

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DO COLÁGENO E
EXPRESSÃO DE MMP-2, MMP-9 E TIMP-1 NAS
ENDOMETRITES CRÔNICAS DAS ÉGUAS**

CAMILA DIAS PORTO

**BOTUCATU - SP
Março, 2006**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DO COLÁGENO E
EXPRESSÃO DE MMP-2, MMP-9 E TIMP-1 NAS
ENDOMETRITES CRÔNICAS DAS ÉGUAS

CAMILA DIAS PORTO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, 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
Março, 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Porto, Camila Dias.

Caracterização histoquímica o colágeno e expressão de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 nas endometrites crônicas das éguas / Camila Dias Porto. – Botucatu : [s.n.], 2006.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2006.

Orientador: Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira

Assunto CAPES: 50503030

1. 1. Patologia animal. 2. Égua. 3. Endométrio. 4. Colágeno.

CDD 636.1089607

Palavras chave: Endométrio; Equino; Fibrose; Imunohistoquímica; Metaloproteinase; Endometrite.

Camila Dias Porto

Botucatu, 03 de março de 2006.

Comissão Examinadora:

Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

Prof. Dr. Alexandre Hataka

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

A Deus e aos amigos espirituais, pela oportunidade contínua de
aprendizado e crescimento;

À minha Família, parte fundamental da minha formação, por
todo amor concedido e por sempre me apoiar
incondicionalmente na melhoria pessoal e profissional;

Ao meu orientador, Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira, pela
confiança depositada, sobretudo em um momento de
questionamentos e incertezas...

Muito obrigada por me ensinarem a ser uma pessoa melhor a
cada dia e, principalmente, a vislumbrar o futuro, mesmo que
incerto, de maneira otimista, sempre acrescentando o que nós
construímos com nosso trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela outorga da bolsa de mestrado e recursos do auxílio à pesquisa, viabilizando o desenvolvimento deste trabalho.

À pós-graduanda Louisiane de Carvalho Nunes, pela oportunidade do trabalho em conjunto, pela demonstração de amizade e humildade durante os anos de convivência.

Ao Prof. Ass. Dr. Deilson Elgui de Oliveira (Departamento de Patologia, FMB – UNESP, campus de Botucatu) pelo auxílio com os anticorpos anti-MMP.

Ao técnico de laboratório Marcos Roberto Franchi (Laboratório de Patologia Molecular, Departamento de Patologia – FMB UNESP, campus de Botucatu) e ao pós-graduando Luís Antônio Justulin Filho (Departamento de Morfologia – IBB UNESP, campus de Botucatu), pela ajuda na padronização dos anticorpos e troca de experiências.

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

Ao Prof. Adj. Sebastião Martins Filho (Departamento de Engenharia Rural do Centro de Ciências Agrárias - UFES, campus de Alegre), pela realização da análise estatística.

À pós-graduanda Sara Maria de Carvalho e Suzano, pelo coleguismo, solicitude e toda ajuda oferecida durante este trabalho.

À Prof^a. Adj. Noeme Sousa Rocha, pelo exemplo de força, profissionalismo e dedicação. Muito obrigada pela amizade, pelo conhecimento e experiências compartilhados.

À Prof^a. Ass. Dr^a. Renée Laufer Amorim, por me fazer acreditar que podemos melhorar, por maiores que nos pareçam os obstáculos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Hataka, pelo incentivo aos estudos, por mostrar o caminho da Patologia e por fazer “me virar” perante as dificuldades. Agradeço sua amizade sincera de todos os momentos.

Agradeço a Deus pela oportunidade de (re)encontrar amigos, que são a minha família em Botucatu: os pós-graduandos Anne Santos do Amaral, Luiz Fernando Jantzen Gaspar, Adriana Wanderley Pinho Pessoa, Celmira Calderón, Carlos Frederico Gitsio Klier Teixeira da Silva, Sandra Bassani Silva, Edna Tereza de Lima, e os amigos do Centro Cristão Espírita “Amor e Luz”, Arnold e Neide Gottschalk, Alice, Cristiana Freire, Leonardo Seito, Cecília Tilton, Ivone e João, e tantos mais, mas torna-se impossível nomear todos pela falta de espaço.

Aos amigos Ana Paula Masseno, Solange Sá e Leonardo Parr, Fabio Evangelista, Satie Katagiri, Fabiano Sellos, João Ferreira Neto e Victor Hugo Bernardoni, pela amizade e por oferecerem ajuda sem exigir nada em troca, além de me fazerem lembrar que temos muitas coisas mais para celebrar nessa vida...

Aos amigos pós-graduandos Marcela Marcondes, Leandro Teixeira e Rafael Torres Neto, pela amizade e convivência fraterna.

Aos residentes do Serviço de Patologia Veterinária Arlete Benta de Souza, Ana Paula Baptista Masseno e Rômulo Francis Lot, pela ajuda e coleguismo.

Ao pós-graduando Danilo (Departamento de Morfologia – IBB UNESP) pela paciência e sinceras desculpas pela mudança na rotina laboratorial.

Ao técnico de necropsia Maury Raul pela convivência amigável, pelos ensinamentos de vida e profissionalismo e por saber dividir seu conhecimento.

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

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

Às funcionárias da Pós-Graduação Denise, Regina e Maria, por toda ajuda, compreensão e pela paciência com que atendem aos alunos.

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

“Em relação a todos os atos de iniciativa e de criação existe uma verdade elementar: no momento em que nos comprometemos, a Providência também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge a nosso favor. Como resultado da decisão, seguem-se todas as formas de coincidências, encontros e ajuda, que nenhum homem jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém, em si mesma, o poder, o gênio e a magia.”

(Goethe)

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Classificação histopatológica das endometrites crônicas das éguas segundo KENNEY & DOIG, 1986..... **26**

QUADRO 2. Classificação das endometrites eqüinas segundo RICKETTS & ALONSO, 1991..... **27**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Anticorpos primários utilizados para marcação imunoistoquímica no endométrio de éguas portadoras de Endométrio.....	23
TABELA 2. Distribuição das biópsias de endométrio eqüino classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986).....	30
TABELA 3. Distribuição das biópsias de endométrio eqüino classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991).....	32
TABELA 4. Valores medianos do percentual de fibrose periglandular de acordo com as categorias de endometrite segundo Kenney & Doig (1986).....	50
TABELA 5. Valores medianos do percentual de fibrose periglandular nos endométrios classificados segundo Ricketts & Alonso (1991).....	50
TABELA 6. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-2 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com KENNEY & DOIG (1986).....	53
TABELA 7. Medianas dos escores acumulativos atribuídos às biópsias uterinas classificadas de acordo com KENNEY & DOIG (1986) para a enzima MMP-2.....	53
TABELA 8. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-2 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com RICKETTS & ALONSO (1991).....	55
TABELA 9. Medianas dos escores acumulativos atribuídos às biópsias uterinas classificadas de acordo com RICKETTS & ALONSO (1991) para a enzima MMP-2.....	55
TABELA 10. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-9 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com KENNEY & DOIG (1986).....	59
TABELA 11. Medianas dos escores acumulativos atribuídos às biópsias uterinas classificadas de acordo com KENNEY & DOIG (1986) para a enzima MMP-9.....	59
TABELA 12. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-9 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com RICKETTS & ALONSO (1991).....	60

TABELA 13. Medianas dos escores acumulativos atribuídos às biópsias uterinas classificadas de acordo com RICKETTS & ALONSO (1991) para a enzima MMP-9..... **61**

TABELA 14. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de TIMP-1 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com KENNEY & DOIG (1986)..... **62**

TABELA 15. Medianas dos escores acumulativos atribuídos às biópsias uterinas classificadas de acordo com KENNEY & DOIG (1986) para a enzima TIMP-1..... **63**

TABELA 16. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de TIMP-1 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com RICKETTS & ALONSO (1991)..... **64**

TABELA 17. Medianas dos escores acumulativos atribuídos às biópsias uterinas classificadas de acordo com RICKETTS & ALONSO (1991) para a enzima TIMP-1..... **64**

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Endométrio categoria I. Ausência de alterações inflamatórias e fibróticas. Epitélio luminal alto (seta), estrato compacto (EC) e alta densidade glandular no estrato esponjoso (EE) Hematoxilina e Eosina. Barra: 100 µm.....	35
FIGURA 2. Endométrio categoria I. Distribuição normal do colágeno. Tricrômico de Masson. Barra: 100 µm.....	35
FIGURA 3. Endométrio categoria III. Fibrose periglandular intensa (seta), ninhos glandulares (N), lacuna linfática (ponta de seta). Hematoxilina e Eosina. Barra: 100 µm.....	36
FIGURA 4. Endométrio categoria III. Fibrose periglandular intensa, ninhos fibróticos e lacuna linfática. Tricrômico de Masson. Barra: 100 µm.....	36
FIGURA 5. Endometrite crônica infiltrativa. Infiltrado inflamatório moderado focal no estrato compacto (seta) e discreto e difuso no estrato esponjoso. Hematoxilina e Eosina. Barra: 100 µm.....	37
FIGURA 6. Endometrite crônica infiltrativa. Infiltrado inflamatório e fibrose discreta multifocal no estrato esponjoso. Tricrômico de Masson. Barra: 100 µm.....	37
FIGURA 7. Endometrose. Alterações degenerativas difusas: fibrose intersticial acentuada, dilatações e cistos glandulares associados à fibrose periglandular. Hematoxilina e Eosina. Barra: 100 µm.....	38
FIGURA 8. Endometrose. Alterações degenerativas difusas: fibrose intersticial e periglandular acentuadas. Tricrômico de Masson. Barra: 100 µm.....	38
FIGURA 9. Endométrio categoria I. Vasos endometriais normais. Hematoxilina e Eosina. Barra: 50 µm.....	39
FIGURA 10. Endométrio categoria I. Vasos endometriais normais. Tricrômico de Masson. Barra: 50 µm.....	39
FIGURA 11. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Vasos endometriais. Fibrose vascular e perivascular acentuada. Hematoxilina e Eosina. Barra: 50 µm.....	40
FIGURA 12. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Vasos endometriais. Fibrose vascular e perivascular acentuada. Tricrômico de Masson. Barra: 50 µm.....	

FIGURA 13. Endométrio categoria I. Distribuição de colágeno do tipo III – negro (seta) na membrana basal das glândulas e no estrato compacto, e do tipo I (castanho) na região profunda do estrato esponjoso. Reticulina. Barra: 100 µm.....	44
FIGURA 14. Endométrio categoria III. Colágeno tipo I-III (castanho-negro) na fibrose periglandular (seta) e predominância do colágeno do tipo I (castanho) nos ninhos glandulares. Reticulina. Barra: 100 µm.....	44
FIGURA 15. Endométrio categoria I. Distribuição reticular do colágeno do tipo III (verde) e presença do colágeno do tipo I (amarelo) em menor proporção. Picrosirius Red – Polarização. Barra: 100 µm.....	45
FIGURA 16. Endométrio categoria III. Colágeno tipo I-III (amarelo-verde) na fibrose periglandular (seta) e predominância do colágeno do tipo I (amarelo e vermelho) nos ninhos fibróticos. Picrosirius Red – Polarização. Barra: 100 µm.....	45
FIGURA 17. Endometrite crônica infiltrativa. Colágeno do tipo III (negro) predominante do estrato compacto e do tipo I (castanho) predominante no estrato esponjoso. Reticulina. Barra: 100 µm.....	46
FIGURA 18. Endometrose. Colágeno do tipo I (castanho) predominante na fibrose intersticial e periglandular. Reticulina. Barra: 100 µm.....	46
FIGURA 19. Endometrite crônica infiltrativa. Colágeno do tipo III (verde) predominante no estrato compacto e do tipo I (amarelo e vermelho) predominante no estrato esponjoso. Picrosirius Red – Polarização. Barra: 100 µm.....	47
FIGURA 20. Endometrose. Colágeno do tipo I (amarelo e vermelho) predominante na fibrose intersticial e periglandular. Barra: 100 µm.....	47
FIGURA 21. Endométrio categoria I. Vasos endometriais normais. Distribuição de colágeno do tipo III (negro) e do tipo I (castanho) na parede vascular. Reticulina. Barra: 50 µm.....	48
FIGURA 22. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Vasos endometriais. Fibrose vascular e perivascular. Predominância do colágeno do tipo I (castanho). Reticulina. Barra: 50 µm.....	48
FIGURA 23. Endométrio categoria I. Vasos endometriais normais. Distribuição de colágeno do tipo III (verde) e do tipo I (amarelo e vermelho) na parede vascular. Picrosirius Red – Polarização. Barra: 100 µm.....	49
FIGURA 24. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Vasos endometriais. Fibrose vascular e perivascular. Predominância do colágeno do tipo I (amarelo e vermelho). Picrosirius Red - Polarização. Barra: 100 µm.....	49

FIGURA 25. Marcação imunoistoquímica para MMP-2. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva na região apical das células do epitélio luminal (seta). Presença de hemossiderófagos no estrato esponjoso (*). Barra: 50 µm.....	56
FIGURA 26. Marcação imunoistoquímica para MMP-2. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva intensa no epitélio de glândulas fibróticas e dilatadas. Notar marcação heterogênea no epitélio de algumas glândulas. Barra: 100 µm.....	56
FIGURA 27. Marcação imunoistoquímica para MMP-2. Endométrio categoria I. Marcação positiva em células estromais do estrato compacto (seta). Barra: 50 µm.....	57
FIGURA 28. Marcação imunoistoquímica para MMP-2. Endométrio categoria IIB – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva na parede vascular e células estromais (seta). Barra: 50 µm.....	57
FIGURA 29. Marcação imunoistoquímica para MMP-9. Endométrio categoria III – endometrose. Marcação positiva no epitélio luminal e glandular, células estromais (seta) e endotélio (*). Barra: 50 µm.....	65
FIGURA 30. Marcação imunoistoquímica para MMP-9. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva intensa em células estromais ao redor da glândula dilatada (seta). Barra: 50 µm.....	65
FIGURA 31. Marcação imunoistoquímica para MMP-9. Endométrio categoria I. Marcação positiva nas células do infiltrado inflamatório no estrato esponjoso (seta). Barra: 50 µm.....	66
FIGURA 32. Marcação imunoistoquímica para MMP-9. Endométrio categoria I. Marcação positiva nas células endoteliais. Barra: 50 µm.....	66
FIGURA 33. Marcação imunoistoquímica para MMP-9. Endométrio categoria I. Marcação positiva no endotélio e parede vascular do estrato esponjoso. Barra: 50 µm.....	67
FIGURA 34. Marcação imunoistoquímica para TIMP-1. Endométrio categoria III – endometrose. Marcação intensa no epitélio luminal e nas células estromais do estrato compacto (seta), e fraca ou moderada no epitélio glandular. Barra: 50 µm.....	67
FIGURA 35. Marcação imunoistoquímica para TIMP-1. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva nas células epiteliais de ninhos glandulares no estrato compacto. Presença de hemossiderófagos (seta). Barra: 50 µm.....	68

- FIGURA 36.** Marcação imunoistoquímica para TIMP-1. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva em células do infiltrado inflamatório ao redor de ninhos glandulares (seta). Barra: 50 μ m..... **68**
- FIGURA 37.** Marcação imunoistoquímica para TIMP-1. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva em células endoteliais do estrato compacto (seta). Barra: 50 μ m..... **69**
- FIGURA 38.** Marcação imunoistoquímica para TIMP-1. Endométrio categoria III – endometrose. Marcação positiva na parede vascular. Barra: 50 μ m..... **69**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3. MATERIAL DE MÉTODOS.....	19
3.1. Procedência do material.....	19
3.2. Processamento histopatológico.....	19
3.2.1. Técnicas histoquímicas.....	20
3.2.1.1. Tricrômico de masson.....	20
3.2.1.2. Reticulina.....	20
3.2.1.3. Picrosirius Red.....	21
3.2.2. Técnica imunoistoquímica.....	22
3.3. Avaliação histopatológica.....	25
3.3.1. Aplicação da classificação das endometrites crônicas equínas.....	25
3.3.2. Avaliação do colágeno.....	27
3.3.2.1. Análise qualitativa.....	27
3.3.2.2. Análise morfométrica.....	28
3.3.3. Avaliação imunoistoquímica.....	28
3.4. Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Avaliação histopatológica.....	30
4.1.1. Classificação das endometrites crônicas.....	30
4.1.2. Avaliação histoquímica do colágeno.....	41
4.1.2.1. Reticulina.....	41
4.1.2.2. Picrosirius Red – Polarização.....	43

4.2. Morfometria do colágeno periglandular	50
4.3. Avaliação imunoistoquímica.....	51
4.3.1. MMP-2.....	51
4.3.2. MMP-9.....	58
4.3.3. TIMP-1.....	61
5. DISCUSSÃO.....	70
5.1. Avaliação histopatológica.....	70
5.1.1. Classificação das endometrites crônicas.....	70
5.1.2. Avaliação histoquímica do colágeno.....	71
5.2. Morfometria do colágeno periglandular.....	73
5.3. Avaliação imunoistoquímica.....	74
6. CONCLUSÕES.....	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
8. TRABALHO CIENTÍFICO.....	89

RESUMO

PORTO, C.D. **Caracterização histoquímica do colágeno e expressão de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 nas endometrites crônicas das éguas.** Botucatu, 2006. 101 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

O presente trabalho teve por objetivos avaliar os graus de fibrose endometrial das éguas, especificando por técnicas histoquímicas os tipos de colágeno e sua proporção nas lesões crônicas, além de verificar por método imunoistoquímico a expressão e distribuição das metaloproteinases (MMP) 2 e 9 e um dos seus inibidores - TIMP-1 - nos processos crônicos endometriais. Foram utilizadas 82 biópsias endometriais classificadas histologicamente de acordo com Kenney e Doig (1986) e segundo as definições de Ricketts & Alonso (1991) para endometrite crônica infiltrativa e endometrose. A avaliação do colágeno foi realizada pelos métodos histoquímicos Tricrômico de Masson, Reticulina e Picrosirius Red. Estudo morfométrico da fibrose periglandular foi realizado utilizando-se a técnica histoquímica do Picrosirius Red. Os resultados mostraram que nos endométrios portadores de endometrite severa há deposição de colágeno do tipo III e do tipo I, sendo este predominante. Não houve diferença significativa na extensão da fibrose periglandular entre as endometrites crônicas infiltrativas e endometroses. Tanto no endométrio hígido como nas endometrites crônicas foi observada imuno-reatividade para as enzimas estudadas. A reação imunoistoquímica para MMP-2 foi localizada no epitélio luminal, glandular, parede vascular e células estromais. MMP-9 e TIMP-1 mostraram marcação mais difusa, sendo também observadas nas células inflamatórias e endoteliais.

ABSTRACT

PORTO, C.D. **Histochemical features of collagen and MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 expression in chronic endometritis of horse mares.** Botucatu, 2006. 101 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

The aim of this study was to evaluate the degrees of endometrial fibrosis in mares, specifying the types of collagen in the chronical lesions and its ratio by histochemical analysis and, the expression and distribution of matrix metalloproteinases (MMP) 2, -9 and one of its inhibitors - TIMP-1 - in the endometrial chronic processes by means of immunohistochemistry. Eighty-two biopsies of chronic endometritis were classified according to Kenney and Doig (1986) and definitions of Ricketts & Alonso (1991) for chronic infiltrative endometritis and endometrosis. The collagen evaluation was made by Masson's trichrome, Reticulin and Picrosirius Red staining methods. The endometrial periglandular fibrosis morfometric analysis was carried out by using Picrosirius Red stained slides. Deposition of type III collagen and type I collagen was seen in severe endometritis with type I predominance. The chronic infiltrative endometritis and endometrosis didn't show significant difference in the extension of periglandular fibrosis. Immunoreactivity of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 was detected in healthy endometrium as in severe chronic endometritis. The luminal epithelium, glandular epithelium, vascular wall and stromal cells expressed MMP-2. MMP-9 and TIMP-1 had shown diffuser marking, and were as well observed in the inflammatory cells and the endothelium.

1. INTRODUÇÃO

Os eqüinos apresentam um dos menores índices de fertilidade entre os animais domésticos. Isso é agravado pelo tipo de seleção empregado nesta espécie, na qual são preconizados a habilidade para o trabalho e alto desempenho esportivo.

Mesmo com essas considerações, é citado que a meta na criação de eqüinos é a produção de um potro por égua a cada ano (AMARAL, 2002). Portanto, problemas de subfertilidade e infertilidade levam a perdas econômicas significativas.

A endometrite é a principal causa de redução da fertilidade em éguas sendo considerada o problema de maior importância clínica nos eqüinos depois da cólica e das enfermidades do trato respiratório (TRAUB-DARGATZ et al., 1991; TROEDSSON, 1999).

A biópsia endometrial é o método mais preciso para o diagnóstico e estabelecimento do prognóstico da fertilidade em éguas, já que permite a avaliação da situação morfofuncional do endométrio (DOIG et al., 1981).

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

Estudos recentes sobre a classificação dos tipos de colágeno e tipificação do infiltrado inflamatório procuram caracterizar o processo (NUNES, 2003), enquanto pesquisas mais recentes envolvendo enzimas que degradam a matriz extracelular buscam elucidar parte de sua patogênese ainda não totalmente compreendida (PORTO et al., 2005).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como principais objetivos:

- ⇒ Avaliar os graus de fibrose endometrial, especificando os tipos de colágeno presentes nas lesões crônicas e sua proporção, por meio da utilização das colorações específicas Tricrômico de Masson, Reticulina e Picrosirius Red;
- ⇒ Estabelecer as características histoquímicas do processo fibrótico nas endometrites crônicas degenerativas (endometroses) e infiltrativas;
- ⇒ Verificar por meio de método imunoistoquímico a expressão e distribuição das metaloproteinases 2 e 9 e um dos seus inibidores (TIMP-1) nos processos crônicos endometriais;
- ⇒ Estabelecer o grau de expressão das metaloproteinases e do TIMP nas endometroses e endometrites crônicas infiltrativas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

É indispensável para a fertilidade das éguas a manutenção da integridade uterina, especialmente a do endométrio. As glândulas endometriais sintetizam e secretam ou transportam substâncias histotróficas que nutrem o concepto no período de pré-implantação - placentação (KENNEY, 1978; GRAY et al., 2001).

Microscopicamente, o útero das éguas é composto por três camadas: a interna é a mucosa ou endométrio, a segunda ou média é o miométrio e a camada externa é o perimétrio. Por sua vez, o endométrio é formado por epitélio luminal e lâmina própria. Esta última se estende desde a membrana basal até a camada muscular interna do miométrio e é dividida em dois estratos, de acordo com a densidade de células estromais. A lâmina própria é caracterizada pela presença de numerosas glândulas uterinas, derivadas do epitélio luminal.

No estrato compacto a densidade de células estromais é alta e há uma delicada rede de fibras reticulares. Essas células normalmente não produzem colágeno detectável por microscopia de luz. O estrato esponjoso apresenta uma baixa densidade celular com muitas fibras conectando as células, o que lhe confere aspecto de esponja (KENNEY, 1978).

O epitélio de revestimento do endométrio apresenta-se composto por células ciliadas, células secretoras não-ciliadas, e, eventualmente, leucócitos (KENNEY, 1978). Observando sob microscópio eletrônico de varredura e transmissão, Amaral (2002) sugere a presença de ao menos sete tipos celulares ou estágios distintos no epitélio luminal do útero das éguas: entre as secretórias encontrou células íntegras repletas de microvilosidades, células com vesículas apicais e outras em degeneração; entre as ciliadas, notou a presença de células jovens com microvilosidades, células maduras com cílios longos e íntegros e em degeneração, além de leucócitos intra-epiteliais. Observou também a presença de aberturas glandulares durante o estro, repletas de secreção sendo lançada para o lúmen uterino. Relata ainda que nas éguas acima de 12 anos, a abertura dessas glândulas encontrava-se

obstruída, o que poderia estar correlacionado com o processo fibrótico endometrial.

A infecção e inflamação transitórias do endométrio são conseqüências inevitáveis da cobertura, ocorrendo tanto por inseminação artificial como monta natural. A instalação dessa reação inflamatória aguda é induzida pela deposição de sêmen e pela contaminação bacteriana que ocorre durante o coito (KATILA, 1996). Éguas consideradas normais do ponto de vista reprodutivo debelam eficientemente essa inflamação, e o ambiente intra-uterino estará adequado para a sobrevivência do embrião em aproximadamente seis dias após a ovulação (RIGBY et al., 2001). Se o animal não for competente para eliminar o agente nesse período, desenvolve-se a endometrite persistente.

Os mecanismos de defesa uterinos são complexos, havendo interação das barreiras anatômicas, componentes celulares, imunoglobulinas, substâncias bactericidas e fatores mecânicos. Éguas jovens são mais resistentes à enfermidade. A inflamação persistente freqüentemente resulta em luteólise prematura e subsequente perda embrionária (KATILA, 1996; TROEDSSON, 1999).

As principais causas de endometrite na égua são defeitos anatômicos, partos distócicos, retenção de placenta, processos iatrogênicos e, em animais suscetíveis, pode ocorrer após a monta (YOUNGQUIST, 1993). Troedsson (1999) classifica as endometrites persistentes conforme a patogênese em quatro grupos, a saber: doenças sexualmente transmissíveis, infecção uterina persistente, endometrite persistente induzida pelo coito e endometrite crônica degenerativa, também denominada endometrose.

O diagnóstico das endometrites é realizado utilizando-se exames microbiológicos, citológicos e histopatológicos. No entanto, a biópsia endometrial é o método definitivo para a determinação dessa enfermidade (MEDICE et al., 1991). Além disso, é o tipo de exame mais preciso para o estabelecimento do prognóstico da fertilidade em éguas, visto que a fibrose é o principal critério utilizado na avaliação do comprometimento do endométrio (DOIG et al., 1981). Esta técnica evidencia a situação morfológica do endométrio e fornece dados sobre a sua situação funcional (DOIG et al., 1981; SILVA et al., 1987), além de ser um procedimento econômico e simples (CONCHA-BERMEJILLO & KENNEDY, 1982).

Dessa forma, Kenney (1978) propôs um sistema de classificação das endometrites crônicas em três categorias, considerando a possibilidade da égua levar o conceito a termo. Essas categorias foram divididas com base na incidência e extensão das alterações histopatológicas. Na categoria I não há alterações patológicas ou se estas existem são discretas e esparsas, e não há interferência com a habilidade de levar o feto a termo. Na categoria II é encontrado infiltrado inflamatório difuso moderado no estrato compacto, podendo estar presentes alterações fibróticas e lacunas linfáticas discretas. Alterações inflamatórias podem regredir se tratadas devidamente. As endometrites classificadas como categoria III impossibilitam a égua de levar um feto a termo e não regredem com tratamento. Há fibrose periglandular intensa, sendo proporcional a quantidade de fibrose à gravidade do prognóstico. Podem ser observados também grandes lacunas linfáticas e infiltrado inflamatório moderado a intenso.

Por ser a fibrose o fator mais importante para a determinação prognóstica da fertilidade, houve a necessidade da reclassificação dos tipos de endometrite em quatro categorias (VAN CAMP, 1988). Kenney & Doig (1986) modificaram essa classificação, subdividindo a categoria II em IIA e IIB, de acordo com a quantidade de fibrose endometrial, sua correlação em manter a prenhez e resposta à terapia. Na categoria IIA estão incluídas as biópsias que apresentam infiltrado difuso no estrato compacto, ou disperso, em focos, nos estratos compacto e esponjoso; a fibrose encontra-se esparsa envolvendo ramos glandulares individuais, em qualquer grau de severidade, ou raros agrupamentos de glândulas. As alterações presentes na categoria IIB são difusas ou multifocais, sendo mais severas e extensas.

Ricketts & Alonso (1991) observaram que as endometrites poderiam estar ou não acompanhadas por infiltrado mononuclear, denominando de endometrite crônica infiltrativa as que apresentavam essa característica e de doença endometrial degenerativa crônica aquelas em que estavam presentes ninhos ou cistos glandulares associados à fibrose periglandular ou difusa. A endometrite infiltrativa crônica caracteriza-se por células mononucleares infiltrando o estroma. A doença endometrial degenerativa crônica, por sua vez, caracteriza-se por alterações degenerativas: ninhos e/ou cistos associados à fibrose periglandular e/ou estromal difusa.

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

A avaliação do grau de fibrose endometrial é importante, pois, ao contrário das alterações inflamatórias, é permanente. Nestas lesões a deposição de colágeno ocorre mais comumente ao redor das glândulas ou associada à membrana basal (KENNEY & DOIG, 1986). Essa alteração compromete a integridade e a função das glândulas endometriais, estruturas necessárias desde o período de pré-implantação embrionária até o desenvolvimento placentário completo. Nas glândulas fibróticas, o epitélio se diferencia irregularmente, além de haver modificação das secreções glandulares. Portanto, nos casos mais severos, mesmo que ocorra implantação embrionária, a redução ou alteração dessas secreções podem causar a nutrição inadequada do feto, podendo resultar em aborto (WALTER et al., 2001 b).

Nunes (2003), estudando o padrão de distribuição e tipos de colágeno, observou maior concentração de colágeno nas endometrites crônicas na região periglandular e perivascular e no estrato esponjoso. Ao correlacionar a gravidade da endometrite com a distribuição do colágeno concluiu que quanto mais grave o grau, mais acentuado o acúmulo de colágeno ao redor das glândulas. Verificou também que o colágeno do tipo I foi mais freqüente nas lesões fibróticas periglandulares nas endometrites incluídas nas categorias IIB e III.

O tipo de colágeno presente expressa a cronologia da lesão, já que o colágeno tipo III é o primeiro a ser depositado durante os processos reparativos e fibróticos em geral, sendo posteriormente substituído pelo do tipo I (MARTINEZ-HERNANDES, 1999). Um método histoquímico utilizado para essa tipificação é o Picrosirius Red, o qual diferencia os colágenos através da intensidade da birrefringência das fibras em microscópio óptico de luz polarizada. Dessa forma, diferentes tonalidades são observadas conforme o tipo de arranjo molecular presente (JUNQUEIRA et al., 1978; MONTES & JUNQUEIRA, 1991).

Há evidências de que em lesões granulomatosas com fibrose persistente ocorre formação progressiva de pontes de ligação de colágeno e conseqüente bloqueio de sítios de reação com as enzimas colagenolíticas, o que impede a degradação das moléculas de colágeno (ANDRADE et al., 1999).

Evans et al. (1998) asseguram que a morfometria computadorizada de biópsias uterinas pode ser incorporada ao diagnóstico e avaliação da fibrose endometrial das éguas. Em conjunto com a avaliação histopatológica a determinação da porcentagem de colágeno periglandular endometrial permite conhecer com maior precisão a fibrose periglandular no endométrio a despeito de sua distribuição, tamanho do ninho fibrótico, camadas de fibrose ou grau de fibrose periglandular individual.

Utilizando análise morfométrica associada à técnica do Picrosirius Red – Polarização, Nunes (2003) observou que à medida que a lesão endometrial evolui há substituição progressiva do colágeno tipo III em tipo I na região periglandular. Entretanto, ao realizar a classificação das endometrites no sistema proposto por Kenney & Doig (1986), notou que amostras apresentando fibrose intensa e infiltrado inflamatório discreto ou ausente foram englobadas com outras em que o infiltrado acompanha a fibrose de forma conspícua. Esses achados levam à suposição da ocorrência de diferentes processos, devido à diferentes causas e, no entanto, sendo classificados como fenômenos iguais.

Troedsson (1999) denomina a fibrose periglandular associada à dilatação glandular como endometrose ou endometrite degenerativa crônica, sendo esta uma condição observada não só em éguas suscetíveis a endometrite persistente, mas também naquelas mais idosas sem histórico conhecido de inflamação. Isto sugere um processo fibroplásico degenerativo do endométrio sendo muito mais uma conseqüência do envelhecimento do que da inflamação uterina.

Em um estudo mais recente, Nunes et al. (2005), classificando 125 casos de endometrite crônica segundo Kenney & Doig (1986), descrevem que 18 casos (14,4%) foram incluídos na categoria I, 46 casos (36,8%) na categoria IIA, 23 casos (18,4%) na categoria IIB e 38 casos (30,4%) na categoria III. Esses dados permitiram concluir que 48,8% das biópsias apresentavam elevado grau de fibrose endometrial associada ou não a infiltrado inflamatório. No mesmo estudo, com o objetivo de segregar alterações endometriais

associadas à inflamação e doença degenerativa crônica aplicou-se também a classificação segundo Ricketts & Alonso (1991), na qual verificou-se que as alterações de caráter inflamatório predominavam, totalizando 56,8% dos casos.

Walter et al. (2001a) citam que a endometrose é uma das razões mais freqüentes da infertilidade em éguas, levando a alterações graves do tecido conjuntivo uterino e das glândulas.

Outros processos que estão relacionados a fibrose endometrial também podem afetar a função das estruturas endometriais. É relatada na literatura especializada no assunto a presença de depósitos contendo fosfato de cálcio ou carbonato de cálcio no lúmen das glândulas uterinas de éguas portadoras de alterações endometriais degenerativas. Isso poderia ser causado pela deposição de sais de cálcio em um núcleo formado por debris celulares presentes nessas glândulas. Este processo seria análogo a sialolitíase que, por sua vez, é mais comum em eqüinos do que nas outras espécies. A formação desses cálculos no útero ocorrem predominantemente nas glândulas pouco ou moderadamente dilatadas e nas fibróticas. Esse processo pode levar à dilatação cística dessas estruturas e poderia explicar a diferenciação miofibroblástica periglandular. Os miofibroblastos podem estar relacionados com a estimulação da produção da matriz extracelular e sua degradação, já que são aptos a produzir citocinas (WALTER et al., 2001a; WALTER et al., 2003).

Inoue et al. (2000) constataram que há relação entre as endometroses e a esclerose vascular da íntima e adventícia de pequenas artérias observadas sob o endométrio através de exame histeroscópico, sendo o grau de comprometimento dos vasos proporcional a gravidade da lesão uterina. Esta afecção pode ser consequência da idade avançada, de inflamação crônica e possivelmente de fatores endócrinos. Porém, outros estudos obtiveram resultados conflitantes, nos quais houve diferenças individuais entre a progressão da alteração esclerótica e o grau da endometrose, não podendo ser aquela diretamente atribuída à causa da enfermidade. Sabe-se, no entanto, que alterações no ambiente uterino produzidas pela esclerose das artérias podem contribuir para a progressão da endometrose ou esta pode ocorrer como resultado da idade. Entretanto, a patogênese deste processo ainda permanece desconhecida (WALTER et al., 2001a).

Ainda, há relatos de que as alterações vasculares relacionadas à idade são caracterizadas pela esclerose da camada média e perivascular. A ocorrência de angiose moderada a severa, atingindo todas as camadas da parede vascular, é mais freqüente quanto maior o número de partos. Ela é freqüentemente observada combinada com alterações degenerativas de vasos linfáticos e no endométrio. É citado que as lacunas linfáticas tem sido interpretadas como um sinal de má perfusão uterina. Portanto, a endometrose representaria mais uma seqüela da congestão endometrial crônica (GRÜNINGER et al., 1998; SCHOON & SCHOON, 2003).

Atrofia endometrial, eventualmente resultando em senilidade endometrial, pode ser conseqüência importante da endometrose. A interação entre a endometrite e a endometrose ainda não é completamente compreendida. A reversão depende de vários fatores como idade, número de partições, status reprodutivo, aspectos clínicos e anormalidades endocrinológicas (SCHOON & SCHOON, 2003).

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

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

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

As proteinases que modificam a matriz extracelular e as moléculas da superfície celular são importantes em vários processos fisiológicos e patológicos. Estas enzimas estão envolvidas, por exemplo, nos processos de fertilização, implantação embrionária, embriogênese, morfogênese e diferenciação, e também na inflamação, cicatrização, artrite, fibrose hepática, enfisema, aterosclerose e câncer. As proteínas são degradadas por exopeptidases ou endopeptidases. As endopeptidases subclassificam-se em quatro principais grupos, conforme seu mecanismo de ação e grupo catalítico,

assim como na sensibilidade a inibidores específicos. As metaloproteinases incluem-se entre essas endopeptidases (STERNLICHT & WERB, 1999).

As metaloproteinases (MMP) são as mais importantes nesse processo, e a interação das MMP ativas e seus inibidores (inibidor tecidual de metaloproteinase - TIMP) é regulada de tal forma que evita o dano tecidual desnecessário (ARTHUR, 2000; LENHART et al., 2002). A proteólise pode afetar a aderência das células com a matriz extracelular bem como liberar fragmentos bioativos, induzir fatores de crescimento e citocinas (MOTT & WERB, 2004).

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

Existem mais de 30 famílias de metalopeptidases dependentes de zinco, que podem ser divididas em cinco grupos de acordo com a maneira que interagem com esse metal. As que ligam o sítio ativo de zinco usando três resíduos de histidina na sequência HEXXHXXGXXH, onde H é uma histidina, E corresponde ao ácido glutâmico e X representa um aminoácido variável, são todas endopeptidases, que têm sido denominadas metzincinas (MURPHY & KNÄUPER, 1997). As metaloproteinases (MMP) são endopeptidases, da família das metzincinas, dependentes de zinco e cálcio, com extensa homologia entre as seqüências gênicas. Elas subdividem-se em cinco grupos, baseados na especificidade ao substrato ou semelhança estrutural, sendo elas as collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13, -18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromalinas (MMP-3, MMP-7, MMP-10 e MMP-11), MMP-tipo membrana (MT-MMP-1 a MT-MMP-6) e outras metaloproteinases (MMP-12, MMP-18, MMP-19 até MMP-26) (STERNLICHT & WERB, 1999; GIANNELLI et al., 2003; GOFFIN et al., 2003).

Estruturalmente, as metaloproteinases são constituídas basicamente por um pró-domínio, com cerca de 80 aminoácidos, responsável por manter a latência enzimática das pró-MMPs, um domínio catalítico, composto de aproximadamente 170 aminoácidos, e um domínio C-terminal semelhante a hemopexina – domínio hemopexina - com cerca de 210 aminoácidos. Além

desses, as metaloproteinases tipo-membrana possuem um domínio transmembrana. (NAGASE & WOESSNER, 1999; POLETTE et al., 2004)

Estudos demonstram a habilidade das metaloproteinases em degradar componentes individuais da matriz extracelular, mas a atividade precisa dessas enzimas *in vivo* ainda não é completamente estabelecida. Inicialmente, essa propriedade foi associada à patogenia de doenças degenerativas, da cicatrização e da gênese de tumores. Nos últimos anos, as MMPs têm sido correlacionadas à modulação sutil das interações célula-matriz comandando processos diversos como diferenciação celular, migração e apoptose, bem como a regulação da atividade de muitos fatores de crescimento (MURPHY & KNÄUPER, 1997).

Menon & Fortunato (2004), em um trabalho de revisão, afirmam que as metaloproteinases estão envolvidas com processo colagenolítico programado que existe no amniocódon humano durante a gestação para que haja o acomodamento das membranas no útero, devido ao constante aumento de pressão e volume do processo gestacional.

As collagenases iniciam a quebra de vários componentes fibrilares do colágeno, incluindo colágenos do tipo I, II, III e VII. Entre as collagenases, a MMP-13 apresenta expressão focal próxima às regiões com perda de membrana basal de carcinomas. Os produtos resultantes dessa clivagem são rapidamente desnaturados em gelatinas, que posteriormente serão degradadas pelas gelatinases. Estas últimas são também conhecidas como collagenases do tipo IV, e degradam preferencialmente colágeno desnaturado e componentes da membrana basal. As metaloproteinases-tipo membrana, reconhecidas por serem os principais ativadores fisiológicos da pró-MMP-2, também quebram colágenos do tipo I, II e III, fibronectina, lamininas, fibrina, gelatina, "nidogen", e proteoglicanas da cartilagem (POLETTE et al., 2004). Juntas, as MMP têm capacidade de digerir todos os componentes da matriz extracelular (MOTT & WERB, 2004).

Em equilíbrio com as metaloproteinases, os inibidores tissulares de metaloproteinases - TIMPs - são importantes reguladores do metabolismo da matriz extracelular, principalmente nas atividades primárias como inibidores das MMPs.

Esses inibidores são glicoproteínas com peso molecular próximo de 28500. Eles interagem com as metaloproteinases ativas na relação estequiométrica de 1:1 (UENO et al., 1996). Os TIMPs dos mamíferos pertencem a uma família com quatro membros (TIMP-1 à TIMP-4) com cerca de 40% de identidade seqüencial. Embora existam somente quatro dessas enzimas, a atividade enzimática atinge diferentes MMPs sem especificidade. A TIMP-1 é uma exceção, pois é fraca inibidora das metaloproteinases do tipo membrana, enquanto a TIMP-2 e TIMP-3 são muito mais efetivas nesses casos (WEI et al., 2003).

Todas as metaloproteinases são sintetizadas como pré-pró-enzimas e secretadas como pró-MMPs inativas na maior parte das vezes. A ativação enzimática da pró-enzima ocorre pelo deslocamento do resíduo de cisteína (chave-cisteína) presente no pró-domínio, mediante clivagem proteolítica ou quebra química, esta produzida experimentalmente por oxidação ou tratamento com compostos mercuriais (NAGASE & WOESSNER, 1999; LEE & LAMMERDING, 2002; PARDO & SELMAN, 2005). Podem ser produzidas por leucócitos e por várias células dos diferentes tipos de epitélio, tecido conjuntivo, além das células neoplásicas. Nas células inflamatórias pode ser observada a MMP-8, ou collagenase neutrofílica, que além dos neutrófilos está presente também nos eosinófilos; a MMP-9 é encontrada nos neutrófilos e macrófagos. Nos macrófagos situam-se outras metaloproteinases como a MMP-2 (presente também no eosinófilo), estromalisinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), a matrilisina (MMP-7), e a metaloelastase, ou MMP-12 (BOCHSLER & SLAUSON, 2002).

Da mesma maneira, os TIMPs podem ser observados nos tecidos em diferentes células. Estudando a presença dos TIMPs na fibrose oral submucosa, CHANG et al. (2002) descreveram que esses inibidores encontravam-se amplamente distribuídos nos tecidos e nos fluidos e estavam expressos em vários tipos celulares, dentre eles os fibroblastos.

A expressão da maioria das metaloproteinases é regulada por fatores de crescimento, hormônios, citocinas, interações célula-matriz e célula-célula e transformação celular (BREW et al., 2000). A estromalisina-3 e todas as MT-MMPs podem ser ativadas no ambiente intracelular. Todas as outras metaloproteinases são ativadas fora da célula. Entre as enzimas que

promovem a ativação extracelular estão a plasmina, a catepsina G e proteinases bacterianas (BOCHSLER & SLAUSON, 2002)

Durante os processos inflamatórios e fibróticos, proteases, entre elas as MMP, são sintetizadas e liberadas para o meio. Recentemente, vários estudos têm sido realizados relacionando a presença das metaloproteinases com essas enfermidades.

Garland et al. (2002) descrevem que nos casos de corioamnionite em humanos há aumento significativo do nível de MMP-9, e que a pesquisa da quantidade dessa metaloproteinase no líquido amniótico é um indicador confiável para o diagnóstico de infecção intra-uterina com 83% de sensibilidade, 95% de especificidade, 71% e 97% de valor prognóstico positivo e negativo respectivamente.

Recentemente, foi observada atividade aumentada da MMP-2 e da MMP-9 associada à presença dos macrófagos nas inflamações gástricas (JAMES et al., 2005).

Os TIMPs desempenham papel importante na implantação embrionária e placentação, assim como em muitos outros processos de remodelamento tecidual relacionados à reprodução, tais como ovulação, angiogênese, crescimento embrionário e desenvolvimento da glândula mamária. No entanto, a função primordial dessas enzimas é promover a homeostasia da matriz extracelular e manter sua integridade (LENHART et al., 2002).

Goffin et al. (2003) relatam que em humanos as MMP são responsáveis pelo remodelamento do colágeno uterino nas fases perimenstruais. Especificamente no trato reprodutivo feminino, estão relacionadas ao remodelamento e reparo tecidual em eventos como ovulação, implantação embrionária, útero pós-parto e involução da glândula mamária (BRUNER et al., 1995).

Em outros órgãos, as MMPs também desempenham papel importante nos processos fibróticos.

Nos processos patológicos progressivos, como a fibrose hepática, há excesso de deposição de proteínas da matriz no espaço extracelular podendo resultar em cirrose. Esse processo está relacionado à regulação da síntese e degradação de matriz. Nestas lesões, ocorre deposição de uma rede de matriz fibrilar, constituída principalmente por colágenos tipo I e III, relativamente

resistentes à atividade das proteases. As células estreladas hepáticas quando ativadas, exibindo fenótipo de miofibroblastos, secretam pró-MMP-2, induzidas pela presença de colágeno do tipo I, o principal no fígado fibrótico. A pró-MMP-9, no fígado, tem como principal fonte as células de Kupffer ativadas. O aumento da atividade colagenolítica está associado à diminuição rápida e significativa do nível de TIMP (ARTHUR, 2000).

A MMP-9 está envolvida na inflamação crônica pulmonar. Acredita-se que seja produzida por macrófagos alveolares e esteja diretamente envolvida com o remodelamento tecidual na fibrose pulmonar idiopática em humanos. Nesta enfermidade, edema e alterações na permeabilidade alvéolo-capilar não são observadas, sugerindo-se então que a expressão aumentada da MMP-9 por macrófagos alveolares está correlacionada mais à fibrose do que a degradação extensa do parênquima (LEMJABBAR et al., 1999; SWEET et al., 2002).

No útero humano, a MMP-2 é a que se encontra mais amplamente distribuída. É detectada na maioria das células endometriais, sejam epiteliais, estromais, vasculares, mas não nos leucócitos, porém observada em maior intensidade no tecido menstrual em degeneração. Já a MMP-9 é encontrada no epitélio somente durante a fase secretória precoce e durante a menstruação está presente predominantemente em leucócitos (ZHANG & SALAMONSEN, 2002). Kaitu'u et al. (2005), observaram a expressão de MMP-9 em leucócitos e células em degeneração no endométrio de camundongas modelo para simulação do ciclo menstrual.

A presença de MMPs e TIMPs nos vasos do endométrio humano foi relacionada à angiogênese e proteção vascular respectivamente (FREITAS et al., 1999; SEVAL et al., 2004). Sabe-se que a MMP-2 desempenha papel crucial na angiogênese e que, embora tenha participação nesse fenômeno, a função da MMP-9 ainda não é bem definida (FODA & ZUCKER, 2001).

Lenhart et al. (2002) demonstraram que em útero de suíno a expressão dos inibidores das metaloproteínases está relacionada ao aumento da expressão de relaxina durante a fase precoce da prenhez, sugerindo que esta estimula o crescimento uterino durante a placentação.

Em eqüinos, estudos sobre metaloproteínases foram realizados em doenças articulares e oculares no sentido de se obter dados sobre a ação

deletéria dessas enzimas em quadros degenerativos e o possível efeito favorável de sua inibição (HOLLANDER, 1997; HAFFNER et al., 2003).

Nesta espécie, os níveis de MMP-2 e MMP-9 estão significativamente aumentados nas artropatias, sejam elas sépticas ou não. A MMP-2 é secretada pelos fibroblastos sinoviais e condrócitos, enquanto a MMP-9 pelos condrócitos, monócitos e neutrófilos. O desequilíbrio na atividade dessas enzimas, leva à destruição excessiva da matriz extracelular. Esses dados podem representar um caminho para o tratamento das doenças articulares (CLEGG et al., 1997; HOLLANDER, 1997).

Nas éguas, também foi verificada a presença das MMP-2 e MMP-9 no fluido folicular em todos os estágios de desenvolvimento dos folículos ovarianos, indicando sua necessidade durante o remodelamento tecidual no crescimento e desenvolvimento folicular (RILEY et al., 2001).

Foi demonstrado por Vagnoni et al. (1995) que no útero das éguas a invasão de uma subpopulação de células trofoblásticas (*chorionic girdle cells*), durante a formação da cinta coriônica é dependente da ação de metaloproteinases.

Nas éguas, há evidências de que a MMP-2 e a MMP-9 participem do processo fibrótico que ocorre na endometrite crônica. PORTO et al. (2005) observaram marcação imunoistoquímica para essas enzimas em diferentes tipos celulares no endométrio de égua portadora de endometrite crônica. A imuno-reatividade para MMP-2 foi constatada nas células do epitélio luminal e glandular, além da parede vascular. A expressão da MMP-9 foi detectada nas células do infiltrado inflamatório presentes na periferia de glândulas fibróticas. Walter et al. (2005) também observaram imuno-reatividade para MMP-2 na fibrose periglandular de éguas com endometrose.

Diante do exposto, nota-se que como a patogênese da fibrose endometrial eqüina ainda permanece obscura, estudos sobre seus mecanismos devem ser desenvolvidos. Esta alteração compromete a função uterina, impedindo a fêmea de manter o feto até o final da gestação, o que leva a grandes perdas econômicas. O estudo dos tipos de colágeno que se acumulam na fibrose endometrial é necessário para que seja realizada a correlação cronológica com as alterações encontradas na histopatologia (NUNES, 2003). Investigações a respeito das metaloproteinases e seus

inibidores nesse tipo de processo ainda são escassos. A observação desses dados auxilia a compreensão da enfermidade, pois tais enzimas participam ativamente do remodelamento tecidual nos processos fibróticos. Novos caminhos na terapia anti-fibrótica podem se abrir a partir da determinação do papel das metaloproteinases nas afecções endometriais crônicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PROCEDÊNCIA DO MATERIAL

No presente estudo, foram utilizadas 82 biópsias endometriais. O material foi proveniente do Serviço de Patologia Veterinária e do Serviço de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, SP, oriundo da rotina do Hospital Veterinário desta instituição, de clínicas particulares e de profissionais autônomos, abrangendo o período entre 1987 e 2005.

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, sendo aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº 002/2004).

3.2. PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO

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

Os blocos selecionados foram submetidos à microtomia em micrótomo rotativo. Os cortes histológicos foram obtidos com três micrômetros de espessura.

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

3.2.1. TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

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

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

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

3.2.1.2. RETICULINA

A técnica utilizada, descrita por Caldini (1992), segue o roteiro da Apostila de Técnicas de Colorações Específicas do Laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP Botucatu.

Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia com três micrômetros de espessura.

Depois da confecção, as lâminas permaneceram em estufa a 60°C por 12 horas e posteriormente foram 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: permanganato de potássio a 0,3% por dois minutos, lavagem em água destilada; ácido oxálico a 5% por 1 minuto, lavagem em água destilada; sulfato férrico amoniacal a 3% por dois minutos, lavagem em água destilada; prata amoniacal, preparada e filtrada na hora do uso, por cinco minutos, seguida de três trocas de água destilada; formol neutro a 5% por cinco minutos, lavagem em água destilada; cloreto de ouro a 0,1% por 10 minutos, lavagem em água destilada; tiosulfato de sódio a 3%, lavagem em água corrente por um minuto e passagem em água destilada; solução de Van Gieson por cinco minutos.

Na composição da prata amoniacal, preparada no momento do uso, foram empregados cinco mililitros de nitrato de prata a 5%, cinco gotas de hidróxido de sódio a 10% e cinco gotas de amônia, esta última podendo ser adicionada em menor quantidade, para que a solução tomasse aspecto quase translúcido, com precipitado enegrecido.

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

3.2.1.3. 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.

De 67 biópsias, foram obtidos cortes com cinco micrômetros de espessura de 67 biópsias. Após sua confecção, as lâminas foram posicionadas em berço de coloração e submetidas aos processos de desparafinização e hidratação.

O material então foi imerso em solução de ácido fosfomolibdico a 0,2% por dois minutos e posteriormente lavado em água corrente e água destilada. Após este processo, permaneceu imerso em solução a 0,1% de Direct Red (Direct Red 36554-8, Sigma Chemical CO., St. Louis MO, EUA) dissolvido em

ácido pícrico a 1,5% (aquoso saturado) por 110 minutos. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de ácido clorídrico a 0,1 N por dois minutos. Depois destas etapas, o material foi lavado em solução de álcool a 70% durante 45 segundos e submetido aos processos de desidratação, diafanização e montagem em resina sintética.

3.2.2. TÉCNICA IMUNOSTOQUÍMICA

A padronização da técnica imunoistoquímica foi realizada no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, em cooperação com o Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, e Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP.

Os anticorpos primários utilizados neste trabalho foram:

MMP-2 (RDI-MMP2abm-5D) – Anticorpo monoclonal produzido em camundongo contra a enzima MMP-2 de origem humana (Research Diagnostics Inc.).

MMP-9 (C-20) (sc-6840) – Anticorpo policlonal produzido na espécie caprina contra a porção C-terminal da enzima MMP-9 de origem humana (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

TIMP-1 (C-20) (sc-6832) – Anticorpo policlonal produzido na espécie caprina contra a porção C-terminal da enzima TIMP-1 de origem humana (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

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

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

ANTICORPO	CLONE	PRODUÇÃO	DILUIÇÃO	FABRICANTE
MMP-2	42-5D11	camundongo	1:200	Research Diagnostics Inc.
MMP-9 (C-20)	policlonal	cabra	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc
TIMP-1 (C-20)	policlonal	cabra	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc

Durante a padronização da técnica, foram utilizados como controle positivo placenta humana, para os anticorpos MMP-2 e MMP-9, e carcinoma mamário humano, para o anticorpo TIMP-1. Tecido de granulação eqüino também foi utilizado com essa finalidade, já que na literatura médica é relatada a marcação positiva para esse inibidor das MMPs no estudo dos processos reparativos e fibróticos (ARTHUR, 2000; VAILLANT et al., 2001; CHANG et al., 2002; GONZÁLEZ et al., 2002; YOSHIJI et al., 2002).

Cortes com três micrômetros de espessura foram posicionados sobre lâminas silanizadas e mantidos em estufa a 60°C por 18 horas.

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

Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio a 30% em metanol na proporção 1:9, por 15 minutos, para os anticorpos MMP-9 e TIMP-1. Este procedimento para o anticorpo MMP-2 foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio a 3%. Para a remoção do peróxido do tecido, as lâminas foram lavadas em água destilada.

A recuperação antigênica foi executada em solução de ácido cítrico a 10 mM, pH 6,0, no forno de microondas a 750 watts (potência máxima). Os tempos de radiação para os anticorpos foram: para MMP-9 e TIMP-1, um ciclo de 5 minutos; para MMP-2, quatro ciclos de 5 minutos cada, totalizando 20 minutos. O material foi então submetido a resfriamento por 20 minutos em

temperatura ambiente. Por conseguinte, as lâminas foram lavadas em água destilada e imersas em tampão TRIS-HCl pH 7,4 por cinco minutos.

Com a finalidade de evitar reações inespecíficas com proteínas teciduais, os cortes foram imersos em solução de leite em pó desnatado a 3% em tampão TRIS-HCl por uma hora, para os anticorpos MMP-9 e TIMP-1.

A incubação com os anticorpos primários por 18 horas a 4°C, conforme as diluições descritas na Tabela 1, foi efetuada em bandeja com tampa e lacrada com fita adesiva, precedida da remoção do excesso de leite das lâminas no caso dos anticorpos MMP-9 e TIMP-1. A diluição foi feita em solução de BSA a 1% para os anticorpos MMP-9 e TIMP-1 e em BSA a 0,1% contendo azida sódica para o anticorpo MMP-2.

Os cortes foram lavados com tampão TRIS-HCl e submetidos à reação com anticorpo secundário biotinilado anti-imunoglobulina de cabra (sc-2347, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) na diluição 1:100, por uma hora, para os anticorpos primários anti-MMP-9 e anti-TIMP-1, e anti-imunoglobulina de camundongo (BA-2000, Vector Laboratories, Inc.) na diluição 1:200, por 30 minutos, para o anticorpo primário anti-MMP-2, ambos em temperatura ambiente.

Após a reação com o anticorpo secundário, o material foi lavado com TRIS-HCl e as lâminas incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (VECTASTAIN Elite ABC Kit, PK-6100, Vector Laboratories, Inc.), à temperatura ambiente por 30 minutos. O complexo era preparado 30 minutos antes do uso.

Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3'-diaminobenzidina (Liquid DAB – K3466, DakoCytomation) durante cinco minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, por 20 segundos. Em seguida, procederam a desidratação, diafanização e montagem em resina sintética.

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

3.3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

3.3.1. APLICAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DAS ENDOMETRITES CRÔNICAS EQUINAS

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

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

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

ALTERAÇÕES	CATEGORIA I	CATEGORIA IIA	CATEGORIA IIB	CATEGORIA III
considerações	Endométrio sem alterações patológicas, ou são discretas e bem dispersas.	Alterações discretas.	Alterações moderadas.	Alterações severas.
infiltrado inflamatório		discreto a moderado no estrato compacto ou focos discretos e freqüentes no estrato compacto e esponjoso	difuso e em focos moderadamente severos	difuso e severo
alterações fibróticas		discretas e freqüentes de glândulas individuais em qualquer grau de severidade ou menos de 2 ninhos por campo linear de 5,5 mm (média de 4 campos)	difusa com distribuição uniforme e 4 ou mais camadas (2 ou 4 ninhos por campo linear de 5,5 mm em média de 4 campos)	difusa e uniforme de glândulas com 5 ou mais ninhos por campo linear de 5,5 mm
lacunas linfáticas		extensas	extensas	severas
outras alterações		éguas com atrofia endometrial parcial no fim da estação de monta são incluídas nesta categoria		éguas com atrofia endometrial severa na estação de monta estão incluídas

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

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	CARACTERÍSTICAS
Endometrite crônica infiltrativa	células mononucleares, incluindo histiócitos e plasmócitos, infiltrando o estroma
Doença endometrial degenerativa crônica (endometrose)	alterações degenerativas glandulares (ninhos e/ou cistos) associadas à fibrose periglandular e/ou fibrose estromal difusa

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

3.3.2. AVALIAÇÃO DO COLÁGENO

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

3.3.2.1. ANÁLISE QUALITATIVA

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

Foi realizada a classificação qualitativa do colágeno presente na fibrose endometrial. Pelo método da Reticulina, as fibras que apresentam afinidade pela prata, corando-se em negro, correspondem ao colágeno do tipo III, e as que apresentam coloração acastanhada correspondem ao colágeno do tipo I. Pelo método do Picrosirius Red-Polarização, foi possível a identificação do colágeno do tipo III, com refringência verde, e do colágeno do tipo I, que apresenta refringência amarelada a avermelhada.

3.3.2.2. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para a análise morfométrica do colágeno as lâminas coradas pelo método de Picrosirius Red foram observadas em microscópio de luz polarizada dispondo de câmara digital modelo Axiocam MRc (Zeiss Vision, Alemanha) acoplado a um microcomputador. As imagens foram processadas pelo programa computacional Axiovision Software Rel. versão 4.3 (Zeiss Vision, Alemanha).

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

Foi avaliado o acúmulo de colágeno ao redor de glândulas individuais e de ninhos fibróticos, em cinco campos diferentes em objetiva de 10x. A área da fibrose foi calculada subtraindo-se a área ocupada pelo colágeno pela área ocupada pelo lúmen glandular. O resultado foi dividido pela área total da amostra e multiplicado por 100. Assim, o valor resultante correspondeu ao percentual total do colágeno presente na região periglandular.

3.3.3. AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

A avaliação descritiva para a imuno-reatividade foi realizada considerando-se os tipos celulares positivos entre as diferentes estruturas marcadas e sua frequência sendo avaliada como ausente, discreta, moderada ou acentuada. A intensidade da marcação foi avaliada como fraca, moderada ou acentuada.

Foi também estabelecido um escore acumulativo para cada biópsia, atribuindo-se pontos a cada elemento marcado: epitélio luminal, epitélio glandular, célula endotelial, parede vascular, célula inflamatória e célula estromal, de maneira que houvesse variação entre 0 e 6.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

Este mesmo método foi empregado para o estudo da associação entre o grau de expressão das metaloproteinases 2 e 9 e do TIMP-1 e as categorias de endometrite.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

4.1.1. CLASSIFICAÇÃO DAS ENDOMETRITES CRÔNICAS

Aplicando-se a classificação de Kenney & Doig (1986) nas 82 biópsias, 15 éguas foram incluídas na categoria I, 18 na categoria IIB e 49 na categoria III.

Os resultados da classificação histopatológica dos 82 casos estão apresentados na Tabela 2, quando classificados de acordo com Kenney & Doig (1986).

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

CARACTERÍSTICA	NÚMERO DE CASOS	PERCENTUAL
Categoria I	15	18,29
Categoria IIB	18	21,95
Categoria III	49	59,76
Total	82	100

Os endométrios considerados saudáveis são os mesmos nas duas classificações, representados pela categoria I de Kenney & Doig (1986) e o grupo hígido de Ricketts & Alonso (1991).

Histopatologicamente, os endométrios saudáveis (Figuras 1 e 2) caracterizaram-se por apresentar epitélio luminal cilíndrico baixo com áreas compostas por epitélio cilíndrico alto e pseudoestratificado. As alterações observadas foram predominantemente de origem circulatória: congestão, edema, dilatação de vasos linfáticos, hemorragia e hemossiderose. Nove casos apresentaram infiltrado inflamatório discreto focal predominantemente mononuclear, representando 60% das amostras, e cinco casos (33,3%) apresentaram alterações fibróticas, caracterizadas por acúmulo do colágeno na

região perivascular (três casos) e intersticial de forma discreta e focal (dois casos). As Figuras 9 e 10 demonstram vasos normais.

As biópsias classificadas como IIB segundo Kenney & Doig (1986) apresentaram epitélio luminal cilíndrico podendo ter áreas de epitélio pseudoestratificado. Entre as alterações fibróticas, a fibrose periglandular foi encontrada em 77,7% dos casos e caracterizou-se por deposição moderada de colágeno e média de 5 ninhos fibróticos por campo de cinco milímetros lineares. Fibrose intersticial (66,7%) e perivascular (55,5%) também foram observadas com frequência nessas amostras. Lacunas linfáticas bem como dilatações glandulares estavam presentes em 33,3% e 27,7% dos casos respectivamente. O infiltrado inflamatório foi encontrado em 88,8% dos casos, sendo distribuído principalmente de forma difusa e constituído predominantemente por mononucleares.

Na categoria III (Figuras 3 e 4) o epitélio luminal apresentou-se cilíndrico alto ou baixo, com áreas de epitélio pseudoestratificado. Assim como nas biópsias da categoria IIB, os principais achados foram as alterações fibróticas, mas com intensidade maior, sobretudo na região periglandular. Nesta região, a fibrose caracterizou-se pela deposição acentuada de colágeno (mais de cinco camadas) e alta frequência de ninhos fibróticos (mais de 10 ninhos por campo). 61,3% dos casos apresentaram fibrose perivascular (Figuras 11 e 12) e 57,1% apresentaram fibrose intersticial. 81,6% das biópsias apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear, sendo que desses casos, 40% das biópsias apresentaram distribuição difusa, intensidade moderada ou acentuada.

Ao ser aplicada a classificação de Ricketts & Alonso (1991), 15 biópsias foram consideradas livres de lesões para o diagnóstico de endometrite, 50 casos foram classificados como endometrite crônica infiltrativa e 17 foram diagnosticados como endometrose.

Na Tabela 3 são apresentados os casos quando classificados conforme Ricketts & Alonso (1991).

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

CARACTERÍSTICA	NÚMERO DE CASOS	PERCENTUAL
Endométrio hígado	15	18,29
Endometrite infiltrativa	50	60,98
Endometrose	17	20,73
Total	82	100

As amostras classificadas como endometrite crônica infiltrativa (Figuras 5 e 6) apresentaram epitélio luminal cilíndrico com áreas de epitélio pseudoestratificado. O infiltrado inflamatório apresentou distribuição difusa, mas em algumas amostras (34%) o aspecto foi focal. O grau de intensidade do infiltrado nesta categoria variou de moderado a severo. A fibrose periglandular caracterizou-se por deposição moderada ou severa de colágeno, em 48% e 42% dos casos respectivamente, levando freqüentemente à formação de ninhos fibróticos. A fibrose perivascular foi observada em 64% dos casos, da mesma forma a fibrose intersticial esteve presente em 60% das biópsias.

Nos casos diagnosticados como endometrose (Figuras 7 e 8) o tipo de epitélio luminal mais freqüentemente observado foi semelhante ao das endometrites infiltrativas. A fibrose intersticial, sobretudo de forma difusa, e a fibrose perivascular foram observadas em 67,7% e 41,2% dos casos respectivamente. Houve alta incidência de ninhos fibróticos em 70,6% dos casos com deposição moderada (35,3%) ou severa (58,8%).

Foi observado que nas endometrites mais severas, em ambas as classificações, a densidade glandular foi relativamente menor.

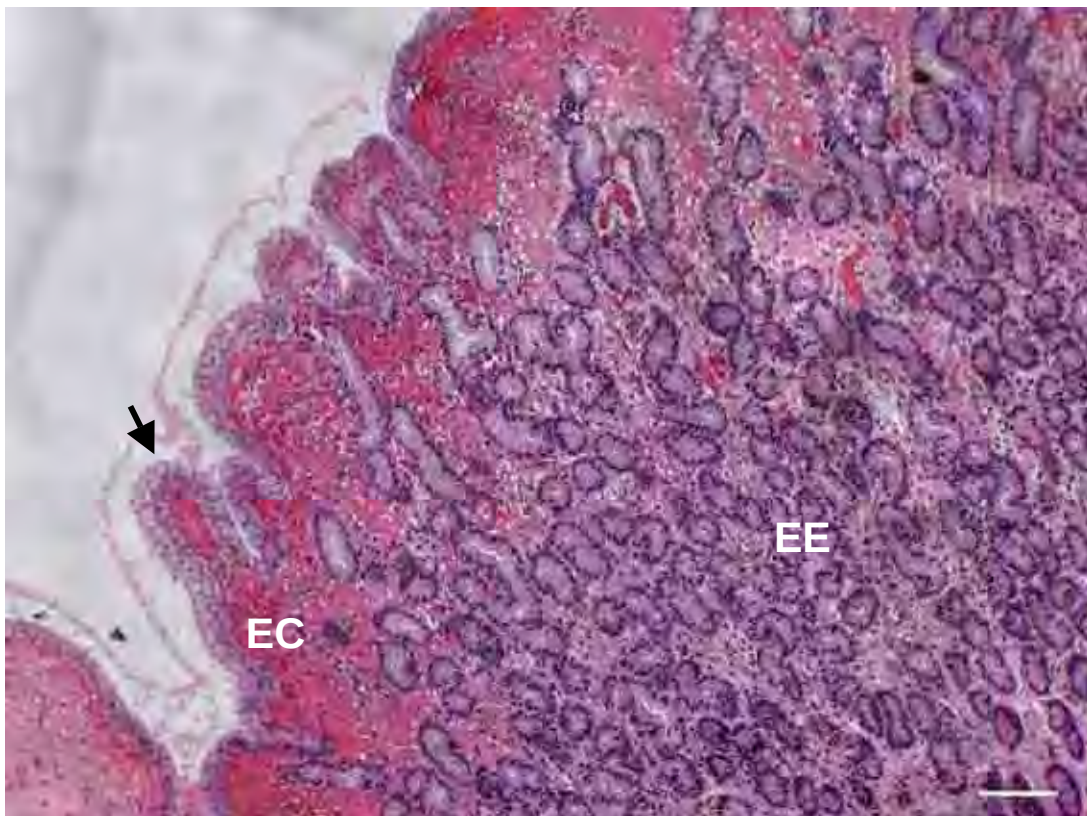


FIGURA 1. Endométrio categoria I. Ausência de alterações inflamatórias e fibróticas. Epitélio luminal alto (seta), estrato compacto (EC) e alta densidade glandular no estrato esponjoso (EE) Hematoxilina e Eosina. Barra: 100 μ m.

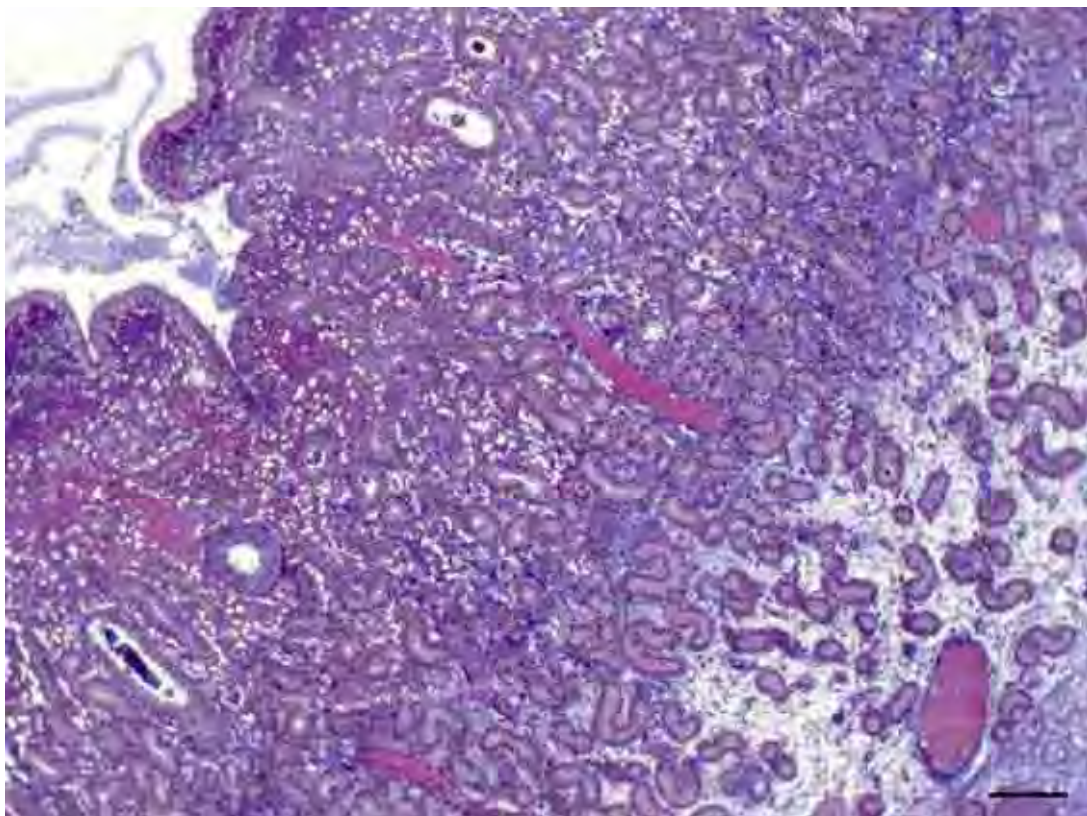


FIGURA 2. Endométrio categoria I. Distribuição normal do colágeno. Tricrômico de Masson. Barra: 100 μ m.

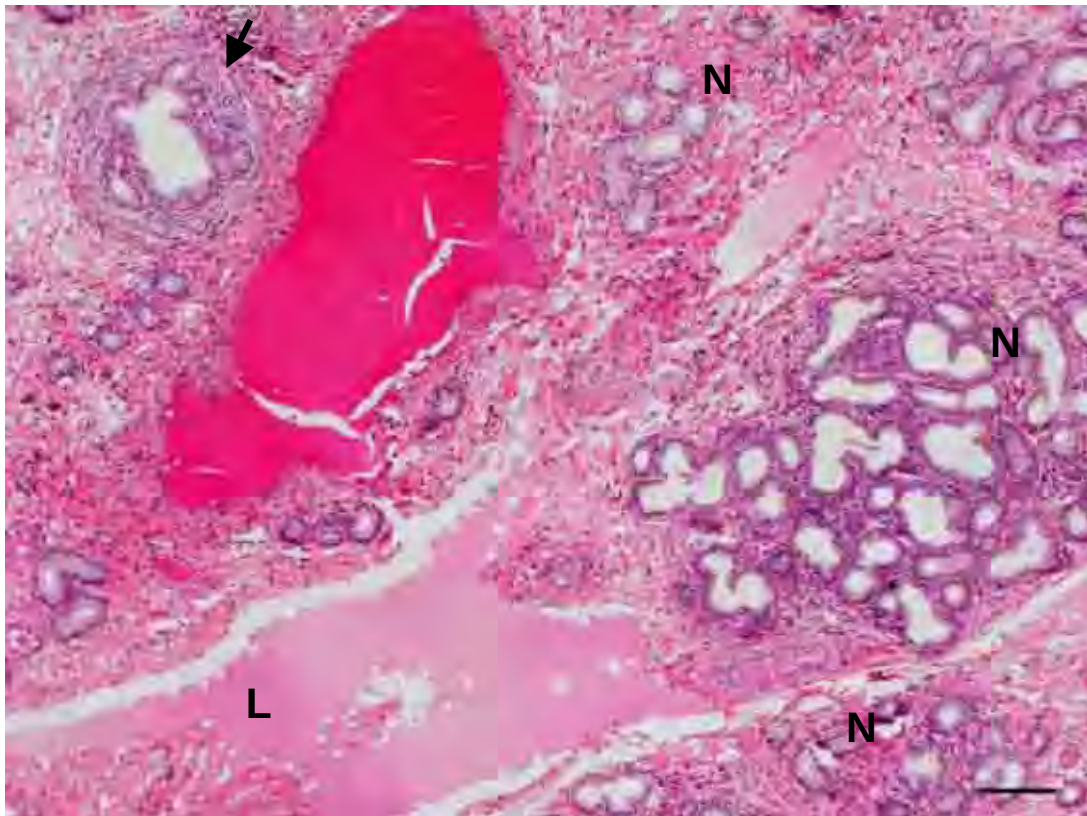


FIGURA 3. Endométrio categoria III. Fibrose periglandular intensa (seta), ninhos glandulares (N), lacuna linfática (ponta de seta), na região profunda do estrato esponjoso. Hematoxilina e Eosina. Barra: 100 μ m.

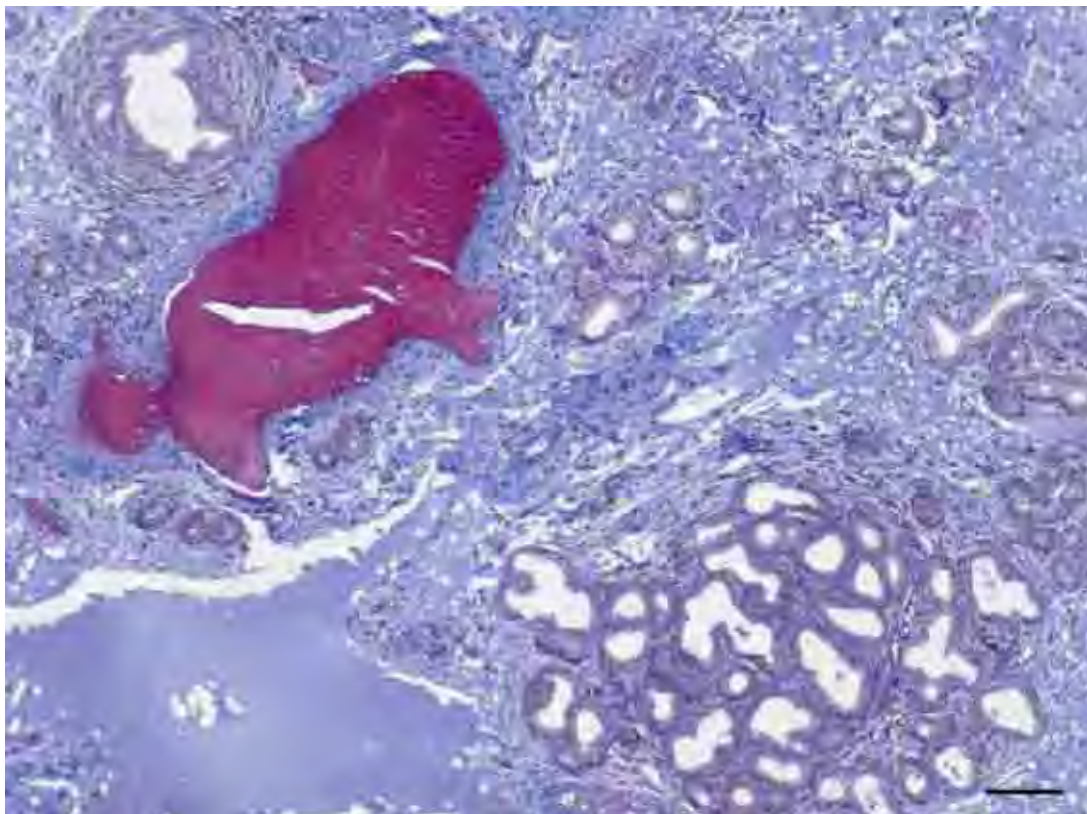


FIGURA 4. Endométrio categoria III. Fibrose periglandular intensa, ninhos fibróticos e lacuna linfática. Tricrômico de Masson. Barra: 100 μ m.

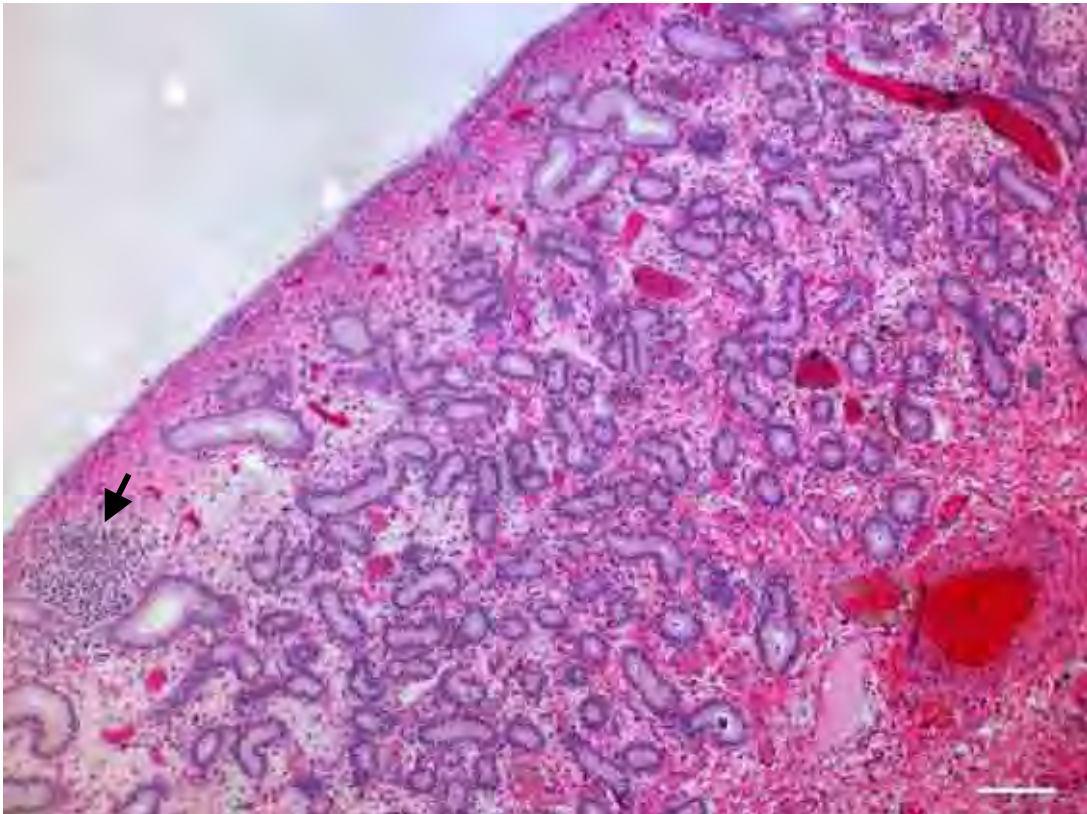


FIGURA 5. Endometrite crônica infiltrativa. Infiltrado inflamatório moderado focal no estrato compacto (seta) e discreto e difuso no estrato esponjoso. Hematoxilina e Eosina. Barra: 100 μ m.

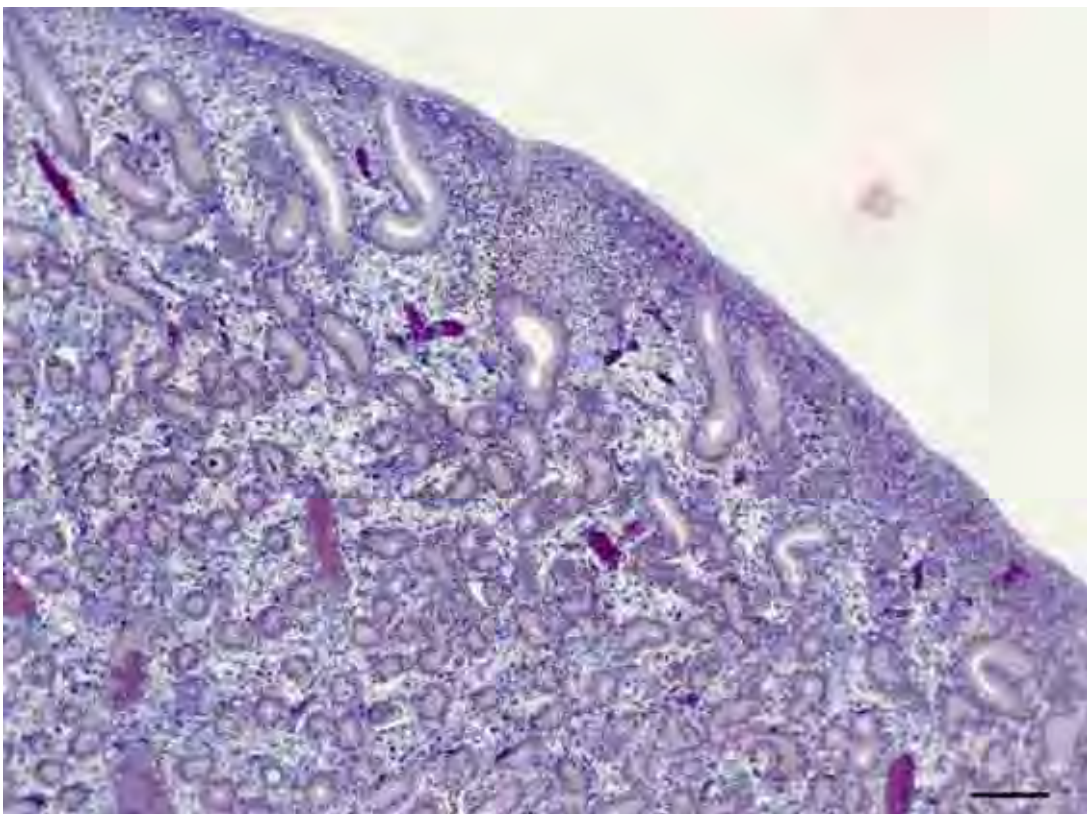


FIGURA 6. Endometrite crônica infiltrativa. Infiltrado inflamatório e fibrose discreta multifocal no estrato esponjoso. Tricrômico de Masson. Barra: 100 μ m.

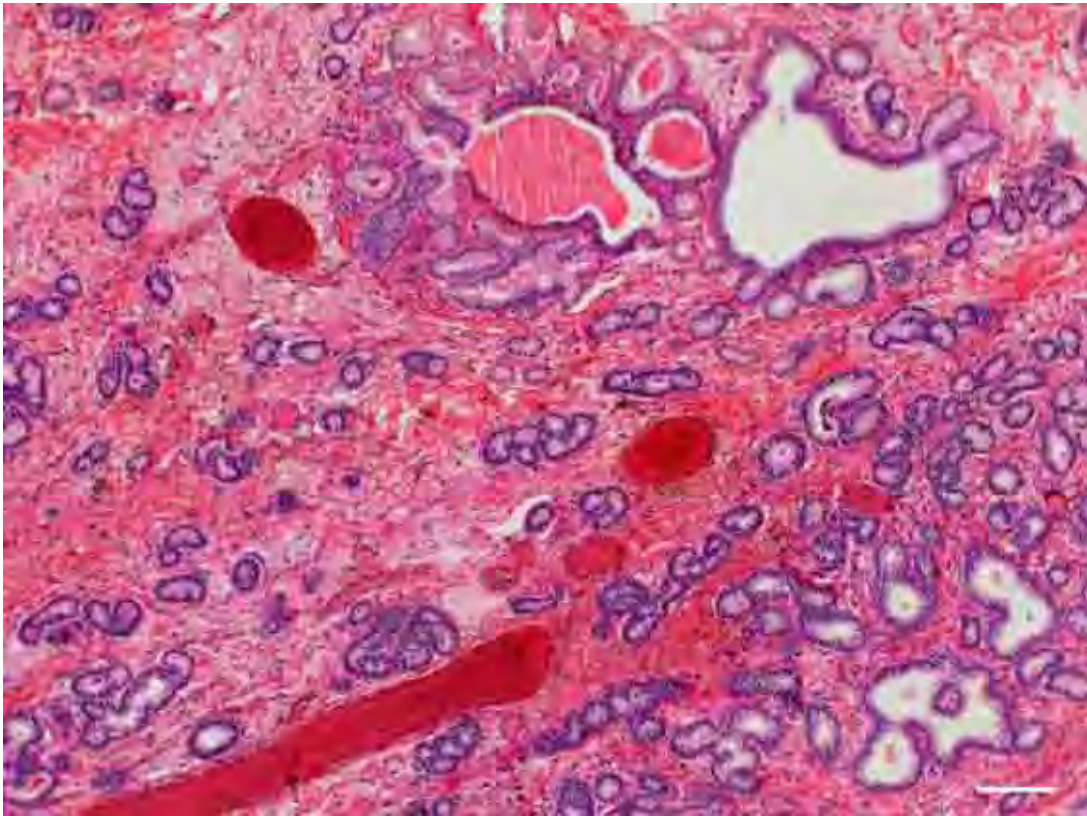


FIGURA 7. Endometrose. Alterações degenerativas difusas: fibrose intersticial acentuada, dilatações e cistos glandulares associados à fibrose periglandular. Hematoxilina e Eosina. Barra: 100 μ m.

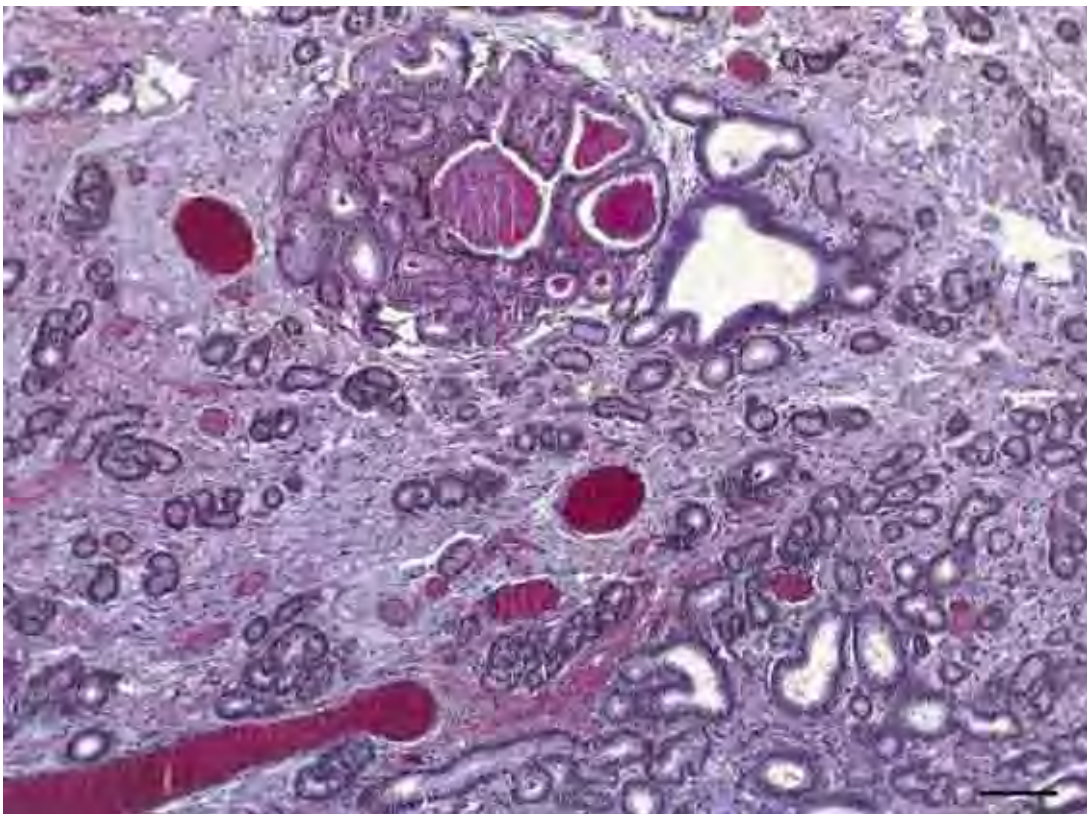


FIGURA 8. Endometrose. Alterações degenerativas difusas: fibrose intersticial e periglandular acentuadas. Tricrômico de Masson. Barra: 100 μ m.

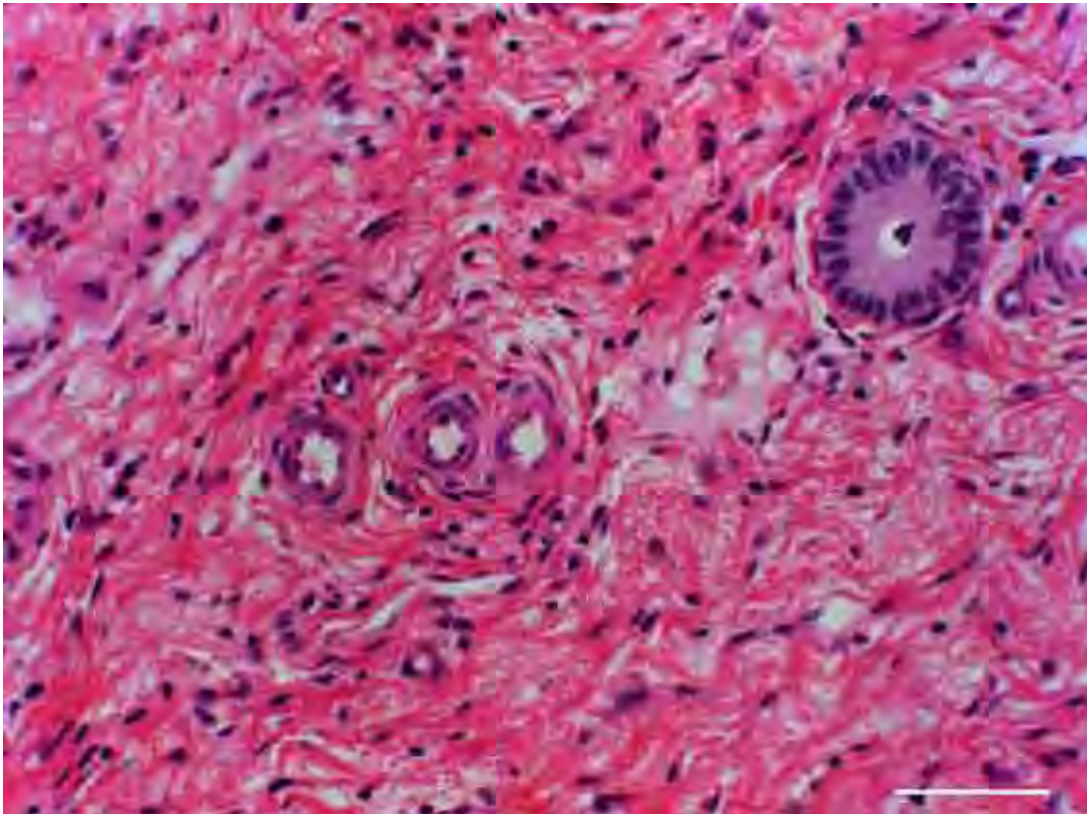


FIGURA 9. Endométrio categoria I. Vasos endometriais normais, na . Hematoxilina e Eosina. Barra: 50 μ m.

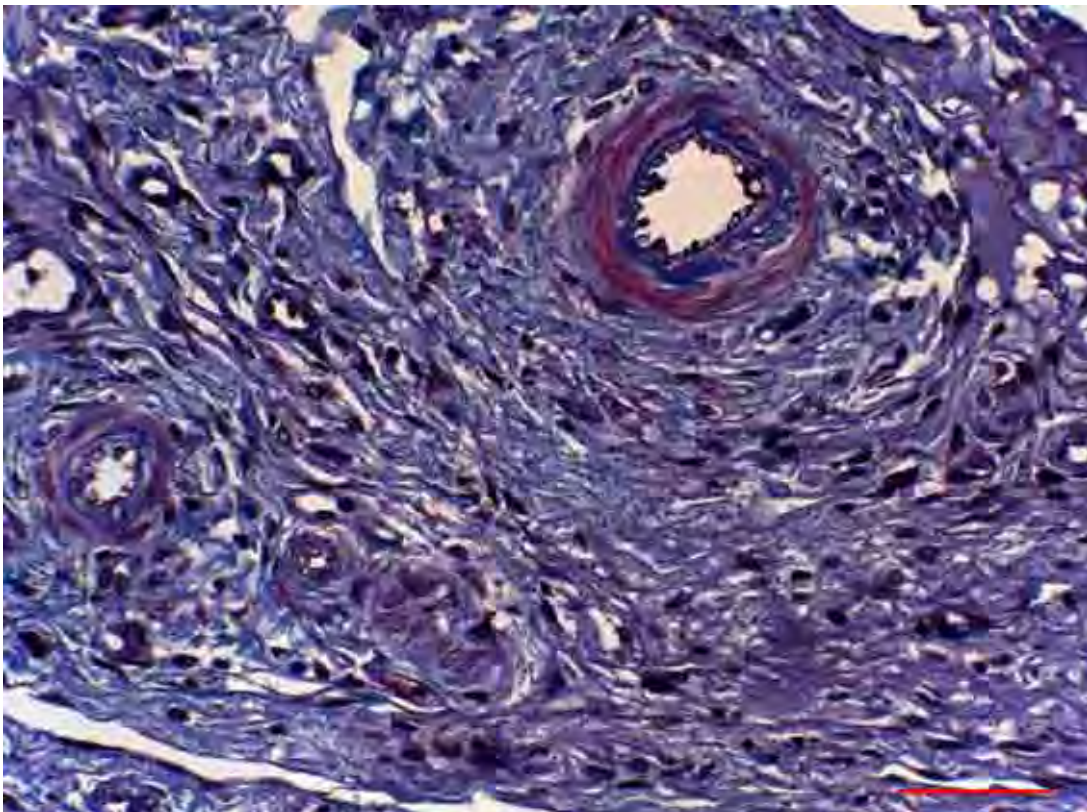


FIGURA 10. Endométrio categoria I. Vasos endometriais normais. Tricrômico de Masson. Barra: 50 μ m.

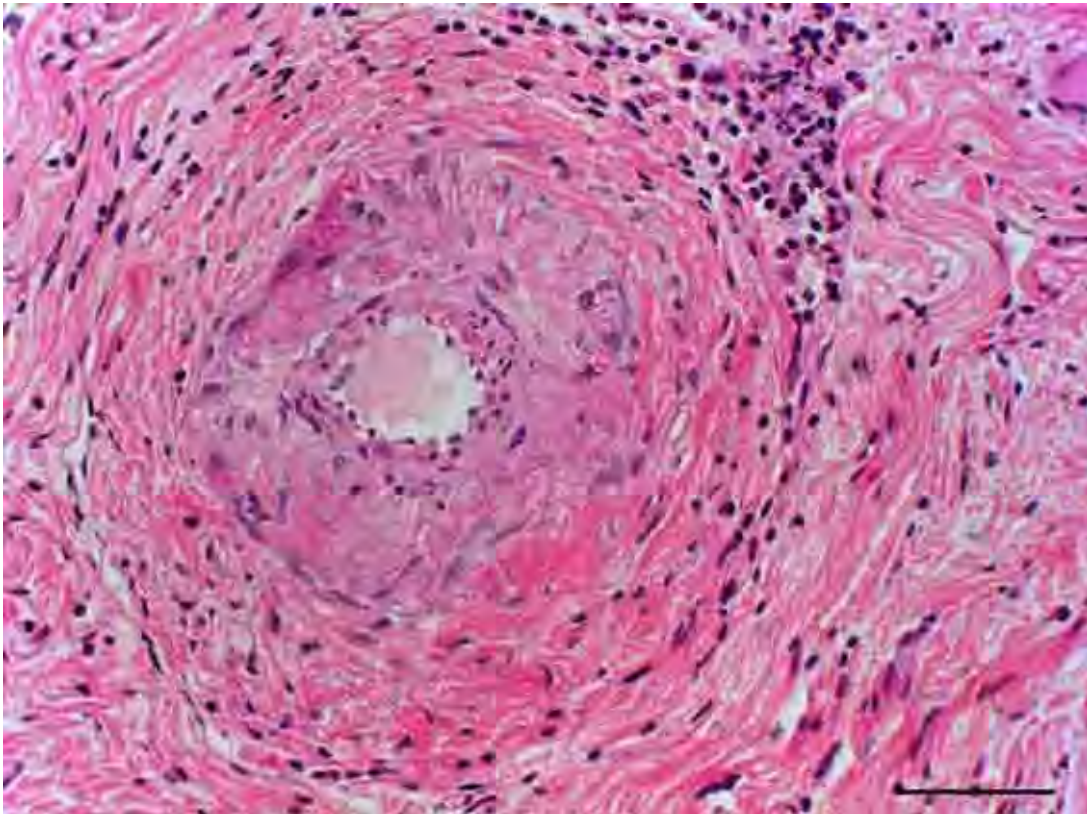


FIGURA 11. Endométrio categoria III – infiltrativa. Vasos endometriais. Fibrose vascular e perivascular acentuada. Hematoxilina e Eosina. Barra: 50 μ m.

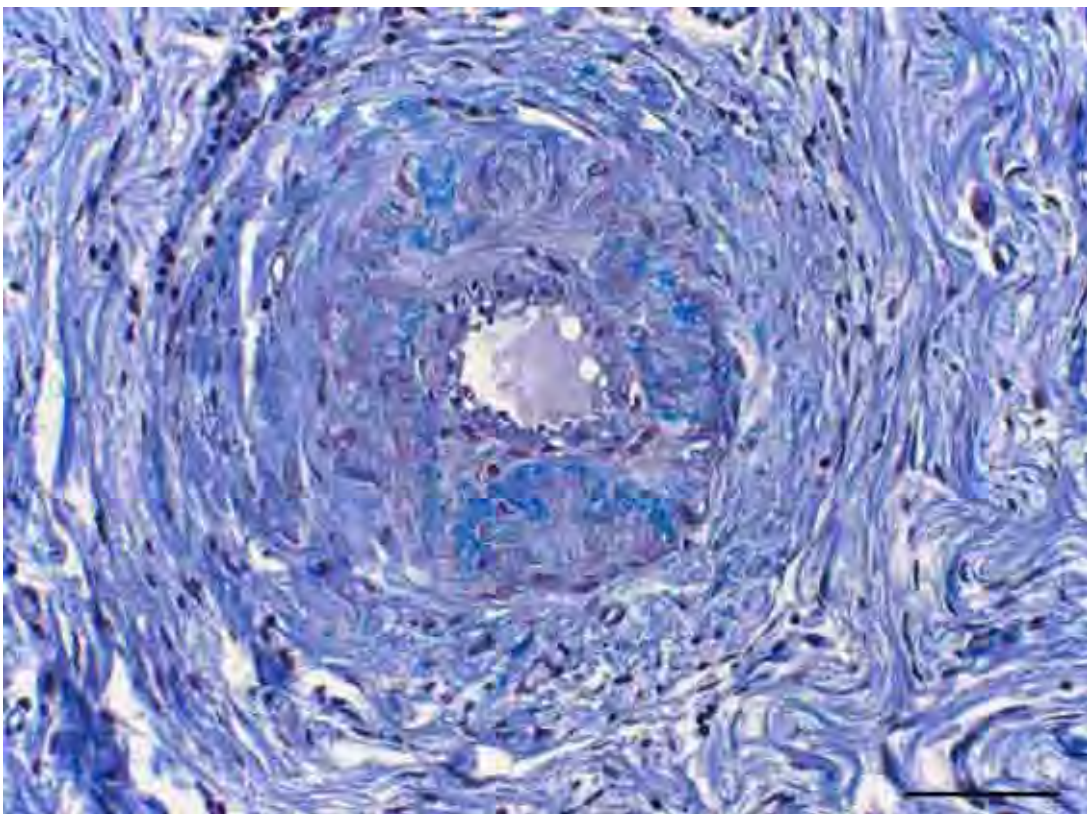


FIGURA 12. Endométrio categoria III – infiltrativa. Vasos endometriais. Fibrose vascular e perivascular acentuada. Tricrômico de Masson. Barra: 50 μ m.

4.1.2. AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DO COLÁGENO

4.1.2.1. RETICULINA

Por esse método foi possível distinguir a membrana basal tanto na região subepitelial como das glândulas endometriais, sendo nítida a diferenciação dos tipos de colágeno devido a sua característica argirófila (tipo III) e não argirófila (tipo I).

Os endométrios saudáveis (Figura 13) [categoria I de Kenney & Doig (1986) e hígidos de Ricketts & Alonso (1991)], de maneira geral, notou-se que houve predominância do colágeno tipo III, distribuído uniformemente pelo endométrio. O estrato esponjoso caracterizou-se por apresentar colágenos do tipo I e III, sem haver predominância de um dos tipos (I-III), em 66,7% das amostras. Na região periglandular, o colágeno mais observado foi do tipo III, correspondendo à membrana basal (66,7%); em alguns casos (26,7%) houve predominância do colágeno do tipo I e em 6,7% foram notados os dois tipos de colágeno simultaneamente sem prevalência de um deles (I-III). A região perivascular, por sua vez, apresentou predominância do colágeno do tipo I (60%). Nesta região, foi possível observar que quanto maior a deposição de colágeno, maior a proporção de colágeno do tipo I em relação ao do tipo III. A Figura 21 demonstra vasos normais em lâmina corada pelo método da Reticulina.

Na categoria IIB de Kenney & Doig (1986), 50% das biópsias apresentou predominância do colágeno III na região subepitelial, sendo em alguns casos notada uma deposição maior, resultando no espessamento da membrana basal. O colágeno do tipo I predominou em 33,3% dos casos e o tipo I-III foi prevalente em 11,1% das amostras. Em um caso a visualização dessa região não foi possível devido a focos de hemorragia. No estrato compacto houve prevalência do colágeno do tipo I em 61,1% dos casos; nessa região, o colágeno do tipo III esteve presente em maior quantidade em 22,2% das biópsias e o tipo I-III foi notado em 16,7% dos casos. O estrato esponjoso mostrou deposição moderada e acentuada em 55,5% e 33,3% dos casos respectivamente, e em 88,9% o colágeno do tipo I foi predominante. A região periglandular caracterizou-se pela deposição moderada de colágeno (72,2%), sendo o colágeno do tipo I predominante em 83,3% das amostras. A região

perivascular demonstrou deposição moderada a acentuada do colágeno (27,8% e 33,3%) sendo o tipo I predominante em 77,8% das biópsias.

Nos casos classificados como categoria III (Figura 14), o colágeno I prevaleceu em todas as regiões estudadas, exceto na região subepitelial. Neste segmento do endométrio, em 63,3% das amostras o colágeno do tipo III foi predominante, não havendo indícios de fibrose, ou esta foi discreta. O acúmulo do colágeno do tipo I no estrato compacto variou de moderado a intenso, ambos em 38,8% dos casos. No estrato esponjoso houve deposição moderada e acentuada em 36,7% e 61,2% dos casos respectivamente, com predominância do colágeno I. A região periglandular caracterizou-se pelo acúmulo acentuado de colágeno, sendo o tipo I prevalente em 73,5% dos casos. Na região perivascular (Figura 22) a deposição do colágeno foi moderada (32,6%) ou acentuada (61,2%), sendo o colágeno do tipo I o mais encontrado em 91,8% das amostras.

Quando aplicada a classificação de Ricketts & Alonso (1991), nos casos diagnosticados como endometrite crônica infiltrativa (Figura 17) houve prevalência do colágeno I, exceto nas regiões subepitelial, na qual o colágeno III predominou em 60% das amostras, e estrato esponjoso, onde 56% das biópsias apresentaram o tipo I-III. A região perivascular apresentou deposição moderada (40%) e acentuada (58%) de colágeno, sendo o do tipo I predominante em 94% das amostras. Na região periglandular, foi constatada deposição discreta em 14% das amostras, e de forma moderada e acentuada em 30% e 54% das biópsias respectivamente. Nessa região, o colágeno do tipo I foi prevalente em 88% desses casos.

Nas endometroses (Figura 18), notou-se maior deposição do colágeno em todas as regiões analisadas, com predominância do colágeno do tipo I: no estrato esponjoso em 94,1% das amostras, na região periglandular em 88,2%, sendo o mesmo valor encontrado na região perivascular, e no estrato compacto em 58,8% das biópsias. Somente na região subepitelial colágeno do tipo III prevaleceu (58,8%).

4.1.2.2. PICROSIRIUS RED – POLARIZAÇÃO

Nos endométrios saudáveis (Figura 15), houve predominância de colágeno do tipo III, com distribuição reticular pelo endométrio. A região que apresentou maior deposição de colágeno do tipo I foi a perivascular, em 33,3% das amostras. A Figura 23 mostra a distribuição dos colágenos I e III em vasos normais do endométrio.

Na categoria IIB de Kenney & Doig (1986), os estratos compacto e esponjoso, além da região periglandular, mostraram deposição de colágeno moderada (69,2%, 53,8% e 84,6% respectivamente), e na região perivascular ocorreu de forma acentuada (61,5%). Todas as regiões avaliadas apresentaram predominância do colágeno do tipo I, com exceção da região subepitelial, onde o tipo I-III foi observado em 38,5% das amostras.

A categoria III (Figura 16) caracterizou-se pela deposição acentuada de colágeno em todas as regiões, sendo observada a predominância do tipo I. A região que apresentou maior acúmulo de colágeno foi a periglandular (92,3%). A Figura 24 mostra a distribuição de colágeno do tipo I e do tipo III em vaso fibrótico.

Quando empregada a classificação de Ricketts & Alonso (1991), nas endometrites crônicas infiltrativas (Figura 19), as regiões onde a deposição de colágeno foi mais intensa foram a perivascular (64,9%), o estrato esponjoso (62,2%) e periglandular (56,8%). Houve predomínio do colágeno I em todas as regiões estudadas.

Nas endometroses (Figura 20) houve deposição intensa de colágeno em todas as regiões analisadas, exceto na região subepitelial, onde foi moderada. Os locais de maior deposição de colágeno foram as regiões periglandular e perivascular em 73,3% e 66,6% das biópsias. Nesse processo, o colágeno do tipo I predominou em todas as amostras, e nas regiões periglandular e do estrato esponjoso somente este tipo de colágeno foi observado.

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



FIGURA 13. Endométrio categoria I. Distribuição de colágeno do tipo III – negro (seta) na membrana basal das glândulas e no estrato compacto, e do tipo I (castanho) na região profunda do estrato esponjoso. Reticulina. Barra: 100 μ m.

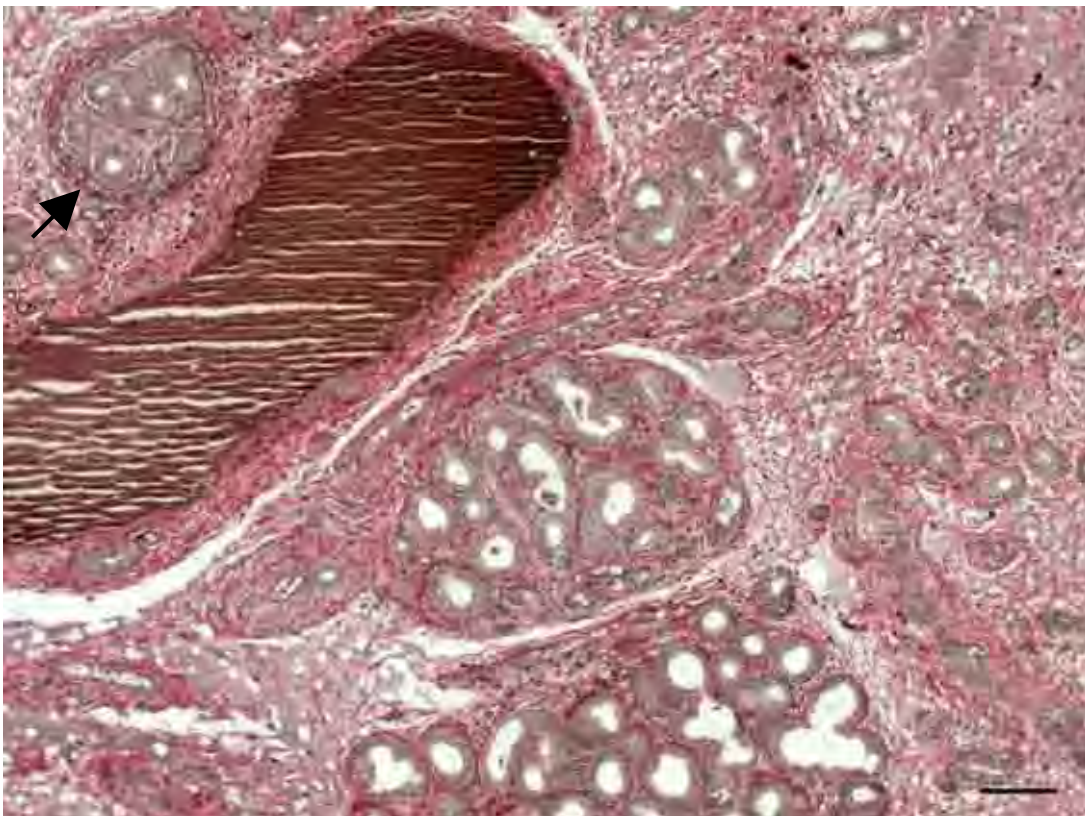


FIGURA 14.. Endométrio categoria III. Colágeno tipo I-III (castanho-negro) na fibrose periglandular (seta) e predominância do colágeno do tipo I (castanho) nos ninhos glandulares. Reticulina. Barra: 100 μ m.

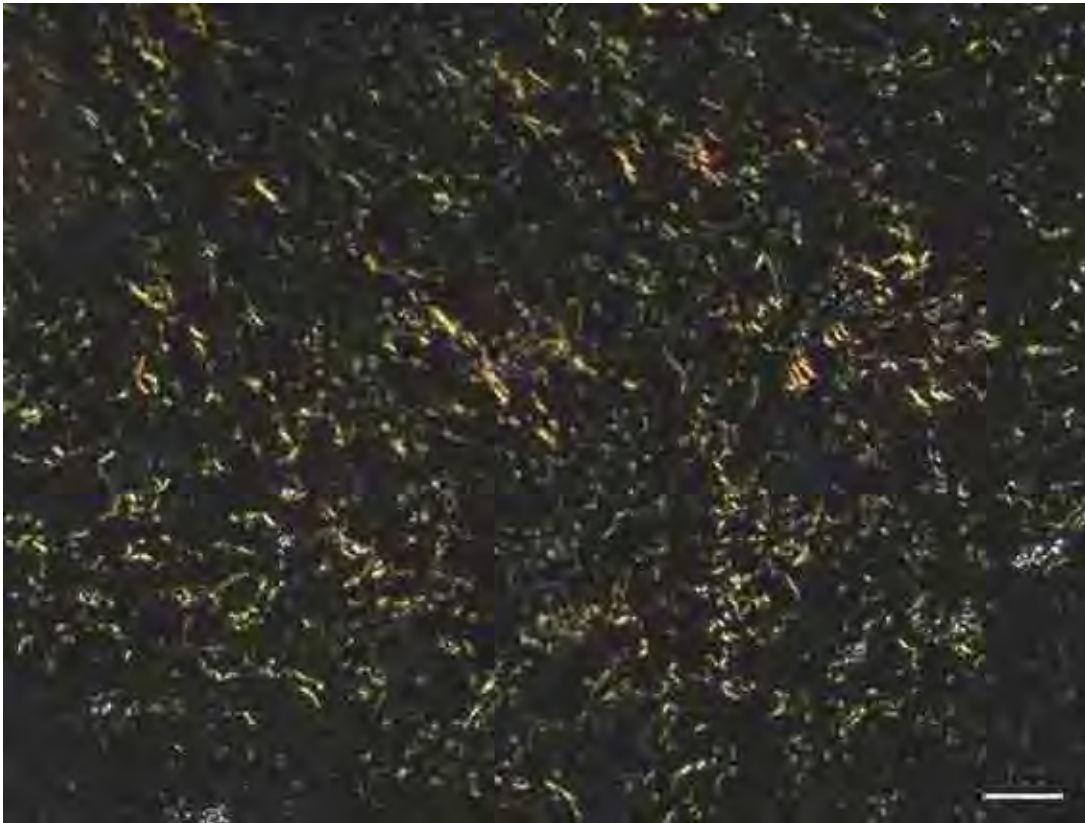


FIGURA 15. Endométrio categoria I. Distribuição reticular do colágeno do tipo III (verde) e presença do colágeno do tipo I (amarelo) em menor proporção. Picrosirius Red – Polarização. Barra: 100 μ m.

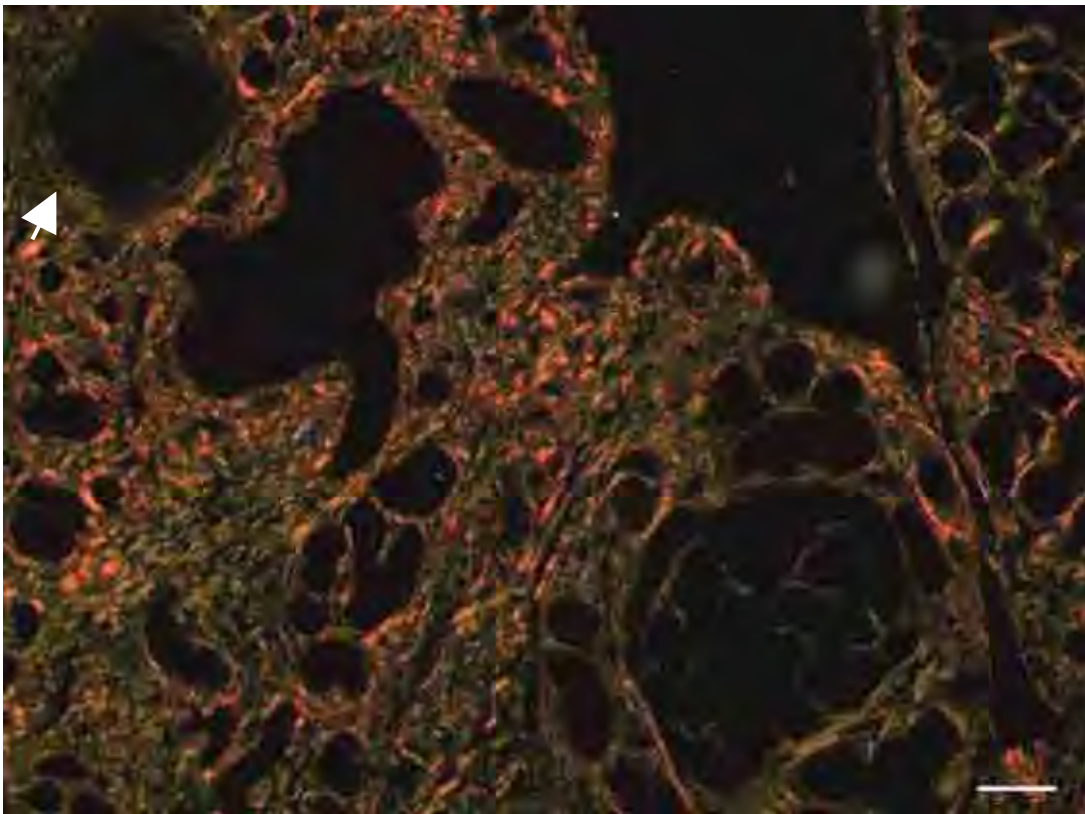


FIGURA 16. Endométrio categoria III. Colágeno tipo I-III (amarelo-verde) na fibrose periglandular (seta) e predominância do colágeno do tipo I (amarelo e vermelho) nos ninhos fibróticos. Picrosirius Red – Polarização. Barra: 100 μ m.

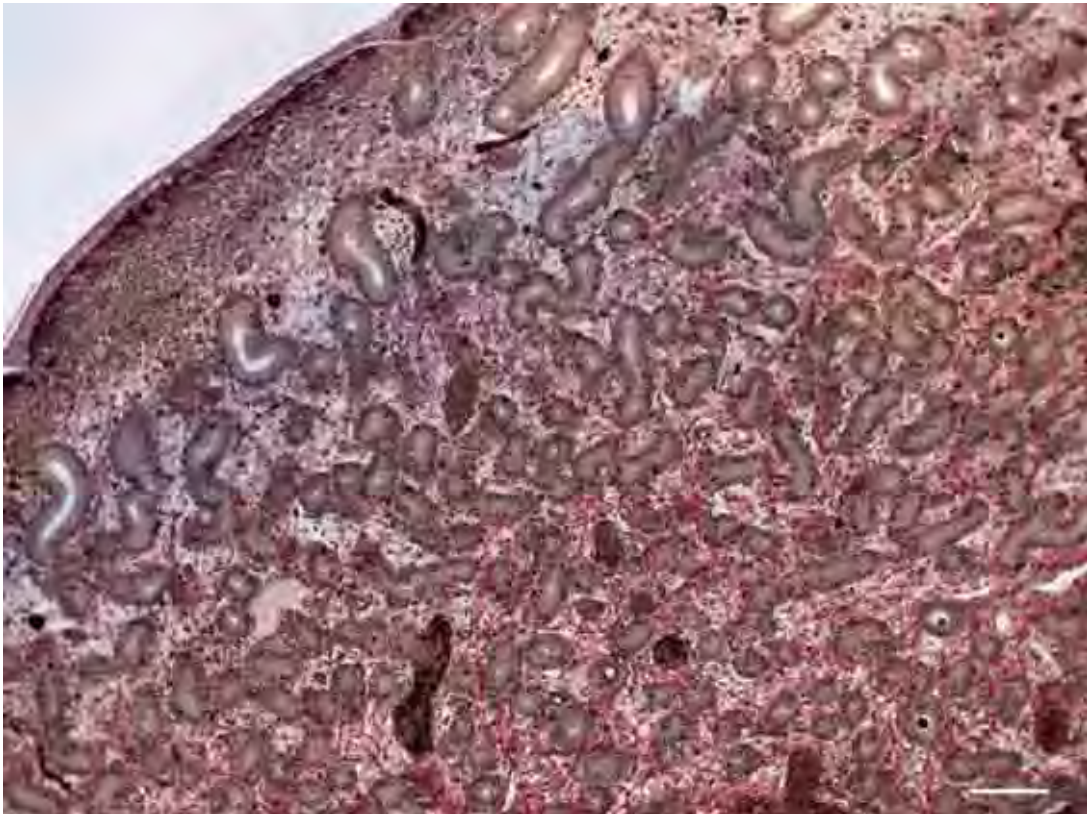


FIGURA 17. Endometrite crônica infiltrativa. Colágeno do tipo III (negro) predominante do estrato compacto e do tipo I (castanho) predominante no estrato esponjoso. Reticulina. Barra: 100 μ m.

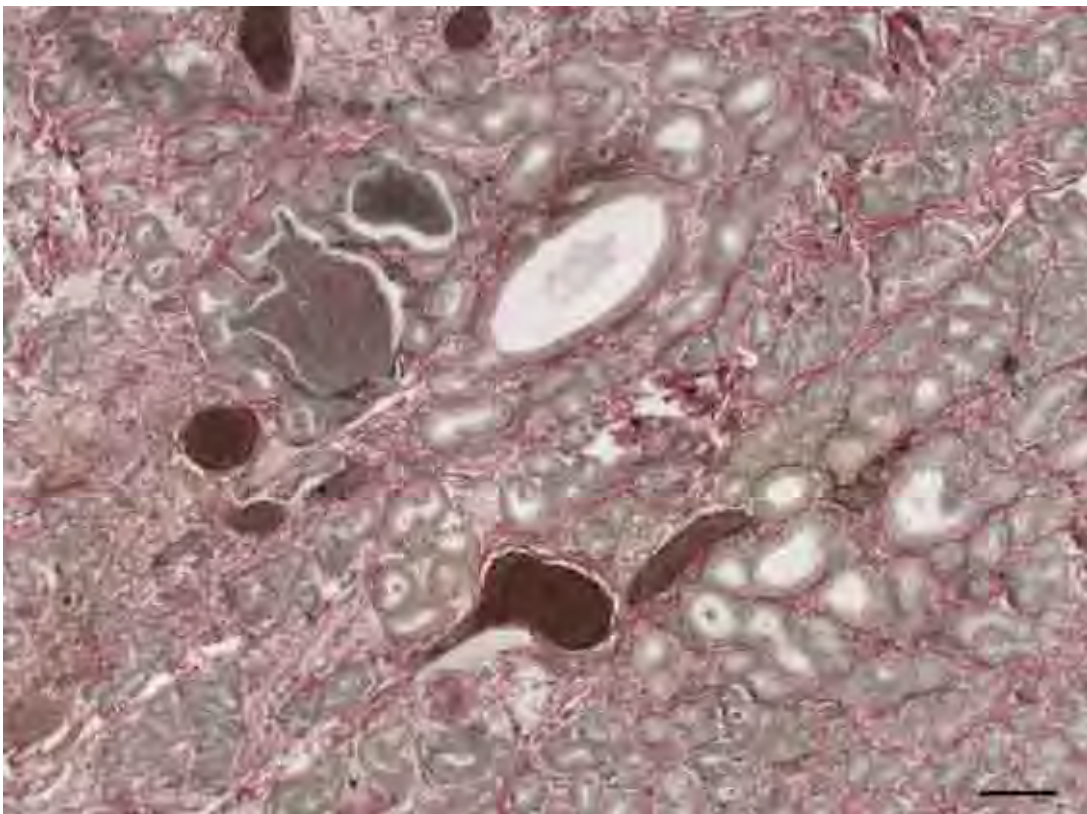


FIGURA 18. Endometriose. Colágeno do tipo I (castanho) predominante na fibrose intersticial e periglandular. Reticulina. Barra: 100 μ m.

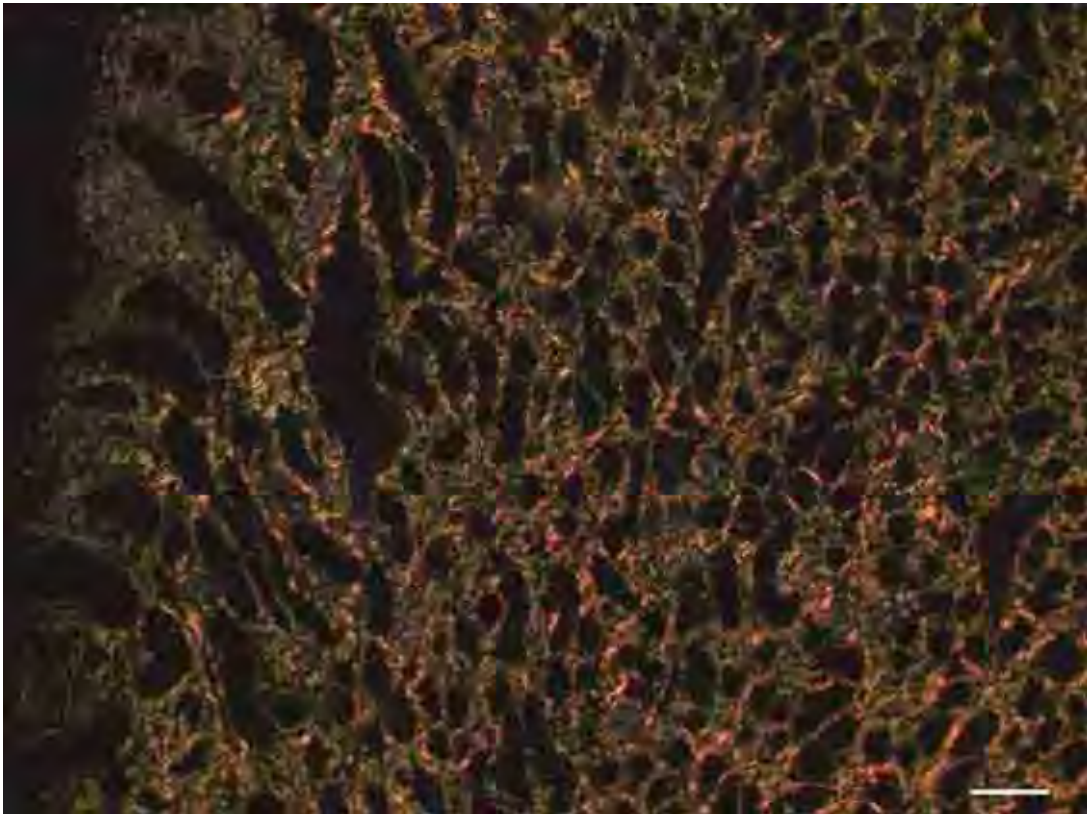


FIGURA 19. Endometrite crônica infiltrativa. Colágeno do tipo III (verde) predominante no estrato compacto e do tipo I (amarelo e vermelho) predominante no estrato esponjoso. Picrosirius Red – Polarização. Barra: 100 μ m.

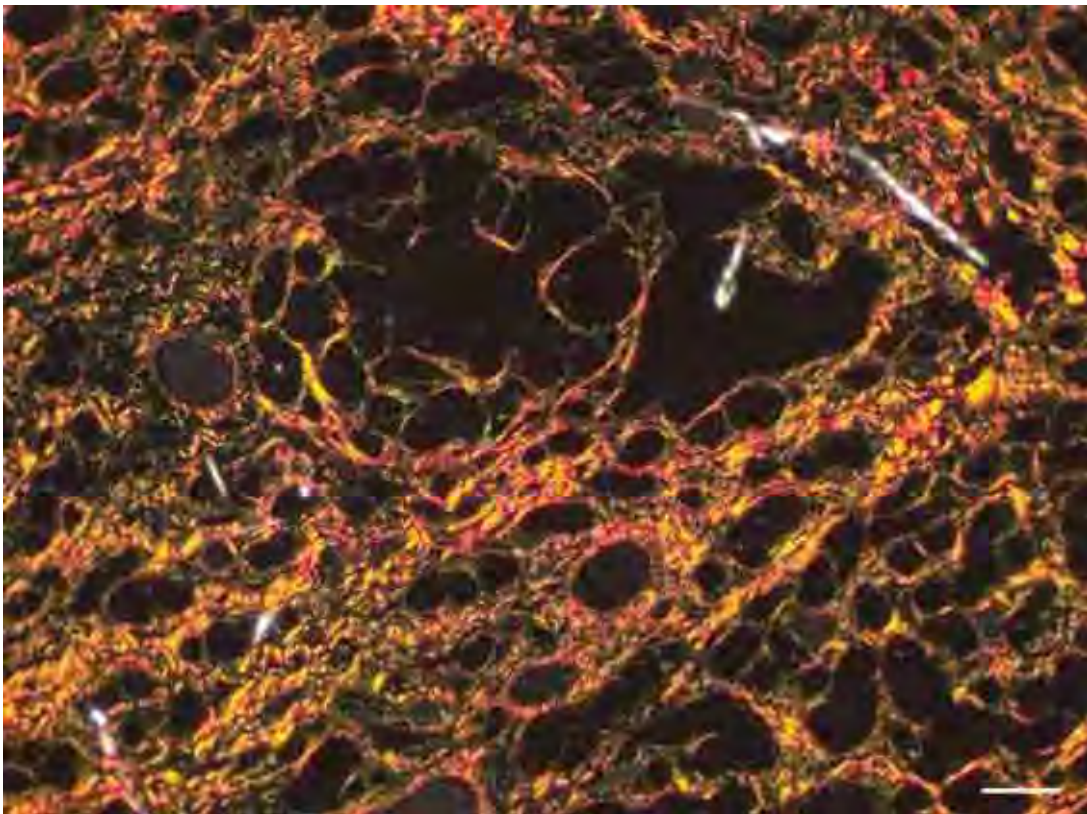


FIGURA 20. Endometriose. Colágeno do tipo I (amarelo e vermelho) predominante na fibrose intersticial e periglandular. Barra: 100 μ m.

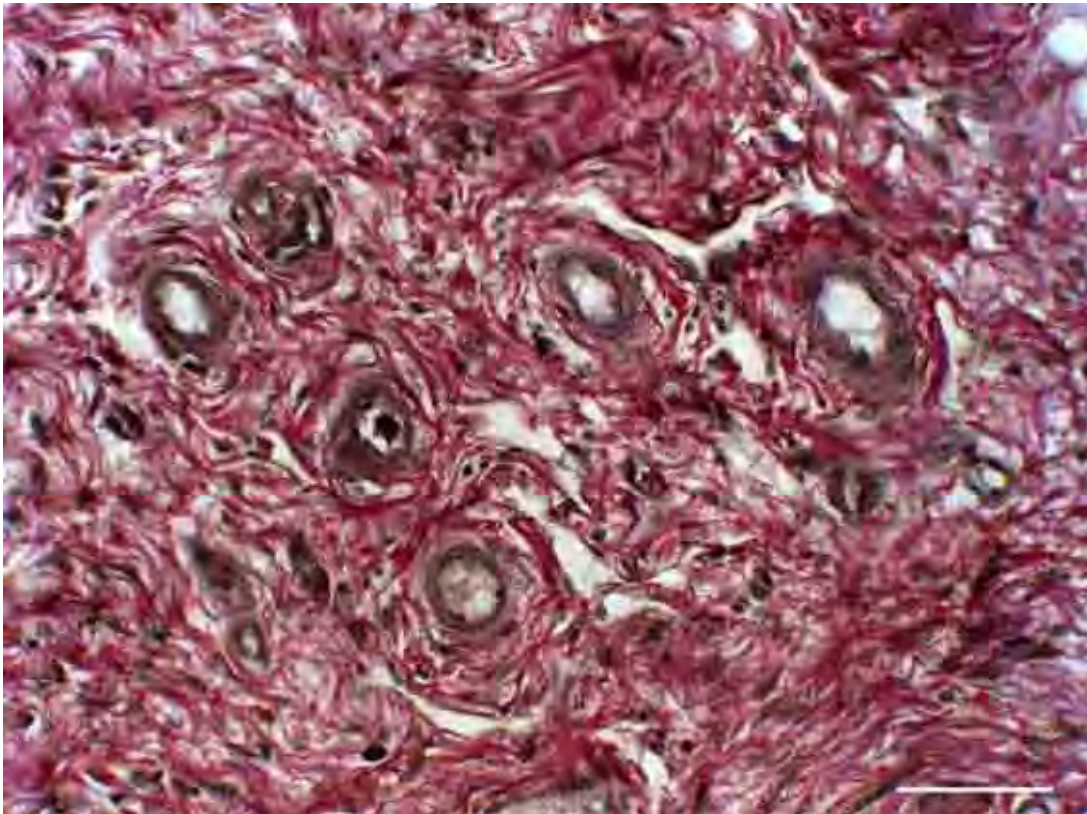


FIGURA 21. Endométrio categoria I. Vasos endometriais normais. Distribuição de colágeno do tipo III (negro) e do tipo I (castanho) na parede vascular. Reticulina. Barra: 50 μ m.

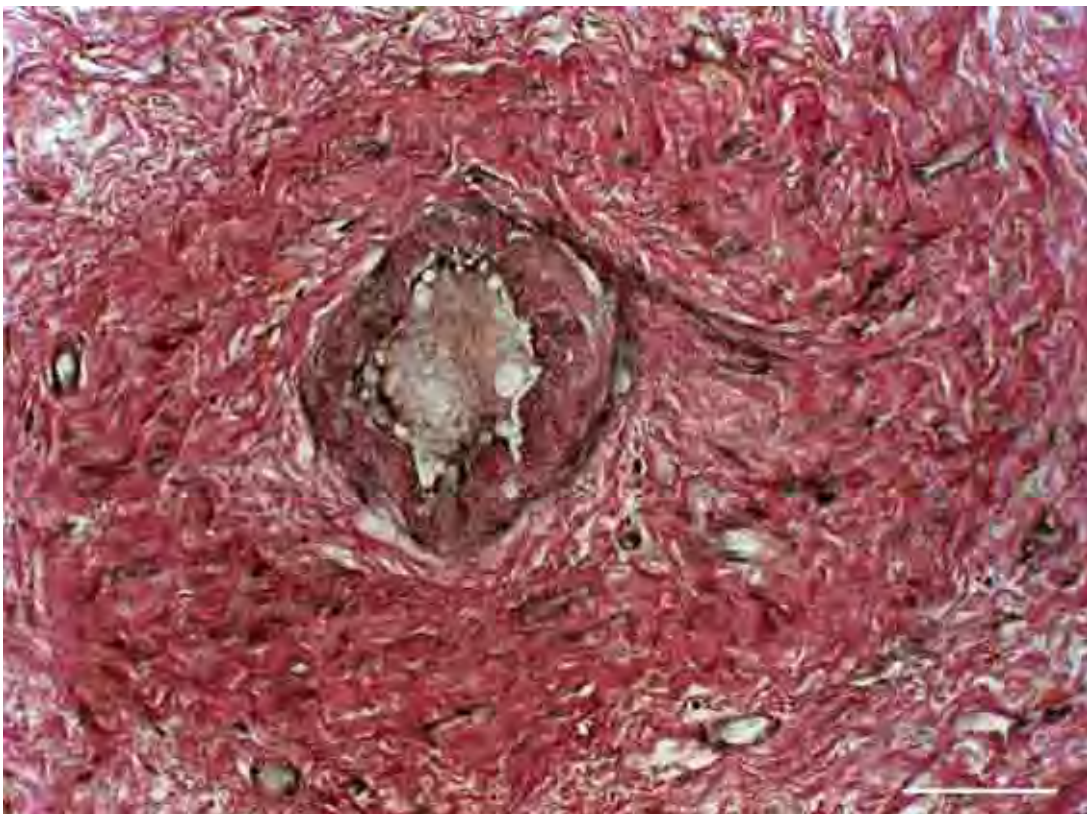


FIGURA 22. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Vasos endometriais. Fibrose vascular e perivascular. Predominância do colágeno do tipo I (castanho). Reticulina. Barra: 50 μ m.

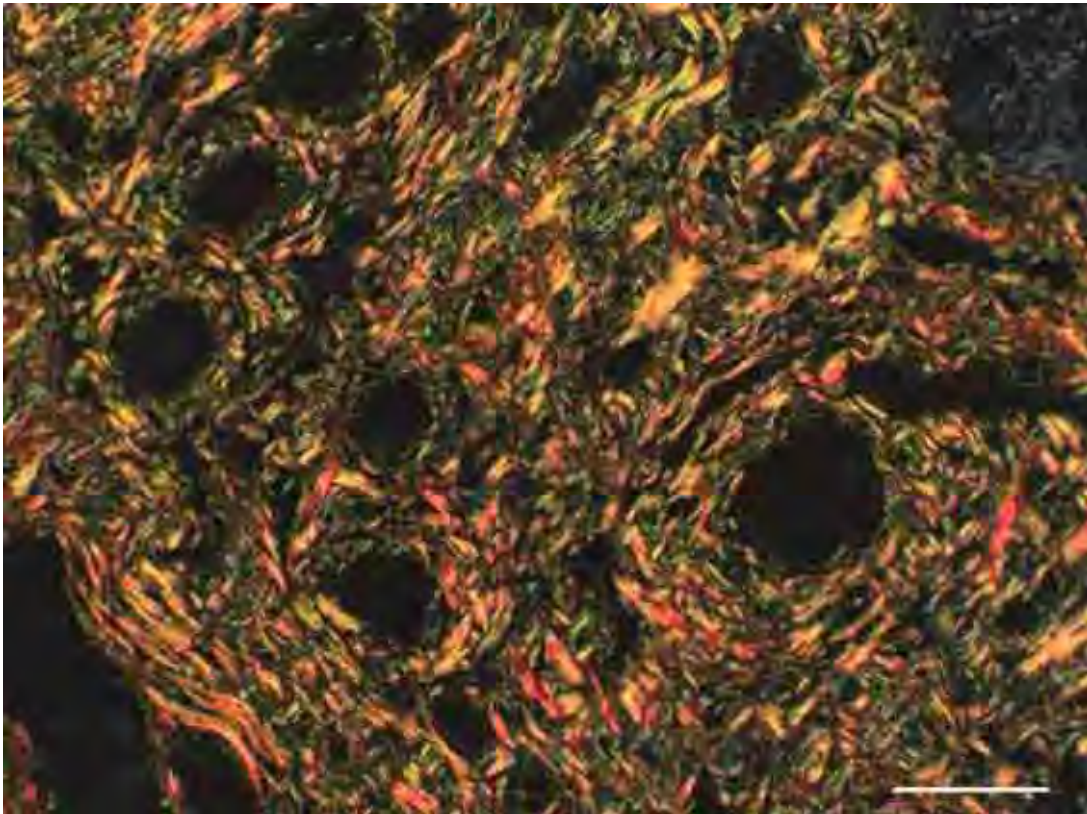


FIGURA 23. Endométrio categoria I. Vasos endometriais normais. Distribuição de colágeno do tipo III (verde) e do tipo I (amarelo e vermelho) na parede vascular. Picrosirius Red – Polarização. Barra: 100 μ m.

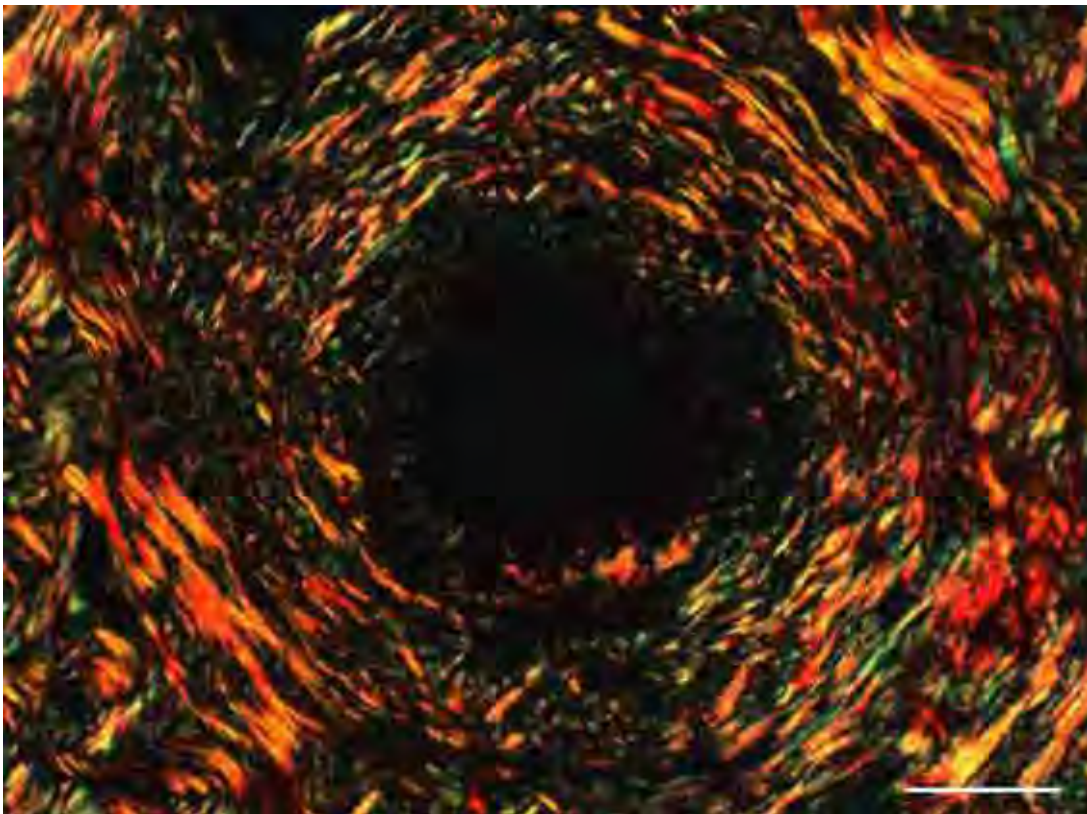


FIGURA 24. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Vasos endometriais. Fibrose vascular e perivascular. Predominância do colágeno do tipo I (amarelo e vermelho). Picrosirius Red - Polarização. Barra: 100 μ m.

4.2. MORFOMETRIA DO COLÁGENO PERIGLANDULAR

A avaliação morfométrica da fibrose periglandular revelou que, independente da classificação utilizada, não houve diferença significativa do percentual de fibrose entre as endometrites crônicas mais graves, categorias IIB e III (KENNEY & DOIG, 1986) e endometrite crônica infiltrativa e endometrose (RICKETTS & ALONSO, 1991). A diferença foi notada apenas entre os endométrios saudáveis e aqueles com diagnóstico de endometrite.

As Tabelas 5 e 6 mostram os resultados da análise estatística.

TABELA 4. Valores medianos do percentual de fibrose periglandular de acordo com as categorias de endometrite segundo Kenney & Doig (1986).

CATEGORIA	FIBROSE PERIGLANDULAR %
I	0,8a ¹
IIB	3,8b
III	4,3b

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

TABELA 5. Valores medianos do percentual de fibrose periglandular nos endométrios classificados segundo Ricketts & Alonso (1991).

CATEGORIA	FIBROSE PERIGLANDULAR %
Endométrio hígido	0,8a ¹
Endometrite crônica infiltrativa	4,4b
Endometrose	3,8b

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

4.3. AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

4.3.1. MMP-2

A expressão de MMP-2 foi observada em 88,7% das amostras de endométrio eqüino. Entre os elementos considerados neste estudo, não houve imuno-reatividade em células inflamatórias, tampouco em células endoteliais.

A marcação imunoistoquímica foi observada nas células estromais do estrato compacto (Figura 27), sobretudo nas biópsias de endométrio saudável. Essas células também mostraram-se reativas ao redor das glândulas fibróticas e/ou dilatadas, nas quais o epitélio também mostrou-se reativo para esse anticorpo. No entanto, a marcação positiva nas células do epitélio glandular não foi limitada às glândulas com esse tipo de alteração (Figura 26). A região da parede vascular, excluindo-se o endotélio (Figura 28), mostrou intensa marcação para MMP-2, principalmente na região mais profunda do estrato esponjoso.

Nos endométrios saudáveis, a região da parede vascular e as células estromais foram as estruturas que apresentaram maior intensidade de marcação, seguidas pelo epitélio glandular. A análise estatística revelou não haver diferença significativa na intensidade da expressão da MMP-2 entre essas estruturas citadas na presente categoria, mas houve diferença significativamente maior entre o grau de intensidade dessas estruturas e o do epitélio luminal, células endoteliais e do infiltrado inflamatório. As estruturas mais freqüentemente marcadas nas biópsias foram as células estromais em 73,3% dos casos e a região da parede vascular, observada em 53,3% das amostras.

Na categoria IIB, marcação mais intensa ocorreu nas células estromais. A análise estatística demonstrou não haver diferença significativa na intensidade da expressão da MMP-2 entre as células estromais, parede vascular e epitélio glandular nesta categoria, mas houve diferença significativamente maior entre o grau de intensidade dessas estruturas e o do epitélio luminal, células endoteliais e do infiltrado inflamatório. As estruturas marcadas com maior freqüência nas biópsias foram as células estromais em 52,9% dos casos, seguidas pela região da parede vascular em 47,1%.

Na categoria III, o epitélio glandular e as células estromais foram as que apresentaram maior intensidade de marcação. A análise estatística mostrou não haver diferença significativa na intensidade da expressão da MMP-2 entre epitélio glandular, células estromais e parede vascular, no entanto houve diferença significativamente maior entre o grau de intensidade dessas estruturas e o do epitélio luminal (Figura 25), células endoteliais e do infiltrado inflamatório. As estruturas mais freqüentemente marcadas nas biópsias foram o epitélio glandular em 60,4% dos casos, células estromais em 52,1% e parede vascular, observada em 47,9% das amostras.

As medianas dos escores acumulativos das categorias I, IIB e III foram 3,0, 2,5 e 3,0 respectivamente, o que não expressou diferença significativa.

A avaliação da intensidade da marcação imunoistoquímica entre as categorias da classificação de Kenney & Doig (1986) revelou que o epitélio glandular das amostras de endométrio da categoria III mostraram valores significativamente maiores que os do epitélio glandular das amostras da categoria I.

No que diz respeito ainda a este parâmetro, a parede vascular mostrou valores significativamente maiores nas amostras de endométrio da categoria I.

As demais estruturas não apresentaram diferença significativa para a expressão de MMP-2.

Os resultados do estudo estatístico para a variável MMP-2 na classificação de KENNEY & DOIG (1986) estão demonstrados nas Tabelas 7 e 8.

TABELA 6. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-2 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com KENNEY & DOIG (1986).

ESTRUTURA	CATEGORIA I	CATEGORIA IIB	CATEGORIA III
epitélio luminal	0aA ¹	0aA	0aA
epitélio glandular	1abA	1bAB	2bB
célula endotelial	0aA	0aA	0aA
parede vascular	2bA	1bB	1bB
célula inflamatória	0aA	0aA	0aA
célula estromal	2bA	1,5bA	2bA

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

TABELA 7. Medianas dos escores acumulativos atribuídos às biópsias uterinas classificadas de acordo com KENNEY & DOIG (1986) para a enzima MMP-2.

CATEGORIA	MEDIANA
I	3,0a ¹
IIB	2,5a
III	3,0a

¹Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

Quando aplicada a classificação de Ricketts & Alonso (1991), nas endometrites crônicas infiltrativas a marcação mais intensa ocorreu no epitélio glandular e nas células estromais. A análise estatística demonstrou não haver diferença significativa na intensidade da expressão da MMP-2 no epitélio glandular, parede vascular e células estromais desta categoria, porém estas estruturas mostraram intensidade de marcação significativamente maior do que o epitélio glandular, as células endoteliais e inflamatórias. As estruturas marcadas com maior frequência nas biópsias foram epitélio glandular em

57,1% dos casos, seguidas pelas células estromais em 51% e parede vascular em 49%.

Nas endometroses as células estromais foram as que apresentaram maior intensidade de marcação, mas sem diferença significativa em relação à marcação do epitélio glandular e parede vascular. No entanto, as células estromais mostraram intensidade de marcação significativamente maior do que o epitélio luminal, as células endoteliais e inflamatórias. As estruturas mais freqüentemente marcadas nas biópsias foram as células estromais em 62,5% dos casos.

As medianas dos escores acumulativos para as diferentes categorias - endométrio hígido, endometrite crônica infiltrativa e endometrose - foram 3,0.

A avaliação da intensidade da marcação imunoistoquímica entre as categorias da classificação Ricketts & Alonso (1991) revelou que o epitélio glandular das amostras de endometrite crônica infiltrativa mostraram valores significativamente maiores que os do epitélio glandular das amostras das de endométrio hígido e com endometrose.

No que diz respeito ainda a este parâmetro, a parede vascular mostrou valores significativamente maiores nas amostras de endométrio hígido.

As demais estruturas não apresentaram diferença significativa para a expressão de MMP-2.

Os resultados do estudo estatístico para a variável MMP-2 na classificação de RICKETTS & ALONSO (1991) estão demonstrados nas Tabelas 9 e 10.

TABELA 8. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-2 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com RICKETTS & ALONSO (1991).

ESTRUTURA	ENDOMÉTRIO HÍGIDO	ENDOMETRITE CRÔNICA INFILTRATIVA	ENDOMETROSE
epitélio luminal	0aA ¹	0aA	0aA
epitélio glandular	1abA	2bB	1abA
célula endotelial	0aA	0aA	0aA
parede vascular	2bA	1bB	1abB
célula inflamatória	0aA	0aA	0aA
célula estromal	2bA	2bA	2bA

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

TABELA 9. Medianas dos escores acumulativos atribuídos às biópsias uterinas classificadas de acordo com RICKETTS & ALONSO (1991) para a enzima MMP-2.

CATEGORIA	MEDIANA
Endométrio hígido	3,0a ¹
Endometrite crônica infiltrativa	3,0a
Endometrose	3,0a

¹Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

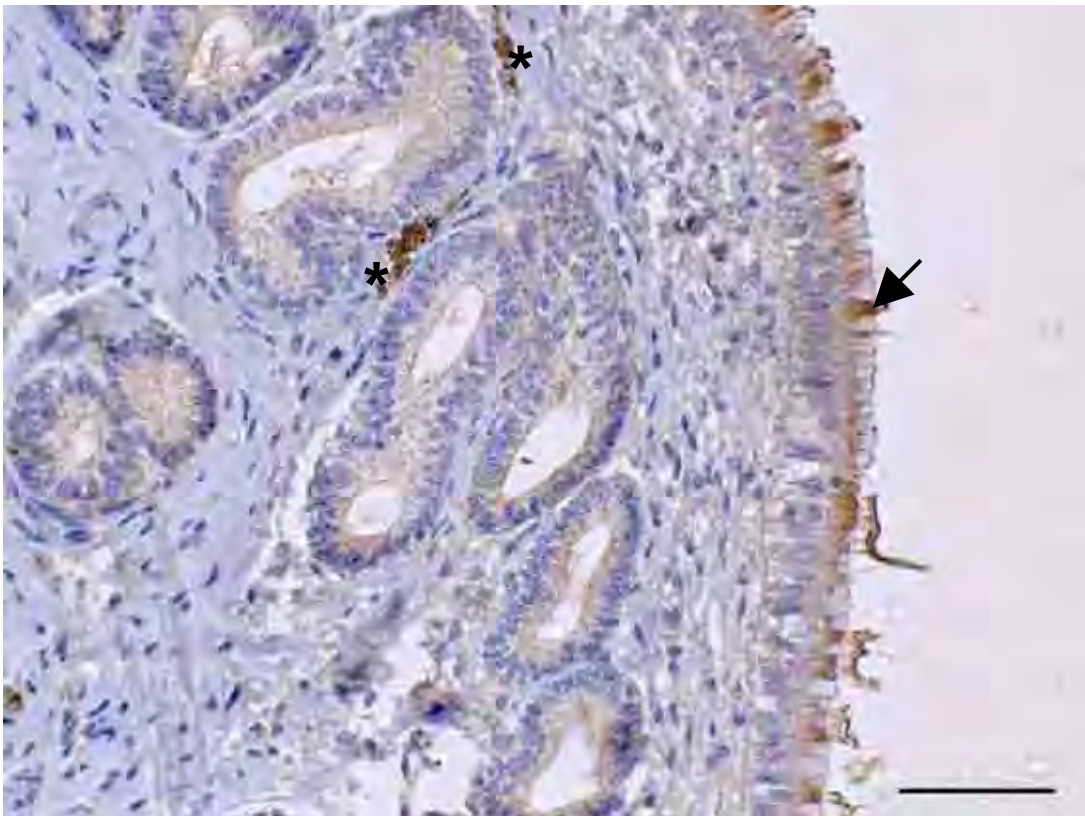


FIGURA 25. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para MMP-2. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva na região apical das células do epitélio luminal (seta). Presença de hemossiderófagos no estrato esponjoso (*). Barra: 50 μ m.

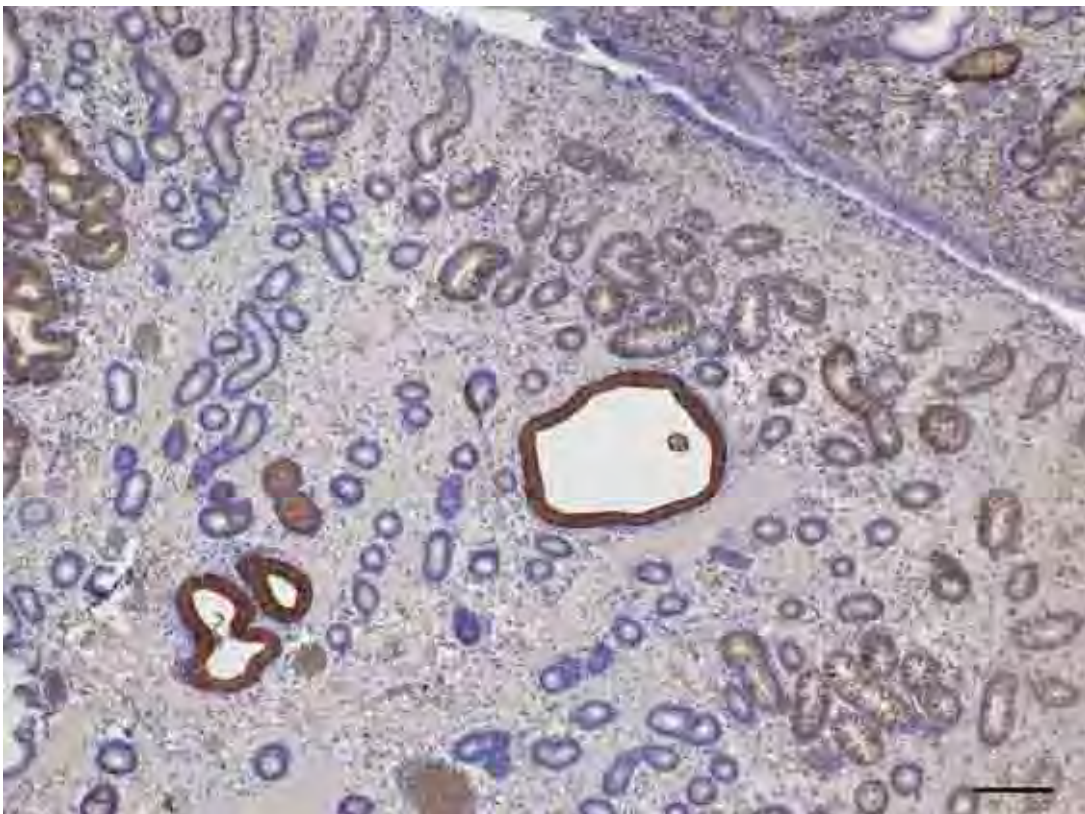


FIGURA 26. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para MMP-2. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva intensa no epitélio de glândulas fibróticas e dilatadas. Notar marcação heterogênea no epitélio de algumas glândulas. Barra: 100 μ m.

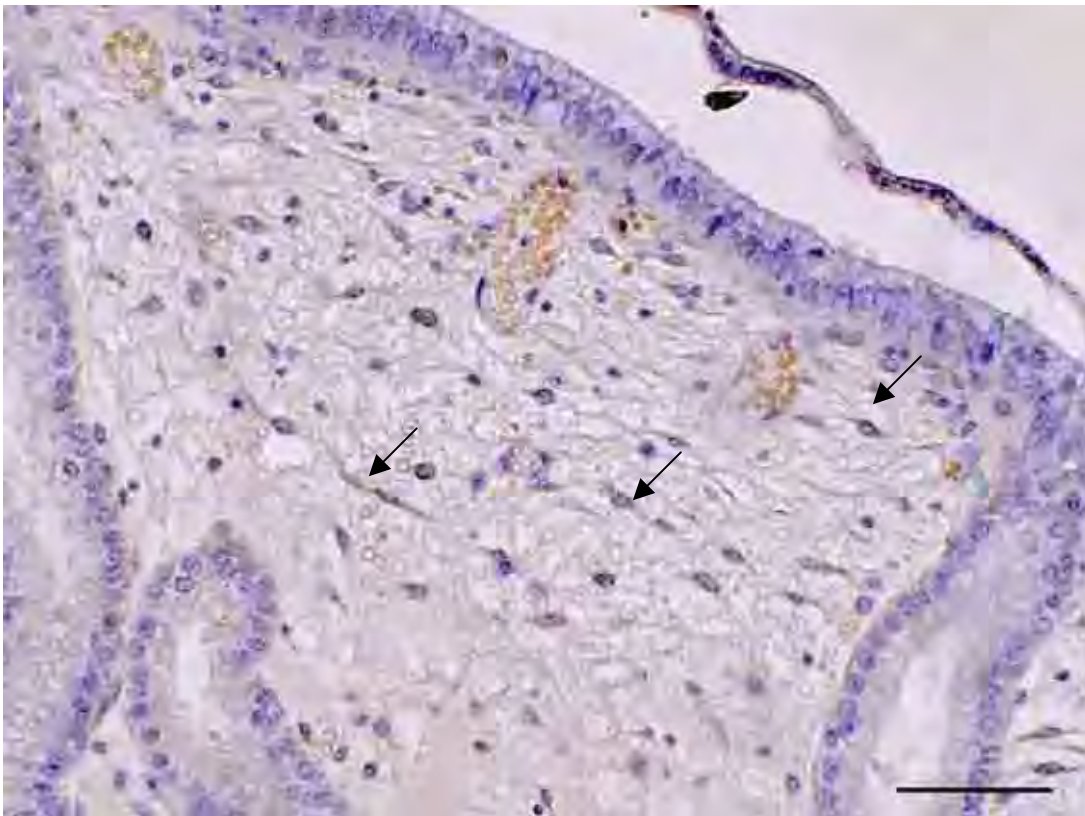


FIGURA 27. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para MMP-2. Endométrio categoria I. Marcação positiva em células estromais do estrato compacto (seta). Barra: 50 μ m.

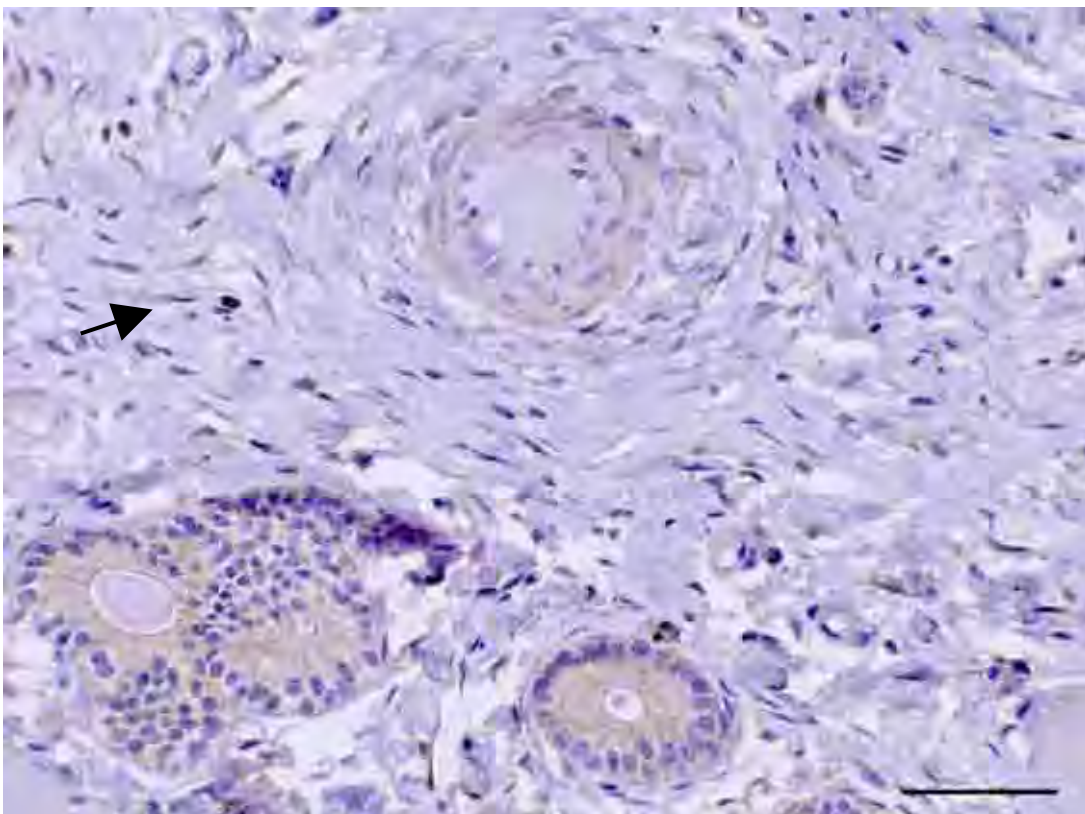


FIGURA 28. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para MMP-2. Endométrio categoria IIB – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva na parede vascular e células estromais (seta). Barra: 50 μ m.

4.3.2. MMP-9

A expressão de MMP-9 foi constatada em todas as amostras de endométrio eqüino, sendo que em 91,5% houve intensidade acentuada.

A marcação imunoistoquímica para este anticorpo mostrou ser difusa por todo o endométrio. Todos os elementos considerados neste estudo apresentaram imuno-reatividade (Figuras 29 a 33), e pôde ser notada positividade também no plasma, linfa e secreção glandular. O miométrio também foi reativo. As células estromais marcaram intensamente em grande parte das biópsias, sobretudo no estrato compacto e região superficial do estrato esponjoso. Nos locais onde constatou-se erosão do endométrio houve maior intensidade na marcação de MMP-9.

Nos endométrios saudáveis, 93,3% dos casos apresentaram imunomarcação acentuada para MMP-9 e em 6,7% foi moderada. Células endoteliais e do infiltrado inflamatório foram as que apresentaram maior intensidade de marcação em 86,7% e 80% das amostras respectivamente, mas não houve diferença significativa entre os diferentes elementos estudados. As estruturas mais freqüentemente marcadas nas biópsias foram as células estromais e o epitélio glandular em 86,7% das biópsias.

Na categoria IIB de Kenney & Doig (1986) as estruturas que apresentaram maior intensidade de marcação para MMP-9 foram as células do epitélio luminal e as células endoteliais e do infiltrado inflamatório, entretanto não foi observada diferença significativa entre os diferentes elementos estudados. O componente mais freqüentemente marcado nas biópsias foi o epitélio glandular em 83,3% dos casos.

Na categoria III, células do epitélio luminal, endoteliais, do infiltrado inflamatório e estromais foram as que apresentaram maior intensidade de marcação, sendo esta significativamente maior do que a apresentada pelo epitélio glandular e pela parede vascular. A estrutura mais freqüentemente marcada nas biópsias foi o epitélio glandular em 75,5% das biópsias.

A mediana dos escores acumulativos para a categoria I foi 6, a mesma observada para as endometrites da categoria III. Na categoria IIB, a mediana desses escores foi 5. Não houve diferença significativa entre as categorias.

A avaliação da intensidade da marcação imunoistoquímica entre as categorias da classificação de Kenney & Doig (1986) revelou que não houve diferença significativa em nenhum dos elementos para MMP-9.

Os resultados do estudo estatístico para a variável MMP-9 na classificação de KENNEY & DOIG (1986) estão demonstrados nas tabelas 11 e 12.

TABELA 10. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-9 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com KENNEY & DOIG (1986).

ESTRUTURA	CATEGORIA I	CATEGORIA IIB	CATEGORIA III
epitélio luminal	3aA ¹	3aA	3aA
epitélio glandular	2aA	2aA	2bA
célula endotelial	3aA	3aA	3aA
parede vascular	2aA	1aA	2bA
célula inflamatória	3aA	3aA	3aA
célula estromal	3aA	2aA	3aA

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

TABELA 11. Medianas dos escores acumulativos atribuídos às biópsias uterinas classificadas de acordo com KENNEY & DOIG (1986) para a enzima MMP-9.

CATEGORIA	MEDIANA
I	6,0a ¹
IIB	5,0a
III	6,0a

¹Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

As endometrites crônicas infiltrativas da classificação de Ricketts & Alonso (1991) mostrou reação imunoistoquímica para MMP-9 significativamente menos intensa na parede vascular. A estrutura mais freqüentemente marcada foi o epitélio glandular (78%).

As endometroses apresentaram reação mais intensa no epitélio luminal, nas células endoteliais e estromais, mas não houve diferença significativa entre os diferentes elementos do endométrio. A estrutura mais freqüentemente marcada foi o epitélio glandular (76,5%).

As medianas dos escores acumulativos para MMP-9 nos endométrios hígidos e endometrites crônicas infiltrativas foram maiores (6), entretanto, sem diferença significativa com a endometrose.

A avaliação da intensidade da marcação imunoistoquímica entre as categorias da classificação de Ricketts & Alonso (1991), revelou que não houve diferença significativa em nenhum dos elementos para MMP-9.

Os resultados do estudo estatístico para a variável MMP-9 na classificação de RICKETTS & ALONSO (1991) estão demonstrados nas Tabelas 13 e 14.

TABELA 12. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-9 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com RICKETTS & ALONSO (1991).

ESTRUTURA	ENDOMÉTRIO HÍGIDO	ENDOMETRITE CRÔNICA INFILTRATIVA	ENDOMETROSE
epitélio luminal	3aA ¹	3aA	3aA
epitélio glandular	2aA	2abA	2aA
célula endotelial	3aA	3aA	3aA
parede vascular	2aA	1,5bA	2aA
célula inflamatória	3aA	3aA	2aA
célula estromal	3aA	3aA	3aA

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

TABELA 13. Medianas dos escores acumulativos atribuídos às biópsias uterinas classificadas de acordo com RICKETTS & ALONSO (1991) para a variável MMP-9.

CATEGORIA	MEDIANA
Endométrio hígido	6,0a ¹
Endometrite crônica infiltrativa	6,0a
Endometrose	5,0a

¹Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

4.3.3. TIMP-1

A expressão de TIMP-1 foi constatada em todas as amostras de endométrio eqüino, sendo que em 97,6% houve intensidade acentuada.

Foi observada marcação imunoistoquímica difusa por todo o endométrio. Todos os elementos considerados neste estudo apresentaram imuno-reatividade (Figuras 34 a 38). As células endoteliais apresentaram intensa imunomarcação, sobretudo no estrato compacto. A parede vascular foi positiva, em expressão menos intensa, nos vasos de maior calibre. A expressão também pôde ser verificada no plasma. Células estromais apresentaram marcação variável, sendo marcante no estrato compacto; a reatividade dessas células nas glândulas fibróticas e na fibrose perivascular pôde ser notada.

Nos endométrios saudáveis as células endoteliais e estromais mostraram intensidade de marcação significativamente maior do que o epitélio luminal, o epitélio glandular, a parede vascular e as células inflamatórias. O segmento que demonstrou menor intensidade de marcação foi a região da parede vascular. As estruturas mais freqüentemente marcadas nas biópsias foram as células endoteliais (93,3%), seguidas pelas células inflamatórias (33,3%).

Na categoria IIB de Kenney & Doig (1986), os maiores valores de expressão do TIMP-1 foram verificados no epitélio luminal, nas células endoteliais e estromais, havendo diferença significativa da expressão observada nestas células quando comparadas com a expressão da parede

vascular. Os componentes mais freqüentemente marcados nas biópsias foram as células endoteliais (88,9%) e leucócitos (55,5%).

Na categoria III, o epitélio luminal, as células endoteliais, as células inflamatórias e as estromais foram as que apresentaram maior intensidade de marcação. As estruturas mais freqüentemente marcadas corresponderam àquelas cuja marcação foi mais intensa.

As medianas dos escores acumulativos para TIMP-1 nas categorias IIB e III foram maiores (5), entretanto, sem diferença significativa com a categoria I.

A avaliação da intensidade da marcação imunoistoquímica entre as categorias da classificação de Kenney & Doig (1986), revelou que não houve diferença significativa em nenhum dos elementos para TIMP-1.

Os resultados do estudo estatístico para a variável TIMP-1 na classificação de KENNEY & DOIG (1986) estão demonstrados nas Tabelas 15 e 16.

TABELA 14. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de TIMP-1 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com KENNEY & DOIG (1986).

ESTRUTURA	CATEGORIA I	CATEGORIA IIB	CATEGORIA III
epitélio luminal	2aA ¹	3bA	3bA
epitélio glandular	2aA	2abA	2aA
célula endotelial	3bA	3bA	3bA
parede vascular	1aA	0,5aA	1aA
célula inflamatória	2aA	2abA	3bA
célula estromal	3bA	3bA	3bA

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

TABELA 15. Medianas dos escores acumulativos atribuídos às biópsias uterinas classificadas de acordo com KENNEY & DOIG (1986) para a variável TIMP-1.

CATEGORIA	MEDIANA
I	4a ¹
IIB	5a
III	5a

¹Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

Nas endometrites crônicas infiltrativas de Ricketts & Alonso (1991) o epitélio luminal, as células endoteliais, inflamatórias e estromais mostraram maior intensidade de marcação. As estruturas mais freqüentemente marcadas foram as células endoteliais (94%), leucócitos (40%) e epitélio glandular (26%).

Nas endometroses, o epitélio luminal, as células endoteliais e as estromais apresentaram maior intensidade para TIMP-1. As estruturas mais freqüentemente marcadas foram endotélio em 82,3% dos casos e leucócitos (41,2%).

As medianas dos escores acumulativos para TIMP-1 nas endometrites crônicas infiltrativas e endometroses foram maiores (5), entretanto, sem diferença significativa com os endométrios hígidos.

A avaliação da intensidade da marcação imunoistoquímica entre as categorias da classificação de Ricketts & Alonso (1991), revelou que não houve diferença significativa em nenhum dos elementos para TIMP-1.

Os resultados do estudo estatístico para a variável TIMP-1 na classificação de RICKETTS & ALONSO (1991) estão demonstrados nas Tabelas 17 e 18.

TABELA 16. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de TIMP-1 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com RICKETTS & ALONSO (1991).

ESTRUTURA	ENDOMÉTRIO HÍGIDO	ENDOMETRITE CRÔNICA INFILTRATIVA	ENDOMETROSE
epitélio luminal	2aA ¹	3bA	3bA
epitélio glandular	2aA	2aA	2abA
célula endotelial	3bA	3bA	3bA
parede vascular	1aA	1aA	0aA
célula inflamatória	2aA	3bA	2abA
célula estromal	3bA	3bA	3bA

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

TABELA 17. Medianas dos escores acumulativos atribuídos às biópsias uterinas classificadas de acordo com RICKETTS & ALONSO (1991) para a variável TIMP-1.

CATEGORIA	MEDIANA
Endométrio hígido	4a ¹
Endometrite crônica infiltrativa	5a
Endometrose	5a

¹Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

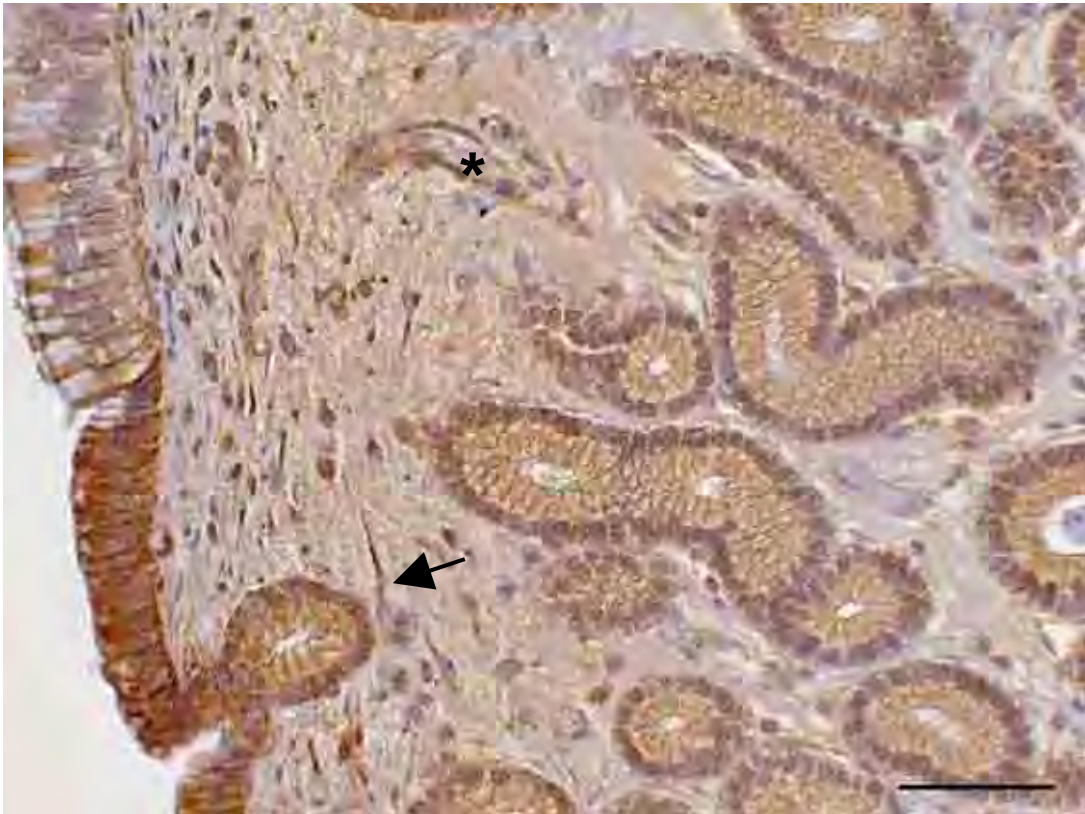


FIGURA 29. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para MMP-9. Endométrio categoria III – endometrose. Marcação positiva no epitélio luminal e glandular, células estromais (seta) e endotélio (*). Barra: 50 μ m.

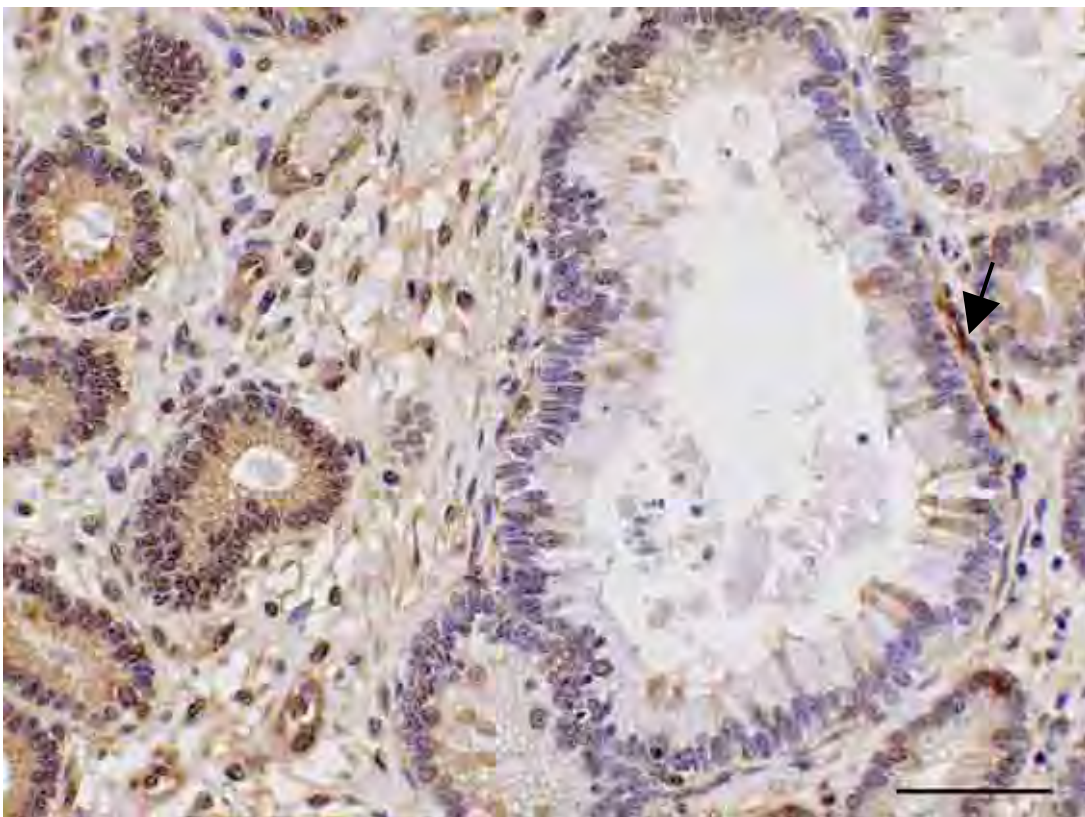


FIGURA 30. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para MMP-9. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva intensa em células estromais ao redor da glândula dilatada (seta). Barra: 50 μ m.

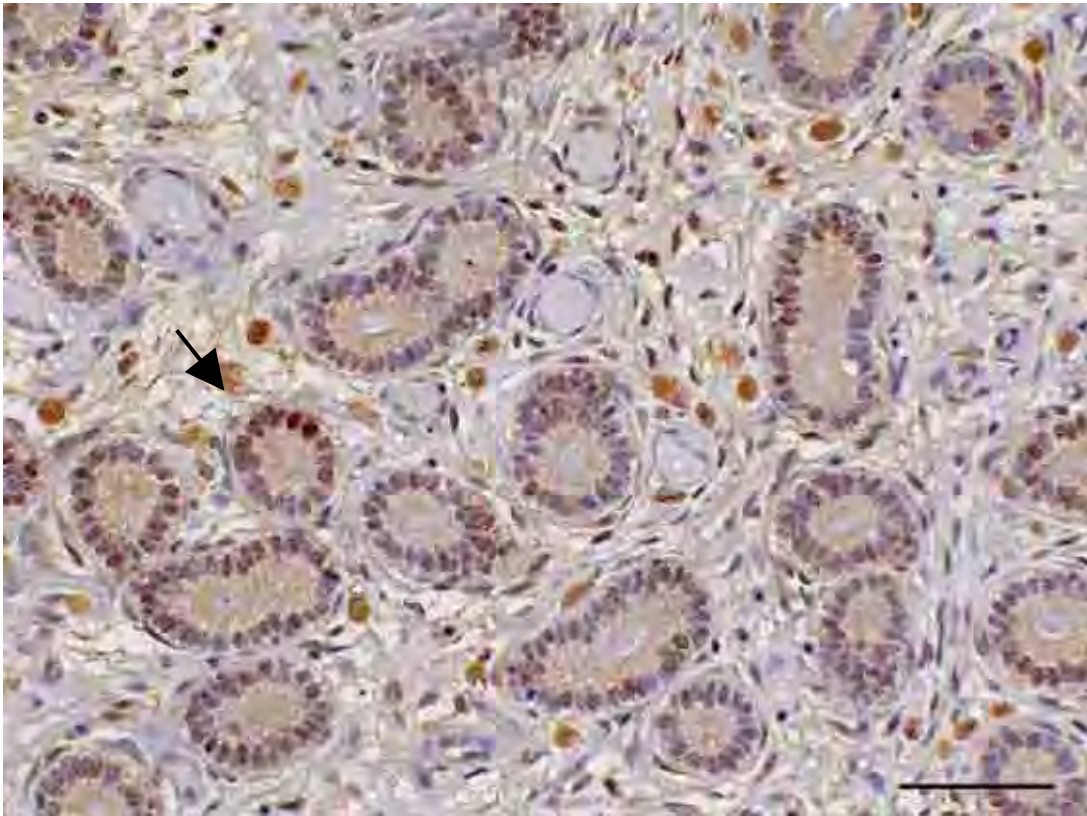


FIGURA 31. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para MMP-9. Endométrio categoria I. Marcação positiva nas células do infiltrado inflamatório no estrato esponjoso (seta). Barra: 50 μ m.

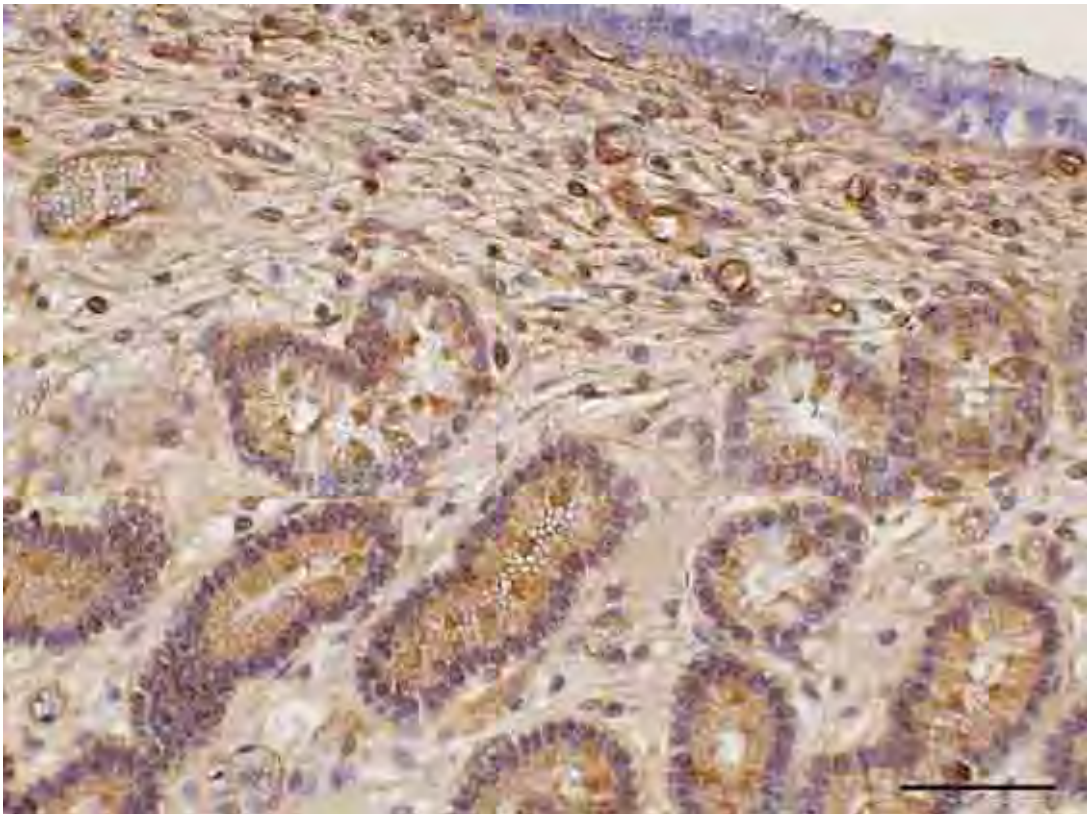


FIGURA 32. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para MMP-9. Endométrio categoria I. Marcação positiva nas células endoteliais. Barra: 50 μ m.

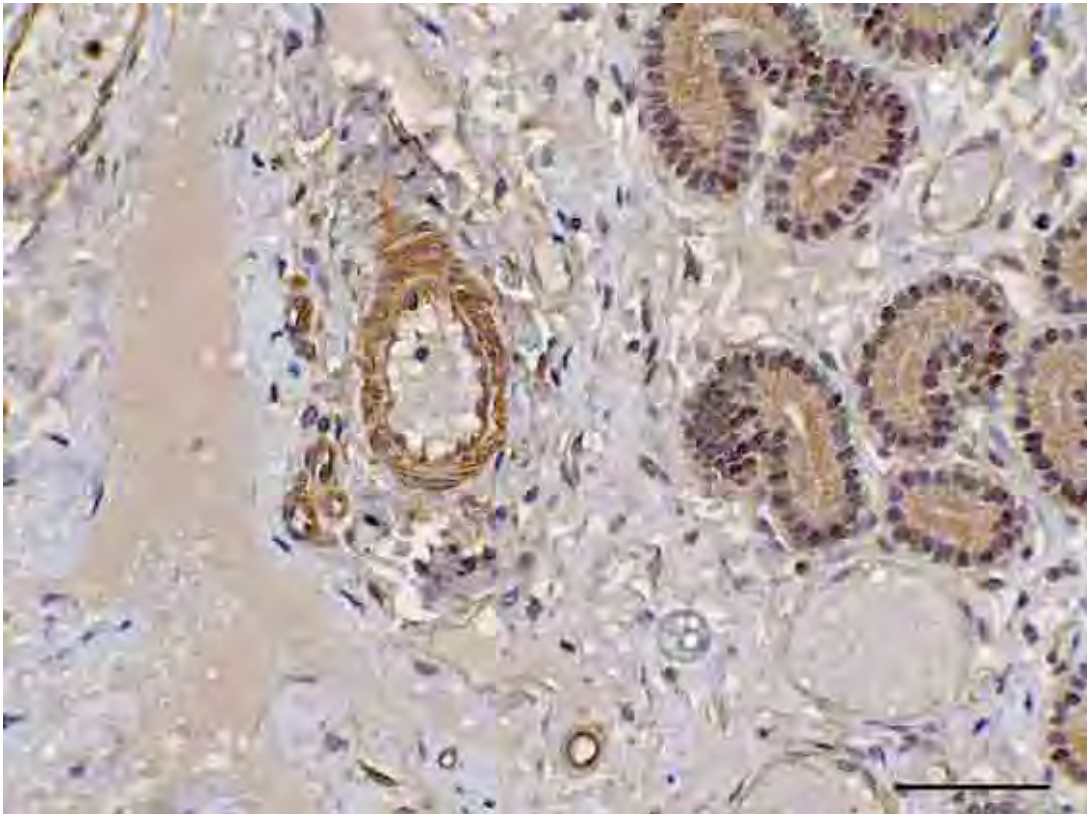


FIGURA 33. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para MMP-9. Endométrio categoria I. Marcação positiva no endotélio e parede vascular do estrato esponjoso. Barra: 50 μ m.

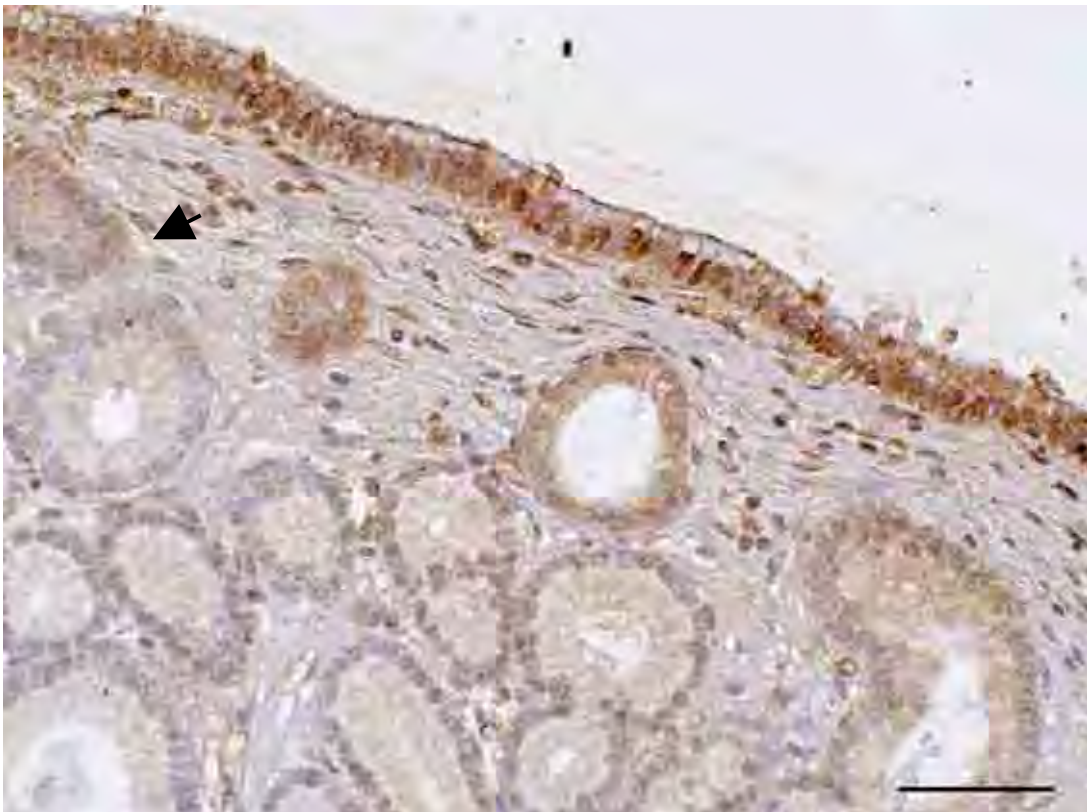


FIGURA 34. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para TIMP-1. Endométrio categoria III – endometrose. Marcação intensa no epitélio luminal e nas células estromais do estrato compacto (seta), e fraca ou moderada no epitélio glandular. Barra: 50 μ m.

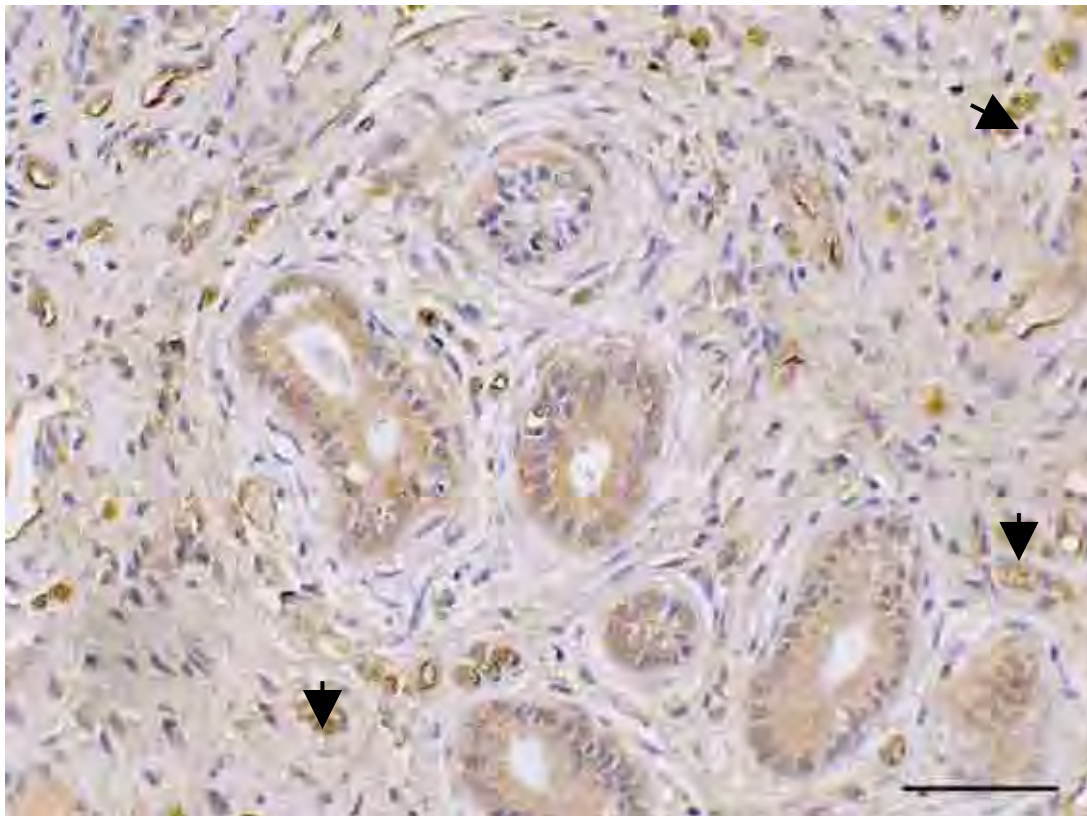


FIGURA 35. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para TIMP-1. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva nas células epiteliais de ninhos glandulares no estrato compacto. Presença de hemossiderófagos (seta). Barra: 50 μ m.

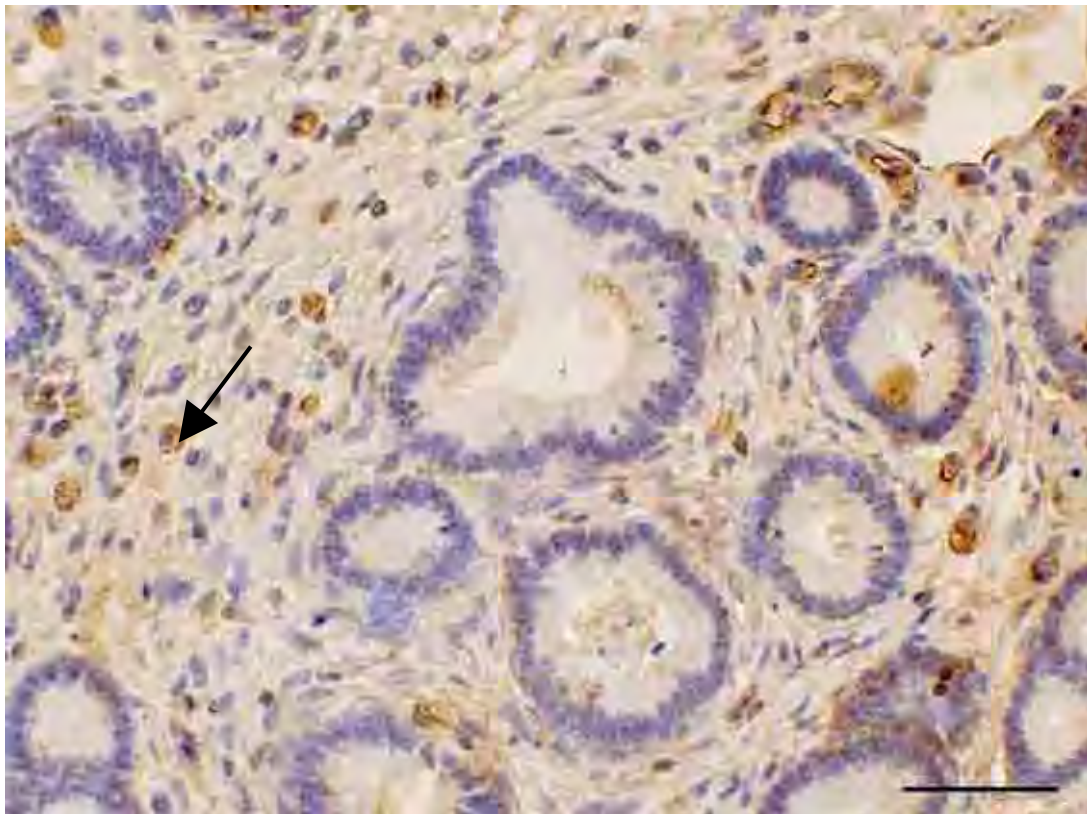


FIGURA 36. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para TIMP-1. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva em células do infiltrado inflamatório ao redor de ninhos glandulares (seta). Barra: 50 μ m.

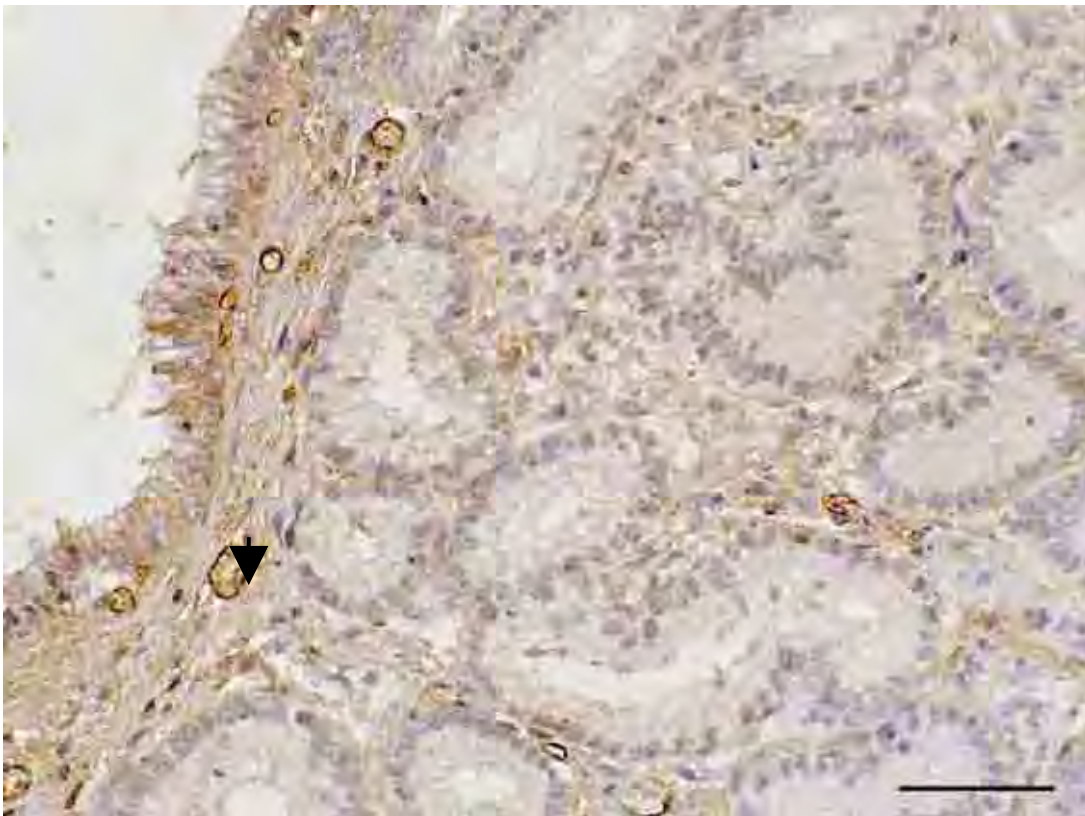


FIGURA 37. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para TIMP-1. Endométrio categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva em células endoteliais do estrato compacto (seta). Barra: 50 μ m.

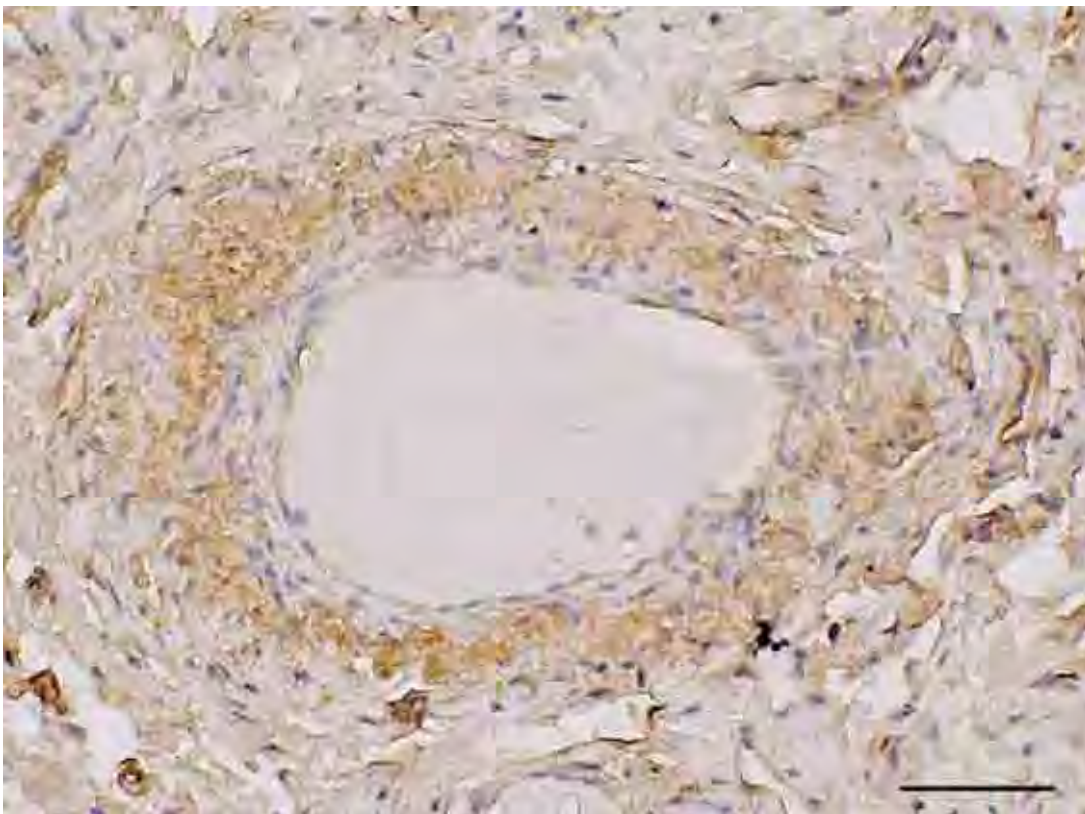


FIGURA 38. Endométrio eqüino. Marcação imunoistoquímica para TIMP-1. Endométrio categoria III – endometrose. Marcação positiva na parede vascular. Barra: 50 μ m.

5. DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

5.1.1. CLASSIFICAÇÃO DAS ENDOMETRITES CRÔNICAS

Para este estudo, foram selecionados os casos que apresentavam lesões endometriais mais severas. Este procedimento objetivou a correlação entre a presença das diferentes metaloproteinases e um dos seus inibidores específicos com o processo fibrótico já estabelecido. Assim, também foram utilizados como controle endométrios hígidos segundo os critérios das duas classificações utilizadas (KENNEY & DOIG, 1986; RICKETTS & ALONSO, 1991).

Utilizando-se a classificação de Kenney & Doig (1986), a maior parte das biópsias (59,8%) pertenceram a categoria III, na qual são incluídas as lesões mais graves. Como o material utilizado neste trabalho foi proveniente de arquivo, é natural que predominem amostras de animais que apresentem problemas reprodutivos persistentes, que se devem a lesões crônicas endometriais.

Mesmo nos casos classificados como categoria I, alterações fibróticas como fibrose perivascular e intersticial foram notadas em um número expressivo de amostras (33,3%), sendo a fibrose perivascular, observada em 20% dessas biópsias, uma das alterações mais observadas nas endometrites crônicas. Esses critérios não são considerados na classificação de Kenney & Doig (1986). Este tipo de comprometimento vascular precisa ser estudado de forma mais aprofundada, para que possa ser esclarecida a sua real participação nos problemas reprodutivos das éguas, já que a sua frequência é relativamente alta, mesmo nos animais considerados normais (NUNES, 2003).

As biópsias incluídas na categoria III de Kenney & Doig (1986) apresentaram fibrose periglandular bastante intensa, com deposição acentuada de colágeno e freqüentes ninhos fibróticos. No entanto, conforme observado por Nunes (2003), houve casos em que a fibrose esteve presente de maneira

inconspícua, acompanhada de infiltrado inflamatório proeminente. Isto sugere que processos diferentes estão incluídos na mesma categoria quando se utiliza este tipo de classificação.

Para a melhor avaliação dos diferentes processos endometriais, a tipificação do colágeno e a verificação da expressão das enzimas colagenolíticas estudadas, também foram empregadas as definições de Ricketts & Alonso (1991), baseadas na classificação de Ricketts datada em 1975 apud Ricketts & Alonso (1991), que define a enfermidade endometrial segundo sua origem inflamatória ou degenerativa. No entanto, como foram selecionados os casos mais severos de endometrite crônica, fibrose periglandular importante foi observada numa grande porcentagem das biópsias mesmo quando classificadas como endometrite infiltrativa.

Na classificação de Ricketts & Alonso (1991) houve predomínio das endometrites crônicas infiltrativas em relação às endometroses. Dessa forma, segundo nossos dados, estas lesões endometriais mais graves parecem ter como causa primária principalmente os processos de origem inflamatória, e aqueles de origem degenerativa seriam responsáveis pela enfermidade endometrial menos freqüentemente. Assim, neste trabalho também puderam ser identificados dois processos distintos morfológicamente e que provavelmente possuem causas diferentes, conforme proposto por Nunes (2003).

5.1.2. AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DO COLÁGENO

A utilização dos métodos histoquímicos para identificação de colágeno, como Tricrômico de Masson, Reticulina e Picrosirius-Polarização, permitiu a identificação dos focos de fibrose, bem como sua distribuição e quantificação, além da identificação dos tipos de colágeno presentes na fibrose.

No processo fibrótico, há a substituição dos depósitos de ácido hialurônico e fibronectina, que ocorrem desde o início do processo inflamatório, por colágeno tipo I e III principalmente. Outros tipos de colágeno também são encontrados nesses processos, porém em menor quantidade. É a deposição desses dois tipos de colágeno estruturalmente rígidos que gradualmente

promovem o desenvolvimento do tecido cicatricial com maior força tensora (BOCHSLER & SLAUSON, 2002).

Nas endometrites severas, foi observada neste trabalho a substituição do colágeno do tipo III pelo colágeno do tipo I, fenômeno também descrito por Nunes (2003), Evans et al. (1998) e Caldini (1992). Caldini (1992) notou correlação entre a quantidade de fibras com birrefringência amarelada e avermelhada, observada na técnica do Picrosisirius-Polarização, e as fibras não argirófilas, correspondentes ao colágeno I, visualizadas quando coradas pela técnica da Reticulina. A mesma correlação foi observada no presente estudo. Além disso, Caldini (1992) notou que essas fibras, por observação ultra-estrutural, demonstraram ser compatíveis com o colágeno I após estudo morfométrico.

Contudo, Walter et al. (2000) obtiveram resultados diferentes ao realizarem estudo imunoistoquímico dos colágenos I, III e IV, pois observaram que o colágeno do tipo I não está aumentado na fibrose endometrial severa das éguas, e a sua proporção é semelhante à dos endométrios incluídos na categoria I de Kenney & Doig (1986), mas houve o aumento do colágeno do tipo IV, que em situação fisiológica encontra-se limitado à membrana basal. Esses pesquisadores descreveram a presença do colágeno IV nos fibroblastos que circundam as glândulas fibróticas.

O colágeno do tipo III forma uma delicada rede de fibras, constituindo o estroma de vários órgãos, e é parte integrante da membrana basal, juntamente com o colágeno do tipo IV e do tipo V. Sua afinidade pela prata deve-se à maior quantidade de carboidratos, que revestem suas fibras (BANKS, 1991).

Com esses resultados divergentes, entende-se que tanto a técnica do Picrosirius Red-Polarização quanto a da Reticulina não diferenciam os colágenos do tipo I e do tipo III do colágeno do tipo IV, mas é possível reconhecer o colágeno mais denso, resultado de interações químicas entre as fibras de colágeno, e que é refratário ou, no mínimo, menos responsivo à ação das enzimas colagenolíticas, porque os sítios de ligação dessas enzimas com o colágeno são bloqueados (ANDRADE et al., 1999). Talvez, nas amostras de endométrios saudáveis do nosso estudo, a não distinção dos colágenos do tipo III e do tipo IV na membrana basal, observada por Walter et al. (2000) por

método imunoistoquímico, deva-se ao fato do colágeno do tipo IV também ser rico em açúcares, que compõem 10% da sua estrutura (BANKS, 1991), o que não permitiria a sua diferenciação por método histoquímico de impregnação argêntica.

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

Mais estudos nesse sentido são necessários para que se encontrem dados consistentes que levem a determinação do tipo de colágeno presente na fibrose uterina das éguas, principalmente aqueles em que associem métodos histoquímicos e imunoistoquímicos.

5.2. MORFOMETRIA DO COLÁGENO PERIGLANDULAR

Os resultados da análise morfométrica da fibrose periglandular corroboraram os achados de Nunes (2003), e foram parcialmente semelhantes aos descritos por Evans et al. (1998). Nos endométrios considerados hígidos, a fibrose periglandular foi ausente ou inconspícua. Já nas endometrites severas (graus IIB e III de Kenney & Doig, 1986) houve aumento significativo do colágeno periglandular, sendo predominante o do tipo I.

A porcentagem da fibrose periglandular nas endometrites crônicas severas, quando classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986), não revelou diferença significativa entre as categorias IIB e III neste trabalho. O mesmo achado foi relatado por Nunes (2003). Entretanto, Evans et al. (1998), encontraram resultados diferentes. Estes autores relatam que há aumento significativo da quantidade de fibrose entre as categorias IIB e III.

Quando classificadas de acordo com Ricketts & Alonso (1991), não houve diferença significativa na deposição de colágeno periglandular entre as endometrites infiltrativas severas e as endometroses. Talvez, isso possa ser

explicado pela maior deposição de colágeno intersticial nas endometroses, o que levou à rarefação das glândulas endometriais.

5.3. AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

As metaloproteinases são as principais enzimas envolvidas no remodelamento tecidual fisiológico e patológico (STERNLICHT & WERB, 1999; ARTHUR, 2000).

Zhang & Salamonsen (2002) relataram que a MMP-2 se expressa amplamente pelo endométrio, sendo detectada na maior parte das células do endométrio, sejam elas epiteliais, estromais ou vasculares, mas não são expressas nos leucócitos. Goffin et al. (2003) constataram que nas mulheres, esta enzima é expressa durante todo o ciclo menstrual, auxiliando na manutenção do endométrio.

O presente estudo revelou que, assim como acontece no endométrio humano, as células estromais e epiteliais, além da parede vascular também expressaram MMP-2. Houve predominância da marcação nas células estromais e parede vascular tanto no endométrio normal quanto nas endometrities crônicas severas. Achado semelhante foi relatado por Freitas et al. (1999) no endométrio de mulheres. Estes autores sugeriram o envolvimento da MMP-2 no remodelamento vascular durante o ciclo menstrual.

A análise entre as categorias das biópsias classificadas de acordo com Kenney & Doig (1986) indica que a intensidade da imunomarcação para a enzima MMP-2 tende a aumentar no epitélio glandular conforme aumenta a gravidade da lesão endometrial e, por conseguinte, a deposição de colágeno. Esse fenômeno talvez contribua para a modificação da secreção glandular no endométrio das éguas, que já foi constatada a partir do uso da técnica de lectinaistoquímica (WALTER et al., 2001b).

Fenômeno inverso foi observado na parede vascular, quando consideradas as duas classificações. Nesta região, a intensidade da imunomarcação para a enzima MMP-2 diminui conforme aumenta a lesão endometrial e conseqüentemente a deposição de colágeno.

A MMP-2 tem papel preponderante na angiogênese, componente indispensável do mecanismo de reparação tecidual por tecido conjuntivo. A

marcação intensa da MMP-2 na região da parede vascular, onde encontram-se os pericitos, e ausência da expressão no endotélio, pode sugerir que, nas éguas, a degradação do colágeno vascular pela MMP-2 é primariamente induzida na região perivascular. Isso pode estar associado à presença de mediadores químicos liberados por células perivasculares, fonte de interleucinas, e outros mediadores químicos. Investigações a respeito da inter-relação entre citocinas e outros fatores pró- inflamatórios com metaloproteinases (KIM et al., 2004) são necessárias para que se entenda melhor o papel das MMP na região da parede vascular do endométrio equino.

Considerando-se a classificação de Ricketts & Alonso (1991), observa-se que nas endometrites crônicas infiltrativas, as células estromais e a parede vascular mostraram maior intensidade de reação imunoistoquímica, embora não tenha ocorrido diferença significativa em relação à parede vascular e ao epitélio glandular. Nas endometroses, a maior intensidade de reação ocorreu nas células estromais. Nota-se ainda que o epitélio glandular mostrou maior reatividade nas endometrites crônicas infiltrativas e intensidade menor nas endometroses. A maior intensidade da reação nessas células nas endometrites crônicas infiltrativas pode estar relacionada ao processo inflamatório ativo, já que nas endometroses este aumento não foi detectado. Walter et al. (2005) estudando as endometroses, encontraram imunoreatividade para MMP-2, nos mesmos sítios, e verificaram que nas regiões do endométrio em que ocorria a infiltração leucocitária a expressão da enzima era mais acentuada.

A marcação imunoistoquímica para MMP-2 nas células estromais manteve-se estável, quando comparadas as endometrites graves com o endométrio hígado, nas duas classificações empregadas.

A expressão da MMP-2 em células estromais ao redor das glândulas fibróticas, também observada por Walter et al. (2005), pode estar associada à presença de miofibroblastos. Estas células são observadas em grande quantidade nas glândulas fibróticas (WALTER et al., 2001). Arthur (2000) relatou que, no fígado fibrótico, os miofibroblastos na presença de colágeno do tipo I são induzidos à ativação da pro-MMP-2.

Foi relatado que no início da gestação a MMP-2 é expressa em maiores quantidades em pequenos vasos do que a MMP-9, e que essa forte

marcação do endotélio pode ter papel importante na degradação da matriz extracelular e na angiogênese (SEVAL et al., 2004).

A MMP-9 também está envolvida na degradação da matriz extracelular e na angiogênese, porém com funções ainda não bem estabelecidas (FODA & ZUCKER, 2001).

A marcação de MMP-9 neste trabalho foi intensa no epitélio luminal, nas células endoteliais e leucócitos, mas outras estruturas também mostraram-se positivas para essa metaloproteinase, como o epitélio glandular, parede vascular e células estromais.

A parede vascular mostrou menor intensidade de reação para MMP-9 nas endometrites crônicas infiltrativas. Por sua vez, as células inflamatórias apresentaram intensidade de reação maior nas amostras de endométrio hígido e de endometrite crônica infiltrativa, do que nas endometroses, embora não tenha havido significância estatística. Esses achados sugerem que os processos endometriais degenerativos são mais graves por haver a tendência na diminuição das enzimas colagenolíticas e, conseqüentemente, maior deposição de colágeno. Deve-se destacar que a MMP-9 é produzida principalmente por leucócitos, entre eles linfócitos e macrófagos, que a secretam após estímulos pró-inflamatórios (JAMES et al., 2005). Estes elementos estão ausentes ou em quantidades discretas nos processos degenerativos do endométrio.

Kaitu'u et al. (2005) estudando o útero de camundongas em modelo que simula o ciclo menstrual da mulher, observaram a expressão da MMP-9 em células inflamatórias localizadas na porção basal da região decídua, estando a redução do número de células positivas relacionada à evolução da reparação tecidual. Isso permitiu atribuir o envolvimento da MMP-9 na destruição da matriz extracelular que envolve o tecido decíduo. Deve-se ressaltar que no presente trabalho constatou-se maior intensidade de marcação em áreas de erosão que comprometiam o endométrio. Freitas et al. (1999) relataram que no endométrio humano a secreção de MMP-9 nos macrófagos pode ser aumentada por citocinas pró-inflamatórias. Neste trabalho, a imunomarcação para MMP-9 nas éguas mostrou-se mais difusa e de intensidade moderada ou acentuada tanto no endométrio hígido como nas

endometrites crônicas. Dessa forma, não foi possível determinar uma função específica para a MMP-9 no endométrio eqüino.

A expressão de MMP-9 por células epiteliais e leucócitos observada no endométrio eqüino neste estudo, já foi identificada em outras espécies. A positividade para MMP-9 no epitélio glandular na fase secretória do ciclo menstrual em mulheres já foi descrita por Freitas et al., 1999. Nesta mesma fase, estes autores detectaram forte marcação para MMP-9 em células arredondadas ou alongadas distribuídas pelo estroma. As primeiras encontravam-se freqüentemente agrupadas e próximas ao epitélio glandular, sendo a maioria delas positivas para CD68, marcador específico de macrófagos.

O tipo de placentação epiteliocorial na égua é o menos invasivo de todas as formas de placentação. No entanto, há uma diferenciação de células trofoblásticas do conceito, que dão origem a uma população celular muito invasiva, que formam a cinta coriônica. Essas células começam a se aderir e invadir o epitélio uterino migrando posteriormente para o estroma endometrial, onde formam nódulos distintos de tecido altamente diferenciado, chamados cálices endometriais. Esse processo de invasão destrói o epitélio endometrial (LUNN et al., 1997), e é dependente de metaloproteinases (VAGNONI et al., 1995). A presença da MMP-9 no endométrio eqüino durante o diestro pode estar relacionada com o processo de aderência e migração do conceito no endométrio após a fertilização.

Os TIMPs são inibidores específicos das metaloproteinases, podendo ser encontrados em vários tipos celulares. Durante a inflamação e remodelamento do colágeno nas vias respiratórias, é produzido de forma ubiqüitária pelo tecido conjuntivo e macrófagos, e com freqüência, é expresso simultaneamente à MMP-9 (CHANG et al., 2002; SWEET et al., 2002; WEI et al., 2003).

Da mesma forma, relatos anteriores descreveram a presença do TIMP-1 em todos os compartimentos celulares do endométrio da mulher, durante todo o ciclo menstrual (FREITAS et al., 1999), com pequena variação na expressão da enzima entre as fases hormonais, mas que não são significativas (GOFFIN et al., 2003; SEVAL et al., 2004).

Os resultados do presente estudo revelaram que, assim como nas situações supracitadas, houve marcação difusa no endométrio das éguas, fenômeno semelhante ao da enzima MMP-9. As endometrites severas mostraram escores acumulativos maiores do que os endométrios saudáveis, entretanto, sem significância.

De maneira geral, não houve diferença na intensidade da expressão do TIMP-1 entre os grupos estudados nas duas classificações utilizadas.

As células endoteliais mostraram intensidade de marcação acentuada para TIMP-1 em todos os grupos analisados, achado semelhante ao de Freitas et al. (1999). Tais pesquisadores associaram essa característica a um efeito vasoprotetor.

A avaliação dos escores acumulativos da expressão de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 não revelou diferença significativa entre as categorias, em cada classificação utilizada. Porém, pôde-se observar pelos resultados obtidos que os escores mais altos foram aqueles relacionados à MMP-9 e TIMP-1, o que demonstra a distribuição difusa no endométrio hígido e fibrótico.

Nota-se pelo que foi apresentado que os processos crônicos endometriais, sejam eles inflamatórios ou fibróticos, mostram grande complexidade. A metodologia aqui empregada teve por objetivo avaliar estes fenômenos utilizando diferentes métodos de análise morfológica que se complementassem.

Os resultados indicam as características das lesões fibróticas no que diz respeito a sua composição e distribuição, além da expressão de enzimas importantes no remodelamento do colágeno. Diferentes técnicas para avaliação dos tipos de colágeno envolvidos na fibrose endometrial das éguas ainda devem ser exploradas para que se conheça com maior precisão a composição desse fenômeno e suas interações bioquímicas, uma vez que este ainda não é bem compreendido, para que no futuro novas terapias com o objetivo de se inibir a deposição excessiva de colágeno sejam desenvolvidas.

O mesmo ocorre quando se busca conhecer as enzimas envolvidas no processo colagenolítico, como as metaloproteinases. Com a mesma finalidade, também é interessante estabelecer a correlação dessas enzimas com agentes pró-inflamatórios.

A técnica imunoistoquímica foi adequada para a determinação dos locais da expressão das enzimas estudadas, permitindo que se reconheça qual o tipo de célula envolvido diretamente no processo colagenolítico nas endometrites crônicas.

A detecção da interação entre estes diversos elementos abre novas perspectivas para a compreensão do processo e, conseqüentemente, para a possibilidade de sua interrupção ou regressão.

6. CONCLUSÕES

Os resultados desta pesquisa permitiram concluir que:

- Fibrose perivascular e intersticial é encontrada em grande parte dos endométrios considerados hígidos;
- Nas endometrites crônicas severas a fibrose periglandular, bem como a perivascular, é intensa, composta predominantemente por colágeno do tipo I;
- Não há diferença na porcentagem da fibrose periglandular entre as endometroses e as endometrites crônicas infiltrativas severas;
- Endométrios hígidos e portadores de endometrite crônica expressam MMP-2, MMP-9 e TIMP-1, sem diferenças importantes entre os graus de severidade;
- MMP-2 é expressa pelas células do epitélio luminal e glandular, estromais e na região da parede vascular, mas não nas células endoteliais e do infiltrado inflamatório;
- MMP-9 e TIMP-1 são expressos pelas células do epitélio luminal e glandular, estromais, endoteliais e do infiltrado inflamatório;
- A MMP-9 e o TIMP-1 estão expressos de forma mais difusa do que a MMP-2.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

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

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

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

BANKS, W.J. Matriz extracelular. In: _____. *Histologia Veterinária Aplicada*. 2 ed., São Paulo: Manole, 1991. p.87-105.

BOCHSLER, P.N., SLAUSON, D.O. Inflammation and repair of tissue. In: SLAUSON, D.O., COOPER, B.J. *Mechanisms of disease: a textbook of comparative general pathology*. 3 ed., St. Louis: Mosby, 2002. p.140-245.

BREW, K., DINAKARPANDIAN, D., NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1477, p.267-83, 2000.

BRUNER, K.L., RODGERS, W.H., GOLD, L.I., KORC, M., HARGROVE, J.T., MATRISIAN, L.M., OSTEEEN, K.G. Transforming growth factor β mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.92, p.7362-6, 1995.

¹ UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. *Normas para publicações da UNESP*. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. *List of journals indexed in Index Medicus*. Washington, 1997. 240p.

- CALDINI, E.T.E.G. *Estudo histoquímico e ultra-estrutural do colágeno na fibrose periglandular do endométrio eqüino*. São Paulo, 1992. 123p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- CHANG, Y.-C., YANG, S.-F., TAI, W.-W., CHOU, M.-Y., HSIEH, Y.-S. Increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression and inhibitor of gelatinase A activity in buccal mucosal fibroblasts by arecoline as possible mechanisms for oral submucous fibrosis. *Oral Oncol.*, v.38, p.195-200, 2002.
- CLEGG, P.D., COUGHLAN, A.R., RIGGS, C.M., CARTER, S.D. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. *Equine Vet. J.*, v.29, n.5, p.343-8, 1997.
- CONCHA-BERMEJILLO, A., KENNEDY, P.C. Prognostic value of endometrial biopsy in the mare: a retrospective analysis. *JAVMA*, v.181, n.7, p.680-1, 1982.
- DOIG, P.A., MCKNIGHT, J.D., MILLER, R.B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Can. Vet. J.*, v.22, p.72-6, 1981.
- EVANS, T.J., MILLER, M.A., GANJAM, V.K., NISWENDER, K.D., ELLERSIECK, M.R., FRAUSE, W.J., YOUNGQUIST, R.S. Morfometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. *AJVR*, v.59, n.10, p.1209-14, 1998.
- FODA, H., ZUCKER, S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *DDT*, v.6, n.9, p.478-82, 2001.
- FREITAS, S., MEDURI, G., NESTOUR, E. L., BAUSERO, P., PERROT-APPLANAT, M. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. *Biol. Reprod.*, v.61, p.1070-82, 1999.
- GARLAND, S.M., CHUILEANNÁIN, F.N., SATZKE, C., ROBINS-BROWNE, R. Mechanisms, organisms and markers of infection in pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, v.57, p.169-83, 2002.

- GIANNELLI, G., QUARANTA, V., ANTONACI, S. Tissue remodelling in liver diseases. *Hist. Histopath.*, v.18, p.1267-74, 2003.
- GOFFIN, F., MUNAUT, C., FRANKENNE, F., D'HAUTERIVE, S.P., BÉLIARD, A., FRIDMAN, V., NERVO, P., COLIGE, A., FOIDART, J.-M. Expression pattern of metalloproteinases and TIMPs in cycling human endometrium. *Biol. Reprod.*, v.69, p.976-84, 2003.
- GONZÁLEZ, A.A., SEGURA, A.M., HORIBA, K., QIAN, S., YU, Z.-X., STETLER-STEVENSON, W., WILLERSON, J.T., McALLISTER JR, H.A., FERRANS, V.J. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lesions of cardiac and pulmonary sarcoidosis: an immunohistochemical study. *Human Pathol.*, v.33, p.1158-64, 2002.
- GRAY, C. A., BARTOL, F.F., TARLETON, B.J., WILEY, A.A., JOHNSON, G.A., BAZER, F.W., SPENCER, T.E. Developmental biology of uterine glands. *Biol. Reprod.*, v.65, p.1311-23, 2001.
- GRÜNINGER, B., SCHOON, H.-A., SCHOON, D., MENDER, S., KLUG, E. Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares in relationship to age and parity. *J. Comp. Pathol.*, v.119, p.293-309, 1998.
- HAFFNER, J.C., FECTEAU, K.A., EILER, H. Inhibition of collagenase breakdown of equine corneas by tetanus antitoxin, equine serum and acetylcysteine. *Veterinary Ophtalmology*, v. 6, n.1, p.67-72, 2003.
- HOLLANDER, A.P. Matrix metalloproteinases as targets for therapy in equine joint diseases. *Equine Vet. J.*, v.29, n.5, p.329-30, 1997.
- INOUE, Y., ITO, K., TERADA, T., NISHIMURA, N., HATAZOE, T., SATO, K. Degenerative changes in the endometrial vasculature of the mare detected by videoendoscopic examination. *AAEP Proceedings*, v.46, p.325-9, 2000.
- JAMES, B.P., SICHENG, W., QIANG, P.-H., MARIANNE, Q.J. Secretion of matrix metalloproteinase-9 by macrophages, *in vitro*, in response to *Helicobacter pylori*. *Fems Immunol. Med. Microbiol.*, v.45, n.2, p.159-69, 2005.

- JUNQUEIRA, L.C.U., COSSERMELLI, W., BRENTANI, R.R. Diferencial staining of collagens typé I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch. Histol. Jpn.*, v.41, p.267-74, 1978.
- KAITU'U, T.J., SHEN, J., ZHANG, J., MORISON, N.B., SALAMONSEN, L.A. Matrix metalloproteinases in endometrial breakdown and repair: functional significance in a mouse model. *Biol. Reprod.*, v.73, p.672-80, 2005.
- KATILA, T. Uterine defence mechanisms in the mare. *Anim. Reprod. Sci.*, v.42, p.197-204, 1996.
- KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *JAVMA*, v.172, n.3, p.241-62, 1978.
- KENNEY, R.M., DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D.A. (ed.). *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p.723-9.
- KIM, H.-S., SHANG, T., CHEN, Z., PFLUGFELDER, S.C., LI, D.-Q. TGF- β 1 stimulates production of gelatinase (MMP-9), collagenases (MMP-1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res.*, v. 79, p. 263-74, 2004.
- LEE, R.T., LAMMERDING, J. Signaling pathways that influence etracellular remodeling. *Journal of Cardiac Failure*, v.8, n.6, suppl, p.S339-43, 2002.
- LEMJABBAR, H., GOSSET, P. LECHAPT-ZALCMAN, E., FRANCO-MONTOYA, M-L., WALLAERT, B., HARF, A., LAFUMA, C. Overexpression of alveolar macrophage gelatinase B (MMP-9) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, v.20, p.903-13, 1999.
- LENHART, J.A., RYAN, P.L., OHLETH, K.M., PALMER, S.S. Relaxin increases secretion of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and -2 during uterine and cervical growth and remodeling in the pig. *Endocrinology*, v.143, p.91-8, 2002.

- LUNA, L.G. *Manual of Histologic Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology*. Washington: McGraw Hill, 1968. 258p.
- LUNN, P., VAGNONI, K.E., GINTHER, O.J. The equine immune response to endometrial cups. *J. Reprod. Immunol.*, v.34, p.203-16, 1997.
- MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Repair, regeneration and fibrosis. *in*: RUBIN, E., FABER, J.L. *Pathology*. 3 ed. Philadelphia: Lippincot-Raven, 1999, 1664p.
- MEDICE, E.B., MERKT, H., POLHENS, J.F., BRUNKHORST, D. Considerations on the use of ancillary diagnostic aids in the diagnosis of endometritis due to infection in mares. *J. Reprod. Fertil., Suppl.*, v.44, p.700-3, 1991.
- MENON, R, FORTUNATO, S.J. The role of matrix degrading enzymes and apoptosis in rupture of membranes. *Journal of Society for Gynecologic Investigation*, v. 11, p. 427-37, 2004.
- MONTES, G.S., JUNQUEIRA, L.C.U. The use of the picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.86, p.1-11, 1991.
- MOTT. J.D., WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v.16, p.558-64, 2004.
- MURPHY, G., KNÄUPER, V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the “hemopexin” domain? *Matrix Biol.*, v.15, p.511-8, 1997.
- NAGASE, H., WOESSNER, J.F. Minireview: Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, v.274, n.31. p.2191-4, 1999.
- NUNES, L.C. *Avaliação histopatológica, histoquímica, imunoistoquímica e morfométrica das endometrites crônicas em éguas*. Botucatu, 2003. 108p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- NUNES, L.C., PORTO, C.D., SEQUEIRA, J.L., ALVARENGA, M.A. Classificação histopatológica das endometrites crônicas das éguas: estudo

- retrospectivo e prospectivo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, supl.1, p.75, 2005.
- OSTEEN, K.G., RODGERS, W.H., GAIRE, M., HARGROVE, J.T., GORSTEIN, F. Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.91, p.10129-33, 1994.
- PARDO, A., SELMAN, M. MMP-1: the elder of the family. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.37, p.283-8, 2005.
- POLETTE, M., NAWROCKI-RABY, B., GILLES, C., CLAVEL, C., BIREMBOUT, P. Tumor invasion and matrix metalloproteinases. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.*, v.49, p.179-86, 2004.
- PORTO, C.D., NUNES, L.C., SEQUEIRA, J.L., OLIVEIRA, D.E., ALVARENGA, M.A.. Expressão de MMP-2 e MMP-9 no processo fibrótico endometrial das éguas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, supl.1, p.105-6, 2005.
- RICKETTS, S.W., ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Vet. J.*, v.23, p.189-92, 1991.
- RIGBY, S.L., BARHOUMI, R., BURGHARDT, C., COLLERAN, P., THOMPSON, J.A., VERNER, D.D., BLANCHARD, T.L., BRINSKO, S.P., TAYLOR, T., WILKERSON, M.K., DELP, M.D. Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. *Biol. Reprod.*, v.65, p.740-7, 2001.
- RILEY, S.C., GIBSON, A.H., LEASK, R., MAUCHLINE, D.J.W., PEDERSEN, H.G., WATSON, E.D. Secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases into follicular fluid during follicle development in equine ovaries. *Reproduction*, v.121, p.553-60, 2001.
- SEVAL, Y., AKKOYUNLU, G., DEMIR, A., ASAR, M. Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy. *Acta histochem.*, v.106, p.353-62, 2004.

- SHOON, H.-A., SCHOON, D. The category I mare (Kenney and Doig 1986): expected foaling rate 80-90% - fact or fiction? *Pferdeheilkunde*, v.19, n.6, p.698-701, 2003.
- SILVA, C.A.M., BARROS, S.S., ESQUERRE, R.A. A biópsia endometrial na avaliação da fertilidade da égua. *Pesq. Vet. Bras.*, v.7, p.131-3, 1987.
- STERNLICHT, M.D., WERB, Z. ECM proteinases. In: KREIS, T., VALE, R. *Guidedbok to the extracellular matrix, anchor, and adhesions proteins*. Oxford: Oxford University Press, 1999. p.505-63.
- SWEET, D.G., HALLIDAY, H.L., WARNER, J.A. Airway remodelling in chronic lung disease of prematurity. *Paediatric Respiratory Reviews*, v.3, p.140-6, 2002.
- TRAUB-DARGATZ, J.L., SALMAN, M.D., VOSS, J.L. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practioners. *JAVMA*, v.198, n.10, p.1745-7, 1991.
- TROEDSSON, M.H.T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*, v.52, p.461-71, 1999.
- UENO, T., TAMAKI, S., SUGAWARA, H., INUZUKA, S., TORIMURA, T., SATA, M., TANIKAWA, K. Significance of serum tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in various liver diseases. *J. Hepatol.*, v.24, p.177-84, 1996.
- VAGNONI, K.E., GINTHER, O.J., LUNN, D.P. Metalloproteinase activity has a role in equine chorionic girdle cell invasion. *Biol. Reprod.*, v.53, p.800-5, 1995.
- VAILLANT, B., GHIARAMONTE, M.G., CHEEVER, A.W., SOLOWAY, P.D., WYNN, T.A. Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the Th response: new insight into the role of Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases. *The Journal of Immunology*, v.167, p. 7017-26, 2001.

- VAN CAMP, S.D. Endometrial biopsy of the mare: a review and update. *Reproduction*, v.4, n.2, p.229-45, 1988.
- 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. *Histol. Histopathol.*, v.20, p.1105-13, 2005.
- 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.581-6, 2001a.
- WALTER, I., HELMREICH, M., HANDLER, J., AURICH, C. Mineralised deposits in the uterine glands of mares with chronic endometrial degeneration. *Vet. Rec.*, v.153, n.23, p.708-10, 2003.
- WALTER, I., KLEIN, M., HANDLER, J., AURICH, J., REIFINGER, M., AURICH, C. Lectin binding patterns of uterine glands in mares with chronic endometrial degeneration. *AVJR*, v.62, n.6, p.840-5, 2001b.
- WEI, S., CHEN, Y., CHUNG, L., NAGASE, H., BREW, K. Protein engineering of the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) inhibitory domain. *J. Biol. Chem.*, v.278, n.11, p.9831-4, 2003.
- YOKOTA, T., DENHAM, W., MURAYAMA, K., PELHAM, C., JOEHL, R., BELL, R.H. Pancreatic stellate cell activation and MMP production in experimental pancreatic fibrosis. *J. Surg. Res.*, v.104, p.106-11, 2002.
- YOSHIJI, H., KURYAMA, S., YOSHII, J., IKENAKA, Y., NOGUCHI, N., NAKATANI, T., TSUJINOUE, H., YANASE, K., NAMISAKI, T., IMAZU, H., FUKUI, H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology*, v.36, p.850-60, 2001.

YOUNGQUIST, R.S. Moléstias do sistema reprodutivo. In: SMITH, B.P. *Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais: moléstias de eqüinos, bovinos, ovinos e caprinos*. São Paulo: Manole, 1993. p.1351-1426.

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

ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 718p.

8. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista *Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science*.

**ENDOMETRITE CRÔNICA DAS ÉGUAS: REVISÃO DE LITERATURA
(EQUINE CHRONIC ENDOMETRITIS: A REVIEW)**

Camila Dias PORTO¹, Louisiane de Carvalho NUNES², Julio Lopes SEQUEIRA³, Marco Antônio ALVARENGA³

1 Pós-graduanda da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu, SP.

2 Docente do Centro de Ciências Agrárias – UFES, Campus de Alegre, ES.

3 Docentes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu, SP.

Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

FMVZ – UNESP Deptº. Clínica Veterinária

Distrito de Rubião Jr, s/n

CEP 18618-000 Botucatu - SP

sequeira@fmvz.unesp.br

ENDOMETRITE CRÔNICA DAS ÉGUAS: REVISÃO DE LITERATURA (EQUINE CHRONIC ENDOMETRITIS: A REVIEW)

É indispensável para a fertilidade das éguas a manutenção da integridade uterina, especialmente a do endométrio. As glândulas endometriais sintetizam, secretam e transportam substâncias histotróficas que nutrem o concepto no período de pré-implantação e de placentação^{8, 13}.

Microscopicamente, o útero das éguas é composto por três camadas: a interna é a mucosa ou endométrio, a segunda ou média é o miométrio e a camada externa é o perimétrio. Por sua vez, o endométrio é formado por epitélio luminal e lâmina própria, que se estende desde a membrana basal até a camada muscular interna do miométrio. De acordo com a densidade de células estromais a lâmina própria é dividida em dois estratos. No estrato compacto, mais superficial, a densidade de células estromais é alta e há uma delicada rede de fibras reticulares. O estrato esponjoso apresenta uma baixa densidade celular com muitas fibras conectando as células, o que confere aspecto de esponja. Esta região é caracterizada pela presença de numerosas glândulas uterinas, derivadas do epitélio luminal¹³.

O epitélio de revestimento do endométrio apresenta-se composto por células ciliadas, células secretoras não-ciliadas, além da presença eventual de leucócitos¹³. Utilizando a microscopia eletrônica de varredura e transmissão, Amaral¹ sugeriu a presença de ao menos sete tipos celulares ou estágios distintos no epitélio luminal do útero das éguas: entre as células secretórias encontrou células íntegras com microvilosidades, células com vesículas apicais e outras em degeneração; entre as células ciliadas, notou a presença de células jovens com microvilosidades, células maduras com cílios longos e íntegros e em degeneração. Nesta camada foram observados também leucócitos intra-epiteliais. Durante o estro constatou a presença de aberturas glandulares, repletas de secreção sendo lançada para o lúmen uterino. Relatou ainda que nas éguas acima de 12 anos a abertura dessas glândulas encontrava-se obstruída, o que poderia estar correlacionado com o processo fibrótico endometrial.

A infecção e inflamação transitórias do endométrio são conseqüências inevitáveis do contato com o sêmen, seja pela inseminação artificial ou mesmo na monta natural. A instalação dessa reação inflamatória aguda é induzida pela deposição de sêmen e pela contaminação bacteriana que ocorre durante o coito¹². Éguas consideradas normais do ponto de vista reprodutivo debelam eficientemente essa inflamação, mantendo o ambiente intra-uterino adequado para a sobrevivência do embrião até a sua implantação²⁴. Se o animal não for competente para eliminar qualquer possível agente nocivo nesse período, desenvolve-se a endometrite persistente.

Os mecanismos de defesa uterinos são complexos, havendo interação das barreiras anatômicas, componentes celulares, imunoglobulinas, substâncias bactericidas e fatores mecânicos. Éguas jovens são mais resistentes à enfermidade. A inflamação persistente freqüentemente resulta em luteólise prematura e subsequente perda embrionária^{12, 28}.

As principais causas de endometrite na égua são defeitos anatômicos, partos distócicos, retenção de placenta, processos iatrogênicos e, em animais suscetíveis, como já foi dito, a própria monta pode permitir a contaminação uterina³². Troedsson²⁷ classifica as endometrites persistentes conforme a patogênese em quatro grupos, a saber: doenças sexualmente transmissíveis, infecção uterina persistente, endometrite persistente induzida pelo coito e endometrite crônica degenerativa, também denominada endometrose.

Para o diagnóstico das endometrites, exames microbiológicos, citológicos e histopatológicos podem ser realizados. No entanto, a biópsia endometrial é o método definitivo para a determinação dessa enfermidade¹⁷.

A biópsia endometrial é o método mais preciso para o diagnóstico e o estabelecimento do prognóstico da fertilidade em éguas, visto que a fibrose é um dos principais critérios utilizados na avaliação do comprometimento do útero⁵. Esta técnica evidencia a situação morfológica do endométrio e fornece dados sobre a sua situação funcional^{5, 26}, além de ser um procedimento econômico e simples⁴.

Dessa forma, Kenney¹³ propôs um sistema de classificação das endometrites crônicas em três categorias, considerando a possibilidade da égua levar o conceito a termo. Essas categorias foram divididas com base na incidência e extensão das alterações histopatológicas. Na categoria I não há alterações patológicas ou se existem são discretas e esparsas, e também não há interferência com a habilidade de levar o feto a termo. Na categoria II é encontrado infiltrado inflamatório difuso moderado no estrato compacto, podendo estar presentes alterações fibróticas e lacunas linfáticas discretas. As alterações inflamatórias desta categoria podem regredir se tratadas devidamente. As endometrites classificadas como categoria III impossibilitam a égua de levar a gestação a termo e não regredem com tratamento. Há fibrose periglandular difusa que se correlaciona com a gravidade do prognóstico. Podem ser observados também grandes lacunas linfáticas e infiltrado inflamatório moderado a intenso.

Por ser a fibrose endometrial o fator mais importante para a determinação prognóstica da fertilidade, houve a necessidade da reclassificação dos tipos de endometrite em quatro categorias²⁸. Kenney & Doig¹⁴ modificaram essa classificação, subdividindo a categoria II em IIA e IIB, de acordo

com a quantidade de fibrose endometrial, a correlação da fibrose com a capacidade da égua em manter a prenhez e sua resposta à terapia. Na categoria IIA foram incluídas as biópsias que apresentavam infiltrado difuso no estrato compacto, ou disperso, em focos, nos estratos compacto e esponjoso; a fibrose encontrase esparsa envolvendo ramos glandulares individuais, em qualquer grau de severidade, ou raros agrupamentos de glândulas. As alterações encontradas na categoria IIB são difusas ou multifocais, sendo mais severas e extensas. A Fig. 1 descreve a classificação das endometrites crônicas segundo Kenney & Doig¹⁴.

Outros autores como Ricketts & Alonso²², baseados na tese de Ricketts datada de 1975, apud Ricketts & Alonso²², observaram que as lesões endometriais poderiam estar ou não acompanhadas por infiltrado mononuclear, denominando de endometrite crônica infiltrativa as que apresentavam características inflamatórias e de doença endometrial degenerativa crônica aquelas em que estavam presentes ninhos ou cistos glandulares associados à fibrose periglandular ou difusa. Segundo estes autores a endometrite infiltrativa crônica caracteriza-se por células mononucleares infiltrando o estroma, enquanto que na doença endometrial degenerativa crônica predominam as alterações degenerativas: ninhos e/ou cistos associados à fibrose periglandular e/ou estromal difusa. A Fig. 2 demonstra a classificação das endometrites eqüinas segundo Ricketts, apud Ricketts & Alonso²² e Ricketts & Barrelet²³.

A fibrose é um dos principais elementos da reação tecidual, sendo portanto importante a determinação de seu arranjo, localização e composição para se avaliar o grau de comprometimento do endométrio e as chances de regressão da lesão já estabelecida¹⁹.

A avaliação do grau de fibrose endometrial é importante, pois, ao contrário das alterações inflamatórias, é permanente. Nestas lesões a deposição de colágeno ocorre mais comumente ao redor das glândulas ou associada à membrana basal¹⁴. Essa alteração compromete a integridade e a função das glândulas endometriais, estruturas necessárias desde o período de pré-implantação embrionária até o desenvolvimento placentário completo. Nas glândulas fibróticas, o epitélio se diferencia irregularmente, além de haver modificação das secreções glandulares. Portanto, nos casos mais severos, mesmo que ocorra implantação embrionária, a redução ou alteração dessas secreções podem causar a nutrição inadequada do feto, podendo resultar em aborto³⁰.

Nunes¹⁹, estudando o padrão de distribuição e tipos de colágeno, observou maior concentração de colágeno nas endometrites crônicas nas regiões periglandular e perivascular, e no estrato esponjoso. Ao

correlacionar a gravidade da endometrite com a distribuição do colágeno, concluiu que quanto mais grave o grau, mais acentuado o acúmulo de colágeno ao redor das glândulas. Verificou também que o colágeno do tipo I foi mais freqüente nas lesões fibróticas periglandulares nas endometrites incluídas nas categorias II B e III.

O tipo de colágeno presente expressa a cronologia da lesão, já que o colágeno tipo III é o primeiro a ser depositado durante os processos reparativos e fibróticos em geral, sendo posteriormente substituído pelo do tipo I¹⁶. Um método utilizado para essa tipificação é o Picrosirius Red, o qual diferencia os tipos de colágenos detectando a diferença de intensidade da birrefringência das fibras em microscópio óptico de luz polarizada. Dessa forma, diferentes tonalidades de cor são observadas conforme o tipo de arranjo molecular presente^{11, 18}.

Há evidências de que em lesões granulomatosas com fibrose persistente ocorre formação progressiva de pontes de ligação de colágeno e conseqüente bloqueio de sítios de reação com as enzimas collagenolíticas, o que impede a degradação das moléculas de colágeno².

Evans et al.⁶ asseguram que a morfometria auxiliada por computação de biópsias uterinas podem ser incorporadas ao diagnóstico e avaliação da fibrose endometrial das éguas. Em conjunto com a avaliação histopatológica a determinação da porcentagem de colágeno periglandular endometrial permite estabelecer com maior precisão a fibrose periglandular no endométrio a despeito de sua distribuição, tamanho do ninho fibrótico, camadas de fibrose ou grau de fibrose individual glandular.

Utilizando análise morfométrica associada à técnica do picrosirius red – polarização, Nunes¹⁹ observou que à medida que a lesão endometrial evolui há substituição progressiva do colágeno tipo III por colágeno tipo I na região periglandular. Entretanto, ao realizar a classificação das endometrites no sistema proposto por Kenney & Doig¹⁴, notou que amostras apresentando fibrose intensa e infiltrado inflamatório discreto ou ausente foram englobadas na mesma categoria de outras em que o infiltrado acompanha a fibrose de forma conspícua. Esses achados permitem supor que processos diferentes, ocorrendo por diferentes causas, podem estar sendo incluídos na mesma categoria. Troedsson²⁷ denomina a fibrose periglandular associada à dilatação glandular como endometrose ou endometrite degenerativa crônica, sendo esta uma condição observada não só em éguas suscetíveis a endometrite persistente, mas também naquelas mais idosas sem histórico conhecido de inflamação. Isto sugere um processo fibroplásico degenerativo do endométrio sendo muito mais uma conseqüência do envelhecimento do que da inflamação uterina.

Walter et al.²⁹ citam que a endometrose é uma das razões mais frequentes da infertilidade em éguas, levando a alterações graves do tecido conjuntivo uterino e das glândulas.

Em um estudo mais recente, Nunes et al.²⁰, classificando 125 casos de endometrite crônica segundo Kenney & Doig¹⁴, descrevem que 18 casos (14,4%) foram incluídos na categoria I, 46 casos (36,8%) na categoria IIA, 23 casos (18,4%) na categoria IIB e 38 casos (30,4%) na categoria III. Esses dados permitiram concluir que 48,8% das biópsias apresentavam elevado grau de fibrose endometrial associada ou não a infiltrado inflamatório. No mesmo trabalho, utilizando-se a classificação de Ricketts & Alonso²², verificou-se que as alterações de caráter inflamatório predominavam, totalizando 56,8% dos casos.

Outros achados morfológicos podem ter relação com a fibrose endometrial. É relatada na literatura a presença de depósitos contendo fosfato de cálcio ou carbonato de cálcio no lúmen das glândulas uterinas de éguas portadoras de alterações endometriais degenerativas. Isso poderia ser causado pela deposição de sais de cálcio em um núcleo formado por debris celulares presentes nessas glândulas. Este mecanismo seria análogo à sialolitíase que, por sua vez, é mais comum em equinos do que nas outras espécies. A formação desses cálculos no útero ocorrem predominantemente nas glândulas pouco ou moderadamente dilatadas e nas fibróticas. Esse processo pode levar à dilatação cística dessas estruturas e poderia explicar a diferenciação miofibroblástica periglandular. Os miofibroblastos podem estar relacionados com a estimulação da produção da matriz extracelular e sua degradação, já que são aptos a produzir citocinas^{29, 31}.

Inoue et al.¹⁰ constataram que há relação entre as endometroses e a esclerose vascular da íntima e adventícia de pequenas artérias observadas sob o endométrio através de exame histeroscópico, e o grau de comprometimento dos vasos acompanha a gravidade da lesão uterina. Este processo vascular pode ser consequência da idade, de inflamação crônica e possivelmente de fatores endócrinos. Porém, outros estudos obtiveram resultados conflitantes, nos quais houve diferenças individuais entre a progressão da alteração esclerótica e o grau da endometrose, não podendo ser aquela diretamente atribuída à causa da enfermidade. Sabe-se que alterações no ambiente uterino produzidas pela esclerose das artérias podem contribuir para a progressão da endometrose, mas ou esta pode ocorrer como resultado do avanço da idade. Portanto, a patogênese deste processo ainda gera dúvidas e necessita de estudos mais aprofundados²⁹.

Ainda há relatos de que as alterações vasculares relacionadas à idade são caracterizadas pela esclerose da camada média e perivascular. O termo angiose é designado como lesão degenerativa de artérias ou veias. Este processo em grau moderado ou grave, atingindo todas as camadas da parede vascular é mais freqüente nas éguas com maior número de partos. A angiose é freqüentemente observada em combinação com as alterações degenerativas de vasos linfáticos e do endométrio. É citado que as lacunas linfáticas têm sido interpretadas como um sinal de má perfusão uterina. Desta forma, a endometrose representaria mais uma seqüela da congestão endometrial crônica^{9, 25}.

A atrofia endometrial, eventualmente resultando em senilidade endometrial, pode ser uma conseqüência importante da endometrose. A interação entre a endometrite e endometrose ainda não é completamente compreendida. A reversão do processo depende de vários fatores como idade, número de parições, *status* reprodutivo, aspectos clínicos e anormalidades endocrinológicas²⁵.

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

A degradação da matriz extracelular envolve muitas enzimas, mas as metaloproteinases (MMP) são as mais importantes nesse processo^{3, 15}.

A relação entre as MMPs e alterações uterinas tem sido estudada nas mulheres⁷. Nas éguas, há evidências de que a MMP-2 e a MMP-9 participem do processo fibrótico que ocorre na endometrite crônica²¹. O estudo destas enzimas e de seus inibidores no processo fibrótico endometrial das éguas abre novas perspectivas na compreensão da patogênese das endometrites crônicas.

Diante do exposto, nota-se que como a patogênese da fibrose endometrial equina ainda permanece obscura, estudos sobre seus mecanismos devem ser desenvolvidos. Esta alteração compromete a função uterina, impedindo a fêmea de manter o feto até o final da gestação, o que leva a grandes perdas econômicas. O estudo dos tipos de colágeno que se acumulam na fibrose endometrial é necessário para que seja realizada a correlação entre a cronologia do processo e as alterações encontradas na histopatologia¹⁹. Investigações a respeito das metaloproteinases e de seus inibidores nesse tipo de processo ainda são escassos. Novos caminhos na terapia antifibrótica podem se abrir a partir da determinação do papel das metaloproteinases nas afecções endometriais crônicas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AMARAL, D. *Estudo morfológico e histoquímico do endométrio de éguas PSI*, 2002. 65 f. Tese (doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 2 ANDRADE, G.B., MONTES, G.S., CONCEIÇÃO, G.M.S., SALDIVA, P.H.N. Use of the Picrosirius-polarization method to age fibrotic lesions in the hepatic granulomas produced in experimental murine schistosomiasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 93, p. 265-72, 1999.
- 3 ARTHUR, M.J.P. MMPs and TIMPs in liver fibrosis. *American Journal of Physiology . Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 279, G245-G249, 2000.
- 4 CONCHA-BERMEJILLO, A., KENNEDY, P.C. Prognostic value of endometrial biopsy in the mare: a retrospective analysis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 181, n. 7, p. 680-1, 1982.
- 5 DOIG, P.A., MCKNIGHT, J.D., MILLER, R.B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Canadian Veterinary Journal*, v. 22, p. 72-6, 1981.
- 6 EVANS, T.J., MILLER, M.A., GANJAM, V.K., NISWENDER, K.D., ELLERSIECK, M.R., FRAUSE, W.J., YOUNGQUIST, R.S. Morfometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. *American Journal of Veterinary Research*, v. 59, n. 10, p. 1209-14, 1998.
- 7 GOFFIN, F., MUNAUT, C., FRANKENNE, F., D’HAUTERIVE, S.P., BÉLIARD, A., FRIDMAN, V., NERVO, P., COLIGE, A., FOIDART, J.-M. Expression pattern of metalloproteinases and TIMPs in cycling human endometrium. *Biology of Reproduction*, v. 69, p. 976-84, 2003.
- 8 GRAY, C. A., BARTOL, F.F., TARLETON, B.J., WILEY, A.A., JOHNSON, G.A., BAZER, F.W., SPENCER, T.E. Developmental biology of uterine glands. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 1311-23, 2001.
- 9 GRÜNINGER, B., SCHOON, H.-A, SCHOON, D., MENDER, S., KLUG, E. Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares in relationship to age and parity. *Journal of Comparative Pathology*, v. 119, p. 293-309, 1998.
- 10 INOUE, Y., ITO, K., TERADA, T., NISHIMURA, N., HATAZOE, T., SATO, K. Degenerative changes in the endometrial vasculature of the mare detected by videoendoscopic examination. *AAEP Proceedings*, v. 46, p. 325-9, 2000.
- 11 JUNQUEIRA, L.C.U., COSSERMELLI, W., BRENTANI, R.R. Diferencial staining of collagens typé I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Archivum Histologicum Japonicum*, v. 41, p. 267-74, 1978.

- 12 KATILA, T. Uterine defence mechanisms in the mare. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 197-204, 1996.
- 13 KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 172, n. 3, p. 241-62, 1978.
- 14 KENNEY, R.M., DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D.A. (ed.). *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p. 723-9.
- 15 LENHART, J.A., RYAN, P.L., OHLETH, K.M., PALMER, S.S. Relaxin increases secretion of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and -2 during uterine and cervical growth and remodeling in the pig. *Endocrinology*, v. 143, p. 91-8, 2002.
- 16 MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Repair, regeneration and fibrosis. in: RUBIN, E., FABER, J.L. *Pathology*. 3 ed. Philadelphia: Lippincot-Raven, 1999, 1664 p.
- 17 MEDICE, E.B., MERKT, H., POLHENS, J.F., BRUNKHORST, D. Considerations on the use of ancillary diagnostic aids in the diagnosis of endometritis due to infection in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl., v. 44, p. 700-3, 1991.
- 18 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.
- 19 NUNES, L.C. *Avaliação histopatológica, histoquímica, imunoistoquímica e morfométrica das endometrites crônicas em éguas*, 2003. 108 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- 20 NUNES, L.C., PORTO, C.D., SEQUEIRA, J.L., ALVARENGA, M.A. Classificação histopatológica das endometrites crônicas das éguas: estudo retrospectivo e prospectivo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, supl.1, p. 75.
- 21 PORTO, C.D., NUNES, L.C., SEQUEIRA, J.L., OLIVEIRA, D.E., ALVARENGA, M.A.. Expressão de MMP-2 e MMP-9 no processo fibrótico endometrial das éguas *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, supl.1, p. 105-6.
- 22 RICKETTS, S.W., ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Veterinary Journal*, v. 23, 189-92, 1991.

- 23 RICKETTS, S.W., BARRELET, A. A retrospective review of the histopathological features seen in a series of 4241 endometrial biopsy samples collected from UK thoroughbred mares over a 25 year period. *Pferdeheilkunde*, v. 13, n. 5, p. 525-30, 1997.
- 24 RIGBY, S.L., BARHOUMI, R., BURGHARDT, R.C., COLLERAN, P., THOMPSON, J.A., VERNER, D.D., BLANCHARD, T.L., BRINSKO, S.P., TAYLOR, T., WILKERSON, M.K., DELP, M.D. Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 740-7, 2001.
- 25 SHOON, H.-A., SCHOON, D. The category I mare (Kenney and Doig 1986): expected foaling rate 80-90% - fact or fiction? *Pferdeheilkunde*, v. 19, n. 6, p. 698-701, 2003.
- 26 SILVA, C.A.M., BARROS, S.S., ESQUERRE, R.A. A biópsia endometrial na avaliação da fertilidade da égua. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 7, p. 131-3, 1987.
- 27 TROEDSSON, M.H.T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*, v. 52, p. 461-71, 1999.
- 28 VAN CAMP, S.D. Endometrial biopsy of the mare: a review and update. *Reproduction*, v. 4, n. 2, p. 229-45, 1988.
- 29 WALTER, I., HANDLER, J., REIFINGER, M., AURICH, C. Association of endometrosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction*, v.121, p. 581-6, 2001a.
- 30 WALTER, I., KLEIN, M., HANDLER, J., AURICH, J, REIFINGER, M., AURICH, C. Lectin binding patterns of uterine glands in mares with chronic endometrial degeneration. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, n. 6, p. 840-5, 2001b.
- 31 WALTER, I, HELMREICH, M., HANDLER, J., AURICH, C. Mineralised deposits in the uterine glands of mares with chronic endometrial degeneration. *Veterinary Record*, v. 153, n. 23, p. 708-10, 2003.
- 32 YOUNGQUIST, R.S. Moléstias do sistema reprodutivo. In: SMITH, B.P. *Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais: moléstias de eqüinos, bovinos, ovinos e caprinos*. São Paulo: Manole, 1993. p. 1351-1426.

RESUMO

A endometrite é a principal causa de redução da fertilidade em éguas sendo considerada o problema de maior importância clínica nos eqüinos depois da cólica e das enfermidades do trato respiratório. A biópsia endometrial é o método mais preciso para o diagnóstico e estabelecimento do prognóstico da fertilidade em éguas, já que permite a avaliação da situação morfofuncional do endométrio. Por serem os padrões de distribuição da fibrose e do infiltrado inflamatório as principais características para o diagnóstico das endometrites, Kenney propôs um sistema de classificação para esta enfermidade, posteriormente modificado por Kenney & Doig. Outras classificações também são utilizadas, como a descrita por Ricketts & Alonso, que procura separar entidades distintas de acordo com o padrão morfológico da lesão endometrial. Estes estudos iniciais permitiram o aprofundamento das pesquisas dos possíveis mecanismos envolvidos nas endometrites crônicas das éguas. Estudos recentes sobre a classificação dos tipos de colágeno e tipificação do infiltrado inflamatório procuram caracterizar o processo, enquanto pesquisas mais recentes envolvendo enzimas que degradam a matriz extracelular buscam elucidar parte de sua patogênese ainda não totalmente compreendida.

Unitermos: Eqüino, Endometrite, Útero, Inflamação crônica, Fibrose.

ABSTRACT

Endometritis is the main cause of fertility reduction in mares and is considered the problem of bigger clinical importance in the equine after the colic syndrome and respiratory system diseases. The endometrial biopsy is the most necessary approach for the diagnosis and establishment of the prognostic of fertility in mares, since it permits the morphofunctional evaluation of the endometrium. Because the main characteristics for the diagnosis of endometritis are the standards of distribution of fibrosis and the infiltrated inflammatory, Kenney proposed a system of classification for this illness, modified later by Kenney & Doig. Other classifications also are utilized, as the one described by Ricketts & Alonso, which seeks to separate different entities according to the morphological standard of the endometrial wound. These initial studies permitted the deepening of the researches on the possible mechanisms involved in the chronic endometritis of the mares. Recent studies about the classification of the kinds of collagen and determination of types of the infiltrated inflammatory try to characterize the trial, while more recent researches involving enzymes that degrade the extra cellular matrix try to explain part of its pathogen not yet completely understood.

Uniterms: Equine, Endometritis, Uterus, Chronic inflammation, Fibrosis.

Figura 1. Classificação histopatológica das endometrites crônicas das éguas segundo Kenney & Doig¹⁴.

CARACTERÍSTICAS	CATEGORIA I	CATEGORIA IIA	CATEGORIA IIB	CATEGORIA III
considerações	Endométrio sem alterações patológicas, ou são discretas e bem dispersas. Probabilidade de levar a gestação a termo de 80 a 90%.	Alterações discretas. Probabilidade de levar a gestação a termo de 50 a 80%.	Alterações moderadas. Probabilidade de levar a gestação a termo de 10 a 50%.	Alterações severas. Probabilidade de levar a gestação a termo de 10% ou menos.
infiltrado inflamatório		discreto a moderado no estrato compacto ou focos discretos e freqüentes no estrato compacto e esponjoso	difuso e em focos moderadamente severos	difuso e severo
alterações fibróticas		discretas e freqüentes de glândulas individuais em qualquer grau de severidade ou menos de 2 ninhos por campo linear de 5,5 mm (média de 4 campos)	difusa com distribuição uniforme e 4 ou mais camadas (2 ou 4 ninhos por campo linear de 5,5 mm em média de 4 campos)	difusa e uniforme de glândulas com 5 ou mais ninhos por campo linear de 5,5 mm
lacunas linfáticas		extensas o suficiente para serem palpáveis	extensas e palpáveis	severas, dando ao útero aspecto de gel
outras alterações		éguas com atrofia endometrial parcial no fim da estação de monta são incluídas nesta categoria		éguas com atrofia endometrial severa na estação de monta estão incluídas
resposta ao tratamento		alterações inflamatórias e linfáticas podem melhorar, com reclassificação para categoria I	alterações inflamatórias e linfáticas podem reduzir, com reclassificação para IIA ou menor, mas as éguas devem ser submetidas à inseminação artificial	alterações inflamatórias e linfáticas podem melhorar, mas devido à fibrose, não há reclassificação da categoria

Figura 2. Classificação das endometrites eqüinas segundo Ricketts & Barrelet²³.

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	CARACTERÍSTICAS
Endometrite aguda	leucócitos polimorfonucleares infiltrando o epitélio luminal e estroma, algumas biópsias apresentam eosinófilos
Endometrite crônica infiltrativa	células mononucleares, incluindo histiócitos e plasmócitos, infiltrando o estroma
Doença endometrial degenerativa crônica (endometrose)	alterações degenerativas glandulares (ninhos e/ou cistos) associadas à fibrose periglandular e/ou fibrose estromal difusa
Atrofia endometrial	atrofia glandular
Hipoplasia endometrial	hipoplasia glandular
Hiperplasia endometrial	hiperplasia glandular

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Objetivo e política editorial](#)
- [Normas editoriais](#)
- [Apresentação dos trabalhos](#)

Objetivo e política editorial

O periódico **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** é publicado sob orientação da Comissão de Publicação da [Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia](#) da Universidade de São Paulo, sendo os conceitos emitidos de inteira responsabilidade dos autores.

A publicação de artigos dependerá da observância das Normas Editoriais, dos pareceres do [Corpo Editorial](#), da Comissão de Publicação e/ou de relator ad hoc.

Todos os pareceres têm caráter sigiloso e imparcial, e tanto os autores quanto os membros do Corpo Editorial e/ou relatores ad hoc não obtêm informações identificadoras entre si.

Os artigos e toda a correspondência deverão ser enviados para o [endereço abaixo](#).

A revista tem por finalidade publicar artigos completos, notas prévias e artigos de revisão nas áreas de medicina veterinária, zootecnia e ciências afins, elaborados por especialistas nacionais e/ou estrangeiros, desde que se enquadrem nas normas editoriais.

Normas editoriais

Artigo completo

1 - Deverá ser inédito e destinar-se exclusivamente ao periódico **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**.

2 - Limitar-se a um máximo de dez páginas digitadas.

3 - Ser escrito em língua portuguesa, na ortografia oficial, ou em língua inglesa.

4 - Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo.

5 - Ser estruturado dentro dos seguintes itens:

- a) Página de rosto
- b) Título em português e inglês
- c) Introdução
- d) Material e Método
- e) Resultados
- f) Discussão
- g) Conclusões
- h) Referências Bibliográficas
- i) Resumo/Summary e Unitermos/Uniterms.

Os itens Resultados, Discussão e Conclusões poderão ser colocados em uma única seção, salvo entendimento contrário do [Corpo Editorial](#).

6 - Apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, nos idiomas inglês e português, não devendo ultrapassar 250 (duzentos e cinquenta) palavras, seguidos dos unitermos, limitados a 5 (cinco), que correspondem a palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo. Os resumos não têm parágrafos e seus unitermos devem estar escritos na forma maiúscula e minúscula.

Nota prévia

1 - Deverá ser inédita e destinar-se exclusivamente ao periódico **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**.

2 - Limitar-se ao máximo de três páginas digitadas.

3 - Ser escrita em língua portuguesa, na ortografia oficial, ou em língua inglesa.

4 - Usar somente as nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas.

5 - Não deverão ser subdivididos em seções separadas (Introdução, Material e Método etc.), mas deverão apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, com Unitermos, à semelhança do que foi descrito para a apresentação de **Artigo completo**, além de Referências Bibliográficas.

Artigo de revisão

Os artigos de revisão só poderão ser publicados por especialistas de renome a convite da [Comissão de Publicação](#). Entretanto, o esboço de um artigo de revisão poderá ser submetido à Comissão de Publicação sem prévia consulta e, se este for considerado apropriado, o(s) autor(es) será(ão) convidado(s) a preparar o artigo para publicação. Esses artigos deverão seguir as normas de

Artigo completo, porém sem subdivisão em Introdução, Material e Método, Resultados e Discussão, preservando-se apenas dois resumos, com Unitermos, à semelhança do que foi descrito para a apresentação de **Artigo completo**, além de Referências Bibliográficas.

Apresentação dos trabalhos

1 - **Digitação**: original em disquete 3 1/2" de alta densidade, devidamente identificado com o título do artigo e nome do(s) autor(es) e três cópias impressas, inclusive suas tabelas e referências bibliográficas; deve ser digitado obrigatoriamente em formato A4 (21,0 x 29,7cm), espaço duplo, em uma só face de papel, margens de 2,5cm, fonte Times New Roman tamanho 10 e numeração consecutiva das páginas. Ilustrações e legendas devem ser relacionadas em folhas separadas. Os artigos deverão ser apresentados utilizando-se o editor de texto Microsoft Word.

2 - **Página de rosto**: todo artigo deve ter uma página de rosto com o título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e instituição de origem. O rodapé da página deverá mencionar o endereço completo (inclusive e-mail) do autor a quem deverão ser encaminhadas as correspondências. Observar que unicamente nesta página conste a identificação dos autores, para o devido sigilo e imparcialidade. Se o artigo for subvencionado, mencionar a instituição que o patrocinou, assim como os agradecimentos.

3 - **Tabelas**: devem ser numeradas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, seguido de local e data. Na montagem das tabelas seguir: IBGE. Normas de apresentação tabular. 3.ed. Rio de Janeiro: IBGE, 1993. 61p.. O limite de tabelas por trabalho é de cinco. Em casos excepcionais, conhecida a opinião do [Corpo Editorial](#), este número poderá ser ultrapassado. No texto devem ser indicadas pela abreviatura Tab.

4 - **Ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos ou esquemas)**: devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras. As fotografias deverão ser identificadas com o título do artigo e o nome do autor principal, além de conter no verso a indicação de seu correto posicionamento. Gráficos, desenhos ou esquemas deve ser fornecidos em folha à parte identificada com o título do artigo e o nome do autor principal, além das respectivas legendas. Todas as ilustrações deverão ser fornecidas em três vias. Os gráficos devem trazer sempre os valores numéricos que lhes deram origem. Desenhos e esquemas devem apresentar boa qualidade técnica e artística (caso tenham sido gerados com o auxílio do computador, sempre acompanhados dos originais impressos). Aceitar-se-á um número máximo de nove ilustrações por artigo, distribuídas da seguinte forma: três fotografias, três gráficos e três

desenhos/esquemas. Acima deste limite, as despesas com reprodução correrão por conta do autor. Ilustrações coloridas, independentemente do número, serão cobradas. No texto devem ser indicadas pela abreviatura Fig.

5 - **Referências bibliográficas:** devem ser arranjadas em ordem alfabética por sobrenome do autor e numeradas consecutivamente. Os títulos de periódicos devem ser mencionados de maneira uniforme, ou seja, todos por extenso. As referências seguem a normalização da NBR-6023/2000, que deverá ser consultada para outros tipos de documentos não exemplificados nas Instruções aos Autores.

Exemplo de periódico

KOTZEKIDOV, P.; BLOUKAS, J.G. Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelf-life of sliced vacuum-pocked cooked ham. **Meat Science**, v.42, n.3, p.333-45, 1996.

Exemplo de livro no todo

HALLIWELL, R.E.W.; GORMAN, N.T. **Veterinary clinical immunology**. London : W.B. Saunders, 1989. 548 p.

Exemplo de autor diferente para o livro e capítulo

FENNER, W.R. Avaliação neurológica dos pacientes. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina interna veterinária. 3.ed. São Paulo : Manole, 1992. p.577-606.**

Exemplo de mesmo autor para o livro e capítulo

THORTON, H. Deleterious changes in meat. In: THORTON, H. **Aspects of meat inspection**. London: Thindall & Cassel, 1973. p. 63-72.

Exemplo de tese

BIRGEL, E. H. **Estudo do quadro eritrocitário de caprinos (Capra hircus, L.) normais criados no Estado de São Paulo:** influências de fatores raciais, sexuais, etários e alimentares, 1973. 92 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Exemplo de evento

OLIVEIRA, C.A. Hormonoterapia em cadelas e gatas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., Belo Horizonte, 1991. **Anais**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p.100-11.

Exemplo de monografia eletrônica considerada no todo

POORE, M. H. **Alternative feeds for beef cattle**. North Carolina: North Carolina Corporative Extension Service, 1994. Disponível em: <<http://www.ces.ncsu.edu/drought/dro-28.html>>. Acesso em: 23 abr. 1997.

Exemplos de artigos de periódicos eletrônicos

MENDONÇA JR., C.X.; MARTINS, A.P.; MORI, A.V.; SILVA, A.B.; MORI, C.S. Efeito da adição de óleo de peixe à dieta sobre o desempenho e níveis de lípidos plasmáticos e de colesterol no ovo de galinhas poedeiras. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.1. 2000. Disponível em: <http://cgi_bin/wxis.exe/iach/scielo>. Acesso em: 31 jan. 2001

6 - **Citações no texto**: devem ser feitas por número sobrescrito. Quando indispensável para a compreensão do texto, combinar sobrenome do autor com indicação do número sobrescrito correspondente ao número que aparece nas Referências Bibliográficas. Neste caso, quando se tratar de dois autores, ambos devem ser citados. No caso de mais de dois autores, a citação deve ser acompanhada pelo sobrenome do primeiro autor seguido da expressão et al., em letra maiúscula e minúscula, conforme exemplos abaixo:

Triparthy e Hanson¹¹

Yanaguita et al.⁹

Disponível no site: <http://www.scielo.br/revistas/bjvras/pinstruc.htm>
(acessado em 08/02/2006)