

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA E IMUNO-  
HISTOQUÍMICA DAS ALTERAÇÕES FIBRÓTICAS NAS  
ENDOMETROSES DAS ÉGUAS**

LEONARDO DOURADO DA COSTA

BOTUCATU – SP

Maio, 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA E IMUNO-  
HISTOQUÍMICA DAS ALTERAÇÕES FIBRÓTICAS NAS  
ENDOMETROSES DAS ÉGUAS**

LEONARDO DOURADO DA COSTA

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Patologia Veterinária.

**Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira**

BOTUCATU – SP

Maio, 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM. DIVISÃO  
TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP BIBLIOTECÁRIA  
RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Costa, Leonardo Dourado da.

Caracterização histoquímica e imuno-histoquímica das alterações  
fibróticas nas endometroses das éguas / Leonardo Dourado da Costa.  
- Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Julio Lopes Sequeira  
Capes: 50503006

1. Imuno-histoquímica. 2. Endometrose. 3. Égua - Doenças. 4.  
Miofibroblastos. 5. Colágeno. 6. Infecundidade em animais.

Palavras-chave: Colágeno; Égua; Endometrose;  
Imuno-histoquímica; Miofibroblastos.

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
LEONARDO DOURADO DA COSTA**

**Comissão da Banca Examinadora**

---

**Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira**

---

**Profa. Dra. Louisiane de Carvalho Nunes**

---

**Prof. Ass. Dr. Alexandre Hataka**

Botucatu, 27 de Maio de 2015.

## DEDICATÓRIA

A Deus, por me dar sabedoria, paciência e saúde para vencer os desafios.  
À minha família, pelo apoio incondicional.  
Ao meu orientador, Prof. Julio Lopes Sequeira, pela oportunidade e ensinamentos.

“Apenas busquem o conhecimento.”  
***Edgar Turin Biloux***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me abençoar, me dar força e a calma necessárias para enfrentar os obstáculos e superá-los.

Ao meu orientador, Prof. Julio Lopes Sequeira, por ter aceitado me orientar e por ser tão paciente e conselheiro.

À minha mãe, pelo exemplo de amor e carinho, pela educação e esforço em todos os sentidos para que eu chegasse até aqui.

Ao meu pai (*in memorian*), que sempre me deu incentivo e estímulo a buscar o conhecimento e a disciplina.

Aos meus irmãos Thiago e Alexandre, meus parceiros, meus ídolos, pela amizade e pelos encontros musicais sempre demais.

À minha querida namorada Marianne, pelo amor verdadeiro, cumplicidade, companheirismo e pelos planos de vida que sonhamos em realizar.

Aos meus tios, tias, primos e vovó Maria, e aos meus padrinhos Sebastião e Deuza, pelo apoio incondicional nos momentos mais delicados e pelos encontros sempre prazerosos e únicos.

Aos Professores do Setor de Patologia Veterinária da UNESP/FMVZ, Prof. Hataka, Profa. Renée e Profa. Noeme pelo coleguismo, prestatividade e convivência agradável.

Ao Prof. Marco Antônio Alvarenga, por ceder amostras gentilmente, contribuindo muito com a nossa pesquisa.

Ao Prof. José Pantoja e seu orientado Fabio Sussai, que nos auxiliaram na análise estatística da pesquisa.

A Profa. Maria Cecília Rui Luvizotto, por ter me guiado até esse caminho e, sobretudo, pela amizade e carinho.

À minha sogra querida Maria Luiza, aos meus cunhados Marielle, Julianna, Henrique, Márcio e meu sobrinho Lucas, pelo imenso carinho, receptividade e pelas viagens inesquecíveis que fizemos juntos.

Aos meus grandes amigos de infância, a famosa Galera da Rua, a galera mais maneira desse meu Brasil: César, Pedro, Lucas, Victor, Vinício, Giovanni, Filipe, Mateus, Rafael, Magnum, André “Dekinha”, Renato e Boreno.

Aos meus amigos e colegas Hugo, Fabrizio, Marcela Marcondes, Nathalia e Clarice, pela parceria e pela confiança que depositam em mim.

Aos meus colegas de Pós Graduação, em especial Talita, Juarez, Luga, Diogo, Claudia, Sarah, Priscila, Mariana, Leandro Maia e Carol, e funcionários da Patologia, Val, Maury e Claudinei, pela amizade, por me receberem muito bem e me ajudarem nessa jornada.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pelo acolhimento e excelente qualidade estrutural e profissional.

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida para a realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido para a aquisição de recursos para execução do experimento.

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Anticorpos primários utilizados para a técnica imuno-histoquímica e suas especificações.....	16
<b>TABELA 2.</b> Número de casos e respectiva porcentagem de acordo com a classificação das endometroses de Hoffmann et al. (2009b).....	19
<b>TABELA 3.</b> Número de casos de cada parâmetro avaliado e a respectiva porcentagem em relação aos tipos de endometrose.....	31

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Secções histológicas de endométrio equino. (A) Endometrose ativa. Glândulas circundadas por células estromais fibróticas que exibem núcleo ovoide, amplo e hipocromático e citoplasma pálido. (B) Endometrose ativa destrutiva. Células estromais fibróticas com focos de invasão glandular, resultando em necrose focal de células epiteliais (setas) e túbulos glandulares tortuosos. (C) Endometrose inativa. Ninho glandular circundado por células estromais fibróticas, com núcleo hiperchromático e alongado, arranjadas paralelamente ao eixo das glândulas adjacentes. (D) Endometrose inativa destrutiva. Glândulas isoladas circundadas por células estromais fibróticas inativas, associado à necrose de células epiteliais individuais (setas). HE.....19
- FIGURA 2.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa destrutiva. Notam-se fibras colágenas espessas dissecando os túbulos glandulares. Tricrômico de Masson.....20
- FIGURA 3.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose inativa. Ninho fibrótico evidenciando dilatação glandular cística com fibras colágenas delgadas por entre os túbulos. Tricrômico de Masson.....21
- FIGURA 4.** Fotomicrografia de endométrio equino. Fibrose estromal difusa. Deposição acentuada de fibras colágenas azuladas, com conseqüente diminuição de densidade glandular. Tricrômico de Masson.....21
- FIGURA 5.** Fotomicrografia de endométrio equino. Fibrose estromal difusa. Predominância de fibras colágenas densas (alaranjadas) depositadas no estrato esponjoso. Picrosirius Red sob luz polarizada.....22

- FIGURA 6.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa. Ninho fibrótico com predomínio de fibras colágenas do tipo frouxo (esverdeado) por entre os túbulos glandulares. Notam-se discretas fibras alaranjadas. Picrosirius Red sob luz polarizada.....23
- FIGURA 7.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose inativa destrutiva. Ninho fibrótico com predomínio de fibras colágenas do tipo denso (alaranjada). Picrosirius Red sob luz polarizada.....24
- FIGURA 8.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa destrutiva. Membrana basal apresentando espessamento principalmente na porção de invaginação do túbulo glandular. PAS.....25
- FIGURA 9.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose inativa. Nota-se membrana basal sem alteração de espessamento. PAS.....25
- FIGURA 10.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa destrutiva. Imunomarcação discreta para colágeno tipo I em ninho fibrótico. Contracoloração: Hematoxilina.....27
- FIGURA 11.** Fotomicrografia de endométrio equino. Mesmo ninho fibrótico demonstrado na figura anterior. Marcação imuno-histoquímica acentuada para colágeno tipo III. Contracoloração: Hematoxilina.....28
- FIGURA 12.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endométrio hígido. Marcação imuno-histoquímica do colágeno tipo IV restrito à membrana basal dos túbulos glandulares e de vasos sanguíneos. Contracoloração: Hematoxilina.....29
- FIGURA 13.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa. Imunoexpressão de colágeno tipo IV compondo a membrana basal sem descontinuidades. Contracoloração: Hematoxilina.....29

**FIGURA 14.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa destrutiva. Fibras de colágeno tipo IV da membrana basal com áreas de descontinuidade. Contracoloração: Hematoxilina.....30

**FIGURA 15.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose inativa. Imunomarcção discreta de uma monocamada de miofibroblastos positivas para  $\alpha$ -SMA. No canto inferior direito, vaso sanguíneo demonstrando positividade imuno-histoquímica. Contracoloração: Hematoxilina.....32

**FIGURA 16.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa destrutiva. Imunomarcção intensa de múltiplas camadas de miofibroblastos, positivas para  $\alpha$ -SMA. Contracoloração: Hematoxilina.....32

**FIGURA 17.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa destrutiva. Comparativo entre técnicas imuno-histoquímicas e Picrosirius Red sob luz polarizada. (A) Colágeno tipo I: imunomarcção positiva em todo o tecido fibrótico que envolve o ninho, com intensidade acentuada na região delimitadora e na porção central interna. (B) Colágeno tipo III: expressão positiva uniformemente acentuada em todo o ninho fibrótico. (C) Picrosirius Red sob luz polarizada: fibras amareladas de colágeno denso na região central e periférica, correspondentes à imunomarcção de colágeno tipo I. Fibras esverdeadas de colágeno frouxo predominantes no ninho fibrótico, refletindo o observado na imuno-histoquímica do colágeno tipo III. (D)  $\alpha$ -SMA: Imunomarcção acentuada de cinco camadas de miofibroblastos. Revelação: DAB, contracoloração com Hematoxilina.....34

**FIGURA 18.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose inativa destrutiva. Comparativo entre técnicas imuno-histoquímicas e Picrosirius Red sob luz polarizada. (A) Colágeno tipo I: imunomarcção positiva acentuada em todo o ninho fibrótico. (B) Colágeno tipo III: positividade mais intensa na área central do ninho fibrótico. Nas demais regiões do ninho, a positividade é discreta. (C) Picrosirius Red sob luz polarizada: predomínio de fibras amareladas de colágeno denso ao redor dos túbulos glandulares, correspondentes à imunomarcção de colágeno tipo I. Fibras esverdeadas de colágeno frouxo discretas no ninho fibrótico, coincidindo com o imunomarcção do colágeno tipo III. Picrosirius Red. (D)  $\alpha$ -SMA: Imunoexpressão discreta de células que circundam o ninho fibrótico. Revelação: DAB, contracoloração com Hematoxilina.....35

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Análise de concordância entre as técnicas imuno-histoquímicas dos tipos de colágeno e técnica histoquímica de Picrosirius Red sob luz polarizada.....	52
<b>ANEXO 2.</b> Análise de concordância entre as técnicas imuno-histoquímicas dos tipos de colágeno e $\alpha$ -SMA.....	53
<b>ANEXO 3.</b> Intervalos de valores do coeficiente Kappa e respectivas qualidades de concordância.....	54

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	3
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	10
3.1. Objetivo geral.....	10
3.2. Objetivos específicos.....	11
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	11
4.1. Procedência do material.....	11
4.2. Processamento e análise histológica.....	11
4.2.1. Técnicas histoquímicas.....	12
4.2.1.1. Tricrômico de Masson.....	12
4.2.1.2. Picrosirius Red.....	13
4.2.1.3. Ácido Periódico de Schiff (PAS).....	14
4.2.2. Técnicas imuno-histoquímicas.....	14
4.3. Análise estatística.....	17
<b>5. RESULTADOS</b> .....	17
5.1. Avaliação histopatológica das endometroses.....	17
5.2. Avaliação histoquímica.....	20
5.2.1. Tricrômico de Masson.....	20
5.2.2. Picrosirius Red.....	22
5.2.3. Ácido Periódico de Schiff (PAS).....	24
5.3. Avaliação imuno-histoquímica.....	26
5.3.1. Colágenos.....	26
5.3.1.1. Colágeno tipo I.....	26
5.3.1.2. Colágeno tipo III.....	26
5.3.1.3. Colágeno tipo IV.....	28
5.3.2. Alfa-actina de músculo liso.....	30
5.3.3. Índice de concordância entre as técnicas imuno-histoquímicas e o Picrosirius Red sob luz polarizada.....	33
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	36
6.1. Considerações finais.....	42
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	43
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>9. ANEXOS</b> .....	52
<b>10. ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	55

## RESUMO

**COSTA, L.D. Caracterização histoquímica e imuno-histoquímica das alterações fibróticas nas endometroses das éguas.** 2015. 69p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

A endometrose é uma alteração degenerativa das glândulas uterinas e do estroma circundante, caracterizada pelo arranjo periglandular de miofibroblastos e a deposição de matriz extracelular (ECM). O presente trabalho objetivou avaliar a expressão de colágeno tipo I, III e IV e  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) nas endometroses equinas, procurando esclarecer a participação dos miofibroblastos na progressão destes processos. Foram utilizadas 24 biópsias uterinas com diagnóstico de endometrose, recebidas pelo Serviço de Patologia Veterinária e de Reprodução Animal da FMVZ, UNESP, Botucatu, SP. Cortes histológicos foram submetidos às técnicas histoquímicas de Tricrômico de Masson, Picrosirius Red sob luz polarizada e Ácido Periódico de Schiff (PAS) e imuno-histoquímicas para os três tipos de colágeno citados e  $\alpha$ -SMA. Ainda, traçou-se um paralelo entre a técnica de Picrosirius Red e a imunomarcagem dos colágenos tipos I e III. A análise histológica revelou que as fibras de colágeno denso correspondem ao colágeno tipo I, predominantes nas endometroses inativa e inativa destrutiva. As fibras de colágeno frouxo correspondem ao colágeno tipo III, predominantes nas endometroses ativas e ativas destrutivas. Nestes mesmos processos, a membrana basal revelou espessamento, aparentemente não relacionado ao colágeno tipo IV, e uma maior imunomarcagem de miofibroblastos periglandulares em relação às endometroses inativa e inativa destrutiva. Desta forma, nota-se que os miofibroblastos estão relacionados ao aumento na deposição de colágeno tipo III nos ninhos fibróticos ativos.

**Palavras-chave:** endometrose, égua, colágeno, miofibroblastos, imuno-histoquímica.

## **ABSTRACT**

**COSTA, L.D. Histochemical and immunohistochemical characterization of fibrotic changes in mares endometrosis.** 2015. 69p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

Endometrosis is a degenerative change of the uterine glands and surrounding stroma, characterized by periglandular arrangement of myofibroblasts and deposition of extracellular matrix (ECM). The aim of this study was evaluate the expression of collagen type I, III and IV and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in equine endometroses, and investigate the role of myofibroblasts in the progression of these processes. A parallel was made with histochemical techniques of Masson's trichrome, Picrosirius Red under polarized light and Periodic Acid-Schiff (PAS). Twenty four uterine biopsies received by the Veterinary Pathology Service and Animal Reproduction of FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, were diagnosed with endometrosis. Histological analysis revealed that the orange dense collagen fibers correspond to type I collagen, being prevalent in inactive and inactive destructive endometrosis. And the green loose collagen fibers correspond to type III collagen, and are predominant in active and active destructive endometrosis. In the same processes, a greater amount of periglandular myofibroblasts were observed in comparison to inactive and inactive destructive endometrosis. The presence of these cells in active processes are strongly related to an increased deposition of collagen type III in fibrotic nests. Regarding the basement membrane, the active destructive and active endometrosis shows thickening, apparently not related to an increase in expression of type IV collagen. The active destructive and inactive destructive endometrosis exhibited disruption areas in type IV collagen fibers. Thus, it is noted that the myofibroblasts are related to increased deposition of type III collagen in active fibrotic nests.

**Keywords:** endometrosis, mares, collagen, myofibroblasts, immunohistochemistry.

## 1. INTRODUÇÃO

A endometriose é uma alteração degenerativa das glândulas uterinas e do estroma circundante, associada à idade e diretamente relacionada com problemas de fertilidade em éguas (SCHOON et al., 1992). O arranjo periglandular de miofibroblastos e a deposição de matriz extracelular (ECM) são características importantes da endometriose (WALTER et al., 2005). Durante o desenvolvimento destes processos, os fibroblastos expressam vários fatores de diferenciação musculares, como alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), tropomiosina e desmina, que foram, portanto, identificados como miofibroblastos (SAPPINO et al., 1990; SCHMITT-GRAF et al., 1994). Além disso, estas células expressam também várias proteínas da ECM, como fibronectina, laminina, colágeno tipo IV e tenascina (BERNDT et al., 1994; HANAMURA et al., 1997).

Segundo alguns autores, na endometriose a fibrose do tecido periglandular não é caracterizada por um aumento da presença de fibras de colágeno, mas pelo arranjo periglandular de fibroblastos, que expressam  $\alpha$ -SMA e produzem proteínas da matriz extracelular, dispostos em uma ou mais camadas (WALTER et al., 2001). Estes resultados contrastam com dados anteriores obtidos utilizando-se a técnica de Picrosirius Red sob luz polarizada, que identificou aumento na quantidade de colágeno periglandular endometrial (EVANS et al., 1998). Porém, em ambos os trabalhos as células que compunham o tecido fibrótico periglandular na endometriose apresentaram características de miofibroblastos (EVANS et al., 1998; WALTER et al., 2001).

Uma hipótese concebida para a patogênese da endometriose baseia-se nos achados morfológicos e estabelece as fases de evolução do processo fibrótico, denominando-as, de forma sequencial, como fibrose ativa, fibrose ativa destrutiva, fibrose inativa e fibrose inativa destrutiva (HOFFMANN et al., 2009b). Algumas destas etapas da progressão do processo fibrótico endometrial estão de acordo com observações anteriores de outros autores (BORDER & NOBLE, 1994; RAILA, 2000).

Um estudo utilizando as técnicas de Picrosirius Red sob luz polarizada e imuno-histoquímica identificou a deposição de colágeno denso nas lesões classificadas como endometrioses inativas, associadas à expressão fraca para

$\alpha$ -SMA pelas células estromais que circundam as glândulas endometriais, sugerindo a correlação entre o tipo de colágeno presente e o fenótipo das células estromais (MASSENO, 2012). No entanto, ainda não existem dados sobre tipificação do colágeno presente nos diferentes tipos de lesão associadas à patogênese da endometrose.

O presente trabalho objetiva avaliar as lesões fibróticas endometriais, identificando o tipo de colágeno presente e a participação dos miofibroblastos nos tipos de endometrose propostos por Hoffmann et al (2009b), procurando estabelecer a relação entre a matriz e os tipos celulares em cada etapa do processo.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

As endometrites clínica e subclínica são as principais causas de redução da eficiência reprodutiva nas éguas (AITKEN, 2012), e, levam a grandes perdas econômicas na criação de equinos (WITTE et al., 2012).

A biópsia endometrial tem sido utilizada como um indicador da saúde uterina e da fertilidade (LUDWIG et al., 2001; SCHLAFER, 2007), tendo sido sugerido que os processos patológicos endometriais estão correlacionados com a susceptibilidade à infecção persistente do endométrio (WOODWARD et al., 2012; TROEDSSON et al., 1993).

Por quase 30 anos, as técnicas de biópsia de endométrio foram empregadas como parte da rotina de avaliação do trato reprodutivo de éguas subférteis, sendo a fibrose e a inflamação as principais características patológicas observadas nesse tipo de material (GANJAM & EVANS, 2006). Nos primeiros sistemas de classificação, as amostras foram classificadas de acordo com os graus de fibrose periglandular e inflamação endometriais (KENNEY, 1978). Mais tarde estes sistemas foram modificados estabelecendo-se os graus I, IIA, IIB e III, correspondentes à lesão mínima, leve, moderada e grave de fibrose periglandular endometrial, respectivamente (KENNEY & DOIG, 1986).

Portanto, levando em consideração alterações histopatológicas inflamatórias ou degenerativas, o endométrio equino pode ser classificado em quatro categorias de acordo com a presença, distribuição e intensidade das lesões observadas (KENNEY & DOIG, 1986). Neste sistema, quanto maior o

grau de classificação da biópsia, menor é a probabilidade do endométrio suportar uma gestação.

Dentre as lesões frequentemente identificadas nas biopsias endometriais estão as alterações degenerativas (KENNEY & DOIG, 1986; SNIDER et al., 2011). Estas, embora não necessariamente irreversíveis, tendem a ser progressivas e contribuem para o declínio do potencial de fertilidade (LEHMANN et al., 2011). O termo endometrose foi cunhado inicialmente por Kenney (1978), e define a cronicidade das alterações degenerativas endometriais vistas em equídeos (GANJAM & EVANS, 2006) e mais especificamente, é definida como fibrose grave seguida por dilatação cística das glândulas endometriais (HOFFMANN et al., 2009a).

A fibrose é um dos principais elementos da reação tecidual endometrial (MASSENO, 2009). Para que se entenda o mecanismo patológico da fibrose, é necessário que, primeiramente, se compreenda o funcionamento normal dos mecanismos da interação célula-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).

No endométrio equino, os fibroblastos que circundam as glândulas uterinas fibróticas nas endometroses mostram forte imuno-reatividade para  $\alpha$ -SMA (MAMBELLI et al., 2012). Mais ainda, glândulas císticas são circundadas por uma camada de células positivas para esta proteína (WALTER et al., 2001). Estas células, chamadas de miofibroblastos, são responsáveis pelas principais características da fibrose ativa por sua capacidade de expressar níveis elevados de citocinas fibrogênicas/inflamatórias e proteínas da matriz extracelular, como fibronectina, laminina, colágeno tipo IV e tenascina (THANNICKAL, 2012; MASSENO et al., 2010).

A presença de células com características de miofibroblastos havia sido descrita anteriormente nas amostras de endométrio equino fibrótico examinadas por microscopia eletrônica de transmissão (EVANS et al., 1998). Os miofibroblastos contribuem para a alteração das propriedades do tecido afetado, havendo evidências de que a produção de colágeno pelos fibroblastos seja uma consequência da diferenciação destes em miofibroblastos (PETROV et al., 2002). Além disso, estas células são reconhecidas como fonte de colágeno tipo I (ZHANG et al., 1994). No endométrio equino fibrótico, mais

especificamente nos quadros de endometriose, células que expressam características de miofibroblastos são observadas ao redor de glândulas dilatadas e não dilatadas, sendo uma incógnita a sua função nestes casos, já que não está claramente definido a partir de que estágio da lesão elas são observadas (MASSENO et al., 2010).

Na endometriose, ocorre a substituição gradativa do colágeno com distribuição reticular, predominante no endométrio sadio, pelo colágeno denso, conforme aumenta o grau das lesões endometriais, preferencialmente na região periglandular (PORTO, 2006; NUNES, 2006). No endométrio equino, o colágeno denso predomina quando graus de lesão são mais acentuados, principalmente nas lesões fibróticas periglandulares, sendo acompanhada pelo aumento do número de células que expressam  $\alpha$ -SMA (MASSENO, 2009). Embora se possa admitir a função de suporte exercida pelos miofibroblastos localizados ao redor de glândulas dilatadas e fibróticas, sua função ao redor de estruturas glandulares não dilatadas permanece desconhecida (HOFFMANN et al., 2009b; MASSENO, 2012). De qualquer forma, o comprometimento das estruturas glandulares pelo processo fibrótico endometrial altera seu funcionamento e, conseqüentemente, diminui a capacidade do animal de levar a gestação a termo (LEHMANN et al., 2011; KILGENSTEIN et al., 2015).

A etiologia e a patogenia da endometriose são desconhecidas. Uma hipótese para a patogênese da endometriose foi descrita por Hoffmann et al. (2009b), que propuseram e descreveram, morfológicamente, as fases de evolução do processo fibrótico. Algumas destas etapas da progressão do processo fibrótico endometrial estão de acordo com observações anteriores de outros autores (BORDER & NOBLE, 1994; RAILA, 2000). Estas etapas são denominadas de fibrose ativa, fibrose ativa destrutiva, fibrose inativa e fibrose inativa destrutiva (HOFFMANN et al., 2009b).

As fibroses ativas caracterizam-se pela presença de células estromais fibróticas metabolicamente funcionais, apresentando núcleo ovoide e hipocromático, e citoplasma pálido, ao redor de uma ou múltiplas glândulas endometriais. Nas fibroses inativas, observam-se células estromais metabolicamente afuncionais, com núcleo fusiforme e hiperchromático, e citoplasma escasso e alongado, arranjadas paralelamente ao eixo da glândula adjacente. A classificação como endometriose ativa destrutiva ou inativa

destrutiva implica da invasão do lúmen glandular pelas células estromais, resultando em degeneração e necrose de células epiteliais individuais (HOFFMANN et al., 2009b). Estas alterações estão diretamente relacionadas à manutenção e progressão do processo fibrótico (HINZ et al., 2007; THANNICKAL, 2012).

Hoffmann et al. (2009b) sugeriram que a proliferação de células estromais e sua diferenciação em miofibroblastos, assim como o aumento da síntese de ECM, respondem à ação sinérgica e auto-induzida de mediadores, resultando em fibrose periglandular. Além disso, a capacidade dos miofibroblastos para liberar várias enzimas que regulam a homeostase da ECM pode contribuir para a destruição progressiva da lâmina basal, resultando em um acúmulo dessa matriz, o que por sua vez é capaz de manter o processo fibrótico (HINZ et al., 2007, WALTER et al., 2001). Ademais, Hanada et al. (2014) postularam que a presença de células epiteliais degeneradas ou necróticas se deve, principalmente, ao dano causado à membrana basal, resultando em contato direto entre as células estromais e epiteliais, bem como a interações entre a ECM fibrótica e células epiteliais glandulares. Ainda, Thannickal (2012) postulou que o aumento do número de miofibroblastos nas lesões fibróticas pode ocorrer devido a inibição da apoptose destas células. A partir da interação desses diversos fatores, a concomitância do processo de endometrite seria uma das causas da ativação metabólica das células estromais fibróticas (HOFFMANN et al., 2009b).

Desta forma, ocorreriam em sequência as etapas denominadas de fibrose ativa e fibrose ativa destrutiva, que resultariam na fibrose estromal característica da endometrose. Porém, os fatores envolvidos e o nível de participação de cada um no processo de endometrose não estão completamente estabelecidos (SNIDER et al., 2011; LEHMANN et al., 2011).

Para a avaliação do tecido conjuntivo, um método histoquímico utilizado na identificação e graduação da fibrose endometrial é o Tricrômico de Masson. Embora as fibras colágenas sejam geralmente bem coradas por este método, ele não realça adequadamente o colágeno estromal endometrial (BLANCHARD, et al., 1987; CALDINI, 1992; PORTO, 2006).

Outro método histoquímico utilizado é o Picrosirius Red, que diferencia os tipos de colágeno pela birrefringência das fibras em microscópio óptico de

luz polarizada. Assim, diferentes tonalidades são observadas conforme o tipo de arranjo molecular presente (JUNQUEIRA et al., 1978; MONTES & JUNQUEIRA, 1991). O emprego deste método associado à análise morfométrica permitiu correlacionar a fibrose periglandular com o grau histológico da lesão (EVANS et al., 1998). Assim, o colágeno pode ser observado como fibras delgadas de coloração esverdeada, que exibem birrefringência fraca e predominam no endométrio categoria I; ou pode ser caracterizado por fibras espessas, amareladas ou avermelhadas, de birrefringência mais intensa que substituem gradativamente as primeiras nos quadros de fibrose (NUNES, 2003).

Em secções histológicas de cinco a sete micrômetros de espessura, as diferentes tonalidades e intensidades de birrefringência exibidos pelos colágenos I, II e III são explicadas pela diferença entre seus padrões físicos de agregação (JUNQUEIRA et al., 1979). O método se comprovou muito útil para o estudo da distribuição das fibras de colágeno nos cortes histológicos normais e patológicos. Entretanto, no início do desenvolvimento do método, ficou evidente que a espessura do corte histológico é de grande importância na cor e intensidade da birrefringência exibida pelo colágeno. Essa é a razão pela qual não se correlacionou uma especificidade entre a coloração de Picrosirius Red e os diferentes tipos de colágeno (JUNQUEIRA et al., 1979).

Estudos com microscopia eletrônica mostraram que o colágeno tipo I forma fibras grosseiras, compostas por fibrilas espessas densamente agrupadas, enquanto o colágeno tipo III forma fibras delgadas, formadas por fibrilas finas e esparsas (MONTES et al., 1980). No entanto, a tipificação do colágeno baseada na morfometria do diâmetro das fibrilas se tornou controversa quando um estudo que demonstrou que o colágeno tipo III pode estar presente em feixes de colágeno independentemente do diâmetro da fibrila (KENEE et al., 1987).

Pesquisadores que avaliaram o colágeno por histoquímica e microscopia eletrônica demonstraram a presença de dois tipos de colágeno, separados em diferentes compartimentos, em nervos (JUNQUEIRA et al., 1979; MONTES et al., 1984), artérias (CARRASCO et al., 1981) e pele (JUNQUEIRA & MONTES, 1983). Estes resultados estão em concordância com os resultados de estudos imuno-histológicos (GAY et al., 1975, MEIGEL et al., 1977) e bioquímicos

(TAJIMA & NAGAI, 1980) quanto à distribuição dos colágenos I e III nos mesmos órgãos sadios. Contudo, ainda não foram realizados estudos neste sentido em tecidos patológicos, a exemplo da endometriose equina.

Em estudo realizado por Masseno (2012), utilizando as técnicas de Picrosirius Red sob luz polarizada e imuno-histoquímica para  $\alpha$ -SMA, foi identificada a deposição de colágeno denso nas lesões das endometrioses inativas, associadas à expressão baixa para  $\alpha$ -SMA pelas células estromais que circundam as glândulas endometriais, sugerindo a correlação entre o tipo de colágeno presente e o fenótipo das células estromais. No entanto, neste mesmo estudo, notou-se que nas endometrioses ativa e ativa destrutiva, o tipo de colágeno predominante é o que possui arranjo reticular, menos denso, enquanto que nas endometrioses inativa e inativa destrutiva o predomínio foi de um colágeno mais denso.

A coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS), que evidencia macromoléculas glicogenadas que compõem a lâmina basal, como o colágeno IV, laminina e fibronectina, em tonalidade rósea, também constitui de um modelo histoquímico recém-empregado no estudo das endometrioses equinas. Hanada et al. (2014) utilizaram desta técnica com o intuito de avaliar a resposta da membrana basal frente ao processo de fibrose, e detectaram alterações como espessamento e ruptura parcial dessa estrutura nas endometrioses ativas e ativas destrutivas.

A imuno-histoquímica é uma técnica que também pode ser utilizada para a diferenciação dos tipos de colágeno, tendo sido realizados vários estudos com esta finalidade em diversos órgãos e diferentes espécies (AUGSBURGER & HENZI, 2008; TEKUL et al., 1996; KUPPEVELT et al., 1995). No entanto, no que diz respeito ao endométrio equino, estes estudos ainda são escassos. Até o momento, a tipificação do colágeno endometrial nas éguas restringe-se a detecção da presença do colágeno tipo IV nas diversas fases do ciclo estral (MANSOUR et al., 2003) e a um único estudo que relaciona esta tipificação a endometriose (WALTER et al., 2001), porém sem considerar as etapas da patogênese do processo (HOFFMANN et al., 2009b).

Deve-se ressaltar que os diferentes métodos utilizados para a determinação da distribuição e das características do colágeno presente no endométrio fibrótico tem levado a resultados discrepantes. Os autores que

utilizaram o método do Picrosirius Red sob luz polarizada relatam que a fibrose periglandular está associada ao aumento da quantidade de colágeno fibrilar periglandular (EVANS et al., 1998; NUNES, 2006; MASSENO, 2012). Porém, quando o método imuno-histoquímico foi empregado, o tipo de colágeno observado na fibrose ao redor das estruturas glandulares, inclusive envolvendo as células estromais da região, foi o do tipo IV, tipo este restrito a membrana basal (WALTER et al., 2001).

Assim sendo, o entendimento do processo de evolução da endometriose depende do reconhecimento morfológico do tipo de reação envolvida e dos elementos que a compõem. As discrepâncias nos resultados obtidos pelos diferentes autores podem ser esclarecidas pela comparação dos métodos morfológicos de análise do colágeno periglandular. Além disso, a participação dos miofibroblastos e sua relação com o tipo de colágeno presente, nas diferentes etapas que tem sido consideradas no processo de endometriose, podem auxiliar não só na compreensão da fibrose endometrial, mas também futuramente na pesquisa de linhas terapêuticas.

### **3. OBJETIVOS**

O presente trabalho tem como principais objetivos:

#### **3.1. Objetivos Gerais**

- ✓ Avaliar as lesões fibróticas endometriais, identificando o tipo de colágeno presente e a participação dos miofibroblastos nos processos de fibrose ativa, fibrose ativa destrutiva, fibrose inativa e fibrose inativa destrutiva, procurando estabelecer a relação entre a matriz e os tipos celulares em cada etapa do processo de endometriose equina.
  
- ✓ Verificar a correlação entre a coloração de Picrosirius Red sob luz polarizada e a marcação imuno-histoquímica dos colágenos tipo I e tipo III;

### **3.2. Objetivos Específicos**

- ✓ Caracterizar o colágeno presente nos processos fibróticos endometriais por meio de método histoquímico que emprega os corantes Tricrômico de Masson e Picrosirius Red sob luz polarizada;
- ✓ Tipificar o colágeno presente nos processos fibróticos endometriais por meio de método imuno-histoquímico, para colágeno tipo I, tipo III e tipo IV;
- ✓ Caracterizar as alterações morfológicas da membrana basal glandular pelo método histoquímico do Ácido Periódico de Schiff (PAS).
- ✓ Determinar a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso pelos miofibroblastos presentes nos processos fibróticos endometriais.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Procedência do material**

No presente estudo, foram utilizadas 24 biópsias endometriais com diagnóstico de endometrose, provenientes dos arquivos dos serviços de Patologia Veterinária e de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu – SP. Este material é proveniente da rotina do diagnóstico do Hospital Veterinário da FMVZ e também de amostras de clínicas privadas e profissionais autônomos. As lâminas correspondentes a cada caso foram analisadas para a confirmação do diagnóstico de endometrite crônica degenerativa (endometrose).

### **4.2. Processamento e análise histológica**

Todas as biópsias foram submetidas ao mesmo tipo de processamento laboratorial. Fixação em Bouin, substituído após 24 horas por solução de álcool a 70%. Posteriormente, 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. Foram obtidos novos cortes de quatro micrômetros de espessura a partir dos blocos selecionados, e posteriormente corados pelo método de Hematoxilina & Eosina (LUNA, 1968), para a classificação do processo crônico endometrial.

Cortes dos mesmos blocos foram utilizados também nos procedimentos histoquímicos e imuno-histoquímicos. A identificação das alterações endometriais e a classificação das lesões seguiram as descrições de Hoffmann et al (2009b), utilizando endométrios sadios como controle, obedecendo-se os critérios de Kenney & Doig (1986).

#### **4.2.1. Técnicas histoquímicas**

Na avaliação da fibrose endometrial, foram utilizadas as técnicas do Tricrômico de Masson, Picrosirius Red sob luz polarizada e Ácido Periódico de Schiff (PAS).

##### **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 Histopatologia do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP.

Depois da obtenção dos cortes histológicos, as lâminas permaneceram em estufa a 60°C por 12 horas, então posicionadas em berços de coloração e submetidas ao processo de desparafinização e hidratação.

As lâminas foram posicionadas em suporte de coloração e os corantes aplicados sobre as mesmas na seguinte ordem: Hematoxilina de Harris 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 dez 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.

Os cortes corados pelo método do Tricrômico de Masson foram utilizados para determinar a localização e o grau de fibrose, permitindo a evidência da lesão endometrial. Nesta técnica, as fibras colágenas exibem uma coloração em tom azulado, enquanto as fibras musculares e células epiteliais glandulares revelam tons de vermelho. A análise consistiu na observação da deposição de fibras colágenas nos diferentes tipos de endometrose.

#### **4.2.1.2. Picrosirius Red**

A utilização desta técnica, descrita por Junqueira et al. (1978), seguiu o roteiro de Técnicas de Colorações Específicas do Departamento de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Após a obtenção dos cortes histológicos, as lâminas foram postas em berço de coloração e submetidas aos processos de desparafinização e hidratação. O material 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 ficaram 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.

Para verificação do padrão de qualidade da coloração e a confirmação da refringência das fibras colágenas, as lâminas foram observadas no microscópio de luz polarizada (campo escuro), modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado à uma câmara digital modelo AxioCam MRc (Zeiss Vision, Alemanha) do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, e avaliados pelo uso do programa computacional Axiovision Software Rel. versão 4.6 (Zeiss Vision, Alemanha).

A coloração pelo método de Picrosirius Red sob luz polarizada foi realizada para a avaliação qualitativa do tipo de colágeno predominante e sua distribuição em cada um dos tipos de endometrose, levando em consideração os ninhos fibróticos e os estratos compacto e esponjoso. Também foi utilizada para verificação de correspondência com a marcação imuno-histoquímica dos colágenos tipo I e tipo III.

#### **4.2.1.3. Ácido Periódico de Schiff (PAS)**

A utilização desta técnica, descrita por Junqueira et al. (1978), seguiu o roteiro de Técnicas de Colorações Específicas do Departamento de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Após a obtenção dos cortes histológicos e deixadas na estufa a 60°C por uma hora, as lâminas foram postas em berço de coloração e submetidas aos processos de desparafinização e hidratação. O material foi imerso em solução de ácido periódico a 0,5% por 15 minutos e posteriormente lavado em água corrente e água destilada. Em seguida, cobriu-se cada lâmina com Reativo de Schiff, permanecendo desta forma por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e submetidas à Hematoxilina de Harris por 30 segundos. Depois destas etapas, o material foi lavado em água corrente por cinco minutos e submetido aos processos de desidratação, diafanização e montagem em resina sintética.

A coloração por Ácido Periódico de Schiff (PAS) foi realizada a fim de avaliar a resposta da membrana basal no processo de fibrose endometrial, rica em colágeno tipo IV, além de glicoproteínas como laminina e fibronectina. A análise foi feita considerando-se a espessura e a tonalidade da membrana basal, associando ao tipo de endometrose correspondente.

#### **4.2.2. Técnicas imuno-histoquímicas**

A padronização das técnicas imuno-histoquímicas foi realizada no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP.

Cortes histológicos com três micrômetros de espessura foram feitos em micrótomo rotativo, e as lâminas, em seguida, colocadas em estufa a 60°C por

24 horas. Após este procedimento, as lâminas foram submetidas aos processos de desparafinização e hidratação.

Para a detecção de colágenos I, III e IV, realizou-se recuperação antigênica por digestão enzimática em pepsina 1%, pH 1,8 (Pepsina 1:10.000 NF- Nuclear, SP, Brasil), com incubação em estufa a 60°C por três minutos e, em seguida, em estufa a 37°C por dez minutos. As etapas seguintes foram o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 3% por vinte minutos, seguida de dez lavagens em água destilada; bloqueio de sítios inespecíficos com leite desnatado Molico® a 3% por 60 minutos, e duas passagens de cinco minutos em solução tampão TRIS–pH 7,4. Realizou-se a incubação com 100µL do anticorpo primário, na diluição de 1:2000, para colágeno tipo I (coelho anti-colágeno I bovino, IgA, Novotec, Ref. 20121); 1:1000, para colágeno tipo III (coelho anti-colágeno III bovino, IgA, Novotec, Ref. 20321); e 1:500, para colágeno tipo IV (coelho anti-colágeno IV humano, IgG Abcam, ab115261) em câmara úmida, durante 18h, à temperatura de 4°C.

Nos cortes em que foram aplicados o anticorpo anti- $\alpha$ -SMA, a recuperação antigênica foi feita sob calor úmido em Pascal (Dako, S2800-1), a 125°C durante 30 segundos com Citrato a 10mM, pH 6,0. Em seguida, realizou-se o bloqueio de ligações inespecíficas com leite desnatado Molico® a 3%. As lâminas foram lavadas em dois banhos de cinco minutos cada, com solução tampão TRIS pH 7,4. Em seguida, aplicou-se 100µL do anticorpo anti- $\alpha$ -SMA (cod. M0851, Clone 1A4, Dako), na diluição de 1:1250, com tempo de incubação de 18 horas em câmara úmida a 4°C.

A Tabela 1 demonstra os detalhes dos anticorpos primários utilizados para a reação.

**TABELA 1.** Anticorpos primários utilizados para a técnica imuno-histoquímica e suas especificações.

<b>Anticorpo</b>	<b>Tipo de anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>
Colágeno tipo I	Policlonal, coelho anti-bovino IgA	1:2000	Novotec, França
Colágeno tipo III	Policlonal, coelho anti-bovino IgA	1:1000	Novotec, França
Colágeno tipo IV	Policlonal, coelho anti-humano IgG	1:500	Abcam, Reino Unido
$\alpha$ -SMA (clone 1A4)	Monoclonal, camundongo anti-humano IgG	1:1250	Dako, Estados Unidos

As próximas etapas foram idênticas para todos os antígenos. Após a incubação com o anticorpo primário, o material foi submetido a banhos de TRIS pH 7,4 e, posteriormente, incubado com o anticorpo secundário HistoFine® (Nichirei Bioscience, Japão) por 30 minutos, segundo instruções do fabricante. Realizou-se nova lavagem com solução tampão TRIS pH 7,4 e revelação com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina - Liquid DAB Cromogen® – Dako, EUA), durante cinco minutos, e novamente lavagem com solução tampão TRIS pH 7,4.

As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por três minutos, com lavagem em água corrente por 10 minutos. Procedeu-se, então, à desidratação do material com banhos de álcool. As lâminas permaneceram três minutos em cada cuba (álcool 85%, 95%, álcool absoluto I, II, III, xilol I, II e III) e, por fim, foram montadas com lamínulas utilizando-se resina sintética - Permout (Fisher Scientific – cód. UN1294e).

Para avaliação dos cortes histológicos submetidos ao anticorpo anti- $\alpha$ -SMA, os parâmetros considerados foram a intensidade de imunomarcacão e a quantidade média de camadas celulares periglandulares positivas, associando ao tipo de endometriose estabelecida.

Para o estudo da distribuição dos tipos de fibras colágenas presentes no endométrio fibrótico, foram analisadas a intensidade e a localização de fibras positivas para colágeno tipo I, III e IV, considerando os ninhos fibróticos, o estrato compacto e o esponjoso, utilizando o endométrio hígido como grupo controle. Posteriormente, em cada biopsia, foi determinada a predominância do tipo de colágeno imunomarcado para cada tipo descrito na classificação de endometriose proposta por Hoffmann et al. (2009b), obtendo-se a concordância estatística com os resultados histoquímicos do Picrosirius Red sob luz polarizada (coloração verde ou vermelho-alaranjada) e expressão imuno-histoquímica da  $\alpha$ -SMA pelas células presentes nos ninhos fibróticos.

### **4.3. Análise estatística**

O coeficiente Kappa foi calculado para analisar a concordância entre os resultados obtidos pela avaliação histoquímica de Picrosirius Red sob luz polarizada e imuno-histoquímica dos colágenos tipos I e III e  $\alpha$ -SMA, utilizando o software SAS, Versão 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC. 2011).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Avaliação histopatológica das endometroses**

Histologicamente, os endométrios saudáveis, utilizados como controle, se caracterizaram por apresentar epitélio luminal cilíndrico alto ou baixo, simples a pseudoestratificado. Algumas vezes, apresentaram alterações inflamatórias discretas, caracterizadas por infiltrado inflamatório linfocítico focal no interstício. Alterações de natureza circulatória ocasionalmente foram notadas, como congestão, edema, hemorragia e hemossiderose.

As alterações que caracterizaram os endométrios categoria III foram as fibróticas, principalmente na região periglandular. Nesta região, a fibrose caracterizou-se pela deposição acentuada de colágeno e de camadas de fibroblastos, com espessura variando de uma a oito camadas, formando os denominados “ninhos fibróticos”. Nos casos mais severos, a densidade glandular foi relativamente menor, e a presença de lacunas linfáticas chamaram a atenção.

Seguindo a classificação proposta por Hoffmann et al. (2009b), nas biópsias que foram classificadas como endometrose ativa, foi observada predominância de ninhos fibróticos e glândulas individuais circundadas por fibroblastos com núcleos ovoides e hipocromáticos, sem danos às células epiteliais glandulares. Em alguns casos se observou acúmulo de secreção no lúmen glandular. Infiltrado inflamatório linfocítico multifocal, variando de discreto a acentuado, também foi observado.

Nas biópsias que foram classificadas como endometrose inativa, a predominância foi de glândulas isoladas envoltas por fibroblastos com núcleos hipercromáticos e alongados, arranjados paralelamente ao eixo das glândulas adjacentes. Focos de glândulas endometriais hiperplásicas com dilatação tubular cística e raras glândulas atróficas também foram identificados. O infiltrado inflamatório linfocítico variou de discreto a moderado e multifocal.

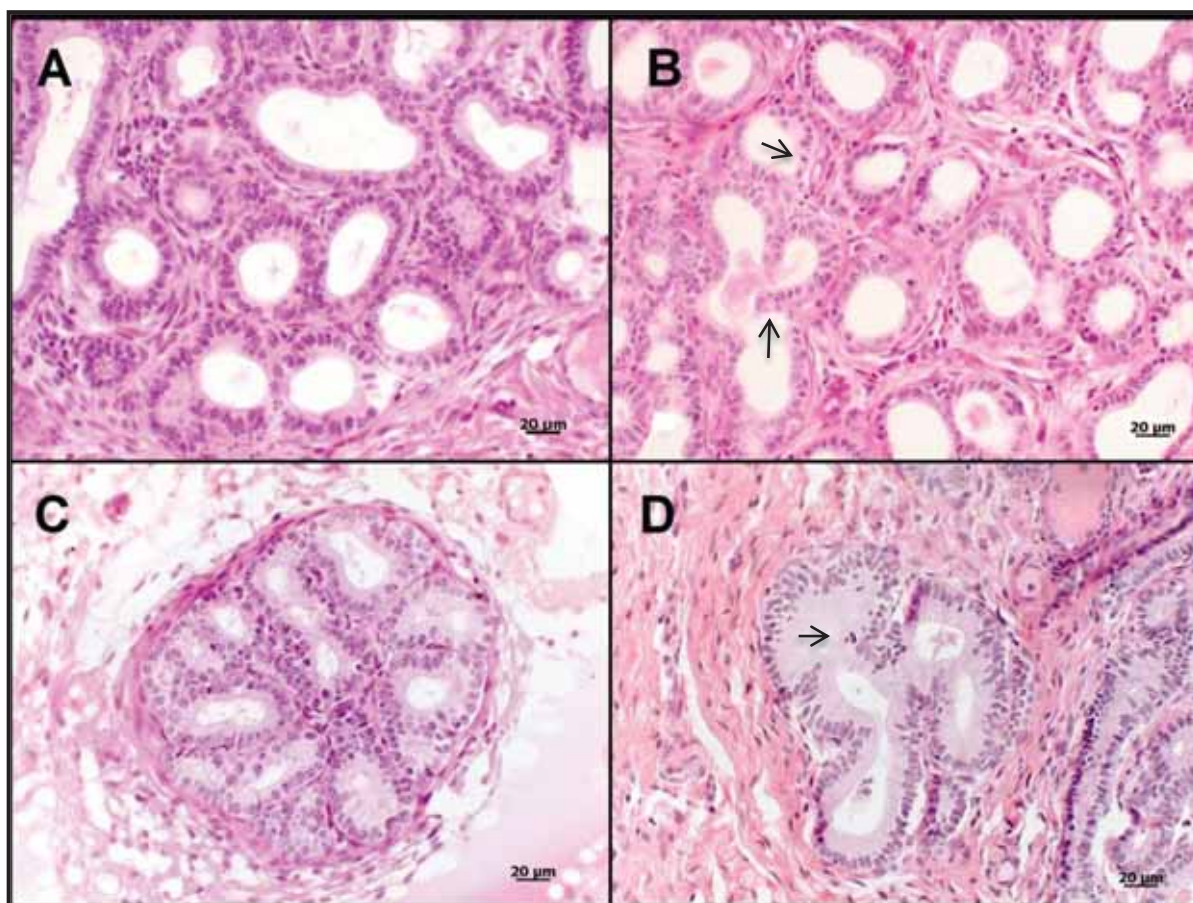
Nos casos diagnosticados como endometrose ativa destrutiva, foi observado predomínio de ninhos fibróticos e glândulas isoladas circundadas por fibroblastos com núcleos ovoides, amplos e hipocromáticos e citoplasma pálido. Células epiteliais glandulares degeneradas e/ou necróticas eram observadas em algumas glândulas, apresentando vacuolização citoplasmática, picnose nuclear ou cariorrexe. Também foi observado Infiltrado inflamatório linfocítico multifocal a difuso, variando de discreto a acentuado.

Nas amostras que apresentaram endometrose inativa destrutiva, glândulas isoladas circundadas por fibroblastos com núcleos alongados e hipercromáticos, arranjadas paralelamente ao eixo das glândulas adjacentes predominaram. Ainda, foi identificada necrose multifocal de células epiteliais glandulares e retenção de secreção no lúmen glandular com dilatação cística. Notou-se infiltrado inflamatório linfocítico discreto a moderado e multifocal.

Considerando a classificação histológica proposta por Hoffmann et al. (2009), dos 24 casos de endometrose diagnosticados, seis foram incluídos na classificação de endometrose ativa; quatro na endometrose inativa; sete na endometrose ativa destrutiva; e sete como endometrose inativa destrutiva. Os resultados da classificação histológica desses casos de endometroses estão apresentados na Tabela 2, e a Figura 1 caracteriza cada um dos tipos.

**TABELA 2.** Número de casos e respectiva porcentagem de acordo com a classificação das endometroses de Hoffmann et al. (2009b).

Endometrose	Nº de casos	Percentual (%)
Ativa	6	25
Ativa destrutiva	7	29
Inativa	4	17
Inativa destrutiva	7	29
<b>TOTAL</b>	<b>24</b>	<b>100</b>

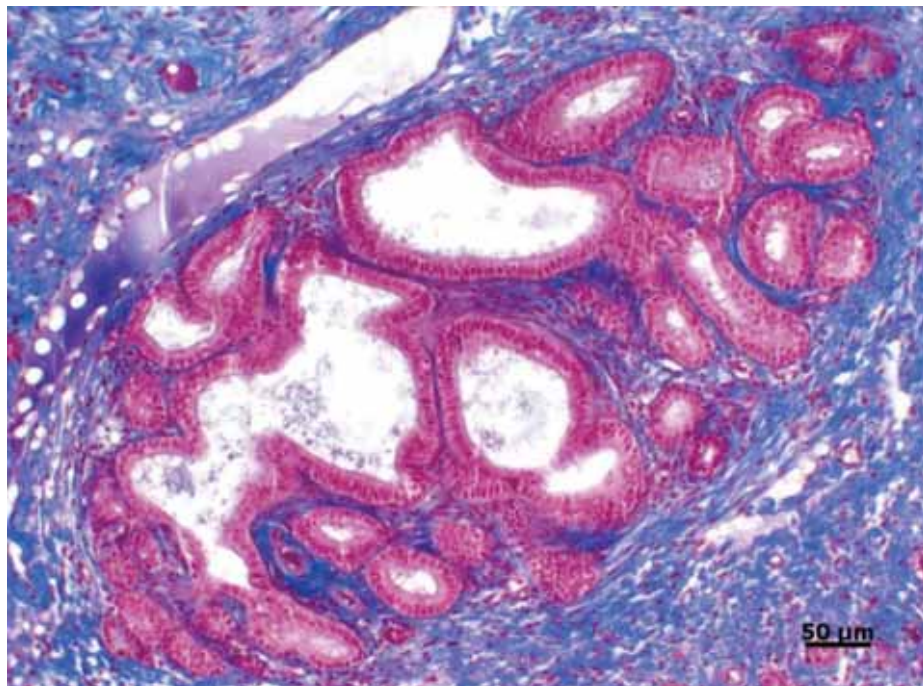


**FIGURA 1.** Secções histológicas de endométrio equino. **(A)** Endometrose ativa. Glândulas circundadas por células estromais fibróticas que exibem núcleo ovoide, amplo e hipocromático e citoplasma pálido. **(B)** Endometrose ativa destrutiva. Células estromais fibróticas com focos de invasão glandular, resultando em necrose focal de células epiteliais (*setas*) e túbulos glandulares tortuosos. **(C)** Endometrose inativa. Ninho glandular circundado por células estromais fibróticas, com núcleo hiperchromático e alongado, arranjadas paralelamente ao eixo das glândulas adjacentes. **(D)** Endometrose inativa destrutiva. Glândulas isoladas circundadas por células estromais fibróticas inativas, associado à necrose de células epiteliais individuais (*setas*). HE.

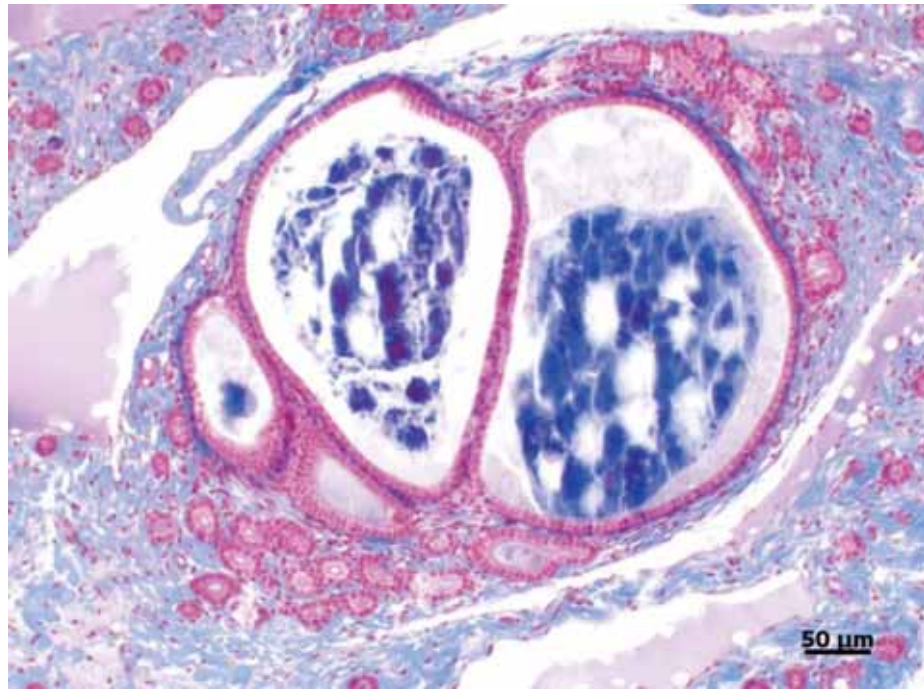
## 5.2. Avaliação histoquímica

### 5.2.1. Tricrômico de Masson

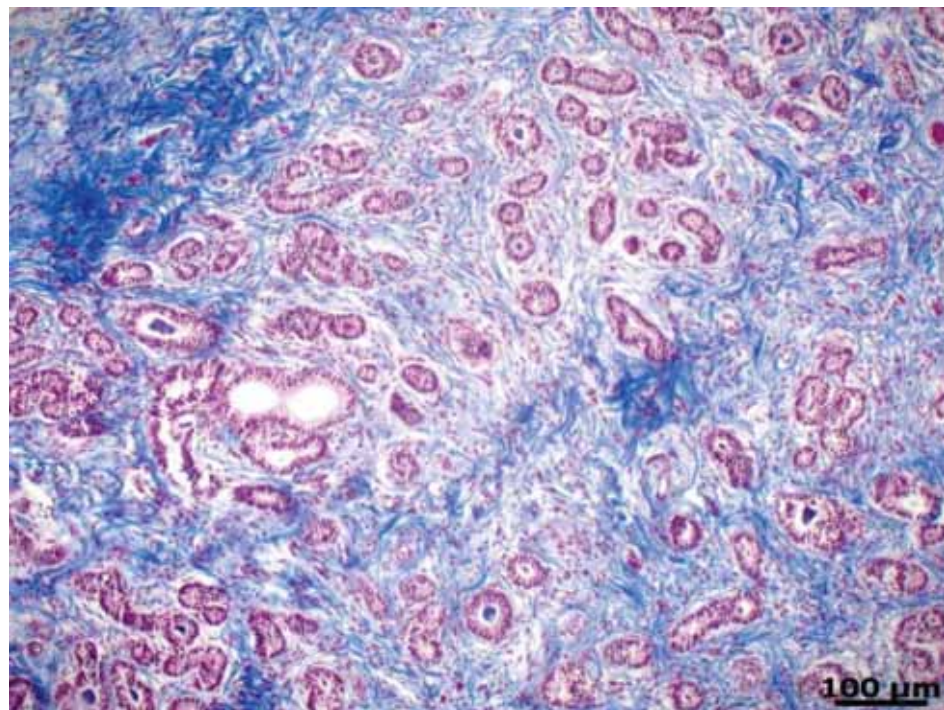
Nos cortes corados pela técnica histoquímica de Tricrômico de Masson, foi observado que, nas endometroses ativas, os ninhos fibróticos revelaram fibras colágenas de espessura maior em relação às inativas (Figuras 2 e 3). Ainda, tornou-se mais nítida a deposição de colágeno nos casos de fibrose intersticial difusa (Figura 4), o que é pouco evidenciada pelo método de Hematoxilina e Eosina.



**FIGURA 2.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa destrutiva. Notam-se fibras colágenas espessas dissecando os túbulos glandulares. Tricrômico de Masson.



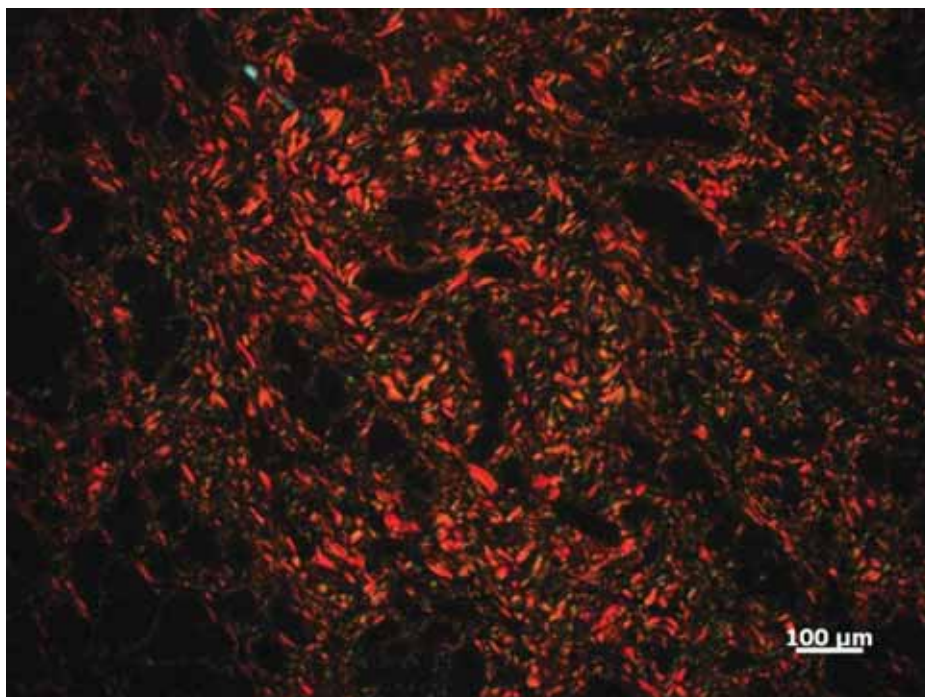
**FIGURA 3.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose inativa. Ninho fibrótico evidenciando dilatação glandular cística com fibras colágenas delgadas por entre os túbulos. Tricrômico de Masson.



**FIGURA 4.** Fotomicrografia de endométrio equino. Fibrose estromal difusa. Deposição acentuada de fibras colágenas azuladas, com consequente diminuição de densidade glandular. Tricrômico de Masson.

### 5.2.2. Picrosirius Red

Os cortes corados pela técnica histoquímica de Picrosirius Red e examinados sob luz polarizada, as endometroses avaliadas revelaram deposição acentuada de colágeno estromal, tanto do tipo frouxo quando do tipo denso, em todas as regiões exceto no estrato compacto, onde a intensidade foi discreta e predominantemente do tipo frouxo. Na porção periglandular dos ninhos fibróticos, o colágeno do tipo denso predominou em todas as amostras. Ficou evidenciada a diminuição da quantidade de glândulas no endométrio fibrótico, principalmente as biópsias que apresentaram fibrose intersticial difusa (Figura 5). Nestas, houve maior deposição de fibras de colágeno denso no estrato esponjoso e em regiões perivasculares.



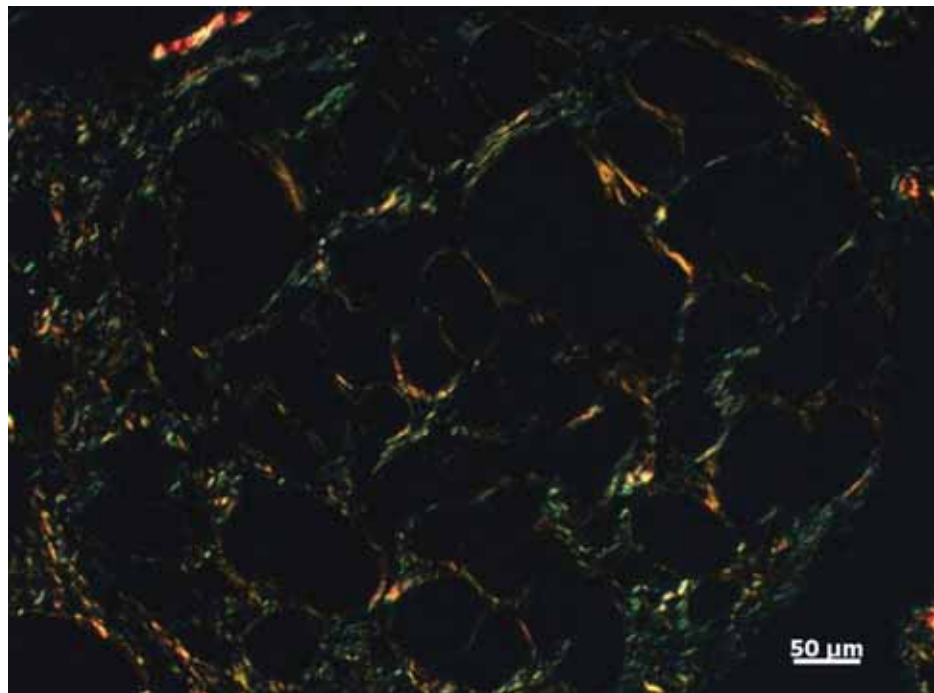
**FIGURA 5.** Fotomicrografia de endométrio equino. Fibrose estromal difusa. Predominância de fibras colágenas densas (alaranjadas) depositadas no estrato esponjoso. Picrosirius Red sob luz polarizada.

Nas biópsias classificadas como endometrose ativa, o estrato de maior deposição de colágeno foi o esponjoso, tanto ao redor quanto no interior dos ninhos fibróticos. Em 83% destas amostras observou-se a predominância de fibras de colágeno do tipo frouxo por entre os túbulos glandulares no interior dos ninhos fibróticos.

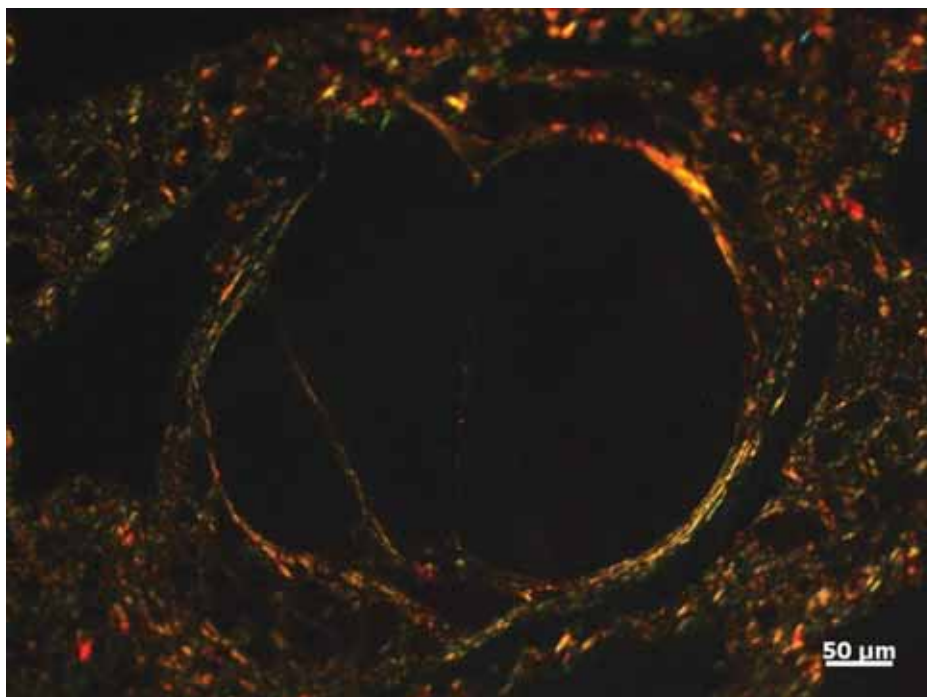
As amostras classificadas como endometriose inativa se caracterizaram por glândulas dilatadas com aspecto cístico, delineadas por fibras colágenas predominantemente amareladas em 50% destes casos, tanto na porção periglandular quanto no interior dos ninhos fibróticos. Nos outros 50%, houve predominância de colágeno esverdeado.

Todos os casos diagnosticados como endometriose ativa destrutiva apresentaram maior deposição de colágeno frouxo na porção interna dos ninhos fibróticos (Figura 6). Ao redor dos ninhos, o colágeno do tipo denso predominou.

Nas amostras que apresentaram endometriose inativa destrutiva, houve predominância de colágeno denso na região periglandular e interna dos ninhos fibróticos, correspondendo a 72% destes casos. Ainda, foi observada uma deposição discreta de colágeno frouxo periglandular (Figura 7).



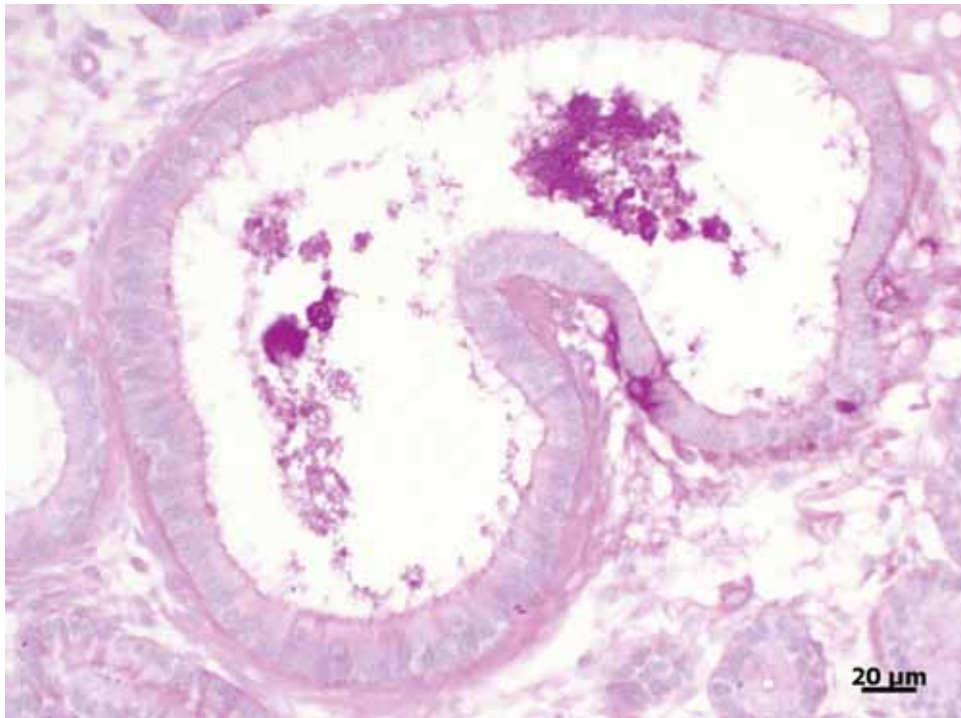
**FIGURA 6.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometriose ativa. Ninho fibrótico com predomínio de fibras colágenas do tipo frouxo (esverdeado) por entre os túbulos glandulares. Notam-se discretas fibras alaranjadas. Picosirius Red sob luz polarizada.



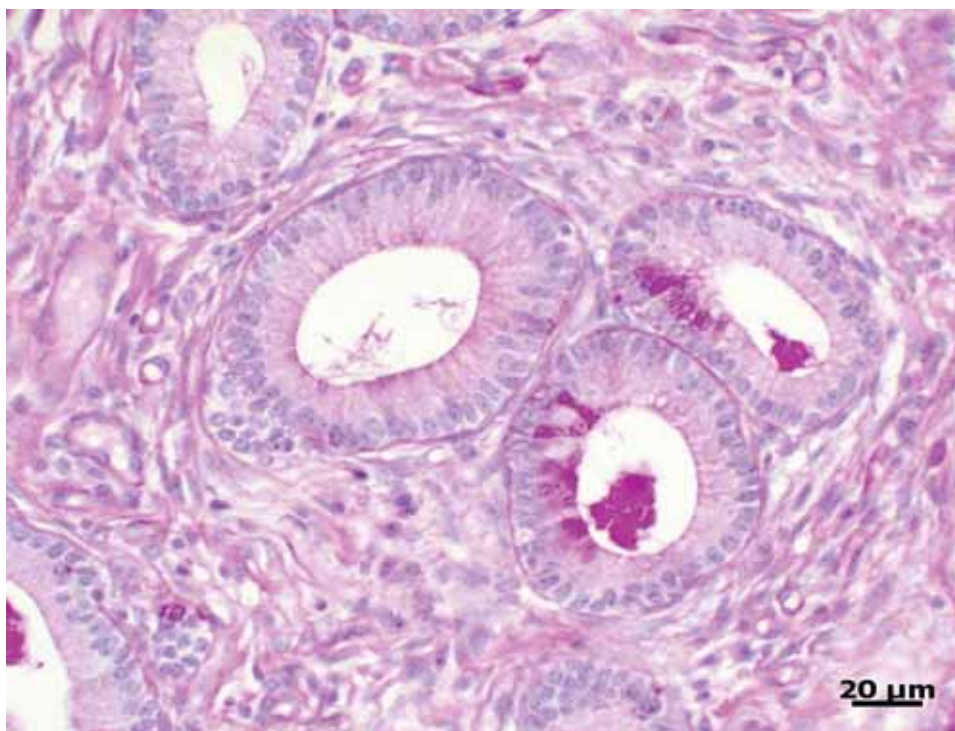
**FIGURA 7.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose inativa destrutiva. Ninho fibrótico com predomínio de fibras colágenas do tipo denso (alaranjada). Picrosirius Red sob luz polarizada.

### 5.2.3. Ácido Periódico de Schiff (PAS)

A partir desta técnica foi observado que, nas endometroses ativas e ativas destrutivas (Figura 8), a marcação histoquímica da membrana basal das glândulas contidas nos ninhos fibróticos se deu em uma tonalidade púrpura, exibindo um espessamento considerável quando comparada às endometroses inativas e inativas destrutivas, bem como nos endométrio hígido. Nestas, foram observadas apenas estrias róseas delgadas e fibrilares (Figura 9).



**FIGURA 8.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa destrutiva. Membrana basal apresentando espessamento principalmente na porção de invaginação do túbulo glandular. PAS.



**FIGURA 9.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose inativa. Nota-se membrana basal sem alteração de espessamento. PAS.

### **5.3. Avaliação imuno-histoquímica**

#### **5.3.1. Colágenos**

##### **5.3.1.1. Colágeno tipo I**

Como controle positivo, o endométrio hígado apresentou marcação difusa de fibras estromais. O estrato compacto revelou intensidade mais discreta quando comparado ao estrato esponjoso.

Nas endometroses avaliadas, houve imunomarcação moderada e difusa de colágeno tipo I nos estratos compacto e esponjoso, não diferindo do endométrio hígado. Considerando a positividade nos ninhos fibróticos, oito biopsias apresentaram predominância deste tipo de colágeno, representando 25% das amostras. Destas oito, três eram endometrose inativa; três inativas destrutivas; uma ativa e uma ativa destrutiva.

Em todos os tipos de endometrose, a marcação imuno-histoquímica para o colágeno tipo I foi mais intensa naquelas com fibrose intersticial difusa, no estrato compacto e esponjoso, ao redor dos ninhos fibróticos e de glândulas fibróticas individualizadas. Nas endometroses ativa e ativa destrutiva (Figura 10), notou-se uma marcação de intensidade discreta a moderada nas fibroses periglandulares quando comparada às endometroses inativa e inativa destrutiva, que revelaram uma marcação mais intensa.

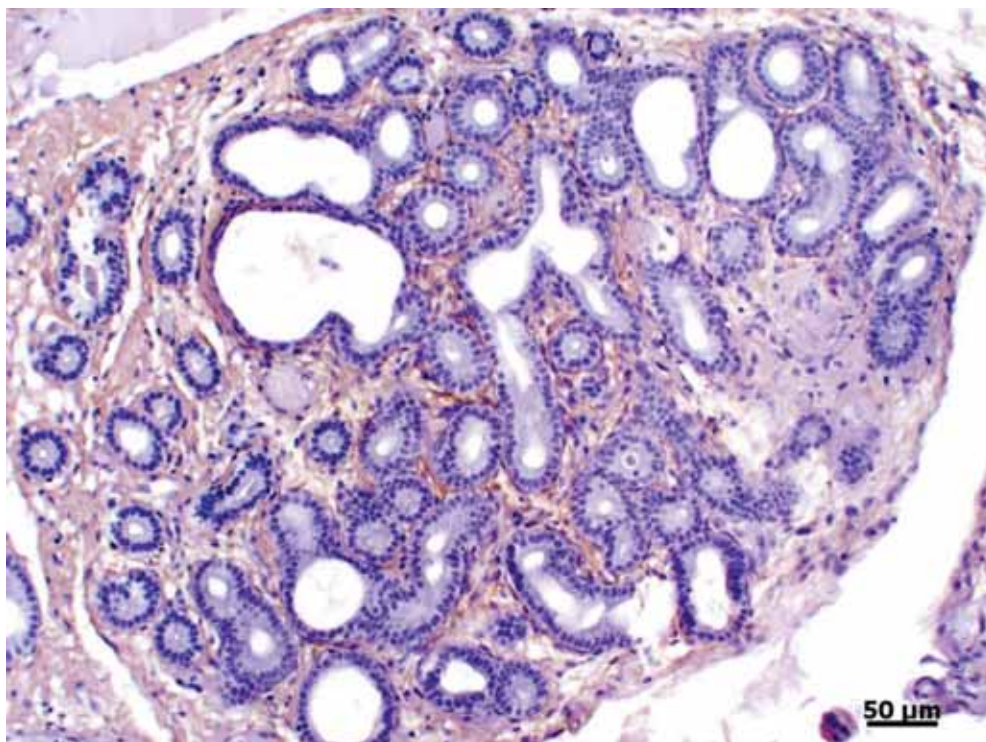
##### **5.3.1.2. Colágeno tipo III**

No endométrio hígado, a imunomarcação apresentou-se difusa tanto no estrato compacto como no esponjoso.

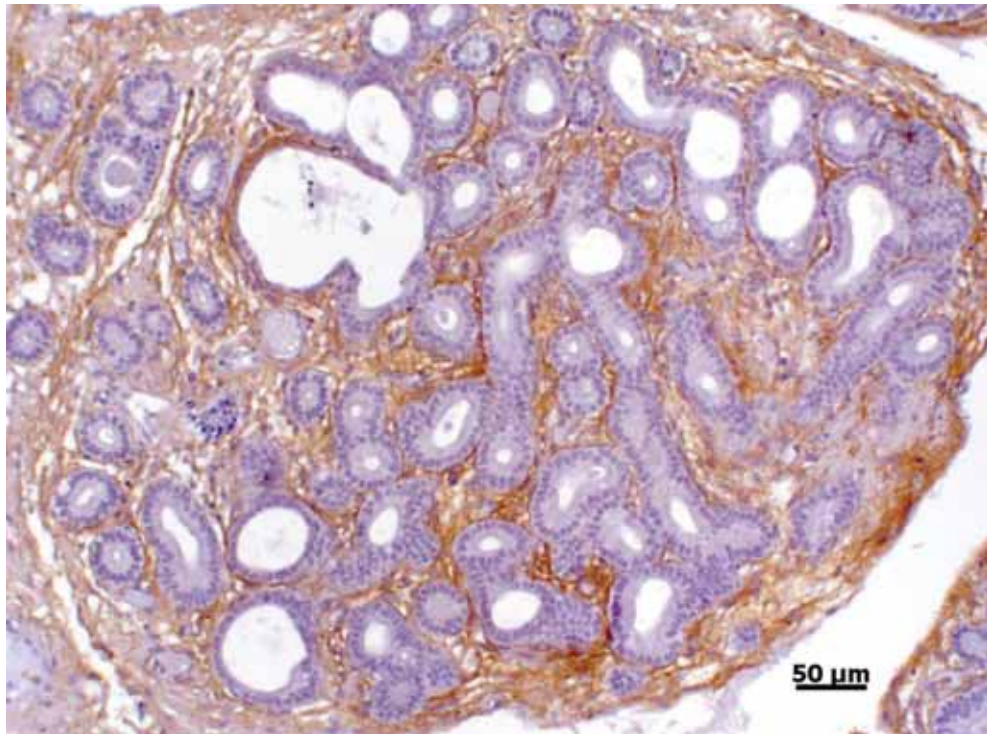
As biopsias com diagnóstico de endometrose apresentaram, bem como o grupo controle, imunomarcação difusa compondo ambos os estratos compacto e esponjoso. Dezesesseis biopsias (66,66%) revelaram predominância deste tipo de colágeno na porção interna dos ninhos fibróticos. Seis eram ativas destrutivas; cinco eram ativas; quatro eram inativas destrutivas; e uma era inativa.

Nas endometroses ativa e ativa destrutiva, foi detectada uma imunomarcação acentuada por entre as glândulas contidas no interior dos ninhos fibróticos (Figura 11). Nas endometroses inativa e inativa destrutiva, a

marcação restringiu-se à porção periglandular, em intensidade discreta a moderada.



**FIGURA 10.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa destrutiva. Imunomarcação discreta para colágeno tipo I em ninho fibrótico. Contracoloração: Hematoxilina.

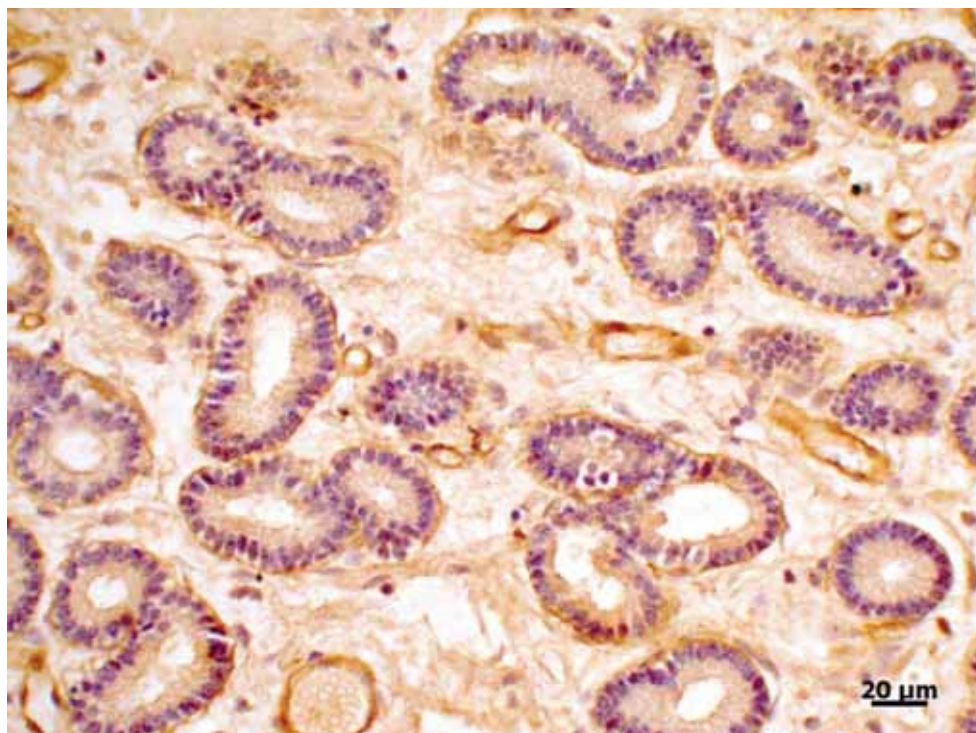


**FIGURA 11.** Fotomicrografia de endométrio equino. Mesmo ninho fibrótico demonstrado na figura anterior. Marcação imuno-histoquímica acentuada para colágeno tipo III. Contracoloração: Hematoxilina.

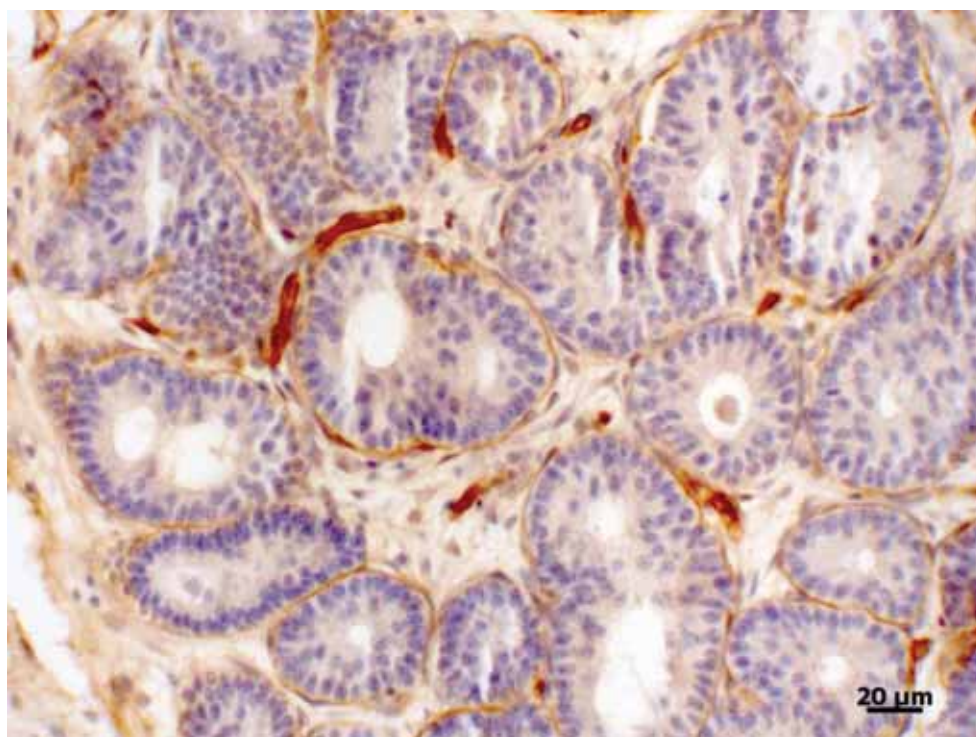
#### **5.3.1.3. Colágeno tipo IV**

Tanto o endométrio hígido (Figura 12) quanto as endometroses exibiram imunomarcção para o colágeno tipo IV restrito à membrana basal do epitélio luminal e glandular e de vasos sanguíneos.

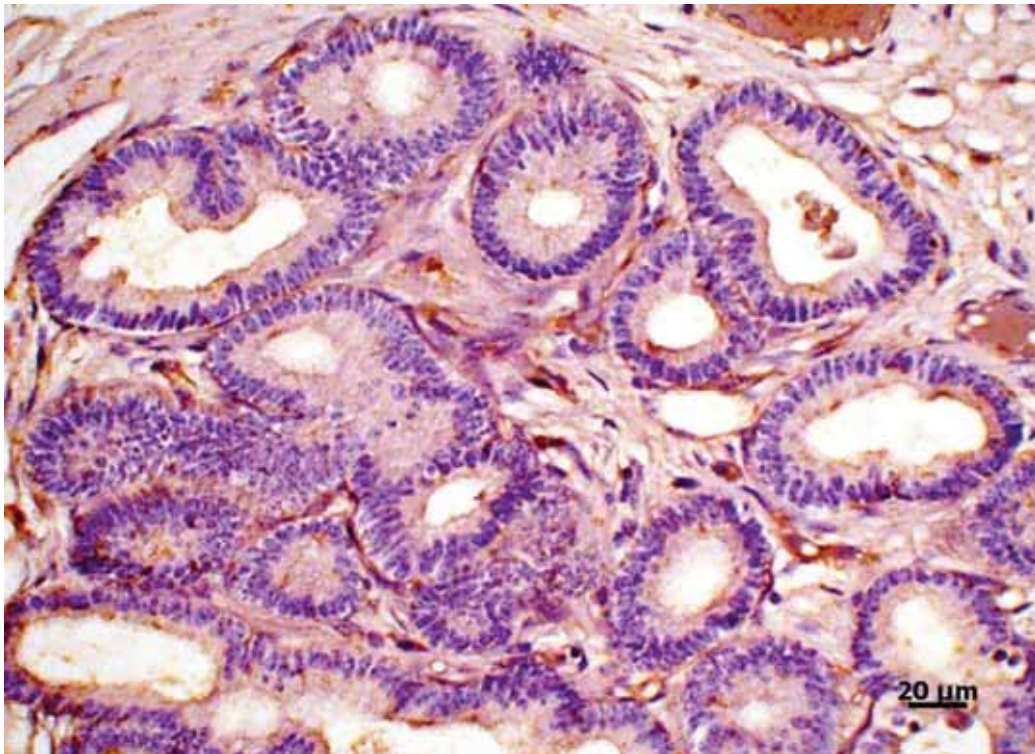
Nas amostras de endometrose, não foram observadas alterações de espessamento da camada de colágeno tipo IV da membrana basal (Figura 13). No entanto, nas endometroses ativa destrutiva e inativa destrutiva, foram observadas áreas de descontinuidade da fibra de colágeno tipo IV da membrana basal das glândulas contidas nos ninhos fibróticos (Figura 14).



**FIGURA 12.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endométrio hígido. Marcação imuno-histoquímica do colágeno tipo IV restrito à membrana basal dos túbulos glandulares e de vasos sanguíneos. Contracoloração: Hematoxilina.



**FIGURA 13.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa. Imunoexpressão de colágeno tipo IV compondo a membrana basal sem descontinuidades. Contracoloração: Hematoxilina.



**FIGURA 14.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa destrutiva. Fibras de colágeno tipo IV da membrana basal com áreas de descontinuidade. Contracoloração: Hematoxilina.

### 5.3.2. Alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA)

A imunopositividade para  $\alpha$ -SMA no endométrio hígado demonstrou-se restrita à parede de vasos sanguíneos.

Nas endometroses, além dos vasos sanguíneos foi observada marcação positiva na região periglandular fibrótica de todas as biopsias. Foram observadas desde glândulas fibróticas isoladas a extensos ninhos fibróticos, compreendendo múltiplos túbulos glandulares. Por vezes, a imunoexpressão da  $\alpha$ -SMA ocorreu apenas em parte da circunferência glandular. Nas células estromais do estrato esponjoso e compacto, não foram observadas marcações positivas.

Considerando as células positivas na região periglandular, dezesseis biopsias (66,67%) apresentaram imunomarcação discreta, apresentando uma ou duas camadas de células, em glândulas individualizadas e por vezes em ninhos fibróticos; enquanto oito revelaram imunomarcação acentuada (33,33%), chegando até oito camadas de células periglandulares, circundando ninhos fibróticos e raramente glândulas individualizadas.

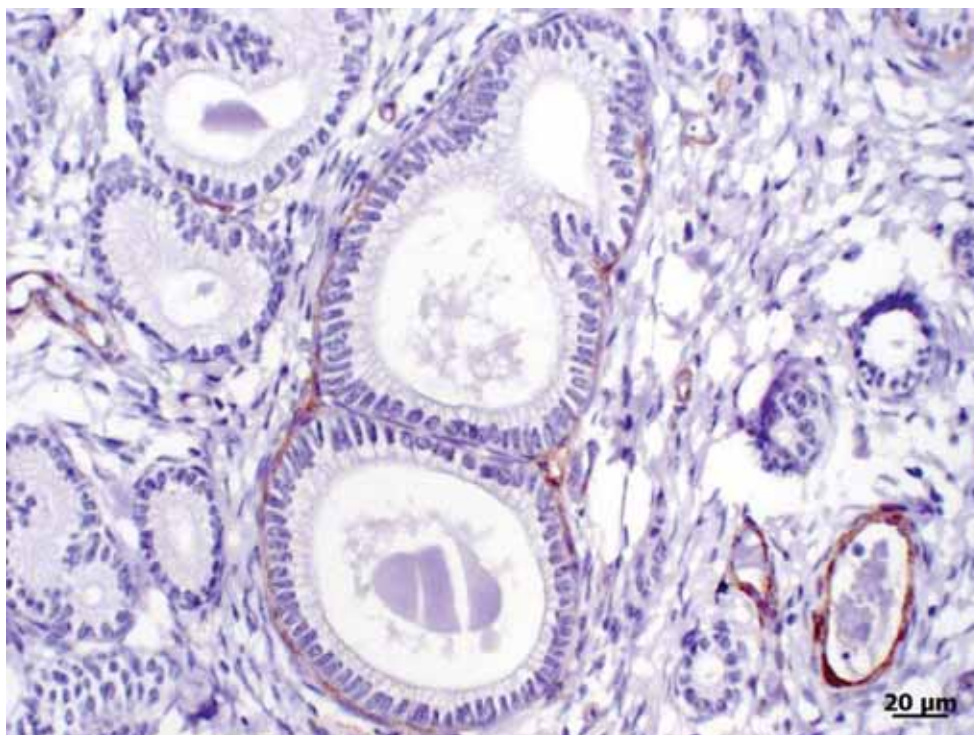
Das dezesseis biópsias com imunoexpressão discreta para  $\alpha$ -SMA, seis eram inativas destrutivas; quatro eram inativas (Figura 15); duas eram ativas destrutivas; e quatro eram ativas. Considerando as oito biópsias que revelaram marcação acentuada, cinco eram ativas destrutivas (Figura 16); duas eram ativas; e uma era inativa destrutiva. Não foi observada imunoexpressão acentuada em nenhuma das biópsias classificadas como inativa.

A Tabela 3 demonstra, resumidamente, os parâmetros analisados e os dados numéricos obtidos pela avaliação de Picosirius Red examinado sob luz polarizada, e imuno-histoquímica dos colágenos tipos I e III e  $\alpha$ -SMA.

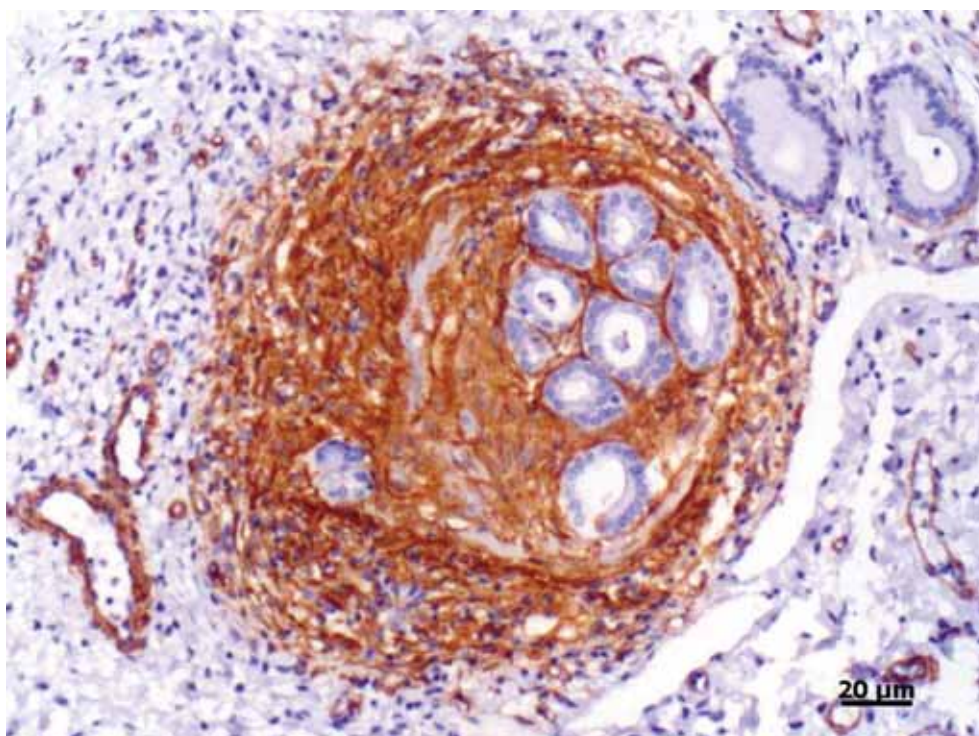
**TABELA 3.** Número de casos de cada parâmetro avaliado e a respectiva porcentagem em relação aos tipos de endometrose.

Endometrose	Predomínio colágeno frouxo (PRSLP)	Predomínio colágeno denso (PRSLP)	Predomínio colágeno tipo I (IHQ)	Predomínio de colágeno tipo III (IHQ)	Baixa expressão de $\alpha$ -SMA (IHQ)	Alta expressão de $\alpha$ -SMA (IHQ)
Ativa	5 (83%)	1 (16,67%)	1 (16,67%)	5 (83,33%)	4 (66,66%)	2 (33,33%)
Ativa destrutiva	7 (100%)	0	1 (14,28%)	6 (85,71%)	2 (28,57%)	5 (71,42%)
Inativa	2 (50%)	2 (50%)	3 (75,00%)	1 (25,00%)	4 (100%)	0
Inativa destrutiva	2 (28%)	5 (72%)	3 (42,85%)	4 (57,14%)	6 (85,71%)	1 (14,28%)
<b>TOTAL</b>	<b>16 (66,67%)</b>	<b>8 (33,33%)</b>	<b>8 (33,33%)</b>	<b>16 (66,67%)</b>	<b>16 (66,67%)</b>	<b>8 (33,33%)</b>

PRSLP: Picosirius Red sob luz polarizada; IHQ: Imuno-histoquímica.



**FIGURA 15.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose inativa. Imunomarcção discreta de uma monocamada de miofibroblastos positivas para  $\alpha$ -SMA. No canto inferior direito, vaso sanguíneo demonstrando positividade imuno-histoquímica. Contracoloração: Hematoxilina.



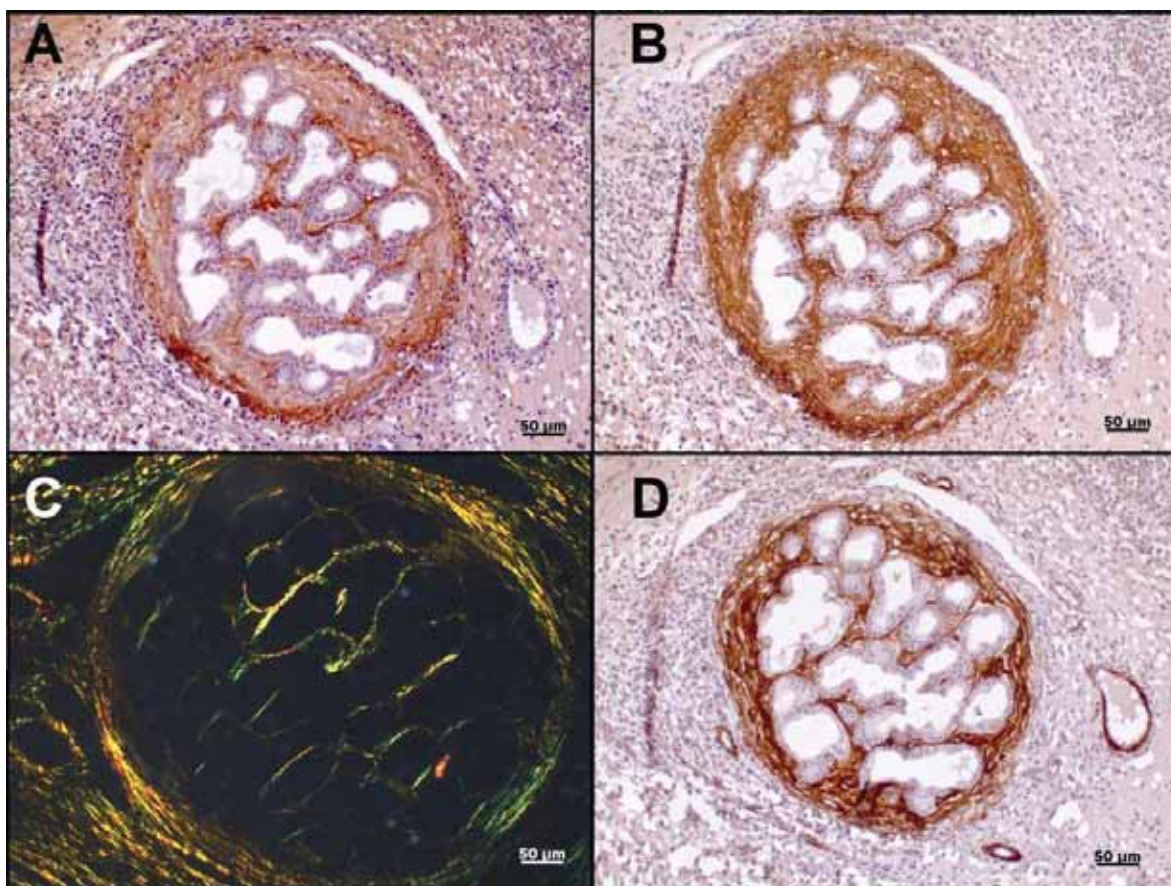
**FIGURA 16.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa destrutiva. Imunomarcção intensa de múltiplas camadas de miofibroblastos, positivas para  $\alpha$ -SMA. Contracoloração: Hematoxilina.

### **5.3.3. Índice de concordância entre as técnicas imuno-histoquímicas e o Picrosirius Red sob luz polarizada**

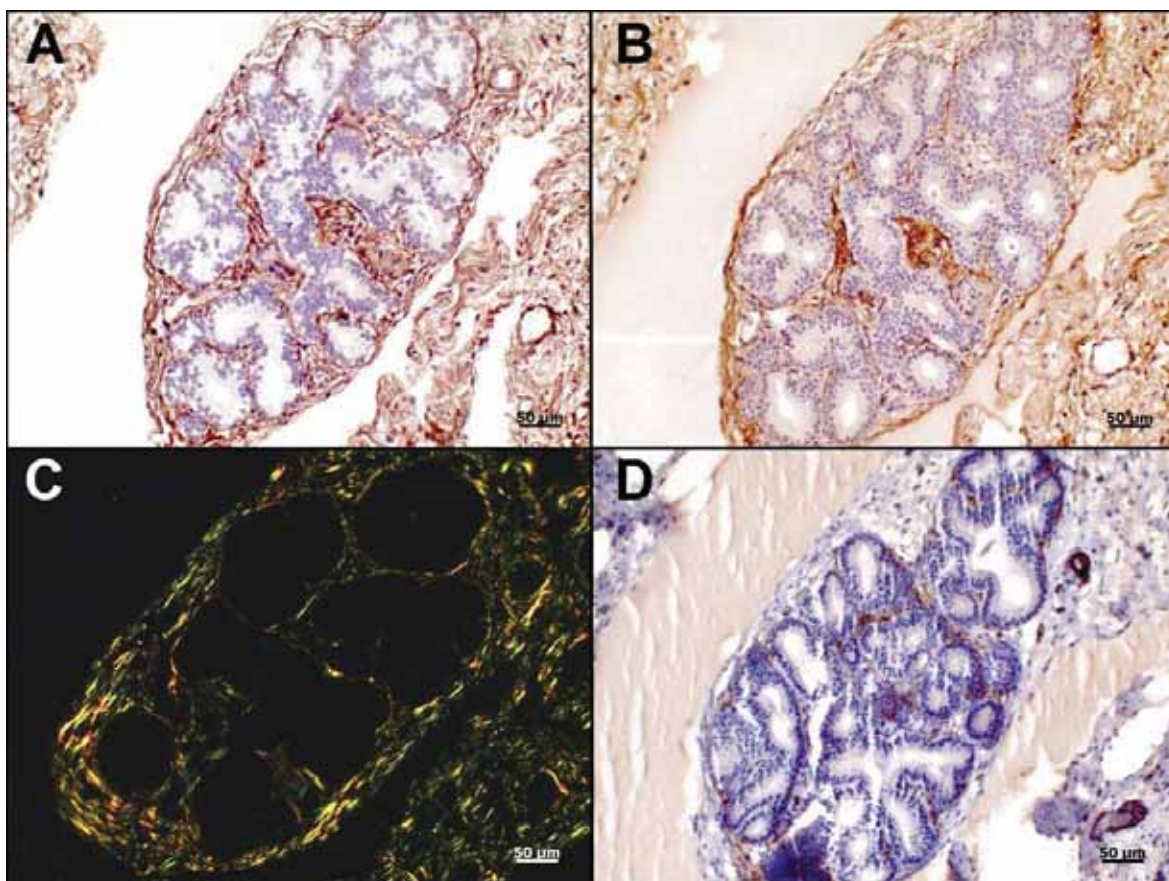
As técnicas imuno-histoquímicas para colágenos tipo I e III apresentaram índice de concordância substancial com a técnica histoquímica de Picrosirius Red sob luz polarizada (coeficiente Kappa = 0,625). Quando comparou-se as mesmas técnicas imuno-histoquímicas com a de  $\alpha$ -SMA, o índice de concordância foi moderado (coeficiente Kappa = 0,400).

Os Anexos 1 e 2 detalham a análise de concordância entre as diferentes técnicas avaliadas. O Anexo 3 demonstra a interpretação do coeficiente Kappa.

As Figuras 17 e 18 demonstram comparativos entre as técnicas imuno-histoquímicas dos colágenos tipos I e III e  $\alpha$ -SMA e a técnica histoquímica de Picrosirius Red sob luz polarizada.



**FIGURA 17.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose ativa destrutiva. Comparativo entre técnicas imuno-histoquímicas e Picrosirius Red sob luz polarizada. **(A) Colágeno tipo I:** imunomarcção positiva em todo o tecido fibrótico que envolve o ninho, com intensidade acentuada na região delimitadora e na porção central interna. **(B) Colágeno tipo III:** expressão positiva uniformemente acentuada em todo o ninho fibrótico. **(C) Picrosirius Red sob luz polarizada:** fibras amareladas de colágeno denso na região central e periférica, correspondentes à imunomarcção de colágeno tipo I. Fibras esverdeadas de colágeno frouxo predominantes no ninho fibrótico, refletindo o observado na imuno-histoquímica do colágeno tipo III. **(D)  $\alpha$ -SMA:** Imunomarcção acentuada de cinco camadas de miofibroblastos, padrão coincidente com a do colágeno tipo III. Revelação: DAB, contracoloração com Hematoxilina.



**FIGURA 18.** Fotomicrografia de endométrio equino. Endometrose inativa destrutiva. Comparativo entre técnicas imuno-histoquímicas e Picrosirius Red sob luz polarizada. **(A) Colágeno tipo I:** imunomarcacão positiva acentuada em todo o ninho fibrótico. **(B) Colágeno tipo III:** positividade mais intensa na área central do ninho fibrótico. Nas demais regiões do ninho, a positividade é discreta. **(C) Picrosirius Red sob luz polarizada:** predomínio de fibras amareladas de colágeno denso ao redor dos túbulos glandulares, correspondentes à imunomarcacão de colágeno tipo I. Fibras esverdeadas de colágeno frouxo discretas no ninho fibrótico, coincidindo com o imunomarcacão do colágeno tipo III. Picrosirius Red. **(D)  $\alpha$ -SMA:** Imunoexpressão discreta de células que circundam o ninho fibrótico, mais concentradas na porção central. Revelação: DAB, contracoloração com Hematoxilina.

## 6. DISCUSSÃO

A origem da endometriose não está ainda estabelecida, porém os dados obtidos até o momento permitem diferenciar conjuntos de alterações morfológicas sequenciais que indicam os estágios de evolução deste processo. A atuação dos miofibroblastos no suporte físico da glândula e o estresse mecânico exercido pela sua capacidade de contração já estão descritas como fatores importantes na origem do processo fibrótico endometrial. Além disto, estas células têm relação direta com a deposição de colágeno nas regiões onde estão presentes. No entanto, para o conhecimento das funções dos miofibroblastos nos processos fibróticos do endométrio, ainda se necessita de estudos mais amplos.

A avaliação histoquímica de biópsias endometriais consiste em um importante método para o diagnóstico preciso de processos degenerativos fibróticos (BLANCHARD et al., 1987). Na análise das biópsias deste estudo, a coloração de Tricrômico de Masson tornou mais evidente a deposição das fibras de colágeno pelo endométrio, principalmente nos casos de fibrose estromal difusa. Também facilitou a identificação dos ninhos fibróticos, embora estas alterações pudessem ser observadas pela coloração de Hematoxilina e Eosina.

Considerando a classificação das endometrioses de Hoffmann et al. (2009b), a coloração de Tricrômico de Masson revelou, nas endometrioses ativa e ativa destrutiva, septos colagenosos mais espessos no interior dos ninhos fibróticos, se comparados às endometrioses inativa e inativa destrutiva. No entanto, este achado ficou mais bem detalhado na coloração de Picrosirius Red sob luz polarizada, método histoquímico importante para avaliação do tipo de colágeno presente na fibrose endometrial equina (CALDINI, 1992).

Estudos prévios demonstraram, pela coloração de Picrosirius Red sob luz polarizada, que no processo fibrótico do endométrio equino ocorre a substituição gradativa do colágeno frouxo pelo colágeno denso, conforme aumenta o grau das lesões endometriais (NUNES, 2003; PORTO, 2006; MASSENO, 2012), concordando com os achados de Evans et al. (1998) e com o presente trabalho.

A técnica do Picrosirius Red demonstrou que não houve variação na distribuição das fibras colágenas estromais entre os diferentes tipos de endometriose descritas por Hoffmann et al. (2009), concordando com estudos anteriores (WALTER et al., 2001; MASSENO, 2012). Apenas as biopsias com fibrose intersticial difusa revelaram uma deposição acentuada e difusa de fibras de colágeno denso, por ser o estágio terminal do processo fibrótico endometrial.

Junqueira et al. (1978) especularam, para cortes histológicos de tecidos sadios ricos em colágeno, que as fibras amareladas na coloração de Picrosirius Red sob luz polarizada correspondem ao colágeno tipo I, enquanto que as esverdeadas correspondem ao colágeno tipo III.

Os cortes histológicos do endométrio hígido, quando submetidos à técnica histoquímica de Picrosirius Red e avaliados sob luz polarizada, revelaram distribuição difusa de fibras amareladas e esverdeadas, com um discreto predomínio destas últimas, especialmente no estrato compacto. Quando submetidos à técnica imuno-histoquímica dos colágenos tipos I e III, o padrão de marcação também foi difuso na lâmina própria. Este padrão dificultou a comparação entre as técnicas para verificação do tipo de colágeno, pela imuno-histoquímica, e a tonalidade de birrefringência, pela técnica de Picrosirius Red sob luz polarizada. Nos casos de endometriose, os focos fibróticos viabilizaram essa avaliação, uma vez que os tipos de fibras ficaram mais definidos e agrupados, tanto na referida técnica histoquímica quanto nas imuno-histoquímicas.

Em todos os tipos de endometriose, a região periglandular exibiu o predomínio do colágeno denso, de arranjo fibrilar. Nas endometroses ativa e ativa destrutiva, o tipo de colágeno predominante nas amostras submetidas ao Picrosirius Red e examinados sob luz polarizada na porção interna dos ninhos fibróticos é o que possui arranjo reticular, menos denso. Nas mesmas lesões, a marcação imuno-histoquímica na porção periglandular e na porção interna do ninho fibrótico foram mais intensas, respectivamente, para fibras de colágeno tipo I e tipo III. Em contrapartida, nas endometroses inativa e inativa destrutiva, nos cortes corados pela técnica de Picrosirius Red e examinados sob luz polarizada, o predomínio foi de fibras de colágeno denso inclusive no interior dos ninhos fibróticos, havendo a correspondência imuno-histoquímica para o

colágeno tipo I. Desta maneira, a hipótese pressuposta por Junqueira et al (1978), citada anteriormente, se confirma neste modelo de estudo de tecido patológico.

Em relação ao estudo da membrana basal, o PAS é uma técnica histoquímica amplamente utilizada, demonstrando grupamentos 1,2-glicol ou 1,2-aminoálcool presentes no glicogênio, muco e glicoproteínas (KIERSZENBAUM & TRES, 2011). O ácido periódico, um oxidante, converte esses grupamentos em aldeídos. O reagente de Schiff, uma fucsina incolor, reage com os aldeídos para formar um produto característico de cor púrpura-avermelhada (magenta). Dentre as estruturas PAS-positivas, está a membrana basal, rica em laminina, fibronectina e colágeno tipo IV (KIERSZENBAUM & TRES, 2011).

Após a proposta de classificação de Hoffmann et al. (2009b), apenas um trabalho com avaliação histoquímica da membrana basal foi publicado até o momento (HANADA et al., 2014). Estes pesquisadores observaram espessamento da membrana basal nas endometrioses ativas e ativas destrutivas, algumas vezes com rompimento da mesma. Os resultados do deste estudo concordaram com a da referida pesquisa, havendo nitidamente um espessamento e hialinização da membrana basal nas endometrioses ativas, que são agravados nas endometrioses ativas destrutivas. Nos processos inativos, observou-se o mantimento de sua espessura e, quando houve dilatação cística, um discreto espessamento quando comparados à membrana basal do endométrio hígido. Apesar da causa desse dano à membrana basal ainda ser desconhecida, acredita-se que seja o fator principal para a instalação da fibrose periglandular, já que ocorre alteração na deposição de componentes da matriz extracelular ao redor da membrana (HOFFMANN et al., 2009b). Contudo, o método de PAS não é capaz de identificar, especificamente, qual ou quais das glicoproteínas que compõem a membrana basal que respondem a esse processo e que a tornam mais espessa.

Até o momento, a detecção imuno-histoquímica do colágeno tipo IV no endométrio equino restringe-se a um estudo em biopsias endometriais saudáveis nas diversas fases do ciclo estral (MANSOUR et al., 2003), e a um único estudo relacionado a endometriose (WALTER et al., 2001). Entretanto, o nosso trabalho é o primeiro a relacionar a avaliação imuno-histoquímica do colágeno

tipo IV considerando as etapas da patogênese do processo proposto por Hoffmann et al. (2009b).

Quanto à associação deste método imuno-histoquímico à classificação das endometroses proposta por Hoffmann et al. (2009b), foi notado que os quatro tipos mantiveram um padrão de positividade semelhante ao do endométrio hígido, revelando o colágeno IV da membrana basal do epitélio luminal e glandular e vascular, apresentando-se delgada e fibrilar. De acordo com Walter et al. (2001), os miofibroblastos periglandulares liberam ativamente colágeno tipo IV no processo fibrótico, o que poderia explicar o espessamento da membrana basal observado na avaliação histoquímica. No entanto, neste estudo a avaliação imuno-histoquímica não revelou espessamento da camada de colágeno tipo IV. Ademais, Hoffmann et al. (2009b) detectaram, por imuno-histoquímica, uma alta deposição de laminina na membrana basal em endometroses ativas destrutivas, além da expressão intracelular desta glicoproteína nas células periglandulares. Estes achados podem justificar o espessamento da membrana basal observado pela técnica histoquímica de PAS do presente estudo, não estando relacionado ao espessamento de camadas de colágeno tipo IV.

Nas endometroses ativa destrutiva e inativa destrutiva, foram detectadas áreas de descontinuidade de fibras de colágeno tipo IV da membrana basal nos ninhos fibróticos. Este fato pode explicar a degeneração e necrose de células epiteliais que caracterizam esses dois tipos de endometrose, por haver uma quebra da interação destas células com a matriz extracelular por meio da membrana. Ainda, ratificam parcialmente os resultados obtidos pela técnica histoquímica de PAS de Hanada et al (2014), em que se constataram áreas de descontinuidade nos processos ativos. Essa concordância parcial provavelmente se deve pelo fato desses autores não levarem em consideração a característica “destrutiva” da classificação de Hoffmann et al. (2009b), mas apenas os tipos ativo e inativo.

No endométrio equino, os fibroblastos que circundam as glândulas uterinas fibróticas nas endometroses mostram forte imunorreatividade para  $\alpha$ -SMA. Diversos estudos avaliaram a expressão dessa proteína nos processos fibróticos endometriais equinos (WALTER et al., 2001; HOFFMANN et al., 2009b; MASSENO, 2012). Os miofibroblastos participam na síntese da matriz

extracelular e na produção de força mecânica, com influência na reorganização da matriz e na formação da fibrose periglandular (EVANS et al., 1998; RAILA, 2000; TOMASEK et al., 2002). Dessa forma, a expressão de  $\alpha$ -SMA pode ser observada principalmente em focos de fibrose ativa, onde há tensão mecânica e consequente dano à membrana basal e células epiteliais glandulares, em especial a endometrose ativa destrutiva (HOFFMANN et al., 2009b). Estes achados ficam evidentes quando comparado o espessamento da membrana basal, evidenciada pela técnica de PAS, com a alta expressão de  $\alpha$ -SMA nos ninhos fibróticos nos processos ativos.

No presente estudo, foi observado que as amostras de endometrose ativa destrutiva apresentaram maior expressão da, representando a maior parte das amostras fortemente positivas, em concordância com Hoffmann et al. (2009b) e Masseno (2012). As endometroses inativas apresentaram uma imunomarcção discreta, com até duas camadas de células positivas periglandulares. Esporadicamente, foi observada imunomarcção positiva para  $\alpha$ -SMA ao redor de glândulas que aparentemente não apresentavam sinais de fibrose ao exame histológico. Hanada et al. (2014) acreditam que esse achado pode ser importante na caracterização de estágios iniciais da endometrose ou para diagnosticar éguas que tenham predisposição à doença.

Quando se comparou a imunoexpressão de  $\alpha$ -SMA com a dos colágenos tipo I e III, percebeu-se que os ninhos fibróticos que revelaram um número maior de células positivamente marcadas, demonstraram forte imunorreatividade para colágeno tipo III. Já nas endometroses com imunomarcção de uma ou duas camadas delgadas de células positivas para  $\alpha$ -SMA, houve predominância de positividade para colágeno tipo I.

Tendo em vista a relação dos tipos de colágeno com a proposta de evolução do processo fibrótico endometrial proposto por Hoffmann et al. (2009b), postulamos que as endometroses ativas representem um processo fibrótico de características morfológicas e funcionais distintas das endometroses inativas. Isto se explica pelo envolvimento importante dos miofibroblastos nos primeiros, células metabolicamente ativas de alta capacidade pró-inflamatória e fibrogênica, que por sua vez estão relacionados à deposição de colágeno tipo III, frouxo. As endometroses inativas demonstraram uma baixa expressão de  $\alpha$ -SMA pelas células que circundam os

ninhos fibróticos e estão relacionados ao colágeno tipo I, denso. Então, entende-se que os fatores envolvidos nestes tipos de fibroses não estejam vinculados aos miofibroblastos, mas por outros fatores não elucidados até o momento. A predominância de colágeno tipo I em 16,67% das endometroses ativas, e a de colágeno tipo III em 25% das endometroses inativas, podem estar relacionadas ao processo de desenvolvimento e evolução do processo fibrótico, em que há a substituição gradativa do tipo de colágeno frouxo pelo denso.

Como postulado por Hoffmann et al. (2009b), tais achados sugerem que a proliferação de células estromais e sua diferenciação em miofibroblastos, assim como o aumento da síntese de matriz extracelular, respondem à ação sinérgica e autoinduzida de mediadores, resultando em fibrose periglandular. A concomitância do processo de endometrite seria uma das causas da ativação metabólica dos fibroblastos em miofibroblastos. Deve-se ressaltar que já se verificou que nos quadros graves de fibrose endometrial, células estromais periglandulares mostram índices apoptóticos menores (PORTO,2009). Este achado pode representar um mecanismo de perpetuação destas células no foco fibrótico, o que se relaciona a deposição gradativa de colágeno nestas áreas (PORTO, 2009; THANNICKAL, 2012). Rebordão et al. (2014) sugerem que diversos elementos relacionados à imunidade inata estão envolvidos no processo de estabelecimento da fibrose endometrial equina, como as redes extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps*, NET), ricas em elastase, mieloperoxidase e catepsina G; citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); e o conseqüente decréscimo de prostaglandina E<sub>2</sub>, que induz a um aumento da transcrição de fibras de colágeno tipo I. No entanto, os fatores que iniciam a fibrose inativa e sua progressão para a fibrose inativa destrutiva permanecem uma incógnita, necessitando de mais estudos para elucidação.

## 6.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nosso estudo pôde esclarecer que as fibras de colágeno frouxo, positivas para colágeno tipo III no método imuno-histoquímico, predominam na fase inicial do processo fibrótico, estando essa deposição associada à diferenciação e proliferação de células estromais em miofibroblastos periglandulares. No entanto, estudos mais específicos para detalhar as fases evolutivas da endometriose ainda são necessários a fim de elucidar a patogenia do processo, como por exemplo, a substituição de colágeno tipo III pelo colágeno tipo I, a identificação de fatores desencadeantes e perpetuantes da fibrose; e a evolução da endometriose inativa em inativa destrutiva. Desta forma, acreditamos que as investigações sobre as características evolutivas do processo de endometriose nas éguas, a partir de dados morfológicos, podem contribuir para a ampliação do conhecimento sobre os mecanismos do processo e sugerir ações terapêuticas que possam reverter, interromper ou retardar sua evolução.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ As fibras de colágeno denso correspondem ao colágeno tipo I, predominantes nas endometroses inativa e inativa destrutiva;
- ✓ As fibras de colágeno frouxo correspondem ao colágeno tipo III, predominantes nas endometroses ativas e ativas destrutivas;
- ✓ A endometrose ativa e, especialmente, ativa destrutiva, possuem uma maior quantidade miofibroblastos periglandulares que as endometroses inativa e inativa destrutiva;
- ✓ A membrana basal apresenta espessamento nas fibroses ativas, aparentemente não relacionado a um aumento de deposição de colágeno tipo IV;
- ✓ Nas fibroses destrutivas, a membrana basal apresenta áreas de descontinuidade da fibra de colágeno tipo IV;
- ✓ Os miofibroblastos nos processos ativos estão fortemente relacionados ao aumento na deposição de colágeno tipo III nos ninhos fibróticos.

## 8. REFERÊNCIAS

AITKEN, G. J. Subclinical fungal endometritis in an 8-year-old Hanoverian mare. **Canadian Vet Journal**, v. 53, n.2, p. 196-198. 2012.

AUGSBURGER, H. R.; HENZI, D. Immunohistochemical expression of collagen types I, III, IV and  $\alpha$ -actin in the uterine horns of nulliparous and multiparous beagles. **Theriogenology**, v. 69, p.1070–1076, 2008.

BERNDT, A.; KOSMEHL, H.; KATENKAMP, D.; TAUCHMANN, V. Appearance of the myofibroblastic phenotype in Dupuytren's disease is associated with a fibronectin, laminin, collagen type IV and tenascin extracellular matrix. **Pathobiology**, v. 62, p. 55–58, 1994.

BLANCHARD, T.L.; GARCIA, M.C.; KINTNER, L.D.; KENNEY, R.M. Investigations of representativeness of a single endometrial sample and the use of trichrome staining to aid in the detection of endometrial fibrosis in the mare **Theriogenology**, v. 28, p. 445–450, 1987.

BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. **New England Journal of Medicine**, v. 331, p.1286-1292, 1994.

BRUNER, K.L.; RODGERS, W.H.; GOLD, L.I.; KORC, M.; HARGROVE, J.T.; MATRISIAN, L.M.; OSTEEEN, K.G. Transforming growth factor  $\beta$  mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 7362-7366, 1995.

CALDINI, E. T. E. G. **Estudo histoquímico e ultra-estrutural do colágeno na fibrose periglandular do endométrio equino**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

CARRASCO, F.H.; MONTES, G.S.; KRISZTAN, R. M.; SHIGIHARA, K. M.; CARNEIRO, J. & JUNQUEIRA, L. C. U. Comparative morphologic and

histochemical studies on the collagen of vertebrate arteries. **Blood vessels**, v.18, p. 296, 1981.

EVANS T. J.; MILLER, M. A.; GANJAM, V. K; NISWENDER, K. D; ELLERSIECK, M. R; KRAUSE, W. J; YOUNGQUIST, R. S. Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n.10, p.1209-1214, 1998.

GANJAM, V.K.; EVANS, T. J. Equine endometrial fibrosis correlates with 11beta-HSD2, TGF-beta1 and ACE activities. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.27, n. 248, p.104-108, 2006.

GAY, S.; BALLEISEN, L.; REMBERGER, K.; FIETZEK, P.P; ADELMANN, B. C.; KUHN, L. Immunohistochemical evidence for the presence of collagen type III in human arterial walls, arterial thrombi, and in leukocytes incubated with collagen in vitro. **Klinische Wochenschrift**, n. 53, p.899-902, 1975.

HANADA, M.; MAEDA, Y.; OIKAWA, M. Histopathological characteristics of endometrosis in throughbred mares in Japan: results from 50 necropsy cases. **Journal of Equine Science**, v. 25, n. 2, p. 45–52, 2014.

HANAMURA, N.; YOSHIDA, T.; MATSUMOTO, E.; KAWARADA, Y.; SAKAKURA, T. Expression of fibronectin and tenascin-c mRNA by myofibroblasts, vascular cells and epithelial cells in human colon adenomas and carcinomas. **International Journal of Cancer**, v. 73, p.10–15, 1997.

HINZ, B.; PHAN, S. H.; THANNICKAL, V. J.; GALLI, A; PIALLAT, M.L.B.; GABBIANI, G. The myofibroblast: One function, multiple origins. **American Journal of Pathology**, n.170, p.1807–1816, 2007.

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

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

JUNQUEIRA, L.C.U., COSSERMELLI, W., BRENTANI, R.R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Archivum Histologicum Japonicum**, v.41, p.267-274, 1978.

JUNQUEIRA, L. C. U. MONTES, G. S.; KRISZTAN, R. M. The collagen of the vertebrate peripheral nervous system. **Cell and Tissue Research**, n.202, p.453-460, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U. MONTES, G. S. Biology of collagen – proteoglycan interaction. **Archivum Histologicum Japonicum**, n.46, p.589-629, 1983.

KENNE, D. R.; SAKAI, L. Y.; BACHINGER, H. P.; BURGESSON, R. E. Type III collagen can be present on bander collagen fibrils regardless of fibril diameter. **Journal of Cell Biology**, n.105, p.2393-2402, 1987.

KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.172, p. 241-262, 1978.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. in: MORROW, D.A. (ed.). **Current therapy in theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders, p. 723-729, 1986.

KILGENSTEIN, H.J; SCHÖNIGER, S.; SCHOON, D.; SCHOON, H.A. Microscopic examination of endometrial biopsies of retired sports mares: An explanation for the clinically observed subfertility? **Research in Veterinary Science**, v.99, p.171-179, 2015.

KIERSZENBAUM, A. L; TRES, L.L. **Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology**. 3ed., Editora Elsevier, 720p, 2011.

KUPPEVELT, T. H. V.; VEERKAMP J. H.; TIMMERMANS, J. A. H. Immunoquantification of Type I, III, IV and V collagen in small samples of

human lung parenchyma. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 27, n. 8, p. 775-782, 1995.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. **The measurement of observer agreement for categorical data**. *Biometrics*, Cap.33: 159-174, 1977.

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

LUDWIG, S.; SCHOON, D.; AUPPERLE, H.; VON REISWITZ, A.; SCHOON, H. A. Angiopathies in the equine endometrial biopsy - a marker for extrauterine vascular lesions? **Pferdeheilkunde**, v. 17, p. 608–614, 2001.

LUNA, L.G. **Manual of histological staining methods of armed forces institute of pathology**. 1. ed., Washington, Editora MacGraw Hill, 258p, 1968.

MAMBELLI, L.I.; WINTER, G.H.Z.; KERKIS, A.; MALSCHITZKY, E.; MATTOS, R.C.; KERKIS, I. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometrosis. **Theriogenology**, p.1–7, 2012.

MANSOUR, G. D.; HENRY, M.; FERREIRA, A. M. R. Immunohistochemical Study of Equine Endometrial Extracellular Matrix during the Oestrous Cycle. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, n. 4, p.316–319, 2003.

MASSENSO, 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. 95p.

MASSENSO, A.P.B. **Avaliação da fibrose endometrial e dos miofibroblastos nas endometroses ativa e inativa das éguas**. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012. 95p.

MASSENO, A.P.B.; PORTO, C.D.; NUNES, L.C.; SEQUEIRA, J.L.; ALVARENGA, M.A. Miofibroblastos: revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.2, p.177-190, 2010.

MEIGEL, W. N.; GAY, S.; WEBER, L. Dermal architecture and collagen type distribution. **Archive for Dermatological Research**, n.259, v.1, p.1-10, 1977.

MENKER, A.; ADLER, G. TGF $\beta$ -induced fibrogenesis of the pancreas. **International Journal of Gastrointestinal Cancer**, v.31, p.41-46, 2002.

MONTES, G. S.; KRISZTAN, R. M.; SHIGIHARA, K. M.; TOKORO, R.; MOURÃO, P.A.S.; JUNQUEIRA, L. C. U. Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. **Histochemistry**, n.65, p.131-141. 1980.

MONTES, G. S.; COTTA-PEREIRA, G.; JUNQUEIRA, L. C. U. The connective tissue matrix of the vertebrate peripheral nervous system, p. 177. In: S. Fedoroff. **Advances in Cellular Neurobiology**, Vol 5, Academic Press, New York. 1984.

MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C.U. The use of the picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, p. 1-11, 1991.

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. 99p.

NUNES, L. C. **Avaliação da expressão de metaloproteinases, TIMP-1 da esclerose vascular nas endometrites das éguas**. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006. 108p.

PETROV, V. V.; FAGARD, R. H.; LIJNEN, P. J. Stimulation of collagen production by transforming growth factor- $\beta$ 1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. **Hypertension**, v.39, p.258–263, 2002.

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. 101p.

PORTO, C. D. **Expressão de TGF- $\beta$ 1, metaloproteinases e avaliação dos índices de proliferação celular e apoptóticos nas endometrites crônicas das éguas.** Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009. 124p.

RAILA G. ZUR Pathogenese der Endometrose der Stute. **Morphologisch-funktionelle Untersuchungen** Dissertação (mestrado) - Universität Leipzig, Leipzig, 2000. 173p.

REBORDÃO, M.R.; GALVÃO, A.; SZÓSTEK, A.; AMARAL, A.; MATEUS, L.; SKARZYNSKI, D.J.; FERREIRA-DIAS, G. Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 49 n. 4, p. 82–87, 2014.

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

SAPPINO, A. P.; SCHÜRCH, W.; GABBIANI, G. Biology of disease. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as a marker of phenotypic modulations. **Laboratory Investigation**, v. 63, p.144–161, 1990.

SCHLAFER, D. H. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? **Theriogenology**, v.68, p.413–422, 2007.

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

SCHMITT-GRAF, A.; DESMOULIÈRE, A.; GABBIANI, G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity **Virchows Archiv**, v.425, p. 3–24, 1994.

SNIDER, T.A.; SEPOY, C.; HOLYOAK, G.R. Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation and application of histopathologic data. **Theriogenology**, n.75, p.1567–1581, 2011.

TAJIMA, S.; NAGAI, Y. Distribution of macromolecular components in calf dermal connective tissue. **Connective Tissue Research**, n.7, p.65-71, 1980.

TEKGUL S.; YOSHINO K.; BAGLI D.; CARR, M. C.; MITCHELL, M. E.; YAO, L. Y. Collagen types I and I11 localization by in situ hybridization and immunohistochemistry in the partially obstructed young rabbit bladder. **The Journal of Urology**, v. 156, p. 582-586, 1996.

THANNICKAL, V.J. Mechanisms of pulmonary fibrosis: role of activated myofibroblasts and NADPH oxidase. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v.5, n.23, 2012.

TROEDSSON, M. H.; DEMORAES, M. J.; LIU, I. K. Correlations between histologic endometrial lesions in mares and clinical response to intrauterine exposure with *Streptococcus zooepidemicus*. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, p.570 –572, 1993.

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

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 endometriosis. **Histology and Histopathology**, v.20, n.4, p.1105-1113, 2005.

WITTE, T.S., MELKUS, E.; WALTER, I.; SENGE, B.; SCHWAB, S.; AURICH, C.; HEUWIESER, W. Effects of oral treatment with N-acetylcysteine on the

viscosity of intrauterine mucus and endometrial function in estrous mares. **Theriogenology**, v.78, n.6, p.1199-1208, 2012.

WOODWARD, E.M.; CHRISTOFFERSEN, M.; CAMPOS, J.; SQUIRES, E.L.; TROEDSSON, M. H. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. **Theriogenology**, v.78, n.3, p.495-501, 2012.

ZHANG, K.; REKHTER, M.D.; GORDON, D.; S.H. PHAN. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and *in situ* hybridization study. **American Journal of Pathology**, v.145, p.114–125, 1994.

## 9. ANEXOS

**ANEXO 1.** Análise de concordância entre as técnicas imuno-histoquímicas dos tipos de colágeno e técnica histoquímica de Picrosirius Red sob luz polarizada.

	IMUNO-HISTOQUÍMICA COLÁGENO	PICROSIRIUS RED SOB LUZ POLARIZADA		TOTAL
	Tipo	Fibras amareladas	Fibras esverdeadas	
	<b>I</b>			
Frequência		<b>6</b>	<b>2</b>	<b>8</b>
Percentual		25,00	8,33	<b>33,33</b>
Porcentagem linha		75,00	25,00	
Porcentagem coluna		75,00	12,50	
	<b>III</b>			
Frequência		<b>2</b>	<b>14</b>	<b>16</b>
Percentual		0,00	58,33	<b>66,67</b>
Porcentagem linha		0,00	87,50	
Porcentagem coluna		0,00	87,50	
<b>TOTAL</b>		<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>
		33,33	66,67	100,00

Coeficiente Kappa Simples	
<b>Kappa</b>	0,625
<b>P-valor geral</b>	0,002
<b>Intervalo inferior de 95% de confiança do Kappa</b>	0,225
<b>Intervalo superior de 95% de confiança do Kappa</b>	1,000

**ANEXO 2.** Análise de concordância entre as técnicas imuno-histoquímicas dos tipos de colágeno e  $\alpha$ -SMA.

	IMUNO-HISTOQUÍMICA $\alpha$ -SMA	IMUNO-HISTOQUÍMICA COLÁGENO		TOTAL
	Expressão	Tipo I	Tipo III	
	<b>Baixa</b>			
Frequência		<b>8</b>	<b>8</b>	<b>16</b>
Percentual		33,33	33,33	<b>66,66</b>
Porcentagem linha		50,00	50,00	
Porcentagem coluna		50,00	50,00	
	<b>Alta</b>			
Frequência		<b>0</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
Percentual		0,00	33,33	33,33
Porcentagem linha		0,00	100,00	
Porcentagem coluna		0,00	50,00	
<b>TOTAL</b>		<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>
		33,33	66,67	100,00

Coeficiente Kappa Simples	
<b>Kappa</b>	0,400
<b>P-valor geral</b>	0,140
<b>Intervalo inferior de 95% de confiança do Kappa</b>	0,080
<b>Intervalo superior de 95% de confiança do Kappa</b>	0,720

**ANEXO 3.** Intervalos de valores do coeficiente Kappa e respectivas qualidades de concordância.

<b>Valores de Kappa</b>	<b>Interpretação</b>
<0	Discordância
0-0,19	Concordância baixa
0,20-0,39	Concordância considerável
0,40-0,59	Concordância moderada
0,60-0,79	Concordância substancial
0,80-1,00	Concordância quase perfeita

Fonte: Landis &amp; Koch (1977).

**10. ARTIGO CIENTÍFICO A SER ENVIADO PARA A REVISTA “ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences”**

**IDENTIFICAÇÃO DOS COLÁGENOS I, III, IV E  $\alpha$ -SMA E A PARTICIPAÇÃO DOS MIOFIBROBLASTOS NO PROCESSO FIBRÓTICO DAS ENDOMETROSES EQUINAS**

**IDENTIFICATION OF COLLAGENS TYPES I, III, IV AND  $\alpha$ -SMA AND THE PARTICIPATION OF MYOFIBROBLASTS IN THE FIBROTIC PROCESS IN MARES ENDOMETROSIS**

Leonardo Dourado da COSTA<sup>1</sup>, Julio Lopes SEQUEIRA<sup>2</sup>, Marianne Camargos DIAS<sup>1</sup>, Marco Antônio ALVARENGA<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Pós-graduando do curso de Mestrado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Professor Assistente Doutor do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Professor Adjunto Doutor do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Endereço:

Julio Lopes Sequeira

Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,  
Departamento de Clínica Veterinária, Caixa Postal 560, Distrito de Rubião Júnior,  
Botucatu, SP, CEP 18618-970.

## RESUMO

A endometriose é uma alteração degenerativa das glândulas uterinas e do estroma circundante, caracterizada pelo arranjo periglandular de miofibroblastos e a deposição de matriz extracelular (ECM). O presente trabalho objetivou avaliar a expressão de colágeno tipo I, III e IV e  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) nas endometroses equinas, procurando esclarecer a participação dos miofibroblastos na progressão destes processos. Foram utilizadas 24 biópsias uterinas com diagnóstico de endometriose, recebidas pelo Serviço de Patologia Veterinária e de Reprodução Animal da FMVZ, UNESP, Botucatu, SP. Cortes histológicos foram submetidos às técnicas histoquímicas de Tricrômico de Masson, Picrosirius Red sob luz polarizada e Ácido Periódico de Schiff (PAS) e imuno-histoquímicas para os três tipos de colágeno citados e  $\alpha$ -SMA. Ainda, traçou-se um paralelo entre a técnica de Picrosirius Red e a imunomarcagem dos colágenos tipos I e III. A análise histológica revelou que as fibras de colágeno denso correspondem ao colágeno tipo I, predominantes nas endometroses inativa e inativa destrutiva. As fibras de colágeno frouxo correspondem ao colágeno tipo III, predominantes nas endometroses ativas e ativas destrutivas. Nestes mesmos processos, a membrana basal revelou espessamento, aparentemente não relacionado ao colágeno tipo IV, e uma maior imunomarcagem de miofibroblastos periglandulares em relação às endometroses inativa e inativa destrutiva. Desta forma, nota-se que os miofibroblastos estão relacionados ao aumento na deposição de colágeno tipo III nos ninhos fibróticos ativos.

**Palavras-chave:** endometriose, égua, colágeno, miofibroblastos, imuno-histoquímica.

## ABSTRACT

Endometriosis is a degenerative change of the uterine glands and surrounding stroma, characterized by periglandular arrangement of myofibroblasts and deposition of extracellular matrix (ECM). The aim of this study was evaluate the expression of collagen type I, III and IV and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in equine endometroses, and investigate the role of myofibroblasts in the progression of these processes. A parallel was made with histochemical techniques of Masson's trichrome, Picrosirius Red under polarized light and Periodic Acid-Schiff (PAS). Twenty four uterine biopsies received by the Veterinary Pathology Service and Animal Reproduction of FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, were diagnosed with endometriosis. Histological analysis

revealed that the orange dense collagen fibers correspond to type I collagen, being prevalent in inactive and inactive destructive endometrosis. And the green loose collagen fibers correspond to type III collagen, and are predominant in active and active destructive endometrosis. In the same processes, a greater amount of periglandular myofibroblasts were observed in comparison to inactive and inactive destructive endometrosis. The presence of these cells in active processes are strongly related to an increased deposition of collagen type III in fibrotic nests. Regarding the basement membrane, the active destructive and active endometrosis shows thickening, apparently not related to an increase in expression of type IV collagen. The active destructive and inactive destructive endometrosis exhibited disruption areas in type IV collagen fibers. Thus, it is noted that the myofibroblasts are related to increased deposition of type III collagen in active fibrotic nests.

**Keywords:** endometrosis, mare, collagen, myofibroblasts, immunohistochemistry.

## INTRODUÇÃO

A endometrose é uma alteração degenerativa das glândulas uterinas e do estroma circundante, associada à idade e diretamente relacionada com problemas de fertilidade em éguas (RICKETTS & ALONSO, 1991). O arranjo periglandular de miofibroblastos e a deposição de matriz extracelular (ECM) são características importantes da endometrose (WALTER et al., 2001). Durante o desenvolvimento destes processos, os fibroblastos expressam vários fatores de diferenciação musculares, como alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), tropomiosina e desmina, e foram, portanto, identificados como miofibroblastos (SAPPINO et al., 1990). Além disso, os miofibroblastos expressam também várias proteínas da ECM, como fibronectina, laminina, colágeno tipo IV e tenascina (HANAMURA et al., 1997).

A presença deste tipo celular já havia sido descrita anteriormente nas amostras de endométrio equino fibrótico examinadas por microscopia eletrônica de transmissão (EVANS et al., 1998). Os miofibroblastos contribuem para a alteração das propriedades do tecido afetado, havendo evidências de que a produção de colágeno pelos fibroblastos seja uma consequência da diferenciação destes em miofibroblastos (PETROV et al., 2002). No endométrio equino fibrótico, mais especificamente nos quadros de endometrose, células que expressam características de miofibroblastos são observadas ao redor de glândulas dilatadas e não dilatadas, sendo uma incógnita a sua função nestes

casos, já que não está claramente definido a partir de que estágio da lesão elas são observadas (MASSENO et al., 2010).

A etiologia e a patogenia da endometriose são desconhecidas. Uma hipótese concebida para a patogênese da endometriose baseia-se nos achados morfológicos e estabelece as fases de evolução do processo fibrótico, denominando-as, de forma sequencial, como fibrose ativa, fibrose ativa destrutiva, fibrose inativa e fibrose inativa destrutiva (HOFFMANN et al., 2009).

Hoffmann et al. (2009) sugerem que a proliferação de células estromais e sua diferenciação em miofibroblastos, assim como o aumento da síntese de ECM, respondem à ação sinérgica e auto-induzida de mediadores, resultando em fibrose periglandular. Além disso, a capacidade dos miofibroblastos para liberar várias enzimas que regulam a homeostase da ECM pode contribuir para a destruição progressiva da lâmina basal, resultando em um acúmulo dessa matriz, o que por sua vez é capaz de manter o processo fibrótico (WALTER et al., 2001). Ademais, Hanada et al. (2014) postulam que a presença de células epiteliais degeneradas ou necróticas se deve, principalmente, ao dano causado à membrana basal, resultando em contato direto entre as células estromais e epiteliais, bem como a interações entre a ECM fibrótica e células epiteliais glandulares. A partir da interação desses diversos fatores, a concomitância do processo de endometrite seria uma das causas da ativação metabólica das células estromais fibróticas (HOFFMANN et al., 2009).

Um método histoquímico utilizado para a avaliação do tecido conjuntivo é o Picosirius Red, que diferencia os tipos de colágeno pela birrefringência das fibras em microscópio óptico de luz polarizada. Assim, diferentes tonalidades são observadas conforme o tipo de arranjo molecular presente (JUNQUEIRA et al., 1978). Entretanto, no início do desenvolvimento deste método, ficou evidente que a espessura do corte histológico é de grande importância na cor e intensidade da birrefringência exibida pelo colágeno. Essa é a razão pela qual não se correlacionou uma especificidade entre a coloração de Picosirius Red e os diferentes tipos de colágeno (JUNQUEIRA et al., 1978).

Estudos imuno-histoquímicos para tipificação das fibras de colágeno ainda são escassos no que diz respeito ao endométrio equino. Até o momento, a tipificação do colágeno endometrial nas éguas restringe-se a detecção da presença do colágeno tipo IV nas diversas fases do ciclo estral (MANSOUR et al., 2003) e a um único estudo que

relaciona esta tipificação a endometriose (WALTER et al., 2001), porém sem considerar as etapas da patogênese do processo (HOFFMANN et al., 2009).

Deve-se ressaltar que os diferentes métodos utilizados para a determinação da distribuição e das características do colágeno presente no endométrio fibrótico tem levado a resultados discrepantes. Os autores que utilizaram o método do Picrosirius Red sob luz polarizada relatam que a fibrose periglandular está associada ao aumento da quantidade de colágeno fibrilar periglandular (EVANS et al., 1998). Porém, quando o método imuno-histoquímico foi empregado, o tipo de colágeno observado na fibrose ao redor das estruturas glandulares, inclusive envolvendo as células estromais da região, foi o do tipo IV, tipo este restrito a membrana basal (WALTER et al., 2001).

Assim sendo, o entendimento do processo de evolução da endometriose depende do reconhecimento morfológico do tipo de reação envolvida e dos elementos que a compõem. As discrepâncias nos resultados obtidos pelos diferentes autores podem ser esclarecidas pela comparação dos métodos morfológicos de análise do colágeno periglandular. Além disso, a participação dos miofibroblastos e sua relação com o tipo de colágeno presente, nas diferentes etapas que tem sido consideradas no processo de endometriose, podem auxiliar não só na compreensão da fibrose endometrial, mas também futuramente na pesquisa de linhas terapêuticas.

O presente trabalho objetiva avaliar as lesões fibróticas endometriais, identificando o tipo de colágeno presente e a participação dos miofibroblastos nos tipos de endometriose propostos por Hoffmann et al (2009b), procurando estabelecer a relação entre a matriz e os tipos celulares em cada etapa do processo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

No presente estudo, foram utilizadas 24 biópsias endometriais com diagnóstico de endometriose, provenientes dos arquivos do serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu – SP.

Todas as biópsias foram submetidas ao mesmo tipo de processamento laboratorial. Fixação em Bouin e inclusão em parafina. Foram obtidos cortes de quatro micrômetros de espessura dos blocos, e corados pelos métodos de Hematoxilina & Eosina, Tricrômico de Masson, Picrosirius Red e Ácido Periódico de Schiff (PAS). A identificação das alterações endometriais e a classificação das lesões seguiram as

descrições de Hoffmann et al (2009b), utilizando endométrios sadios como controle, obedecendo-se os critérios de Kenney & Doig (1986).

Para a detecção de colágenos I, III e IV, realizou-se recuperação antigênica por digestão enzimática em pepsina 1%, pH 1,8 (Pepsina 1:10.000 NF- Nuclear, SP, Brasil). As etapas seguintes foram o bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 3% e bloqueio de sítios inespecíficos com leite desnatado a 3%. Realizou-se a incubação com 100µL do anticorpo primário, na diluição de 1:2000, para colágeno tipo I (coelho anti-colágeno I bovino, IgA, Ref. 20121, Novotec, França); 1:1000, para colágeno tipo III (coelho anti-colágeno III bovino, IgA, Ref. 20321, Novotec, França); e 1:500, para colágeno tipo IV (coelho anti-colágeno IV humano, IgG, ab115261, Abcam, Reino Unido) em câmara úmida, durante 18h, à temperatura de 4°C.

Nos cortes em que foram aplicados o anticorpo anti- $\alpha$ -SMA, a recuperação antigênica foi feita sob calor úmido em Pascal (Dako, S2800-1) com Citrato a 10mM, pH 6,0. Em seguida, realizou-se o bloqueio de ligações inespecíficas com leite desnatado a 3%. Em seguida, aplicou-se 100µL do anticorpo anti- $\alpha$ -SMA (cod. M0851, Clone 1A4, Dako), na diluição de 1:1250 com tempo de incubação de 18 horas em câmara úmida a 4°C.

Posteriormente, todos os cortes foram incubados com o anticorpo secundário HistoFine® (Nichirei Bioscience, Japão), segundo instruções do fabricante. Finalmente, realizou-se revelação com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina - Liquid DAB Cromogen® – Dako, EUA). As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris.

Para avaliação dos cortes histológicos submetidos ao anticorpo anti- $\alpha$ -SMA, os parâmetros considerados foram positividade de imunomarcção e a quantidade de camadas celulares periglandulares positivas, associando ao tipo de endometrose estabelecida.

Para o estudo da distribuição dos tipos de fibras colágenas, foram analisadas a intensidade e a localização de fibras positivas para colágeno tipo I, III e IV, considerando os ninhos fibróticos, o estrato compacto e o esponjoso, utilizando o endométrio hígido como grupo controle. Posteriormente, em cada biopsia, foi determinada a predominância do tipo de colágeno imunomarcado para cada tipo descrito na classificação de endometrose proposta por Hoffmann et al (2009), obtendo-se a concordância estatística com os resultados histoquímicos do Picrosirius Red sob luz polarizada (coloração verde ou vermelho-alaranjada); e expressão imuno-histoquímica

da  $\alpha$ -SMA pelas células presentes nos ninhos fibróticos. Para isso, o coeficiente Kappa foi calculado para analisar a concordância entre os resultados obtidos entre as técnicas, utilizando o software SAS, Versão 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC. 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a classificação histológica proposta por Hoffmann et al. (2009), dos 24 casos de endometrose diagnosticados, seis foram inclusos na classificação de endometrose ativa (25%); quatro na endometrose inativa (17%); sete na endometrose ativa destrutiva (29%); e sete como endometrose inativa destrutiva (29%). A Tab.1 detalha os resultados obtidos na avaliação de cada parâmetro.

**Tabela 1.** Número de casos de cada parâmetro avaliado e a respectiva porcentagem em relação aos tipos de endometrose.

Endometrose	Nº de casos	Predomínio colágeno frouxo (PRSLP)	Predomínio colágeno denso (PRSLP)	Predomínio colágeno tipo I (IHQ)	Predomínio de colágeno tipo III (IHQ)	Baixa expressão de $\alpha$ -SMA (IHQ)	Alta expressão de $\alpha$ -SMA (IHQ)
Ativa	6 (25%)	5 (83%)	1 (16,67%)	1 (16,67%)	5 (83,33%)	4 (66,66%)	2 (33,33%)
Ativa destrutiva	7 (29%)	7 (100%)	0	1 (14,28%)	6 (85,71%)	2 (28,57%)	5 (71,42%)
Inativa	4 (17%)	2 (50%)	2 (50%)	3 (75,00%)	1 (25,00%)	4 (100%)	0
Inativa destrutiva	7 (29%)	2 (28%)	5 (72%)	3 (42,85%)	4 (57,14%)	6 (85,71%)	1 (14,28%)
<b>TOTAL</b>	<b>24 (100%)</b>	<b>16 (66,67%)</b>	<b>8 (33,33%)</b>	<b>8 (33,33%)</b>	<b>16 (66,67%)</b>	<b>16 (66,67%)</b>	<b>8 (33,33%)</b>

PRSLP: Picrosirius Red sob luz polarizada; IHQ: Imuno-histoquímica.

Nos cortes corados pela técnica histoquímica de Tricrômico de Masson, foi observado que, nas endometroses ativas, os ninhos fibróticos revelaram fibras colágenas de espessura maior em relação às inativas.

Nas biópsias classificadas como endometrose ativa, os cortes corados pela técnica de Picrosirius Red e examinados sob luz polarizada revelaram que em 83% destas amostras, observou-se a predominância de fibras de colágeno do tipo frouxo por entre os túbulos glandulares no interior dos ninhos fibróticos. As amostras classificadas como endometrose inativa se caracterizaram por glândulas dilatadas com aspecto cístico, delineadas por fibras colágenas predominantemente densas em 75% destes

casos, tanto na porção periglandular quanto no interior dos ninhos fibróticos. Todos os casos diagnosticados como endometrose ativa destrutiva apresentaram deposição de colágeno frouxo predominante na porção interna dos ninhos fibróticos. Já ao redor dos ninhos, o colágeno do tipo denso predominou. Nas amostras de endometrose inativa destrutiva, houve predominância de colágeno do tipo denso na região periglandular e interna dos ninhos fibróticos, correspondendo a 72% destes casos. Ainda, foi observada uma deposição discreta de colágeno frouxo periglandular.

Quanto à técnica histoquímica de PAS, foi observado que, nas endometroses ativas e ativas destrutivas, a marcação histoquímica da membrana basal das glândulas contidas nos ninhos fibróticos se deu em uma tonalidade púrpura, exibindo um espessamento considerável quando comparada às endometroses inativas e inativas destrutivas. Nestas, foram observadas apenas estrias róseas delgadas e fibrilares.

Para a avaliação imuno-histoquímica, o endométrio hígido foi utilizado como controle positivo. A imunoposição de colágeno tipo I nestas amostras revelou-se difusamente no estroma, principalmente no estrato esponjoso. No estrato compacto, a imunomarcação foi discreta.

De forma geral, nas endometroses houve imunomarcação moderada e difusa de colágeno tipo I nos estratos compacto e esponjoso, não diferindo do endométrio hígido. Considerando a positividade nos ninhos fibróticos, oito biopsias apresentaram predominância deste tipo de colágeno, representando 25% das amostras. Destas oito, três eram endometrose inativa; três inativas destrutivas; uma ativa e uma ativa destrutiva. Nas endometroses ativa e ativa destrutiva, notou-se uma imunomarcação discreta nas fibroses periglandulares quando comparada às endometroses inativa e inativa destrutiva, que revelaram marcação acentuada.

Assim como o colágeno tipo I, no endométrio hígido, a imunomarcação do colágeno tipo III apresentou-se difusa nos estratos compacto e esponjoso. As biopsias com diagnóstico de endometrose apresentaram, bem como o grupo controle, imunomarcação difusa. Dezesesseis biopsias (66,66%) revelaram predominância deste tipo de colágeno na porção interna dos ninhos fibróticos. Seis ativas destrutivas; cinco ativas; quatro inativas destrutivas; e uma inativa. Nas endometroses ativa e ativa destrutiva, foi detectada uma imunomarcação acentuada por entre as glândulas contidas no interior dos ninhos fibróticos. Já nas endometroses inativa e inativa destrutiva, a marcação restringiu-se à porção delimitadora do ninho fibrótico.

Tanto o endométrio hígido quanto as endometroses exibiram imunomarcção para o colágeno tipo IV restrito à membrana basal do epitélio luminal e glandular e de vasos sanguíneos. Nas amostras de endometrose, não foram observadas alterações de espessamento da camada de colágeno tipo IV da membrana basal. No entanto, nas endometroses ativa destrutiva e inativa destrutiva, foram observadas áreas de descontinuidade da fibra de colágeno tipo IV da membrana basal das glândulas contidas nos ninhos fibróticos.

A imunopositividade para  $\alpha$ -SMA no endométrio hígido demonstrou-se restrita à parede de vasos sanguíneos. Nas endometroses, além dos vasos sanguíneos foi observada marcação positiva na região periglandular fibrótica de todas as biopsias. Considerando as células positivas na região periglandular, dezesseis biopsias (66,67%) apresentaram imunomarcção discreta, apresentando uma ou duas camadas de células, em glândulas individualizadas e por vezes em ninhos fibróticos, sendo seis inativas destrutivas; quatro inativas; duas ativas destrutivas; e quatro ativas. Oito biopsias revelaram imunomarcção acentuada (33,33%), chegando até oito camadas de células periglandulares, sendo cinco ativas destrutivas; duas ativas; uma inativa destrutiva e zero inativa.

As técnicas imuno-histoquímicas para colágenos tipo I e III apresentaram bom índice de concordância com a técnica histoquímica de Picosirius Red sob luz polarizada (coeficiente Kappa = 0,625). Quando comparada as mesmas técnicas imuno-histoquímicas com a de  $\alpha$ -SMA, o índice de concordância foi considerável (coeficiente Kappa = 0,400).

Considerando a classificação das endometroses de Hoffmann et al. (2009), na coloração de Tricrômico de Masson, as endometroses ativa e ativa destrutiva exibiram, no interior dos ninhos fibróticos, septos colagenosos mais espessos, se comparados às endometroses inativa e inativa destrutiva. No entanto, este achado ficou mais bem detalhado na coloração de Picosirius Red sob luz polarizada. Esta técnica demonstrou que não houve variação na distribuição das fibras colágenas estromais entre os diferentes tipos de endometrose descritas por Hoffmann et al. (2009), concordando com estudos anteriores (WALTER et al., 2001). Apenas as biopsias com fibrose intersticial difusa revelaram uma deposição acentuada e difusa de fibras de colágeno denso.

Em todos os tipos de endometrose, a região periglandular exibiu o predomínio do colágeno denso, de arranjo fibrilar. Nas endometroses ativa e ativa destrutiva, o tipo de colágeno predominante nas amostras submetidas ao Picosirius Red e examinados

sob luz polarizada na porção interna dos ninhos fibróticos é o que possui arranjo reticular, menos denso. Nas mesmas lesões, a marcação imuno-histoquímica na porção periglandular e na porção interna do ninho fibrótico foram mais intensas, respectivamente, para fibras de colágeno tipo I e tipo III. Em contrapartida, nas endometrioses inativa e inativa destrutiva, nos cortes corados pela técnica de Picosirius Red e examinados sob luz polarizada, o predomínio foi de fibras de colágeno denso inclusive no interior dos ninhos fibróticos, havendo a correspondência imuno-histoquímica para o colágeno tipo I. Desta maneira, se confirma neste modelo de estudo de tecido patológico a hipótese pressuposta por Junqueira et al (1978), que especularam, na avaliação de cortes histológicos, pela técnica de Picosirius Red sob luz polarizada, de tecidos sadios ricos em colágeno, que as fibras amareladas observadas correspondem ao colágeno tipo I, enquanto que as esverdeadas correspondem ao colágeno tipo III.

Tendo em vista a relação dos tipos de colágeno com a proposta de evolução do processo fibrótico endometrial proposto por Hoffmann et al. (2009b), postulamos que as endometrioses ativas representem um processo fibrótico de características morfológicas e funcionais distintas das endometrioses inativas. Isto se explica pelo envolvimento importante dos miofibroblastos nos primeiros, células metabolicamente ativas de alta capacidade pró-inflamatória e fibrogênica, que por sua vez estão relacionados à deposição de colágeno tipo III, frouxo. As endometrioses inativas demonstraram uma baixa expressão de  $\alpha$ -SMA pelas células que circundam os ninhos fibróticos e estão relacionados ao colágeno tipo I, denso. Então, entende-se que os fatores envolvidos nestes tipos de fibroses não estejam vinculados aos miofibroblastos, mas por outros fatores não elucidados até o momento. A predominância de colágeno tipo I em 16,67% das endometrioses ativas, e a de colágeno tipo III em 25% das endometrioses inativas, podem estar relacionadas ao processo de desenvolvimento e evolução do processo fibrótico, em que há a substituição gradativa do tipo de colágeno frouxo pelo denso.

Pesquisadores observaram espessamento da membrana basal nas endometrioses ativas e ativas destrutivas, algumas vezes com rompimento da mesma (HANADA et al., 2014). Os resultados do nosso estudo concordaram com a da referida pesquisa, havendo nitidamente um espessamento e hialinização da membrana basal nas endometrioses ativas, que são agravados nas endometrioses ativas destrutivas. Nos processos inativos, observou-se o mantimento de sua espessura e, quando houve dilatação cística, um discreto espessamento quando comparados à membrana basal do endométrio hígido. Apesar da causa desse dano à membrana basal ainda ser desconhecida, acredita-se que

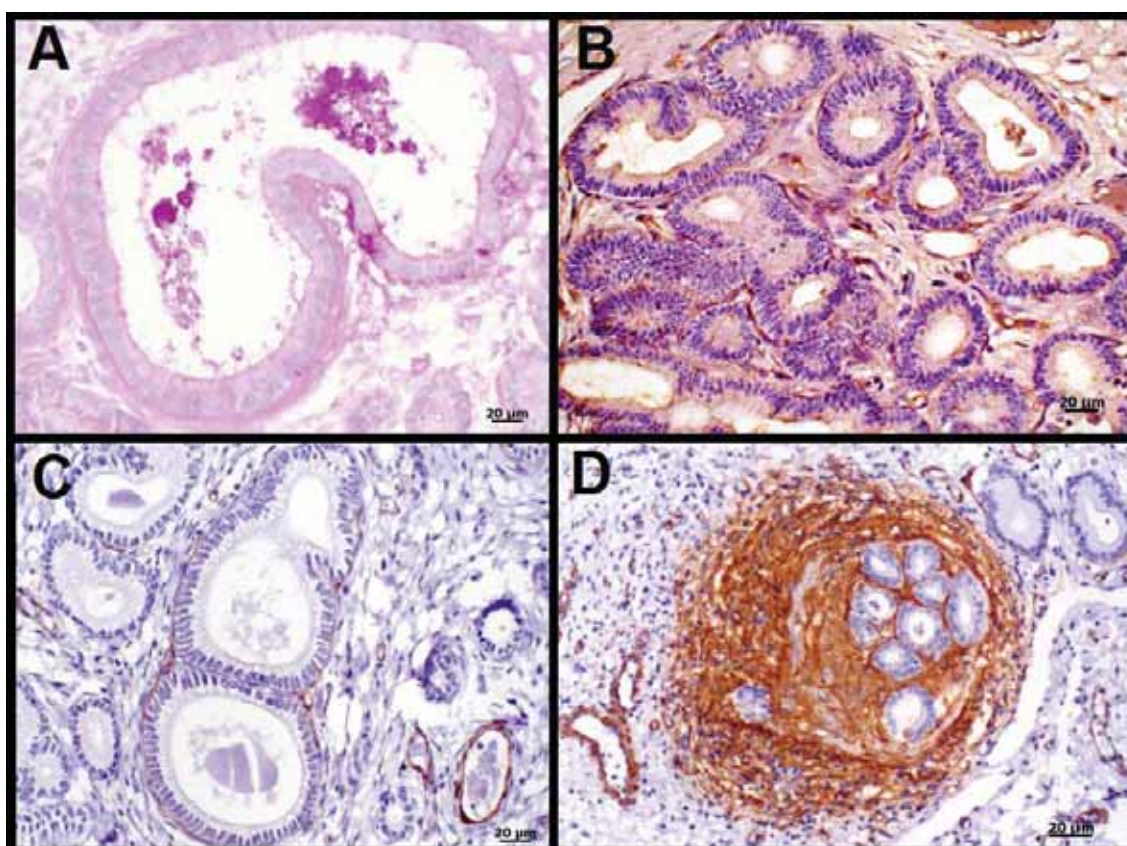
seja o fator principal para a instalação da fibrose periglandular, já que ocorre alteração na deposição de componentes da matriz extracelular ao redor da membrana (HOFFMANN et al., 2009).

Até o momento, a detecção imuno-histoquímica do colágeno tipo IV no endométrio equino restringe-se a um estudo em biopsias endometriais saudáveis nas diversas fases do ciclo estral (MANSOUR et al., 2003), e a um único estudo relacionado a endometriose (WALTER et al., 2001). Contudo, o nosso trabalho é o primeiro a relacionar a avaliação imuno-histoquímica do colágeno tipo IV considerando as etapas da patogênese do processo proposto por Hoffmann et al. (2009).

Quanto à associação deste método imuno-histoquímico à classificação das endometrioses proposta por Hoffmann et al. (2009b), foi notado que os quatro tipos mantiveram um padrão de positividade semelhante ao do endométrio hígido, revelando o colágeno IV da membrana basal do epitélio luminal e glandular e vascular, apresentando-se delgada e fibrilar. De acordo com Walter et al. (2001), os miofibroblastos periglandulares liberam ativamente colágeno tipo IV no processo fibrótico, o que poderia explicar o espessamento da membrana basal observado na avaliação histoquímica. No entanto, a nossa avaliação imuno-histoquímica não revelou espessamento da camada de colágeno tipo IV. Ademais, Hoffmann et al. (2009b) detectaram, por imuno-histoquímica, uma alta deposição de laminina na membrana basal em endometrioses ativas destrutivas, além da expressão intracelular desta glicoproteína nas células periglandulares. Estes achados podem justificar o espessamento da membrana basal observado pela técnica histoquímica de PAS do presente estudo, não estando relacionado ao espessamento de camadas de colágeno tipo IV.

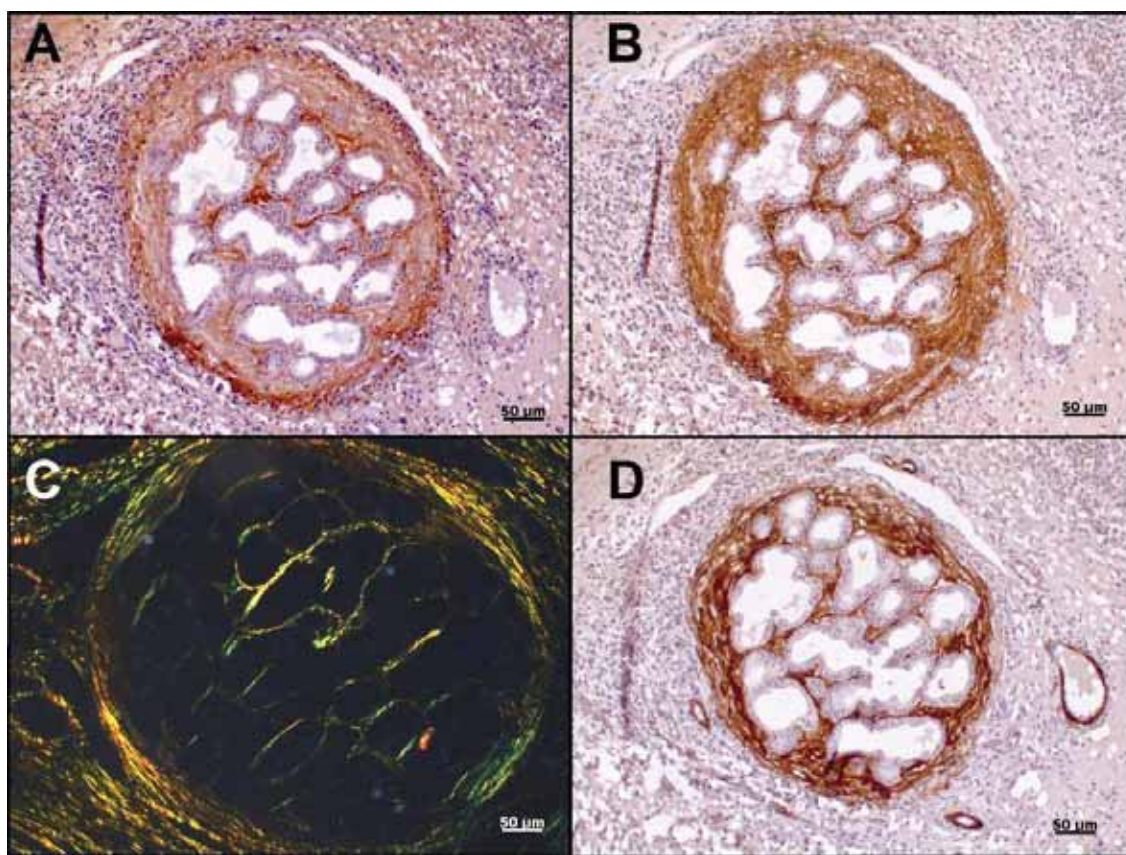
Nas endometrioses ativa destrutiva e inativa destrutiva, foram detectadas áreas de descontinuidade de fibras de colágeno tipo IV da membrana basal nos ninhos fibróticos. Este fato pode explicar a degeneração e necrose de células epiteliais que caracterizam esses dois tipos de endometriose, por haver uma quebra da interação destas células com a matriz extracelular por meio da membrana. Ainda, ratificam parcialmente os resultados obtidos pela técnica histoquímica de PAS de Hanada et al (2014), em que se constataram áreas de descontinuidade nos processos ativos. Essa concordância parcial provavelmente se deve pelo fato desses autores não levarem em consideração a característica “destrutiva” da classificação de Hoffmann et al. (2009b), mas sim apenas os tipos ativo e inativo.

As amostras de endometriose ativa destrutiva apresentaram maior expressão de  $\alpha$ -SMA, representando a maior parte das amostras fortemente positivas (71,42%), em concordância com Hoffmann et al. (2009). As endometrioses inativas apresentaram uma imunomarcacão discreta, com até duas camadas de células positivas periglandulares ou ao redor de glândulas que aparentemente não apresentavam sinais de fibrose ao exame histológico. Hanada et al. (2014) acreditam que este último achado pode ser importante na caracterização de estágios iniciais da endometriose ou para diagnosticar éguas que tenham predisposição à doença. A Fig.1 demonstra alguns resultados da coloração histoquímica de PAS e imuno-histoquímica do colágeno tipo IV e  $\alpha$ -SMA.



**Figura 1.** Fotomicrografias de endométrio equino. (A) Endometriose ativa destrutiva. Membrana basal apresentando espessamento principalmente na porção de invaginação do túbulo glandular. PAS. (B) Endometriose ativa destrutiva. Fibras de colágeno tipo IV da membrana basal com áreas de descontinuidade. Contracoloração: Hematoxilina. (C) Endometriose inativa. Imunomarcacão discreta de uma monocamada de miofibroblastos positivos para  $\alpha$ -SMA. No canto inferior direito, vaso sanguíneo demonstrando positividade imuno-histoquímica. Contracoloração: Hematoxilina. (D) Endometriose ativa destrutiva. Imunomarcacão intensa de múltiplas camadas de miofibroblastos, positivas para  $\alpha$ -SMA. Revelação: DAB, contracoloração com Hematoxilina.

Quando comparamos a imunoposição de  $\alpha$ -SMA com a dos colágenos tipo I e III, percebemos que os ninhos fibróticos que revelaram um número maior de células positivamente marcadas, observadas principalmente nas endometrioses ativas destrutivas, demonstraram forte imunorreatividade para colágeno tipo III. Nas endometrioses com imunomarcção discreta para  $\alpha$ -SMA, predominantemente inativas, houve predominância de positividade para colágeno tipo I. A Fig. 2 demonstra um comparativo entre as técnicas imuno-histoquímicas dos colágenos tipos I e III e da  $\alpha$ -SMA e a técnica histoquímica de Picosirius Red sob luz polarizada.



**Figura 2.** Fotomicrografias de endométrio equino. Endometrose ativa destrutiva. Comparativo entre técnicas imuno-histoquímicas e Picosirius Red sob luz polarizada. **(A) Colágeno tipo I:** imunomarcção positiva em todo o tecido fibrótico que envolve o ninho, com intensidade acentuada na região delimitadora e na porção central interna. **(B) Colágeno tipo III:** expressão positiva uniformemente acentuada em todo o ninho fibrótico. **(C) Picosirius Red sob luz polarizada:** fibras amareladas de colágeno denso na região central e periférica, correspondentes à imunomarcção de colágeno tipo I. Fibras esverdeadas de colágeno frouxo predominantes no ninho fibrótico, refletindo o observado na imuno-histoquímica do colágeno tipo III. **(D)  $\alpha$ -SMA:** Imunomarcção acentuada de cinco camadas de miofibroblastos. Revelação: DAB, contracoloração com Hematoxilina.

A partir destes achados, postulamos que as endometroses ativas representem um processo fibrótico de características morfológicas e funcionais distintas das endometroses inativas. Isto se explica pelo envolvimento importante dos miofibroblastos nos primeiros, células metabolicamente ativas de alta capacidade pró-inflamatória e fibrogênica, que por sua vez estão relacionados à deposição de colágeno tipo III, frouxo e aumento da espessura da membrana basal. As endometroses inativas demonstraram uma baixa expressão de  $\alpha$ -SMA pelas células que circundam os ninhos fibróticos e estão relacionados ao colágeno tipo I, denso, mantendo a espessura da membrana basal. Então, entende-se que os fatores envolvidos nestes tipos de fibroses não estejam vinculados aos miofibroblastos, mas por outros fatores não elucidados até o momento. A predominância de colágeno tipo I em 16,67% das endometroses ativas, e a de colágeno tipo III em 25% das endometroses inativas, podem estar relacionadas ao processo de desenvolvimento e evolução do processo fibrótico, em que há a substituição gradativa do tipo de colágeno frouxo pelo denso.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, podemos inferir que as fibras de colágeno denso correspondem ao colágeno tipo I, predominantes nas endometroses inativa e inativa destrutiva, enquanto que as fibras de colágeno frouxo correspondem ao colágeno tipo III, predominantes nas endometroses ativas e ativas destrutivas. Estes dois tipos de endometrose, especialmente a ativa destrutiva, possuem uma maior quantidade miofibroblastos periglandulares que as endometroses inativa e inativa destrutiva. Nas fibroses ativas, a membrana basal apresenta espessamento, aparentemente não relacionado a um aumento na deposição de colágeno tipo IV. Nos tipos destrutivos, as fibras deste tipo de colágeno apresentaram áreas de descontinuidade na membrana basal. Finalmente, os miofibroblastos nos processos ativos estão fortemente relacionados ao aumento na deposição de colágeno tipo III nos ninhos fibróticos.

## REFERÊNCIAS

EVANS T. J.; MILLER, M. A.; GANJAM, V. K; NISWENDER, K. D; ELLERSIECK, M. R; KRAUSE, W. J; YOUNGQUIST, R. S. Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. *American Journal of Veterinary Research*, v. 59, n.10, p.1209-1214, 1998.

- HANADA, M.; MAEDA, Y.; OIKAWA, M. Histopathological characteristics of endometriosis in throughbred mares in Japan: results from 50 necropsy cases. *Journal of Equine Science*, v. 25, n. 2, p. 45–52, 2014.
- HANAMURA, N.; YOSHIDA, T.; MATSUMOTO, E.; KAWARADA, Y.; SAKAKURA, T. Expression of fibronectin and tenascin-c mRNA by myofibroblasts, vascular cells and epithelial cells in human colon adenomas and carcinomas. *International Journal of Cancer*, v. 73, p.10–15, 1997.
- HOFFMANN, C.; ELLENBERGER, C.; MATTOS, R. C.; AUPPERLE, H.; DHEIN, S.; STIEF, B.; SCHOON, H. A. The equine endometriosis: new insights into the pathogenesis. *Animal Reproduction Science*, v.111, p.261-278, 2009.
- JUNQUEIRA, L.C.U., COSSERMELLI, W., BRENTANI, R.R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Archivum Histologicum Japonicum*, v.41, p.267-274, 1978.
- KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. in: MORROW, D.A. (ed.). *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, p. 723-729, 1986.
- MANSOUR, G. D.; HENRY, M.; FERREIRA, A. M. R. Immunohistochemical Study of Equine Endometrial Extracellular Matrix during the Oestrous Cycle. *Journal of Comparative Pathology*, v. 129, n. 4, p.316–319, 2003.
- MASSENO, A.P.B.; PORTO, C.D.; NUNES, L.C.; SEQUEIRA, J.L.; ALVARENGA, M.A. *Miofibroblastos: revisão de literatura*. Veterinária e Zootecnia, v.17, n.2, p.177-190, 2010.
- PETROV, V. V.; FAGARD, R. H.; LIJNEN, P. J. Stimulation of collagen production by transforming growth factor- $\beta$ 1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension*. v.39, p.258–263, 2002.
- RICKETTS, S.W.; ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Veterinary Journal*, v. 23, 189-192, 1991.
- SAPPINO, A. P.; SCHÜRCH, W.; GABBIANI, G. Biology of disease. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as a marker of phenotypic modulations. *Laboratory Investigation*, v. 63, p.144–161, 1990.
- WALTER, I.; HANDLER, J.; REIFINGER, M.; AURICH, C. Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction*, v.121, p. 581-586, 2001.

**FUNDAÇÃO ESTUDO PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA  
FEP MVZ EDITORA  
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

CNPJ: 16.629.388/0001-24 Insc. Municipal: 302856.001-3  
Av. Antônio Carlos, 6627 - Caixa Postal 567 - 30123-970 – Belo Horizonte – MG  
Fone: (31) 3409-2042 Fax: (31) 3409-2041  
<http://www.abmvz.org.br> E-mail: [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br)

Sr.(s): Leonardo Dourado da Costa, Marianne Camargos Dias, Marco Antonio Alvarenga,  
Julio Lopes Sequeira,

Cumpre-nos informar-lhe(s) que o artigo:

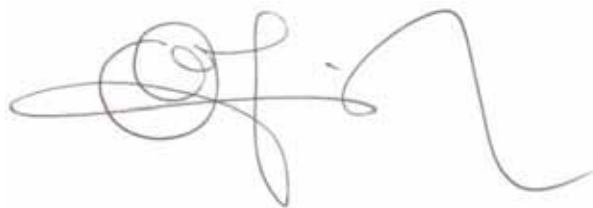
**IDENTIFICAÇÃO DOS COLÁGENOS I, III, IV E  $\alpha$ -SMA E A PARTICIPAÇÃO  
DOS MIOFIBROBLASTOS NO PROCESSO FIBRÓTICO DAS ENDOMETROSES  
EQUINAS**

enviado para publicação nesta revista, será encaminhado para análise do Corpo Editorial desde que não haja manifestação contrária de qualquer autor do trabalho e que a taxa de submissão esteja quitada.

**REG.: 8533/2015**

**Protocolado em: 21/06/2015**

Atenciosamente,



Prof. Antônio de Pinho Marques Jr.

Editor Chefe

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia