

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EXPRESSÃO DE TGF- β 1, METALOPROTEINASES E
AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR E APOPTÓTICO NAS ENDOMETRITES
CRÔNICAS DAS ÉGUAS

CAMILA DIAS PORTO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária, Área de Patologia Veterinária.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

BOTUCATU - SP
Agosto, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Porto, Camila Dias.

Expressão de TGF- β 1, metaloproteinases e avaliação dos índices de proliferação celular e apoptótico nas endometrites crônicas da éguas / Camila Dias Porto. – Botucatu [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientador: Julio Lopes Sequeira

Assunto CAPES: 50501003

1. Égua - Doenças 2. Fibrose endometrial 3. Equino - Patologia

CDD 636.10896

Palavras-chave: Apoptose; Endométrio equino; Metaloproteinase; Proliferação celular; TGF- β 1

CAMILA DIAS PORTO

**EXPRESSÃO DE TGF-B1, METALOPROTEINASES E AVALIAÇÃO DOS
ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTÓTICO NAS
ENDOMETRITES CRÔNICAS DAS ÉGUAS.**

Botucatu, 21 de agosto de 2009.

Banca examinadora:

Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade Estadual Paulista

Prof.^a Adj. Dr.^a Noeme Sousa Rocha

Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade Estadual Paulista

Prof. Adj. Dr. Carlos Alberto Hussni

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade Estadual Paulista

Prof.^a Adj. Dr.^a Louisiane de Carvalho Nunes

Departamento de Medicina Veterinária
Centro de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof.^a Adj. Dr.^a Anaglória Pontes

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu
Universidade Estadual Paulista

"O carinho edifica alicerces da casa, a fim de que, mais tarde, as provas necessárias da vida possam chegar."

(Autor desconhecido)

Dedico este trabalho à minha *FAMÍLIA*, que é meu porto seguro, meu lar, onde sempre posso retornar sem medo de me encontrar e ser julgada. Hoje valorizo e sou valorizada por tudo o que construímos sobre bases sólidas que não constam em currículos e não são adquiridas em instituições de ensino.

"En el mundo ha de haber cierta cantidad de luz, como ha de haber cierta cantidad de decoro. Cuando hay muchos hombres sin decoro, hay siempre otros que tienen en sí el decoro de muchos hombres."

José Martí

***Agradeço** ao meu orientador, Prof. Ass. Dr. Júlio Lopes Sequeira, o qual se mostrou um verdadeiro amigo por todo o tempo de convivência. Admiro seu caráter, ética, integridade e personalidade, existentes somente nas pessoas capazes de me fazerem acreditar na humanidade.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e à espiritualidade, por estarem sempre presentes, ajudando em todos os estágios da Vida, e pela oportunidade de aprender continuamente.

À minha família, por me apoiar nas escolhas que faço, acompanhando os momentos de conquistas e desafios. Agradeço a compreensão pela ausência prolongada, às vezes dolorida, mas necessária. Agradeço por ser o arrimo, nunca deixando me sentir só, mesmo quando as coisas parecem muito difíceis.

Ao Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira, por ter me aceitado como orientada da pós-graduação, pois são anos de convívio. Palavras sempre serão insuficientes para traduzir o que senti quando acreditou que eu pudesse levar um projeto de pesquisa ao seu termo. Agradeço tudo o que ensina, sobretudo o que não se lê em livros ou artigos científicos.

À pós-graduanda Ana Paula Batista Masseno, pela amizade e cooperação durante o período de realização deste projeto.

À Prof.^a Dr.^a Louisiane de Carvalho Nunes (Departamento de Medicina Veterinária, CCA, UFES), por ter me ensinado com desprendimento as técnicas empregadas no mestrado e que foram também utilizadas nesta tese, e principalmente pela amizade, com a qual aprendi que o trabalho em conjunto fica mais fácil de ser executado (e mais gostoso!!).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela outorga da bolsa de doutorado (processo 06/61832-0) e recursos do auxílio à pesquisa (processo 07/54418-5), viabilizando o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Ass. Dr. Deilson Elgui de Oliveira (Departamento de Patologia, FMB, UNESP), sempre solícito, pelo auxílio com a técnica imunoistoquímica.

Ao Prof. Adj. Dr. Marco Antônio Alvarenga (Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP), pelas biópsias uterinas cedidas para a realização do projeto.

Ao Prof. Adj. Sebastião Martins Filho (Departamento de Estatística, Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal de Viçosa), pela disposição e paciência durante a realização da análise estatística.

À Prof^a. Adj. Dr^a. Noeme Sousa Rocha (Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP), pela amizade e exemplo de humildade mesmo com tamanha bagagem de conhecimento. Agradeço toda ajuda que oferece sempre que solicitada, com muita paciência e vontade de ensinar.

Ao Prof. Dr. Alexandre Hataka (FCA, Universidade de Marília), meu amigo e primeiro orientador, por me incentivar na Patologia Veterinária, abrindo as primeiras portas e, principalmente, pelo auxílio no início das atribuições profissionais. Hoje entendo o que é “fazer parte do sistema” e não se deixar corromper.

À Prof.^a Adj. Dr.^a Anaglória Pontes (Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, FMB, UNESP), por ter sido tão solícita no momento da defesa desta tese, mostrando generosidade ao deixar seus afazeres para atender o pedido de última hora. Muito obrigada!

À Prof^a. Adj. Dr^a. Ana Liz Garcia Alves por ceder uma alíquota do anticorpo anti-TGF- β 1 para realização de testes no endométrio equino.

Agradeço a Deus pela oportunidade de (re)encontrar amigos, minha família em Botucatu, que são os amigos do Centro Cristão Espírita “Amor e Luz”, Arnold e Neide Gottschalk, Cristiana Freire, Leonardo Seito, Christiane Peçanhuk da Rocha, Cecília Tilton e família, Maria Luiza Cassetari, Alice, Cidinhas, Ivone e João, Nilza e Roberto, Ione e todos os que fizeram parte da convivência durante esses anos em Botucatu.

Aos amigos Cristiana Freire, Christiane Peçanhuk da Rocha, Leonardo Seito, Ana Paula Batista Masseno, João Ferreira Neto, Celmira Calderón, Rodolfo Françon, Mariana Marras Vidale, pelas conversas sérias e momentos de descontração, que me fizeram pensar sobre a vida além de proporcionarem alegria aos meus dias em Botucatu.

A Gilberto Alves, por me mostrar que defeitos podem ser corrigidos e que ter opinião e expressar idéias é diferente de ser inflexível. Agradeço por me fazer refletir sobre minhas atitudes perante a vida e em relação às pessoas.

Ao técnico de necropsia Maury Raul pela convivência amiga, pelos ensinamentos de vida e profissionalismo e por saber dividir seu conhecimento. Com tanto trabalho, ainda consegue um tempinho para se preocupar em reunir as pessoas e proporcionar momentos de descontração e lanchinhos gostosos!

Ao técnico do Laboratório de Histologia Noel Almeida Melo, pela paciência e por compartilhar sua experiência nas técnicas de coloração.

Aos residentes e ex-residentes do Serviço de Patologia Veterinária Arita Cremasco, Didier Cagnini, Freddi Bardela de Souza, Fabrício Grandi, Lidianne Monteiro, pela ajuda oferecida quando solicitada.

Aos colegas pós-graduandos e residentes da Ornitopatologia (Mariana Marras Vidale, Rodolfo Françon, Fábio Henrique Evangelista, Mário Henrique Bariani, Isabelle Ferreira, Paulo Ricardo Bersano, Adriano Sakai, Guilherme Marietto, Roberta Mazola (Barbie), Taís Donato (Susi), Márcia Moleta Colodel, Luciano Fonseca) que puseram no dia-a-dia da Patologia um pouco mais de humor.

Ao pós-graduando Rodolfo Françon pela ajuda na tabulação dos dados da estatística. Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação Denise Aparecida Fioravanti Garcia, José Roberto de Lalla Júnior e Maria Ap. Dias de Almeida Manoel, pela ajuda, compreensão e pela paciência com que atendem aos alunos.

Aos professores de educação física Íris Duarte, Fernanda Ferrari Spadotto, Zuel Rodrigues Paes Junior (AAF) e Fernanda Gabriel Rocha, que proporcionaram mais que aulas e treinos, mas momentos agradabilíssimos de atividade física e conversas descontraídas.

Às secretárias do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ UNESP, Marlene Dias de Camargo Cais e Izabel Cristina Castro, e funcionárias da FUNVET, Maricília Luzia Rossetto e Ana Maria Basso, pelo auxílio na parte administrativa e convívio amigo.

Às funcionárias da Biblioteca, especialmente do Posto de Atendimento da FAPESP, Rosângela, Malu e Marluci, por toda ajuda oferecida.

Aos estagiários do Serviço de Patologia Veterinária que de alguma forma mostraram-se solícitos e sempre dispostos a ajudar.

E finalmente, àqueles que de alguma forma me ensinaram que viver é vencer um degrau por vez, que acreditar é diferente de credulidade, e que as dificuldades existem para serem superadas, tornando-nos mais fortes e humanos. Com isso, obtemos valores incalculáveis para a evolução, resultados de nosso próprio esforço e dedicação.



AÇÃO DA AMIZADE

A amizade é o sentimento que imanta as almas umas às outras, gerando alegria e bem estar.

A amizade é suave expressão do ser humano que necessita de intercambiar as forças da emoção sob os estímulos do entendimento fraternal.

Inspiradora de coragem e de abnegação, a amizade enflorêce as almas, abençoando-as com resistências para as lutas.

...

Se a amizade fugisse da Terra, a vida espiritual dos seres se esfacelaria.

Ela é meiga e paciente, vigilante e ativa.

Discreta, apaga-se, para que brilhe aquele a quem se afeiçoa.

Sustenta na fraqueza e liberta nos momentos de dor.

Joanna de Ângelis



O Pensamento escolhe. A Ação realiza. O homem conduz o barco da vida com os remos do desejo e a vida conduz o homem ao porto que ele aspira a chegar. Eis porque, segundo as Leis que nos regem, “a cada um será dado segundo suas próprias obras”.

Emmanuel

LISTA DE ABREVIATURAS

α-SMA	Alfa - actina de músculo liso
CTGF	Fator de crescimento para tecido conjuntivo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
FGF	Fator de crescimento para fibroblasto
IFN- γ	Interferon - gama
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina - 1
IL	Interleucina
MMP	Metaloproteinase
PAI	Inibidor do ativador de plasminogênio
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
SGF	Fator de crescimento de sarcoma
TGF- α	Fator de crescimento transformante - alfa
TGF- β	Fator de crescimento transformante - beta
TIMP-1	Inibidor tecidual de metaloproteinase - 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral - alfa
TNFR	Receptor para TNF
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
VEGF	Fator de crescimento para endotélio vascular

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Anticorpos primários utilizados para marcação imunoistoquímica no endométrio de éguas sadias e portadoras de endometrite crônica.....	31
TABELA 2. Distribuição das 60 biópsias de endométrio equino classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986).....	38
TABELA 3. Distribuição das 60 biópsias de endométrio equino classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991).....	40
TABELA 4. Medianas do percentual de fibrose periglandular avaliado por método morfométrico das biópsias endometriais classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986).....	47
TABELA 5. Medianas do percentual de fibrose periglandular avaliado por método morfométrico das biópsias endometriais classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991).....	48
TABELA 6. Medianas da intensidade da marcação imunoistoquímica de TGF- β 1 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986).....	50
TABELA 7. Medianas da intensidade da marcação imunoistoquímica de TGF- β 1 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991).....	52
TABELA 8. Medianas da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-2 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986).....	55
TABELA 9. Medianas da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-2 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991).....	57
TABELA 10. Medianas da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-9 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986).....	60
TABELA 11. Medianas da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-9 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991).....	61
TABELA 12. Médias das porcentagens de proliferação celular nas diferentes estruturas endometriais nas amostras classificadas conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log.....	64

TABELA 13. Médias das porcentagens de proliferação celular nas categorias definidas por Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log..	65
TABELA 14. Médias das porcentagens de células em proliferação nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log.....	67
TABELA 15. Médias das porcentagens de proliferação celular entre as categorias definidas por Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log.....	68
TABELA 16. Médias das porcentagens de células em proliferação nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log.....	70
TABELA 17. Médias das porcentagens de células apoptóticas entre as diferentes estruturas endometriais nas amostras classificadas conforme Kenney & Doig (1986).Valores expressos em log.....	73
TABELA 18. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas categorias definidas por Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log.....	74
TABELA 19. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log.....	77
TABELA 20. Médias das porcentagens de células apoptóticas entre as diferentes estruturas endometriais nas amostras classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log.....	79
TABELA 21. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas categorias definidas por Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log.....	80
TABELA 22. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log.....	81

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Endométrio eqüino - categoria I. Ausência de alterações inflamatórias e fibróticas. Hematoxilina e Eosina. Objetiva: 20x.....	41
FIGURA 2. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Infiltrado inflamatório mononuclear acentuado difuso no estrato esponjoso, associado à dilatação glandular e fibrose periglandular. Hematoxilina e Eosina. Objetiva: 20x.....	42
FIGURA 3. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrose. Grandes ninhos fibróticos, fibrose periglandular acentuada, dilatação glandular e fibrose intersticial. Hematoxilina e Eosina. Objetiva: 20x.....	42
FIGURA 4. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrose. Alterações degenerativas: dilatação glandular, achatamento do epitélio glandular, fibrose periglandular acentuada, fibrose intersticial, fibrose perivascular (seta). Tricrômico de Masson. Objetiva: 20x.....	43
FIGURA 5. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrose. Rarefação glandular, fibrose intersticial acentuada no estrato esponjoso, fibrose perivascular. Tricrômico de Masson. Objetiva: 20x.....	43
FIGURA 6. Endométrio eqüino - categoria I. Distribuição reticular do colágeno do tipo III (verde) e presença do colágeno do tipo I (amarelo) em menor proporção. Picosirius – Polarização. Objetiva: 10x.....	46
FIGURA 7. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrose. Predominância do colágeno do tipo I (amarelo/vermelho) nos ninhos fibróticos e interstício. Picosirius – Polarização. Objetiva: 10x.....	46
FIGURA 8. Endométrio eqüino - categoria IIA. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunoistoquímica para TGF- β 1. A: Imuno-reatividade em células inflamatórias mononucleares no estrato esponjoso. B: Imuno-reatividade em células inflamatórias (ponta de seta) e estromais na região periglandular e perivascular (setas). Objetiva: 20x.....	52
FIGURA 9. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunoistoquímica para MMP-2. Imuno-reatividade intensa e freqüente nas células epiteliais glandulares dilatadas, associadas à fibrose glandular. Presença de marcação heterogênea em algumas glândulas. Objetiva: 10x.....	57

- FIGURA 10.** Endométrio eqüino - categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunoistoquímica para MMP-9. Imuno-reatividade difusa. Reação de intensidade acentuada no epitélio glandular, célula inflamatória (seta) e células estromais superficiais (ponta de seta). Epitélio luminal com positividade segmentar. Objetiva: 40x..... **62**
- FIGURA 11.** Médias das porcentagens de proliferação celular nas diferentes estruturas do endométrio eqüino, nas biópsias classificadas conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade..... **64**
- FIGURA 12.** Médias das porcentagens de proliferação celular no endométrio eqüino de diferentes categorias nas biópsias classificadas conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log..... **65**
- FIGURA 13.** Médias das porcentagens de proliferação celular nas estruturas do endométrio eqüino, nas diferentes categorias definidas de acordo com Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade..... **67**
- FIGURA 14.** Médias das porcentagens da proliferação celular nas estruturas do endométrio eqüino agrupadas por categoria, na classificação conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade..... **68**
- FIGURA 15.** Médias das porcentagens de proliferação celular no endométrio eqüino de diferentes categorias nas biópsias classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log..... **69**
- FIGURA 16.** Médias das porcentagens da proliferação celular nas diferentes estruturas do endométrio eqüino, nas biópsias classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade..... **70**
- FIGURA 17.** Médias das porcentagens da proliferação celular nas estruturas do endométrio eqüino agrupadas de acordo com as características morfológicas, na classificação conforme Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade..... **71**
- FIGURA 18.** Endométrio eqüino - categoria I. Marcação imunoistoquímica para PCNA. Imuno-reatividade freqüente nas células do epitélio glandular e estromais (setas). Objetiva: 40x..... **71**
- FIGURA 19.** Endométrio eqüino - categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunoistoquímica para PCNA. Imuno-reatividade nas células do epitélio glandular e estromais (setas). Objetiva: 40x..... **72**

- FIGURA 20.** Endométrio eqüino - categoria III. Endometrose. Marcação imunoistoquímica para PCNA. Imuno-reatividade esparsa nas células do epitélio glandular. Objetiva: 40x..... 72
- FIGURA 21.** Médias das porcentagens de células apoptóticas nas diferentes estruturas do endométrio eqüino, nas biópsias classificadas conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade..... 74
- FIGURA 22.** Médias das porcentagens de células apoptóticas no endométrio eqüino de diferentes categorias nas biópsias classificadas conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log..... 75
- FIGURA 23** Médias das porcentagens de células apoptóticas nas estruturas do endométrio eqüino, nas diferentes categorias definidas de acordo com Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade..... 77
- FIGURA 24.** Médias das porcentagens de células apoptóticas nas estruturas do endométrio eqüino agrupadas por categoria, na classificação conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade..... 78
- FIGURA 25.** Médias das porcentagens de células apoptóticas nas diferentes estruturas do endométrio eqüino, nas biópsias classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade..... 79
- FIGURA 26.** Médias das porcentagens de células apoptóticas no endométrio eqüino de diferentes categorias nas biópsias classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log..... 80
- FIGURA 27.** Médias das porcentagens de células apoptóticas nas estruturas do endométrio eqüino, nas diferentes categorias definidas de acordo com Ricketts & Alonso (1991). Os valores estão expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade..... 82
- FIGURA 28.** Médias das porcentagens de células apoptóticas nas estruturas do endométrio eqüino agrupadas por categoria, na classificação conforme Ricketts & Alonso (1991). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade..... 82
- FIGURA 29.** Endométrio eqüino - categoria I. Marcação imunoistoquímica para caspase-3 clivada. Imuno-reatividade em célula estromal (seta) e em corpos apoptóticos freqüentes no epitélio glandular (pontas de seta). Objetiva de 40x..... 84

FIGURA 30. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunistoquímica para caspase-3 clivada. Imuno-reatividade esparsa em corpos apoptóticos nas células do epitélio glandular (setas)..... **84**

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL DE MÉTODOS.....	28
4.1. Procedência do material.....	28
4.2. Processamento histopatológico.....	28
4.2.1. Técnicas histoquímicas.....	29
4.2.1.1. Tricrômico de Masson.....	29
4.2.1.2. Picrosirius Red.....	29
4.2.2. Técnica imunoistoquímica.....	30
4.3. Avaliação histopatológica.....	34
4.3.1. Aplicação da classificação das endometrites crônicas equínas.....	34
4.3.2. Avaliação do colágeno.....	35
4.3.2.1. Análise qualitativa.....	35
4.3.2.2. Análise morfométrica.....	35
4.3.3. Avaliação imunoistoquímica.....	36
4.4. Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1. Avaliação histopatológica.....	38
5.1.1. Classificação das endometrites crônicas.....	38

5.1.2. Avaliação histoquímica do colágeno.....	44
5.1.2.2. Picrosirius – Polarização.....	44
5.2. Morfometria do colágeno periglandular	47
5.3. Avaliação imunoistoquímica.....	48
5.3.1. TGF- β 1.....	48
5.3.2. MMP-2.....	53
5.3.3. MMP-9.....	58
5.3.4. Proliferação celular.....	63
5.3.5. Apoptose.....	73
6. DISCUSSÃO.....	85
7. CONCLUSÕES.....	109
8. BIBLIOGRAFIA.....	111
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	125

RESUMO

PORTO, C.D. *Expressão de TGF- β 1, metaloproteinases e avaliação dos índices de proliferação celular e apoptótico nas endometrites crônicas das éguas*. Botucatu, 2009. 124 p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

O presente trabalho teve por objetivos avaliar os índices de proliferação celular e apoptótico, nos endométrios saudáveis, portadores de endometrite crônica e com endometrose por método imunohistoquímico. Ainda, verificou-se a expressão e distribuição do TGF- β 1 e das metaloproteinases (MMP) 2 e 9 e sua relação com os índices de proliferação celular e apoptóticos, além da inter-relação entre esse fator de crescimento e as enzimas colagenolíticas estudadas. Os resultados obtidos foram comparados aos diferentes graus de alteração endometrial das éguas, e os tipos de colágeno presentes e sua proporção nas endometrites crônicas, especificados por técnicas histoquímicas. Foram utilizadas 60 biópsias endometriais classificadas histologicamente de acordo com Kenney e Doig (1986) e segundo as definições de Ricketts & Alonso (1991) para endometrite crônica infiltrativa e endometrose. A avaliação do colágeno foi realizada pelos métodos histoquímicos Tricrômico de Masson e Picrosirius Red - Polarização. Estudo morfo métrico da fibrose periglandular foi realizado utilizando-se a técnica histoquímica do Picrosirius Red - Polarização. Os resultados mostraram que nos endométrios portadores de endometrite grave há deposição de colágeno do tipo III e do tipo I, sendo este predominante. Não houve diferença significativa na extensão da fibrose periglandular entre as endometrites crônicas infiltrativas e endometroses. A expressão do TGF- β 1 foi escassa, presente nos endométrios normais e com alterações inflamatórias e degenerativas, e teve como principal fonte as células inflamatórias, embora tenha mostrado positividade nas células estromais em grande número de amostras, esparsamente. Não foi possível relacionar a presença do TGF- β 1 com a gravidade das endometrites nem com o tipo de apresentação morfológica, tampouco com a proliferação celular e apoptose. A MMP-2 apresentou imuno-reatividade mais intensa nas células do epitélio

glandular nas endometrites da categoria III e parede vascular nos endométrios da categoria I. A MMP-9 apresentou imuno-reatividade menos intensa na parede vascular das biópsias da categoria IIB. Não houve relação na expressão imunoistoquímica das metaloproteinases estudadas com o tipo de endometrite, com a presença do TGF- β 1, nem com os índices de proliferação celular e apoptótico. Não houve diferença nos índices gerais de proliferação celular e apoptóticos entre as diferentes categorias de endométrio nem entre lesões inflamatórias e fibróticas. Entretanto, as células estromais associadas à fibrose mostraram índices proliferativos significativamente menores do que as células estromais não associadas à fibrose. O epitélio glandular mostrou índices menores de proliferação celular nas endometrites graves. Em geral, os índices apoptóticos foram maiores nas células epiteliais e menores nas estromais. Os índices apoptóticos do epitélio glandular foram maiores nas endometrites graves.

Palavras-chave: endométrio equino, proliferação celular, apoptose, metaloproteinase, TGF-beta1

ABSTRACT

PORTO, C.D. *Expression of TGF- β 1, metalloproteinases and evaluation of cell proliferation and apoptosis in chronic endometritis of mares*. Botucatu, 2009. 124 p. Doctorate Thesis, São Paulo State University - UNESP, School of Veterinary Medicine and Animal Science.

The aim of this study was to evaluate the indexes of cellular proliferation and apoptosis in healthy endometrium and with chronic lesions by means of immunohistochemical method. It was also verified the expression and distribution of TGF- β 1 and metalloproteinases (MMP) 2 and 9 and its relation with the rates of cellular proliferation and apoptosis, besides the interrelation between that growth factor and the studied collagenolytic enzymes. The results were compared to the different degrees of endometrial alteration of the mares, and the present types of collagen and its proportion in chronic lesions, specified by histochemical techniques. Sixty endometrial biopsies were classified in agreement with Kenney and Doig (1986) and according to the definitions of Ricketts & Alonso (1991) for infiltrative chronic endometritis and endometrosis. The collagen evaluation was made by Masson's trichrome and Picrosirius Red staining methods. The endometrial periglandular fibrosis morphometric analysis was carried out by using Picrosirius Red stained slides. Deposition of type III collagen and type I collagen was seen in severe endometritis with type I predominance. The chronic infiltrative endometritis and endometrosis didn't show significant difference in the extension of periglandular fibrosis. The expression of TGF- β 1 was scanty, present in normal endometrium and with chronic lesions, and it had as main source the inflammatory cells, although it has shown assertiveness in the stromal cells in a great number of samples, sparsely. It was not possible the correlation of TGF- β 1 with the gravity of endometritis nor with the type of morphologic presentation, either with the cellular proliferation and apoptosis. MMP-2 presented more intense immunoreactivity in the cells of glandular epithelium in the category III endometritis and vascular wall in the category I biopsies. MMP-9 presented less

intense immunoreactivity in vascular wall of the category IIB biopsies. There was no relation in expression of the metalloproteinases studied with the endometritis type, with the presence of TGF- β 1, nor with the rates of cellular proliferation and apoptosis. There was no difference in the general indexes of cellular proliferation and apoptosis among the different endometrium categories nor between inflammatory and fibrotic lesions. However, there was decreased proliferative activity in stromal cells related to the fibrosis than the stromal cells not related to the fibrosis. The glandular epithelium showed lower proliferative activity in severe endometritis. In general, the apoptotic indexes were greater in the epithelial cells and lower in the stromal ones. The apoptotic indexes of glandular epithelium were greater in severe endometritis.

Key words: equine endometrium, cell proliferation, apoptosis, metalloproteinase, TGF-beta1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade nas éguas ainda é causa de grande perda econômica na criação de eqüinos por inviabilizar a produção de um potro por égua a cada ano (AMARAL, 2002, EIGENHEER-MOREIRA et al., 2007).

Dos últimos 50 anos até hoje, a endometrite é considerada uma das principais causas de infertilidade nas éguas, além de ser o problema de maior importância clínica nos eqüinos depois da cólica e das enfermidades do trato respiratório (TRAUB-DARGATZ et al., 1991; TROEDSSON, 1999; LIU & TROEDSSON, 2008).

Várias podem ser as causas de endometrite, e incluem-se a endometrite aguda associada à infecção venérea, endometrites infecciosas crônicas, endometrite persistente pós-monta e endometrites crônicas degenerativas, também denominadas endometroses (FUMUSO et al., 2003).

Por décadas, o valor da biópsia endometrial na avaliação da subfertilidade e infertilidade em éguas é reconhecido internacionalmente. Especialmente em éguas que não apresentam sinais clínicos ou têm dificuldade para emprenhar, a investigação histopatológica tem demonstrado importância diagnóstica e prognóstica, tornando a biópsia o método mais preciso por permitir a avaliação da situação morfofuncional do endométrio (DOIG et al., 1981; SCHOON & SCHOON, 2003).

Por serem os padrões de distribuição da fibrose e do infiltrado inflamatório as principais características para o diagnóstico das endometrites, Kenney (1978) propôs um sistema de classificação para esta enfermidade, posteriormente modificado por Kenney & Doig (1986). Outras classificações também são utilizadas, como a descrita por Ricketts & Alonso (1991), que procura separar entidades distintas de acordo com o padrão morfológico da doença.

Estudos sobre a classificação dos tipos de colágeno e tipificação do infiltrado inflamatório procuram caracterizar o processo (NUNES, 2003), enquanto pesquisas mais recentes envolvendo enzimas envolvidas na degradação da matriz extracelular, a caracterização das células que estão

presentes na fibrose periglandular e sua associação com fatores que promovem a fibrólise buscam elucidar parte de sua patogênese ainda não totalmente compreendida (NUNES, 2006; PORTO, 2006; MASSENO, 2009).

Sabe-se que os processos inflamatórios e fibróticos apresentam condições distintas do tecido normal, as quais levam a modificações do padrão de proliferação celular e morte por apoptose, associadas a diferentes fatores solúveis liberados no meio (CHUJO et al., 2009). No entanto, poucos são os trabalhos que associam mediadores químicos e estudos da proliferação celular e apoptose nas endometrites crônicas das éguas.

Conhecer as interações celulares e moleculares na inflamação e fibrose que ocorrem no útero equino pode ser útil para proporcionar bases para o desenvolvimento de novas terapias específicas num futuro próximo.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A endometrite é a principal causa de redução da fertilidade em éguas sendo considerado o problema de maior importância clínica nos eqüinos depois da cólica e das enfermidades do trato respiratório, e responsável pela redução na produção anual de potros produzindo grandes perdas econômicas (TRAUB-DARGATZ et al., 1991; TROEDSSON, 1999; LIU & TROEDSSON, 2008).

Os mecanismos de defesa uterinos são complexos e a falha nestes mecanismos leva à inflamação persistente que pode resultar em luteólise prematura e perda embrionária (KATILA, 1996; TROEDSSON, 1999).

A biópsia endometrial fornece informações valiosas com relação à redução da inflamação após o tratamento, se a égua é portadora de degeneração, que afeta a limpeza uterina e o fluxo sanguíneo e se terapia adicional é necessária. Os achados da camada mucosa próxima ao epitélio, alterações no tamanho e forma epiteliais, grau do edema endometrial considerando a fase do ciclo estral, angiose, lacunas linfáticas, fibrose periglandular, figuras mitóticas no epitélio glandular e degeneração glandular, são informações associadas a processos patológicos específicos e a presença de cada uma dessas alterações dita uma estratégia terapêutica distinta. Éguas com edema endometrial excessivo podem possuir incompetência cervical, defeitos na drenagem uterina ou inflamação crônica. Angiose ocorre em conjunto com lacunas linfáticas e indica que o fluxo sanguíneo no endométrio está anormal e a drenagem pode estar prejudicada. Degeneração glandular cística ou figuras mitóticas no epitélio glandular podem estar associadas à inflamação crônica ou irritação endometrial (LEBLANC, 2008).

Estudos mais recentes, comparando a biópsia endometrial a outras técnicas diagnósticas, concluem que a biópsia endometrial ainda é o método mais sensível e específico para o diagnóstico de endometrite na égua (LIU et al., 2008). Portanto, a biópsia endometrial é o método definitivo para o diagnóstico da endometrite crônica e o prognóstico da fertilidade (MEDICE et al., 1991). Kenney (1978), baseando-se na intensidade das alterações

fibróticas e inflamatórias endometriais propôs um sistema de classificação das endometrites crônicas em categorias, considerando a possibilidade de a égua manter a gestação. Posteriormente, Kenney & Doig (1986) modificaram esta classificação, principalmente no que diz respeito a avaliação da fibrose endometrial, e sua relação com a manutenção da prenhez e a resposta do animal à terapia. Outros autores também propuseram sistemas de classificação para as endometrites. Ricketts & Alonso (1991) observaram que as endometrites poderiam estar ou não acompanhadas por infiltrado mononuclear, denominando de endometrite crônica infiltrativa as que apresentavam sinais de inflamação e de doença endometrial degenerativa crônica, ou endometrose, aquelas em que estavam presentes apenas alterações fibróticas com ausência de células inflamatórias.

A fibrose é um dos principais elementos da reação endometrial, sendo, portanto, relevante a determinação de seu arranjo, localização e composição para se avaliar o grau de comprometimento do endométrio e as chances de regressão da lesão já estabelecida (NUNES, 2003).

A avaliação do grau de fibrose endometrial é importante, pois, ao contrário das alterações inflamatórias, é permanente. Nestas lesões a deposição de colágeno ocorre mais comumente ao redor das glândulas ou associada à membrana basal (KENNEY & DOIG, 1986). Essa alteração compromete a integridade e a função das glândulas endometriais, estruturas necessárias desde o período de pré-implantação embrionária até o desenvolvimento placentário completo, por serem responsáveis pela síntese e secreção de substâncias histotróficas (GRAY et al., 2001).

Porto (2006) verificou que, entre as lesões encontradas nas endometrites mais graves, as alterações fibróticas foram as mais freqüentemente observadas, sendo verificadas nas regiões periglandular, intersticial e perivascular.

Evans et al. (1998) asseguram que a morfometria realizada com auxílio de programa computacional de biópsias uterinas pode ser incorporada ao diagnóstico e avaliação da fibrose endometrial das éguas. Em conjunto com a avaliação histopatológica, a determinação da porcentagem de colágeno periglandular endometrial permite conhecer com maior precisão a fibrose periglandular no endométrio.

Nunes (2003), estudando o padrão de distribuição e tipos de colágeno nas endometrites crônicas, observou maior concentração de colágeno nas regiões periglandular e perivascular e no estrato esponjoso. Ao relacionar a gravidade da endometrite com a distribuição do colágeno, concluiu que quanto maior o grau, mais acentuado foi o acúmulo de colágeno ao redor das glândulas. Verificou também, empregando a técnica do Picrosirius – Polarização, que o colágeno do tipo I foi mais freqüente nas lesões fibróticas periglandulares nas biópsias que apresentavam lesões mais graves. Esses achados foram posteriormente corroborados por Nunes (2006) e Porto (2006), sendo que neste trabalho foi utilizado, além da técnica do Picrosirius - Polarização, o método da Reticulina para a diferenciação dos tipos de colágeno pela afinidade com a prata.

Hoffmann et al. (2009) relatam que as células estromais da fibrose periglandular são aptas a secretar componentes da matriz extracelular e fibronectina, contribuindo ainda mais para o acúmulo da matriz nesta região. Estes mesmos autores afirmam que algumas destas células expressam moléculas que as caracterizam fenotipicamente como miofibroblastos, ao mesmo tempo em que expressam receptores hormonais de forma inadequada. Como resultado as células estromais do foco fibrótico tornam-se incapazes de responder aos estímulos endócrinos cíclicos e tornam-se independentes dos mecanismos de controle hormonais do útero.

No processo fibrótico, há a substituição dos depósitos de ácido hialurônico e fibronectina, que ocorrem desde o início do processo inflamatório, por colágeno tipo I e III principalmente. Outros tipos de colágeno também são encontrados nesses processos, porém em menor quantidade. O tipo de colágeno presente expressa a cronologia da lesão, já que o colágeno tipo III é o primeiro a ser depositado durante os processos reparativos e fibróticos em geral, sendo posteriormente substituído pelo do tipo I (MARTINEZ-HERNANDES, 1999; BOCHSLER & SLAUSON, 2002). Um método utilizado para essa tipificação é o Picrosirius Red, que diferencia os colágenos pela intensidade da birrefringência das fibras em microscópico óptico de luz polarizada. Dessa forma, diferentes tonalidades são observadas conforme o tipo de arranjo molecular presente (JUNQUEIRA et al., 1978; MONTES & JUNQUEIRA, 1991; BORGES et al., 2007). Este tipo de avaliação se torna

importante, pois em lesões granulomatosas com fibrose persistente ocorre formação progressiva de pontes de ligação de colágeno e conseqüente bloqueio de sítios de reação com as enzimas colagenolíticas, o que impede a degradação das moléculas de colágeno (ANDRADE et al., 1999). No endométrio eqüino, é citado que o Picrosirius Red é uma técnica histoquímica promissora, que em conjunto com sistemas de análise computacionais tem sido utilizada para a avaliação da fibrose (SCHLAFER, 2007).

Nunes (2003) observou que à medida que a lesão endometrial piora há substituição progressiva do colágeno tipo III por colágeno do tipo I na região periglandular, corroborado por Nunes (2006) e Porto (2006). Troedsson (1999) denomina a fibrose periglandular associada à dilatação glandular como endometrose ou endometrite degenerativa crônica, sendo esta uma condição observada não só em éguas suscetíveis a endometrite persistente, mas também naquelas mais idosas sem histórico conhecido de inflamação. Isto sugere um processo fibroplásico degenerativo do endométrio e, portanto, muito mais uma conseqüência do envelhecimento do que da inflamação uterina. Walter et al. (2001) citam que a endometrose é uma das razões mais freqüentes da infertilidade em éguas, levando a alterações graves do tecido conjuntivo uterino e das glândulas.

Em um estudo realizado por Abd-Elnalim et al. (2006) foi constatado que nas éguas com endometrose houve o desenvolvimento anormal da placenta, com malformação nos microplocentomas. Concomitantemente, pôde ser verificado que o índice ponderal dos fetos dessas éguas foi menor do que os de éguas jovens primíparas. Os autores afirmaram que esse menor índice nos fetos das fêmeas com endometrose indica que o déficit deve-se ao desenvolvimento microcotiledonário sub-ótimo nas porções do alantocócion posicionadas particularmente nas regiões fibróticas do endométrio, juntamente com a reduzida quantidade de histotrofo produzida por glândulas endometriais degeneradas. Também, o peso fetal bastante diminuído pôde ser notado precocemente.

Para que se entenda o mecanismo patológico da fibrose é necessário que, primeiramente, se compreenda o funcionamento normal dos mecanismos de interação da matriz extracelular.

A regulação da composição desta matriz promove a integridade dos tecidos e fornece sinais bioativos que podem afetar o comportamento celular (BRUNER et al., 1995).

A resposta à injúria tecidual envolve complexa inter-relação de diversos elementos humorais e do tecido conjuntivo que limita a lesão e acaba restabelecendo a integridade tissular (BUCKLEY, et al., 2001).

Entre os fatores de crescimento conhecidos, aqueles que têm função proeminente na cicatrização são os pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformante β , ou TGF- β . Essas proteínas regulam uma ampla variedade de funções biológicas, incluindo a proliferação celular, apoptose, diferenciação, adesão, imuno-regulação, produção de matriz extracelular, angiogênese e gênese tumoral. Essa superfamília compreende perto de 100 proteínas distintas, todas homólogas, com pelo menos uma região similar na seqüência dos aminoácidos. O TGF- β é uma proteína produzida predominantemente por células T, sendo, no entanto expresso de forma ubiqüitária pelas células do organismo animal. Outras principais fontes são plaquetas, neutrófilos, ossos, placenta, rins, endométrio e células malignas (CHIN et al., 2004; LU et al., 2005; WILGUS et al., 2008). Durante a fase precoce da cicatrização, os macrófagos são as principais fontes de TGF- β (KAPOOR et al., 2006).

O TGF- β foi descoberto em 1983, como substância derivada da placenta, por cientistas que estudavam fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e fatores de crescimento epidermais (EGF, TGF- α). Este fator foi identificado devido sua capacidade em “transformar” fibroblastos de ratos. Inicialmente era denominado fator de crescimento de sarcoma (SGF). Posteriormente, reconheceram-se dois fatores distintos – TGF- α e TGF- β . O TGF- α é atualmente chamado de EGF e geralmente estimula a proliferação em uma ampla variedade de tipos de células epiteliais (CHIN et al., 2004; HSU & CHANG, 2004).

Nguyen et al. (2005) afirmam que o TGF- β 1 acelera a diferenciação espontânea de monócitos em macrófagos, tendo papel importante no processo inflamatório. Especificamente no processo inflamatório, Ogawa et al. (2004) citam que o TGF- β é um modulador imune multifuncional que tem função essencial na manutenção da homeostasia do sistema imune,

porque coordena eventos críticos para a progressão e modulação das respostas inflamatórias. Essa ação envolve o recrutamento de células inflamatórias, a ativação de linfócitos, a modulação da função de macrófagos e a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, monócitos e linfócitos.

Nos processos de reparo tecidual e cicatrização essa superfamília é considerada como crucial. O TGF- β é expresso em altos níveis durante o remodelamento e influencia significativamente a formação do tecido conjuntivo. O excesso desse fator durante a cicatrização cutânea pode causar fibrose. Além disso, a administração sistêmica e local de TGF- β 1, 2 e 3 aumenta a taxa de reparo tecidual e a força tensora nas cicatrizes. Com o bloqueio do TGF- β nas feridas de pele há diminuição da formação de cicatriz (LU et al., 2005). Durante o processo reparativo, o TGF- β tem ainda as funções de mediar a quimiotaxia de monócitos, linfócitos, neutrófilos e fibroblastos. Esse fator de crescimento é um potente estimulante da produção de matriz extracelular *in vivo* e está envolvido na síntese de colágeno pelos fibroblastos (KAPOOR et al., 2006).

O TGF- β 1 regula muitas respostas biológicas, incluindo a angiogênese, quimiotaxia, progressão do ciclo celular, diferenciação e apoptose. Essa citocina também está relacionada à regulação do remodelamento da matriz extracelular, expressão de genes do colágeno e degradação de proteínas da matriz durante o processo de injúria tecidual e reparo (WANG et al., 2005; HASSOUN et al., 2009).

O TGF- β 1 é considerado o principal mediador químico na fibrose em todos os órgãos. Entretanto, em alguns casos, como na fibrose intestinal, esse fator não está relacionado diretamente à proliferação de fibroblastos. No entanto, desempenha esta função de forma indireta devido a sua capacidade de aumentar a expressão de receptores para o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), aumentar a síntese de fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e promover a expressão do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1). Dessa forma, a função do TGF- β 1 estará mais relacionada à diferenciação celular e à secreção de fatores solúveis do que com a proliferação celular (RIEDER & FIOCCHI, 2008).

Fujiwara et al. (2005) relatam que a síntese de colágeno aumentou em cultivo de fibroblastos normais e também naqueles obtidos de quelóide como resultado do estímulo exercido pelo TGF- β 1 e diminuiu pelo tratamento com anticorpo neutralizante anti-TGF- β 1. Esse resultado deveu-se a diminuição na produção de MMP-1 e aumento na síntese de TIMP-1, já que um dos mecanismos de regulação das proteases que regulam a degradação da matriz é pela liberação de fatores solúveis, entre eles o TGF- β 1. Esses autores citam que a MMP-1 é necessária para a contração da matriz e sugerem que tanto a MMP-1 quanto a MMP-2 podem desempenhar função importante na migração e invasão de fibroblastos durante a formação do quelóide. Citam também que a expressão de TIMP-1 poderia contribuir diretamente para o acúmulo de matriz extracelular pela inibição de sua degradação, porque o TIMP-1, além de ser o inibidor mais ativo da maior parte das formas ativas de MMP, também tem sido relacionado a outros efeitos como proliferação celular e apoptose.

Dos fatores que estão envolvidos no processo de fibrogenênese, o TGF- β 1, interleucina-1 beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) são aqueles capazes de induzir nos miofibroblastos presentes nos focos fibróticos a sua mobilidade característica, além da capacidade de proliferação e de síntese de matriz extracelular. Entretanto, é a presença do TGF- β 1 que mais se relaciona com a extensão da fibrose e a indução de células miofibroblásticas (FORBES et al., 2004; GARRETT, et al., 2004; KASAI et al., 2005). Estudos prévios já demonstraram a presença de miofibroblastos e buscaram sua relação com o processo fibrótico no endométrio das éguas (WALTER et al., 2001; MASSENO, 2009). Os miofibroblastos são fibroblastos diferenciados com função contrátil e fonte de colágeno fibrilar e fatores solúveis que influenciam a fibrose (ARTHUR, 2000; HOLT et al., 2008). Outros trabalhos relatam ainda que em várias doenças fibróticas, como a fibrose renal, hepática e pulmonar, o TGF- β 1 promove a transição de células epiteliais para células mesenquimais, apresentando fenótipo de miofibroblastos. Esse processo é denominado transição epitelial-mesenquimal, e ocorre sob condições patológicas como a cicatrização. Durante a transição epitelial-mesenquimal há a dissociação de junções de aderência celular e desmossomos concomitantemente ou em momento próximo ao rearranjo do citoesqueleto, com aumento de RNAm para

proteínas filamentosas, possibilitando a promoção do fenótipo mesenquimal. Nesse processo, o TGF- β 1 diminui a expressão de E-caderina, uma proteína transmembrana cujo domínio extracelular interage com outro domínio extracelular da molécula de E-caderina da célula adjacente. Assim, esta proteína desempenha papel crítico para uma adesão celular estável, mantendo a polaridade celular e a estabilidade epitelial. O complexo de caderinas evita a desagregação de células epiteliais, e com isso, o evento fundamental para a transição epitelial-mesenquimal é a desregulação de E-caderina. Ainda, a transição do fenótipo epitelial ao mesenquimal iniciado pelo TGF- β 1 é acompanhada pela expressão aumentada do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (GARRETT, et al., 2004; KASAI et al., 2005).

Promover a indução do CTGF é uma das atividades bem conhecidas do TGF- β 1, estando aquele fator envolvido na manutenção da fibrogênese (KASAI et al., 2005). O CTGF é uma proteína produzida por fibroblastos sob estímulo do TGF- β 1. Como o TGF- β , o CTGF atua como um agente quimioatrativo e mitogênico e também estimula a produção de componentes da matriz extracelular. O gene do CTGF é ativado pelo TGF- β e medeia muitas atividades de fibroblastos estimulados pelo TGF- β . Estando a matriz colágena sob controle do CTGF, o TGF- β 1 tem capacidade de gerar força tracionadora nos fibroblastos presentes (DANIELS et al., 2003; HORAN et al., 2005).

O TGF- β regula a expressão de proteínas da matriz extracelular, incluindo os colágenos fibrilares e a fibronectina. O TGF- β também suprime a degradação da matriz extracelular pela inibição da expressão de metaloproteinases e proteases serina, e aumentando a expressão dos inibidores de proteases tais como os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e inibidores do ativador de plasminogênio (PAIs). Dessa maneira, o TGF- β é considerado um potente fator anabólico que aumenta a deposição de tecido conjuntivo e o reparo tecidual (JAVELAUD & MAUVIEL, 2004).

Kim et al. (2005) citam que o TGF- β 1 estimula a produção de MMP-9 em queratinócitos, odontoblastos, fibroblastos humanos e células neoplásicas. Esses pesquisadores investigaram a ação do TGF- β 1 nas células epiteliais da córnea humana, e observaram que essa citocina estimulou a produção de MMP-9 em uma relação dose-dependente. A MMP-9 estimulada

pelo TGF- β 1 pode mediar a migração de células epiteliais durante a cicatrização e envolve a patogênese das doenças na superfície ocular tais como ulceração e ceratoconjuntivite seca.

O TGF- β 1 também tem função importante no desenvolvimento da fibrose hepática. Essa citocina aumenta a expressão dos colágenos do tipo I, do tipo II e do tipo III pelas células estreladas hepáticas, além de estimular estas células a aumentar a expressão da MMP-2. Os efeitos pró-fibrogênicos do TGF- β 1 estão aumentados para proteger a matriz extracelular da degradação. O TGF- β 1 regula a produção de MMPs, mas este efeito é diferente de acordo com o tipo molecular de MMP (MIGITA et al., 2006; WANG et al., 2006).

É relatado que o TGF- β 1 aumenta a expressão de MMP-2 enquanto diminui a da MMP-1 e MMP-3. Resultados de um estudo realizado por Wang et al. (2006) demonstraram que o TGF- β 1 aumentou a expressão da MMP-2 ativa e da pró-MMP-2 nas células estreladas hepáticas durante a fibrose hepática.

O TGF- β já foi detectado no endométrio da mulher, e é um potencial regulador das funções reprodutivas e pode atuar no crescimento e funcionamento uterino (DUMONT et al., 1995; ARICI et al., 1996; GODKIN & DORÉ, 1998). Rodriguez et al. (2008) relatam que, em primatas, este fator de crescimento tem sido relacionado com a indução da apoptose induzida por hormônio no ovário e do epitélio uterino. Ganjam & Evans (2006) pesquisaram a presença do TGF- β 1 no endométrio das éguas utilizando a técnica do ELISA sanduíche, e observaram que a quantidade desse fator de crescimento aumenta de acordo com a gravidade da endometrite, sugerindo que a magnitude da fibrose periglandular no endométrio eqüino esteja relacionada a esse fato. Entretanto, Cadario et al. (2002), observaram que, utilizando *Real Time* PCR, não houve diferenças significativas na expressão de RNAm nos endométrios com alterações degenerativas.

Em casos específicos, são necessários estudos para que se entenda o processo de fibrose, já que não está totalmente compreendido se este se desenvolve a partir da inflamação ou se pode ocorrer de forma independente, total ou parcialmente, tendo a inflamação somente como gatilho. A partir do momento em que a causa estiver determinada, haverá melhores

condições para se estabelecer uma intervenção terapêutica anti-inflamatória, tendo como alvo o sistema imune ou então as células ou produtos da linhagem mesenquimal (RIEDER & FIOCCHI, 2008).

A inibição da produção de matriz tem sido o principal alvo das terapias antifibróticas até o momento. Alguns meios têm sido testados, como o bloqueio direto da síntese da matriz extracelular, ou indiretamente pela inibição da atividade do TGF- β 1, a principal citocina fibrogênica. No fígado, inibidores da síntese de colágeno, que atuam sobre a enzima prolilhidrolase, estão entre os primeiros componentes antifibróticos testados, mas com sucesso limitado. Atualmente, tem-se estudado a regulação da expressão de genes que regulam a síntese de colágeno. No tratamento do quelóide, o anticorpo anti-TGF β 1 pode ter potencial terapêutico pela inibição da síntese de colágeno pelo bloqueio do efeito de TGF- β 1 e também por acelerar a degradação dos colágenos do tipo I e do tipo III promovendo a produção de MMP-1. Dessa forma, antagonistas do TGF- β têm sido amplamente testados devido a essa citocina apresentar duplo efeito sobre a matriz extracelular: o de inibir a produção ou acelerar sua degradação. Vários antagonistas do TGF- β estão sendo desenvolvidos e poderão ser testados em breve (FUJIWARA et al., 2005; FRIEDMAN, 2008).

Além do TGF- β , outros fatores também exercem funções importantes para a manutenção da homeostasia da matriz extracelular nos diferentes tecidos.

A matriz extracelular representa um complexo dinâmico de macromoléculas no qual se incluem o colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas. Alterações fisiológicas ou patológicas nessa matriz resultam no desequilíbrio da degradação e síntese desses componentes da matriz (UENO et al., 1996).

As metaloproteinases são uma família de enzimas que degradam alguns componentes da matriz extracelular como proteoglicanos, glicoproteínas e colágenos da membrana basal. Acredita-se que esse grupo de enzimas desempenha papel fundamental no remodelamento e reparo em vários processos (OSTEEN et al., 1994; YOKOTA et al., 2002).

As MMPs estão envolvidas em vários processos fisiológicos de remodelamento tecidual, mas em geral estão associadas a condições

patológicas como invasão tumoral, processos fibróticos (ZHANG & SALAMONSEN, 2002).

Juntas, as metaloproteinases são capazes de degradar a maior parte das proteínas da matriz extracelular e regular a atividade de outras proteases, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e receptores celulares. Portanto, as MMPs têm complexas funções, atuando na modulação do comportamento celular normal, nas comunicações célula-célula, bem como em condições patológicas (MATHISEN et al., 2006; MEIJER, et al., 2007).

Os produtos resultantes da clivagem do colágeno são rapidamente desnaturados em gelatinas, que posteriormente serão degradadas pelas gelatinases. Estas últimas são também conhecidas como colagenases do tipo IV, e degradam preferencialmente colágeno desnaturado e componentes da membrana basal (POLETTE et al., 2004; NEWBY, 2006).

Alguns membros da família, como a MMP-2 (ou gelatinase A), são expressos em tecidos normais, tendo papel na sua homeostasia. No entanto, a maioria das MMPs não é expressa nessa condição. Para que ocorra tal fenômeno, é necessário que essas enzimas sejam ativadas nas condições patológicas. Nestes locais, células ativadas expressam várias MMPs de forma concomitante. A produção dessas enzimas é regulada por sinais específicos que são temporariamente limitados e espacialmente confinados, tendo fatores e citocinas que induzem (IL-1, TNF- α , TGF- α , EGF, FGF e PDGF) ou suprimem (TGF- β e IL-4) a transcrição dos genes de MMP (BIRKEDAL-HANSEN, 1995; RA & PARKS, 2007).

Nos processos patológicos progressivos, como a fibrose hepática, há excesso de deposição de proteínas da matriz no espaço extracelular podendo resultar em cirrose. Esse processo está relacionado à regulação da síntese e degradação de matriz. Nestas lesões, ocorre deposição de uma rede de matriz fibrilar, constituída principalmente por colágenos tipo I e III, relativamente resistentes à atividade das proteases. As células estreladas hepáticas quando ativadas, exibindo fenótipo de miofibroblastos, secretam pro-MMP-2, induzidas pela presença de colágeno do tipo I, o principal no fígado fibrótico. A pro-MMP-9, no fígado, tem como principal fonte as células de Kupffer ativadas (ARTHUR, 2000).

As metaloproteinases são responsáveis pela renovação e degradação da matriz extracelular, contudo a degradação da matriz não é a principal função dessas enzimas. Vários estudos recentes têm demonstrado que várias MMPs atuam em proteínas não pertencentes à matriz, como citocinas, quimiocinas, receptores e peptídeos antimicrobianos. Portanto, as MMPs não devem ser vistas como proteinases que exercem exclusivamente uma ação catalítica, mas também como enzimas de processamento extracelular, envolvidas na regulação célula-célula e sinalização de eventos célula-matriz. Dessa forma, as MMPs podem ativar, desativar ou modificar a atividade de moléculas sinalizadoras, direta ou indiretamente (PAGE-MCCAW et al., 2007; RA & PARKS, 2007).

A MMP-2 já foi encontrada, na sua forma inativa, em fígados saudáveis (ZHOU et al. 2004). Entretanto, Hemmann et al. (2007) citam que no fígado normal o RNAm e a pró-proteína de MMP-2 são dificilmente encontrados, e que quando induzida a fibrose, há um aumento na expressão desse RNAm. Os mesmos autores afirmam que a MMP-2 é um fator autócrino de proliferação e migração para as células estreladas hepáticas. Outros autores também relatam a presença de maior atividade da MMP-2 na fibrose intersticial cardíaca, e sua inibição diminui essa alteração (MATSUSAKA et al., 2006).

Fisiologicamente, no útero das éguas há uma subpopulação de células trofoblásticas (*chorionic girdle cells*) que desenvolve um fenótipo altamente invasivo durante a formação da cinta coriônica. A invasão dessas células durante a formação da cinta coriônica é dependente da ação de metaloproteinases (VAGNONI et al., 1995; ALLEN et al., 2007).

Trabalhos recentes têm investigado a participação da MMP-2 e da MMP-9 no processo fibrótico endometrial das éguas. Porto et al. (2005) observaram marcação imunoistoquímica para essas enzimas em diferentes tipos celulares no endométrio de éguas portadoras de endometrite crônica: A imuno-reatividade para MMP-2 foi constatada nas células do epitélio luminal e glandular, além da parede vascular. A expressão da MMP-9 foi detectada nas células do infiltrado inflamatório presentes na periferia de glândulas fibróticas. Walter et al. (2005) também observaram imuno-reatividade para MMP-2 na fibrose periglandular de éguas com endometrose. Posteriormente, Porto (2006)

constatou que a análise da presença de MMP-2 nas endometrites severas indica que a intensidade da imunomarcação para esta enzima tende a aumentar no epitélio glandular conforme aumenta a gravidade da lesão endometrial e, por conseguinte, a deposição de colágeno, e foi sugerido que esse fenômeno talvez contribua para a modificação da secreção glandular no endométrio das éguas, constatada por Walter et al. (2001) empregando a técnica de lectinaistoquímica. No mesmo trabalho realizado por Porto (2006), na parede vascular foi observado fenômeno inverso. Nesta região, a intensidade da imunomarcação para a enzima MMP-2 foi inversamente proporcional ao aumento da gravidade da lesão endometrial, e conseqüentemente à deposição do colágeno. Este achado poderia estar associado à presença de mediadores químicos liberados por células perivasculares, fonte de interleucinas, e outros mediadores químicos (PORTO, 2006). Outros estudos sugerem que a presença de mediadores da inflamação, fatores de crescimento específicos e padrões dos filamentos intermediários podem ajudar a caracterizar as lesões endometriais (SCHLAFER, 2007). Investigações a respeito da inter-relação entre citocinas e outros fatores pró-inflamatórios com as metaloproteinases são necessárias para que se entenda melhor o papel das MMP na região da parede vascular do endométrio eqüino (PORTO 2006), bem como em outras localizações, e sugere que a expressão de MMP-2 pode estar relacionada à deposição do colágeno do tipo I, que é mais espesso, no endométrio eqüino (NUNES, 2006). Sabe-se que a MMP-2, além de apresentar atividade proteolítica e degradar colágeno desnaturado, gelatinas e várias moléculas da matriz extracelular, incluindo laminina e colágenos amorfos como do tipo IV, V e XI, digere os colágenos do tipo I, II e III de maneira semelhante às collagenases (MURPHY & NAGASE, 2008).

Nunes (2006), ao estudar a imunomarcação de MMP-9 no endométrio de éguas notou expressão significativamente maior no epitélio glandular e na parede vascular em endometrites classificadas como grau III segundo Kenney & Doig (1986). Porto (2006) também verificou marcação de MMP-9 no epitélio luminal, nas células endoteliais, leucócitos, epitélio glandular, parede vascular e células estromais. Neste trabalho, a parede vascular mostrou menor intensidade de reação para MMP-9 nas endometrites crônicas infiltrativas; por sua vez, as células inflamatórias apresentaram

intensidade de reação maior nas amostras de endométrio hígido e de endometrite crônica infiltrativa do que nas endometroses, e foi sugerido que os processos endometriais degenerativos são mais graves por haver a tendência a diminuição da expressão das enzimas colagenolíticas e, conseqüentemente, maior deposição de colágeno. Deve-se destacar que a MMP-9 é produzida principalmente por leucócitos, entre eles linfócitos e macrófagos, que a secretam após estímulos pró-inflamatórios (ABRAHAM et al., 2005; BERGIN et al., 2005). Nunes (2003) observou que linfócitos T estavam presentes nas endometrites crônicas das éguas e que sua população é maior nas lesões mais graves; linfócitos B também foram encontrados, porém em menor número e não houve diferença em relação à gravidade do processo. Macrófagos puderam ser notados em 50,65% das amostras de endométrio de éguas, contudo não havia relação com o agravamento da lesão endometrial. No entanto, Porto (2006) constatou que as células inflamatórias estavam ausentes ou em quantidades discretas nos processos degenerativos do endométrio. Freitas et al. (1999) relacionaram a presença da MMP-9 ao ciclo menstrual em mulheres. Estes autores detectaram forte marcação para MMP-9 em células arredondadas ou alongadas distribuídas pelo estroma. As primeiras encontravam-se freqüentemente agrupadas e próximas ao epitélio glandular, sendo a maioria delas positivas para CD68, marcador específico de macrófagos.

A avaliação específica e objetiva da proliferação celular e dos componentes da matriz extracelular utilizando-se a biópsia do endométrio eqüino poderá ser de grande valor para o estudo de condições patológicas e para avaliação do prognóstico de fertilidade (MANSOUR, 2000).

A prática da histopatologia envolve o acesso direto ou, mais comumente, indireto à proliferação celular e fenômenos correlatos, como por exemplo a diferenciação celular, em várias situações (HALL & LEVISON, 2000).

Os eventos da fase mitótica fazem parte de uma pequena porção do ciclo celular total; em uma célula típica de um mamífero, essa fase dura menos de uma hora. As células em crescimento permanecem a maior parte do tempo entre divisões celulares, chamada interfase, que inclui a fase G1, S e G2. Na fase S (S=síntese) ocorre a duplicação do DNA. Essa fase é precedida

pela fase G1, que separa a fase S da mitose prévia (fase M) e ocorre o início da síntese. A fase S é seguida pela fase G2, intervalo para a próxima fase mitótica. Algumas células podem permanecer por longos períodos na fase G1 e são chamadas células no estado G0 (BECKER et al., 2000; HALL & LEVISON, 2000).

Os anticorpos têm se tornado um importante meio para a avaliação da proliferação celular. Uma vantagem particular do método imunistoquímico é a possibilidade de identificar as células em proliferação determinando sua localização no tecido normal e nas áreas de lesão. A imunomarcagem com Ki-67 tem sido amplamente empregada. Este anticorpo reconhece um antígeno nuclear associado ao ciclo celular que é expresso em todas as fases exceto a G0. Entretanto, o Ki-67 tem algumas limitações quanto ao seu uso, pois o antígeno é muito sensível aos fixadores e pode deteriorar com o tempo mesmo quando o material é estocado a -20°C. Outro anticorpo bastante utilizado para a pesquisa de células em proliferação é o PCNA. O PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) é uma proteína bem conservada durante a evolução das espécies e encontrada em todos os eucariotos. Uma das funções dessa proteína é fazer a replicação do DNA. O PCNA foi originalmente descrito como um antígeno de doença autoimune e posteriormente foi associado à proliferação celular. Desde então, tem sido útil como marcador biológico para o estudo de células em proliferação. Anticorpos monoclonais que reconhecem o PCNA têm sido usados em materiais citológicos e histológicos, inclusive em material parafinado, com resultados comparáveis aos obtidos com a técnica da citometria de fluxo (HALL & LEVISON, 2000; STOIMENOV & HELLEDAY, 2009).

O endométrio consiste de populações celulares que sofrem constantes renovações. A proliferação celular, as alterações morfológicas e fisiológicas que ocorrem neste tecido são dependentes de hormônios, e envolvem o crescimento e a regressão do tecido em padrão cíclico (LEBLOND, 1981; MEDH & THOMPSON, 2000; SCHOON et al., 2000).

Poucas pesquisas envolvendo a determinação da proliferação celular têm sido realizadas no estudo do endométrio eqüino para caracterização das diferentes fases do ciclo estral. Mansour (2000) demonstrou que não houve diferença significativa entre o estro e o diestro no endométrio de

éguas utilizando o anticorpo PCNA, mas pôde verificar que o padrão de distribuição da marcação nas células epiteliais foi característico em cada fase: no segundo dia de cio e ovulação a proliferação celular do epitélio luminal e ductal foi significativamente maior que no sétimo dia após a ovulação (diestro), e no sétimo dia após a ovulação foi encontrada predominância da proliferação celular em porções secretoras das glândulas endometriais. No mesmo trabalho, a autora relata que as células estromais e endoteliais do endométrio equino também apresentaram positividade, mas sem padrão diferenciado entre as fases do ciclo estral, e sugere que a investigação da atividade proliferativa dessas células poderá contribuir para o estudo da fibrose periglandular, inclusive sua patogênese, e, nesse sentido, cita que seria interessante estabelecer a relação entre a atividade proliferativa das células do endométrio e os processos inflamatórios que o acometem. Roberto da Costa et al. (2007) também verificaram imuno-reação com marcadores para células em proliferação, sendo associado o índice de células em proliferação relacionado à fase do ciclo estral.

Por outro lado, a ocorrência de morte celular “natural”, ou fisiológica, é um evento inconspícuo nos organismos multicelulares, ainda que prevalente. Há 30 anos foi salientada a significância da remoção celular controlada e descreveram-se as características morfológicas desse fenômeno programado, o qual foi proposto como tendo papel “complementar mas oposto à mitose na regulação da população celular animal” (FADEEL & ORRENIUS, 2005).

A apoptose é um tipo de morte celular programada, regulada de maneira ordenada por uma série de reações em cascata sob certas condições; desempenha função essencial ao crescimento, desenvolvimento e resposta imune, além de limitar o número de células no tecido e remover as células anormais. É também um importante modo pelo qual os organismos podem manter uma quantidade de células constante (FAN et al., 2005, LIN et al., 2008). Durante o desenvolvimento precoce, a apoptose é necessária para o desenvolvimento do organismo funcional, tendo papel fundamental na embriogênese, organogênese e morfogênese. Nos estágios tardios do desenvolvimento e durante a vida adulta, tem importância central para eliminação de células indesejáveis com mutações potencialmente perigosas,

assumindo importante função na manutenção da homeostasia em vários tecidos (MENDOZA-RODRÍGUEZ et al., 2002; HOSAKA et al., 2005; OLIVER & VALLETE, 2005; MASUOKA et al., 2009; NASU et al. 2009).

Por ser dependente da ativação de enzimas e clivagem de proteínas celulares específicas ou “substratos de morte” presentes na célula, a apoptose pode ser vista, em termos bioquímicos, como uma forma de morte celular mediada por caspases. A liberação do citocromo C após dano mitocondrial tem sido reconhecida como evento comum mediando a ativação de proteases aspartato-específicas conhecidas como caspases em células de mamíferos. Vários marcadores bioquímicos importantes de apoptose têm sido identificados, incluindo a fragmentação nuclear do DNA, ativação de caspases, e exteriorização de resíduos de fosfatidilserina – PS (FADEEL & ORRENIUS, 2005; YUAN, 2006; CHÁVEZ-GALÁN et al., 2009).

Nos mamíferos, são identificadas 12 caspases. Elas são sintetizadas de acordo com a função que desempenham, incluindo inflamação e apoptose, e estão divididas em dois grupos. O primeiro está envolvido na maturação de citocinas e o segundo está relacionado à apoptose. De acordo com sua homologia na seqüência de aminoácidos, essas enzimas podem ser divididas ainda em três subfamílias: I) ativadoras da apoptose ou iniciadoras – caspase-2, caspase-8, caspase-9 e caspase-10; II) executoras da apoptose - caspase-3, caspase-6 e caspase-7; III) mediadoras da inflamação – caspase-1, caspase-4, caspase-5 e caspase-14 (FADEEL & ORRENIUS, 2005; FAN et al., 2005; HO & HAWKINS, 2005; LAUNAY et al., 2005; OLIVER & VALLETE, 2005).

As caspases executoras são responsáveis pela clivagem da maioria dos substratos apoptóticos conhecidos, como por exemplo o fator 45 de fragmentação do DNA (DFF45), poli-(ADP-ribose)polimerase (PARP). Dentre essas caspases, a caspase-3 é o fator chave na execução da apoptose (FAN et al., 2005; MENDOZA-RODRÍGUEZ et al., 2009).

Duas principais vias celulares estão envolvidas na ativação das caspases executoras pelas caspases iniciadoras: o *receptor de morte* com as caspases 8 e 10 como iniciadoras e a caspase-3 como principal caspase executora, e a *via mitocondrial* com a caspase-9 como iniciadora, sendo

ativada mediando a formação de apoptossomo e tendo como alvo as caspases 3, 6 e 7 (GREEN, 2005; OLIVER & VALLETE, 2005).

A apoptose durante o processo inflamatório é um processo de extrema importância para a remoção de células inflamatórias cuja desintegração com liberação de conteúdo nocivo no espaço extracelular poderia prolongar a inflamação. O processo de limpeza celular não é um evento passivo, mas participa ativamente na resolução do processo inflamatório, pela produção de citocinas anti-inflamatórias pelos macrófagos, como o TGF- β e a supressão de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α .

Vários métodos são utilizados para detectar células apoptóticas, o que pode trazer discrepâncias e inconsistências nos dados obtidos em diversas pesquisas. O TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase – [TdT]-mediated doxyuridine triphosphate nick –end labelling*) talvez seja o mais comumente usado, entretanto é relatado que essa técnica está sujeita a erros técnicos, além de não ser específico para apoptose. Já a imunomarcagem da caspase-3 tem sido usada para identificar células apoptóticas em muitos estudos recentes. Em eqüinos, essa técnica tem sido usada para identificar condrócitos apoptóticos na cartilagem articular para investigar a relação entre o processo de morte celular e o grau de degradação da cartilagem nas osteoartrites. Foi verificado que a expressão da caspase-3 e a degradação da cartilagem articular estavam intimamente relacionadas, ou seja, observou-se alta incidência de condrócitos apoptóticos na matriz cartilaginosa gravemente degenerada (THOMAS et al., 2007). Nesta espécie, a mesma metodologia foi empregada para a observação da ocorrência e a função da apoptose na degeneração do tendão flexor digital superficial. Pesquisadores observaram número maior de tendinócitos apoptóticos nas amostras de tendões inflamados do que nos normais, e concluem que a apoptose excessiva contribui para a diminuição do número dessas células, o que leva à diminuição na habilidade de síntese e degradação de matriz extracelular. Essa característica contribui não somente como causa intrínseca de degeneração tendínea, mas também como causa de alteração do seu metabolismo. Os mesmos estudiosos citam ainda que o sinal da apoptose também desempenha uma função importante na regulação da degradação do colágeno pela indução da atividade da colagenase no tecido conjuntivo. Relatam que o gene p53, promotor da

apoptose, liga-se à MMP-2 humana, e sugerem que os sinais apoptóticos podem suprimir a deposição de colágeno por: 1) reduzir o número de fibroblastos, resultando na diminuição ou estagnação da síntese de colágeno, e 2) aumentando a atividade da colagenase (HOSAKA et al., 2005).

A apoptose endometrial durante o ciclo estral tem sido estudada em várias espécies e está relacionada às concentrações dos hormônios esteróides (VAN CRUCHTEN et al., 2003)

No endométrio eqüino, Roberto da Costa et al. (2007) pesquisou a presença de células apoptóticas empregando o anticorpo contra a enzima caspase-3. Esses autores observaram a expressão da caspase-3 nas células do epitélio luminal, células glandulares, estromais e do endotélio vascular nas fases luteal e folicular do ciclo estral, havendo diferença da porcentagem de células apoptóticas entre as diferentes fases do ciclo conforme o tipo celular pesquisado. Pôde-se notar que a porcentagem de células epiteliais apoptóticas era maior na fase luteal, ao passo que a maior porcentagem de células estromais apoptóticas foi observada durante a fase folicular, e esses resultados foram relacionados ao índice de células em proliferação e concluíram que as atividades proliferativas e apoptóticas do endométrio eqüino parece ser dependente principalmente da oscilação hormonal ovariana. Os mesmos relatam que a apoptose no endométrio das éguas parece ser mediada pela caspase-3 e as alterações celulares cíclicas uterinas pode envolver a coordenação dos processos de proliferação celular e apoptose. No útero eqüino, a apoptose foi também estudada durante a involução uterina (JISCHA, 2008).

A apoptose também tem sido investigada durante os processos de reparo tecidual. Recentemente, pesquisas vêm demonstrando o acúmulo e a persistência de miofibroblastos durante o reparo tecidual, o que tem sido proposto como causa de fibrose. Nos processos fibróticos, algumas vezes parece não haver remodelamento, e o tecido de granulação se desenvolve para cicatriz hipertrófica, contendo miofibroblastos e produção alterada de matriz extracelular, já que essas células tornam-se refratárias ao mecanismo da apoptose (WALLACH-DAYAN et al., 2007; HANIFFA et al., 2009).

Diante do exposto, nota-se que como a patogênese da fibrose endometrial eqüina ainda permanece obscura, estudos sobre seus

mecanismos devem ser desenvolvidos. Esta alteração compromete a função uterina, impedindo a fêmea de manter a prenhez até o final, o que leva a grandes perdas econômicas. Estudos envolvendo o índice de renovação celular no endométrio eqüino em diferentes estágios do processo inflamatório crônico, bem como sua caracterização nas afecções inflamatórias e degenerativas, além de compará-lo com outros fatores, como agentes pró-inflamatórios e promotores da homeostasia da matriz extracelular, podem contribuir para o entendimento da patogênese dessa enfermidade. Investigações a respeito do TGF- β 1, das metaloproteinases e sua inter-relação nesse tipo de processo ainda são escassos, principalmente no que tange aos sítios onde essas proteínas podem ser observadas. A verificação desses dados auxilia a compreensão da patogenia da enfermidade, já que esses elementos participam ativamente do remodelamento tecidual nos processos fibróticos.

Objetivos

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como principais objetivos:

✓ Verificar por método imunoistoquímico a expressão e a distribuição do marcador de proliferação celular PCNA e do marcador de células apoptóticas caspase-3 clivada no endométrio saudável, nas endometrites crônicas e nas endometroses;

✓ Verificar por método imunoistoquímico a expressão e distribuição do fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1) no endométrio saudável, nas endometrites crônicas e nas endometroses, bem como sua relação com os índices de proliferação celular e apoptótico;

✓ Verificar por método imunoistoquímico a expressão e distribuição das metaloproteinases 2 e 9 e sua relação com o TGF- β 1, com o índice de proliferação celular e apoptótico no endométrio saudável, nas endometrites crônicas e nas endometroses;

✓ Avaliar o processo fibrótico endometrial das éguas por método histoquímico do Picrosirius Red associado à microscopia de luz polarizada para verificação do tipo de colágeno presente bem como a extensão da fibrose nos diferentes graus e processos endometriais das éguas;

✓ Comparar os resultados obtidos na análise imunoistoquímica com o tipo de colágeno predominante nos processos fibróticos do endométrio, bem como com a quantidade de colágeno presente na região periglandular.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PROCEDÊNCIA DO MATERIAL

No presente estudo, foram utilizadas 60 biópsias endometriais. Estas foram colhidas em períodos hormonalmente semelhantes, sendo preconizada a fase do diestro. O material foi proveniente do Serviço de Patologia Veterinária e do Serviço de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, SP, oriundo da rotina do Hospital Veterinário desta instituição, de clínicas particulares e de profissionais autônomos, abrangendo o período entre 1987 e 2005.

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, sendo aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (protocolo 02/2007).

4.2. PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO

Todas as biópsias sofreram o mesmo tipo de processamento laboratorial. A fixação foi realizada em Bouin, substituído após 24 horas por solução de álcool a 70%. Posteriormente, por padronização da técnica, os fragmentos foram lavados em água corrente, deixados em solução de álcool amoniacal a 10% por 18 horas e, novamente, lavados em água corrente por quatro horas. Após processamento histológico foi realizada inclusão em parafina.

Os blocos selecionados foram submetidos à microtomia em micrótomo rotativo semi-motorizado programável (Leica RM2155). Os cortes histológicos foram obtidos com três micrômetros de espessura.

Inicialmente, uma lâmina correspondente a cada caso foi corada pelo método de Hematoxilina e Eosina – H.E. (LUNA, 1968), para posterior análise e classificação histológica da endometrite. Portanto, para cada caso, foram obtidas oito lâminas histológicas.

4.2.1. TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

4.2.1.1. TRICRÔMICO DE MASSON

A técnica utilizada foi descrita por Luna (1968) e segue o roteiro da Apostila de Técnicas de Colorações Específicas do Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP.

Depois da confecção, as lâminas permaneceram em estufa a 60°C por 12 horas, após o que foram posicionadas em berços de coloração e submetidas ao processo de desparafinização e hidratação.

As lâminas ficaram submersas em solução de Bouin em estufa a 60°C por uma hora, que se seguiu por resfriamento até a temperatura ambiente. Depois deste procedimento, foram lavadas em água corrente por 15 minutos e rapidamente em água destilada. Após esta etapa, as lâminas foram posicionadas em suporte de coloração e os corantes aplicados sobre as mesmas na seguinte ordem: hematoxilina férrica por cinco minutos, lavagem em água corrente por cinco minutos e depois em água destilada; fucsina ácida adicionada de ponceau por dez minutos, lavagem em água corrente por um minuto e depois em água destilada; ácido fosfomolibdico a 5% por cinco minutos até o clareamento dos cortes, lavagem em água corrente e água destilada rapidamente; azul de anilina a 0,5% por cinco minutos, lavagem em água corrente e água destilada rapidamente; ácido acético por um minuto.

Após a passagem nessas soluções, as lâminas foram novamente postas em berço de coloração e submetidas aos processos de desidratação, diafanização e montagem com resina sintética.

4.2.1.2. PICROSIRIUS RED

A utilização desta técnica, descrita por Junqueira et al. (1978), seguiu o roteiro da Apostila de Técnicas de Colorações Específicas do Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP.

Para esta coloração, foram obtidos cortes com cinco micrômetros de espessura. Após sua confecção, as lâminas foram posicionadas em berço de coloração e submetidas aos processos de desparafinização e hidratação.

O material então foi imerso em solução de ácido fosfomolibdico a 0,2% por dois minutos e posteriormente lavado em água corrente e água destilada. Após este processo, permaneceu imerso em solução a 0,1% de Direct Red (Direct Red 36554-8, Sigma Chemical CO., St. Louis MO, EUA) dissolvido em ácido pícrico a 1,5% (aquoso saturado) por 110 minutos. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de ácido clorídrico a 0,1 N por dois minutos. Depois destas etapas, o material foi lavado em solução de álcool a 70% durante 45 segundos e submetido aos processos de desidratação, diafanização e montagem em resina sintética.

4.2.2. TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA

A padronização da técnica imunoistoquímica foi realizada no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP.

Os anticorpos primários utilizados neste trabalho foram:

- **TGF- β 1** (cód. NCL-TGFB, clone TGFB17) – Anticorpo produzido em camundongo contra o regulador celular TGF- β 1 de origem humana (Novocastra).
- **MMP-2** (RDI-MMP2abm-5D, clone 42-5D11) – Anticorpo produzido em camundongo contra a enzima MMP-2 de origem humana (Research Diagnostics Inc. – RDI Division of Fitzgerald Industries, Concord, USA);
- **MMP-9 (C-20)** (sc-6840) – Anticorpo policlonal produzido na espécie caprina contra a porção C-terminal da enzima MMP-9 de origem humana (Santa Cruz Biotechnology, Inc.);
- **Ki-67** (M7240, clone MIB-1) – Anticorpo produzido em camundongo contra a proteína nuclear Ki-67 de origem humana (Dako Denmark A/S);

- **PCNA** (M0879, clone PC10) – Anticorpo produzido em camundongo contra o antígeno nuclear de proliferação celular de origem murina (Dako Denmark A/S);
- **Caspase-3 clivada (Asp175)** (9661) – Anticorpo policlonal produzido em coelho contra a enzima caspase-3 ativa de origem humana (Cell Signaling Technology, Inc.).

A Tabela 1 demonstra os anticorpos e suas respectivas diluições no endométrio eqüino.

TABELA 1. Anticorpos primários utilizados para marcação imunoistoquímica no endométrio de éguas sadias e portadoras de endometrite crônica.

ANTICORPO	CLONE	PRODUÇÃO	DILUIÇÃO	FABRICANTE
TGF- β 1	TGFB17	camundongo	1:1200	Novocastra
MMP-2	42-5D11	camundongo	1:200	RDI
MMP-9	policlonal	cabra	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Ki-67	MIB-1	camundongo	1:75	Dako
PCNA	PC10	camundongo	1:2000	Dako
Caspase-3 clivada	policlonal	coelho	1:400	Cell Signaling Technology.

Durante a padronização da técnica, foram utilizados como controle positivo placenta humana, para os anticorpos MMP-2 e MMP-9 e linfoma canino e carcinoma de células escamosas proveniente da espécie eqüina para os anticorpos Ki-67, PCNA e caspase-3 clivada.

Cortes com três micrômetros de espessura foram posicionados sobre lâminas pré-tratadas com adesivo (Poli-L-lisina, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e mantidos em estufa a 60°C por 18 horas.

Posteriormente, as lâminas foram submetidas à desparafinização em duas passagens, cada uma de dez minutos, em xilol à temperatura ambiente, reidratação em álcool etílico absoluto e três banhos de água destilada.

Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio a 30% em metanol na proporção 1:9, por 10 minutos. Para a remoção do peróxido do tecido, as lâminas foram lavadas em água destilada.

A recuperação antigênica foi executada em solução de ácido cítrico a 10 mM, pH 6,0. Para os anticorpos MMP-2 e MMP-9 foi empregado o forno de microondas a 750 watts (potência máxima). Os tempos de radiação foram: para o anticorpo MMP-2, quatro ciclos de 5 minutos cada, totalizando 20 minutos, e para o anticorpo MMP-9 um ciclo de 5 minutos. Para os anticorpos TGF- β 1, Ki-67 e caspase-3, foi empregada a Pascal, panela de pressão microprocessada (Dako Denmark A/S), a 125°C por 30 segundos. O material foi então submetido a resfriamento por 20 minutos em temperatura ambiente. Por conseguinte, as lâminas foram lavadas em água destilada e imersas em tampão TRIS pH 7,5 por cinco minutos.

Para o anticorpo PCNA a recuperação antigênica foi eliminada, já que o material apresentou intensa marcação inespecífica quando realizada esta etapa durante a padronização.

Com a finalidade de evitar reações inespecíficas com proteínas teciduais, os cortes foram imersos em solução de leite em pó desnatado* a 3% em tampão TRIS por uma hora.

A incubação com os anticorpos primários por 18 horas a 4°C, conforme as diluições descritas na Tabela 1, foi efetuada em bandeja com tampa lacrada com fita adesiva, precedida da remoção do excesso de leite das lâminas. A diluição foi feita em solução de BSA a 1%.

Os cortes foram lavados com tampão TRIS e submetidos à reação com o anticorpo secundário e sistema de visualização. Para os anticorpos TGF- β 1, Ki-67 e caspase-3 clivada, foi empregado o sistema NovoLink Max Polymer (RE7260-K, Novocastra Laboratories, Newcastle Upon Tyne, United Kingdom), o qual consiste em sistema de amplificação por polímero não biotilado para os anticorpos MMP-2, MMP-9 e PCNA foi empregado o kit ABC (VECTASTAIN Elite ABC Kit, PK-6100, Vector Laboratories, Inc.). O anticorpo secundário empregado para os anticorpos

*Molico®, Nestlé.

primários MMP-2 e PCNA foi o anti-imunoglobulina de camundongo (BA-2000, Vector Laboratories, Inc.) titulado a 1:200, e para o anticorpo MMP-9 foi utilizado o anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulina de cabra (sc-2347, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) na diluição 1:100, ambos incubados por uma hora em temperatura ambiente. Os dois sistemas foram aplicados conforme instruções dos fabricantes.

Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3' diaminobenzidina (Liquid DAB – K3466, DakoCytomation) durante cinco a sete minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, por 15 segundos. Em seguida, procederam a desidratação, diafanização e montagem em resina sintética.

Em cada bateria de reação, controles positivos e negativos foram incluídos. O controle positivo baseou-se em biópsias endometriais de égua que apresentaram positividade para os anticorpos durante a padronização da técnica. O controle negativo consistiu na omissão do anticorpo primário em corte de endométrio eqüino, sendo incubado somente o diluente.

4.3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

4.3.1. APLICAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DAS ENDOMETRITES CRÔNICAS EQUINAS

Para cada caso, utilizou-se a classificação histopatológica conforme proposto por Kenney & Doig (1986) e Ricketts & Alonso (1991) para as endometrites crônicas.

Os Quadros 1 e 2 descrevem as classificações de Kenney & Doig (1996) e Ricketts & Alonso (1991), respectivamente.

QUADRO 1. Classificação histopatológica das biópsias endometriais das éguas segundo Kenney & Doig, 1986.

ALTERAÇÕES	CATEGORIA I	CATEGORIA IIA	CATEGORIA IIB	CATEGORIA III
Considerações	endométrio sem alterações patológicas, ou são discretas e bem dispersas	alterações discretas	alterações moderadas	alterações acentuadas
Infiltrado inflamatório		discreto a moderado no estrato compacto ou focos discretos e freqüentes no estrato compacto e esponjoso	difuso e em focos moderados	difuso e acentuado
Alterações fibróticas		discretas e freqüentes de glândulas individuais em qualquer grau de acometimento ou menos de 2 ninhos por campo linear de 5,5 mm (média de 4 campos)	difusa com distribuição uniforme e 4 ou mais camadas (2 ou 4 ninhos por campo linear de 5,5 mm em média de 4 campos)	difusa e uniforme de glândulas com 5 ou mais ninhos por campo linear de 5,5 mm
Lacunas linfáticas		extensas	extensas	acentuadas
Outras alterações		éguas com atrofia endometrial parcial no fim da estação de monta são incluídas nesta categoria		éguas com atrofia endometrial grave na estação de monta estão incluídas

QUADRO 2. Classificação das endometrites eqüinas segundo Ricketts & Alonso, 1991.

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	CARACTERÍSTICAS
Endometrite crônica infiltrativa	predomínio de alterações inflamatórias, com presença de células mononucleares que incluem histiócitos, linfócitos e plasmócitos infiltrando o estroma
Doença endometrial degenerativa crônica (endometrose)	predomínio de alterações degenerativas glandulares (ninhos e/ou cistos) associadas à fibrose periglandular e/ou fibrose estromal difusa

Os cortes corados pelo método do Tricrômico de Masson foram utilizados para determinar a localização e a extensão da fibrose, permitindo a classificação do grau da lesão endometrial.

4.3.2. AVALIAÇÃO DO COLÁGENO

As lâminas coradas com Picrosirius Red foram utilizadas para a avaliação do tipo de colágeno endometrial. Para análise dos cortes, utilizou-se microscópio de luz polarizada, modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP.

4.3.2.1. ANÁLISE QUALITATIVA

A análise do colágeno presente nas biópsias foi feita considerando-se a sua distribuição nas diferentes regiões do endométrio, que compreenderam: região subepitelial (membrana basal), estratos compacto e esponjoso, e regiões periglandular e perivascular.

Foi realizada a classificação qualitativa do colágeno presente na fibrose endometrial. Pelo método do Picrosirius - Polarização foi possível a identificação do colágeno do tipo III, fibrilar, com refringência verde, e do colágeno do tipo I, denso, que apresenta refringência amarelada a avermelhada.

4.3.2.2. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para a análise morfométrica do colágeno as lâminas coradas pelo método de Picrosirius Red foram observadas em microscópio de luz polarizada dispondo de câmara digital modelo AxioCam MRc (Zeiss Vision, Alemanha) acoplado a um microcomputador. As imagens foram processadas pelo programa computacional Axiovision Software Rel. Versão 4.6.1 (Zeiss Vision, Alemanha).

A análise morfométrica da fibrose periglandular foi realizada conforme descrito por Evans et al. (1998).

Foi mensurado o acúmulo de colágeno ao redor de glândulas individuais e de ninhos fibróticos, em cinco campos diferentes em objetiva de 10x. A área da fibrose foi calculada subtraindo-se a área ocupada pelo

colágeno pela área ocupada pelo lúmen glandular. O resultado foi dividido pela área total da amostra e multiplicado por 100. Assim, o valor resultante correspondeu ao percentual do colágeno presente na região periglandular.

4.3.3. AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

A avaliação descritiva para a imuno-reatividade com os anticorpos TGF- β 1, MMP-2 e MMP-9 foi realizada considerando-se os tipos celulares positivos entre as diferentes estruturas marcadas. Consideraram-se o epitélio luminal, epitélio glandular, célula endotelial, parede vascular, célula inflamatória e célula estromal. Foram avaliadas a frequência e a intensidade, atribuindo-se escores, que posteriormente corresponderam a um número. Os escores estabelecidos foram: ausente (0), discreto (1), moderado (2) e acentuado (3).

A avaliação das células em proliferação e apoptóticas com os anticorpos PCNA e caspase-3 clivada, respectivamente, foi realizada por porcentagem, conforme descrito por Gerstenberg et al. (1999) Os tipos celulares analisados foram epitélio luminal, epitélio glandular superficial, epitélio glandular profundo, células estromais superficiais, células estromais profundas, epitélio glandular na glândula fibrótica e célula estromal na glândula fibrótica. A proporção de células positivas foi contada em cinco campos do estrato superficial e cinco campos do estrato esponjoso, selecionados de forma randômica. O estrato superficial (epitélio luminal, estrato compacto e glândulas superficiais) foi analisado no aumento de 400X, sendo contadas 30 células do epitélio luminal, 20 células do epitélio glandular superficial e 30 células estromais em cada campo, perfazendo o total de 150, 100 e 150 células respectivamente. O estrato esponjoso foi avaliado no aumento de 200x, e foram contadas 80 células do epitélio glandular, 80 células de epitélio glandular com fibrose periglandular, 130 células estromais e 130 células estromais em região de fibrose periglandular em cada campo, totalizando 400, 400, 650 e 650 células respectivamente.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O percentual de fibrose encontrado nas diferentes categorias de endometrite foi avaliado utilizando-se o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis (ZAR, 1996), adotando-se o nível de 5% de significância.

Este mesmo método foi empregado para o estudo da associação entre a intensidade da expressão das metaloproteinases 2 e 9 e do TGF- β 1 com os diferentes grupos de endométrio nas classificações propostas por Kenney & Doig (1986) e Ricketts & Alonso (1991).

No estudo da associação entre a porcentagem das células em proliferação e em apoptose com as diversas categorias de endométrio, foi empregado o teste F da análise de variância (ANOVA) e comparação *post hoc* usando o teste de Scheffé, adotando-se o nível de 5% de significância. Para tanto, os percentuais obtidos na contagem foram transformados na escala logarítmica [$\log (x+1)$].

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

5.1.1. CLASSIFICAÇÃO DAS ENDOMETRITES CRÔNICAS

Das 60 biópsias de endométrio eqüino, submetidas à classificação de Kenney & Doig (1986), 13 éguas foram incluídas na categoria I (23,33%), 17 na categoria IIA (26,67%), 15 na categoria IIB (25%) e 15 na categoria III (25%). Os resultados da classificação histopatológica desses 60 casos estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Distribuição das 60 biópsias de endométrio eqüino classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986).

CLASSIFICAÇÃO	NÚMERO DE CASOS	PERCENTUAL
Categoria I	13	21,67
Categoria IIA	17	28,33
Categoria IIB	15	25
Categoria III	15	25
Total	60	100

Histopatologicamente, os endométrios saudáveis, classificados como pertencentes à categoria I (Figura 1), caracterizaram-se por apresentar epitélio luminal cilíndrico baixo com áreas compostas por epitélio cilíndrico alto e pseudoestratificado. As alterações observadas foram predominantemente de origem circulatória: congestão, edema, dilatação de vasos linfáticos, hemorragia e hemossiderose. Oito casos apresentaram infiltrado inflamatório discreto focal predominantemente mononuclear, representando 61,54% das amostras, e três casos (23,01%) apresentaram alterações fibróticas, caracterizadas por acúmulo do colágeno na região perivascular (três casos) e intersticial de forma discreta e focal (um caso).

As biópsias classificadas como IIA demonstraram epitélio luminal cilíndrico e eventualmente epitélio cúbico. Uma amostra apresentou erosão, caracterizada pela perda focal do epitélio luminal e manutenção da membrana basal. Fibrose periglandular discreta foi encontrada em 52,94% dos casos e foi caracterizada pela deposição discreta de colágeno em glândulas individuais. Ninhos foram observados em cinco amostras (29,41%), mas em quantidade discreta (um ou dois ninhos por biópsia). Apenas uma amostra mostrou um ninho com deposição moderada de colágeno. Uma amostra apresentou fibrose intersticial moderada. Fibrose perivascular foi observada em 29,41% dos endométrios. Houve presença de lacunas linfáticas em 23,53% dos casos, e dilatação glandular discreta em 29,41% das biópsias. Infiltrado inflamatório mononuclear foi encontrado em 82,35% dos casos, sendo predominantemente de intensidade moderada, confinando-se na região do estrato compacto em 58,82% das amostras. Quatro casos (23,53%) apresentaram infiltrado inflamatório perivascular.

As biópsias classificadas como IIB segundo Kenney & Doig (1986) apresentaram epitélio luminal cilíndrico com áreas de epitélio pseudoestratificado. Entre as alterações fibróticas, a fibrose periglandular foi encontrada em 80% dos casos e caracterizou-se por deposição moderada de colágeno e média de cinco ninhos fibróticos por campo de cinco milímetros lineares. Fibrose intersticial (60%) e perivascular (53,33%) também foram observadas com frequência nessas amostras. Lacunas linfáticas, bem como dilatações glandulares, estavam presentes em 40% e 20% dos casos respectivamente. O infiltrado inflamatório foi encontrado em 86,67% dos casos, sendo distribuído principalmente de forma difusa e constituído predominantemente por mononucleares.

Na categoria III (Figuras 2, 3, 4 e 5) o epitélio luminal apresentou-se cilíndrico alto ou baixo, com áreas de epitélio pseudoestratificado. Assim como nas biópsias da categoria IIB, os principais achados foram as alterações fibróticas, mas com intensidade maior, sobretudo na região periglandular. Nesta região, a fibrose caracterizou-se pela deposição acentuada de colágeno (mais de cinco camadas) e alta frequência de ninhos fibróticos, sendo observadas mais de 10 ninhos por campo. 66,67% dos casos apresentaram fibrose perivascular e 73,33% apresentaram fibrose intersticial. 73,33% das

biópsias apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear, sendo que desses casos, 40% das biópsias apresentaram distribuição difusa, intensidade moderada ou acentuada (Figura 2).

Ao ser aplicada a classificação de Ricketts & Alonso (1991), 13 biópsias foram consideradas sem alterações histopatológicas dignas de nota, e corresponderam à categoria I da classificação anterior, 35 casos foram classificados como endometrite crônica infiltrativa e 12 foram classificados como endometrose. Na Tabela 3 são apresentados estes dados.

TABELA 3. Distribuição das 60 biópsias de endométrio eqüino classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991).

CLASSIFICAÇÃO	NÚMERO DE CASOS	PERCENTUAL
Endométrio hígido	13	21,67
Endometrite crônica infiltrativa	35	58,33
Endometrose	12	20
Total	60	100

As amostras classificadas como endometrite crônica infiltrativa (Figura 2) apresentaram epitélio luminal cilíndrico com áreas de epitélio pseudoestratificado. O infiltrado inflamatório apresentou distribuição difusa, mas em algumas amostras (28,57%) o aspecto foi focal. O grau de intensidade do infiltrado nesta categoria variou de moderado a acentuado. A fibrose periglandular foi discreta em 28,57%, moderada em 37,14% e acentuada em 22,85% dos casos, levando freqüentemente à formação de ninhos fibróticos. A fibrose perivascular foi observada em 54,28% dos casos, da mesma forma a fibrose intersticial esteve presente em 48,57% das biópsias.

Nos casos diagnosticados como endometrose (Figuras 3, 4 e 5), o tipo de epitélio luminal mais freqüentemente observado foi semelhante ao das endometrites infiltrativas. A fibrose intersticial, sobretudo de forma difusa, e a fibrose perivascular foram observadas em 41,87% e 33,33% dos casos respectivamente. Houve incidência discreta de ninhos fibróticos em apenas uma amostra, moderada em 33,33% e alta incidência em 41,67% dos casos. A deposição do colágeno foi discreta (25%), moderada (16,67%) ou grave (25%).

Foi observado que nas endometrites mais graves, em ambas as classificações, a densidade glandular foi relativamente menor (Figura 5).

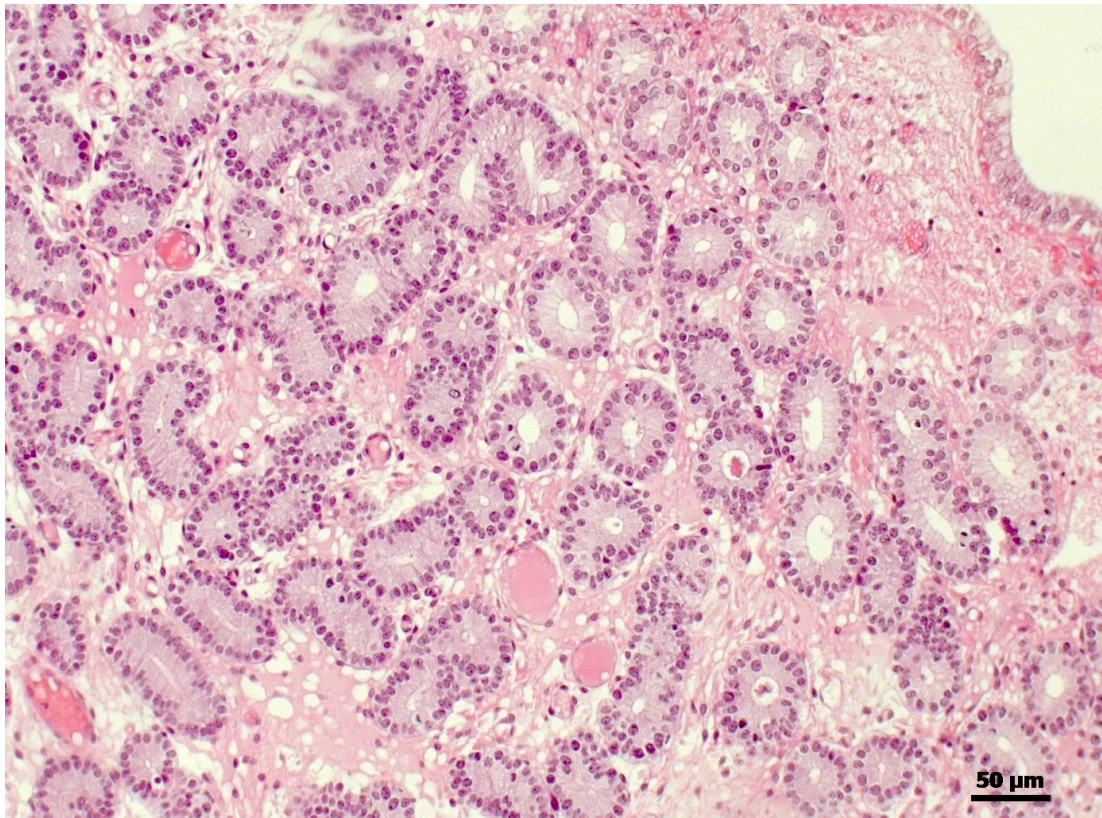


FIGURA 1. Endométrio eqüino - categoria I. Ausência de alterações inflamatórias e fibróticas. Hematoxilina e Eosina. Objetiva: 20x.

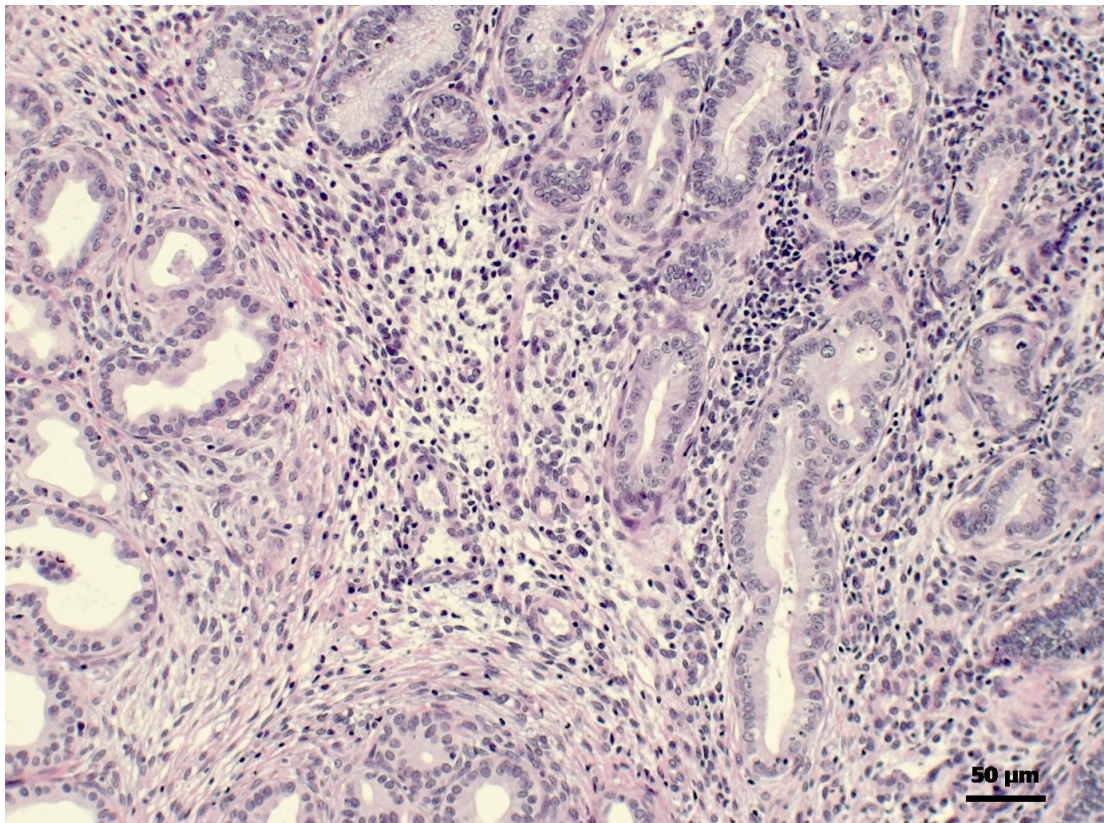


FIGURA 2. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Infiltrado inflamatório mononuclear acentuado difuso no estrato esponjoso, associado à dilatação glandular e fibrose periglandular. Hematoxilina e Eosina. Objetiva: 20x.

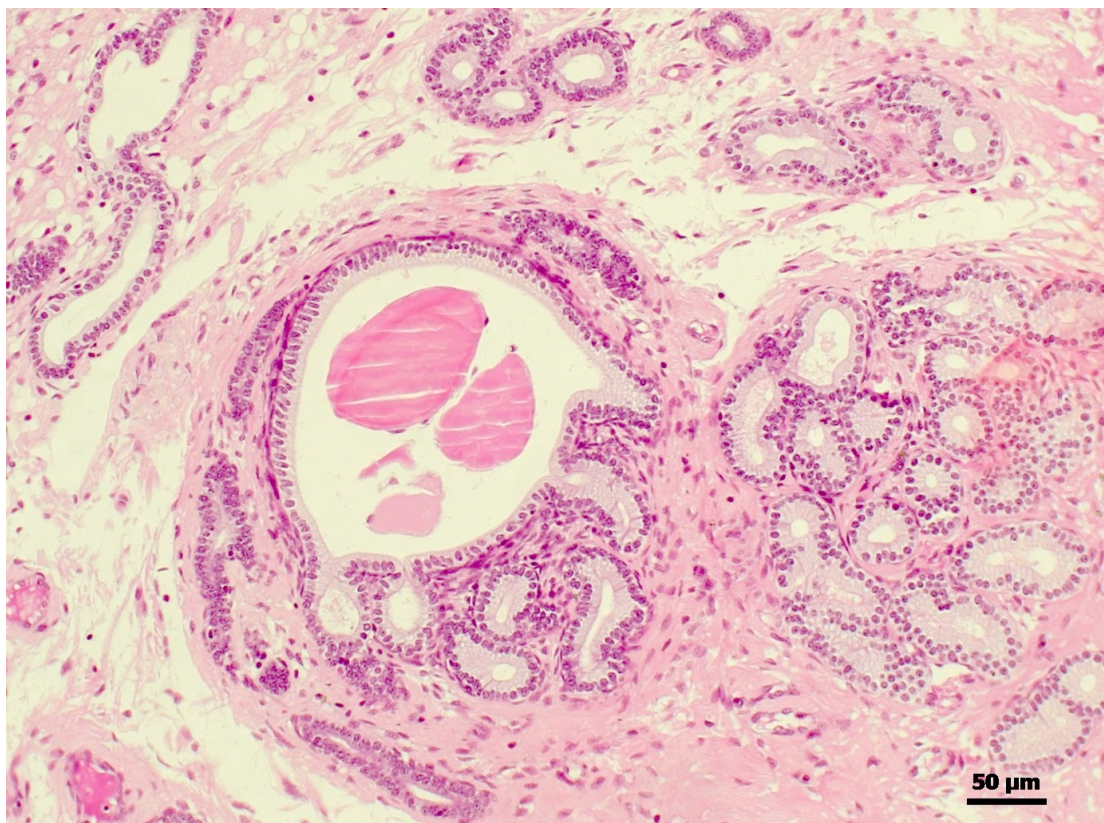


FIGURA 3. Endométrio eqüino - categoria III. Endometriose. Grandes ninhos fibróticos, fibrose periglandular acentuada, dilatação glandular e fibrose intersticial. Hematoxilina e Eosina. Objetiva: 20x.

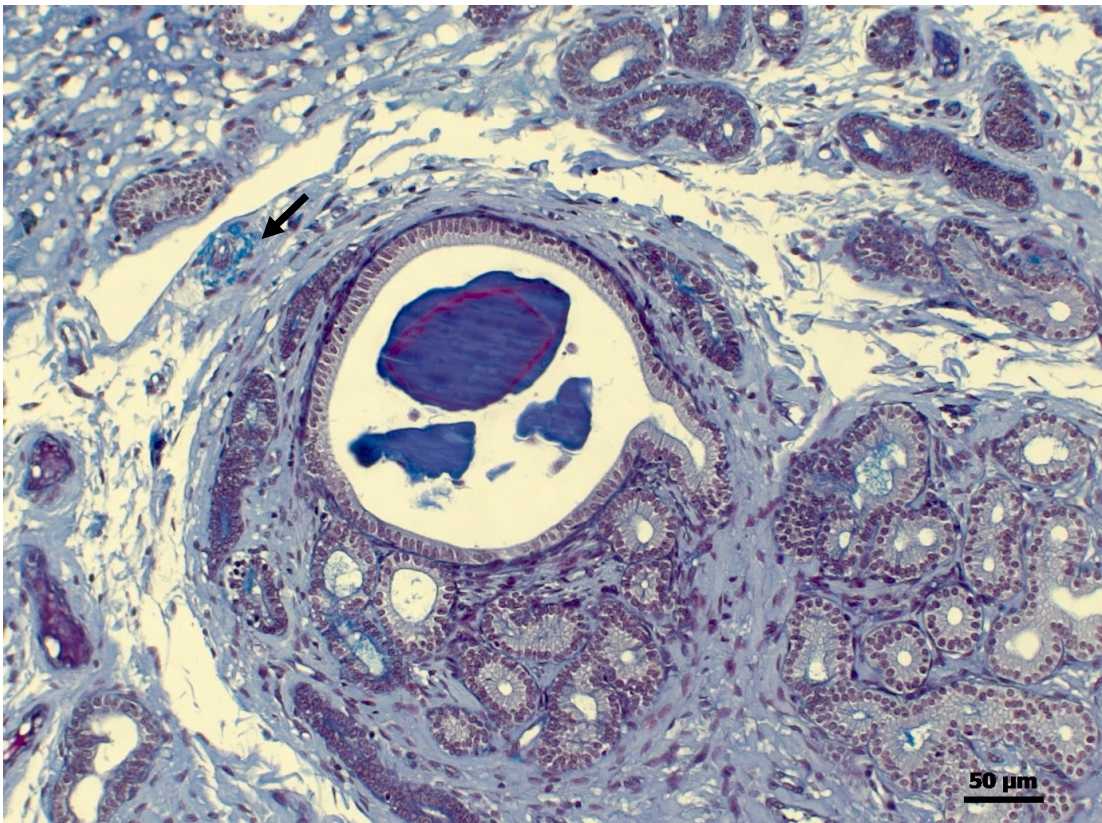


FIGURA 4. Endométrio eqüino - categoria III. Endometriose. Alterações degenerativas: dilatação glandular, achatamento do epitélio glandular, fibrose periglandular acentuada, fibrose intersticial, fibrose perivascular (seta). Tricrômico de Masson. Objetiva: 20x.

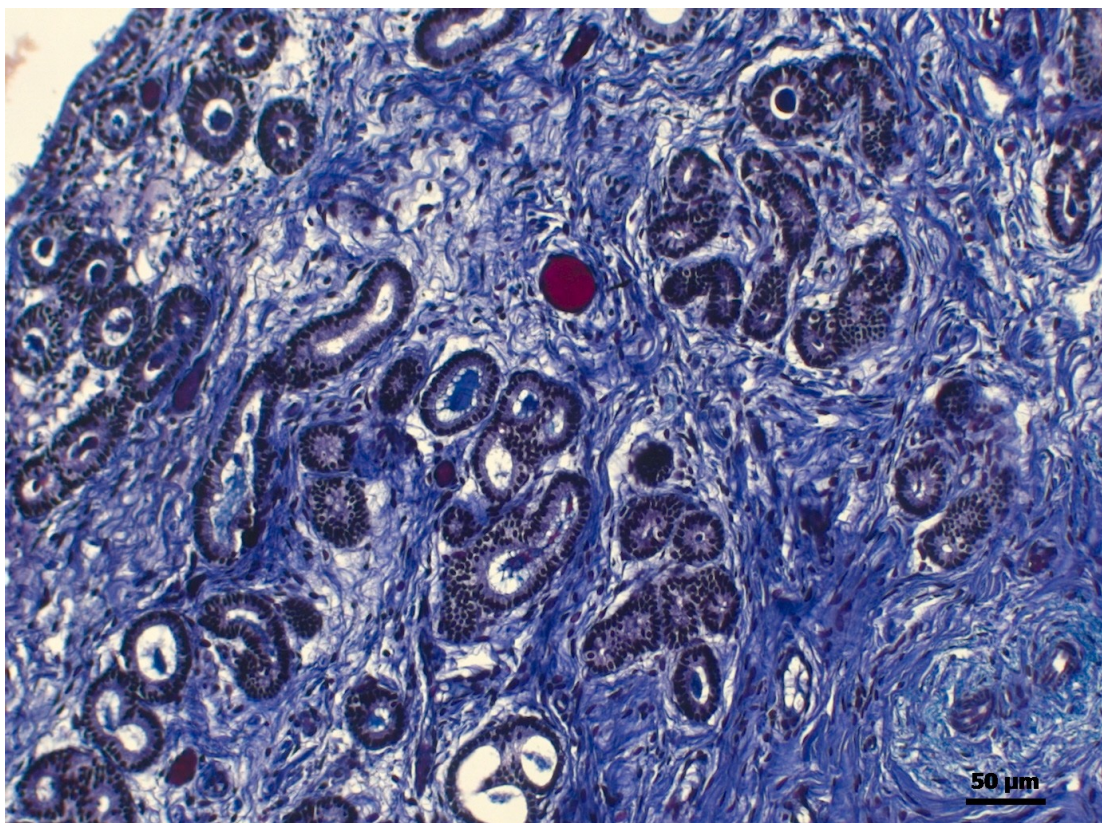


FIGURA 5. Endométrio eqüino - categoria III. Endometriose. Rarefação glandular, fibrose intersticial acentuada no estrato esponjoso, fibrose perivascular. Tricrômico de Masson. Objetiva: 20x.

5.1.2. AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DO COLÁGENO

5.1.2.2. PICROSIRIUS – POLARIZAÇÃO

Nos endométrios saudáveis (Figura 6), houve predominância de colágeno do tipo III, com distribuição reticular pelo endométrio. A região que apresentou maior deposição de colágeno do tipo I foi a perivascular, em 53,85% das amostras, sendo que em 23,08% das amostras estava mesclado com o colágeno do tipo III, denominado como colágeno do tipo I-III.

Nas biópsias classificadas como IIA, na classificação de Kenney & Doig (1986), a distribuição do colágeno foi semelhante à das amostras da categoria I, mas a deposição foi mais intensa. Houve predomínio do colágeno do tipo III, além da mescla dos colágenos do tipo I e do tipo III, denominada tipo I-III, em todas as regiões, em proporções semelhantes.

Na categoria IIB, houve predominância do colágeno do tipo I. A região que mostrou maior acúmulo de colágeno foi a perivascular, em 53,33% das amostras. Os estratos compacto e esponjoso, além da região periglandular, mostraram deposição de colágeno moderada. Somente na região subepitelial, o colágeno que predominou foi o do tipo III, depositado de forma discreta.

A categoria III (Figura 7) caracterizou-se pela deposição acentuada de colágeno, sendo observada a predominância do tipo I. A região que apresentou maior acúmulo de colágeno foi a periglandular, em 80% das amostras.

Quando empregada a classificação de Ricketts & Alonso (1991), nas endometrites crônicas infiltrativas pode-se verificar que de maneira geral houve deposição moderada de colágeno, sendo o do tipo I predominante na região periglandular e o do tipo I-III predominante nas regiões do estrato compacto e esponjoso. A região perivascular apresentou variação na quantidade de colágeno depositado, mas houve predominância do colágeno do tipo I (67,7%). Na região subepitelial houve deposição discreta de colágeno, principalmente o do tipo III (44,12%). Em cinco amostras (14,7%) não foi possível distinguir esta região pela quantidade excessiva de colágeno presente no estrato compacto.

Nas endometroses (Figura 7) a deposição do colágeno foi moderada ou acentuada, prevalecendo o do tipo I em grande parte das amostras estudadas, exceto na região subepitelial, onde predominaram os colágenos dos tipos III e I-III, depositado de forma discreta ou moderada. As regiões que apresentaram deposição mais intensa foram a periglandular e perivascular.

Utilizando-se esta técnica histoquímica, ficou evidenciada a diminuição do número de glândulas no endométrio fibrótico, mormente as biópsias que apresentaram fibrose intersticial acentuada.

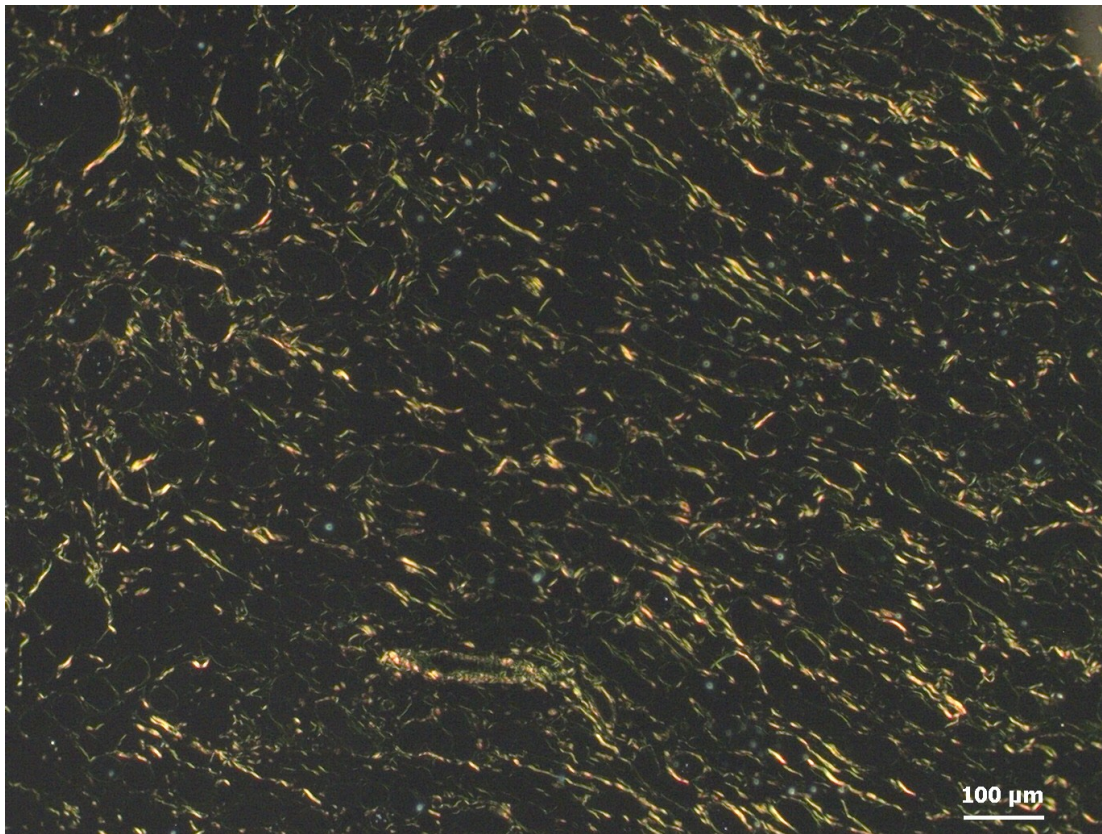


FIGURA 6. Endométrio eqüino - categoria I. Distribuição reticular do colágeno do tipo III (verde) e presença do colágeno do tipo I (amarelo) em menor proporção. Picrosirius – Polarização. Objetiva: 10x.

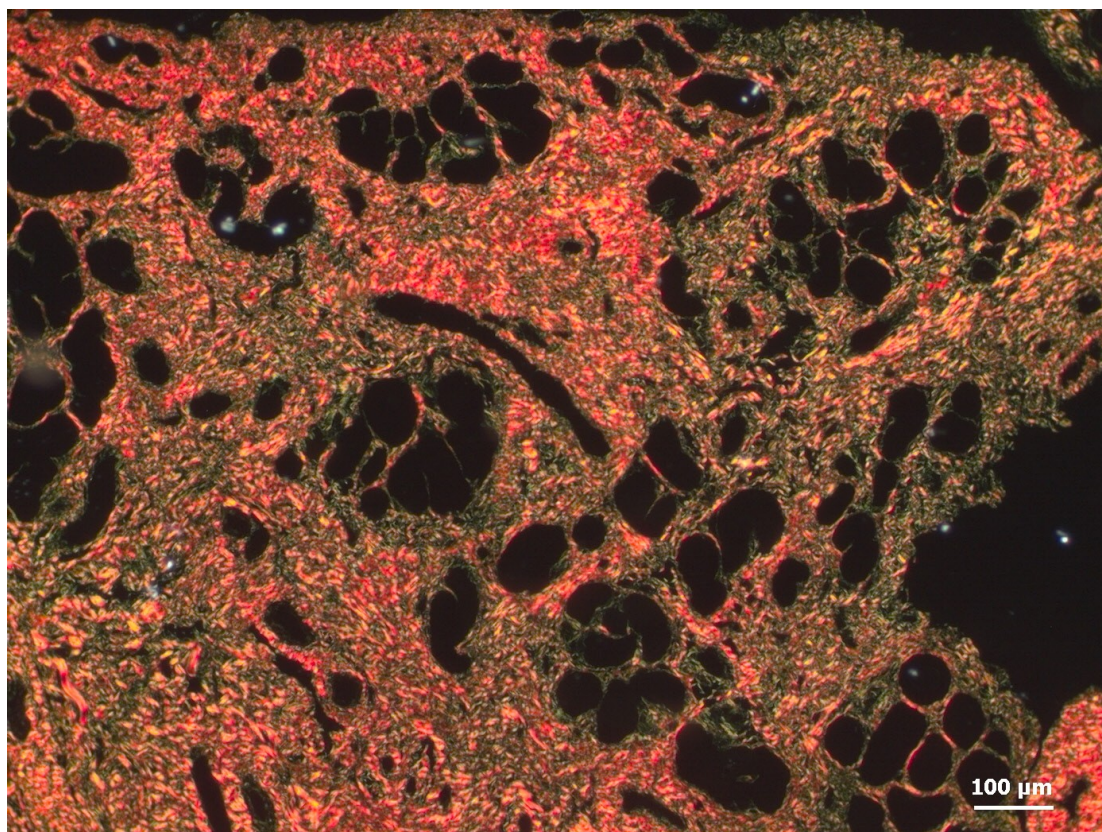


FIGURA 7. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrose. Predominância do colágeno do tipo I (amarelo/vermelho) nos ninhos fibróticos e interstício. Picrosirius – Polarização. Objetiva: 10x.

5.2. MORFOMETRIA DO COLÁGENO PERIGLANDULAR

A avaliação morfométrica da fibrose periglandular revelou que houve diferença significativa entre os endométrios considerados saudáveis (categoria I) e com alterações acentuadas (categorias IIB e III), mas entre estas últimas não foi verificada diferença.

Considerando a classificação de Kenney & Doig (1986), não houve diferença entre os endométrios saudáveis (categoria I) e aqueles classificados como categoria IIA, que apresentaram lesões discretas. Também não foi verificada diferença significativa entre as amostras com lesões discretas (categoria IIA) e as mais acentuadas (categoria III).

Comparando os grupos na classificação conforme Ricketts & Alonso (1991), houve diferença significativa entre os endométrios hígidos e aqueles com alterações, sejam inflamatórias ou exclusivamente degenerativas. Entretanto, não houve diferença na quantidade de colágeno depositado na região periglandular entre as endometrites crônicas infiltrativas e as endometroses.

As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados da análise estatística realizada no estudo do colágeno nas duas formas de classificação de endométrio eqüino.

TABELA 4. Medianas do percentual de fibrose periglandular avaliado por método morfométrico das biópsias endometriais classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986).

CLASSIFICAÇÃO	FIBROSE PERIGLANDULAR %
Categoria I	0,80a ¹
Categoria IIA	2,41ac
Categoria IIB	4,28b
Categoria III	4,27bc

¹Medianas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Kruskal-Wallis.

TABELA 5. Medianas do percentual de fibrose periglandular avaliado por método morfométrico das biópsias endometriais classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991).

CLASSIFICAÇÃO	FIBROSE PERIGLANDULAR %
Endométrio hígido	0,80a ¹
Endometrite crônica infiltrativa	2,74b
Endometrose	2,89b

¹Medianas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Kruskal-Wallis.

5.3. AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

5.3.1. TGF- β 1

A expressão de TGF- β 1 foi observada em 76,67% das amostras de endométrio. A imuno-reatividade pode ser observada no epitélio luminal, epitélio glandular, célula endotelial, parede vascular, células inflamatórias e estromais. A intensidade da marcação citoplasmática variou de fraca a intensa, sendo maior nas células inflamatórias e estromais. A quantidade de células marcadas positivamente sempre se apresentou discreta e de forma esparsa, sendo localizada em células individuais, exceto nas células inflamatórias mononucleares, nas quais puderam ser verificados agregados de células positivas de acordo com a sua distribuição (Figura 8). Entre estas, a marcação foi freqüente.

Nas amostras de endométrio saudável, categoria I e grupo hígido, segundo as classificações de Kenney & Doig (1986) e Ricketts & Alonso (1991) respectivamente, houve marcação imunoistoquímica para TGF- β 1 em 92,3% das amostras. As estruturas que demonstraram imuno-reatividade para este fator de crescimento foram as células inflamatórias e as estromais. As células inflamatórias marcadas apresentaram-se distribuídas predominantemente de forma difusa e no estrato esponjoso, mas em 23,01% das amostras deste grupo estiveram presentes no estrato compacto de forma esparsa. A imuno-marcação dessas células na região periglandular também foi observada, porém de forma discreta.

Nas biópsias classificadas na categoria IIA segundo a descrição de Kenney & Doig (1986) houve imuno-reatividade em 87,5% das amostras.

Dessas, todas mostraram positividade em células inflamatórias presentes no estrato esponjoso. A distribuição dessas células foi predominantemente difusa. Houve presença de imunomarcção desse tipo celular na região periglandular e raramente na perivascular. O segundo tipo celular mais marcado foram as células estromais, em 40% das amostras. Estas células encontraram-se principalmente no estrato esponjoso e região periglandular, mas também foram observadas na região perivascular. Raramente notou-se a presença desse tipo celular no estrato compacto. Não houve diferença entre as formas de distribuição focal e difusa. Ainda, pode ser notada marcação no epitélio luminal, epitélio glandular e em raras amostras na parede vascular, porém de forma mais discreta.

Nas amostras incluídas na categoria IIB houve 60% de imuno-reatividade para o fator de crescimento TGF- β 1. O tipo celular mais freqüentemente marcado expresso foram as células inflamatórias, em 53,33% dos casos. Estas células encontraram-se principalmente no estrato esponjoso, mas observou-se marcação também no estrato compacto. A distribuição das células marcadas foi predominantemente difusa. Verificou-se ainda que houve imunomarcção para estas células na região periglandular. Em 20% dos animais houve marcação para este fator nas células estromais do estrato esponjoso, e em uma amostra foi verificada também na região periglandular. Além desses tipos celulares, houve marcação do epitélio glandular em uma amostra.

Entre as amostras da categoria III, a imuno-reatividade foi observada em 80%. Houve positividade nas células inflamatórias em 66,67% dos casos. Estas células, difusamente distribuídas, localizaram-se no estrato esponjoso, podendo ser observadas também no estrato compacto e região periglandular, mas com menor freqüência. Sessenta por cento das amostras demonstraram expressão nas células estromais, observadas no estrato esponjoso e raramente no estrato compacto, com distribuição predominantemente difusa. Notou-se reação positiva nas células estromais periglandulares e perivasculares. Células positivas do endotélio vascular e epitélio glandular puderam ser observadas.

A análise estatística revelou diferença significativamente maior na intensidade da imuno-reação para TGF- β 1 nas células inflamatórias e

estromais quando comparadas às estruturas avaliadas na categoria I. Na categoria IIA, a intensidade foi significativamente maior nas células inflamatórias. Observando esse parâmetro na categoria III, houve maior intensidade de marcação nas células inflamatórias e estromais, contudo, apenas as células inflamatórias mostraram diferença significativa. Comparando os diferentes locais na categoria IIB, não houve diferença na intensidade da expressão do TGF- β 1. Não houve diferença significativa na intensidade da reação imunoistoquímica para TGF- β 1 entre as diferentes categorias em nenhum local estudado. A Tabela 6 demonstra os resultados do estudo estatístico para as classificações de Kenney & Doig (1986).

TABELA 6. Medianas da intensidade da marcação imunoistoquímica de TGF- β 1 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986).

ESTRUTURA	CATEGORIA I	CATEGORIA IIA	CATEGORIA IIB	CATEGORIA III
Epitélio luminal	0 bA ¹	0 bA	0 aA	0 bA
Epitélio glandular	0 bA	0 bA	0 aA	0 bA
Célula endotelial	0 bA	0 bA	0 aA	0 bA
Parede vascular	0 bA	0 bA	0 aA	0 bA
Célula inflamatória	2 aA	3 aA	0 aA	2 aA
Célula estromal	2 aA	0 bA	0 aA	1 abA

¹Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Quando aplicadas as definições de Ricketts & Alonso (1991), nas endometrites crônicas infiltrativas 75% das amostras de endométrio apresentaram imuno-reatividade para o fator TGF- β 1. Em 70,59% houve marcação positiva para células inflamatórias. As células inflamatórias positivas localizaram-se predominantemente no estrato esponjoso, e poucas amostras mostraram infiltrado positivo também no estrato compacto. A distribuição dessas células foi predominantemente difusa. Apenas um caso apresentou marcação localizada somente no estrato compacto, distribuído focalmente, o que também ocorreu na região perivascular. Células inflamatórias positivas puderam ser verificadas na região periglandular, com menor frequência. Células estromais expressaram TGF- β 1 em 35,29% dos casos de endometrite crônica infiltrativa. Estas se localizaram principalmente na região do estrato

esponjoso, tendo distribuição predominantemente difusa. Com menor frequência, células estromais das regiões periglandular e perivascular também mostraram imunomarcção positiva. Em raros casos houve expressão no epitélio glandular, epitélio luminal, célula endotelial e parede vascular.

Nas endometroses houve 75% de positividade para o fator de crescimento TGF- β 1. Mesmo nessa categoria, houve predominância da marcação em células inflamatórias, mas de forma mais discreta, presentes no estrato compacto, de forma difusa e esparsa. Em 25% dos casos houve reatividade desse tipo celular na região periglandular. Presença de células estromais positivas foram verificadas principalmente no estrato esponjoso. Pode ser notada positividade desse tipo celular também na região periglandular, perivascular e raramente no estrato compacto, mas de forma mais freqüente neste último local. Células endoteliais e do epitélio glandular também mostraram reatividade.

A análise estatística revelou que considerando os diferentes grupos não houve diferença significativa na intensidade da expressão de TGF- β 1 entre os endométrios hígidos, com endometrite crônica infiltrativa e endometrose. Entretanto, nas endometroses houve diminuição da intensidade da marcação nas células inflamatórias. Os animais incluídos no grupo hígido mostraram intensidade significativamente maior nas células inflamatórias e estromais. Nas endometrites crônicas infiltrativas, somente as células inflamatórias foram positivas para TGF- β 1. Nas endometroses, embora houvesse marcação em células inflamatórias e estromais, esta ocorreu em menor intensidade do que nos endométrios saudáveis e sem diferença estatisticamente significativa em relação aos outros elementos. A Tabela 7 demonstra os resultados do estudo estatístico para a intensidade da marcação do fator de crescimento TGF- β 1 quando empregada a classificação de Ricketts & Alonso (1991).

TABELA 7. Medianas da intensidade da marcação imunoistoquímica de TGF- β 1 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991).

ESTRUTURA	ENDOMÉTRIO HÍGIDO	ENDOMETRITE CRÔNICA INFILTRATIVA	ENDOMETROSE
Epitélio luminal	0 bA ¹	0 bA	0 aA
Epitélio glandular	0 bA	0 bA	0 aA
Célula endotelial	0 bA	0 bA	0 aA
Parede vascular	0 bA	0 bA	0 aA
Célula inflamatória	2 aA	2 aA	1 aA
Célula estromal	2 aA	0 bA	1 aA

¹Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Kruskal-Wallis.

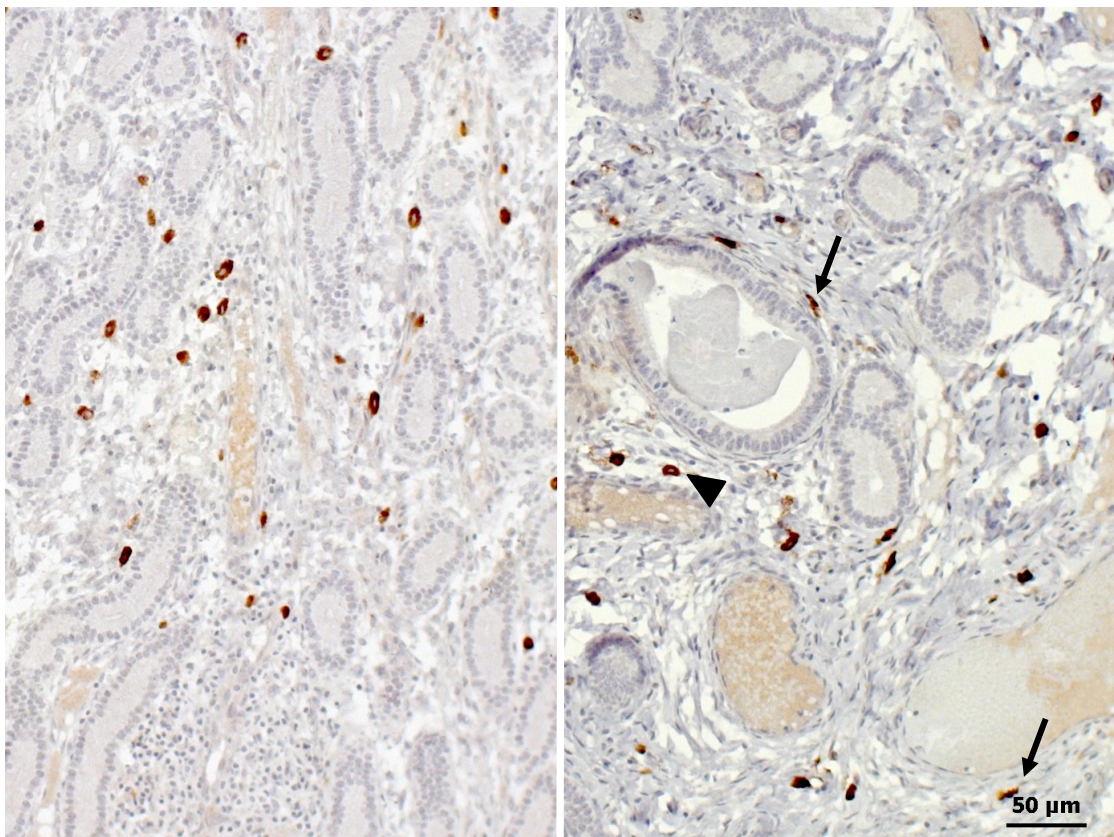


FIGURA 8. Endométrio eqüino - categoria IIA. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunoistoquímica para TGF- β 1. **A:** Imuno-reatividade em células inflamatórias mononucleares no estrato esponjoso. **B:** Imuno-reatividade em células inflamatórias (ponta de seta) e estromais na região periglandular e perivascular (setas). Objetiva: 20x.

5.3.2. MMP-2

A expressão de MMP-2 foi observada em 95% das amostras de endométrio eqüino.

A marcação imunoistoquímica foi observada nas células estromais do estrato compacto, sobretudo nas biópsias de endométrio saudável. Essas células também se mostraram reativas ao redor das glândulas fibróticas e/ou dilatadas, nas quais o epitélio também mostrou intensa reação positiva para esse anticorpo. No entanto, a marcação positiva nas células do epitélio glandular não foi limitada às glândulas com alterações fibróticas. A região da parede vascular, excluindo-se o endotélio, mostrou intensa marcação para MMP-2, principalmente na região mais profunda do estrato esponjoso. A Figura 9 ilustra a marcação imunoistoquímica para a enzima MMP-2.

Entre os elementos considerados neste estudo, não houve imuno-reatividade em células inflamatórias, nem em células endoteliais.

Nos endométrios saudáveis, 92,31% das amostras mostraram imuno-reatividade para a enzima MMP-2. A região da parede vascular e as células estromais foram as estruturas que mostraram marcação num maior número de biópsias, seguidas pelo epitélio glandular. Entretanto, foram as células estromais que apresentaram maior freqüência de células positivas. Nas glândulas endometriais, a reação ocorreu de forma esparsa, mas todas as células da unidade glandular foram positivas. Neste grupo, a menor quantidade de células positivas foi observado no epitélio luminal.

Considerando a classificação de Kenney & Doig (1986), todas as amostras incluídas na categoria IIA, todas as biópsias mostraram imuno-reatividade para MMP-2. As estruturas que demonstraram marcação num maior número de amostras foram as células estromais, mas com freqüência discreta na maior parte das amostras estudadas. As células mais freqüentemente marcadas foram as do epitélio luminal. O epitélio glandular também apresentou imuno-reatividade expressiva para a enzima.

Na categoria IIB, 93,33% dos casos demonstraram positividade para MMP-2. Entre as estruturas analisadas, a marcação positiva foi mais freqüente no epitélio glandular, a parede vascular e células estromais. O grau de expressão variou de discreto a acentuado.

Na categoria III, 93,33% das biópsias foram positivas para MMP-2. O epitélio glandular e a parede vascular foram as estruturas que demonstraram imuno-reatividade em maior número dentre as amostras estudadas nesta categoria, seguidas pelas células estromais. As células marcadas positivamente com maior frequência nas amostras deste grupo estiveram localizadas no epitélio glandular, além das células estromais.

Quanto à intensidade da marcação, comparando as diferentes categorias de endométrio, houve aumento da expressão no epitélio glandular conforme aumentou o grau de lesão. A intensidade da expressão de MMP-2 por este tipo celular foi maior na categoria III, do que na categoria I, resultado estatisticamente significativo. Nas categorias intermediárias IIA e IIB, o epitélio glandular mostrou intensidade moderada de expressão, mas não houve diferença estatística significativa com as demais categorias.

A parede vascular mostrou reação moderada na categoria I. Imuno-reação discreta nesta região foi verificada nas categorias IIB e III. Na categoria IIA, a parede vascular não mostrou marcação positiva na maior parte das amostras. Entretanto, diferença significativa na intensidade da reação imunoistoquímica foi observada somente entre as categorias I e IIA.

Entre as células estromais, embora as categorias I, IIB e III apresentassem reação de intensidade moderada, não houve diferença significativa em relação às amostras incluídas na categoria IIA, cuja intensidade caracterizou-se por ser discreta.

Pode-se observar que nos endométrios saudáveis, as estruturas que apresentaram maior intensidade de marcação imunoistoquímica para a enzima MMP-2 foram a parede vascular e as células estromais. O epitélio glandular mostrou intensidade discreta, porém sem diferença significativa com as demais estruturas. Na maior parte das biópsias, não houve reação positiva para o epitélio luminal ou esta foi discreta.

Comparando-se as diferentes estruturas dentro de cada grupo, as amostras da categoria IIA mostraram marcação intensa no epitélio luminal, moderada no epitélio glandular e discreta nas células estromais, mas sem diferença significativa. Intensidade de expressão significativamente maior da MMP-2 foi verificada somente nas células do epitélio luminal e do epitélio glandular em relação às células endoteliais, inflamatórias e parede vascular.

Na categoria IIB, houve maior intensidade da marcação no epitélio glandular e nas células estromais. Houve diferença na intensidade dessas estruturas quando comparadas à intensidade da reação presente no epitélio luminal, nas células endoteliais e inflamatórias. Células estromais apresentaram marcação positiva discreta, sem diferença significativa com as demais estruturas endometriais pesquisadas.

Entre as amostras da categoria III, verificou-se que o epitélio glandular foi a estrutura que apresentou maior intensidade de marcação, seguido pelas células estromais e parede vascular, de forma gradativamente menor. O estudo estatístico revelou haver diferença significativamente maior no grau da expressão do epitélio glandular e células estromais com o epitélio luminal, células endoteliais e inflamatórias, mas sem significância quando comparado com a intensidade da reação da parede vascular.

A Tabela 8 demonstra os resultados da análise estatística da intensidade da reação imunoistoquímica para MMP-2, realizada nas biópsias classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986).

TABELA 8. Medianas da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-2 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986).

ESTRUTURA	CATEGORIA I	CATEGORIA IIA	CATEGORIA IIB	CATEGORIA III
Epitélio luminal	0 bB ¹	3 aA	0 bB	0 bB
Epitélio glandular	1 abB	2 aAB	2 aAB	3 aA
Célula endotelial	0 bA	0 bA	0 bA	0 bA
Parede vascular	2 aA	0 bB	1 abAB	1 abAB
Célula inflamatória	0 aA	0 bA	0 bA	0 bA
Célula estromal	2 aA	1 abA	2 aA	2 aA

¹Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Quando aplicada a classificação de Ricketts & Alonso (1991), 94,12% das amostras mostraram imuno-reatividade positiva para MMP-2 nas endometrites crônicas infiltrativas. Neste grupo, o epitélio glandular foi a estrutura que marcou positivamente na maior parte das amostras, seguido pela parede vascular, células estromais, e epitélio luminal, diminuindo

gradativamente. Foi também o epitélio glandular o elemento expressado com maior frequência nas amostras, seguidas pelas células estromais.

Nas endometroses, 91,67% das amostras foram imuno-reativas para MMP-2. A frequência de amostras com marcação positiva para este anticorpo foi expressivamente maior nas células estromais, seguidas pela parede vascular, epitélio glandular e epitélio luminal. Foram as células estromais que também demonstraram positividade com maior frequência, mas esta foi variável entre as amostras. A frequência da positividade nas células estromais foi sucedida pela do epitélio glandular, da parede vascular e finalmente pelo epitélio luminal.

Quanto à intensidade da imuno-reatividade para MMP-2, observou-se que o epitélio glandular mostrou maior expressão nas endometrites crônicas infiltrativas. Na parede vascular esta característica foi observada nos endométrios hígidos; nas células estromais, foi maior nos endométrios hígidos e nas endometroses. Notou-se que a intensidade da marcação para MMP-2 no epitélio luminal foi maior nas endometroses, já que nos demais grupos, grande parte dessas células não demonstrou positividade. Entretanto, a análise estatística do grau de intensidade da imuno-reatividade dos elementos estudados entre os diferentes grupos não demonstrou diferença significativa.

Considerando a intensidade da expressão de MMP-2 entre as diferentes estruturas dentro de cada grupo classificado conforme Ricketts & Alonso (1991), verificou-se que nas endometrites crônicas infiltrativas o epitélio glandular, apresentou maior intensidade da reação imunoistoquímica. Notou-se expressão discreta na parede vascular e células estromais. Entretanto, o estudo estatístico demonstrou diferença significativa somente entre as células do epitélio glandular quando comparadas às do epitélio luminal, do endotélio vascular e do infiltrado inflamatório. Já nas endometroses, as células que apresentaram maior grau de expressão foram as do estroma, seguidas pelo epitélio glandular, epitélio luminal e parede vascular. Entretanto, o resultado da análise estatística demonstrou diferença significativa somente entre a intensidade da reação imunoistoquímica das células estromais, que foi maior em relação à imuno-reatividade das endoteliais e inflamatórias.

A Tabela 9 demonstra os resultados do estudo estatístico dos graus de intensidade para amostras classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991).

TABELA 9. Medianas da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-2 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991).

ESTRUTURA	ENDOMÉTRIO HÍGIDO	ENDOMETRITE CRÔNICA INFILTRATIVA	ENDOMETROSE
Epitélio luminal	0 bA ¹	0 bA	1 abA
Epitélio glandular	1 abA	2 aA	1.5 abA
Célula endotelial	0 bA	0 bA	0 bA
Parede vascular	2 aA	1 abA	1 abA
Célula inflamatória	0 bA	0 bA	0 bA
Célula estromal	2 aA	1abA	2aA

¹Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Kruskal-Wallis.

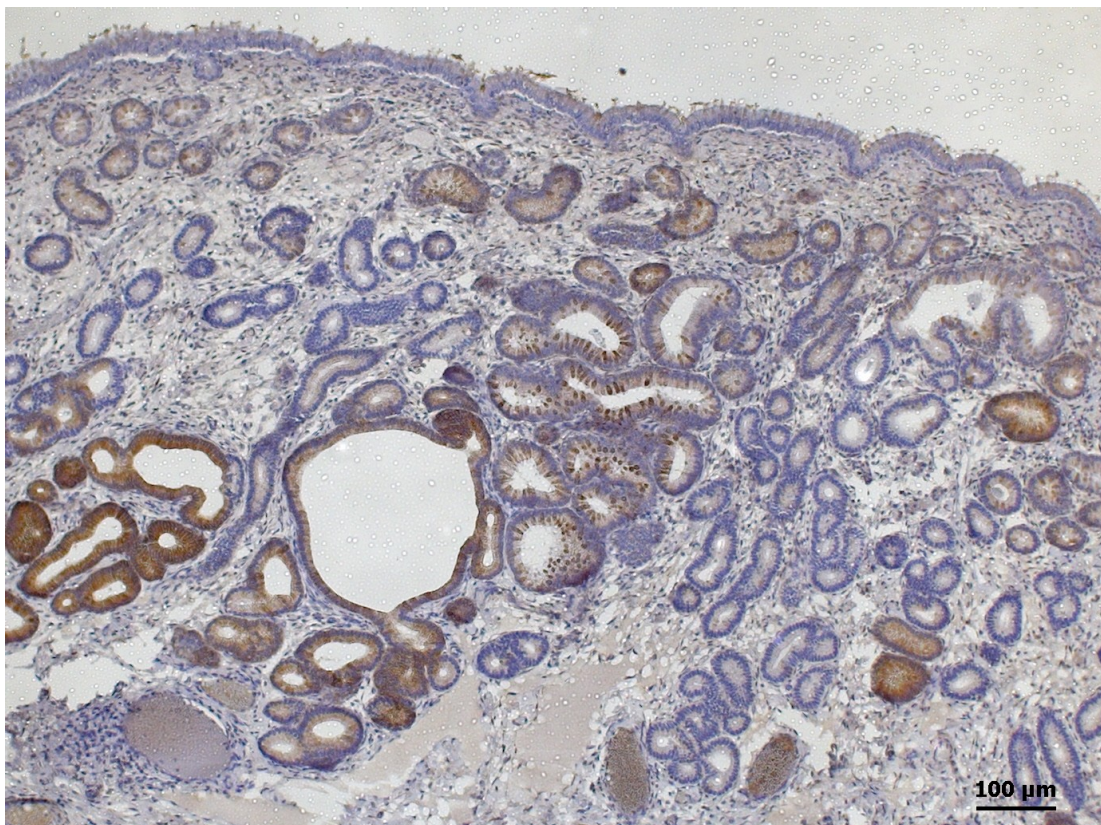


FIGURA 9. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunoistoquímica para MMP-2. Imuno-reatividade intensa e freqüente nas células epiteliais glandulares dilatadas, associadas à fibrose glandular. Presença de marcação heterogênea em algumas glândulas. Objetiva: 10x.

5.3.3. MMP-9

A expressão de MMP-9 foi constatada em todas as amostras de endométrio eqüino.

A marcação imunoistoquímica para este anticorpo mostrou ser difusa por todo o endométrio. Todos os elementos considerados neste estudo apresentaram imuno-reatividade em intensidade predominantemente acentuada. As células estromais marcaram intensamente em grande parte das biópsias, sobretudo no estrato compacto e região superficial do estrato esponjoso. A Figura 10 ilustra a marcação imunoistoquímica para a enzima MMP-9.

Nos endométrios saudáveis, foi observada marcação positiva para MMP-9 no epitélio glandular e nas células estromais em todas as amostras estudadas. Células inflamatórias mononucleares e epitélio glandular expressaram MMP-9 em 92,3% dos casos. A região da parede vascular foi positiva em 84,61% e o epitélio luminal em 76,92%. As células que marcaram positivamente com maior freqüência nas biópsias foram as do epitélio glandular, seguidas pelas células estromais, células inflamatórias e células endoteliais. As células do epitélio luminal mostraram freqüência variável. Quanto à intensidade da reação imunoistoquímica, as células endoteliais, inflamatórias e estromais apresentaram grau maior, mostrando-se acentuado, enquanto que o epitélio glandular e a parede vascular mostraram intensidade moderada. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão de nenhum dos elementos estudados.

Quando aplicada a classificação de Kenney & Doig (1986), na categoria IIA, células do epitélio glandular, do endotélio, parede vascular e do estroma mostraram imuno-reatividade em todas as amostras estudadas. Marcação positiva no epitélio luminal e células inflamatórias foi observada em 93,75% dos casos. Os elementos marcados com maior freqüência nas biópsias foram o epitélio glandular e as células inflamatórias, seguidos pelas células endoteliais.

Na categoria IIB o epitélio glandular, as células endoteliais e as estromais foram positivas em todas as amostras estudadas. As células inflamatórias e o epitélio luminal mostraram imuno-reatividade em 86,67% dos

casos, enquanto a região da parede vascular demonstrou reação positiva em 60% dos animais. As estruturas positivas observadas com maior frequência nesta categoria foram as células do epitélio glandular.

Na categoria III, epitélio glandular, células endoteliais e estromais positivas para MMP-9 foram observadas em todas as amostras. Epitélio luminal, células inflamatórias e parede vascular mostraram imuno-reatividade em 93,33%, 80% e 73,33% dos casos, respectivamente. As estruturas que expressaram essa enzima mais freqüentemente foram as células endoteliais, seguidas pelo epitélio luminal.

Quando comparadas as freqüências dos diferentes elementos marcados entre as categorias de endométrio, nas células do epitélio glandular, do endotélio vascular e as do infiltrado inflamatório não houve modificações evidentes. No epitélio luminal e na região da parede vascular observou-se que houve diminuição do número de células que demonstraram positividade para MMP-9 conforme aumentou o grau de lesão. Já nas células estromais, houve uma diminuição gradativa discreta na quantidade de células positivas entre os endométrios saudáveis e aqueles com lesões discretas e intermediárias, enquanto que endométrios da categoria III apresentaram maior quantidade de células que expressaram a enzima, mas ainda em menor número do que os da categoria I.

Ao se observar a intensidade da reação imunoistoquímica para a enzima MMP-9, ao se comparar cada estrutura nas categorias diversas, observou-se que somente a parede vascular demonstrou diferença estatisticamente significativa, sendo menor na categoria IIB quando comparada à categoria IIA. O epitélio luminal e as células endoteliais sempre expressaram intensidade acentuada; já o epitélio glandular mostrou intensidade moderada em todas as categorias. Considerando as células inflamatórias, houve diminuição da intensidade nas endometrites mais graves, incluídas na categoria III. Já nas células estromais, este fato foi observado nos endométrios da categoria IIB. Porém, estes resultados não foram estatisticamente significativos.

Ao se comparar os elementos dentro de cada categoria, observou-se que na categoria IIA a reatividade foi menor no epitélio glandular. Na categoria IIB, os elementos expressos com maior intensidade foram o

epitélio luminal, as células endoteliais e as inflamatórias. Já na categoria III, reação mais intensa ocorreu no epitélio luminal, células endoteliais e estromais. Entretanto, não houve diferença significativa na intensidade da reação imunoistoquímica para MMP-9 comparando as categorias entre si.

Os resultados da análise estatística na avaliação da intensidade da reação imunoistoquímica para a enzima MMP-9 nas biópsias classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986) são apresentados na Tabela 10.

TABELA 10. Medianas da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-9 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986).

ESTRUTURA	CATEGORIA I	CATEGORIA IIA	CATEGORIA IIB	CATEGORIA III
Epitélio luminal	3 aA ¹	3 aA	3 aA	3 aA
Epitélio glandular	2 aA	2 aA	2 aA	2 aA
Célula endotelial	3 aA	3 aA	3 aA	3 aA
Parede vascular	2 aAB	3 aA	1 aB	2 aAB
Célula inflamatória	3 aA	3 aA	3 aA	2 aA
Célula estromal	3 aA	3 aA	2 aA	3 aA

¹Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Quando aplicada a classificação de Ricketts & Alonso (1991), 100% das amostras apresentaram imuno-reatividade para MMP-9 em todas as estruturas estudadas nas endometrites crônicas infiltrativas, com exceção da parede vascular, que expressou esta enzima em 78,79% dos casos. O epitélio glandular foi a estrutura que demonstrou maior frequência de células positivas, seguido das células endoteliais.

Nas endometroses, houve imuno-reatividade para MMP-9 em todas as amostras no epitélio luminal, epitélio glandular, células endoteliais e fibroblastos. O epitélio glandular apresentou maior frequência de células positivas, seguido pelas células endoteliais, células do infiltrado inflamatório e células estromais.

Quando comparados os diferentes elementos estudados entre os endométrios hígidos, com endometrite crônica infiltrativa e endometrose, não foram evidenciadas modificações na frequência de células positivas no epitélio luminal e células endoteliais. Embora no epitélio glandular houvesse predominância da expressão de MMP-9 em quantidade acentuada nos três

grupos, notou-se que houve menor número de amostras apresentando essa característica nos grupos acometidos por alterações de ordem inflamatória ou degenerativa, fato também observado nas células estromais. O epitélio glandular do grupo hígido expressou a enzima de forma acentuada em 92,3% das amostras; o que ocorreu em 81% das endometrites crônicas infiltrativas e em 75% das endometroses. Já nas células estromais, não houve diferença entre os grupos com lesões inflamatórias ou degenerativas, mas o número de células que expressaram MMP-9 nos dois grupos foi discretamente menor do que no grupo hígido. Considerando a parede vascular, as endometroses demonstraram menor frequência da marcação para MMP-9 do que os endométrios hígidos e nos que prevaleceram as alterações inflamatórias.

Quando considerada a intensidade da reação imunoistoquímica, não houve diferença significativa entre os elementos estudados quando comparados entre si em cada grupo isolado ou entre grupos distintos.

Os resultados do estudo estatístico para a variável MMP-9 na classificação de Ricketts & Alonso (1991) estão demonstrados nas Tabela 11.

TABELA 11. Medianas da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-9 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991).

ESTRUTURA	ENDOMÉTRIO HÍGIDO	ENDOMETRITE CRÔNICA INFILTRATIVA	ENDOMETROSE
Epitélio luminal	3 aA ¹	3 aA	3 aA
Epitélio glandular	2 aA	2 aA	2 aA
Célula endotelial	3 aA	3 aA	3 aA
Parede vascular	2 aA	2 aA	2 aA
Célula inflamatória	3 aA	3 aA	2,5 aA
Célula estromal	3 aA	3aA	3 aA

¹Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Kruskal-Wallis.

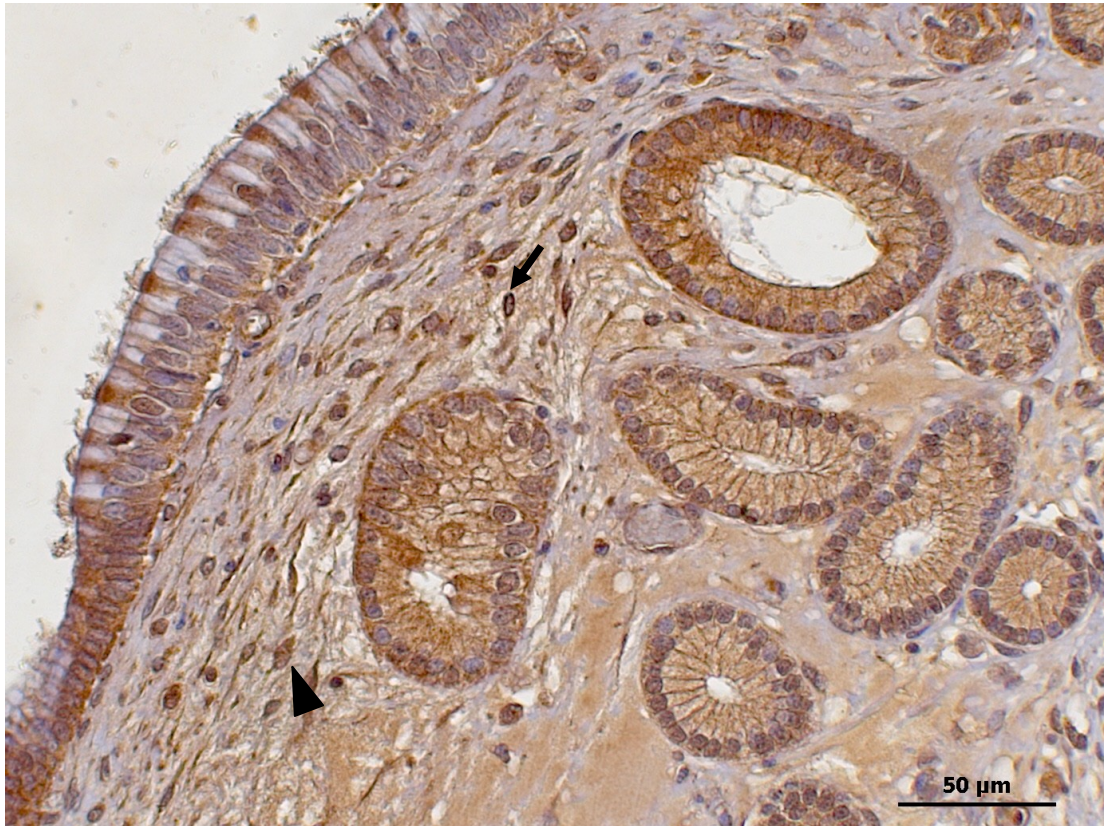


FIGURA 10. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunoistoquímica para MMP-9. Imuno-reatividade difusa. Reação de intensidade acentuada no epitélio glandular, célula inflamatória (seta) e células estromais superficiais (ponta de seta). Epitélio luminal com positividade segmentar. Objetiva: 40x.

5.3.4. PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para o estudo da proliferação celular foram utilizados os anticorpos primários Ki-67 e PCNA.

As amostras de endométrio eqüino não mostraram marcação positiva para o anticorpo Ki-67 em nenhuma técnica testada durante a padronização do método imunistoquímico, embora amostras controle (linfoma canino e carcinoma de pele na espécie eqüina) demonstrassem imunoreatividade evidente. Dessa forma, a análise da proliferação celular foi realizada empregando-se o anticorpo PCNA.

Em alguns casos que apresentaram lesões fibróticas menos evidentes, não foi possível a contagem do número total de células presentes na fibrose periglandular, fato mais freqüente nas células estromais. Por outro lado, nas amostras em que esse tipo de alteração ocorreu de forma intensa, houve biópsias que não apresentaram glândulas normais nos campos pesquisados.

Nos endométrios com alterações histopatológicas, as glândulas que apresentaram modificações degenerativas possuíram segmentos de células epiteliais proliferativas e outros segmentos com células não proliferativas com freqüência, dado pouco observado ou ausente nos endométrios saudáveis.

Observou-se atividade proliferativa em células estromais fenotipicamente distintas, ou seja, naquelas que se apresentavam morfológicamente como fibroblastos ou como fibrócitos. A presença mais freqüente de células estromais proliferativas na região próxima da membrana basal foi um achado comum nos ninhos fibróticos maiores. Porém, células marcadas positivamente foram também encontradas próximo de vasos sanguíneos normais ou daqueles que mostravam fibrose periférica. No entanto, na contagem final do número de células estromais proliferantes não foi feita a distinção entre localizações.

De maneira geral, atividade proliferativa mais intensa foi observada na região do estrato compacto. Entre as células epiteliais, o epitélio glandular superficial mostrou maior índice de proliferação. As células estromais superficiais demonstraram alto índice proliferativo quando comparado com os demais tipos celulares estudados. Entretanto, não houve diferença

estatisticamente significativa na porcentagem dos diferentes tipos celulares marcados positivamente para o PCNA, exceto quando houve presença de fibrose periglandular. Nas glândulas fibróticas, a atividade proliferativa foi significativamente menor, tanto nas células epiteliais quanto nas células estromais. O resultado do estudo estatístico está demonstrado na Tabela 12 e Figura 11.

TABELA 12. Médias das porcentagens de proliferação celular nas diferentes estruturas endometriais nas amostras classificadas conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log.

LOCAIS	MÉDIAS
Epitélio luminal	1,15 ab ¹
Epitélio glandular superficial	1,21 a
Célula estromal superficial	1,36 a
Epitélio glandular profundo	1,10 ab
Célula estromal profunda	1,21 a
Epitélio glandular (fibrose periglandular)	0,84 bc
Célula estromal (fibrose periglandular)	0,73 c

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

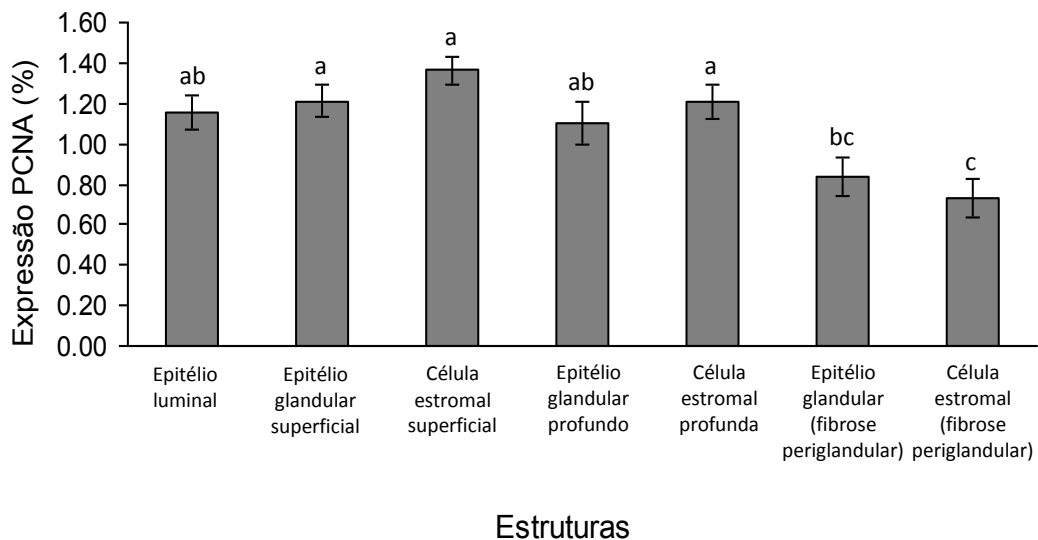


FIGURA 11. Médias das porcentagens de proliferação celular nas diferentes estruturas do endométrio equino, nas biópsias classificadas conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

Comparando-se as categorias definidas por Kenney & Doig (1986) entre si, sem distinção entre as estruturas, nota-se que houve aumento da atividade proliferativa nas biópsias que mostravam lesão discreta ou moderada, e diminuição nos casos de lesão grave. Entretanto, estes resultados não mostraram diferença estatisticamente significativa. A Tabela 13 e a Figura 12 demonstram o estudo estatístico realizado para este dado.

TABELA 13. Médias das porcentagens de proliferação celular nas categorias definidas por Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log.

CLASSIFICAÇÃO	MÉDIAS
Categoria I	1,04 ¹
Categoria IIA	1,19
Categoria IIB	1,14
Categoria III	0,97

¹Não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F (ANOVA).

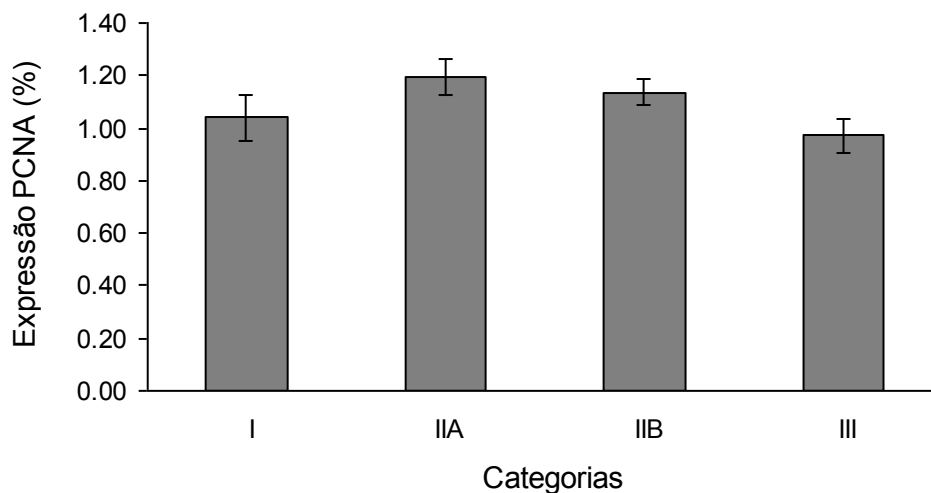


FIGURA 12. Médias das porcentagens de proliferação celular no endométrio equino de diferentes categorias nas biópsias classificadas conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log.

Pode-se verificar que nos endométrios da categoria I e nos que tinham alterações discretas (categoria IIA), o epitélio glandular profundo e as células estromais superficiais foram as estruturas que mostraram maior

atividade proliferativa (Figura 18). Nas amostras da categoria IIB isso ocorreu nas células do epitélio glandular superficial e células estromais profundas. Entretanto, não foi constatada diferença estatisticamente significativa para esses dados. Já na categoria III, as células com percentual significativamente mais alto de proliferação foram as do estroma superficial e epitélio glandular superficial.

Das estruturas consideradas neste estudo houve diminuição da atividade proliferativa no epitélio luminal, células estromais superficiais, epitélio glandular profundo e células estromais profundas, além das células epiteliais glandulares e estromais das glândulas fibróticas, conforme o grau de comprometimento do endométrio aumentou. Isso ficou evidenciado no epitélio glandular, o qual mostrou diferença significativamente menor na porcentagem de células positivas para PCNA nos endométrios da categoria III (Figura 20) em relação às categorias I e IIA, quando classificados conforme Kenney & Doig (1986). No epitélio glandular superficial e células estromais superficiais também foi observada redução da proliferação celular nos endométrios com alteração histopatológica, mas que não seguiram o mesmo padrão gradativo, observado na Figura 13. Embora o resultado não tenha sido estatisticamente significativo, no epitélio glandular superficial, houve redução da atividade proliferativa nas biópsias da categoria IIA. Esta atividade foi aumentando nas amostras com lesões moderadas e graves. Já nas células estromais superficiais, as categorias intermediárias apresentaram redução gradativa da proliferação, mas aumentou discretamente na categoria III, ainda permanecendo menor do que na categoria I.

Nas estruturas presentes nas glândulas fibróticas, observou-se que as lesões discretas e graves apresentaram porcentagem de células proliferativas semelhantes. Entretanto, embora não tenha sido significativo estatisticamente, houve aumento de atividade na categoria IIB. Comparando-se glândulas normais e fibróticas, com exceção da categoria IIA, pode-se observar que houve uma tendência ao aumento da atividade proliferativa nas células epiteliais, mais evidente na categoria III. Já nas células estromais profundas, houve redução da atividade proliferativa em endométrios que apresentavam qualquer grau de lesão, porém sem significância estatística. Estes dados estão apresentados na Figura 14.

A Tabela 14 demonstra as médias das porcentagens (após transformação logarítmica) nas diferentes estruturas endometriais que expressaram PCNA, classificados conforme Kenney & Doig (1986).

TABELA 14. Médias das porcentagens de células em proliferação nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log.

ESTRUTURA	CATEGORIA I	CATEGORIA IIA	CATEGORIA IIB	CATEGORIA III
Epitélio luminal	1,23 a ¹	1,15	1,15	1,09 ab
Epitélio glandular superficial	1,38 a	1,08	1,23	1,17 a
Célula estromal superficial	1,56 aA	1,53 A	1,11 A	1,26 aA
Epitélio glandular profundo	1,62 aA	1,43 A	1,01 AB	0,41 bB
Célula estromal profunda	1,49 a	1,24	1,20	0,94 ab
Epitélio glandular (fibrose periglandular)	0 bB	1,05 A	1,18 A	1,05 abA
Célula estromal (fibrose periglandular)	0 bB	0,88 A	1,09 A	0,87 abA

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente a 5% de probabilidade. A ausência de letras minúsculas na coluna ou maiúsculas na linha implica que o teste F da análise de variância foi não-significativo.

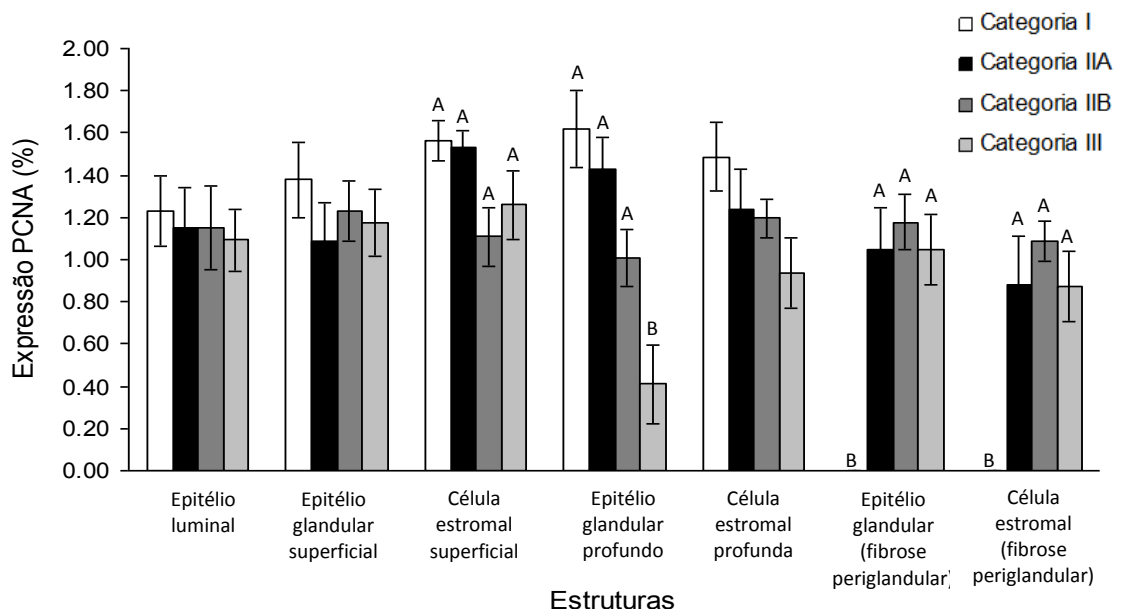


FIGURA 13. Médias das porcentagens de proliferação celular nas estruturas do endométrio equino, nas diferentes categorias definidas de acordo com Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

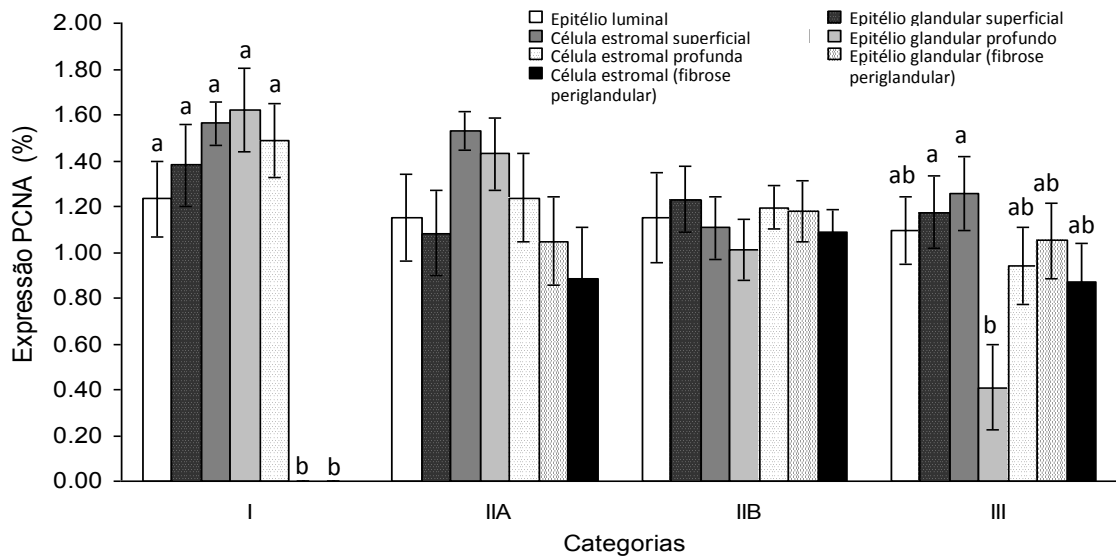


FIGURA 14. Médias das porcentagens da proliferação celular nas estruturas do endométrio eqüino agrupadas por categoria, na classificação conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

Nas biópsias classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991), comparando-se os grupos entre si, foi possível a identificação de aumento da atividade proliferativa nos endométrios que apresentaram alterações morfológicas, sendo mais elevada nas endometroses. Entretanto, essa característica não mostrou diferença estatisticamente significativa. A Tabela 15 e a Figura 15 ilustram a análise estatística para este estudo.

TABELA 15. Médias das porcentagens de proliferação celular entre as categorias definidas por Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log.

CLASSIFICAÇÃO	MÉDIAS
Endométrio hígido	1,04 ¹
Endometrite crônica infiltrativa	1,06
Endometrose	1,23

¹Não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F (ANOVA).

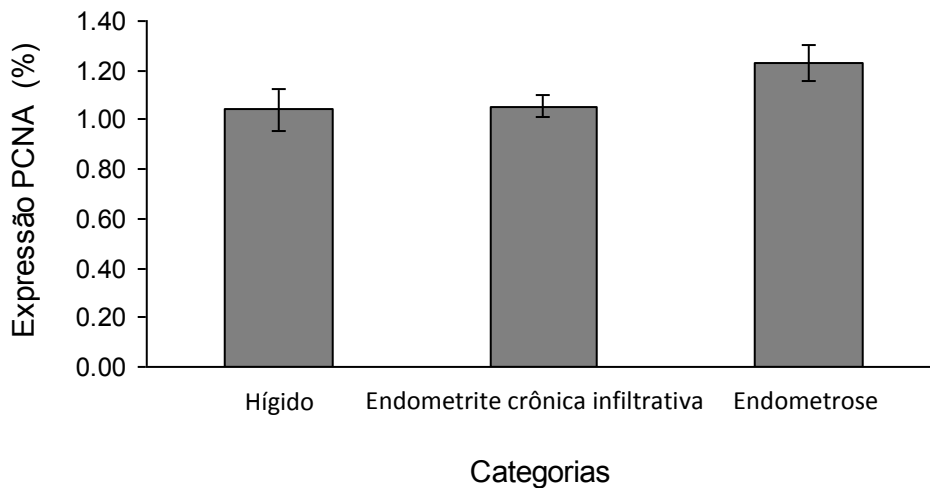


FIGURA 15. Médias das porcentagens de proliferação celular no endométrio eqüino de diferentes categorias nas biópsias classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log.

Em todas as células estudadas, sem considerar as glândulas fibróticas, há diminuição da proliferação celular tanto nas endometrites crônicas infiltrativas como nas endometroses. Considerando os tipos de processos, verificou-se que, exceto no epitélio luminal, nas endometrites crônicas infiltrativas houve menor índice proliferativo. Contudo, diferença estatisticamente significativa ocorreu somente nas células do epitélio glandular profundo, que proliferam menos nas endometrites crônicas infiltrativas do que no endométrio hígido. Estes achados estão demonstrados na Figura 16.

Nas glândulas do estrato esponjoso, embora não tenha sido observada significância estatística, há aumento da atividade proliferativa nas células epiteliais das glândulas fibróticas tanto nas endometrites crônicas infiltrativas (Figura 19) quanto nas endometroses, ocorrendo o inverso nas células estromais (Figura 17).

A Tabela 16 mostra os resultados da avaliação estatística nas diferentes estruturas endometriais e grupos classificados conforme Ricketts & Alonso (1991).

TABELA 16. Médias das porcentagens de células em proliferação nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log.

ESTRUTURA	ENDOMÉTRIO HÍGIDO	ENDOMETRITE CRÔNICA INFILTRATIVA	ENDOMETROSE
Epitélio luminal	1,23 a ¹	1,15	1,07
Epitélio glandular superficial	1,38 a	1,13	1,25
Célula estromal superficial	1,56 a	1,23	1,51
Epitélio glandular profundo	1,62 aA	0,93 B	0,98 AB
Célula estromal profunda	1,49 a	1,04	1,36
Epitélio glandular (fibrose periglandular)	0 bB	1,03 A	1,27 A
Célula estromal (fibrose periglandular)	0 bB	0,87 A	1,17 A

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente a 5% de probabilidade. A ausência de letras minúsculas na coluna ou maiúsculas na linha implica que o teste F da análise de variância foi não-significativo.

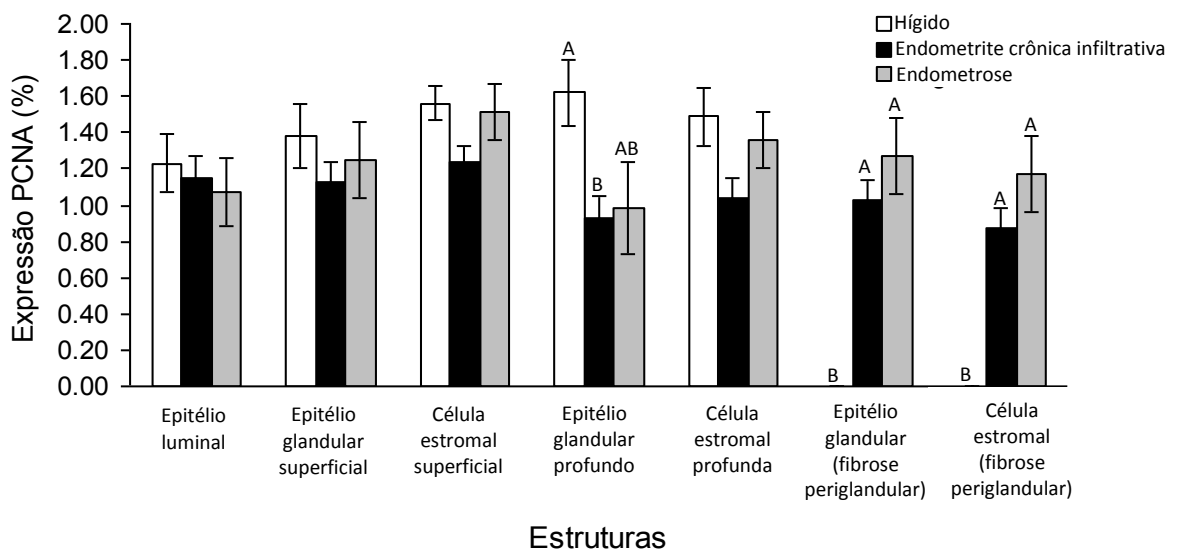


FIGURA 16. Médias das porcentagens da proliferação celular nas diferentes estruturas do endométrio equino, nas biópsias classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

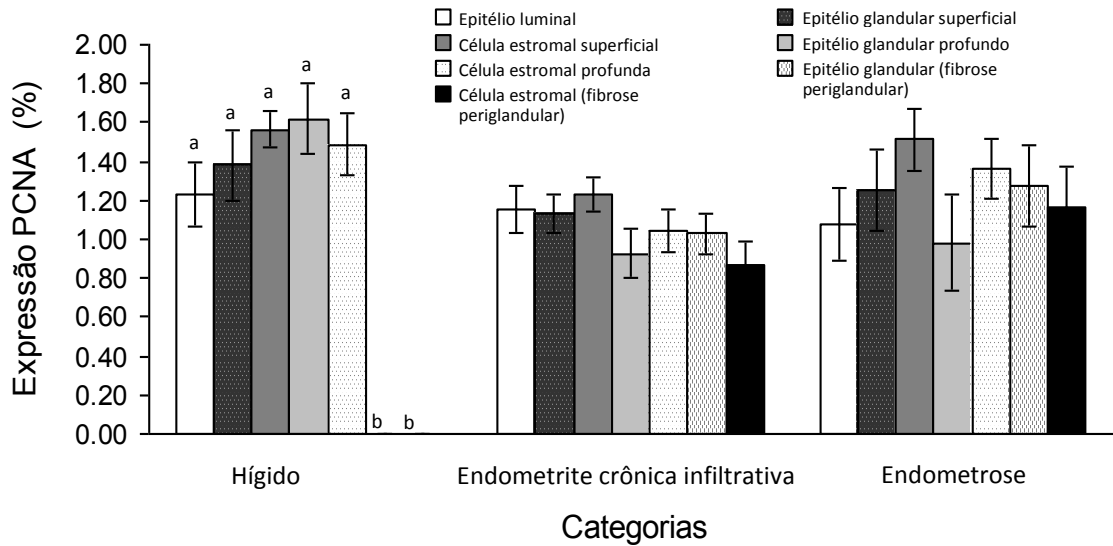


FIGURA 17. Médias das porcentagens da proliferação celular nas estruturas do endométrio eqüino agrupadas de acordo com as características morfológicas, na classificação conforme Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

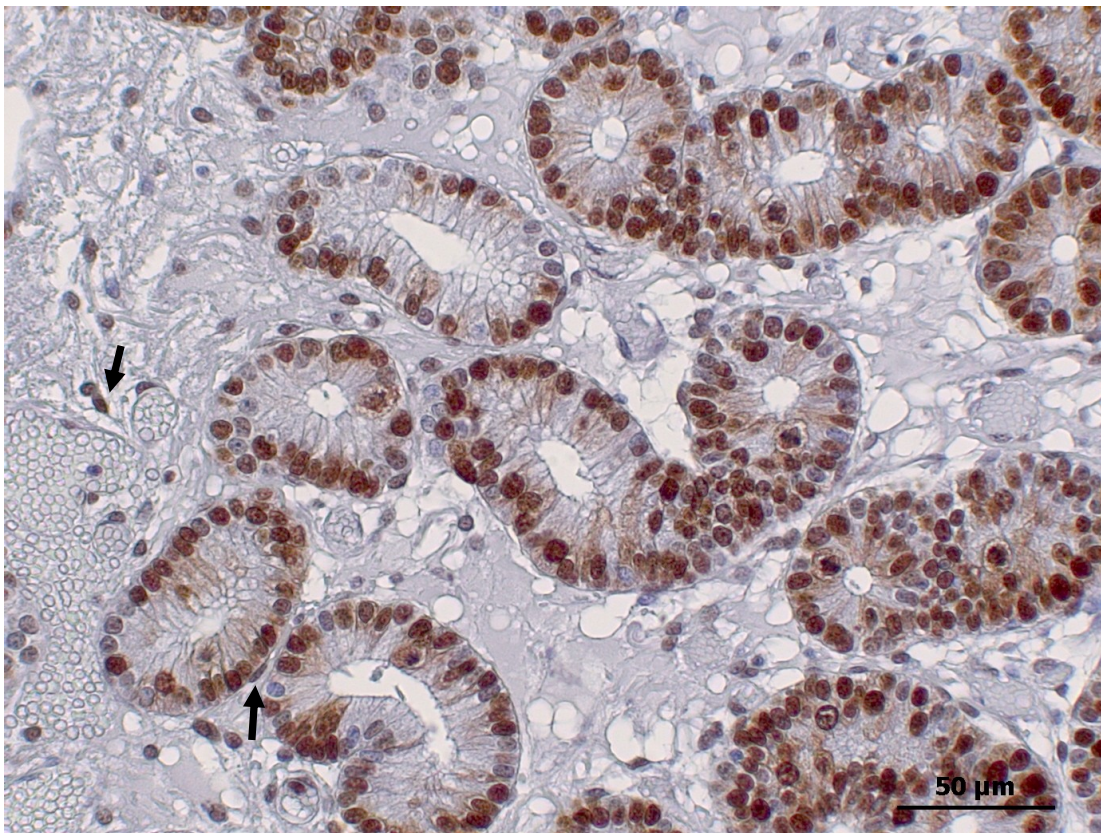


FIGURA 18. Endométrio eqüino - categoria I. Marcação imunoistoquímica para PCNA. Imuno-reatividade freqüente nas células do epitélio glandular e estromais (setas). Objetiva: 40x.

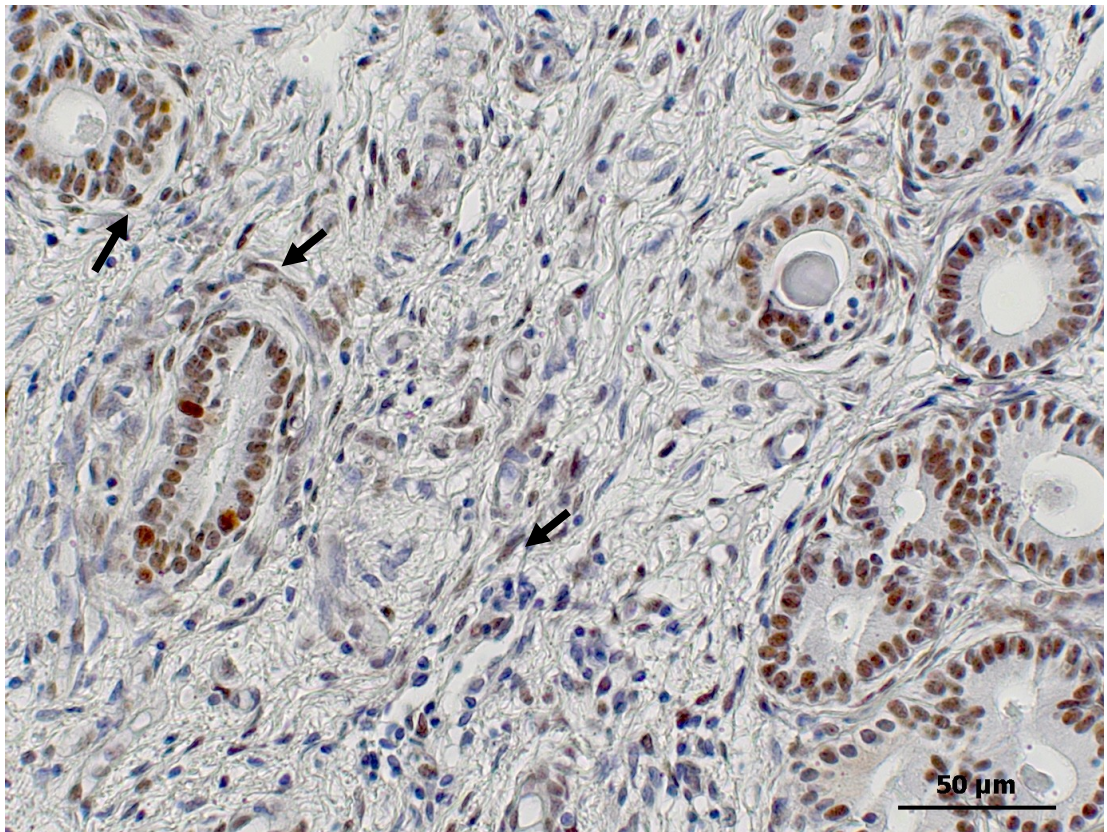


FIGURA 19. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunoistoquímica para PCNA. Imuno-reatividade nas células do epitélio glandular e estromais (setas). Objetiva: 40x.

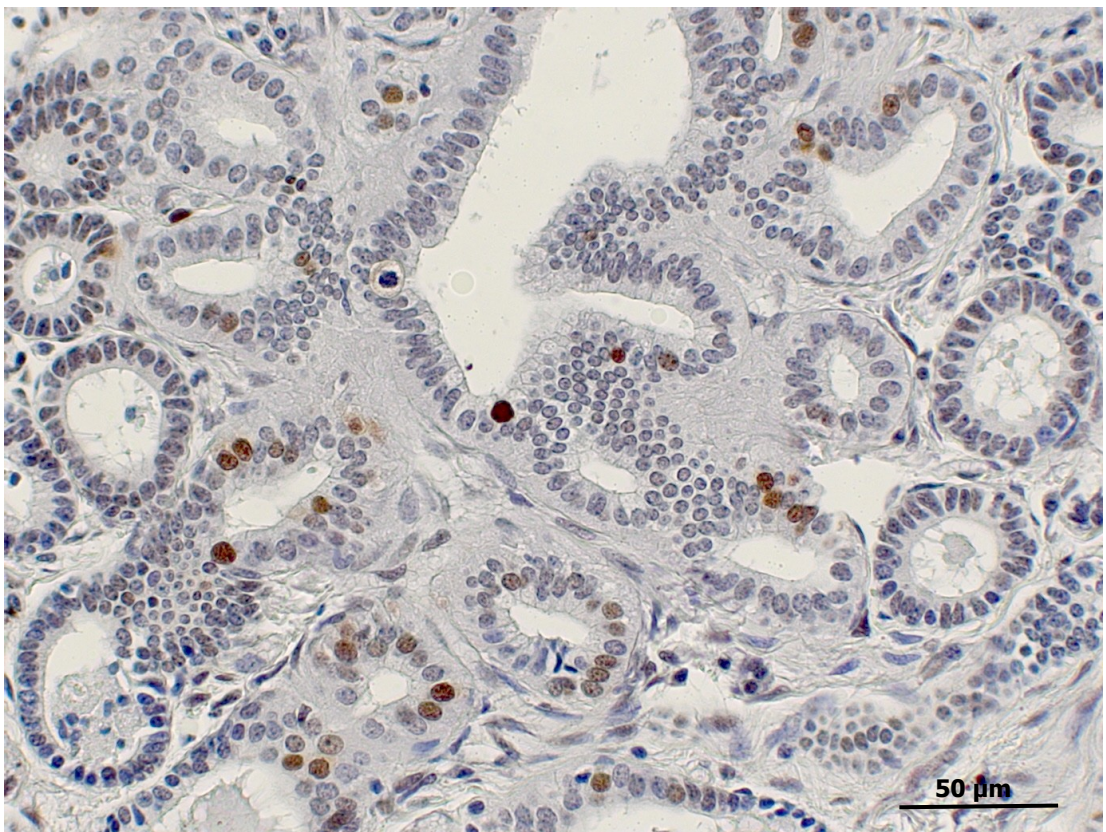


FIGURA 20. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrose. Marcação imunoistoquímica para PCNA. Imuno-reatividade esparsa nas células do epitélio glandular. Objetiva: 40x.

5.3.5. APOPTOSE

Para o estudo da apoptose foi empregado o anticorpo primário caspase-3 clivada.

A reação imunoistoquímica mostrou positividade predominantemente em corpos apoptóticos, sobretudo nas células epiteliais.

A expressão da caspase-3 clivada foi observada em todas as regiões analisadas.

Considerando as estruturas endometriais entre si, independente do grupo a que pertence a amostra dentro da classificação de KENNEY & DOIG (1986), o epitélio demonstrou maior porcentagem de células apoptóticas do que as células estromais. O epitélio luminal mostrou diferença significativamente maior do percentual de células em apoptose do que todos os outros tipos celulares. As células estromais na região da fibrose periglandular mostrou valor significativamente menor de apoptose. O epitélio das glândulas fibróticas mostrou menor índice apoptótico quando comparado com as glândulas profundas normais, embora sem diferença estatisticamente significativa. A Tabela 17 e a Figura 21 mostram os resultados estatísticos nesta análise.

TABELA 17. Médias das porcentagens de células apoptóticas entre as diferentes estruturas endometriais nas amostras classificadas conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log.

LOCAIS	MÉDIAS
Epitélio luminal	0,24 a ¹
Epitélio glandular superficial	0,12 b
Célula estromal superficial	0,02 c
Epitélio glandular profundo	0,15 b
Célula estromal profunda	0,07 bc
Epitélio glandular (fibrose periglandular)	0,08 bc
Célula estromal (fibrose periglandular)	0,01 c

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

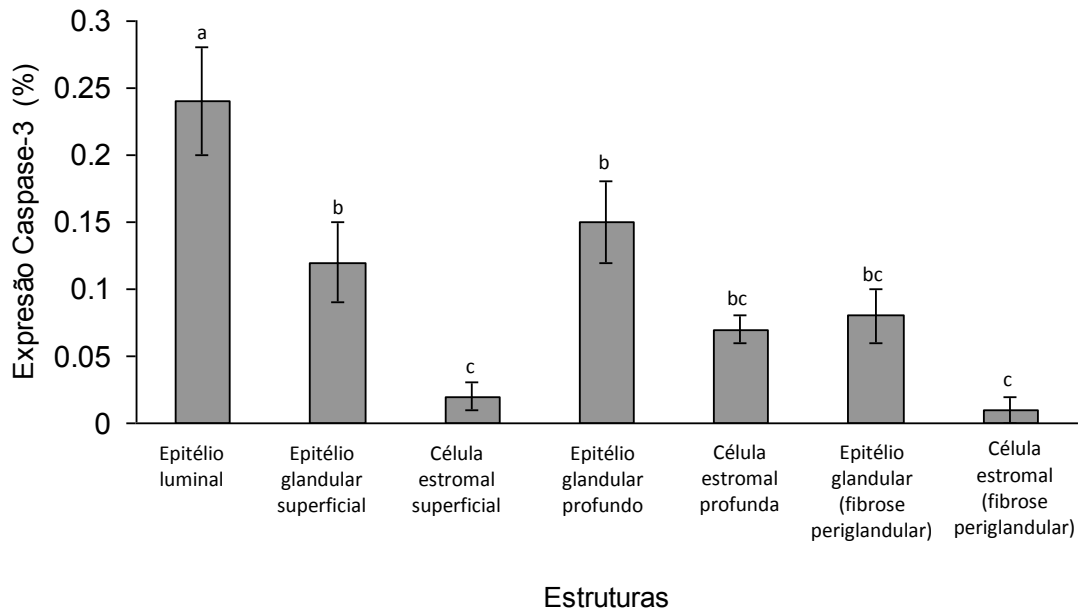


FIGURA 21. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas diferentes estruturas do endométrio equino, nas biópsias classificadas conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

Comparando-se as categorias entre si, observou-se que o fenômeno da apoptose foi mais freqüente nos endométrios da categoria I. A quantidade de células marcadas diminuiu conforme aumentou o grau da lesão endometrial, estabilizando-se nos endométrios que apresentaram alterações acentuadas (categoria III). Contudo, não houve significância estatística. A Tabela 18 e a Figura 22 mostram o resultado do estudo estatístico para estas características.

TABELA 18. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas categorias definidas por Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log.

CLASSIFICAÇÃO	MÉDIAS
Categoria I	0,14 ¹
Categoria IIA	0,10
Categoria IIB	0,09
Categoria III	0,09

¹Não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F (ANOVA).

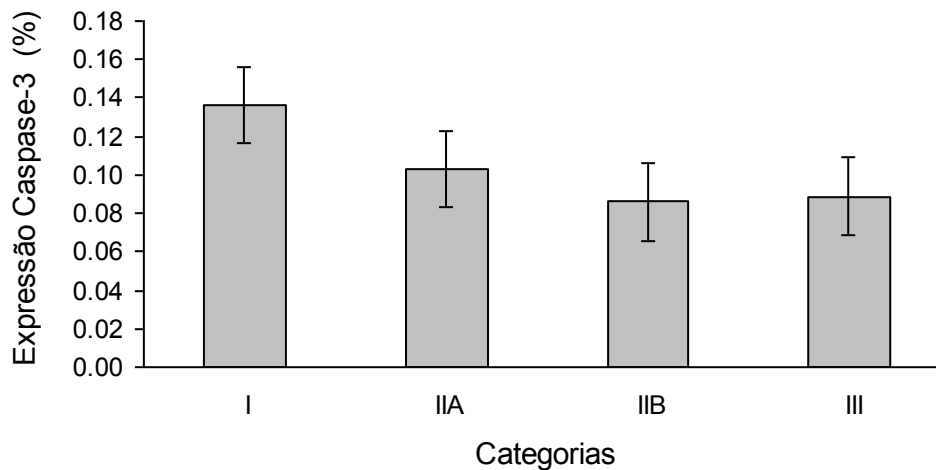


FIGURA 22. Médias das porcentagens de células apoptóticas no endométrio equino de diferentes categorias nas biópsias classificadas conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log.

Na categoria I (Figura 29), houve maior porcentagem de células apoptóticas no epitélio luminal, dado estatisticamente significativo, seguido pelo epitélio glandular superficial e profundo. Nas células estromais, o maior índice apoptótico foi verificado no estrato esponjoso, sem no entanto significância estatística.

Na categoria IIA, a apoptose ocorreu com maior frequência no epitélio glandular profundo, resultado estatisticamente significativo. Entre as células estromais, houve maior índice apoptótico no estrato compacto. Observou-se que as células estromais na região da fibrose periglandular e na região superficial apresentaram valores significativamente menores no número de apoptoses.

Já na categoria IIB, observou-se que o epitélio luminal teve valor significativamente maior do índice apoptótico.

As amostras da categoria III mostraram maior quantidade de células em apoptose no epitélio luminal e no epitélio glandular associado à fibrose periglandular. Entretanto, não houve diferenças significativas.

Pode-se observar que, em todas as categorias, a proporção de células estromais apoptóticas no estrato esponjoso foi menor nas glândulas fibróticas. Essa relação foi observada nas células epiteliais glandulares secretoras (profundas) nos endométrios da categoria IIA e IIB, mas na

categoria III houve aumento do índice apoptótico dessas células nas glândulas fibróticas. Esses resultados não foram estatisticamente significativos.

Comparando-se as diferentes categorias, observou-se que houve índice apoptótico significativamente maior nas células epiteliais do epitélio glandular acometido por fibrose nas biópsias da categoria III. Ainda nas glândulas fibróticas, notou-se que o número de apoptoses entre as células estromais diminuiu conforme aumentou o grau da lesão endometrial, dado não significativo estatisticamente.

Outro fenômeno observado foi que as estruturas do estrato compacto, ou seja, o epitélio glandular superficial as células estromais superficiais, houve redução do número de células apoptóticas conforme se acentuaram as alterações morfológicas.

No epitélio glandular profundo, houve discreto aumento da expressão da caspase-3 clivada, mas nas categorias IIB e III a expressão diminuiu gradativamente (Figura 30). As células estromais profundas demonstraram diminuição da apoptose nas categorias intermediárias, porém, a categoria III, embora possuísse índice menor do que os endométrios da categoria I, mostrou valor maior do que as demais amostras com alterações histopatológicas. Estes resultados não foram estatisticamente significativos.

Os resultados do estudo estatístico estão apresentados na Tabela 19 e Figuras 23 e 24.

TABELA 19. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log.

ESTRUTURA	CATEGORIA I	CATEGORIA IIA	CATEGORIA IIB	CATEGORIA III
Epitélio luminal	0,33 a ¹	0,19 ab	0,36 a	0,18 b
Epitélio glandular superficial	0,21 ab	0,15 ab	0,04 b	0,09 b
Célula estromal superficial	0,07 b	0,02 b	0 b	0 b
Epitélio glandular profundo	0,21 ab	0,23 a	0,10 b	0,07 b
Célula estromal profunda	0,10 b	0,08 ab	0,03 b	0,07 b
Epitélio glandular (fibrose periglandular)	0 bB	0,06 abAB	0,06 bAB	0,18 bA
Célula estromal (fibrose periglandular)	0 b	0 b	0,01 b	0,03 b

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade. A ausência de letras minúsculas na coluna implica que o teste F da análise de variância foi não-significativo

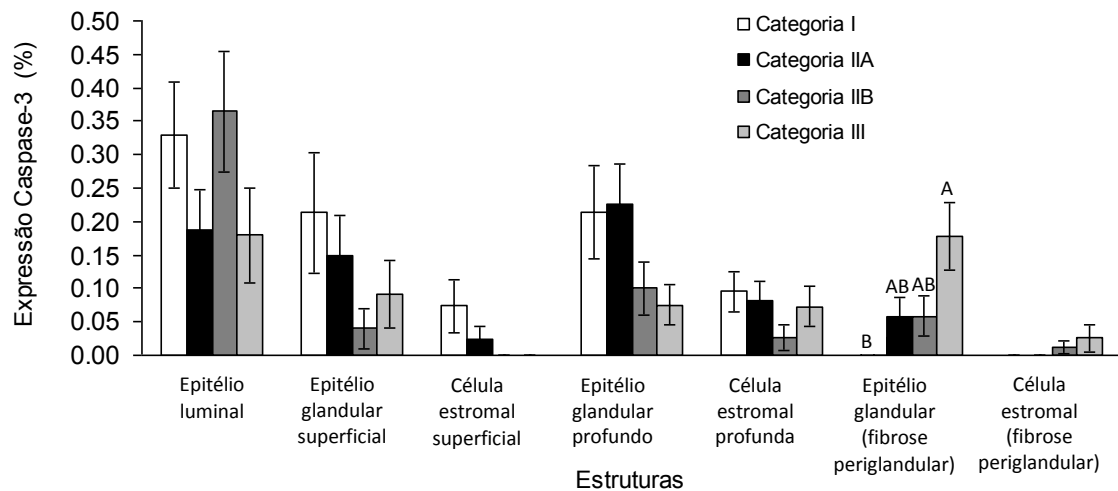


FIGURA 23. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas estruturas do endométrio eqüino, nas diferentes categorias definidas de acordo com Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

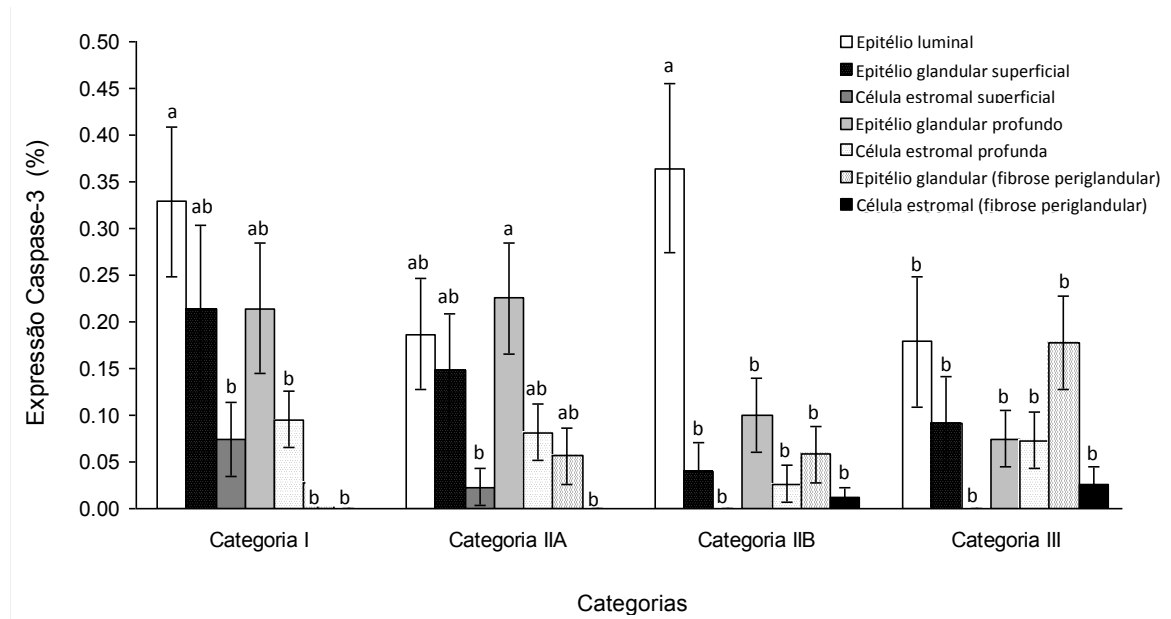


FIGURA 24. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas estruturas do endométrio equino agrupadas por categoria, na classificação conforme Kenney & Doig (1986). Valores expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

Embora esse padrão tenha sido observado pela verificação da média das porcentagens de células positivas para a reação imunoistoquímica, durante a análise da distribuição das células apoptóticas notou-se que houve maior frequência de glândulas endometriais apresentando células apoptóticas nos endométrios sem alterações histopatológicas. Entretanto, ao se realizar a contagem nos focos com a presença de células positivas para caspase-3 clivada, como foi obedecido o mesmo padrão da contagem de células em proliferação, no qual as células marcadas eram contadas por unidade glandular, esse dado não foi evidenciado.

Empregando-se as definições de RICKETTS & ALONSO, observou-se que, quando comparados os grupos entre si, observou-se que o epitélio luminal mostrou índice apoptótico significativamente maior nas células apoptóticas. As células epiteliais foram as que mais apresentaram apoptose, e entre as células estromais, houve maior número e células apoptóticas no estrato esponjoso (profundas). Número significativamente menor de apoptoses foi verificado nas células estromais, localizadas no estrato compacto (superficiais) e na região da fibrose periglandular. O epitélio glandular

associado à fibrose periglandular mostrou menos apoptoses do que o epitélio glandular secretor normal (profundo), contudo, sem diferença significativa. A Tabela 20 e a Figura 25 mostram os resultados do estudo estatístico.

TABELA 20. Médias das porcentagens de células apoptóticas entre as diferentes estruturas endometriais nas amostras classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log.

LOCAIS	MÉDIAS
Epitélio luminal	0,26 a ¹
Epitélio glandular superficial	0,12 b
Célula estromal superficial	0,02 c
Epitélio glandular profundo	0,15 b
Célula estromal profunda	0,07 bc
Epitélio glandular (fibrose periglandular)	0,08 bc
Célula estromal (fibrose periglandular)	0,01 c

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

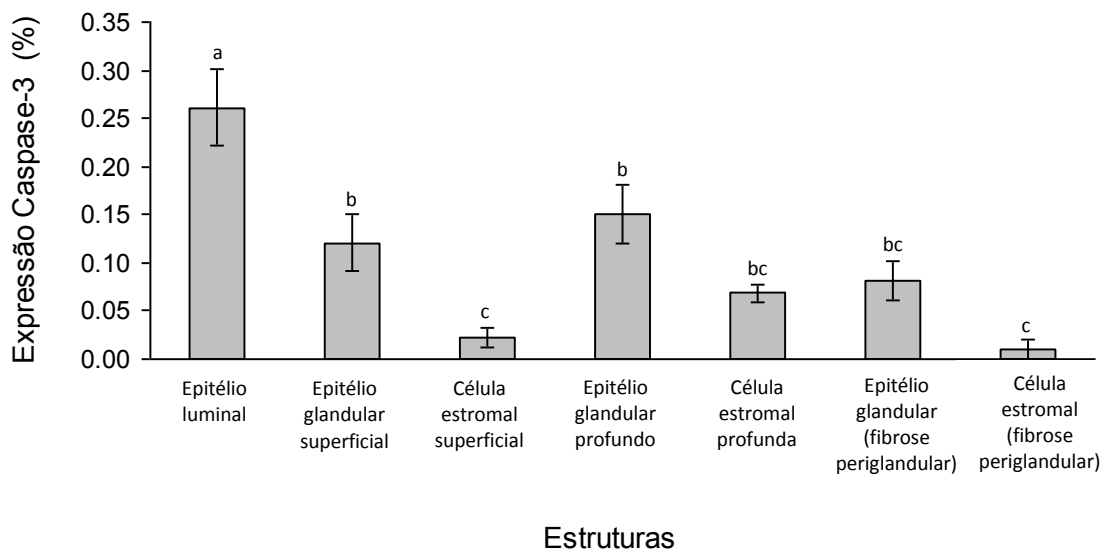


FIGURA 25. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas diferentes estruturas do endométrio eqüino, nas biópsias classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

Ao se comparar os diferentes grupos, verificou-se que os endométrios hígidos apresentaram maior índice de células em processo de apoptose, embora não tenha sido estatisticamente significativo. A Tabela 21 e a Figura 26 mostram os resultados da análise estatística.

TABELA 21. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas categorias definidas por Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log.

CLASSIFICAÇÃO	MÉDIAS
Endométrio hígido	0,14 ¹
Endometrite crônica infiltrativa	0,09
Endometrose	0,09

¹A ausência de letras implica que a diferença foi não significativa a 5% de probabilidade, pelo teste F (ANOVA).

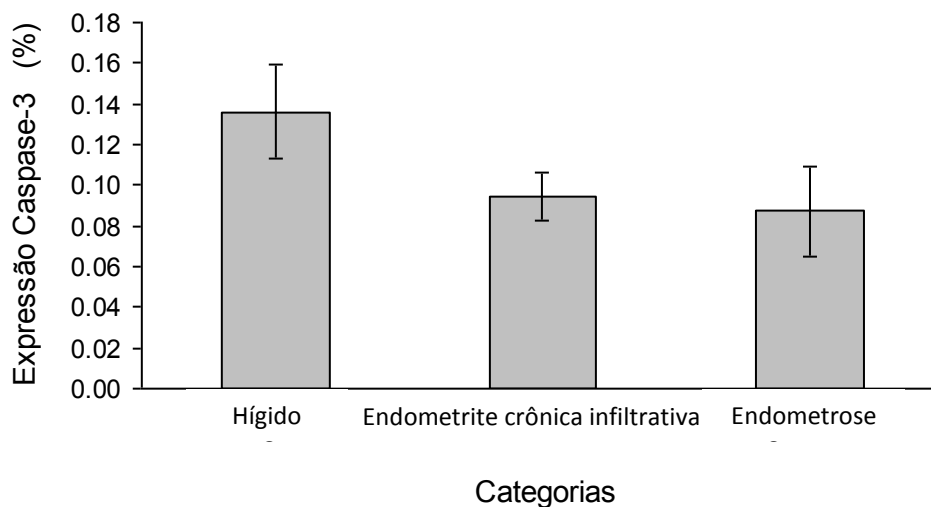


FIGURA 26. Médias das porcentagens de células apoptóticas no endométrio eqüino de diferentes categorias nas biópsias classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log.

Pode-se verificar que nas endometrites crônicas infiltrativas, o epitélio luminal apresentou quantidade significativamente maior de células apoptóticas. Já as células estromais das regiões superficial e periglandular foram as que apresentaram índice apoptótico significativamente menor.

Nas endometroses, maior frequência de apoptose foi verificada no epitélio luminal, no epitélio glandular superficial e no epitélio glandular associado à fibrose periglandular. Entre as células estromais, o menor índice apoptótico foi observado nas células estromais superficiais.

As glândulas fibróticas apresentaram diminuição da apoptose nas células estromais nos dois grupos de doenças endometriais. Entretanto, verificou-se que no epitélio glandular, nas endometrites crônicas infiltrativas houve diminuição da apoptose nas glândulas associadas à fibrose, enquanto que nas endometroses, verificou-se que o índice apoptótico foi maior nas glândulas alteradas.

Entretanto, as variações observadas entre os grupos de endométrio não mostrou diferenças significativas. O estudo estatístico da porcentagem de células apoptóticas para as biópsias classificadas conforme Ricketts & Alonso (1991) estão demonstrados na Tabela 22 e nas Figuras 27 e 28.

TABELA 22. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991). Valores expressos em log.

ESTRUTURA	ENDOMÉTRIO HÍGIDO	ENDOMETRITE CRÔNICA INFILTRATIVA	ENDOMETROSE
Epitélio luminal	0,33 a ¹	0,27 a	0,17
Epitélio glandular superficial	0,20 ab	0,07 bc	0,16
Célula estromal superficial	0,08 bA	0,01 cA	0 A
Epitélio glandular profundo	0,21 ab	0,16 ab	0,04
Célula estromal profunda	0,10 b	0,06 bc	0,08
Epitélio glandular (fibrose periglandular)	0 b	0,09 bc	0,13
Célula estromal (fibrose periglandular)	0 b	0,01 c	0,03

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente a 5% de probabilidade. A ausência de letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha implica que o teste F da análise de variância foi não-significativo.

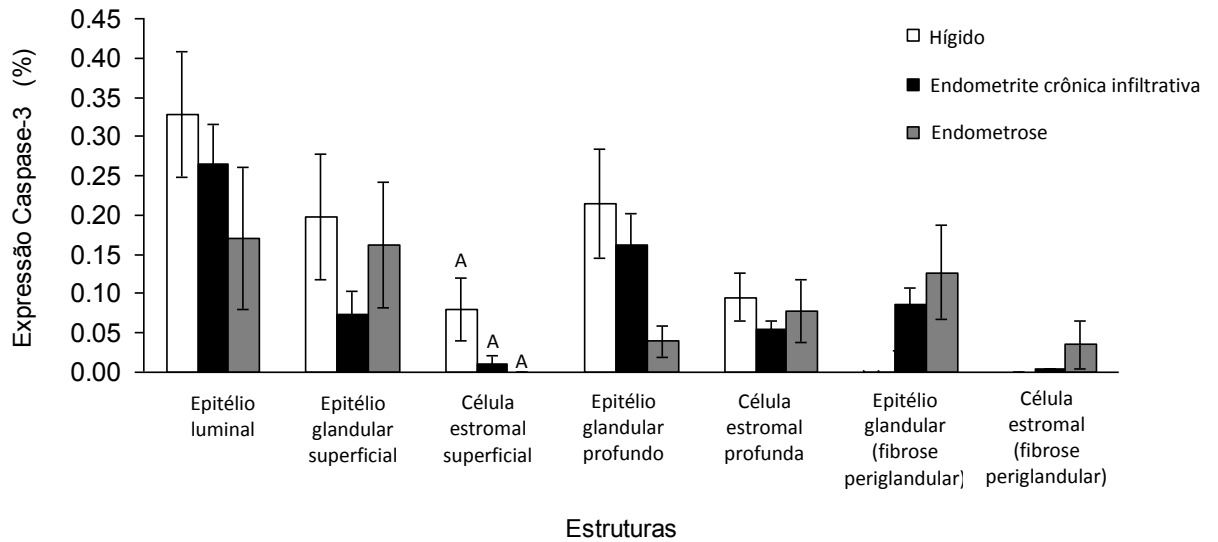


FIGURA 27. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas estruturas do endométrio eqüino, nas diferentes categorias definidas de acordo com Ricketts & Alonso (1991). Os valores estão expressos em log. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

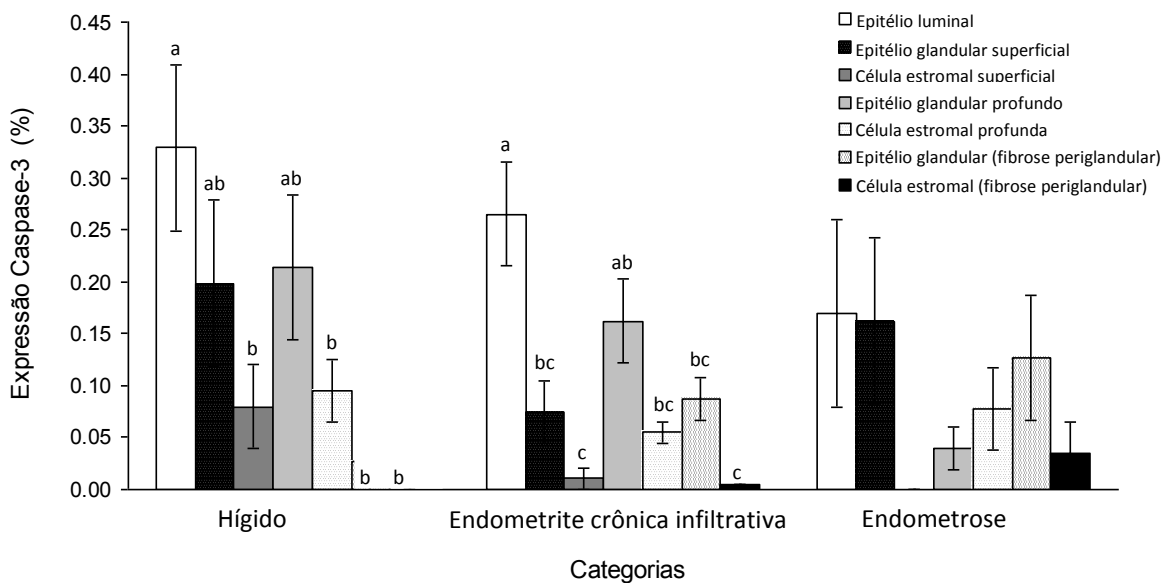


FIGURA 28. Médias das porcentagens de células apoptóticas nas estruturas do endométrio eqüino agrupadas por categoria, na classificação conforme Ricketts & Alonso (1991). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

Uma amostra entre os endométrios saudáveis e duas amostras em cada uma das categorias em que se identifica lesão endometrial não mostraram imuno-reatividade. Ao se verificar o tipo de lesão predominante nesses casos negativos para caspase-3 clivada, também não houve predileção entre os tipos inflamatório e degenerativo.



FIGURA 29. Endométrio eqüino - categoria I. Marcação imunoistoquímica para caspase-3 clivada. Imuno-reatividade em célula estromal (seta) e em corpos apoptóticos freqüentes no epitélio glandular (pontas de seta). Objetiva de 40x.

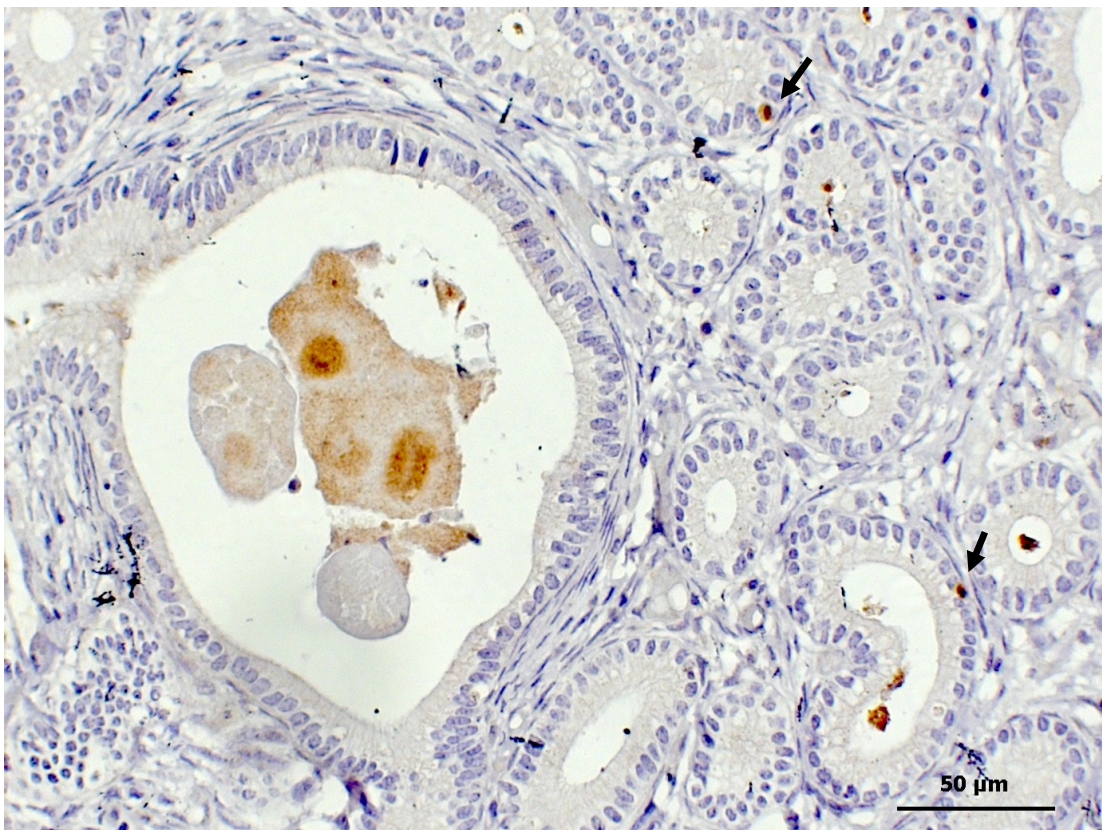


FIGURA 30. Endométrio eqüino - categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunoistoquímica para caspase-3 clivada. Imuno-reatividade esparsa em corpos apoptóticos nas células do epitélio glandular (setas).

Díscussão

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram empregados dois sistemas de classificação das endometrites crônicas das éguas. Ao ser empregada a classificação de Kenney & Doig (1986) foi possível a relação dos resultados obtidos nas diferentes avaliações propostas com as diversas intensidades de comprometimento endometrial, enquanto que com a classificação de Ricketts & Alonso (1991) buscou-se a relação dos resultados com as diferentes apresentações de alteração no endométrio, considerando os processos de origem inflamatória ou fibrótica.

Ao se verificar a proporção dos tipos de alteração endometrial, obedecendo-se os critérios de Ricketts & Alonso (1991), observou-se que a maior parte das amostras foram incluídas nas endometrites crônicas infiltrativas. Entretanto, dentre elas, a fibrose pode ser verificada em diferentes graus, já que pode ser observada em biópsias com alterações discretas, moderadas e graves. Entretanto, a maior parte das amostras classificadas como endometrose foi oriunda das endometrites com alterações histopatológicas mais graves (categoria III).

Isso sugere que as endometroses, além da origem desconhecida citada por alguns pesquisadores (WALTER et al., 2001), podem corresponder à etapa final do reparo tecidual com substituição das estruturas funcionais por tecido fibroso. Porto (2006) menciona que as lesões endometriais mais graves parecem ter como causa primária principalmente os processos de origem inflamatória, e aqueles de origem degenerativa seriam responsáveis pela enfermidade endometrial menos freqüentemente. Assim, também puderam ser identificados dois processos distintos morfológicamente e que provavelmente possuem causas diferentes, conforme proposto por Nunes (2003).

Entretanto, conforme observado por Porto (2006), a alteração fibrótica também pode ser verificada em amostras de endométrio saudável. Nestas biópsias, a alteração fibrótica foi encontrada predominantemente na região perivascular. Porto (2006) cita que esse critério não é considerado na classificação de Kenney & Doig (1986), e relata que este tipo de

comprometimento vascular precisa ser estudado de forma mais aprofundada, para que possa ser esclarecida a sua real participação nos problemas reprodutivos das éguas, já que a sua freqüência é relativamente alta, mesmo nos animais considerados normais, fato já descrito por Nunes (2003). Nesse âmbito, Nunes (2006), verificando a presença de fibroelastose na região perivascular, relatou que esta alteração esteve presente em todas as amostras estudadas, mesmo naquelas de endométrio considerado sadio, que mostraram a alteração de forma discreta.

Neste trabalho, foram empregados os métodos histoquímicos do tricrômico de Masson e do Picrosirius - Polarização para a identificação da distribuição do colágeno e sua tipificação nos processos endometriais crônicos. Assim como verificado por Nunes (2003, 2006) e Porto (2006), estas colorações permitiram a identificação dos focos de fibrose, a quantificação do colágeno por método morfométrico, além da identificação dos tipos de colágeno presentes na fibrose, com o uso do Picrosirius Red observado em microscópio de luz polarizada, conforme já descrito por Evans et al. (1998).

O aumento da birrefringência promovida pelo método do Picrosirius – Polarização é específico para estruturas colagenosas compostas de agregados de moléculas orientadas, já que as moléculas do corante se alinham paralelamente ao longo do eixo de cada molécula de colágeno. Este método ainda hoje é empregado, considerado de grande utilidade na distinção do arranjo do colágeno, o qual pode é relacionado com sua estrutura molecular (BORGES et al., 2007).

Sabe-se que nos processos fibróticos há deposição dos colágenos do tipo I e do tipo III, estruturalmente rígidos, que gradualmente promovem o desenvolvimento do tecido cicatricial com maior força tensora (BOCHSLER & SLAUSON, 2002).

Os resultados obtidos no presente estudo foram semelhantes aos descritos por Nunes (2003, 2006), Porto (2006) e Masseno (2009), os quais demonstraram que houve substituição gradativa do colágeno do tipo III, mais fibrilar, predominante nas amostras de endométrio sadio (categoria I) com distribuição reticular, pelo colágeno do tipo III, conforme aumentou o grau das lesões endometriais. Este tipo de colágeno é mais denso, e é encontrado preferencialmente na região periglandular.

O uso das técnicas histoquímicas, sobretudo a do Picrosirius – Polarização, evidenciou a diminuição da quantidade de glândulas nas endometrites mais graves, classificadas na categoria III. Isso reforça a hipótese de que ocorre a substituição gradativa do tecido funcional endometrial por fibrose, o que conduz à atrofia. Com isso, há comprometimento da produção de histotrofo, incapacidade de nidadao do embrião e continuidade da gestação (GRAY et al., 2001; AMARAL, 2002).

Contudo, Walter et al. (2001) obtiveram resultados diferentes ao realizarem estudo imunoistoquímico dos colágenos I, III e IV, pois observaram que o colágeno do tipo I não está aumentado na fibrose endometrial severa das éguas, e a sua proporção é semelhante à dos endométrios incluídos na categoria I de Kenney & Doig (1986), mas houve o aumento do colágeno do tipo IV, que em situação fisiológica encontra-se limitado à membrana basal. No mesmo trabalho, Walter et al. (2001) descreveram a presença do colágeno IV nos fibroblastos que circundam as glândulas fibróticas.

A técnica do Picrosirius – Polarização pode não diferenciar os colágenos do tipo I e do tipo III do colágeno do tipo IV, mas é possível reconhecer o colágeno mais denso, resultado de interações químicas entre as fibras de colágeno (PORTO, 2006). Este é refratário ou, no mínimo, menos responsivo à ação das enzimas colagenolíticas, porque os sítios de ligação dessas enzimas com o colágeno são bloqueados (ANDRADE et al., 1999).

Por fim, os métodos histoquímicos empregados neste trabalho demonstraram no mesmo corte histológico o colágeno mais denso e o mais delicado, possibilitando a obtenção da proporção relativa de ambos os tipos. Além disso, tais métodos são de fácil execução e têm menor custo, podendo ser empregados rotineiramente, como tem sido verificado por diversos autores (CALDINI, 1992; EVANS et al., 1998; NUNES, 2003, 2006; PORTO, 2006).

Os resultados da análise morfométrica da fibrose periglandular corroboraram os achados de Nunes (2003, 2006) e Porto (2006), e foram parcialmente semelhantes aos descritos por Evans et al. (1998). Nos endométrios considerados hígidos, a fibrose periglandular foi ausente ou inconspícua. Houve diferença significativa do colágeno periglandular nas endometrites crônicas, sendo predominante o do tipo I.

No presente estudo, a porcentagem da fibrose periglandular foi significativamente maior nas endometrites mais graves, incluídas nas categorias IIB e III de Kenney & Doig (1986), quando comparadas ao endométrio normal (categoria I), mas não houve diferença significativa quando comparadas entre si. Entretanto, Evans et al. (1998), encontraram resultados diferentes. Estes autores relatam que há aumento significativo da quantidade de fibrose entre as categorias IIB e III.

Esse resultado sugere que conforme progride a doença endometrial crônica há diminuição da quantidade de glândulas endometriais, o que pode culminar com a atrofia endometrial.

Quando classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991), não houve diferença significativa na deposição de colágeno periglandular entre as endometrites crônicas infiltrativas e as endometroses. Talvez, isso possa ser explicado pela maior deposição de colágeno intersticial nas endometroses, o que levou à rarefação das glândulas endometriais.

O emprego do método imunistoquímico possibilita a pesquisa de diferentes proteínas e a determinação dos locais onde são expressas no tecido, nos processos fisiológicos e patológicos. Dessa forma, permite estudos que buscam relacionar os mecanismos moleculares envolvidos no processo de manutenção ou quebra da homeostasia tissular.

Neste estudo, com a utilização deste método, foram pesquisados componentes dos processos inflamatórios e fibróticos, como a presença de um fator de crescimento, de enzimas colagenolíticas e de proteínas que identificam células em atividade proliferativa e morte por apoptose.

Entre os fatores de crescimento conhecidos, o TGF- β 1 tem função relevante durante o processo de cicatrização e reparo tecidual, pois regula uma ampla variedade de funções biológicas, que inclui proliferação celular e diferenciação, apoptose, angiogênese, adesão, imuno-regulação e produção de matriz extracelular (CHIN et al., 2004; LU et al., 2005).

Ainda, vários pesquisadores citam que o TGF- β 1 é um potencial regulador das funções reprodutivas, atuando no crescimento e funcionamento do útero (DUMONT et al., 1995; GODKIN & DORÉ, 1998).

Este estudo revelou que o TGF- β 1 foi expresso tanto nos endométrios saudáveis quanto naqueles que apresentaram alterações

histopatológicas. Entretanto, a imuno-reatividade foi escassa, exceto nas células inflamatórias, o que também foi observado por outros autores. Rodriguez et al. (2008) relataram que no endométrio de primatas, a expressão da isoforma TGF- β 1 é escassa nas glândulas endometriais e ausente nas células estromais, independentemente do tipo de estímulo hormonal presente.

Neste trabalho, ficou evidente que a principal fonte de TGF- β 1 no endométrio das éguas foram as células inflamatórias pela quantidade expressivamente maior dessas células demonstrando imuno-reação positiva. Outro tipo celular que apresentou imuno-reatividade para este fator de crescimento em grande número de amostras foram as células estromais, porém, as escassas células positivas encontraram-se distribuídas de forma esparsa pela lâmina própria do endométrio. Além disso, foi verificada uma tendência das endometrites crônicas infiltrativas apresentarem maior grau de expressão desse fator em relação às endometroses, mesmo não havendo significância estatística. A literatura consultada relata que o TGF- β 1 é uma proteína produzida predominantemente por células T (CHIN et al., 2004; LU et al., 2005). Foi demonstrado por Nunes (2003) que nas diversas categorias de lesão endometrial, dentre as células que compõem o infiltrado inflamatório, os linfócitos T sempre predominaram, sobretudo nos casos de endometrite grave.

Ainda dentre as células inflamatórias, Horan et al. (2005) relatam que macrófagos expressam e liberam TGF- β 1 no tecido cicatricial. Além de linfócitos T, Nunes (2003) verificou que os macrófagos estiveram presentes nas endometrites das éguas, aumentando seu número principalmente nos casos mais graves, classificados nas categoria IIB e III de Kenney & Doig (1986).

A análise estatística não revelou diferença significativa entre os diversos grupos na intensidade da expressão do TGF- β 1 em nenhuma classificação utilizada. Isso pode sugerir que a regulação dos processos inflamatório e fibrótico no útero das éguas esteja ocorrendo ao nível dos receptores para este fator. Ademais, sabe-se que em alguns processos, este fator de crescimento atua de maneira indireta, levando ao aumento da produção de outros fatores solúveis ou à maior expressão de receptores para fatores de crescimento nas células (RIEDER & FIOCCHI, 2008). O resultado da expressão deste fator de crescimento obtido no presente estudo corrobora os dados descritos por Cadario et al. (2001). Estes autores quantificaram o TGF-

$\beta 1$ no endométrio de éguas normais e com fibrose periglandular em diferentes graus de severidade, utilizando o método do *Real Time* PCR. Entretanto, nossos dados contrastaram com o que foi descrito por Ganjam & Evans (2006). Estes pesquisadores relataram que, utilizando o ensaio ELISA sanduíche, a concentração de TGF- $\beta 1$ aumenta proporcionalmente com a gravidade da fibrose periglandular, e sugeriram que a progressão desse fenômeno pode estar relacionada à essa citocina fibrogênica. Entretanto, se considerarmos que o infiltrado inflamatório mais acentuado acompanha a gravidade da fibrose nas endometrites, talvez seja possível relacionar a variação na quantidade do TGF- $\beta 1$ observada por esses autores, mas que contradiz o trabalho de Cadario et al. (2001). Deve-se ressaltar que no presente estudo, devido ao tipo de método empregado, procurou-se quantificar o grau da expressão avaliando-se a intensidade da reação, e desta forma, foi possível estabelecer a sua presença e os locais onde é expresso nos diferentes processos endometriais das éguas, já que investigações neste sentido ainda não constam na literatura.

Sabe-se que a fibrose endometrial, uma vez iniciada, continua a despeito da cessação da injúria, caracterizando-se então por ser progressiva e irreversível (RICKETTS & ALONSO, 1991). Vários autores descrevem que a deposição do colágeno na região periglandular é a principal característica das endometrites eqüinas, e estudos são realizados no sentido de elucidar seus componentes e os fatores que podem estar associados a este fenômeno.

Atualmente, discute-se amplamente a presença dos miofibroblastos nos processos fibróticos. Estas células são fibroblastos diferenciados com função contrátil, fonte de colágeno fibrilar e fatores solúveis que influenciam a fibrose (ARTHUR, 2000; HOLT et al., 2008).

O TGF- $\beta 1$ é responsável pela diferenciação dos miofibroblastos, seja a partir dos fibroblastos ou pelo fenômeno da transição epitelial-mesenquimal (GARRET et al., 2004; KASAI et al., 2005). A presença dessas células no endométrio eqüino já foi descrita por Walter et al. (2001) e Masseno (2009), na região da fibrose periglandular. Esta autora relatou que a presença dos miofibroblastos aumentava na medida em que também aumentava o grau da lesão endometrial. Walter et al. (2001) sugeriu que investigações são necessárias para a identificação dos sinalizadores e das células que liberam essas moléculas responsáveis pela diferenciação miofibroblástica no

endométrio eqüino. O presente estudo vem ao encontro dessa informação, buscando preencher a lacuna no sentido da identificação dos elementos que promovem a presença do TGF- β 1 no útero das éguas.

Outra função do TGF- β 1 que tem sido destacada é a indução do CTGF (fator de crescimento do tecido conjuntivo). Este fator promove a manutenção da fibrogênese. Além disso, quando a matriz extracelular está sob estímulo do CTGF, o TGF- β 1 tem capacidade de gerar força tracionadora nos miofibroblastos (DANIELS et al., 2003; KASAI et al., 2005). Assim, além de levar à diferenciação miofibroblástica, este fator ainda influencia na sua função.

Nas endometrites das éguas a degeneração vascular é comum, agravada conforme aumenta a intensidade das alterações endometriais (NUNES, 2006). O comprometimento vascular pode levar à substituição do tecido funcional por colágeno. Arici et al. (1996) citam que a hipóxia pode induzir a secreção de TGF- β 1, e esse mecanismo pode estar envolvido também nas endometrites eqüinas.

A inibição da produção de matriz tem sido o principal alvo das terapias antifibróticas até o momento. Alguns meios têm sido testados, como o bloqueio direto da síntese da matriz extracelular, ou indiretamente pela inibição da atividade do TGF- β 1, a principal citocina fibrogênica. No fígado, inibidores da síntese de colágeno, que atuam sobre a enzima prolilhidrolase, estão entre os primeiros componentes antifibróticos testados, mas com sucesso limitado. Atualmente, tem-se estudado a regulação da expressão de genes que regulam a síntese de colágeno. No tratamento do quelóide, o anticorpo anti-TGF β 1 pode ter potencial terapêutico pela inibição da síntese de colágeno pelo bloqueio do efeito de TGF- β 1 e também por acelerar a degradação dos colágenos do tipo I e do tipo III promovendo a produção de metaloproteinase. Dessa forma, antagonistas do TGF- β têm sido amplamente testados devido a essa citocina apresentar duplo efeito sobre a matriz extracelular: o de inibir a produção ou acelerar sua degradação. Vários antagonistas do TGF- β estão sendo desenvolvidos e poderão ser testados em breve (FUJIWARA et al., 2005; FRIEDMAN, 2008).

As enzimas colagenolíticas pesquisadas neste estudo foram as metaloproteinases (MMP) 2 e 9.

As MMP estão envolvidas em vários processos fisiológicos de remodelamento tecidual, mas em geral estão associadas a condições patológicas como invasão tumoral e processos fibróticos (ZHANG & SALAMONSEN, 2002).

As metaloproteinases são as principais enzimas que degradam componentes estruturais da matriz extracelular. Entretanto, a proteólise promovida pelas MMPs pode gerar espaços para a migração celular, produzir fragmentos de especificidade substrato-clivagem com atividade biológica independente, regular a arquitetura tecidual por seus efeitos na matriz extracelular e junções intercelulares, além de ativar, desativar ou modificar a atividade de moléculas sinalizadoras, direta ou indiretamente (PAGE-MCCAW et al., 2007).

A expressão de metaloproteinases é fortemente controlada por fatores e citocinas que podem induzir (IL-1, TNF- α , TGF- α , EGF, FGF e PDGF) ou suprimir (TGF- β e IL-4) a transcrição dos genes de MMP (BIRKEDAL-HANSEN, 1995).

Não houve diferença evidente na porcentagem de amostras das diferentes categorias classificadas conforme Kenney & Doig (1986) expressando MMP-2, mas, quando empregada as definições de Ricketts & Alonso (1991), pode-se verificar uma tendência na diminuição do número de amostras expressando esta enzima nos endométrios com alterações histopatológicas, estando entre as endometroses o menor percentual de biópsias expressando MMP-2. Ao se observar a intensidade da reação imunohistoquímica, verificou-se que também houve uma tendência na diminuição da positividade nas estruturas pesquisadas em relação aos endométrios saudáveis, exceto no epitélio glandular, que apresentou aumento da marcação positiva nos casos de endometrite, sendo significativa na categoria III. Pode-se considerar que o aumento da MMP-2 no epitélio glandular esteja relacionado à diminuição da enzima nos demais compartimentos estudados, mecanismo esse associado à tentativa do tecido manter os níveis de expressão estáveis. Talvez, esses dados possam estar relacionados ao prognóstico do endométrio, principalmente quando considerado o tipo de enfermidade presente, ou seja, naqueles casos em que há predomínio da reação fibrótica, havendo menor quantidade de MMP-2,

entende-se que a atividade colagenolítica estaria ocorrendo em menor escala, no que tange a esta enzima.

O aumento na expressão da MMP-2 pelas células epiteliais foi observado anteriormente (PORTO, 2006), quando foi sugerido que esse fenômeno possa estar relacionado à modificação da secreção glandular no endométrio das éguas. Um dado interessante verificado por Masseno (2009), o qual já foi citado, foi a presença mais evidente de miofibroblastos nas lesões endometriais mais graves. Ainda, o presente estudo demonstrou que células estromais periglandulares positivas para MMP-2 foram observadas, sobretudo nas glândulas dilatadas e fibróticas, corroborando os resultados de Walter et al. (2005). Sabe-se que uma das fontes da metaloproteinase 2 é o miofibroblasto, que na fibrose hepática, sintetiza essa gelatinase na presença de colágeno do tipo I (ARTHUR, 2000; HOLT et al., 2008). Os miofibroblastos presentes nas endometroses das éguas podem estar relacionados com a estimulação da produção da matriz extracelular e sua degradação, já que são aptos a produzir citocinas (WALTER et al., 2001).

O presente estudo constatou que as endometrites apresentaram maior de deposição deste tipo de colágeno, o que também foi verificado por Evans et al. (1998), Caldini (1992), Nunes (2003, 2006), Porto (2006) e Masseno (2009). Assim, Masseno (2009) deduziu que a indução da produção de MMP-2 pelos miofibroblastos possa ocorrer por mecanismo semelhante àquele relacionado à fibrose hepática. Essa indução da produção da MMP-2 por miofibroblastos envolve a presença do TGF- β 1 (FUJIWARA et al., 2005). Portanto, esse fator de crescimento tem efeitos antagônicos nos miofibroblastos, ou seja, na fibrose hepática, está relacionada ao aumento da expressão dos colágenos fibrilares, entre eles o colágeno do tipo I, além de estimular estas células a produzirem MMP-2, a qual promove a colagenólise. Entretanto, os efeitos pró-fibrogênicos exercidos pelo TGF- β 1 estão aumentados para proteger a matriz extracelular da degradação enzimática (WANG et al., 2006). Talvez isto esteja ocorrendo nas endometrites crônicas das éguas, já que, a despeito da presença da MMP-2, produzida por várias estruturas endometriais, incluindo os miofibroblastos como prováveis fontes desta enzima, há um maior acúmulo do colágeno do tipo I, inclusive com a redução na quantidade do colágeno do tipo III, dado observado quando

empregada a coloração do Picrosirius Red associada à microscopia de polarização.

Sabe-se também que a MMP-2 é considerada um fator autócrino de proliferação e migração para os miofibroblastos, e além do estímulo promovido pelo TGF- β 1, radicais livres de oxigênio, presentes nas doenças hepáticas crônicas, levam ao aumento da expressão da enzima. A hiperexpressão contínua de MMP-2 nos miofibroblastos de fígados fibróticos com suas seqüelas na proliferação e migração deste tipo de célula podem estimular a progressão da fibrose (HEMMAN et al., 2007).

Conforme verificado anteriormente, a região da parede vascular mostrou intensa marcação para MMP-2, mas foi ausente nas células endoteliais. Porto (2006), ao fazer essas observações, cita que a MMP-2 tem papel preponderante na angiogênese, e que essa marcação pode estar relacionada à presença dos pericitos, que é fonte de vários mediadores químicos.

Além de degradar as gelatinas, a MMP-2 também pode atuar como colagenase por possuir repetições em sua estrutura semelhantes à fibronectina, o que faz com que apresente afinidade pelo colágeno fibrilar, sendo apta a realizar a clivagem desse tipo de proteína (MATHISEN et al., 2006; PAGE-MCCAW et al., 2007).

O aumento da atividade da MMP-2 já foi associado com a fibrose intersticial durante o remodelamento cardíaco. É citado que, hipoteticamente, o aumento da atividade das metaloproteinases diminui o substrato para essas enzimas enquanto que sua inibição resultaria no aumento do colágeno. Entretanto, estudos já observaram que o aumento da atividade da MMP-2 foi acompanhado pelo aumento da fibrose cardíaca, o qual se deve provavelmente à proteólise direta dos componentes da matriz do miocárdio, facilitando assim uma resposta pró-fibrótica (MATSUSAKA et al., 2006). A MMP-2 já foi encontrada, na sua forma inativa, em fígados saudáveis (ZHOU et al. 2004). Por outro lado, Hemmann et al. (2007) citam que no fígado normal o RNAm e a pró-proteína de MMP-2 são dificilmente encontrados, e que quando induzida a fibrose, há um aumento na expressão desse RNAm. Entretanto, a metodologia empregada no presente estudo não é adequada para verificação de atividade enzimática. Outros estudos nesse sentido são necessários. Uma técnica

interessante para se investigar a atividade dessa enzima no útero das éguas é a zimografia *in situ* em material submetido à congelação (FUJIWARA et al., 2006).

Os resultados da análise da expressão imunoistoquímica da MMP-9 demonstraram que todas as amostras foram positivas para esta gelatinase. Em todos os grupos, independentemente da classificação empregada, houve positividade nas células endoteliais e estromais, sempre em grande proporção. Na parede vascular e nas células inflamatórias, observou-se que nas endometrites de grau mais elevado (IIB e III) houve diminuição da positividade desta estrutura. Quando se considerou o tipo de alteração predominante, verificou-se que nos endométrios fibróticos a quantidade estimada de células inflamatórias positivas nas células inflamatórias para MMP-9 diminuiu. Quanto à intensidade da reação, não se observaram diferenças significativas.

Hemmann et al. (2007) relatam que a MMP-9 por si não exibe atividade contra o colágeno do tipo I, predominante na fibrose, mas desde que a expressão desta enzima está intensamente aumentada desde o início da fibrólise, admite-se seu envolvimento indireto no processo lítico do colágeno.

Nas doenças inflamatórias intestinais do homem já foi verificado o aumento da expressão de metaloproteinases, entre elas a 2 e a 9, embora a MMP-9 também tenha sido identificada na mucosa intestinal não inflamada. Esse efeito deve-se à atividade leucocitária, sobretudo pela ação da mieloperoxidase liberada por essas células (MEIJER et al., 2007).

Sabe-se que a MMP-9 está relacionada ao remodelamento vascular, e esse fenômeno está ligado ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). A MMP-9 promove a mobilização do VEGF da matriz extracelular, tornando-o apto a ligar-se ao seu receptor (PAGE-MCCAW et al., 2007). Entretanto, embora não houvesse diferença significativa na intensidade da expressão da enzima nesta estrutura endometrial, o presente estudo revelou que houve redução da positividade na região da parede vascular para MMP-9 nas endometrites mais graves, o que pode estar relacionado ao prognóstico menos favorável. Talvez isso não tenha sido evidenciado nas endometroses porque as amostras foram classificadas segundo as alterações predominantes, ou seja, ainda que houvesse infiltrado inflamatório

mononuclear proeminente dentre as amostras do grupo das endometrites crônicas infiltrativas, este poderia estar associado à fibrose periglandular em diferentes graus. Essa diminuição na positividade da parede vascular poderia ter relação com o comprometimento da angiogênese, o que levaria ao maior acúmulo de tecido fibroso, menos sensível à diminuição da vascularização. Talvez, o aumento da expressão de MMP-2 na região da parede vascular seja um mecanismo compensatório à diminuição da MMP-9, já que ambas as enzimas pertencem ao mesmo grupo de metaloproteinases. Para confirmação desta hipótese, são necessários estudos que verificam a concentração das enzimas ativas neste tipo de alteração endometrial. Isto poderia estar relacionado com o que observaram Inoue et al. (2000) e Nunes (2006), ao verificarem que nas endometrites crônicas mais graves há maior grau de fibroelastose. Nunes (2006) verificou que quanto maior o grau da endometrite maior a fibrose vascular, e cita que estas alterações caracterizam a degeneração vascular, a qual leva à falha da limpeza uterina e, posteriormente, ao desenvolvimento das endometrites.

A presença de imuno-marcação positiva da MMP-9 nas células epiteliais e inflamatórias já foi verificada em outras espécies. No endométrio eqüino, já foi constatada anteriormente por Nunes (2006) e Porto (2006). Quanto ao epitélio glandular, Freitas et al. (1999) associa sua imuno-reatividade à fase do ciclo menstrual no endométrio da mulher. Neste trabalho não pode ser atribuída uma função específica à MMP-9 nesta localização, pois foi amplamente expresso em todos os tipos de endométrio eqüino pesquisados. Já entre as células inflamatórias, há relatos de que macrófagos e células T são responsáveis pela produção de MMP-9 nos processos inflamatórios (ABRAHAM et al., 2005; BERGIN et al., 2005). Abraham et al. (2005) citam que a atividade migratória das células T *helper* é dependente da atividade de metaloproteinases, sobretudo de MMP-2 e MMP-9, por serem capazes de clivar os componentes da membrana basal vascular. Nguyen et al. (2005) relatam que a infiltração e diferenciação dos monócitos nos tecidos lesionados é dependente de MMP-9. Esse dado pode explicar o resultado obtido por Nunes (2003), que não verificou aumento significativo do número de macrófagos nas endometrites. Entretanto, nos endométrios das éguas, somente a MMP-9, e não a MMP-2, demonstrou imuno-reatividade nas células

inflamatórias, e talvez possa estar relacionada a esse tipo de função. Ainda assim, nas endometroses observou-se que houve diminuição da intensidade da imuno-reatividade para MMP-9, embora sem diferença estatisticamente significativa. Talvez nas endometroses, as células inflamatórias expressando menos MMP-9, haja o comprometimento da atividade migratória dos linfócitos e monócitos, e por isso eles não infiltram o tecido lesionado.

Outros fatores podem estar associados à liberação de MMP-9. A presença do fator de necrose tumoral α (TNF- α) está relacionada à progressão das hepatites, e induz a produção de MMP-9, o qual tem relevância na evolução da lesão hepática (MIGITA et al., 2006). A modulação da expressão da MMP-9 também está relacionada ao TGF- β , o qual exerce a supressão dessa enzima via TNF- α , função atribuída aos monócitos e macrófagos (OGAWA et al., 2004). No presente estudo, não foi possível a relação entre a expressão de TGF- β 1 com a MMP-9. Nas doenças intestinais inflamatórias crônicas do homem, além do TNF- α , outras citocinas, como a interleucina 1 β (IL-1 β) e o interferon γ (IFN- γ) podem induzir a síntese de MMP-9 (MEIJER et al., 2007). Logo, estudos que buscam investigar a presença de outros mediadores químicos nas endometrites crônicas das éguas podem colaborar para a compreensão dos dados obtidos neste trabalho, já que a expressão e a localização da MMP-9 foram definidas. Neste sentido, Ra & Parks (2007) mencionam que a compartimentalização - onde e como a MMP é liberada e mantida no ambiente pericelular - é importante, regulando a especificidade da proteólise e a afinidade da interação com o substrato. Os mesmos autores afirmam ainda que essa informação é importante pelo fato de que as células não liberam proteases indiscriminadamente, já que se encontram ancoradas à membrana celular, resultando na manutenção da alta concentração enzimática local e marcando sua ação catalítica em substratos específicos.

Frente aos dados encontrados na literatura, parece que a MMP-2 tem sua função voltada principalmente para os processos fibrogênicos e a MMP-9 relaciona-se sobretudo com as reações inflamatórias. Neste trabalho, talvez a relação da MMP-9 mais evidente nos processos inflamatórios tenha sido demonstrada pela imuno-marcação positiva nas células inflamatórias, o que não foi verificado para a MMP-2, enquanto que a relação mais estreita da

MMP-2 com o processo fibrótico no útero das éguas talvez possa ser sugerida pelo aumento da expressão dessa enzima nas glândulas endometriais.

A desestabilização tecidual pela atividade proteolítica pode levar à liberação de fatores de crescimento ancorados à matriz extracelular e presentes na superfície celular, com a formação de novas moléculas bioativas. Talvez, considerando este aspecto, seja interessante a identificação da atividade enzimática das metaloproteinases além da inter-relação com outros mediadores químicos, já que este estudo demonstrou a presença e a localização das metaloproteinases 2 e 9, buscando sua relação com os diferentes processos nos diversos graus de lesão presentes no endométrio eqüino.

Mansour (2000) cita que a avaliação específica e objetiva dos componentes da matriz extracelular e da proliferação celular utilizando-se a biópsia do endométrio eqüino poderá ser de grande valor para o estudo de condições patológicas e para avaliação do prognóstico de fertilidade.

No presente trabalho, foi testado o anticorpo primário Ki-67 (clone MIB1) para a pesquisa das células em atividade proliferativa. Entretanto, a despeito das várias técnicas realizadas, a imuno-reatividade com este anticorpo não foi obtida em material fixado em solução de Bouin, mas houve marcação evidente nos tecidos controle, fixados em solução de formol a 10%. Os artigos publicados até o momento investigando a proliferação celular com o anticorpo Ki-67 no endométrio das éguas utilizaram amostras criopreservadas ou fixadas em solução de formol a 10%. Por conseguinte, concluiu-se que o fixador empregado neste estudo foi o fator limitante para o uso do referido anticorpo, o que fez com que optássemos pela utilização do anticorpo PCNA, adequado para o objetivo e que tem demonstrado resultados satisfatórios, inclusive no tipo de tecido que estudamos.

O endométrio, assim como todas as mucosas, consiste de populações celulares que são constantemente renovadas, o que ocorre especialmente no epitélio luminal e glandular (LEBLOND, 1981). Neste tecido, a proliferação celular bem como suas alterações morfológicas e fisiológicas são processos hormônio-dependentes, envolvendo o crescimento e a regressão do tecido em padrão cíclico (MEDH & THOMPSON, 2000). A incapacidade do endométrio para responder adequadamente aos estímulos hormonais pode

representar uma das causas de subfertilidade das éguas, relacionada a inflamação crônica ou alterações degenerativas (GERSTENBERG et al., 1999).

No endométrio das éguas, existem estudos que relacionam a proliferação celular com a fase do ciclo estral, verificada pela imuno-marcação dos receptores hormonais de estrógeno e progesterona (GERSTENBERG et al., 1999; MANSOUR, 2000; ROBERTO DA COSTA et al., 2007) e poucos visando relacioná-la às alterações morfológicas que ocorrem neste tecido (SCHOON et al., 2000; HOFFMANN et al., 2009).

Este trabalho buscou observar a proliferação celular no endométrio de éguas com diferentes tipos e graus de alteração morfológica e compará-la com endométrios normais.

O grande número de células em proliferação no epitélio glandular profundo observado neste trabalho coincide com a fase do ciclo estral correspondente ao diestro (GERSTENBERG et al., 1999; MANSOUR, 2000). GERSTENBERG et al. (1999) justifica o alto índice proliferativo neste tipo de célula afirmando que há necessidade do epitélio glandular proliferar antes de secretar substância histotrófica suficiente para nutrir o embrião, que só atinge o útero no sexto dia. Esse aumento do número de glândulas está relacionado ao aumento da tortuosidade das mesmas, fato já relatado por Kenney (1978).

Contrariando trabalhos prévios (GERSTENBERG et al., 1999; MANSOUR, 2000; ROBERTO DA COSTA et al., 2007), este estudo demonstrou que não houve diferença significativa na quantidade de células epiteliais e estromais em proliferação. Talvez isso seja explicado porque, no presente estudo, estavam incluídos tanto os endométrios saudáveis quanto aqueles morfológicamente comprometidos nesta análise geral. Esse resultado foi semelhante ao obtido por Mishra et al. (2008), os quais verificaram que, nas mulheres, as porcentagens de células epiteliais e estromais em proliferação eram próximas tanto nos endométrios saudáveis quanto naqueles que apresentavam inflamação crônica. Entretanto, o objetivo destes autores não era verificar essa diferença, não sendo realizada avaliação estatística para este tipo de dado.

As diferentes categorias de endométrio, definidas por Kenney & Doig (1986), mostraram diferenças estatisticamente não significativas na proporção de células em atividade, mas que talvez devam ser ressaltados.

Notou-se que, em relação aos endométrios saudáveis, as amostras que apresentaram lesões discretas e moderadas (categorias IIA e IIB) mostraram atividade proliferativa mais intensa. Talvez isso seja explicado pela presença de mediadores químicos presentes no tecido lesionado. Entretanto, os endométrios da categoria III, que apresentam alterações graves, apresentaram menor atividade proliferativa. Considerando as definições de Ricketts & Alonso (1991), as endometroses mostraram discreto aumento no índice proliferativo em relação aos endométrios normais e com endometrite crônica infiltrativa, que apresentaram índices semelhantes, diferença essa não significativa, mas que pode sugerir eventos biológicos distintos. Nas glândulas fibróticas, os índices de proliferação das células epiteliais e estromais foram significativamente menores.

Observou-se que na maioria das células estudadas, houve redução gradativa da proliferação celular conforme aumentou o grau da lesão endometrial, particularmente no epitélio glandular profundo, o qual demonstrou diferença significativa nos endométrios da categoria III em relação à categoria I.

Estudos mostram que alterações inflamatórias e fibróticas do útero estão associadas com a expressão aumentada de receptores de estrógeno e progesterona, o que poderia estar relacionado com o *status* proliferativo alterado (HOFFMANN et al., 2009; MISHRA et al., 2008). Entretanto, Hoffmann et al. (2009) notaram que em determinada alteração fibrótica do endométrio eqüino, definida como endometrose destrutiva baseada nas características degenerativas apresentadas pelo epitélio glandular, houve a diminuição da expressão dos receptores para os hormônios sexuais. Neste tipo de alteração, houve a perda da expressão dos receptores para os hormônios esteróides, e os autores identificaram o fenômeno como desdiferenciação celular. Quanto ao estroma, Hoffmann et al. (2009) constataram diminuição da proliferação de células estromais nas endometroses inativas, nas quais este tipo celular apresentou fenótipo de fibrócito, considerado metabolicamente inativo. Também nestas células, o estudo constatou que houve diminuição dos receptores para estrógeno e progesterona. No presente trabalho, as endometroses não foram classificadas da mesma forma, mas talvez esta má diferenciação das células epiteliais, identificada por nós como degeneração glandular, ocorra nas endometrites mais graves, fato não relacionado no

trabalho citado, e a desdiferenciação seja responsável pelo menor índice proliferativo nessas células. Entretanto, quando comparamos células glandulares profundas normais e fibróticas nas amostras classificadas no mesmo grupo, nas categorias com lesões moderadas e graves (IIB e III), verificou-se que nas glândulas alteradas o epitélio mostrou maior atividade proliferativa, o que pode ser uma resposta à agressão, representada pela fibrose.

As células estromais localizadas na região da fibrose periglandular sofrem modificações funcionais e estruturais, já que passam a expressar moléculas que não estão presentes no tecido normal. A presença da α actina de músculo liso (α -SMA) indica que a célula sofreu transformação para miofibroblasto, passando a desempenhar funções observadas somente em órgãos com processo fibrótico em progressão. Essas células são responsáveis pela liberação de vários mediadores químicos, além do colágeno do tipo I (ARTHUR, 2000; WALTER et al., 2001; MASSENO, 2009). Esses mediadores químicos liberados, não só pelos miofibroblastos, mas também por fibroblastos presentes na reação fibrótica, atuam localmente (CHUJO et al., 2009), podendo ter relação com a maior atividade proliferativa do epitélio glandular envolvido por fibrose.

A promoção miofibroblástica está relacionada ao TGF- β , cuja isoforma TGF- β 1 foi observada no presente trabalho. Este fator de crescimento é responsável pela proliferação de células estromais (GARRETT et al., 2004). Observou-se que na espécie eqüina que a MMP-2, presente nos endométrios normais, está presente também nas endometrites. Hemmann et al. (2007) mencionaram que a MMP-2 é um fator autócrino de proliferação e migração para miofibroblastos nos fígados fibróticos. Entretanto, não obstante fosse verificada a presença do TGF- β 1 e da MMP-2, e sabendo-se da presença dos miofibroblastos, houve menor proliferação nas células estromais presentes na fibrose periglandular do que naquelas não relacionadas à fibrose nas endometrites eqüinas.

Wilgus et al. (2008) relataram que a MMP-9 é responsável pelo aumento da expressão de VEGF e seus receptores nos processos de cicatrização corneal e, a esse fenômeno, atribuíram o aumento da proliferação celular nos queratinócitos. Allen et al. (2007) verificaram a presença desses

elementos no endométrio eqüino, e observaram que o VEGF esteve presente nas células epiteliais das glândulas endometriais, além da expressão de receptores para este fator de crescimento (VEGF-I e VEGF-II) no epitélio glandular e células estromais. Talvez, nos processos inflamatórios e fibróticos do endométrio das éguas, este tipo de interação MMP-9 - VEGF também esteja favorecendo o estímulo da proliferação celular no epitélio das glândulas fibróticas. Wilgus et al. (2005) citam que a expressão dos receptores para VEGF não é restrita às células endoteliais, estando presente em vários tipos celulares do útero, nas células da musculatura lisa vascular, nos pericitos e nos neurônios, além de neutrófilos, monócitos e células estromais, e essa expressão fora das células endoteliais é conhecida por estar envolvida no processo de reparação tecidual.

A partir dos dados obtidos com o estudo da proliferação celular, observou-se que o epitélio glandular secretor (profundo) foi a estrutura que mais sofreu as interferências do processo inflamatório e degenerativo, fato representado pela diminuição significativa da proliferação dessas células nas endometrites mais graves, enquanto as células estromais mantiveram índices proliferativos semelhantes. Com isso, pode-se sugerir que há uma tendência à atrofia endometrial, efeito que pode ser atribuído ao tempo de evolução da doença, já que os processos inflamatórios relacionam-se com o processo fibrótico, e este é progressivo e irreversível (RICKETTS & ALONSO, 1991). Esta teoria pode ser reforçada pela verificação da diminuição da quantidade de glândulas profundas nas amostras da categoria III devido ao processo de fibrose endometrial, neste estudo evidenciado pelo emprego dos métodos histoquímicos do tricrômico de Masson e Picrosírius – Polarização. KENNEY (1978) relata que a atrofia endometrial difusa não relacionada à sazonalidade é idiopática e incomum em éguas idosas, enquanto a forma focal é causa comum de repetição de cio em éguas multíparas idosas. Esta alteração está relacionada à categoria III, do sistema de classificação de Kenney & Doig (1986).

Em contrapartida à proliferação celular, a ocorrência de morte celular “natural”, ou fisiológica, é um evento inconspícuo nos organismos multicelulares, ainda que prevalente (FADEEL & ORRENIUS, 2005). A morte celular é finamente regulada, estando envolvida na formação dos tecidos

durante a embriogênese e no contrabalanço da proliferação nos tecidos adultos (MENDOZA-RODRÍGUEZ et al., 2002; HOSAKA et al., 2005; OLIVER & VALLETE, 2005). Nasu et al. (2009) citam que a apoptose desempenha função crítica na manutenção da homeostasia tecidual, atuando na eliminação do excesso de células ou de células anômalas.

A execução da apoptose ocorre mediante a ativação consecutiva de uma família de enzimas conhecidas como caspases, sendo a caspase-3 considerada efetora (MENDOZA-RODRÍGUEZ et al., 2009). A pesquisa de células apoptóticas pela imuno-deteção da caspase-3 clivada em cortes histológicos vem sendo amplamente empregada nos estudos envolvendo desenvolvimento embrionário e processos patológicos, traduzida pelos inúmeros artigos publicados nos últimos anos.

A apoptose é o principal processo de morte celular que ocorre no útero (MENDOZA-RODRÍGUEZ et al., 2009). Contudo, no endométrio eqüino, até o momento raros estudos sobre o assunto foram publicados. Roberto da Costa et al. (2007) buscaram a relação desse tipo de morte celular com o processo fisiológico do ciclo estral. Em outro trabalho, Jischa et al. (2008) investigaram a expressão da caspase-3 durante a involução uterina em pôneis.

No presente estudo, verificou-se que houve índice apoptótico significativamente maior nas células do epitélio luminal, seguido pelo epitélio glandular, tanto superficial (ductal) quanto o profundo (secretor). As células estromais mostraram índices apoptóticos bem reduzidos, sendo significativamente menor na região do estrato compacto.

Esses resultados diferem em parte dos obtidos por Roberto da Costa et al. (2007), que observaram que as células estromais apresentaram porcentagem de células apoptóticas significativamente maior do que as células epiteliais. Além disso, observaram que, nas células epiteliais, houve maior índice de apoptose nas glândulas profundas sem, no entanto, mostrar diferença significativa com o epitélio luminal e glândulas superficiais. No endométrio eqüino, isso pode ser explicado por estarem incluídas nesta contagem amostras de endométrios normais e alterados. Este fato é evidenciado quando comparamos os endométrios da categoria I, que são considerados fisiologicamente normais, portanto semelhantes aos estudados por Roberto da Costa et al. (2007).

O presente estudo, ainda que mostrando maiores índices apoptóticos no epitélio luminal, demonstrou haver semelhança nas contagens de apoptose entre as células epiteliais. Van Cruchten et al. (2003) citam que este resultado também foi encontrado em outras espécies que apresentam estro, e que o fato de haver mais apoptose neste compartimento não corresponde à sugestão de descamação endometrial que ocorre nos humanos, mas não encontram explicação evidente. Entretanto, para o epitélio luminal, este resultado não é atribuído somente aos endométrios saudáveis, já que amostras classificadas na categoria IIB mostraram índices maiores do que as demais categorias, embora sem significância estatística. Proporções semelhantes neste tipo celular puderam ser observadas nos endométrios da categoria I e IIB, e entre as categorias IIA e III, estas apresentando porcentagens mais baixas.

De maneira geral, o epitélio luminal e glandular mostrou maiores índices apoptóticos, o que mostra que são células mais lábeis, que se renovam constantemente, fato relacionado à proliferação celular também alta. Com exceção das amostras da categoria IIB, houve menos apoptose nas endometrites do que os endométrios sadios, enquanto que a proliferação manteve-se estável, exceto no epitélio glandular profundo. Isso mostra, como nos processos inflamatórios há maior liberação de fatores de crescimento e outros mediadores, há maior estímulo proliferativo e anti-apoptótico, fato descrito nas inflamações pulmonares, em que há proliferação anormal de células musculares lisas, fibroblastos e células epiteliais, com inibição da apoptose (HASSOUN et al., 2009).

Quanto à avaliação da apoptose nas células estromais, nossos resultados mostraram semelhança aos obtidos por Van Cruchten et al. (2003), que relataram que no endométrio de cadelas o índice apoptótico das células estromais foi muito baixo, semelhante aos estudos realizados em outras espécies, e sugeriram que o aumento e diminuição estromal durante o ciclo estral são causados principalmente por alterações na matriz extracelular, e não tanto pela proliferação e morte celular.

Pode-se observar que de maneira geral o índice de células apoptóticas demonstrou leve decréscimo conforme aumentou o grau das alterações endometriais.

Nas glândulas fibróticas, observou-se que as células estromais profundas mostraram semelhança de valores para porcentagens de apoptose entre as diferentes categorias de endométrio. Comparando-se as células estromais profundas com aquelas presentes na região da fibrose periglandular, observou-se que em todas as categorias os índices de células apoptóticas diminuíram nas glândulas acometidas.

Masuoka et al. (2009) relatam que nos quadros de fibrose hepática, os corpos apoptóticos são englobados por células estreladas hepáticas, o que resulta na sua transformação para miofibroblastos, levando ao aumento da expressão do colágeno do tipo I. Esse mecanismo de ativação miofibroblástica pode estar envolvido nas endometrites crônicas das éguas, visto que os miofibroblastos são mais evidentes nas endometrites mais graves (MASSENO, 2009), e foi observado que há maior quantidade de células apoptóticas no epitélio glandular associado à fibrose periglandular nos endométrios incluídos na categoria III. A ativação contínua dos miofibroblastos está associada ao aumento da sensibilidade local às citocinas (HOLT et al., 2008), que pode estar associado à progressão do processo fibrótico também no endométrio das éguas.

A diminuição da apoptose entre as células estromais nas áreas de fibrose periglandular pode envolver mecanismos moleculares complexos.

A diminuição do acúmulo de miofibroblastos durante o reparo após uma lesão tecidual tem sido associada à apoptose. Entretanto, em alguns casos, o remodelamento tecidual não ocorre, e o tecido de granulação evolui para cicatriz hipertrófica contendo miofibroblastos e produção inadequada de matriz extracelular. Este processo se aplica a muitos órgãos, como rim, fígado, coração e pulmão, após diferentes tipos de lesão (WALLACH-DAYAN et al., 2007). Recentemente, tem sido demonstrado que os miofibroblastos adquirem resistência ao mecanismo da apoptose induzido pelas células T através do Fas. Além disso, os miofibroblastos promovem a auto-sobrevivência expressando moléculas FasL e matando linfócitos adjacentes (HANIFFA et al., 2009). Neste âmbito, Forbes et al. (2004) citam que nas regiões de fibrose perivascular e periportal, os miofibroblastos de fígados cirróticos não expressaram Fas, diferente das células hepáticas estreladas ativadas, o que

sugeriu que essas células provinham de outro local, tendo a medula óssea como origem.

O Fas é uma proteína relacionada a um dos receptores de morte para o TNF- α (TNFR1). Essa via de desencadeamento da apoptose é denominada via extrínseca (KUMAR et al., 2005). O Fas ligante – FasL - é expresso normalmente por células T e Natural Killer efectoras, enquanto o Fas é expresso por células alvo, tornando-as suscetíveis à apoptose (CHÁVEZ-GALÁN, et al., 2009).

Talvez, esse mecanismo de perpetuação dos miofibroblastos no foco fibrótico esteja presente nas endometrites das éguas, o que justificaria os menores índices apoptóticos das células estromais periglandulares, e conseqüentemente a maior deposição do colágeno do tipo I nesta região. Ainda, a suposição de que haveria uma modificação na expressão de moléculas que modificam a função dos miofibroblastos, que passariam a promover a morte de linfócitos, estaria associada à hipótese da evolução para o processo degenerativo, favorecendo o aparecimento das endometroses. Estudos envolvendo a detecção de moléculas associadas aos receptores de morte poderiam auxiliar na elucidação da patogênese da fibrose endometrial, e conseqüentemente no desenvolvimento de fármacos que antagonizam a expressão inadequada da apoptose.

Por outro lado, observou-se que nas glândulas fibróticas, houve aumento do índice apoptótico nas células epiteliais das amostras incluídas na categoria III, com lesões graves, o que pode sugerir que essas células podem ser mais sensíveis às alterações do meio. Nesta categoria, houve aumento na quantidade de células apoptóticas no epitélio glandular associado à fibrose periglandular, ainda que não estatisticamente significativo. Entretanto, nas categorias IIA e IIB, notou-se que houve diminuição da apoptose neste tipo celular, mais evidente na categoria IIA. Ao que parece, a relação dos valores das porcentagens de apoptose entre as células epiteliais de glândulas normais e fibróticas vai se alterando conforme evolui a doença endometrial, chegando mesmo à inversão nos processos graves, que mostram maior número dessas células em apoptose.

O mecanismo para o aumento da apoptose nas glândulas secretoras (epitélio glandular profundo) pode envolver a presença de

mediadores químicos, constantemente liberados por fibroblastos e miofibroblastos. A ativação de fibroblastos leva à produção de citocinas, quimiocinas e prostanoídes como a PGE₂. A perpetuação dos miofibroblastos também implica na continuidade da liberação de citocinas e quimiocinas. A persistência do infiltrado inflamatório leva ao dano tecidual e fibrose (BUCKLEY et al., 2001; HOLT et al., 2008).

No presente estudo, considerando a intensidade da marcação imunoistoquímica para TGF- β 1, não pode ser verificada a relação entre a presença desse fator de crescimento com a apoptose de células endometriais por dois motivos: 1) não houve diferença na expressão imunoistoquímica para TGF- β 1 entre os graus de lesão endometrial, e 2) ao se observar as amostras classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991), o índice apoptótico foi igual nos dois grupos de endométrios com alteração morfológica. Entretanto, não se pode concluir que o TGF- β 1 não esteja relacionado às doenças endometriais crônicas, havendo necessidade de estudos mais aprofundados, já que se sabe que este fator de crescimento promove a expressão de receptores para outros fatores solúveis, influenciando na interação célula-matriz. Avaliações quantitativas para o fator de crescimento TGF- β 1 já foram realizadas no endométrio eqüino, na tentativa de se estabelecer a relação com os graus de fibrose, mas demonstraram resultados divergentes (CADARIO et al., 2002; GANJAN & EVANS, 2006).

Relacionando a proliferação celular com a apoptose, a partir dos dados obtidos no presente trabalho, notou-se que a renovação celular ficou comprometida conforme aumentou o grau da lesão endometrial. Essa é mais uma evidência de que o tempo parece influenciar de maneira contundente na evolução das endometrites para a atrofia do endométrio na espécie eqüina. Isso indica que conforme a lesão endometrial se agrava, a estagnação tissular ocorre de forma insidiosa, o que define o caráter crônico da fibrose endometrial.

O estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na fibrogênese possibilita o conhecimento dos fatores envolvidos com a produção da matriz extracelular e de como inibi-los. Este trabalho procurou contribuir nesse sentido, buscando a correlação entre um fator de crescimento, enzimas

colagenolíticas e a renovação celular nos diferentes graus de endometrite na espécie eqüina.

No presente estudo o método imunohistoquímico mostrou-se adequado para a determinação da expressão e localização dos fatores estudados, além de permitir a quantificação da proliferação celular e apoptose nos endométrios das éguas, e a comparação com o grau de fibrose periglandular, utilizando-se programa computacional de análise de imagem associada à técnica histoquímica.

Novos estudos são necessários para que se amplie o conhecimento sobre o processo fibrótico que ocorre no endométrio das éguas. A fibrose pode se desenvolver a partir da inflamação ou pode ocorrer de forma independente, total ou parcialmente, tendo a inflamação somente como gatilho. A partir do momento em que a causa estiver determinada, haverá melhores condições para se estabelecer uma intervenção terapêutica anti-inflamatória, tendo como alvo o sistema imune, ou então as células ou os produtos da linhagem mesenquimal (RIEDER & FIOCCHI, 2008).

Além da inibição da produção da matriz extracelular, a indução da apoptose tem sido alvo das terapias antifibróticas. (FUJIWARA et al., 2005; FRIEDMAN, 2008; LIN et al., 2008).

O conhecimento das inter-relações que ocorrem entre as células, a matriz extracelular e seus sinalizadores fornecem subsídios para que se possa interferir de forma precisa no processo fibrótico do endométrio das éguas, o que poderá interromper a evolução ou mesmo reverter os fenômenos que comprometem a função uterina.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram concluir que:

- ✓ O fator de crescimento TGF- β 1 foi expressado por células inflamatórias e estromais, porém o seu grau de expressão não foi relacionado ao grau ou ao tipo de alteração morfológica predominante, ou a expressão maior ou menor das metaloproteinases 2 e 9, nem aos índices de proliferação celular e apoptóticos.
- ✓ MMP-2 apresentou intensidade de expressão imunoistoquímica significativamente maior nas células do epitélio glandular nas endometrites da categoria III e na parede vascular dos endométrios da categoria I.
- ✓ MMP-9 apresentou intensidade de expressão imunoistoquímica significativamente menor na parede vascular das biópsias da categoria IIB.
- ✓ Não houve relação na expressão imunoistoquímica de MMP-2 e MMP-9 com o tipo de endometrite.
- ✓ Não houve relação entre a expressão imunoistoquímica das metaloproteinases 2 e 9 e os índices de proliferação celular e apoptóticos.
- ✓ Não houve diferença nos índices gerais de proliferação celular e apoptóticos entre as diferentes categorias de lesão endometrial consideradas neste estudo.
- ✓ As células estromais associadas à fibrose periglandular mostraram índices proliferativos significativamente menores do que as células estromais não associadas à fibrose;

- ✓ O epitélio glandular mostrou índices menores de proliferação celular nas endometrites graves.
- ✓ Em geral, os índices apoptóticos foram significativamente maiores nas células epiteliais e significativamente menores nas células estromais.
- ✓ Os índices apoptóticos do epitélio glandular associado à fibrose periglandular foram significativamente maiores nas endometrites graves.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFIA²

ABD-ELNAEIM, M.M.M., LEISER, R., WILSHER, S., ALLEN, W.R. Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout in young and aged mares. *Placenta*, v. 27, p. 1103-13, 2006.

ABRAHAM, M., SHAPIRO, S., KARNI, A., WEINER, H.L., MILLER, A. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. *J. Neuroimmunol.*, v.163, p. 157-64, 2005.

ALLEN, W.R., GOWER, S., WILSHER, S. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (Flt-1 and KDR) in the endometrium and placenta of the mare during the oestrus cycle and pregnancy. *Reprod. Dom. Anim.*, v.42, p.516-26, 2007.

AMARAL, D. *Estudo morfológico e histoquímico do endométrio de éguas PSI*. Belo Horizonte, 2002. 65p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

ANDRADE, G.B., MONTES, G.S., CONCEIÇÃO, G.M.S., SALDIVA, P.H.N. Use of the Picrosirius-polarization method to age fibrotic lesions in the hepatic granulomas produced in experimental murine schistosomiasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 93, p. 265-72, 1999.

ARICI, A., MACDONALD, P.C., CASEY, M.L. Modulation of the levels of transforming growth factor β messenger ribonucleic acids in human endometrial stromal cells. *Biol. Reprod.*, v.54, p.463-9, 1996.

ARTHUR, M.J.P. MMPs and TIMPs in liver fibrosis. *Am. j. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v. 279, G245-G249, 2000.

2 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. *Normas para publicações da UNESP*. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. *List of journals indexed in Index Medicus*. Washington, 1997. 240p.

- BECKER, W.M., KLEINSMITH, L.J. HARDIN, J. *The world of the cell*. 4 ed. San Francisco: Addison Wesley Longman, 2000. 878 p.
- BERGIN, P.J., WEN, S., PAN-HAMMARSTRÖM, Q., QUIDING-JÄRBRINK, M. Secretion of matrix metalloproteinase-9 by macrophages, *in vitro*, in response to *Helicobacter pylori*. *Fems Immunol. Med. Microbiol.*, v.45, n.2, p.159-69, 2005.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v.7., p.728-35, 1995.
- BORGES, L.F., GUTIERREZ, P.S., MARANA, H.R.C., TABOGA, S.R. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapsed lesions. *Micron*, v.38, p.580-3, 2007.
- BOCHSLER, P.N., SLAUSON, D.O. Inflammation and repair of tissue. In: SLAUSON, D.O., COOPER, B.J. *Mechanisms of disease: a textbook of comparative general pathology*. 3 ed.,. St. Louis: Mosby, 2002. p.140-245.
- BRUNER, K.L., RODGERS, W.H., GOLD, L.I., KORC, M., HARGROVE, J.T., MATRISIAN, L.M., OSTEEEN, K.G. Transforming growth factor β mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 92, p. 7362-6, 1995.
- BUCKLEY, C.D., PILLING, D., LORD, J.M., AKBAR, A.N., SCHEEL-TOELLNER, D., SALMON, M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *TRENDS in Immunology*, v.22, n.4, p.199-204, 2001.
- CADARIO, M.E., LOSINNO, L., GIGUERE, S., AGUILAR, J., JACK, T.J., MACPHERSON, M., FITZPATRICK, C., UHL, E.W. Uterine expression of fibrogenic cytokines in the mare. *Theriogenology*, v.58, p.449-52, 2002.
- CALDINI, E.T.E.G. *Estudo histoquímico e ultra-estrutural do colágeno na fibrose periglandular do endométrio eqüino*. São Paulo, 1992. 123p. Tese

(Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

CHÁVEZ-GALÁN, L., ARENAS-DEL ANGEL, M.C., ZENTENO, E., CHÁVEZ, R., LASCURAIN, R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular and Molecular Immunology*, v.6, n.1, p.15-25, 2009.

CHIN, D., BOYLE, G.M., PARSONS, P.G., COMAN, W.B. What is transforming growth factor-beta (TGF- β)? *The British Association of Plastic Surgeons*, v. 57, p. 215-21, 2004.

CHUJO, S., SHIRASAKI, F., KONDO-MIYAZAKI, M., IKAWA, Y., TAKEHARA, K. Role of connective tissue growth factor and its interaction with basic fibroblast growth factor and macrophage chemoattractant protein-1 in skin fibrosis. *J. Cell. Physiol.*, v.220, p. 189-95, 2009.

DANIELS, J.T., SCHULTZ, G.S., BLALOCK, T.D., GARRETT, Q., GROTENDORST, G.R., DEAN, N.M., KHAW, P.T. Mediation of transforming growth factor- β 1-stimulated matrix contraction by fibroblasts: a role for connective tissue growth factor in contractile scarring. *Am. J. Pathol.*, v.163, n.5, p.2043-52, 2003.

DOIG, P.A., MCKNIGHT, J.D., MILLER, R.B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Can. Vet. J.*, v. 22, p. 72-6, 1981.

DUMONT, N., O'CONNOR-MCCOURT, M.D., PHILIP, A. Transforming growth factor- β receptors on human endometrial cells: identification of the type I, II and III receptors and glycosylphosphatidylinositol anchored TGF- β binding proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.111, p.55-66, 1995.

EIGENHEER-MOREIRA, J., 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. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, n.12, p.506-12, 2007.

EVANS, T.J., MILLER, M.A., GANJAM, V.K., NISWENDER, K.D., ELLERSIECK, M.R., FRAUSE, W.J., YOUNGQUIST, R.S. Morfometric

- analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. *AJVR*, v.59, n.10, p.1209-14, 1998.
- FADEEL, B., ORRENIUS, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J. Intern. Med.*, v. 258, p. 479-517, 2005.
- FAN, T.-J, HAN, L.-H., CONG, R.-S., LIANG, J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, v. 37, n. 11, p. 719-27, 2005.
- FORBES, S.J., RUSSO, F.P., REY, V., BURRA, P., RUGGE, M., WRIGHT, N.A., ALISON, M.R. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology*, v.126, n.4, p.955-63, 2004.
- FREITAS, S., MEDURI, G., NESTOUR, E. L., BAUSERO, P., PERROT-APPLANAT, M. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. *Biol. Reprod.*, v.61, p.1070-82, 1999.
- FRIEDMAN, S.L. Hepatic fibrosis – overview. *Toxicology*, v.254, p.120-9, 2008.
- FUJIWARA, M., MURAGAKI, Y. OOSHIMA, A. Keloid-derived fibroblasts show increased secretion of factors involved in collagen turnover and depend on matrix metalloproteinases for migration. *Br. J. Dermatol.*, v. 153, p.295-300, 2005.
- FUJIWARA, A., SHIBATA, E., TERASHIMA, H., SHISHIDO, A., NISHIKI, J., YOSHIDA, K., MIYAUCHI, K., MADACHI, A., MATSUURA, N. Evaluation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity with film *in situ* zymography for improved cytological diagnosis of breast tumors. *Breast Cancer*, v.13, n.3, p.272-8, 2006.
- FUMUSO, E., GIGUÈRE, S., WADE, J., ROGAN, D., VIDELA-DORNA, I., BOWDEN, R.A. Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis – Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.96, p.31-41, 2003.

- GANJAM, V.K., EVANS, T.J. Equine endometrial fibrosis correlates with 11 β -HSD2, TGF- β 1 and ACE activities. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 248, p. 104-8, 2006.
- GARRETT, Q., KHAW, P.T., BLALOCK, T.D., SCHULTZ, G.S., GROTENDORST, G.R., DANIELS, J.T. Involvement of CTGF in TGF- β 1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.45, n.4, p.1109-16, 2004.
- GERSTENBERG, C, ALLEN, W.R., STEWART, F. Cell proliferation patterns in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle. *J. Reprod. Fertil.*, v.116, p.167-75, 1999.
- GODKIN, J.D., DORÉ, J.J.E. Transforming growth factor β and the endometrium. *Rev. Reprod.*, v.3, p. 1-6, 1998.
- GRAY, C. A., BARTOL, F.F., TARLETON, B.J., WILEY, A.A., JOHNSON, G.A., BAZER, F.W., SPENCER, T.E. Developmental biology of uterine glands. *Biol. Reprod.*, v. 65, p. 1311-23, 2001.
- GREEN, D.R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*, v. 121, p. 671-4, 2005.
- HALL, P.A., LEVISON, D.A. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J. Clin. Pathol.*, v. 43, p. 184-92, 1990.
- HANIFFA, M.A., COLLIN, M.P., BUCKLEY, C.D., DAZZI, F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*, v.94, n.2, p.258-63, 2009.
- HASSOUN, P.M., MOUTHON, L., BARBERÀ, J.A., EDDAHIBI, S., FLORES, S.C., GRIMMINGER, F, JONES, P.L., MAITLAND, M.L., MICHELAKIS, E.D., MORRELL, N.W., NEWMAN, J.H., RABINOVITCH, M., SCHERMULY, R., STENMARK, K.R., VOELKEL, N.F., YUAN, J.X.-J., HUMBERT, M. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v.54, n.1, Suppl S, 2009.

- HEMMANN, S., GRAF, J., RODERFELD, M., ROEB, E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis – a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *Journal of Hepatology*, v.46, p. 955-75, 2007.
- HOFFMANN, C., ELLENBERGER, C., MATTOS, R.C., AUPPERLE, H., DHEIN, S., STIEF, B., SCHOON, H.-A. The equine endometosis: new insights into the pathogenesis. *Anim. Reprod. Sci.*, v.111, p.261-78, 2009.
- HOLT, A.P., SALMON, M., BUCKLEY, C.D., ADAMS, D.H. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin. Liver Dis.*, v.12, p.861-82, 2008.
- HORAN, M.P., QUAN, N., SUBRAMANIAN, S.V., STRAUCH, A.R., GAJENDRAREDDY, P.K., MARUCHA, P.T. Impaired wound contraction and delayed myofibroblast differentiation in restraint-stressed mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, v.19, p.207-16, 2005.
- HOSAKA, Y., TERAOKA, H., YAMAMOTO, E., UEDA, H., TAKEHANA, K. Mechanism of cell death in inflamed superficial digital flexor tendon in the horse. *J. Comp. Pathol.*, v. 132, p. 51-8, 2005.
- HSU, C., CHANG, J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J. Hand Surg.*, v.29A, p.551–63, 2004.
- INOUE, Y., ITO, K., TERADA, T., NISHIMURA, N., HATAZOE, T., SATO, K. Degenerative changes in the endometrial vasculature of the mare detected by videoendoscopic examination. *AAEP Proceedings*, v. 46, p. 325-9, 2000.
- JAVELAUD, D., MAUVIEL, A. Mammalian transforming growth factor- β s: Smad signaling and physio-pahtological roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.36, p.1161-5, 2004.
- JISCHA, S., WALTER, I., NOWOTNY, N., PALM, F., BUDIK, S., KOLODZIEJEK, J., AURICH, C. Uterine involution and endometrial function in postpartum pony mares. *Am. J. Vet. Res.*, v.69, p.1525-34, 2008.

- JUNQUEIRA, L.C.U., COSSERMELLI, W., BRENTANI, R.R. Diferencial staining of collagens typé I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch. Histol. Jpn.*, v. 41, p. 267-74, 1978.
- KAPOOR, M., NOMIYAMA, T., BRUEMMER, D., KOJIMA, F., CROFFORD, L.J. Growth factors and cytokines: emphasis on their role in wound healing and atherosclerosis. *Current Anaesthesia & Critical Care*, v. 17, p. 13-20, 2006.
- KASAI, H., ALLEN, J.T., MASON, R.M., KAMIMURA, T., ZHANG, Z. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respiratory Research*, v.6, n.56, 2005.
- KATILA, T. Uterine defence mechanisms in the mare. *An. Reprod. Sci.*, v. 42, p. 197-204, 1996.
- KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *JAVMA*, v. 172, n. 3, p. 241-62, 1978.
- KENNEY, R.M., DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. in: MORROW, D.A. (ed.). *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p. 723-9.
- KIM, H.-S., LUO, L., PFLUGFELDER, S.C., LI, D.-Q. Doxycycline inhibits TGF- β 1-induced MMP-9 via Smad and MAPK in human corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 46, n. 3, p. 840-8, 2005.
- KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. 1525p.
- LAUNAY, S., HERMINE, O., FONTENAY, M., KROEMER, G., SOLARY, E. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene*, v. 24, p. 5137-48, 2005.
- LEBLANC, M.M. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. *Theriogenology*, v.70, n.3, p.421-9, 2008.

- LEBLOND, C.P. The life history of cells in renewing systems. *Am. J. Anat.*, v.160, p.114-58, 1981.
- LIN, .Y., LIU, X, YUE, P., BENBROOK, D.M., BERLIN, K.D., KHURI, F.R., SUN, S.-Y. Involvement of c-FLIP and survivin down-regulation in flexible heteroarotinoid-induced apoptosis and enhancement of TRAIL-initiated apoptosis in lung cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, v.7, n.11, p.3556-65, 2008.
- LIU, I.K.M., TROEDSSON, M.H.T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: yesterday and today. *Theriogenology*, v.70, n.3, p.415-20, 2008.
- LU, L., SAULIS, A.S., LIU, W.R., ROY, N.D., CHAO, J.D., LEDBETTER, S., MUSTOE, T.A. The temporal effects of anti-TGF- β 1, 2 and 3 monoclonal antibody on wound healing and hypertrophic scar formation. *Journal of American College of Surgeons*, v. 201, p. 391-7, 2005.
- LUNA, L.G. *Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology*. Washington: McGraw Hill, 1968, 258p.
- MANSOUR, G.D. *Avaliação imuno-histoquímica da proliferação celular e de componentes da matriz extracelular do endométrio equino*. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2000. 95 p.
- MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Repair, regeneration and fibrosis. *in*: RUBIN, E., FABER, J.L. *Pathology*. 3 ed. Philadelphia: Lippincot-Raven, 1999, 1664p.
- MASSENO, A.P.B. *Caracterização imunoistoquímica dos miofibroblastos endometriais e da expressão de MMP-2 nas endometrites crônicas das éguas*. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009. 69 p.
- MASUOKA, H.C., GUICCIARDI, M.E., GORES, G.J. Caspase inhibitors for the treatment of Hepatitis C. *Clin. Liver Dis.*, v.13, n.467-75, 2009.

- MATHISEN, B., LOENNECHEN, T., GEDDE-DAHL, T., WINBERG, J.-O. Fibroblast heterogeneity in collagenolytic response to colchicine. *Biochem. Pharmacol.*, v.71, p.574-83, 2006.
- MATSUSAKA, H. IDE, T., MATSUSHIMA, S., IKEUCHI, M., KUBOTA, T., SUNAGAWA, K., KINUGAWA, S., TSUTSUI, H. Targeted deletion of matrix metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure overload. *Hypertension*, v.47, p.711-7, 2006.
- MEDH, R.D., THOMPSON, E.B. Hormonal regulation of physiological cell turnover and apoptosis. *Cell Tissue Res.*, v.301, p.101-24, 2000.
- MEDICE, E.B., MERKT, H., POLHENS, J.F., BRUNKHORST, D. Considerations on the use of ancillary diagnostic aids in the diagnosis of endometritis due to infection in mares. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl., v. 44, p. 700-3, 1991.
- MEIJER, M.J.W., MIEREMET-OOMS, M.A.C., VAN DER ZON, A.M., VAN DUIJIN, W., VAN HOGEZAND, R.A., SIER, C.F.M., HOMMES, D.W., LAMERS, C.B.H.W., VERSPAGET, H.W. Increased mucosal matrix metalloproteinase-1, -2, -3 and -9 activity in patients with inflammatory bowel disease and the relation with Crohn's disease phenotype. *Digestive and Liver Disease*, v.39, p.733-9, 2007.
- MENDOZA-RODRÍGUEZ, C.A., MERCHANT-LARIOS, H., SEGURA-VALDEZ, M.L., MORENO-MENDOZA, N., CRUZ, M.E., ARTEAGA-LÓPEZ, P., CAMACHO-ARROYO, I., DOMINGUEZ, R., CERBÓN, M. Expression of p53 in luminal and glandular epithelium during the growth and regression of rat uterus during the estrous cycle. *Mol. Reprod. Dev.*, v.61, p.445-52, 2002.
- MENDOZA-RODRÍGUEZ, C.A., MARTÍNEZ, M.A., VARGAS, O., NAVA, K., MORIMOTO, S., ESPINOSA, M., CERBÓN, M. Mating modifies apoptosis pattern in epithelial cells of the rat uterus. *Mol. Reprod. Dev.*, v.76, p.564-72, 2009.

- MIGITA, K., MAEDA, Y., ABIRU, S., NAKAMURA, M., KOMORI, A., YOKOYAMA, T., TAKII, Y., MORI, T., YATSUHASHI, H., EGUCHI, K., ISHIBASHI, H. Immunosuppressant FK506 inhibits matrix metalloproteinase-9 induction in TNF- α stimulated human hepatic stellate cells. *Life Sci.*, v.78, p.2510-5, 2006.
- MISHRA, K., WADHWA, N., GULERIA, K., AGARWAL, S. ER, PR and Ki-67 expression status in granulomatous and chronic non-specific endometritis. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, v.34, n.3, p.371-8, 2008.
- MONTES, G.S., JUNQUEIRA, L.C.U. The use of the picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.86, p. 1-11, 1991.
- MURPHY, G., NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 29, p.290-308, 2008.
- NASU, K., YUGE, A., TSUNO, A., NISHIDA, M., NARAHARA, H. Involvement of resistance to apoptosis in the pathogenesis of endometriosis. *Histol. Histopathol.*, v.24, 1181-92, 2009.
- NEWBY, A.C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc. Res.*, v.69, p. 614-24, 2006.
- NGUYEN, J., KNAPNOUGEL, P., LESAVRE, P., BAUVOIS, B. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 by interferons and TGF- β 1 through distinct signalings accounts for reduced monocyte invasiveness. *FEBS Letters*, v.579, p. 5487-93, 2005.
- NUNES, L.C. *Avaliação histopatológica, histoquímica, imunoistoquímica e morfométrica das endometrites crônicas em éguas*. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003. 108 p.
- NUNES, L.C. *Expressão de metaloproteinases, TIMP-1 e da esclerose vascular nas endometrites crônicas das éguas*. Tese (doutorado) – Faculdade de

- Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006. 84 p.
- OGAWA, K., CHEN, F., KUANG, C., CHEN, Y. Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor- β is mediated by a nuclear factor- κ B site. *Biochem. J.*, v.381, p.413-22, 2004.
- OLIVER, L., VALLETTE, F.M. The role of caspases in cell death and differentiation. *Drug Resistance Updates*, v. 8, p. 163-70, 2005.
- OSTEEN, K.G., RODGERS, W.H., GAIRE, M., HARGROVE, J.T., GORSTEIN, F. Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 91, p. 10129-33, 1994.
- PAGE-MCCAW, A., EWALD, A.J., WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev., Mol. Cell. Biol.*, v.8, p.221-33, 2007.
- POLETTE, M., NAWROCKI-RABY, B., GILLES, C., CLAVEL, C., BIREMBOUT, P. Tumor invasion and matrix metalloproteinases. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.*, v.49, p.179-86, 2004.
- PORTO, C.D. *Caracterização histoquímica do colágeno e expressão de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 nas endometrites crônicas das éguas*. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006. 102 p.
- PORTO, C.D., NUNES, L.C., SEQUEIRA, J.L., OLIVEIRA, D.E., ALVARENGA, M.A.. Expressão de MMP-2 e MMP-9 no processo fibrótico endometrial das éguas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, supl.1, p.105-6, 2005.
- RA, H.-J., PARKS, W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol.*, v.26, n.8, p.587-96, 2007.
- RICKETTS, S.W., ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Vet. J.*, v. 23, 189-92, 1991.

- RIEDER, F., FIOCCHI, C. Intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease – current knowledge and future perspectives. *Journal of Crohn's and Colitis*, v.2, p.279-90, 2008.
- 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 oestrus cycle. *Reproduction, Fertility and Development*, v.19, n.8, p. 925-32, 2007.
- RODRIGUEZ, G.C., RIMEL, B.J., WATKIN, W., TURBOV, J.M., BARRY, C. DU, H., MAXWELL, G.L., CLINE, J.M. Progestin treatment induces apoptosis and modulates transforming growth factor- β in the uterine endometrium. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v.17, n.3, p.578-84, 2008.
- SCHLAFER, D.H. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? *Theriogenology*, v.68, p.413-22, 2007.
- SCHOON, H.-A., WIEGANDT, I., SCHOON, I., AUPPERLE, H., BARTMANN, C.P. Functional disturbances in the endometrium of barren mares: a histological and immunohistological study. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.56, p.381-91, 2000.
- SCHOON, H.-A., SCHOON, D. The category I mare (Kenney and Doig 1986): Expected foaling rate 80-90% - fact or fiction? *Pferdeheilkunde*, v.19, n.6, p.698-701, 2003.
- STOIMENOV, I., HELLEDAY, T. PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem. Soc. Trans.*, 37, p.605–613, 2009.
- THOMAS, C.M., FULLER, C.J., WHITTLES, C.E., SHARIF, M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthr. Cartil.*, v.15, n.1, p.27-34, 2007.

- TRAUB-DARGATZ, J.L., SALMAN, M.D., VOSS, J.L. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. *JAVMA*, v. 198, n. 10, p. 1745-7, 1991.
- TROEDSSON, M.H.T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*, v. 52, p. 461-71, 1999.
- UENO, T., TAMAKI, S., SUGAWARA, H., INUZUKA, S., TORIMURA, T., SATA, M., TANIKAWA, K. Significance of serum tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in various liver diseases. *J. Hepatol.*, v.24, p.177-84, 1996.
- VAGNONI, K.E., GINTHER, O.J., LUNN, D.P. Metalloproteinase activity has a role in equine chorionic girdle cell invasion. *Biol. Reprod.*, v.53, p.800-5, 1995.
- VAN CAMP, S.D. Endometrial biopsy of the mare: a review and update. *Reproduction*, v. 4, n. 2, p. 229-45, 1988.
- VAN CRUCHTEN, S., VAN DEN BROECK, W., DUCHATEAU, L., SIMOENS, P. Apoptosis in the canine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology*, v.60, p.1595-1608, 2003.
- WALLACH-DAYAN, S.B., GERSTI, R.G., BREUER, R. Evasion of myofibroblasts from immune surveillance: a mechanism for tissue fibrosis. *PNAS*, v.104, n.51, p.20460-5, 2007.
- WALTER, I., HANDLER, J., MILLER, I., AURICH, C. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue transglutaminase (TG 2) are expressed in periglandular fibrosis in horse mares with endometrosis. *Histol. Histopathol.*, v.20, p.1105-13, 2005.
- 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. 581-6, 2001.

- WANG, L., CLUTTER, S., BENINCOSA, J., FORTNEY, F., GIBSON, L.F. Activation of transforming growth factor- β 1/p38/Smad3 signaling in stromal cells requires reactive oxygen species-mediated MMP-2 activity during bone marrow damage. *Stem Cells*, v. 23, p. 1122-34, 2005.
- WANG, Y., ZHANG, J.-S., QIAN, J., HUANG, G.-C., CHEN, Q. Adrenomedullin regulates expressions of transforming growth factor- β 1 and β 1-induced matrix metalloproteinases-2 in hepatic stellate cells. *Intern. J. Exp. Pathol.*, v. 87, p. 177-84, 2006.
- WILGUS, T.A., MATTHIES, A.M., RADEK, K.A., DOVI, J.V., BURNS, A.L., RAVI SHANKAR, R.S., DIPIETRO, L.A. Novel function for vascular endothelial growth factor receptor-1 on epidermal keratinocytes. *Am. J. Pathol.*, v.167, n.5, 2005.
- WILGUS, T.A., FERREIRA, A.M., OBERYSZYN, T.M., BERGDALL, V.K., DIPIETRO, L.A. Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor. *Lab. Invest.*, v.88, p.579-90, 2008.
- YOKOTA, T., DENHAM, W., MURAYAMA, K., PELHAM, C., JOEHL, R., BELL, R.H. Pancreatic stellate cell activation and MMP production in experimental pancreatic fibrosis. *J. Surg. Res.*, v. 104, p. 106-11, 2002.
- YUAN, J. Divergence form a dedicated cellular suicide mechanism: exploring the evolution of cell death. *Mol. Cell*, v. 23, p. 1-12, 2006.
- ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New Jersey, 1996, 718 p.
- ZHANG, J., SALAMONSEN, L.A. In vivo evidence for active matrix metalloproteinases in human endometrium supports their role in tissue breakdown at menstruation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 87, p. 2346-51, 2002.
- ZHOU, X., HOVELL, C.J., PAWLEY, S., HUTCHINGS, M.I., ARTHUR, M.P.J., IREDALE, J.P., BENYON, R.C. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis. *Liver Int.*, v.24, p.492-501, 2004.

Trabalho Científico

8. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.

EXPRESSÃO DE MMP-2 E MMP-9 NAS ENDOMETRITES CRÔNICAS DAS ÉGUAS

[Expression of MMP-2 and MMP-9 in chronic endometritis of mares]

C.D. Porto¹, L.C. Nunes², A.P.B. Masseno¹, J.L. Sequeira³, D.E. Oliveira⁴, M.A. Alvarenga³

¹Alunas da pós-graduação - FMVZ UNESP, Botucatu, SP - bolsistas FAPESP

²CCA UFES, Alegre, ES

³FMVZ UNESP, Botucatu, SP

⁴FMB UNESP, Botucatu, SP

³ Autor para correspondência (*corresponding author*)

FMVZ UNESP Departamento de Clínica Veterinária, Distrito de Rubião Jr, s/n, caixa postal 560, CEP 18618-000, Botucatu, SP. Fone/fax: (14) 3811-6293. E-mail: sequeira@fmvz.unesp.br
Apoio: FAPESP (processos 07/54418-5, 06/61832-7, 06/59287-3)

30 MMP-2 was observed in vascular wall, stromal cells and glandular epithelium, and
31 greater immune-reaction was seen glandular epithelium of category III endometritis and
32 vascular wall of category I endometrium. MMP-9 immune-reaction was diffuse and was
33 seen in luminal and glandular epithelium, vascular wall region and stromal, endotelium
34 and inflammatory cells. It was decreased marking in vascular wall region as increased
35 degree of endometrial injury, as well as reducing intensity of reaction in this
36 compartment. There was no relation in immunohistochemistry expression of
37 metalloproteinases with the type of endometritis.

38 **Keywords:** equine, endometrium, inflammation, fibrosis, metalloproteinases.

39 INTRODUÇÃO

40 A investigação histopatológica do endométrio tem demonstrado importância diagnóstica
41 e prognóstica, tornando a biópsia o método mais preciso para a avaliação da situação
42 morfofuncional do endométrio (Doig et al., 1981; Schoon e Schoon, 2003).

43 Kenney (1978) propôs um sistema de classificação das endometrites, posteriormente
44 modificado por Kenney e Doig (1986). Outras classificações também são utilizadas,
45 como a descrita por Ricketts e Alonso (1991), que procura separar entidades distintas de
46 acordo com o padrão morfológico da doença.

47 Na fibrose periglandular do endométrio as células estromais secretam componentes da
48 matriz extracelular e fibronectina, contribuindo para o acúmulo da matriz nesta região
49 (Hoffmann et al., 2009). Alterações fisiológicas ou patológicas na matriz extracelular
50 resultam no desequilíbrio da degradação e síntese dos componentes da matriz (Arthur,
51 2000). As metaloproteinases (MMPs) participam dos processos fisiológicos de
52 remodelamento tecidual e também estão associadas a condições patológicas (Zhang e
53 Salamonsen, 2002).

54 Nos processos patológicos progressivos, como a fibrose hepática, há excesso de
55 deposição de proteínas da matriz no espaço extracelular, e isso deve-se à regulação da
56 síntese e degradação de matriz. Nestas lesões, ocorre deposição de colágenos tipo I e III,
57 relativamente resistentes à atividade das proteases (Arthur, 2000).

58 No endométrio das éguas, Walter et al. (2005) verificaram a expressão de MMP-2 na
59 endometrose. Esses autores relataram que essa enzima está associada a glândulas
60 dilatadas e fibróticas e sugeriram que sua presença está relacionada às alterações da
61 homeostasia da matriz extracelular nas regiões fibróticas.

62 A patogênese da fibrose endometrial equina ainda permanece obscura. Investigações a
63 respeito da participação das metaloproteinases neste tipo de processo ainda são
64 escassos, principalmente no que tange aos sítios onde essas proteínas podem ser
65 observadas. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença das enzimas MMP-2 e
66 MMP-9 no endométrio das éguas que apresentam diferentes graus de lesão e
67 apresentação morfológica.

68 **MATERIAL E MÉTODOS**

69 O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal,
70 sendo aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (protocolo 02/2007).

71 As biópsias uterinas foram obtidas de 60 éguas provenientes da rotina do Hospital
72 Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu.

73 Todas as amostras foram fixadas em Bouin e incluídas em parafina. Cortes com três
74 micrômetros de espessura foram obtidos e corados pelos métodos da hematoxilina-
75 eosina e tricrômico de Masson.

76 Foram empregadas as classificações histopatológicas descritas por Kenney e Doig
77 (1986) e Ricketts e Alonso (1991) para as endometrites crônicas. A primeira foi
78 utilizada para a associação do grau de lesão endometrial com a expressão das enzimas
79 MMP-2 e MMP-9, e a segunda, para a associação com apresentação morfológica da
80 doença endometrial, classificando-as como endometrites crônicas infiltrativas ou
81 endometroses.

82 Para realização da técnica imunoistoquímica, os cortes histológicos foram posicionados
83 sobre lâminas silanizadas. Para o bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se solução
84 de peróxido de hidrogênio a 30% em metanol para o anticorpo MMP-9 e solução de
85 peróxido de hidrogênio a 3% para o anticorpo MMP-2. A recuperação antigênica foi
86 executada em solução de ácido cítrico a 10 mM, pH 6,0, no forno de microondas. Os
87 cortes foram lavados em água destilada e imersos em tampão TRIS pH 7,4. Com a
88 finalidade de evitar reações inespecíficas com proteínas teciduais, o material foi imerso
89 em solução de leite em pó desnatado a 3% em tampão TRIS. Os anticorpos primários
90 empregados foram MMP-2, na diluição 1:200 (clone 42-5D11, Research Diagnostics
91 Inc. - RDI) e MMP-9, na diluição 1:100 (policlonal, Santa Cruz Biotechnology). A
92 incubação com os anticorpos primários foi realizada por 18 horas a 4°C. No dia
93 seguinte, os cortes foram lavados com tampão TRIS e submetidos à reação com

94 anticorpo secundário biotilado. Sucedeu-se a lavagem do material com TRIS e as
95 lâminas foram incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (VECTASTAIN
96 Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc.), preparado conforme recomendações do
97 fabricante. Para visualização da reação, os cortes foram tratados com solução de
98 3,3'-diaminobenzidina (Liquid DAB DakoCytomation). A contra-coloração foi realizada
99 com hematoxilina de Harris. A avaliação descritiva para a imuno-reatividade foi
100 realizada considerando-se os tipos celulares positivos – epitélio luminal, epitélio
101 glandular, célula estromal, célula endotelial, células inflamatórias e parede vascular. A
102 frequência e a intensidade da marcação foi avaliada como discreta, moderada ou
103 acentuada.

104 **RESULTADOS**

105 Quando foi empregada a classificação de Kenney e Doig (1986), 13 éguas foram
106 incluídas na categoria I (23,33%), 17 na categoria IIA (26,67%), 15 na categoria IIB
107 (25%) e 15 na categoria III (25%). Ao ser aplicada a classificação de Ricketts e Alonso
108 (1991), 13 biópsias foram consideradas sem alterações histopatológicas dignas de nota,
109 e corresponderam à categoria I da classificação anterior, 35 casos foram classificados
110 como endometrite crônica infiltrativa e 12 foram classificados como endometrose.

111 A marcação imunoistoquímica para MMP-2 (Fig.1) foi observada nas células estromais
112 do estrato compacto, sobretudo nas biópsias de endométrio saudável. Essas células
113 também mostraram reatividade ao redor das glândulas fibróticas e/ou dilatadas, nas
114 quais o epitélio também mostrou intensa reação positiva para esse anticorpo. No
115 entanto, a marcação positiva nas células do epitélio glandular não foi limitada às
116 glândulas com esse tipo de alteração fibrótica. A região da parede vascular, excluindo-
117 se o endotélio, mostrou intensa marcação para MMP-2, principalmente na região mais
118 profunda do estrato esponjoso.

119 Nos endométrios saudáveis a região da parede vascular e as células estromais foram as
120 estruturas que mostraram marcação em maior número de biópsias, seguidas pelo
121 epitélio glandular. Entretanto, foram as células estromais que apresentaram maior
122 frequência de células positivas. Nas glândulas endometriais, a reação ocorreu de forma
123 esparsa e discreta. Neste grupo, a menor quantidade de células positivas foi observada
124 no epitélio luminal.

125 Nas amostras incluídas na categoria IIA, as estruturas que demonstraram marcação em
126 maior número de amostras foram as células estromais, mas com frequência discreta. As
127 células do epitélio luminal e do epitélio glandular apresentaram imuno-reatividade
128 expressiva para MMP-2.

129 Na categoria IIB, entre as estruturas analisadas, a marcação positiva para MMP-2 foi
130 mais freqüente no epitélio glandular, parede vascular e células estromais. O grau de
131 expressão variou de discreto a acentuado.

132 Na categoria III, o epitélio glandular e a parede vascular foram as estruturas que
133 demonstraram imuno-reatividade para MMP-2 em maior número de amostras, seguidas
134 pelas células estromais. Quanto à intensidade da marcação, comparando as diferentes
135 categorias de endométrio, o epitélio glandular mostrou aumento da intensidade da
136 expressão de MMP-2 conforme aumentou o grau de lesão. A parede vascular mostrou
137 reação moderada na categoria I, negativa na maior parte das amostras da categoria IIA,
138 e imuno-reatividade discreta nas categorias IIB e III. Entre as células estromais, as
139 categorias I, IIB e III apresentaram reação de intensidade moderada, e na categoria IIA,
140 a intensidade caracterizou-se por ser discreta.

141 Comparando-se as diferentes estruturas dentro de cada grupo, pode-se observar que nos
142 endométrios saudáveis, as estruturas que apresentaram maior intensidade de marcação
143 imunoistoquímica para a enzima MMP-2 foram parede vascular e células estromais. O
144 epitélio glandular mostrou intensidade discreta. Na maior parte das biópsias, não houve
145 reação positiva para o epitélio luminal ou esta foi discreta. As amostras da categoria IIA
146 mostraram marcação intensa no epitélio luminal, moderada no epitélio glandular e
147 discreta nas células estromais. Intensidade de expressão maior da MMP-2 foi verificada
148 somente nas células do epitélio luminal e do epitélio glandular em relação às células
149 endoteliais, inflamatórias e parede vascular. Na categoria IIB, houve maior intensidade
150 da marcação no epitélio glandular e nas células estromais. Células estromais
151 apresentaram marcação positiva discreta. Entre as amostras da categoria III, verificou-se
152 que o epitélio glandular foi a estrutura que apresentou maior intensidade de marcação,
153 seguido pelas células estromais e parede vascular, de forma gradativamente menor.

154 As endometrites crônicas infiltrativas mostraram imuno-reatividade positiva para MMP-
155 2 em 94,12% das amostras. Neste grupo, o epitélio glandular foi a estrutura que marcou
156 positivamente na maior parte das amostras, seguido pela parede vascular, células

157 estromais, e epitélio luminal, diminuindo gradativamente. Foi também o epitélio
158 glandular o elemento expressado com maior freqüência nas amostras, seguidas pelas
159 células estromais.

160 Nas endometroses, 91,67% das amostras foram imuno-reativas para MMP-2. A
161 freqüência de amostras com marcação positiva para este anticorpo foi expressivamente
162 maior nas células estromais, seguidas pela parede vascular, epitélio glandular e epitélio
163 luminal. Foram as células estromais que também demonstraram positividade com maior
164 freqüência, mas esta foi variável entre as amostras. A freqüência da positividade nas
165 células estromais foi sucedida pela do epitélio glandular, da parede vascular e
166 finalmente pelo epitélio luminal.

167 Quanto à intensidade da imuno-reatividade para MMP-2, observou-se que o epitélio
168 glandular mostrou maior expressão nas endometrites crônicas infiltrativas. Na parede
169 vascular esta característica foi observada nos endométrios hígidos; nas células
170 estromais, foi maior nos endométrios hígidos e nas endometroses. Notou-se que a
171 intensidade da marcação para MMP-2 no epitélio luminal foi maior nas endometroses,
172 já que nos demais grupos, grande parte dessas células não demonstrou positividade.

173 Considerando a intensidade da expressão de MMP-2 entre as diferentes estruturas
174 dentro de cada grupo classificado conforme Ricketts e Alonso (1991), verificou-se que
175 nas endometrites crônicas infiltrativas o epitélio glandular, apresentou maior
176 intensidade da reação imunoistoquímica. Notou-se expressão discreta na parede
177 vascular e células estromais. Já nas endometroses, as células que apresentaram maior
178 grau de expressão foram as do estroma, seguidas pelo epitélio glandular, epitélio
179 luminal e parede vascular.

180 A expressão de MMP-9 (Fig.2) foi constatada em todas as amostras de endométrio
181 eqüino. A marcação imunoistoquímica para este anticorpo Foi difusa por todo o
182 endométrio. Todos os elementos considerados neste estudo apresentaram imuno-
183 reatividade em intensidade predominantemente acentuada.

184 Nos endométrios saudáveis, foi observada marcação positiva para MMP-9 no epitélio
185 glandular e nas células estromais em todas as amostras estudadas. Células inflamatórias
186 mononucleares e epitélio glandular expressaram MMP-9 em 92,3% dos casos. A região
187 da parede vascular foi positiva em 84,61% e o epitélio luminal em 76,92%. As células
188 que marcaram positivamente com maior freqüência nas biópsias foram as do epitélio

189 glandular, seguidas pelas células estromais, células inflamatórias e células endoteliais.
190 As células do epitélio luminal mostraram frequência variável. Quanto à intensidade da
191 reação imunistoquímica para MMP-9, as células endoteliais, inflamatórias e estromais
192 apresentaram grau maior, mostrando-se acentuado, enquanto que o epitélio glandular e a
193 parede vascular mostraram intensidade moderada.

194 Na categoria IIA, células do epitélio glandular, do endotélio, parede vascular e do
195 estroma mostraram imuno-reatividade para MMP-9 em todas as amostras estudadas.
196 Marcação positiva no epitélio luminal e células inflamatórias foi observada em 93,75%
197 dos casos. Os elementos marcados com maior frequência nas biópsias foram o epitélio
198 glandular e as células inflamatórias, seguidos pelas células endoteliais.

199 Na categoria IIB o epitélio glandular, as células endoteliais e as estromais foram
200 positivas em todas as amostras estudadas. As células inflamatórias e o epitélio luminal
201 mostraram imuno-reatividade em 86,67% dos casos, enquanto a região da parede
202 vascular demonstrou reação positiva em 60% dos animais. As estruturas positivas
203 observadas com maior frequência nesta categoria foram as células do epitélio glandular.

204 Na categoria III, epitélio glandular, células endoteliais e estromais positivas para MMP-
205 9 foram observadas em todas as amostras. Epitélio luminal, células inflamatórias e
206 parede vascular mostraram imuno-reatividade em 93,33%, 80% e 73,33% dos casos,
207 respectivamente. As estruturas que expressaram essa enzima mais frequentemente
208 foram as células endoteliais, seguidas pelo epitélio luminal.

209 Quando comparadas as frequências dos diferentes elementos marcados para MMP-9
210 entre as categorias de endométrio, nas células do epitélio glandular, do endotélio
211 vascular e as do infiltrado inflamatório não houve modificações evidentes. No epitélio
212 luminal e na região da parede vascular observou-se que houve diminuição do número de
213 células que demonstraram positividade conforme aumentou o grau de lesão. Já nas
214 células estromais, houve uma diminuição gradativa discreta na quantidade de células
215 positivas entre os endométrios saudáveis e aqueles com lesões discretas e
216 intermediárias, enquanto que amostras da categoria III apresentaram maior quantidade
217 de células que expressaram a enzima, mas ainda em menor número do que os da
218 categoria I.

219 Ao se observar a intensidade da reação imunistoquímica para a enzima MMP-9, ao se
220 comparar cada estrutura nas categorias diversas, observou-se que a parede vascular

221 demonstrou imuno-reatividade menor na categoria IIB quando comparada à categoria
222 IIA. O epitélio luminal e as células endoteliais sempre expressaram intensidade
223 acentuada; já o epitélio glandular mostrou intensidade moderada em todas as categorias.
224 Considerando as células inflamatórias, houve diminuição da intensidade nas
225 endometrites mais graves, incluídas na categoria III. Já nas células estromais, este fato
226 foi observado nos endométrios da categoria IIB. Ao se comparar os elementos dentro de
227 cada categoria, observou-se que na categoria IIA a reatividade foi menor no epitélio
228 glandular. Nas categorias IIB e III os elementos expressos com maior intensidade foram
229 o epitélio luminal, as células endoteliais e as inflamatórias.

230 Nas endometrites crônicas infiltrativas todas as amostras apresentaram imuno-
231 reatividade para MMP-9 em todas as estruturas estudadas, com exceção da parede
232 vascular, que expressou esta enzima em 78,79% dos casos. O epitélio glandular foi a
233 estrutura que demonstrou maior frequência de células positivas, seguido das células
234 endoteliais.

235 Nas endometroses, houve imuno-reatividade para MMP-9 em todas as amostras no
236 epitélio luminal, epitélio glandular, células endoteliais e células estromais. O epitélio
237 glandular apresentou maior frequência de células positivas, seguido pelas células
238 endoteliais, células do infiltrado inflamatório e células estromais.

239 Quando comparados os diferentes elementos estudados entre os endométrios hígidos,
240 com endometrite crônica infiltrativa e endometrose, não foram evidenciadas
241 modificações na frequência de células positivas no epitélio luminal e células endoteliais.
242 Embora no epitélio glandular houvesse predominância da expressão de MMP-9 em
243 quantidade acentuada nos três grupos, notou-se que houve menor número de amostras
244 apresentando essa característica nos grupos acometidos por alterações de ordem
245 inflamatória ou degenerativa, fato também observado nas células estromais. O epitélio
246 glandular do grupo hígido expressou a enzima de forma acentuada em 92,3% das
247 amostras; o que ocorreu em 81% das endometrites crônicas infiltrativas e em 75% das
248 endometroses. Já nas células estromais, não houve diferença entre os grupos com lesões
249 inflamatórias ou degenerativas, mas o número de células que expressaram MMP-9 nos
250 dois grupos foi discretamente menor do que no grupo hígido. Considerando a parede
251 vascular, as endometroses demonstraram menor frequência da marcação para MMP-9
252 do que os endométrios hígidos e nos que prevaleceram as alterações inflamatórias.

DISCUSSÃO

253

254 As metaloproteinases são as principais enzimas que degradam componentes estruturais
255 da matriz extracelular. Além disso, proteólise promovida pelas MMPs pode gerar
256 espaços para a migração celular, produzir fragmentos de especificidade substrato-
257 clivagem com atividade biológica independente, regular a arquitetura tecidual por seus
258 efeitos na matriz extracelular e junções intercelulares, além de ativar, desativar ou
259 modificar a atividade de moléculas sinalizadoras, direta ou indiretamente (Page-McCaw
260 et al., 2007).

261 Nas biópsias endometriais, pode-se verificar uma tendência na diminuição do número
262 de amostras expressando MMP-2 nos endométrios com alterações histopatológicas,
263 estando entre as endometroses o menor percentual de biópsias expressando esta enzima.
264 Ao se observar a intensidade da reação imunoistoquímica, verificou-se que também
265 houve uma tendência na diminuição da positividade nas estruturas pesquisadas em
266 relação aos endométrios saudáveis, exceto no epitélio glandular, que apresentou
267 aumento da marcação positiva nos casos de endometrite, sendo maior na categoria III.
268 Pode-se considerar que o aumento da MMP-2 no epitélio glandular esteja relacionado à
269 diminuição da enzima nos demais compartimentos estudados, mecanismo associado à
270 tentativa do tecido manter os níveis de expressão estáveis. Talvez, esses dados possam
271 estar relacionados ao prognóstico do endométrio, principalmente quando considerado o
272 tipo de enfermidade presente, ou seja, naqueles casos em que há predomínio da reação
273 fibrótica, havendo menor quantidade de MMP-2, entende-se que a atividade
274 colagenolítica estaria ocorrendo em menor escala, no que tange a esta enzima.

275 O aumento na expressão da MMP-2 pelas células epiteliais foi observado anteriormente
276 (Porto, 2006), quando foi sugerido que esse fenômeno pode estar relacionado à
277 modificação da secreção glandular no endométrio das éguas. Um dado interessante
278 verificado por Masseno (2009) foi presença mais evidente de miofibroblastos nas lesões
279 endometriais mais graves. Ainda, o presente estudo demonstrou que células estromais
280 periglandulares positivas para MMP-2 foram observadas, sobretudo nas glândulas
281 dilatadas e fibróticas, corroborando os resultados de Walter et al. (2005). Sabe-se que
282 uma das fontes da metaloproteinase 2 é o miofibroblasto, que na fibrose hepática,
283 sintetiza essa gelatinase na presença de colágeno do tipo I (Arthur, 2000). Os
284 miofibroblastos presentes nas endometroses das éguas podem estar relacionados com a

285 estimulação da produção da matriz extracelular e sua degradação, já que são aptos a
286 produzir citocinas (Walter et al., 2001).

287 As endometrites apresentam maior de deposição do colágeno do tipo I (Evans et al.,
288 1998). Assim, Masseno (2009) deduziu que a indução da produção de MMP-2 pelos
289 miofibroblastos possa ocorrer por mecanismo semelhante àquele relacionado à fibrose
290 hepática. Sabe-se que a MMP-2 é considerada um fator autócrino de proliferação e
291 migração para os miofibroblastos, e além do estímulo promovido pelo TGF- β 1, radicais
292 livres de oxigênio presentes nas doenças hepáticas crônicas levam ao aumento da
293 expressão da enzima. A hiper-expressão contínua de MMP-2 nos miofibroblastos de
294 fígados fibróticos com suas seqüelas na proliferação e migração deste tipo de célula
295 podem estimular a progressão da fibrose (Hemman et al., 2007). Além de degradar as
296 gelatinas, a MMP-2 também pode atuar como colagenase por possuir repetições em sua
297 estrutura semelhantes à fibronectina, o que faz com que apresente afinidade pelo
298 colágeno fibrilar (Page-McCaw et al., 2007).

299 A região da parede vascular mostrou intensa marcação para MMP-2, mas foi ausente
300 nas células endoteliais. Porto (2006) cita que a MMP-2 tem papel preponderante na
301 angiogênese, e que essa marcação pode estar relacionada à presença dos pericitos, fonte
302 de vários mediadores químicos.

303 O aumento da atividade da MMP-2 já foi associado com a fibrose intersticial durante o
304 remodelamento cardíaco. Entretanto, estudos já observaram que o aumento da atividade
305 da MMP-2 foi acompanhado pelo aumento da fibrose cardíaca, o qual se deve
306 provavelmente à proteólise direta dos componentes da matriz do miocárdio, facilitando
307 assim uma resposta pró-fibrótica (Matsusaka et al., 2006).

308 A MMP-2 já foi encontrada na sua forma inativa em fígados saudáveis (Zhou et al.
309 2004), mas Hemmann et al. (2007) citam que no fígado normal o RNAm e a pró-
310 proteína de MMP-2 são dificilmente encontrados, e que quando induzida a fibrose, há
311 um aumento na expressão desse RNAm. Entretanto, a metodologia empregada no
312 presente estudo não é adequada para verificação de atividade enzimática. Outros estudos
313 nesse sentido são necessários. Uma técnica interessante para se investigar a atividade
314 dessa enzima no útero das éguas é a zimografia *in situ* em material submetido à
315 congelação.

316 Hemmann et al. (2007) relatam que a MMP-9 por si não exibe atividade contra o
317 colágeno do tipo I, predominante na fibrose, mas desde que a expressão desta enzima
318 está intensamente aumentada desde o início da fibrólise, admite-se seu envolvimento
319 indireto no processo lítico do colágeno.

320 Os resultados da análise da expressão imunoistoquímica da MMP-9 demonstraram que
321 todas as amostras foram positivas para esta gelatinase. Em todos os grupos,
322 independente da classificação empregada, houve positividade nas células endoteliais e
323 estromais, sempre em grande proporção.

324 Nas doenças inflamatórias intestinais do homem já foi verificado o aumento da
325 expressão de metaloproteinases, entre elas a 2 e a 9, embora a MMP-9 também tenha
326 sido identificada na mucosa intestinal não inflamada. Esse efeito deve-se à atividade
327 leucocitária, sobretudo pela ação da mieloperoxidase liberada por essas células (Meijer
328 et al., 2007).

329 Sabe-se que a MMP-9 está relacionada ao remodelamento vascular, e esse fenômeno
330 está ligado ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). A MMP-9 promove a
331 mobilização do VEGF da matriz extracelular, tornando-o apto a ligar-se ao seu receptor
332 (Page-McCaw et al., 2007). Entretanto, o presente estudo revelou que houve redução da
333 positividade na região da parede vascular para MMP-9 nas endometrites mais graves, o
334 que pode estar correlacionado ao prognóstico menos favorável. Talvez isso não tenha
335 sido evidenciado nas endometroses porque as amostras foram classificadas segundo as
336 alterações predominantes, ou seja, ainda que houvesse infiltrado inflamatório
337 mononuclear proeminente dentre as amostras do grupo das endometrites crônicas
338 infiltrativas, este poderia estar associado à fibrose periglandular em diferentes graus.
339 Essa diminuição na positividade da parede vascular poderia ter relação com o
340 comprometimento da angiogênese, o que levaria ao maior acúmulo de tecido fibroso,
341 menos sensível à diminuição da vascularização. Talvez, o aumento da expressão de
342 MMP-2 na região da parede vascular seja um mecanismo compensatório à diminuição
343 da MMP-9, já que ambas as enzimas pertencem ao mesmo grupo de metaloproteinases.
344 Para confirmação desta hipótese, são necessários estudos que verifiquem a concentração
345 das enzimas ativas neste tipo de alteração endometrial. Isto poderia estar relacionado
346 com o que observou Nunes (2006), ao verificar que nas endometrites crônicas mais
347 graves há maior grau de fibroelastose.

348 A presença de imuno-marcação positiva da MMP-9 nas células epiteliais e inflamatórias
349 já foi verificada em outras espécies. Neste trabalho não pode ser atribuída uma função
350 específica à MMP-9 nesta localização, pois foi amplamente expresso em todos os tipos
351 de endométrio equino pesquisados. Já entre as células inflamatórias, há relatos de que
352 macrófagos e células T são responsáveis pela produção de MMP-9 nos processos
353 inflamatórios (Abraham et al., 2005; Bergin et al., 2005). Abraham et al. (2005) citam
354 que a atividade migratória das células T helper é dependente da atividade de
355 metaloproteinases, sobretudo de MMP-2 e MMP-9, por serem capazes de clivar os
356 componentes da membrana basal vascular. Nguyen et al. (2005) relatam que a
357 infiltração e diferenciação dos monócitos nos tecidos lesionados é dependente de MMP-
358 9. Esse dado pode explicar o resultado obtido por Nunes (2003), que não verificou
359 aumento significativo do número de macrófagos nas endometrites. Entretanto, nos
360 endométrios das éguas, somente a MMP-9, e não a MMP-2, demonstrou imuno-
361 reatividade nas células inflamatórias, e talvez possa estar correlacionada a esse tipo de
362 função. Ainda assim, nas endometroses observou-se que houve diminuição da
363 intensidade da imuno-reatividade para MMP-9. Talvez nas endometroses, onde as
364 células inflamatórias expressando menos MMP-9, haja o comprometimento da atividade
365 migratória dos linfócitos e monócitos, e por isso eles não infiltram o tecido lesionado.
366 Outros fatores podem estar associados à liberação de MMP-9. A presença do fator de
367 necrose tumoral α (TNF- α) está relacionada à progressão das hepatites, e induz a
368 produção de MMP-9, o qual tem relevância na evolução da lesão hepática (Migita et al.,
369 2006). A modulação da expressão da MMP-9 também está relacionada ao TGF- β , o
370 qual exerce a supressão dessa enzima via TNF- α , função atribuída aos monócitos e
371 macrófagos (Ogawa et al., 2004). Nas doenças intestinais inflamatórias crônicas do
372 homem, além do TNF- α , outras citocinas, como a interleucina 1 β (IL-1 β) e o interferon
373 γ (IFN- γ) podem induzir a síntese de MMP-9 (Meijer et al., 2007). Logo, estudos que
374 buscam investigar a presença de outros mediadores químicos nas endometrites crônicas
375 das éguas podem colaborar para a compreensão dos dados obtidos neste trabalho, já que
376 a expressão e a localização da MMP-9 foram definidas. Neste sentido, Ra e Parks
377 (2007) mencionam que a compartimentalização - onde e como a MMP é liberada e
378 mantida no ambiente pericelular - é importante, regulando a especificidade da proteólise
379 e a afinidade da interação com o substrato. Os mesmos autores afirmam ainda que essa

380 informação é importante pelo fato de que as células não liberam proteases
381 indiscriminadamente, já que se encontram ancoradas à membrana celular, resultando na
382 manutenção da alta concentração enzimática local e marcando sua ação catalítica em
383 substratos específicos.

384 Frente aos dados encontrados na literatura, parece que a MMP-2 tem sua função voltada
385 principalmente para os processos fibrogênicos e a MMP-9 relaciona-se sobretudo com
386 as reações inflamatórias. Neste trabalho, talvez a relação da MMP-9 mais evidente nos
387 processos inflamatórios tenha sido demonstrada pela imuno-marcação positiva nas
388 células inflamatórias, o que não foi verificado para a MMP-2, enquanto que a relação
389 mais estreita da MMP-2 com o processo fibrótico no útero das éguas talvez possa ser
390 sugerida pelo aumento da expressão dessa enzima nas glândulas endometriais.

391 A desestabilização tecidual pela atividade proteolítica pode levar à liberação de fatores
392 de crescimento ancorados à matriz extracelular e presentes na superfície celular, com a
393 formação de novas moléculas bioativas. Talvez, considerando este aspecto, seja
394 interessante a identificação da atividade enzimática das metaloproteinases além da inter-
395 relação com outros mediadores químicos, já que este estudo demonstrou a presença e a
396 localização das metaloproteinases 2 e 9, buscando sua relação com os diferentes
397 processos nos diversos graus de lesão presentes no endométrio equino.

398 O conhecimento das inter-relações que ocorrem entre as células, a matriz extracelular e
399 seus sinalizadores fornecem subsídios para que se possa interferir de forma precisa no
400 processo fibrótico do endométrio das éguas, o que poderá interromper a evolução ou
401 mesmo reverter os fenômenos que comprometem a função uterina.

402 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

403 ABRAHAM, M.; SHAPIRO, S.; KARNI, A. et al. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9)
404 are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. *J. Neuroimmunol.*, v.163, p. 157-64,
405 2005.

406 ARTHUR, M.J.P. MMPs and TIMPs in liver fibrosis. *Am. j. Physiol. Gastrointest. Liver*
407 *Physiol.*, v. 279, G245-G249, 2000.

408 BERGIN, P.J.; WEN, S.; PAN-HAMMARSTRÖM, Q. et al. Secretion of matrix
409 metalloproteinase-9 by macrophages, *in vitro*, in response to *Helicobacter pylori*. *Fems*
410 *Immunol. Med. Microbiol.*, v.45, n.2, p.159-69, 2005.

411 DOIG, P.A.; MCKNIGHT, J.D.; MILLER, R.B. The use of endometrial biopsy in the
412 infertile mare. *Can. Vet. J.*, v. 22, p. 72-6, 1981.

413 EVANS, T.J.; MILLER, M.A.; GANJAM, V.K. et al. Morfometric analysis of
414 endometrial periglandular fibrosis in mares. *AJVR*, v.59, n.10, p.1209-14, 1998.

415 HEMMANN, S.; GRAF, J.; RODERFELD, M. et al. Expression of MMPs and TIMPs
416 in liver fibrosis – a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies.
417 *J. Hepatol.*, v.46, p. 955-75, 2007.

418 HOFFMAN, C.; ELLENBERGER, C.; MATTOS, R.C. et al. The equine endometrosis:
419 new insights into the pathogenesis. *Anim. Reprod. Sci.*, v.111, p.261-78, 2009.

420 KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected
421 by biopsy, with a note on early embryonic death. *JAVMA*, v. 172, n. 3, p. 241-62, 1978.

422 KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. *in: MORROW, D.A. (ed.).*
423 *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p.723-9.

424 MASSENO, A.P.B. *Caracterização imunoistoquímica dos miofibroblastos*
425 *endometriais e da expressão de MMP-2 nas endometrites crônicas das éguas.*
426 *Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade*
427 *Estadual Paulista, Botucatu, 2009. 69 p.*

428 MATSUSAKA, H.; IDE, T.; MATSUSHIMA, S. et al. Targeted deletion of matrix
429 metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure
430 overload. *Hypertension*, v.47, p.711-7, 2006.

431 MEIJER, M.J.W.; MIEREMET-OOMS, M.A.C.; VAN DER ZON, A.M. et al.
432 Increased mucosal matrix metalloproteinase-1, -2, -3 and -9 activity in patients with
433 inflammatory bowel disease and the relation with Crohn's disease phenotype. *Digestive*
434 *and Liver Disease*, v.39, p.733-9, 2007.

435 MIGITA, K.; MAEDA, Y.; ABIRU, S. et al. Immunosuppressant FK506 inhibits matrix
436 metalloproteinase-9 induction in TNF- α stimulated human hepatic stellate cells. *Life*
437 *Sci.*, v.78, p.2510-5, 2006.

438 NGUYEN, J.; KNAPNOUGEL, P.; LESAVRE, P. et al. Inhibition of matrix
439 metalloproteinase-9 by interferons and TGF- β 1 through distinct signalings accounts for
440 reduced monocyte invasiveness. *FEBS Letters*, v.579, p. 5487-93, 2005.

441 NUNES, L.C. *Avaliação histopatológica, histoquímica, imunoistoquímica e*
442 *morfométrica das endometrites crônicas em éguas.* *Dissertação (mestrado) – Faculdade*

443 de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
444 108 p.

445 NUNES, L.C. *Expressão de metaloproteinases, TIMP-1 e da esclerose vascular nas*
446 *endometrites crônicas das éguas*. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina
447 Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006. 84 p.

448 OGAWA, K.; CHEN, F.; KUANG, C. et al. Suppression of matrix metalloproteinase-9
449 transcription by transforming growth factor- β is mediated by a nuclear factor- κ B site.
450 *Biochem. J.*, v.381, p.413-22, 2004.

451 PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the
452 regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev., Mol. Cell. Biol.*, v.8, p.221-33, 2007.

453 PORTO, C.D. *Caracterização histoquímica do colágeno e expressão de MMP-2, MMP-*
454 *9 e TIMP-1 nas endometrites crônicas das éguas*. Dissertação (mestrado) – Faculdade
455 de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.
456 102 p.

457 RICKETTS, S.W.; ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of
458 equine chronic endometrial disease. *Equine Vet. J.*, v. 23, 189-92, 1991.

459 SCHOON, H.-A.; SCHOON, D. The category I mare (Kenney and Doig 1986):
460 Expected foaling rate 80-90% - fact or fiction? *Pferdeheilkunde*, v.19, n.6, p.698-701,
461 2003.

462 WALTER, I.; HANDLER, J.; MILLER, I. et al. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2)
463 and tissue transglutaminase (TG 2) are expressed in periglandular fibrosis in horse
464 mares with endometrosis. *Histol. Histopathol.*, v.20, p.1105-13, 2005.

465 WALTER, I.; HANDLER, J.; REIFINGER, M. et al. Association of endometrosis in
466 horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular
467 matrix proteins. *Reproduction*, v.121, p. 581-6, 2001.

468 ZHANG, J.; SALAMONSEN, L.A. In vivo evidence for active matrix
469 metalloproteinases in human endometrium supports their role in tissue breakdown at
470 menstruation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 87, p. 2346-51, 2002.

471 ZHOU, X.; HOVELL, C.J.; PAWLEY, S. et al. Expression of matrix metalloproteinase-
472 2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might
473 contribute to fibrolysis. *Liver Int.*, v.24, p.492-501, 2004.

EXPRESSÃO DE MMP-2 E MMP-9 NAS ENDOMETRITES CRÔNICAS DAS ÉGUAS

[Expression of MMP-2 and MMP-9 in chronic endometritis of mares]

C.D. Porto¹, L.C. Nunes², A.P.B. Masseno¹, J.L. Sequeira^{3,5}, D.E. Oliveira⁴, M.A.

Alvarenga³

Legendas das Figuras

Figura 1. Endométrio equino – categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunoistoquímica para MMP-2. Imuno-reatividade intensa e frequente nas células epiteliais glandulares dilatadas, associadas à fibrose glandular. Presença de marcação heterogênea em algumas glândulas. Objetiva: 10x.

Figura 2. Endométrio equino – categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunoistoquímica para MMP-9. Imuno-reatividade difusa. Reação de intensidade acentuada no epitélio glandular, célula inflamatória (seta) e células estromais superficiais (asterisco). Epitélio luminal com positividade segmentar. Objetiva: 40x.

⁵ Autor para correspondência (*corresponding author*)

FMVZ UNESP Departamento de Clínica Veterinária, Distrito de Rubião Jr, s/n, caixa postal 560, CEP 18618-000, Botucatu, SP. Fone/fax: (14) 3811-6293. E-mail: sequeira@fmvz.unesp.br
Apoio: FAPESP (processos 07/54418-5, 06/61832-7, 06/59287-3)

C.D. Porto, L.C. Nunes, A.P.B. Masseno, J.L. Sequeira, D.E., Oliveira, M.A.,
Alvarenga

Figura 1.

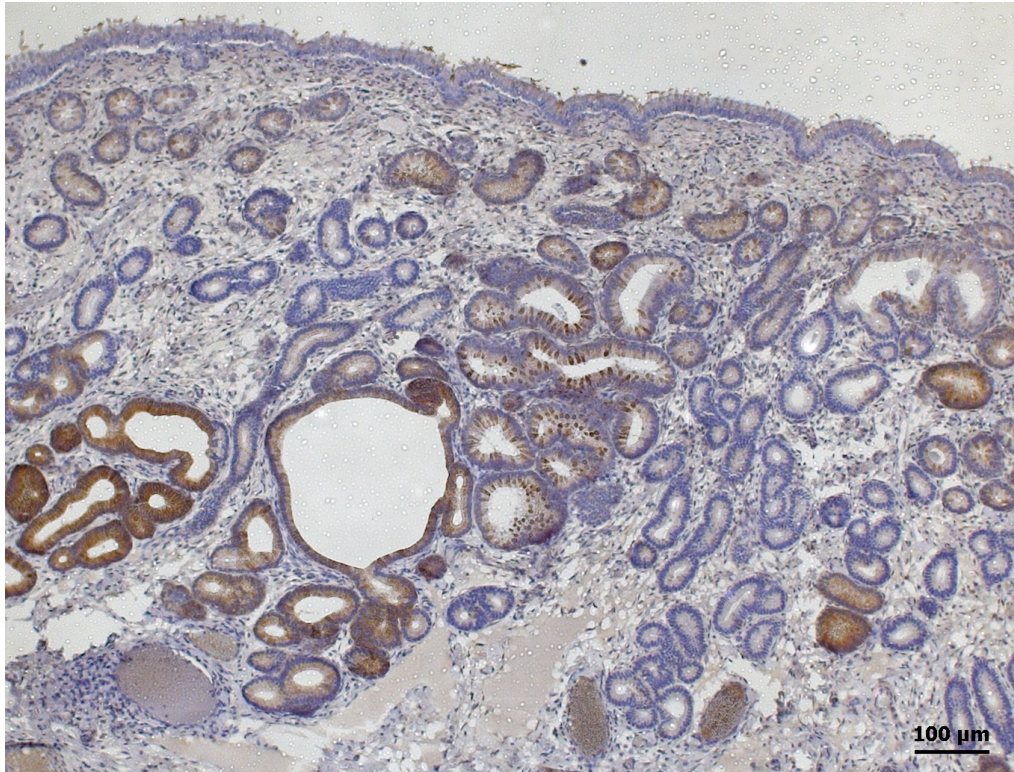
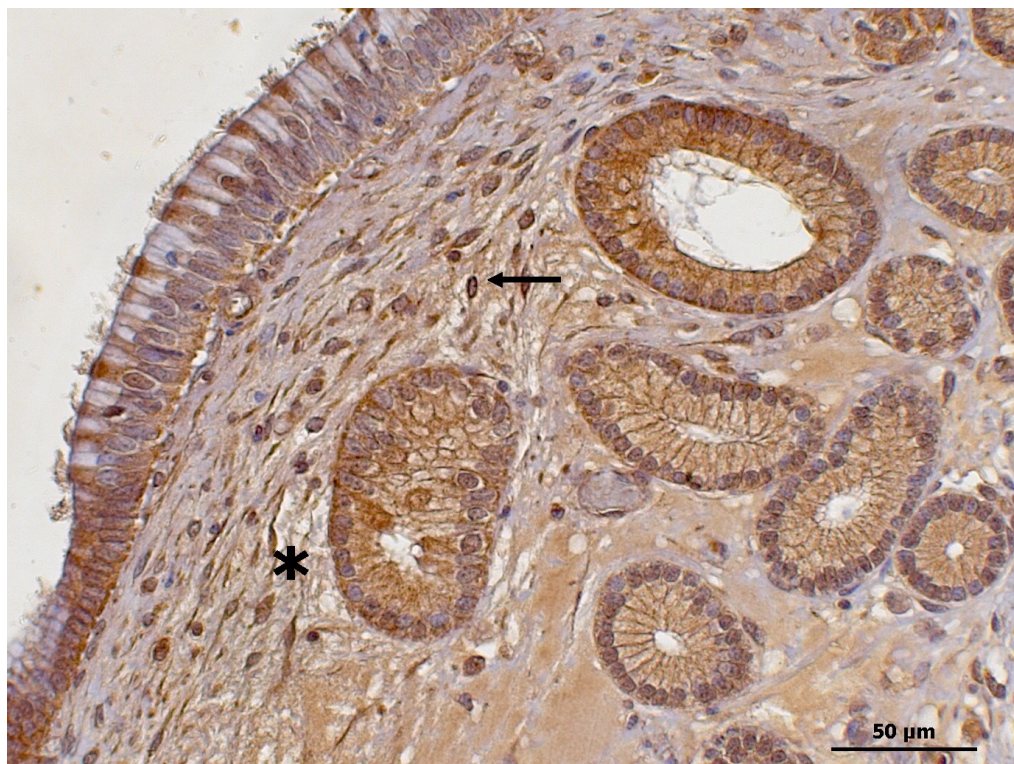


Figura 2.





INSTRUÇÕES AOS AUTORES
ISSN 0102-0935 *versão impressa*
ISSN 1678-4162 *versão online*

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo Científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Elementos do corpo do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões.

Relato de Caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Elementos do corpo do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes).

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo oito páginas impressas, sem distinção dos elementos do corpo do texto especificados para “Artigo Científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

Política editorial

O periódico **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** é editado pela Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia/FEPMVZ-Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins relacionadas com a produção animal. Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). A lista de especialistas que colaboraram em cada volume é publicada no último fascículo do ano. Os trabalhos cujos textos necessitem de revisões ou correções que não puderem ser feitas pelos editores serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista.

Preparação dos manuscritos para publicação

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS: Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em CD-ROM juntamente com uma via impressa em uma só face, espaço entre linhas 1,5, fonte Times New Roman tamanho 12 e 3cm de margens, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua), não excedendo a 15.

TRABALHOS APÓS MODIFICAÇÕES: A versão após as modificações sugeridas deverá ser apresentada em CD-ROM identificado pelo número de registro do trabalho, em editor de texto compatível com o “Word for Windows”, sem formatação do texto, juntamente com uma cópia impressa com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster’s Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa.

Citações bibliográficas

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT-NBR – 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na seqüência do texto. Quando os nomes dos

autores forem parte integrante do texto menciona-se a data da publicação citada entre parênteses, logo após o nome do autor, conforme exemplos:

autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971) ; (Anuário..., 1987-88) ou Anuário... (1987-88)

dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)

mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971) ; Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente.

Citação de citação (Adaptação da ABNT-NBR 10520 feita pela FEPMVZ-Editora). Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Entretanto, nem sempre é possível. Nesse caso, pode-se reproduzir informação já citada por outros autores. Pode-se adotar o seguinte procedimento:

no texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor do documento consultado;

na listagem de referência deve-se incluir a referência completa da fonte citada e outra referência da fonte consultada (citar as 2 referências em separado) não usar o apud como manda a NBR 10520. (Adaptação FEPMVZ-Editora).

Comunicação pessoal (ABNT-NBR 10520). Não fazem parte da lista de referências, sendo colocadas apenas em nota de rodapé. Coloca-se o sobrenome do autor seguido da expressão “comunicação pessoal”, a data da comunicação, nome, estado e país da Instituição ao qual o autor é vinculado..

Documento eletrônico (ABNT – NBR 6023). Faz parte da lista de referências bibliográficas onde se deve colocar o endereço eletrônico e a data de acesso.

TIPOS DE TRABALHOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

Artigo Científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Elementos do corpo do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões.

Relato de Caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Elementos do corpo do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes).

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo oito páginas impressas, sem distinção dos elementos do corpo do texto especificados para “Artigo Científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

CARACTERÍSTICAS DOS ELEMENTOS DE UM TRABALHO

TÍTULO. Em português e em inglês e vice-versa. Evitar termos não significativos como estudo, exame, análise etc. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

AUTORES. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

RESUMO e ABSTRACT devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

PALAVRAS-CHAVE e KEYWORDS. No máximo cinco.

INTRODUÇÃO. Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS. Técnicas e procedimentos de rotina devem ser apenas referenciados. Não se aceitam subtítulos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO. Os resultados poderão ser apresentados como um elemento do texto ou juntamente com a discussão, em texto corrido ou mediante ilustrações. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. Comparações, quando pertinentes, devem ser feitas de forma que o leitor chegue às suas próprias conclusões.

Ilustrações são tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) de onde foi extraída. A referência bibliográfica completa relativa à fonte da ilustração deve figurar na lista bibliográfica final. As despesas de impressão de ilustrações coloridas correrão por conta dos autores.

Tabela. O termo refere-se ao conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Serão construídas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. O termo refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. Os desenhos, gráficos etc. devem ser feitos com tinta preta, bem nítidos. As fotografias, no tamanho de 10 ´ 15cm, devem ser bem nítidas e de bom contraste, ambos indicando no verso a orientação para impressão, nome do autor e a qual figura se refere. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. Chama-se a atenção para as proporções entre letras, números e dimensões totais da figura: caso haja necessidade de redução, esses elementos também serão reduzidos e podem ficar ilegíveis. Assim, é bom que o tamanho dos desenhos apresentados pelos autores se aproxime do tamanho final impresso. Além de impressas, quando pertinente, devem ser enviadas em arquivo separado, extensão .jpg.

CONCLUSÕES. As conclusões podem estar inseridas na discussão. Neste caso este item não é necessário. As conclusões não devem ser repetição dos resultados. Lembrar que nem sempre são necessárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. Relacionam-se, em ordem alfabética, as referências bibliográficas, incluindo todas as fontes utilizadas. São adotadas as normas ABNT-NBR-6023 – agosto de 2002, simplificadas conforme exemplos:

periódicos

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

publicação avulsa

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97.(Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.
SOUZA, C. F. A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DOCUMENTOS ELETRÔNICOS

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-Related-Articles/>>. Acessado em: 5 dec. 1994.

Envio dos trabalhos

Os trabalhos para publicação deverão ser encaminhados ao

FEP MVZ Editora

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Caixa Postal 567

30123-970 - Belo Horizonte, MG

Telefone: 0055 21 31 3409 2041

Telefax: 0055 21 31 3409 204

e-mail: revista@vet.ufmg.br

TAXAS DE PUBLICAÇÃO

TAXA DE SUBMISSÃO: O autor, ao submeter o artigo, deverá apresentar um comprovante de depósito no valor de R\$30,00 na conta da FEP-MVZ Editora (Ag. 3610-2; Conta 921482-8; Banco do Brasil) referente à taxa de submissão juntamente com os dados para emissão da nota fiscal (Nome ou Razão Social, CPF ou CNPJ, Endereço).

TAXA DE PUBLICAÇÃO: A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores.

© 2001-2009 Escola de Veterinária UFMG

Caixa Postal 567

30123-970 Belo Horizonte MG Brasil

Tel.: +55 31 3409-2041

Telefax: +55 31 3409-2042



journal@vet.ufmg.br

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)