

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

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DOS
MIOFIBROBLASTOS ENDOMETRIAIS E DA
EXPRESSÃO DE MMP-2 NAS ENDOMETRITES
CRÔNICAS DAS ÉGUAS**

ANA PAULA BATISTA MASSENO

BOTUCATU - SP

Fevereiro, 2009

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

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DOS
MIOFIBROBLASTOS ENDOMETRIAIS E DA
EXPRESSÃO DE MMP-2 NAS ENDOMETRITES
CRÔNICAS DAS ÉGUAS**

ANA PAULA BATISTA MASSENO

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

Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

**BOTUCATU - SP
Fevereiro, 2009**

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

Masseno, Ana Paula Batista.

Caracterização imunoistoquímica dos miofibroblastos endometriais e da expressão de MMP-2 nas endometrites crônicas das éguas / Ana Paula Batista Masseno. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Júlio Lopes Sequeira

Assunto CAPES: 50503006

1. Eqüino - Doenças 2. Endometrite 3. Útero - biópsia 4. Patologia animal

CDD 636.10896

Palavras-chave: Endométrio; Endometrite; Eqüino; Fibrose; Imunoistoquímica; Miofibroblasto

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
ANA PAULA BATISTA MASSENO

Comissão da Banca Examinadora

Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

Prof^a . Dra. Louisiane de Carvalho Nunes

Prof^a . Dra. Noeme Sousa Rocha

Botucatu, 10 de Fevereiro de 2009.

A Deus por me guiar e me abençoar sempre.

À minha família pelo amor incondicional e todo apoio que me deram durante toda
minha vida e meu caminho. Sempre estiveram ao meu lado...

Amo todos vocês!

Ao meu orientador, Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira, pelo exemplo de ser humano.

Ao meu namorado Rafael Vieira, pelo carinho, pela cumplicidade e por estar ao meu
lado.

DEDICO

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a
força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”

Goethe

AGRADECIMENTOS

- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro tornando viável o desenvolvimento deste trabalho.
- À pós-graduanda Camila Dias Porto pela companhia no desempenho deste estudo, pela amizade durante os anos de convívio.
- À Prof^a Dr^a Noeme Sousa Rocha, Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, pelo exemplo de vida e perseverança, dos incontáveis conselhos e ensinamentos. Muito obrigada!
- À Prof^a Dr^a Renée Laufer Amorim, Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, por me mostrar que podemos ser melhores, por mais limitações possam existir no caminho.
- Ao Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, pelo material concedido durante a efetivação do projeto.
- Ao Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP – Botucatu, pelo auxílio indireto para a realização da imunoistoquímica.
- Ao Prof. Sebastião Martins Filho, Departamento de Informática, da Universidade Federal de Viçosa, pela realização da análise estatística deste trabalho.
- À Prof^a Dr^a Louisiane de Carvalho Nunes, pelo estímulo ao estudo e amizade durante ao longo desses anos.
- À Prof^a Dr^a Surama Freitas Zanini, pelo exemplo de determinação e força, pelo apoio e ensinamentos.
- Aos amigos adquiridos e àqueles de longas datas, João Marcelo Antunes, Camila Dias Porto, Fernanda Saules Ignácio, Andreza Amaral, Milla Paiva, Gabriel Monteiro, Simone Henriques, Mangia Priscila Guasti, Ulisses Stellman, Jair Camargo, e todos os demais.
- A todos os pós-graduandos, residentes e estagiários da Patologia Veterinária pelo convívio amigo.

- Ao técnico de necropsia Maury Raul pelo exemplo de simplicidade e força, pelos seus ensinamentos de vida e profissionais.
- Ao técnico do Laboratório de Histologia da UNESP Noel Almeida Melo, por cada coloração, por cada processamento de material e pelas longas horas de conversa amiga.

1. INTRODUÇÃO

A endometrite é uma importante causa de subfertilidade na égua. Infecções uterinas persistentes ou repetidas levam ao desenvolvimento de fibrose periglandular. Éguas suscetíveis à infecção falham em eliminar as bactérias com a mesma eficiência das éguas saudáveis.

A biópsia uterina é um método diagnóstico auxiliar importante na reprodução equina. Algumas alterações uterinas, como a fibrose periglandular e as endometrites não purulentas, só são diagnosticadas por meio de uma biópsia uterina.

As alterações histopatológicas apresentadas pelo endométrio equino foram descritas por Kenney (1978) e incluem processos inflamatórios agudos ou crônicos e alterações crônicas degenerativas como fibrose, dilatação cística e lacunas linfáticas. A classificação mais amplamente utilizada foi proposta por Kenney (1978) e posteriormente modificada por Kenney e Doig (1986). Segundo esta última, o endométrio da égua pode ser classificado em quatro categorias (I, IIA, IIB e III) de acordo com a presença, distribuição e intensidade das lesões observadas na lâmina própria. Neste sistema, quanto maior o grau de classificação da biópsia, menor é a probabilidade do endométrio suportar uma gestação.

Os miofibroblastos são componentes importantes durante a reparação do tecido lesionado e aparecem após o término dos fenômenos inflamatórios iniciais (GABBIANI et al., 1971). No endométrio equino, os fibroblastos que circundam as glândulas uterinas fibróticas nas endometroses mostram forte imunoreatividade para actina de músculo liso- α . Mais ainda, glândulas císticas são circundadas por uma camada de células positivas para esta proteína (WALTER et al., 2001). Walter et al. (2001) avaliaram a expressão de MMP-2 na fibrose periglandular das éguas e verificaram que a expressão desta enzima estava associada com a dilatação e fibrose glandular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O útero da égua é formado por três camadas: endométrio (mucosa), miométrio (muscular) e perimétrio (serosa).

A mucosa do lúmen uterino é revestida por células epiteliais, que variam de cúbicas a cilíndricas altas. Abaixo do epitélio está a lâmina própria, a qual foi dividida por Kenney (1978) em estrato compacto e esponjoso. O estrato compacto é formado por muitas células do estroma e capilares. No estrato esponjoso encontram-se algumas células do estroma, artérias, veias e vasos linfáticos, bem como as glândulas endometriais. Vogel e Humke (1973) denominam a camada entre o endométrio e o miométrio de estrato subglandular, rico em vasos e pobre em glândulas. O miométrio é formado por uma espessa camada circular interna e uma fina camada longitudinal externa, e entre elas, está o estrato vascular. Justaposto ao miométrio fica o perimétrio, formado por tecido conjuntivo frouxo, vasos e nervos, cobertos por mesotélio peritoneal (DELLMAN e BROWN, 1987).

As características histológicas observadas nas biópsias endometriais podem ser fisiológicas (cíclicas ou estacionais), patológicas ou artefatos de técnica (KENNEY, 1978). A interpretação correta de alterações depende do conhecimento das mudanças cíclicas e estacionais do endométrio. Características cíclicas a serem observadas são a altura do epitélio luminal, a configuração das glândulas e a quantidade de edema da lâmina própria (DOIG e WAELCHLI, 1993).

A biópsia uterina faz parte do exame ginecológico para avaliar a capacidade reprodutiva da égua. Sua maior importância consiste na determinação da capacidade do útero em levar uma gestação a termo. O método também é útil na investigação de mudanças associadas com baixa fertilidade, não facilmente diagnosticadas por outras técnicas e na monitoração da resposta à uma terapia uterina específica (DOIG e WAELCHLI, 1993). A biópsia endometrial é indicada em qualquer égua não gestante com suspeita de alteração uterina.

Nos Estados Unidos a endometrite é o terceiro maior problema que acomete eqüinos adultos, sendo superada apenas pelos quadros de cólica e os processos patológicos do trato respiratório (TRAUB-DARGATZ; SALMAN E VOSS, 1991).

A endometrite persistente é uma causa importante de subfertilidade em éguas (SUMMERFIELD e WATSON, 1998) contribuindo de maneira significativa para o declínio do potencial de fertilidade (JEFFCOTT et al., 1982).

As éguas podem ser classificadas como suscetíveis ou resistentes às endometrites de acordo com a sua capacidade de eliminar infecções uterinas dentro de um determinado período de tempo ou pelo escore da biópsia endometrial. Éguas férteis realizam a limpeza uterina dentro de 24 a 36 horas após o cio. Isto ocorre antes do embrião alcançar o útero, cerca de 5,5 dias após a ovulação (WATSON, 2000). Segundo Troedsson (1999), após a fertilização o zigoto permanece no oviduto de cinco a seis dias sendo depois transportado até o lúmen uterino. Quando a endometrite persiste por mais de cinco dias o ambiente citotóxico do útero não permite a manutenção da gestação (WATSON, 2000).

Defeitos anatômicos da genitália, defeitos na contratilidade endometrial, baixa resposta imune, baixa produção de muco, inadequada drenagem linfática ou uma combinação destes fatores predispõem ao aparecimento da endometrite (WATSON, 2000).

A deposição de sêmen no ambiente intra-uterino resulta em reação inflamatória devido a contaminação bacteriana do ejaculado ou a presença dos espermatozoides. Em um estudo recente constatou-se que aproximadamente 15% da população de éguas normais desenvolveu endometrite persistente pós-cobertura (TROEDSSON, 1999).

A biópsia uterina, quando associada ao histórico reprodutivo e exame ginecológico, é uma ferramenta valiosa utilizada frequentemente na avaliação da fertilidade da égua (RICKETTS, 1975; KENNEY, 1978; KENNEY e DOIG, 1986; RICKETTS e ALONSO, 1991). Esta técnica tem se mostrado de grande valor no auxílio ao diagnóstico de processos patológicos do endométrio fornecendo a base para o prognóstico e o tratamento de éguas subférteis (MANSOUR et al., 1997).

Nielsen (2005) mostrou que a avaliação histológica de biópsias endometriais representa o melhor método para o diagnóstico de endometrite e infecção uterina. Segundo este mesmo autor, a histologia endometrial permite a detecção da resposta inflamatória causada por diferentes agentes infecciosos e de desordens degenerativas crônicas do endométrio na mesma amostra.

As alterações histopatológicas apresentadas pelo endométrio equino foram descritas em detalhes por Kenney (1978) e incluem os processos inflamatórios agudos ou crônicos e as alterações crônicas degenerativas como fibrose, dilatação cística e lacunas linfáticas.

Vários têm sido os protocolos propostos para classificação do endométrio com o objetivo de se avaliar o potencial reprodutivo da égua. A classificação mais amplamente utilizada foi proposta por Kenney (1978) e posteriormente modificada por Kenney e Doig (1986). Segundo esta última, o endométrio da égua pode ser classificado em quatro categorias (I, IIA, IIB e III) de acordo com a presença, distribuição e intensidade das lesões observadas na lâmina própria. Neste sistema, quanto maior o grau de classificação da biópsia, menor é a probabilidade do endométrio suportar uma gestação.

Ricketts e Alonso (1991) observaram que as endometrites poderiam estar ou não acompanhadas por infiltrado mononuclear, denominando de endometrite crônica infiltrativa as que apresentavam sinais de inflamação e fibrose e de doença endometrial degenerativa crônica (endometrose) aquelas em que estavam presentes apenas ninhos ou cistos glandulares associados à fibrose periglandular ou difusa.

A endometrite crônica infiltrativa e a doença endometrial degenerativa crônica são as duas alterações histopatológicas mais comumente observadas nas biópsias endometriais de éguas inférteis e subférteis (RICKETTS e ALONSO, 1991).

Doig, McNight e Miller (1981) citam que a doença endometrial degenerativa crônica é uma condição progressiva inevitável e está mais diretamente associada aos efeitos da idade do que ao número de partos. Já Watson (2000) afirma que a endometrose não é uma condição pós-cobertura, embora esteja associada à falha do *clearance* uterino.

As alterações degenerativas, embora não necessariamente irreversíveis, tendem a ser progressivas e contribuem para o declínio do potencial de fertilidade. Algumas hipóteses sugerem que a endometrite crônica infiltrativa seja um sinal de resposta imune local e que a endometrite degenerativa seja a resposta à inflamação crônica, ao envelhecimento e/ou a possíveis fatores endócrinos (RICKETTS e ALONSO, 1991).

Dascanio et al. (1998) relataram que éguas com endometrose podem apresentar cistos ou problemas de *clearance* uterinos. Isto pode estar relacionado à idade, visto que éguas velhas apresentam má conformação perineal, baixo tônus miometrial e fibrose uterina aumentada

quando comparadas com éguas jovens. Ricketts e Alonso (1991) observaram que éguas velhas, independente das alterações relacionadas ao sêmen, infecções, prenhez, partos e/ou involução uterina pós-parto apresentaram sinais avançados de doença degenerativa endometrial.

Os cistos endometriais podem afetar a fertilidade quando numerosos ou aumentados de tamanho e interferem com a motilidade embrionária, absorção de nutrientes pelo concepto, reconhecimento materno da gestação e placentação (DASCANIO et al., 1998). A atrofia do endométrio também interfere com a fertilidade e tem sido relacionada a um processo de envelhecimento do útero da égua. Este quadro de atrofia endometrial é geralmente complicado pela presença de endometrite crônica (TROEDSSON E LIU, 1991).

Um estudo realizado por Papa et al. (1998) revelou que de 17 éguas que apresentaram morte embrionária precoce, nove mostraram endometrite, duas apresentaram fibrose periglandular e seis apresentaram combinação de ambas, sugerindo que os processos inflamatórios que envolvem o endométrio representam a maior causa de morte embrionária nesta espécie.

Ekici et al. (2001) realizaram um estudo em éguas que apresentavam problemas reprodutivos há mais de dois anos. Neste estudo foram utilizadas 36 éguas entre 7 e 18 anos de idade, classificadas segundo Kenney e Doig (1986) como categoria IIA, IIB e III. Após a inseminação apenas 3 de 8 éguas da categoria IIA emprenharam. Nenhuma égua dos outros grupos obteve prenhez demonstrando que éguas com endometrites crônicas têm reduzida capacidade de manter a gestação.

A detecção da fibrose endometrial pode refletir alterações degenerativas e inflamatórias do endométrio. Entretanto, a identificação de vários graus de fibrose difusa ou periglandular em combinação com a infiltração de células inflamatórias indicam exposição persistente ao agente (TROEDSSON et al., 1993).

A fibrose periglandular pode lesar a superfície endometrial, reduzir o crescimento microcotiledonário, reduzir a taxa de crescimento fetal e alterar a secreção de substâncias histotróficas (EVANS et al., 1998).

A fibrose é um dos principais elementos da reação tecidual endometrial. Desse modo, é importante a determinação de seu arranjo, localização e composição para se avaliar o grau de

comprometimento do endométrio (NUNES, 2003). Entretanto a patogênese da fibrose periglandular ainda permanece desconhecida, embora a idade, o número de partições e o uso de medicações cáusticas intra-uterinas possam contribuir para o aparecimento do processo (EVANS et al., 1998).

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 e DOIG, 1986). A fibrose pode estar localizada no estrato esponjoso, envolvendo a base das glândulas, resultando na formação dos ninhos fibróticos, ou ainda no estrato compacto envolvendo os ductos das glândulas, o que pode comprometer o fluxo de secreção resultando na dilatação glandular e formação de cistos (AMARAL, 2002).

É comum na prática laboratorial o emprego de colorações específicas, como o tricrômico de Masson, para avaliação do tecido conjuntivo. Este método tem sido utilizado para identificar e graduar a fibrose endometrial patológica em biópsias uterinas de éguas (BLANCHARD et al., 1987). O aumento do número de camadas de tecido conjuntivo em volta das glândulas endometriais correlaciona-se significativamente com a diminuição da fertilidade. Já foi verificado em estudos prévios que éguas com uma média menor do que três camadas de fibrose periglandular têm 75% de probabilidade de levar uma gestação a termo, enquanto que éguas com uma média maior do que 3,5 camadas apresentam um prognóstico pior para fertilidade, ou seja, 25% de probabilidade de manter a gestação até o final (LEISCHMAN et al., 1982).

Embora as fibras colágenas apareçam geralmente bem coradas por este método, alguns tipos de colágeno importantes para a avaliação das lesões endometriais não podem ser observados seletivamente (CALDINI, 1992; PORTO, 2006).

Outro método histoquímico também utilizado para a avaliação dos processos endometriais é o do Picrosirius Red associado à microscopia de polarização. Esta técnica é específica para detecção de estruturas compostas de moléculas de colágeno orientadas (MONTES e JUNQUEIRA, 1991). Este método provou ser útil para o estudo dos diferentes tipos de colágeno em cortes histológicos obtidos de amostras normais e em vários modelos patológicos (JUNQUEIRA et al., 1980).

Segundo Andrade et al. (1999) o exame ao microscópio de luz polarizada de cortes corados pelo método de Picrosirius Red representa um eficiente meio para estudar a cronologia das lesões fibróticas. Também é usado para estudar a distribuição dos colágenos do tipo I e do tipo III. O primeiro aparece na forma de fibras espessas, amareladas ou avermelhadas, birrefringentes e o segundo com birrefringência fraca, caracterizado por fibras delgadas de coloração esverdeada.

No que diz respeito ao endométrio eqüino, Caldini (1992) concluiu que o estudo histoquímico e ultra-estrutural do colágeno na fibrose periglandular revelou que a base molecular da fibrose endometrial eqüina reside na substituição do colágeno do tipo III, presente na maior parte da lâmina própria do endométrio, por colágeno do tipo I, fato corroborado por Nunes (2006) e Porto (2006), quando foi associada a análise morfométrica do colágeno periglandular.

Vários estudos têm demonstrado que a matriz extracelular não apenas fornece aos tecidos um suporte estrutural, mas também favorece a troca de informações com as células via sinalização bioquímica, modulando uma série de processos que incluem o desenvolvimento, a migração celular, adesão, diferenciação e reparo (BRANTON e KOPP, 1999; MARTINEZ-HERNANDEZ, 1999). Nos processos fibróticos, entre outros fatores a síntese e degradação da matriz extracelular estão presentes (COTRAN et al., 1999).

Segundo Branton e Kopp (1999), em circunstâncias normais durante o remodelamento tecidual, a taxa de síntese das proteínas da matriz são balanceadas por proteínas de degradação, catalizadas por várias famílias de enzimas, incluindo plasmina e metaloproteinases (MMPs).

As MMPs, principais enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, constituem mais de 20 tipos e são divididas em quatro grupos: as collagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) que degradam os colágenos fibrilares I, II e III; as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) que degradam o colágeno amorfo e fibronectina; as estromalisinas (MMP-3, MMP-7 e MMP-10) que degradam componentes da membrana basal como colágeno IV e V, laminina e outras proteínas como a fibronectina; as metaloproteinases tipo membrana (MT-MMP) que degradam colágeno I e III, fibronectina, laminina, entactina/nidogênio, tenascina e perlecan e ainda ativam outras MMPs (BRANTON e KOPP, 1999; GOFFIN et al., 2003).

González et al., (2002) citam que as MMPs são uma família de enzimas com características em comum: (1) existem na forma de pró-enzimas, que são biologicamente inativas, ou como enzimas ativas que tem alto grau de afinidade pelos substratos dos componentes do tecido conjuntivo, como os colágenos, elastina e proteoglicanas; (2) têm complexos mecanismos de ativação que podem envolver uma ou mais etapas, nas quais ocorre proteólise parcial ou remodelamento estrutural da pró-enzima, resultando na descoberta do seu local de ação (que contém zinco e requer cálcio para a sua função catalizadora); e (3) são sujeitas à inativação por complexos inibidores, sendo os TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases) seus principais inibidores, considerados específicos para esse tipo de enzima.

Porto et al., (2006) afirmaram que existem evidências de que a MMP-2 e a MMP-9 participem do processo fibrótico que ocorre na endometrite crônica das éguas. Walter et al., (2001) avaliaram a expressão de MMP-2 na fibrose periglandular das éguas e verificaram que a expressão desta enzima estava associada com a dilatação e fibrose glandular. Quanto à distribuição no endométrio, estes autores observaram que a MMP-2 estava localizada no estrato compacto no endométrio de éguas saudáveis e com endometrose. Os autores sugerem que a MMP-2 tenha um papel importante nas alterações da homeostase da matriz extracelular em regiões de fibrose endometrial.

A produção de MMPs está relacionada com determinados tipos celulares que estão presentes nos processos fibróticos em diversos órgãos.

Arthur (2000) observou estudando a fibrose hepática que as células estreladas hepáticas quando ativadas exibem fenótipo de miofibroblastos e secretam pro-MMP-2. A indução deste processo se dá pela presença de colágeno do tipo I, que predomina no fígado fibrótico.

A cicatrização é um fenômeno complexo que restabelece a integridade morfológica e funcional de qualquer tecido ou órgão lesado. A reconstituição consiste numa perfeita e ordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a recomposição do tecido (MARTIN e LEIBOVICH, 2005).

Os fibroblastos são as principais células envolvidas na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Os fibroblastos são estimulados a

produzir e a depositar componentes da matriz extracelular e, na pele, esses eventos são necessários para permitir e promover a reepitelização (AMADEU et al., 2003). Eles são suscetíveis a alterações devido às forças mecânicas as quais são submetidos durante situações patológicas ou fisiológicas e, assim, organizam as fibras colágenas e estão diretamente relacionados à formação do tecido de granulação. Além de produzirem colágeno, os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico da célula (HILDEBRAND et al., 2005).

Fibroblastos são células mesenquimais encontradas no estroma de variados tecidos. No pulmão adulto normal, podem ser encontradas na adventícia de estruturas vasculares e vias aéreas. Apresentam morfologia fusiforme e expressam colágeno intersticial (tipos I e III), mas não expressam marcadores de outras células diferenciadas.

Durante a formação do tecido de granulação, fibroblastos e células endoteliais se movem para o interior da ferida, produzindo matriz extracelular e angiogênese (SINGER e CLARK, 1999). Muitos destes fibroblastos adquirem alguns aspectos morfológicos e bioquímicos de células musculares lisas, sendo denominados miofibroblastos (DESMOULIE`RE e GABBIANI, 1996). Os miofibroblastos participam na síntese da matriz extracelular e na produção de força mecânica, com influência na reorganização da matriz e na contração da ferida (TOMASEK et al., 2002). Segundo Gabbiani (2003), sua atividade contrátil é responsável pelo fechamento das feridas após as lesões.

Os fibrócitos são fibroblastos inativos cuja atividade celular é o desenvolvimento da fibrose (BANKS, 1992). Eles são considerados importantes no processo cicatricial por participarem do mecanismo de formação dos granulomas, na atividade antigênica, na produção de colágeno e na formação de matriz protéica, e na inflamação como fonte rica de citocinas (ABE et al., 2001; QUAN, 2004). Além disso, produzem fatores de crescimento, fatores angiogênicos, contribuindo para a formação de novos vasos sanguíneos e no surgimento de desordens fibróticas (METZ, 2002; QUAN, 2004).

Durante a cicatrização, os fibrócitos podem ser recrutados do tecido adjacente não-lesado se revertendo para o estado de fibroblasto e reativando sua capacidade de síntese (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Os fibrócitos podem ser encontrados em vários tecidos, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (BUCALA et al., 1994). Eles são

derivados de precursores da medula óssea e contribuem para a presença de miofibroblastos no tecido cicatricial (MORI et al., 2005).

Durante os processos fibróticos, os fibroblastos expressam fatores de diferenciação muscular, como a actina de músculo liso- α , que conferem a estas células a capacidade de contração (SAPPINO et al., 1990). Estas células são denominadas de miofibroblastos e, morfológica e funcionalmente, parecem ser células intermediárias entre os fibroblastos e as fibras musculares lisas (GUYOT et al., 2006).

Os miofibroblastos podem ser encontrados no tecido normal de diversos órgãos, atuando na sua contração ou no seu remodelamento que ocorrem fisiologicamente (SCHURCH et al., 1998). Entretanto, também são verificados durante a cicatrização. Após a injúria tecidual e durante o desenvolvimento do processo reparativo, surge o tecido de granulação, que facilita a reposição de células no local da agressão. Este tecido se caracteriza pela proliferação de fibroblastos, angiogênese e deposição de matriz extracelular. No transcorrer deste processo os fibroblastos adquirem as características de miofibroblastos, que são o principal tipo celular envolvido na deposição de matriz extracelular durante o reparo tecidual, mas também são responsáveis pela síntese de enzimas relacionadas à degradação da matriz, ao remodelamento tecidual e à formação de cicatriz (CHAPONNIER e GABBIANI, 2004; GUYOT et al., 2006).

Os miofibroblastos são componentes importantes durante a reparação do tecido lesionado e aparecem após o término dos fenômenos inflamatórios iniciais (GABBIANI et al., 1971).

Na maioria dos órgãos, a lesão tecidual ativa fibrócitos locais que na presença dos fatores de crescimento derivados dos macrófagos se diferenciam em miofibroblastos contráteis, que são caracterizados pela expressão da α -actina de músculo liso (α -SMA) (TOMASEK et al., 2002; GABBIANI, 2003).

Segundo Shi Y (1996), quando as lesões ocorrem em locais onde não se encontram os fibrócitos, como nas paredes arteriais ou na córnea, os miofibroblastos são provenientes das células musculares lisas adjacentes ou queratinócitos, respectivamente (JESTER, 2002). Miofibroblastos também são encontrados em condições patológicas caracterizadas por fibrose e arteriosclerose assim como durante a invasão e crescimento de tumores (HEUGHAN, 1980; DE WEVER, 2002; GABBIANI, 2003). Em tecidos lesado e não lesado, a positividade destas

células para α -SMA sinalizam um remodelamento do tecido e representam ações alvos para intervenções terapêuticas (TOMASEK et al., 2002).

As lesões fibróticas, se destacam pela predominância de fibroblastos, ou de células com características morfológicas semelhantes aos fibroblastos (KATZENSTEIN et al., 1998). No entanto, devido à expressão de diferentes fatores, incluindo o colágeno tipo I, Thy-1, a α -actina de músculo liso (α -SMA), a cicloxigenase (COX)-2, a telomerase e a caveolina-1 estas células parecem ser heterogêneas, talvez representando subpopulações distintas (DERDAK et al., 1992; WANG et al., 2006).

Recentes estudos indicam a existência de subtipos distintos de fibroblastos em regiões diferentes do corpo, baseados em testes do padrão da expressão genética (CHANG et al., 2002). Este fato ressalta a presença de diferentes progenitores que poderiam gerar diferentes fenótipos durante a resposta do tecido à lesão. Em todo caso, a notável diferenciação dos subtipos dos fenótipos, pode ser importante na indução da fibrose em tecidos lesados, como acontece Fibrose Pulmonar Idiopática (FIP) (ZHANG et al., 1994). Dessa forma, os fibroblastos que expressam a α -actina de músculo liso (α -SMA), denominados de miofibroblastos, são reconhecidos como a fonte principal de colágeno tipo I e de citocinas fibrogênicas/inflamatórias nas lesões fibróticas (ZHANG et al., 1994; PHAN, 2002). A deficiência de caveolina-1 está associada com o desenvolvimento de lesões fibróticas no pulmão, enquanto que a sua expressão determina alguma proteção contra fibrose (WANG et al., 2006).

A expressão negativa de Thy-1 e caveolina-1 por fibroblastos ou células que apresentem característica morfológicas de fibroblastos, está associada com a fibrose pulmonar, no entanto estes marcadores não são expressos pelos miofibroblastos (HAGOOD et al., 2005; WANG et al., 2006), determinando seu papel no desenvolvimento da fibrose. O significado da expressão da telomerase em uma determinada subpopulação, que seja distinta dos miofibroblastos ainda não foi elucidado (NOZAKI et al., 2000; LIU et al., 2002; LIU et al., 2006). Este tipo de análise do fenótipo de fibroblastos determinou o papel fisiopatológico, destas diferentes subpopulações no processo fibrótico, sugerindo sua possível interação, como ocorre na fibrose pulmonar. Estes distintos fenótipos podem representar diferentes fases de diferenciação dos miofibroblastos resultantes de subpopulações progenitoras variadas. Em função disso, uma

rigorosa e completa análise destes subtipos ou subpopulações diferenciadas de fibroblastos, podem fornecer informações sobre a patogênese da fibrose em resposta a certos tipos de lesão pulmonar.

As subpopulações diferenciadas de fibroblastos descritas acima podem contribuir para a resposta fibrótica conforme a característica de seus respectivos fenótipos. Devido a capacidade dos miofibroblastos poderem expressar elevados níveis de citocinas, matriz extracelular e α -actina de músculo liso (α -SMA), estas células podem desempenhar funções fundamentais na inflamação e na deposição de tecido conectivo (PHAN, 2002). O aumento da sobrevivência destas células pode resultar numa expansão da população precursora, com potencial de se diferenciarem em miofibroblastos sob a influência do Fator Transformante do Crescimento (TGF)- β , que é altamente expresso em lesões fibróticas. Como alternativa, ou adicionalmente, o aumento da sobrevivência das células telomerase positivas pode contribuir para a produção de citocinas fibrogênicas ou mediadores que poderiam, então, estimular a diferenciação em miofibroblastos progenitores (WANG et al., 2006). Inversamente, a expressão reduzida da telomerase pelos fibroblastos é relatada na Fibrose Pulmonar Idiopática (FIP) em tecido pulmonar normal.

O papel anti-fibrótico da caveolina-1 é confirmado pelo aumento da sua expressão, e dessa forma suprimindo a diferenciação dos miofibroblastos, sendo que, a sua deficiência resulta em fibrose pulmonar.

A diminuição da expressão da COX-2 pelos fibroblastos também é característica na Fibrose Pulmonar Idiopática (FIP). Isto se explica pelo caso, pela ação anti-fibrótica da COX-2, via elaboração de prostanóides, que são conhecidos pela capacidade de inibir a produção de colágeno, bem como a proliferação de fibroblastos (WILBORN, 1995).

Assim a presença de três dessas características, ou seja, expressão de baixos níveis de Thy-1, Caveolina-1 ou de Cox-2 orientam sua diferenciação para um fenótipo fibrótico. Portanto, esta célula apresenta a perda de características do fenótipo antifibrótico.

A perda de propriedades anti-fibróticas sugere que, em tecidos normais, mecanismos ativos para suprimir a fibrose constitutiva, têm importância na manutenção da homeostase tecidual. Conseqüentemente, a perda ou a desregulação nestes mecanismos homeostáticos ativos teriam influência na patogênese da fibrose. A função do fibroblasto na fibrose é

elaboração da matriz extracelular e, talvez, a elaboração de citocinas e da regulação das propriedades mecânicas do tecido. Entretanto, no contexto da interferência fibroblasto-epitelial, como postulado para componentes celulares dos focos fibróticos, estudos recentes confirmam que os elementos fibroblásticos têm influência considerável sobre fenótipo epitelial (CHANG et., 2002; YAMAGUCHI et al., 2004).

Já foi demonstrado que os miofibroblastos presentes nas lesões teciduais podem determinar o recrutamento local de fibroblastos da derme circunvizinha e do tecido subcutâneo (ROSS et al., 1970). Pericitos ou células musculares lisas da parede vascular representam outra possível fonte de miofibroblastos. Durante a fibrogênese renal, foi demonstrado que fibroblastos surgem em grande número da transição epitelial-mesenquimal local. Células precursoras, denominadas fibrócitos migram na ferida e contribuem para a formação da população miofibroblástica do tecido de granulação (BUCALA et al., 1994).

A reação estromal, reconhecida em diversos tumores epiteliais, tem como um de seus componentes os miofibroblastos. Estes interagem com as células tumorais do tecido, controlando fenômenos tais como a capacidade de invasão e a angiogênese (OLASO et al., 2003; DE WEVER et al., 2004).

Estas células podem, quando estimuladas pelo TGF- β 1, ser induzidas expressarem α -SMA (ABE et al., 2001). Estudos demonstram que fibrócitos circulantes representam uma importante fonte de fibroblastos durante a cicatrização de feridas extensas, nas quais a migração para os bordos da lesão seja dificultada (YANG et al., 2002).

O miofibroblasto é responsável pelas principais características da fibrose ativa por sua capacidade em expressar elevados níveis de citocinas fibrogênicas, contribuindo para alteração das propriedades do tecido afetado. Há evidências de que a produção de colágeno pelos fibroblastos, em função do estímulo do TGF- β , seja uma consequência da diferenciação do miofibroblasto (PETROV et al., 2002). Além disso, este efeito sobre a produção de colágeno é irreversível, persistindo mesmo após a remoção do TGF- β . Isto indica que o aumento da expressão gênica da matriz seja uma característica fenotípica do miofibroblasto. Recentemente, foi relacionada à expressão da α -actina de músculo liso (α -SMA) a inibição do Fator de Crescimento do Tecido Conectivo (CTGF), que está associada com a reduzida translocação nuclear do Fator Nuclear (NF)- κ B (CHAQOUR et al., 2006). Assim a

manifestação da α -actina de músculo liso (α -SMA) expressando seu fenótipo pode ser crucial para aquisição de características do miofibroblasto totalmente diferenciado, o que pode representar um avanço importante na indução e progressão da fibrose.

Além de ser um dos principais marcadores na diferenciação do miofibroblasto e do seu papel na regulação da expressão gênica do colágeno e CTGF, a α -actina de músculo liso (α -SMA) tem importância também nas interações com sinalização dos componentes de transcrição de genes diferentes (CHAQOUR et al., 2006; WANG et al., 2005; FURUKAWA et al., 2003).

Esta interação com a sinalização de componentes e/ou fatores de transcrição pode facilitar a translocação nuclear de fatores, bem como a localização de componentes para boa sinalização. A ativação da p38 induzida por estresse sobre as células exige a presença de α -actina de músculo liso (α -SMA) (WANG et al., 2005).

A p38 é uma enzima caracterizada pela regulação de várias citocinas, sendo ativada por células do sistema imune citocinas inflamatórias e tem um importante papel na resposta imunológica (JOHNSON e LAPADAT, 2002). Similar à mediação da sinalização de TGF- β pela p38, o princípio acima mencionado da expressão de CTGF pela α -actina de músculo liso (α -SMA) é igualmente dependente da p38 (CHAQOUR et al., 2006). Estes mecanismos mediados pela p38 que promovem a diferenciação do miofibroblasto podem servir de base para os inibidores da p38, e dessa forma suprime a fibrose pulmonar em modelos experimentais em animais (MATSUOKA et al., 2002).

O efeito conhecido do TGF- β na expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) ocorre na diferenciação dos miofibroblastos sugere a importância da associação do TGF- β . Estudos *in vitro*, indicam a importância do gene Smad3 na expressão da α -actina de músculo liso (α -SMA) pelos fibroblastos do pulmão (HU et al., 2003). Por outro lado, estudos *in vivo*, mostram que a deficiência de Smad3 conduz a uma significativa redução na fibrose pulmonar (HU et al., 2007). Distintos fenótipos de fibroblastos foram recuperados a partir de tecidos submetidos à remodelação ou fibrose, com muitas propriedades que sugerem a sua contribuição para o processo fibrótico. Suas origens, as potenciais interrelações, interações e os mecanismos que deram origem a esses fenótipos foram caracterizados de forma limitada,

em uma forma compartimentada, que impede a plena compreensão do seu papel exato na patogênese das doenças fibróticas progressivas (ADAM et al., 2000).

O miofibroblasto foi identificado inicialmente por meio da microscopia eletrônica de transmissão no tecido de granulação e nas cicatrizes como um fibroblasto modificado, exibindo características de células de músculo liso, tais como agrupamentos de microfilamentos (GABBIANI et al., 1971). A partir daí a presença de miofibroblastos foi descrita sucessivamente em praticamente todos os processos fibróticos caracterizados pela retração do tecido e pela remodelação (DESMOULIE`RE et al., 2003). Pesquisas têm contribuído pra definir essas células morfologicamente, ao demonstrarem que suas estruturas contráteis são representadas por filamentos de actina, e bioquimicamente, mostrando que a atividade das fibras expressam proteínas contráteis típicas de células de músculo liso, em particular de células musculares lisas vasculares, tais como α -actina de músculo liso (α -SMA) (DARBY et al., 1990). Atualmente se admite que a diferenciação miofibroblástica dos fibroblastos tenha início no protomiofibroblasto, cujos filamentos de actina contêm somente actinas β - e α -citoplasmáticas e evoluem, mas não necessariamente sempre, para o miofibroblasto diferenciado que possui filamentos que contêm α -SMA (TOMASEK et al., 2002). Miofibroblastos podem, de acordo com situações clínicas ou experimentais, expressarem outras proteínas contráteis de células de músculo liso, tais como miosina-MS que representa o principal marcador seguro do fenótipo miofibroblástico (TOMASEK et al., 2002).

A modificação a partir de protomiofibroblastos diferenciados para os miofibroblastos têm sido relacionados com a produção pelas células inflamatórias e, possivelmente, por fibroblastos, de Fator Transformador de Crescimento β 1 (TGF- β 1) (DESMOULIE`RE et al., 1993). Mais recentemente, os mecanismos pelos quais a trombina e endotelina-1 são capazes de promover a indução do miofibroblasto têm sido investigados (BOGATKEVICH et al., 2001; SHI-WEN et al., 2004). Além disso, está sendo cada vez mais aceita a hipótese de que os fatores mecânicos desempenham um papel importante em ambas as transições (HINZ e GABBIANI, 2003).

A questão relativa à reversibilidade da diferenciação dos miofibroblastos é importante. Fibroblastos remanescentes no tecido de granulação, após a reepitelização, reverteram a um fenótipo quiescente, não contrátil e que não apresenta os microfilamentos que estiveram

presentes durante o processo cicatricial. Entretanto, esta modulação positiva e negativa do fenótipo do miofibroblasto ainda não foi claramente demonstrada *in vivo*, embora a reversão do fenótipo já tenha sido observada *in vitro*. Além disso, considera-se que os fibroblastos residuais representem uma subpopulação de células que não evoluíram até o fenótipo de miofibroblasto durante o processo de cicatrização, e assim resistem (DESMOULIE`RE et al., 2005).

Recentemente, foi demonstrada uma participação importante da α -actina de músculo liso (α -SMA) na produção de miofibroblasto *in vitro*, utilizando modelos que envolvem fibroblastos cultivados em substratos flexíveis e flutuantes utilizados em experimentos que envolvem o processo cicatricial de feridas em ratos (HINZ et al., 2001). Células expressando esta proteína, ou seja, diferenciadas em miofibroblastos, possuem uma forte atividade retrátil, em comparação aos protomiofibroblastos que apresentam ausência de qualquer outra alteração na expressão da proteína contrátil (KATOH et al., 2001; BOGATKEVICH et al., 2003).

Um dos problemas importantes que não foram solucionados no entendimento da biologia do miofibroblasto é a evolução da diferenciação e na sua persistência nos eventos patológicos que envolvem cicatrizes hipertróficas e desenvolvimento da fibrose. Nas cicatrizes hipertróficas é intensa a expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) pelos miofibroblastos, sendo que estes estão envolvidos na contratilidade da cicatriz. Uma possível hipótese é a inibição da apoptose destas células que caracteriza uma fase terminal da cicatrização da ferida (DESMOULIE`RE et al., 1995). No entanto, esta hipótese ainda não foi confirmada em situações clínicas e não existem modelos animais experimentais confiáveis de cicatrizes hipertróficas. Além disso, mesmo que os miofibroblastos sofram apoptose durante a cicatrização, pouco se conhece sobre os mecanismos que regulam este fenômeno nestas células. O ponto de partida para esta morte celular pode estar relacionada a redução da concentração de fatores tróficos locais, devido a reepitelização e depleção de células inflamatórias que ocorrem após a cicatrização de feridas. A remodelação da matriz extracelular pelas metaloproteinases (MMPs) pode também desempenhar um papel importante, interferindo na aderência do miofibroblasto à matriz extracelular como têm sido sugeridos por estudos sobre a regressão de tecido de granulação na pele (DARBY et al., 2002).

No início do reparo, o equilíbrio entre MMPs como collagenases e gelatinases e seus inibidores teciduais endógenos de metaloproteinases (TIMPs), favorece a produção da matriz extracelular. Mais tarde, na cicatriz em remodelação, é possível que esta tendência mude e favoreça a degradação da matriz. Como mencionado anteriormente, esta mudança pode ser o aumento na apoptose. Alterações no estresse físico causado pelo estiramento do tecido de granulação podem também contribuir para a perda de células pelo mecanismo apoptótico como têm sido sugerido em estudos *in vitro* sobre a estrutura do colágeno derivado dos fibroblastos (GRINNELL, 2003). A persistência de queratinócitos ativados tem sido observada na epiderme que recobre cicatrizes hipertróficas, o que implica em interações epidérmico-mesenquimais anormais, sugerindo que os mecanismos celulares envolvidos na patogênese das cicatrizes hipertróficas sejam mais complexos do que fenômenos cutâneos isolados (MACHESNEY et al., 1998). Contudo, recentemente respostas diferentes a indutores apoptóticos foram observadas entre a pele normal ferida e miofibroblastos de cicatrizes hipertróficas, confirmando a hipótese de defeitos no mecanismo de apoptose e de crescimento durante a formação da cicatriz patológica, impedindo o desaparecimento do miofibroblasto no final do processo de cicatrização (MOULIN et al., 2004).

O processo adequado de reparação do tecido conjuntivo, num determinado órgão exige a adequada reconstituição da sua função. Miofibroblastos expressando α -actina de músculo liso (α -SMA) não só promovem a contração, mas também sintetizam níveis elevados de proteases degradantes da matriz extracelular. Os estudos sobre miofibroblastos sugerem essa possibilidade para os tecidos adultos e indicam novos mecanismos possíveis para esta ação. As interações entre miofibroblastos e a matriz extracelular desempenham um papel importante nas propriedades mecânicas do tecido e, a persistência de miofibroblastos na lesão leva à fibrose cicatricial excessiva com comprometimento funcional do órgão afetado (HINZ & GABBIANI, 2003). Curiosamente, foi demonstrado que em alguns processos que levam a cirrose hepática anteriormente considerados como processos irreversíveis, podem ser remodelados com a diminuição da expressão do colágeno tipo I e TIMP, a ativação das MMPs e a apoptose de miofibroblastos (ISSA et al., 2004).

No fígado, como em muitos órgãos, diferentes subpopulações de células fibroblásticas podem adquirir o fenótipo miofibroblástico (por exemplo, células hepáticas estreladas –

células de Ito - e fibroblastos portais). Dessa forma, supõe-se que nestas diferentes populações, os mecanismos que conduzem a expressão da α -SMA e a persistência em situações patológicas sejam diferentes. Dentre as células capazes de expressarem α -SMA, podemos distinguir células fibroblásticas e células “pericyte-like”. Estas últimas podem modular a expressão de α -SMA em resposta a alterações da pressão arterial. No entanto, ambas as populações podem ser envolvidas em processos fibróticos. É importante ressaltar que, nos diferentes órgãos os fibroblastos representam uma população heterogênea de células definidas de acordo com sua localização no órgão (KOUMAS et al., 2003; SORRELL e CAPLAN, 2004). Entre essas populações, diferenças fenotípicas são óbvias, como exemplo, a síntese de matriz extracelular e remodelação, a produção de fatores de crescimento e citocinas, e de envolvimento em processos de reparação de tecido. Esta distinção entre subtipos de fibroblastos tem importantes conseqüências no tecido normal ou na formação excessiva de cicatriz.

Recentes pesquisas relacionadas à plasticidade em células-tronco têm indicado a possibilidade de que células mesenquimais possam surgir a partir de células progenitoras na medula óssea ou de células-tronco adultas da medula óssea, o que já foi relatado para células epiteliais e outros tipos de células diferenciadas. No caso do pulmão, as células-tronco mesenquimais derivadas da medula, possuem ação protetora contra a fibrose (ORTIZ et al., 2007). No entanto, outros estudos têm revelado que fibroblastos ou “fibroblast-like cells” obtidas a partir da medula óssea parecem promover a fibrose neste órgão (LAMA e PHAN, 2006). Estudos utilizando células da medula óssea de ratos para detectar a migração de progenitores de medula óssea, indicam infiltração de “fibroblast-like cells” em tecidos em remodelação (HASHIMOTO et al., 2004; KISSELEVA et al., 2006). Esta conclusão é coerente com a presença de fibroblastos derivados de fibrócitos circulantes detectados em estudos em modelos animais (ABE et al., 2002; PHILLIPS et al., 2004). No entanto, existem dúvidas no que diz respeito ao fenótipo de células “fibroblast-like”, a célula que é recrutada na fibrose pulmonar. Alguns estudos utilizando marcadores de fibrócitos (CD34, CD45 e colágeno I) determinam uma fonte significativa de miofibroblastos em pulmões fibróticos (SCHMIDT et al., 2003; PHILLIPS et al., 2004). A presença de fibroblastos no tecido como uma fonte de miofibroblastos foi bem documentada em tecidos, primeiramente por estudos

destas células em cultivo de tecido, no qual a diferenciação em miofibroblasto pode ser induzida pelo tratamento com TGF- β e outras citocinas. Isto implica na presença no pulmão de células progenitoras do miofibroblasto normal ou de células pluripotentes mesenquimais progenitoras, ou mesmo de células epiteliais e de transição endotelial-mesenquimal (ZHANG et al., 1994; IWANO et al., 2002; FRID et al., 2002; HINZ et al., 2007; LAMA et al., 2007). A real contribuição destes mecanismos para a população total de miofibroblastos permanece incerta, especialmente *in vivo*.

No que diz respeito ao endométrio eqüino, os fibroblastos que circundam as glândulas uterinas fibróticas nas endometroses mostram forte imunoreatividade para actina de músculo liso- α . Mais ainda, glândulas císticas são circundadas por uma camada de células positivas para esta proteína (WALTER et al., 2001). Coincidentemente, o epitélio glandular do útero fibrótico expressa MMP-2 com maior intensidade, principalmente nas estruturas denominadas de ninhos fibróticos (NUNES, 2006; PORTO, 2006).

Segundo Czernobilsky et al., (1993), a reação fibrótica periglandular endometrial seria um mecanismo de remodelamento tecidual para que a estrutura glandular suportasse a retenção de secreções. Na endometrose, glândulas dilatadas e repletas de secreção e restos celulares são observadas com frequência no endométrio eqüino, assim como glândulas não dilatadas que mostram acentuada reação fibrótica (EVANS et al., 1998). Em ambas as situações estão presentes, em meio ao tecido fibrótico, células positivas para actina de músculo liso- α (WALTER et al., 2001). Desta forma, no processo de endometrose, a função destas células permanece uma incógnita. Por outro lado, não existem dados sobre a presença ou não de células positivas para actina de músculo liso- α nas endometrites infiltrativas. Não está claro também, a partir de qual estágio da lesão estas células passam a ser observadas e, no caso das endometrites infiltrativas, qual a sua localização preferencial.

A análise histopatológica das lesões crônicas endometriais fornece informações sobre o estado funcional da mucosa uterina e a evolução do processo inflamatório. Por outro lado, sendo a fibrose um dos elementos principais da reação tecidual, a determinação do seu arranjo, localização e composição auxiliam na identificação do grau de comprometimento do endométrio e das chances de regressão da lesão já estabelecida. 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. Estudos sobre a expressão das metaloproteinases e dos tipos celulares, como os miofibroblastos, envolvidos no processo fibrótico endometrial poderão auxiliar no entendimento deste processo, pois tais elementos participam ativamente do remodelamento tecidual. A compreensão da inter-relação destes fatores contribuirá para o esclarecimento da patogênese das endometrites crônicas e das endometroses nas éguas, além de fornecer dados que possibilitarão o surgimento de novas linhas na terapêutica anti-fibrótica.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve objetivos:

- Detectar a presença de miofibroblastos no endométrio de éguas normais e portadoras de endometrite crônica, estabelecendo sua frequência e localização.
- Determinar o tipo de colágeno predominante nas lesões fibróticas endometriais e relacionar a presença de miofibroblastos.
- Determinar a expressão de MMP-2 pelo endométrio eqüino e relacionar com a presença de miofibroblastos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PROCEDÊNCIA DO MATERIAL

No presente estudo foram utilizadas 60 biópsias endometriais. O material foi proveniente dos Serviços de Patologia Veterinária e do Serviço de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu – SP, bem como de Clínicas Privadas e Profissionais Autônomos. Os dados foram obtidos através dos Livros de Registros de biópsias e dos arquivos de relatórios histopatológicos. Posteriormente, as lâminas correspondentes a cada caso foram novamente analisadas para a confirmação do diagnóstico de endometrite crônica.

4.2. PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO

As biópsias uterinas foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas. Após esse período foram lavadas em água corrente e transferidas para a solução de álcool a 70%. Em seguida, foi realizado procedimento de rotina para inclusão em parafina. Desse material, associado ao proveniente do arquivo do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu, foram confeccionados cortes com três micrômetros de espessura em micrótomo rotativo. Os cortes corados pelo método de Hematoxilina-Eosina de acordo, com Luna (1968), para posterior análise e classificação histológica das endometrites crônicas. Foram empregadas colorações específicas para tecido conjuntivo como o Tricrômico de Masson e o Picrosirius Red para avaliação da fibrose endometrial. Cortes do mesmo material foram submetidos aos procedimentos imunoistoquímicos.

4.2.1. TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

4.2.1.1. MÉTODO DE 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. Para a padronização desta técnica foram utilizados fragmentos de endométrio equino, colhidos durante exame necroscópico, com diagnóstico de endometrite crônica. Os fragmentos de endométrio foram processados da mesma maneira que as biópsias uterinas, ou seja, fixados em solução de Bouin a 10% por 24 horas e, em seguida, colocados em solução de álcool a 70%. Após o processamento histológico e a inclusão em parafina, os cortes foram feitos com cinco micrômetros de espessura.

As lâminas foram submetidas ao processamento de rotina de desparafinização e hidratação e em seguida, colocadas em solução de Bouin à 60⁰ C, em estufa, por uma hora. Após o resfriamento à temperatura ambiente, foram lavadas em água corrente por um minuto e passadas rapidamente em água destilada. Após esta etapa, as lâminas foram colocadas em suporte de coloração e os corantes foram aplicados na seguinte ordem:

- Hematoxilina de Weigth por cinco minutos, lavagem em água corrente por cinco minutos, seguida de lavagem em água destilada;
- Fuccina Ácida adicionada de Ponceau por dez minutos, lavagem em água corrente por um minuto, seguida de lavagem em água destilada;
- Ácido fosfomolibdico a 5% por cinco minutos até o clareamento dos cortes e lavagem em água corrente e água destilada rapidamente;
- Azul de anilina a 2,5% por oito minutos, lavagem em água corrente e água destilada rapidamente e Ácido acético por um minuto.

Após a passagem pelos corantes, as lâminas foram submetidas aos processos de desidratação e montagem.

4.2.1.2. MÉTODO DE PICROSIRIUS RED

A utilização desta técnica, descrita por Junqueira et al., (1978), seguiu o roteiro da Apostila de Técnicas de Colorações Específicas do Departamento de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UNESP. Para a padronização do método, foram utilizados fragmentos de endométrio equino que apresentavam alteração fibrótica significativa, colhidos de animais encaminhados para necropsia no Serviço de Patologia Veterinária. Os fragmentos, com cinco micrômetros de espessura foram processados da mesma maneira que as biópsias uterinas, conforme descrito anteriormente.

As lâminas foram submetidas aos processos de desparafinização e hidratação e em seguida processadas da seguinte maneira:

- Imersão em solução de ácido fosfomolibdico a 0,2% por dois minutos e em seguida lavagem em água corrente e água destilada;
- Imersão em uma solução a 0,1% de Direct Red (Direct Red 36554-8, Sigma Chemica CO., St. Louis MO., E.U.A.) dissolvido em ácido pícrico a 1,5% (aquoso saturado) durante 110 minutos;
- Imersão em solução de ácido clorídrico a 0,1N por dois minutos.

Após estas etapas, o material foi lavado em solução de álcool a 70% durante 45 segundos e submetido aos processos de desidratação e montagem em resina sintética.

Para a verificação do padrão de qualidade da coloração e a confirmação da refringência das fibras colágenas, as lâminas foram observadas no microscópio de luz polarizada (campo escuro), modelo Axio Imager A1, ZEISS, equipado com o programa de análise de imagem Axio Vision 4.3.

4.2.2. TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA

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

Para a padronização desta técnica foram utilizados fragmentos de endométrio eqüino, fixados em solução de Bouin a 10% por 24 horas e, em seguida, colocados em solução de álcool a 70%. Após esta etapa, o material foi submetido aos procedimentos de rotina para inclusão em parafina e corte em micrótomo rotativo.

4.2.2.1. ANTICORPOS UTILIZADOS PARA A PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO

Os anticorpos primários utilizados neste trabalho foram:

MMP-2 (cód. RDI-MMP2abm-5D, Clone 42-5D11) – Anticorpo monoclonal humano que se liga às formas latente e ativa da enzima MMP-2 (Research Diagnostics, Inc).

α -SMA (cód. M0851, Clone 1A4) – Anticorpo monoclonal que se liga aos miofibroblastos (Dako).

4.2.2.2. DILUIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS ANTICORPOS

Cada anticorpo foi diluído em solução a 1% de albumina sérica bovina em solução tampão de TRIS (TRIZMA base, D5637 Sigma Chemical CO, St. Louis, E.U.A.). As concentrações testadas foram:

MMP-2 = 1:100

α -SMA = 1:1250

4.2.2.3 ROTEIRO DE APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

- **PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS**

Cortes de três μm das biópsias uterinas foram colocados em lâminas histológicas, previamente tratadas com solução de Poli-L-Lisina (P8920- Sigma), desparafinizados e hidratados.

- **OBTENÇÃO DOS CORTES HISTOLÓGICOS**

Cortes histológicos com três micrômetros de espessura foram feitos em micrótomo rotativo e, as lâminas, em seguida, foram colocadas em estufa a 60°C por 24 horas, para que houvesse boa adesão do tecido à lâmina.

Após este procedimento, as lâminas foram submetidas aos processos de desparafinização e hidratação, conforme já descrito anteriormente.

- **BLOQUEIO DA PEROXIDASE ENDÓGENA**

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito como solução de partes iguais, água oxigenada a 30% (30 volumes) diluída em metanol na proporção 1:9, por 15 minutos.

❖ MMP-2

- **RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA**

Para este anticorpo foi utilizada a irradiação por microondas a 750 watts (potência máxima), em solução de ácido cítrico a 10mM, pH 6,0

- **REAÇÃO UTILIZANDO O COMPLEXO AVIDINA-BIOTINA (ABC) / ESTREPTAVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASE, DE ACORDO COM HSU *et al.* (1981)**

MATERIAL E MÉTODOS

Foi empregado o método com o anticorpo secundário anti-mouse (BA2000-VECTOR) e o kit ABC (PK6100 – VECTOR). As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários em câmara úmida, por 18 horas a 4⁰C, lavadas em solução de TRIS pH 7,5 (Trizma Base Reagent Grade – T1503) e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse (BA2000 – VECTOR), à temperatura ambiente por uma hora. O kit ABC foi preparado 30 minutos antes do término da reação com o anticorpo secundário. Após a reação com o anticorpo secundário o material foi lavado com TRIS pH 7,5 e as lâminas incubadas com o kit ABC à temperatura ambiente por 30 minutos.

- **REVELAÇÃO**

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 35 segundos.

- ❖ **α –SMA**

- **RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA**

Para este anticorpo foi utilizado o calor úmido em Pascal (Dako, S2800-1), a 125° C durante 30 segundos com Citrato a 10mM, pH – 6,0.

- **BLOQUEIO DE PROTEÍNA INESPECÍFICA**

Em seguida, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com leite desnatado 3% em TRIS 10mM, pH 7,5.

- **REAÇÃO UTILIZANDO O SISTEMA DE VISUALIZAÇÃO NOVOLINKTM MAX POLYMER DETECTION SYSTEMS, RE7260-K - NOVOCASTRA (1250 TESTES).**

Conforme a orientação do fabricante, o Sistema de visualização, NovolinkTM Max Polymer Detection Systems, RE7260-K (1250 testes). Foram aplicados 100µL do reagente Post Primary Block nas lâminas e, em seguida, estas foram incubadas durante 30 minutos. As lâminas foram lavadas em TRIS três vezes por 5 minutos. Foram aplicados 100µL do reagente Max Polymer, em seguida, foram incubadas durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em TRIS três vezes por 5 minutos.

- **REVELAÇÃO**

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 35 segundos.

4.3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

4.3.1. APLICAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DAS ENDOMETRITES CRÔNICAS EM ÉGUAS

Para cada caso, o tipo histológico foi sendo caracterizado segundo a classificação proposta por Kenney e Doig (1986) para as endometrites crônicas, e as definições de endometrite crônica degenerativa (endometrose) e infiltrativa, descritas por Ricketts e Alonso (1991). Para o estudo dos processos fibróticos foram utilizadas as amostras classificadas como endometrite crônica categoria I, IIA, IIB e III. As biópsias classificadas como categoria I serviram de parâmetro para comparação.

As Tabelas 1 e 2 descrevem as classificações de Kenney e Doig (1986) e Ricketts e Alonso (1991), respectivamente.

QUADRO 1. Classificação histopatológica das biópsias endometriais das éguas segundo Kenney e 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 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		Éguas com atrofia endometrial severa na estação de monta

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

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	CARACTERÍSTICAS
Égua normal	Endométrio não é atrófico ou hipoplásico e as alterações fibróticas e inflamatórias são ausentes ou, quando aparecem são discretas e esparsas.
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.

4.3.2. AVALIAÇÃO DO COLÁGENO

As lâminas coradas com 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.

Foi realizada análise qualitativa do colágeno total em todas as amostras. Nesta análise foi realizada uma avaliação detalhada da distribuição do colágeno, determinando-se as estruturas de sua maior concentração no endométrio. As estruturas consideradas foram: espaço subepitelial, estratos compacto e esponjoso e regiões periglandulares e perivasculares. Ainda foi observado o padrão de distribuição, difuso ou localizado.

Na análise do tipo de colágeno presente nas amostras foi feita uma avaliação com base na refringência das fibras sob polarização de luz: as fibras espessas e de coloração amarelada a avermelhada foram classificadas como colágeno tipo I e as fibrilas delgadas e de coloração esverdeada, como de colágeno tipo III. Quando não foi possível determinar a predominância de um dos tipos, considerou-se que havia os dois tipos de colágeno na mesma amostra.

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

Cortes de parafina corados com Picrosirius Red foram avaliados pelo uso do programa computacional Axiovision Software Rel. versão 4.3 (Zeiss Vision, Alemanha). A observação do percentual de fibrose endometrial será feita de acordo com a descrição de Nunes (2003).

Para a diferenciação dos tipos de colágeno presente nas endometroses e endometrites crônicas infiltrativas a análise foi qualitativa.

4.3.3. 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.

A reação imunoistoquímica do miofibroblasto foi estimada conforme o grau estabelecido – negativo, fraco ou acentuado.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A expressão de MMP-2 encontrada nas diferentes categorias de endometrite foi avaliada por meio do teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis (Zar, 1996), adotando-se o nível de 5% de significância. Das demais variáveis foram feitas análises percentuais descritivas.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

5.1.1. CLASSIFICAÇÃO DAS ENDOMETRITES CRÔNICAS

Após a classificação histológica das 60 biópsias de acordo com a descrição de Kenney e Doig (1986), 15 animais foram incluídos na categoria I (25%), 15 na categoria IIA (25%), 15 na categoria IIB (25%) e 15 na categoria III (25%). Os resultados da classificação histológica das 60 amostras de acordo com a descrição de Ricketts e Alonso (1991) demonstraram que 15 dos animais apresentavam endométrio normal (25%), 20 apresentaram endometrite crônica infiltrativa (33,4%) e 25 animais apresentaram endometrite crônica degenerativa (41,6%).

Os resultados da classificação histológica dos 60 casos de endometrites estão apresentados na tabela 1, quando classificados de acordo com Kenney e Doig (1986). Na tabela 2 são apresentados os casos quando classificados conforme Ricketts e Alonso (1991). As Figuras 1, 2, 3 e 4 ilustram a classificação empregada segundo Kenney e Doig (1986). As Figuras 5 e 6 ilustram a classificação empregada segundo Ricketts e Alonso (1991).

Tabela 1. Classificação das endometrites crônicas de acordo como Kenney e Doig (1986).

Endometrite Crônica	Número de Casos	Percentual
Categoria I	15	25
Categoria IIA	15	25
Categoria IIB	15	25
Categoria III	15	25
Total	60	100

Tabela 2. Classificação das endometrites crônicas de acordo como Ricketts & Alonso (1991).

Endometrite Crônica	Número de Casos	Percentual
Endométrio hígido	15	25
Infiltrativa	20	33,4
Degenerativa	25	41,6
Total	60	100

Nas duas classificações, os endométrios sem alterações são os mesmos, representados pela categoria I segundo Kenney e Doig (1986) e o grupo hígido de Ricketts e Alonso (1991).

Histopatologicamente, os endométrios saudáveis se caracterizaram 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 em três casos (20%) e intersticial de forma discreta e focal em dois casos (13,3%).

As biópsias classificadas como IIA demonstraram epitélio luminal cilíndrico e eventualmente epitélio pseudoestratificado. Fibrose periglandular discreta foi encontrada em 26,6% dos casos e foi definida pela deposição discreta de colágeno e média de quatro ninhos fibróticos por campo. Fibrose perivascular (6,7%) e fibrose periglandular (6,7%) foram discretamente observadas nos endométrios. Lacunas linfáticas (46,7%) e dilatação das glândulas endometriais (6,7%) também foram visualizadas. O infiltrado inflamatório polimorfonuclear foi encontrado em 26,7% das amostras, sendo que se apresentavam distribuídos difusamente no tecido.

As biópsias classificadas como IIB apresentaram epitélio luminal cilíndrico e eventualmente 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 cinco 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, concomitantemente. O infiltrado inflamatório foi encontrado em 88,8% dos casos, sendo distribuído principalmente de forma difusa e constituído predominantemente por mononucleares.

Na categoria III 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, principalmente na região periglandular. Nesta região, a fibrose caracterizou-se pela deposição acentuada de colágeno (mais de cinco camadas) e quantidade acentuada de ninhos fibróticos (mais de dez ninhos por campo). 61,3% dos casos demonstraram fibrose perivascular e 57,1% apresentaram fibrose intersticial. 81,6% das biópsias apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear, sendo que desses casos, 40% das biópsias apresentaram distribuição difusa, com intensidade moderada ou acentuada.

As amostras classificadas como endometrite crônica infiltrativa apresentaram epitélio luminal cilíndrico com áreas de epitélio pseudoestratificado. O infiltrado inflamatório apresentou distribuição predominantemente difusa, mas em 34% amostras mostrava-se focal. O grau de intensidade do infiltrado nesta categoria variou de moderado a severo. A fibrose periglandular caracterizou-se por deposição moderada e severa de colágeno, em 48% e 42% dos casos, respectivamente, levando frequentemente 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 o tipo de epitélio luminal mais frequentemente observado foi similar ao das endometrites infiltrativas. A fibrose intersticial, principalmente 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, moderada (35,3%) ou severa (58,8%).

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

As alterações histopatológicas encontradas nas diferentes categorias de endometrites crônicas estão ilustradas nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

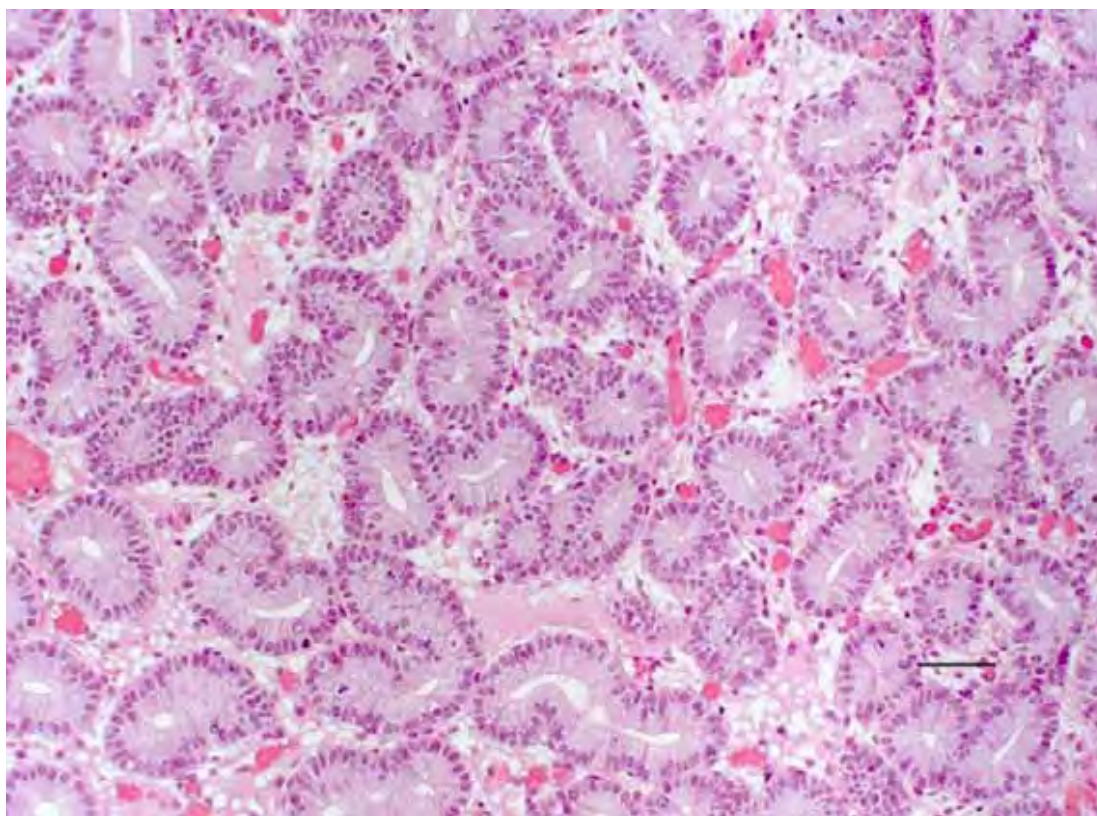


FIGURA 1 – Endométrio eqüino. Categoria I. Ausência de alterações inflamatórias e fibróticas. Alta densidade glandular no estrato esponjoso Hematoxilina Eosina. Barra:50µm

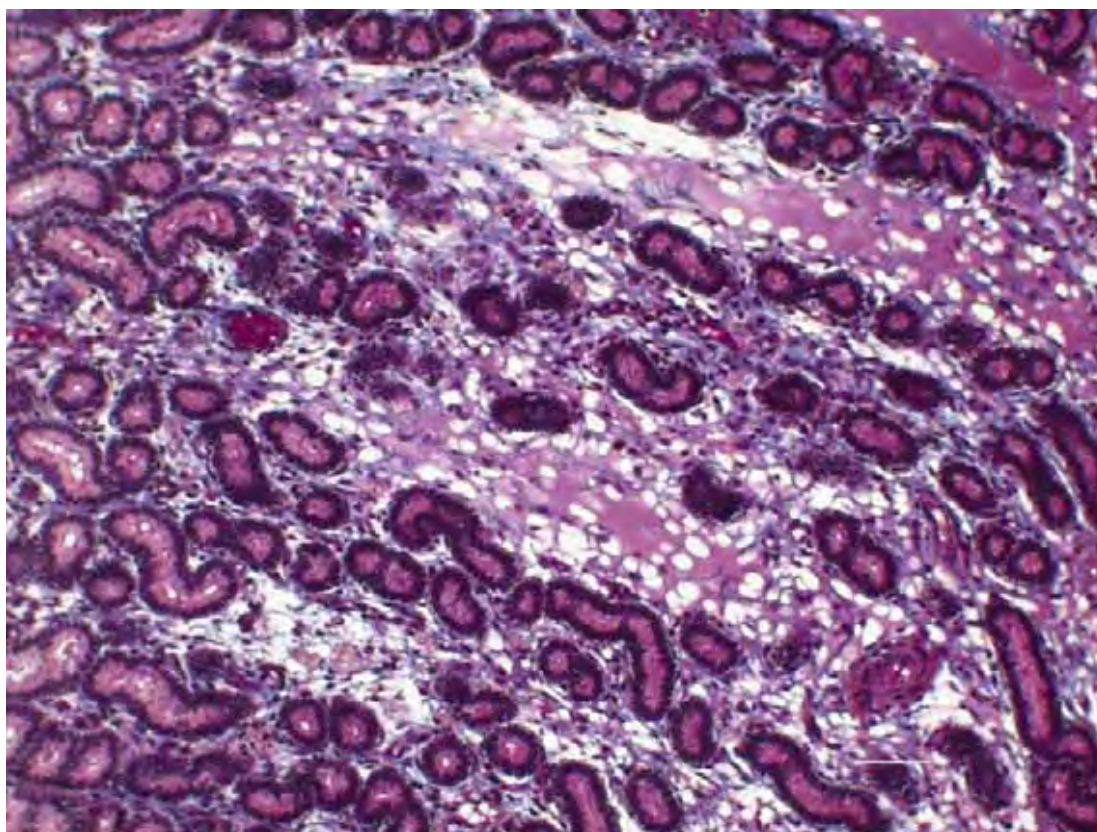


FIGURA 2 – Endométrio eqüino. Categoria I. Distribuição normal do colágeno. Tricrômico de Masson. Barra:50µm

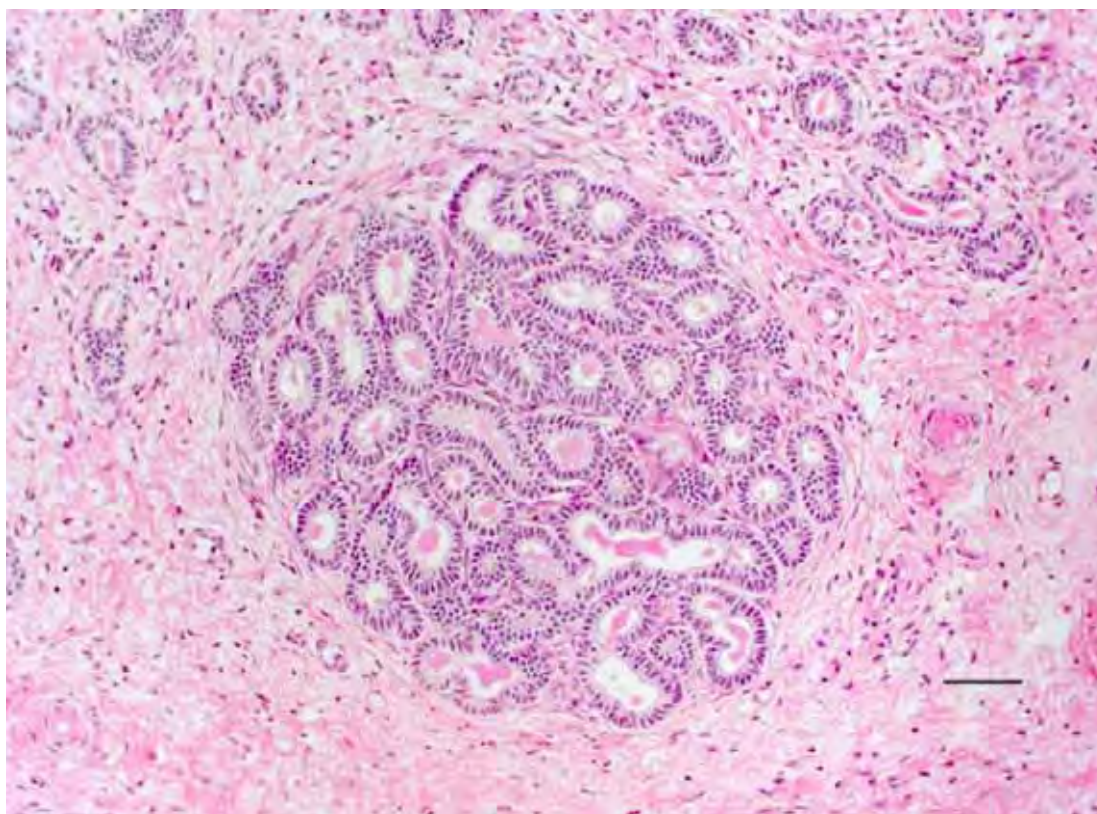


FIGURA 3 – Endométrio eqüino. Categoria III. Fibrose periglandular intensa formando ninho fibrótico. Hematoxilina Eosina. Barra: 50µm

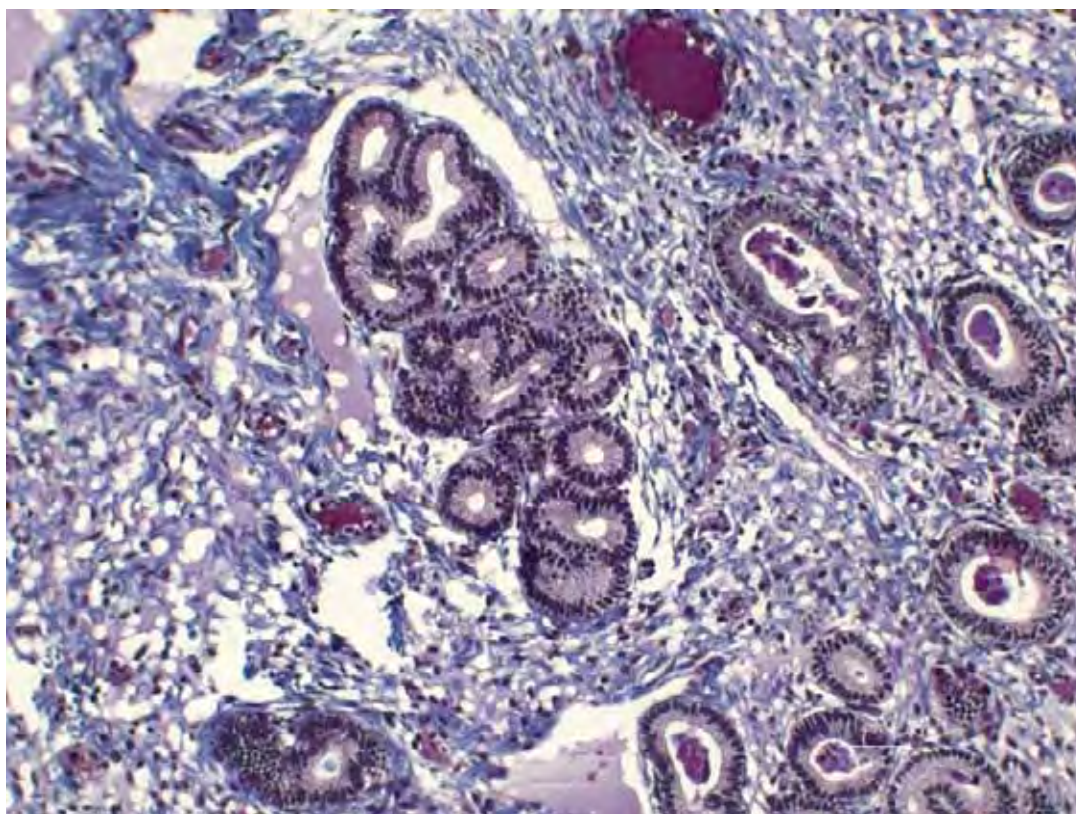


FIGURA 4 – Endométrio equino. Categoria III. Fibrose periglandular intensa, ninhos fibróticos. Tricrômico de Masson. Barra: 50µm

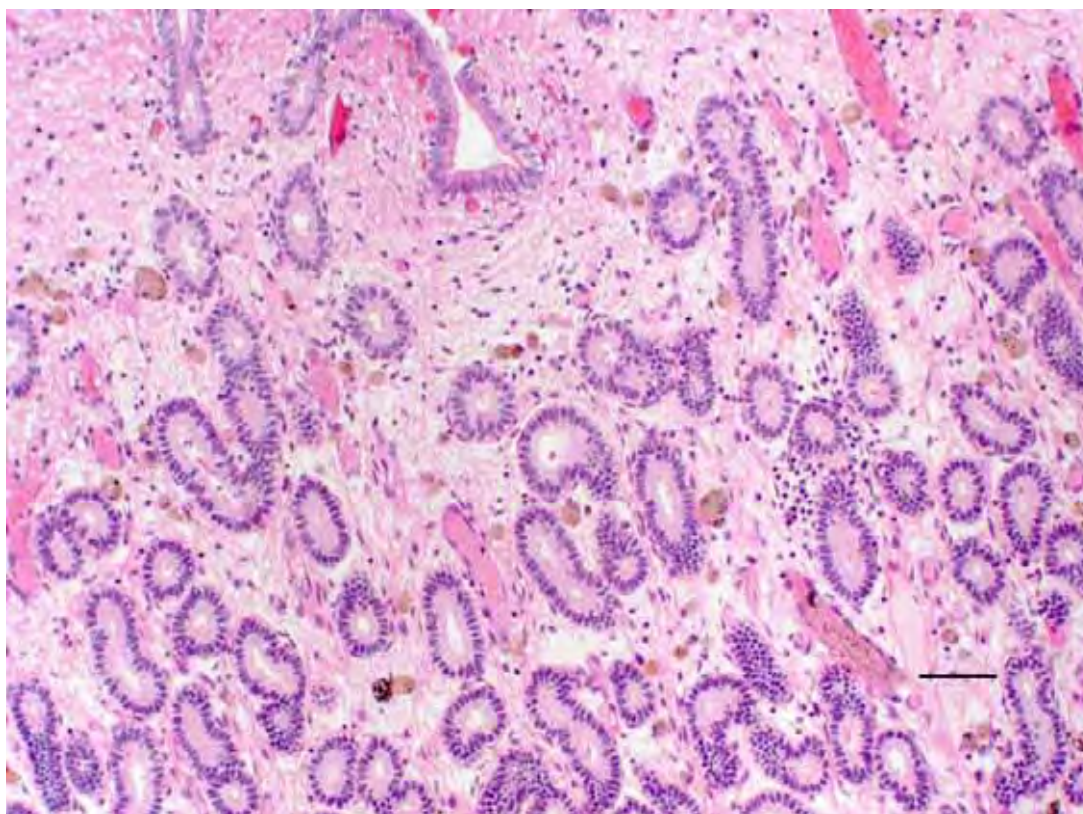


FIGURA 5 – Endometrite crônica infiltrativa. Infiltrado inflamatório moderado focal periglandular e discreto no estrato esponjoso. Hematoxilina Eosina. Barra: 50µm

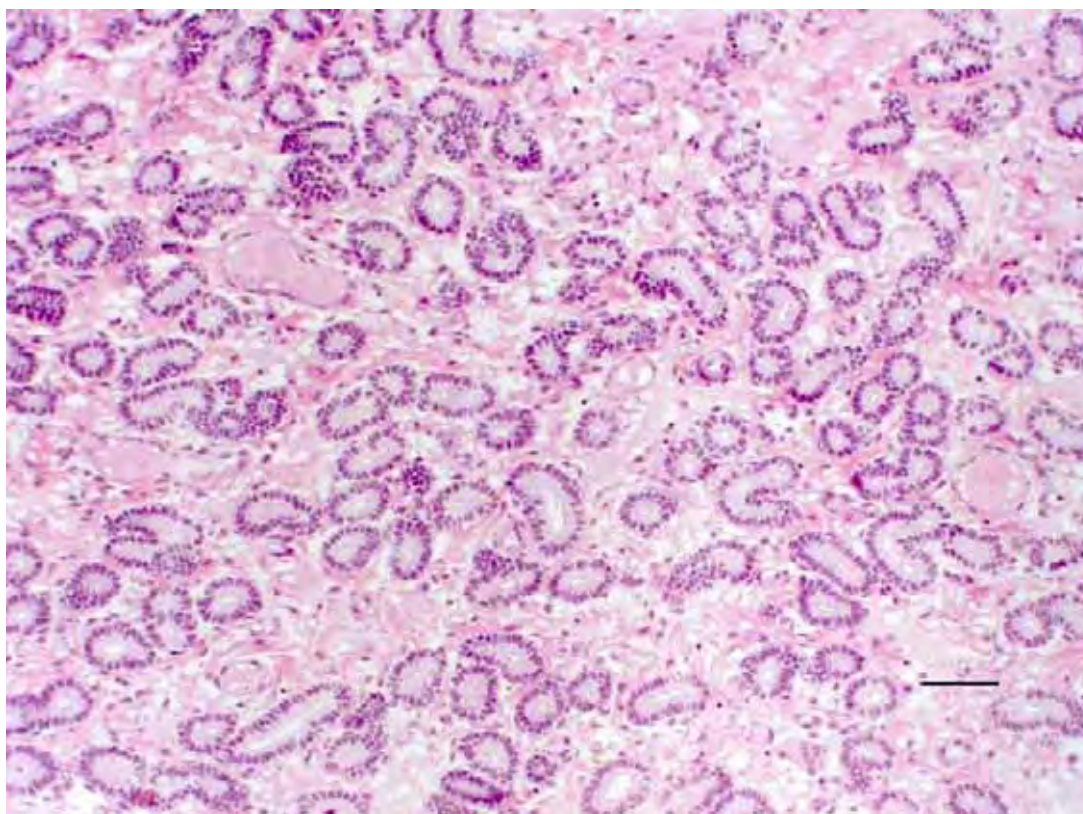


FIGURA 6 – Endométrio eqüino com endometrose. Alterações degenerativas difusas: fibrose intersticial moderada, glândulas endometriais atróficas. Hematoxilina Eosina. Barra: 50µm

5.1.2.. PICROSIRIUS RED – POLARIZAÇÃO

Nas amostras de endométrios saudáveis (Figura 7), 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.

Na categoria IIA, os estratos compacto e esponjoso, assim como a região periglandular, apresentaram a deposição de colágeno discreta em 13%, 86,6% e 40% das amostras, respectivamente, e na região perivascular ocorreu de forma moderada (20%). Todas as regiões avaliadas demonstraram predominância do colágeno tipo I.

Na categoria IIB de Kenney e 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 incidiu 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 8) 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%).

Quando aplicada a classificação de Ricketts e Alonso (1991), nas endometrites crônicas infiltrativas, 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 preponderância do colágeno I em todas as regiões estudadas.

Nas endometroses 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, principalmente as biópsias que apresentaram fibrose intersticial acentuada.

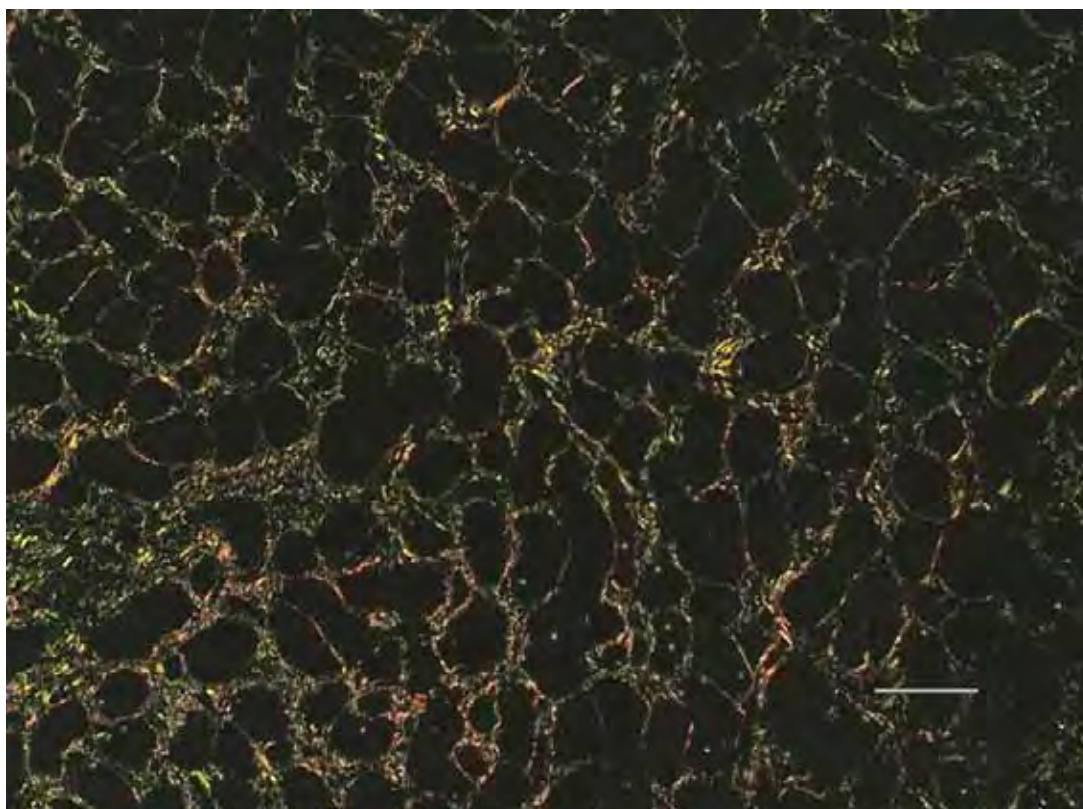


FIGURA 7 – Endométrio eqüino. Categoria I. Distribuição reticular do colágeno do tipo III (verde) e presença do colágeno do tipo I (amarelo) em menor proporção. Picosirius Red - Polarização Barra: 500µm

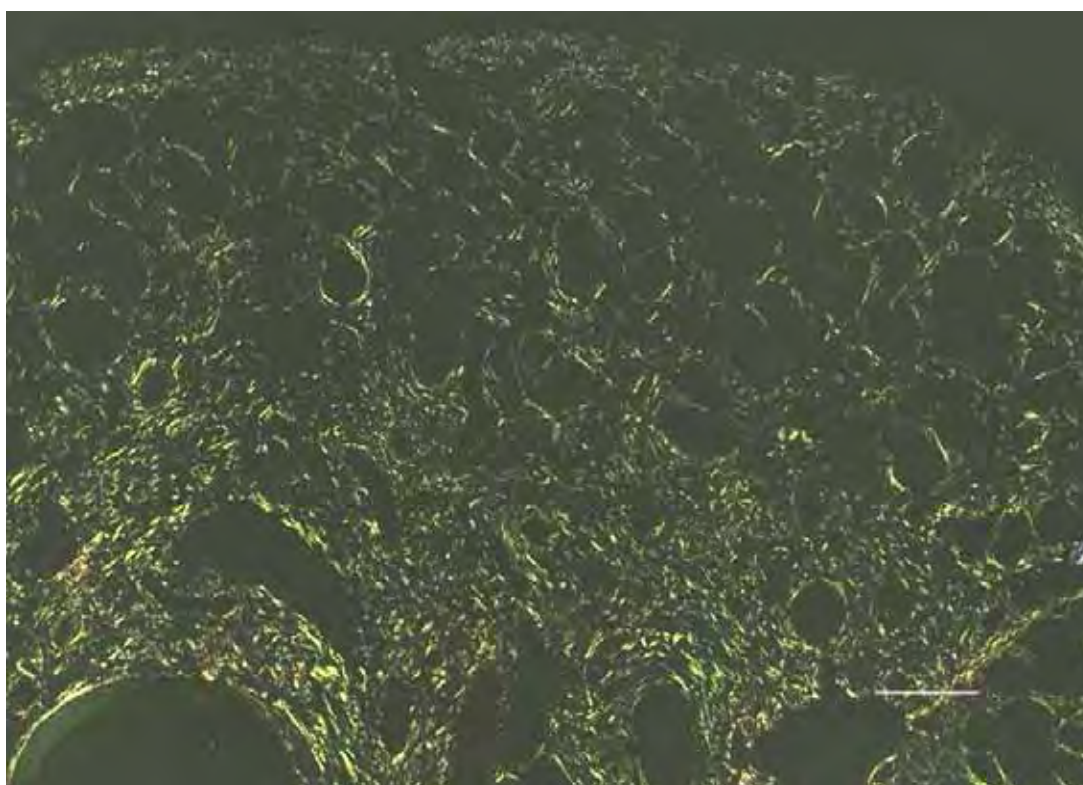


FIGURA 8 – Endométrio eqüino. Categoria III. Colágeno do tipo I (amarelo) e tipo III (verde) na fibrose periglandular. Picosirius Red - Polarização Barra: 500µm

5.2. AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

5.2.1. METALOPROTEINASE 2 (MMP-2)

Foi observada em 88,7% das amostras de endométrio eqüino a expressão de MMP-2.

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

Nos endométrios categoria I, 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 nos endométrios saudáveis, mas houve diferença significativa entre o grau de intensidade da expressão nessas estruturas e o do epitélio luminal, as células endoteliais e das células inflamatórias. As estruturas mais comumente 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 IIA, as estruturas marcadas com maior frequência no endométrio foram as células estromais e o epitélio glandular, em 86% dos casos. Em seguida, a região da parede vascular apresentando 33% da marcação nas biópsias. O epitélio luminal apresentou marcação variando de difusa a focal, podendo ser visualizada na região apical ou intracitoplasmática.

Foi observada a marcação de células estromais individualizadas distribuídas de maneira difusa nos estratos compacto e esponjoso. A análise estatística demonstrou não haver diferença significativa na intensidade da expressão da MMP-2 entre o epitélio glandular, o estrato esponjoso e o estrato compacto, mas houve diferença significativamente maior entre o grau de intensidade da expressão dessas estruturas com a parede vascular e as células inflamatórias. Sendo que as células estromais apresentaram valores intermediários. O epitélio

luminal apresentou diferença significativa em relação às outras estruturas no grau de intensidade da expressão de MMP-2.

Marcação mais intensa ocorreu nas células estromais na categoria IIB (Figura 9). A análise estatística demonstrou não haver diferença significativa na intensidade da expressão da MMP-2 entre o epitélio glandular, parede vascular, células estromais, estrato esponjoso e estrato compacto nesta categoria, mas houve diferença significativa entre o grau de intensidade da expressão dessas estruturas com o epitélio luminal, as células endoteliais e as células inflamatórias. O estrato compacto apresentou diferença significativa em relação às outras estruturas no grau de intensidade da expressão de MMP-2. As estruturas marcadas com maior frequência nas biópsias foram as células estromais em 52,9% dos casos, seguidas pela região da parede vascular em 47,1%.

Na categoria III, as estruturas que apresentaram maior intensidade de marcação foram o epitélio glandular e as células estromais. A análise estatística mostrou não haver diferença significativa na intensidade da expressão de MMP-2 entre epitélio glandular, parede vascular, células estromais, estrato compacto e esponjoso. No entanto, houve diferença significativa entre o grau de intensidade dessas estruturas com o epitélio luminal, as células endoteliais e as células inflamatórias.

A avaliação da intensidade da marcação imunoistoquímica entre as categorias da classificação de Kenney e Doig (1986) revelou que o epitélio glandular das amostras de endométrio das categorias IIA e III mostraram valores significativamente maiores que os do epitélio glandular das amostras da categoria I, sendo os valores da categoria IIB intermediários. A parede vascular mostrou valores significativamente maiores nas amostras de endométrio da categoria I.

Os resultados do estudo estatístico para a variável MMP-2 na classificação de Kenney e Doig (1986) estão demonstrados na Tabela 3.

RESULTADOS

Tabela 3. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-2 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Kenney e Doig (1986).

ESTRUTURA	CATEGORIA I	CATEGORIA IIA	CATEGORIA IIB	CATEGORIA III
epitélio luminal	0aA ¹	3bcB	0aA	0aA
epitélio glandular	1abA	2bB	1bAB	2bB
célula endotelial	0aA	0aA	0aA	0aA
parede vascular	2bA	0aB	1bB	1bB
células inflamatórias	0aA	0aA	0aA	0aA
células estromais	2bA	1abA	1bA	2bA
estrato esponjoso	1abA	2bA	1bA	2bA
estrato compacto	1abA	2bA	2bA	2bA

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

Nos endométrios hígidos a análise estatística confirmou não haver diferença significativa na intensidade da expressão da MMP-2 na parede vascular e células estromais desta categoria, porém estas estruturas apresentaram intensidade de marcação maior do que o epitélio luminal, células endoteliais e células inflamatórias nesta categoria. Os valores do epitélio glandular, do estrato esponjoso e estrato compacto apresentaram-se intermediários.

Nas endometrites crônicas infiltrativas a marcação mais intensa ocorreu no epitélio glandular e nas células estromais, segundo a classificação de Ricketts e Alonso (1991). 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%. A análise estatística mostrou não haver diferença significativa na intensidade da expressão da MMP-2 no epitélio glandular e estrato compacto, porém estas estruturas apresentaram intensidade de marcação significativamente maior do que o epitélio luminal, nas células endoteliais e das células inflamatórias. Os valores da parede vascular, das células estromais e do estrato esponjoso apresentaram-se intermediários.

RESULTADOS

Nas endometroses as células estromais foram as que demonstraram maior intensidade de marcação, mas sem diferença significativa em relação à marcação do epitélio luminal, do epitélio glandular, do estrato compacto e do estrato esponjoso. Contudo, mostraram intensidade de marcação expressivamente maior do que as células endoteliais e das células inflamatórias. As estruturas mais freqüentemente marcadas nas biópsias foram as células estromais em 62,5% dos casos.

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

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

Os resultados do estudo estatístico para a variável MMP-2 na classificação de Ricketts e Alonso (1991) estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores medianos da intensidade da marcação imunoistoquímica de MMP-2 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias classificadas de acordo com Ricketts e Alonso (1991).

ESTRUTURA	ENDOMÉTRIO HÍGIDO	ENDOMETRITE CRÔNICA INFILTRATIVA	ENDOMETROSE
epitélio luminal	0aA ¹	0aA	2cB
epitélio glandular	1abA	2bB	2cB
célula endotelial	0aA	0aA	0aA
parede vascular	2bB	1abA	1abA
células inflamatórias	0aA	0aA	0aA
élulas estromais	2bA	1abA	1,5bcA
estrato esponjoso	1abA	1abA	2cA
estrato compacto	1abA	2bA	2cA

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

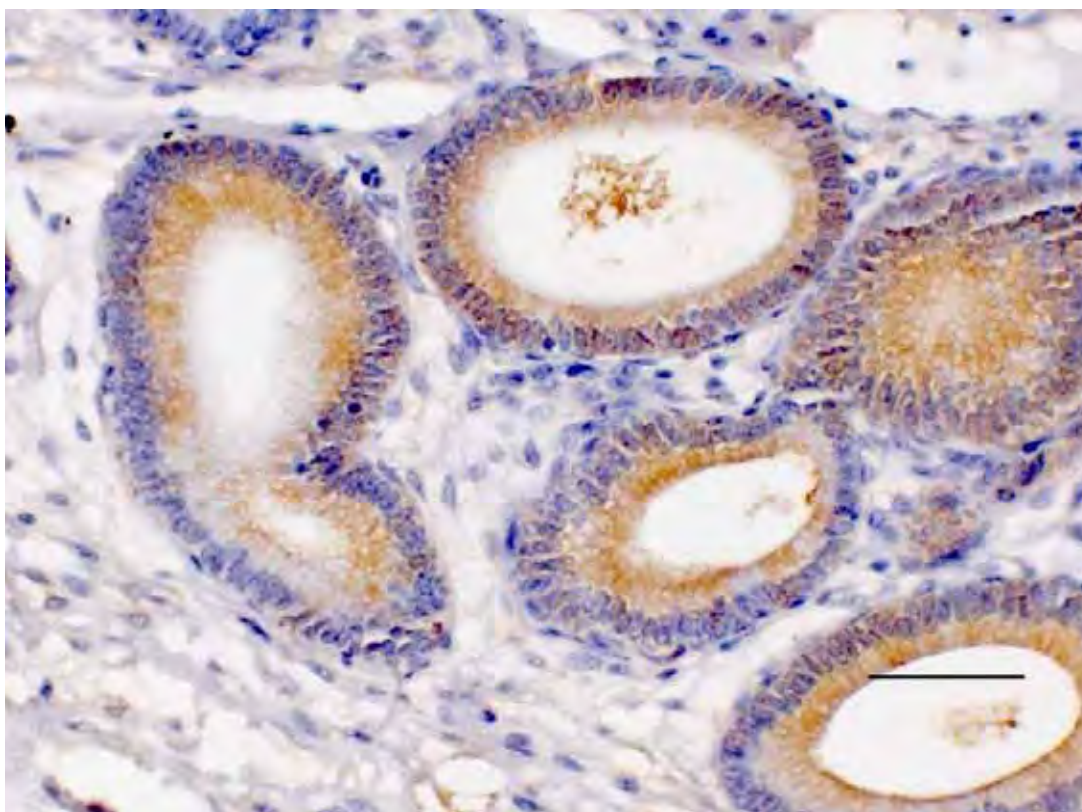


FIGURA 09 – Marcação imunoistoquímica para MMP-2. Endométrio eqüino. Categoria IIB – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva moderada no epitélio de glândulas fibróticas e dilatadas. Barra: 50 μ m

5.2.2. α -ACTINA DE MÚSCULO LISO (α -SMA)

A expressão de α -actina de músculo liso foi constatada em 93,3% das amostras de endométrio eqüino.

Foi observada marcação intensa na parede dos vasos sanguíneos e na região periglandular. Considerando-se as estruturas glandulares do endométrio, esta expressão ocorria mais comumente ao redor das glândulas endometriais dilatadas e que freqüentemente apresentavam acúmulo de secreção no lúmen.

A expressão da α -actina de músculo liso foi observada ao redor de glândulas endometriais fibróticas individualizadas ou agrupadas em ninhos fibróticos.

Nos endométrios categoria I (Figura 10), além dos vasos sanguíneos, a expressão de α -actina de músculo liso estava presente ao redor das esparsas glândulas dilatadas em 60% das amostras. Uma ou duas camadas de fibrose circundavam glândulas individualizadas, que eventualmente mostravam acúmulo de secreção.

Na categoria IIA (Figura 11), marcação mais intensa estava presente na região periglandular, variando entre três a vinte glândulas endometriais fibróticas por campo de observação. A expressão de α -actina de músculo liso foi detectada em glândulas não dilatadas e em glândulas dilatadas e isoladas, sendo que algumas apresentavam acúmulo de secreção intraluminal. O número de camadas de fibrose periglandular observado variou de um a cinco, em glândulas isoladas. A frequência maior de expressão nesta categoria ocorreu ao redor de glândulas endometriais dilatadas e individuais (80% dos casos), seguida pela da marcação ao redor de glândulas endometriais não dilatadas e individuais (40% dos casos).

Na categoria IIB, as glândulas fibróticas individuais foram as estruturas que apresentaram maior intensidade de marcação ao seu redor (73,3% dos casos). As lesões fibróticas que expressavam α -actina de músculo liso ocorriam ao redor de glândulas observadas de maneira individualizadas, variando de cinco a trinta e dois focos por campo de observação. Associados a isto, foram observados ninhos fibróticos em 20% dos casos analisados. Sendo que até oito ninhos fibróticos por campo de observação foram visualizados em uma das biópsias.

Na categoria III (Figuras 12 e 13), os ninhos fibróticos foram as estruturas que apresentaram maior intensidade de marcação positiva para α -actina de músculo liso (60% das amostras). Sendo que o número de camadas de fibrose ao redor das glândulas variou de três a cinco camadas de fibrose. Os ninhos fibróticos apresentaram um número de seis a dezessete glândulas endometriais fibróticas. Em seguida, as estruturas que evidenciaram a imunomarcação foram as glândulas endometriais fibróticas isoladas, (40% das amostras). O número de glândulas fibróticas isoladas variou de dez a treze glândulas por campo de observação.

Utilizando-se a classificação de Ricketts e Alonso (1991), no endométrio hígido foi observada marcação positiva para α -actina de músculo liso na parede vascular ao redor de estruturas glandulares dilatadas. A expressão periglandular estava presente 16% das amostras, geralmente associada ao acúmulo de secreção intraluminal.

As amostras classificadas como endometrite crônica infiltrativa representaram 40% da marcação positiva para α -SMA, e aquelas que tiveram como endometrose em 44%. Nos dois tipos de processo a maior positividade para este anticorpo estava presente ao redor das glândulas endometriais fibróticas dilatadas.

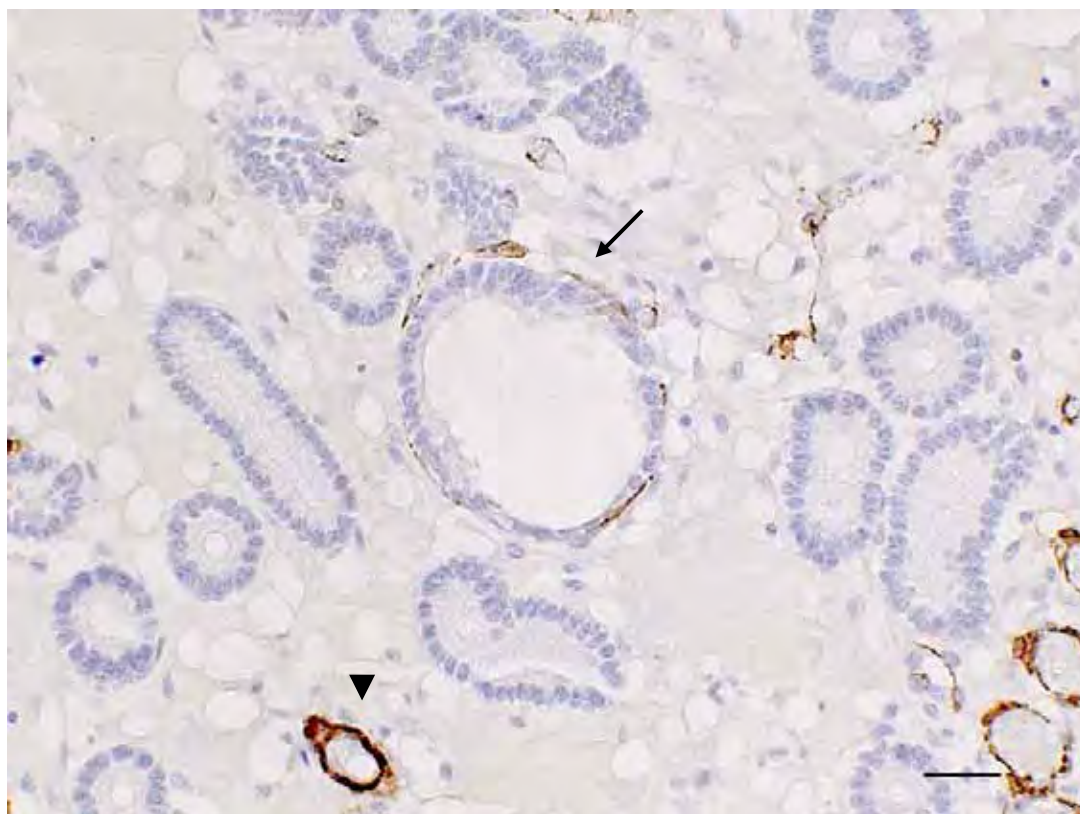


FIGURA 10 – Marcação imunoistoquímica para α -SMA. Endométrio eqüino. Categoria I – endométrio hígido. Marcação positiva na perivascular moderada (cabeça de seta) e periglandular discreta (seta). Barra: 50 μ m

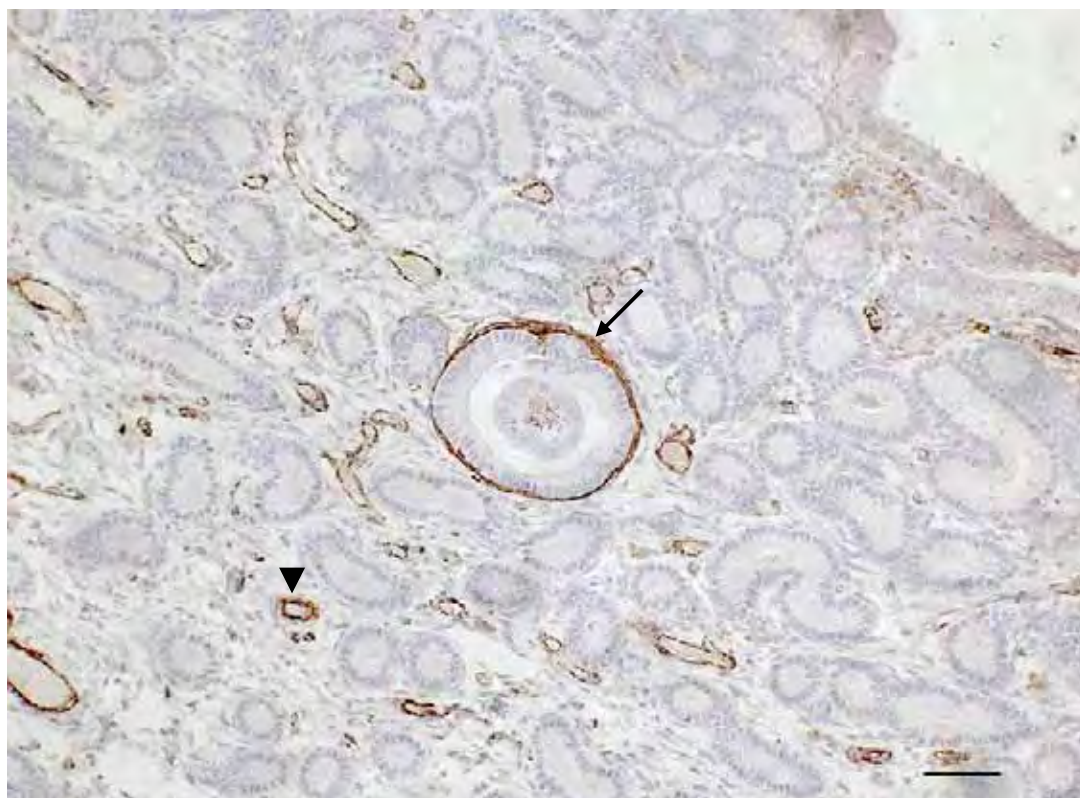


FIGURA 11 – Marcação imunoistoquímica para α -SMA. Endométrio eqüino. Categoria IIA – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva moderada em região periglandular (seta) e em parede vascular (cabeça de seta). Barra: 50 μ m

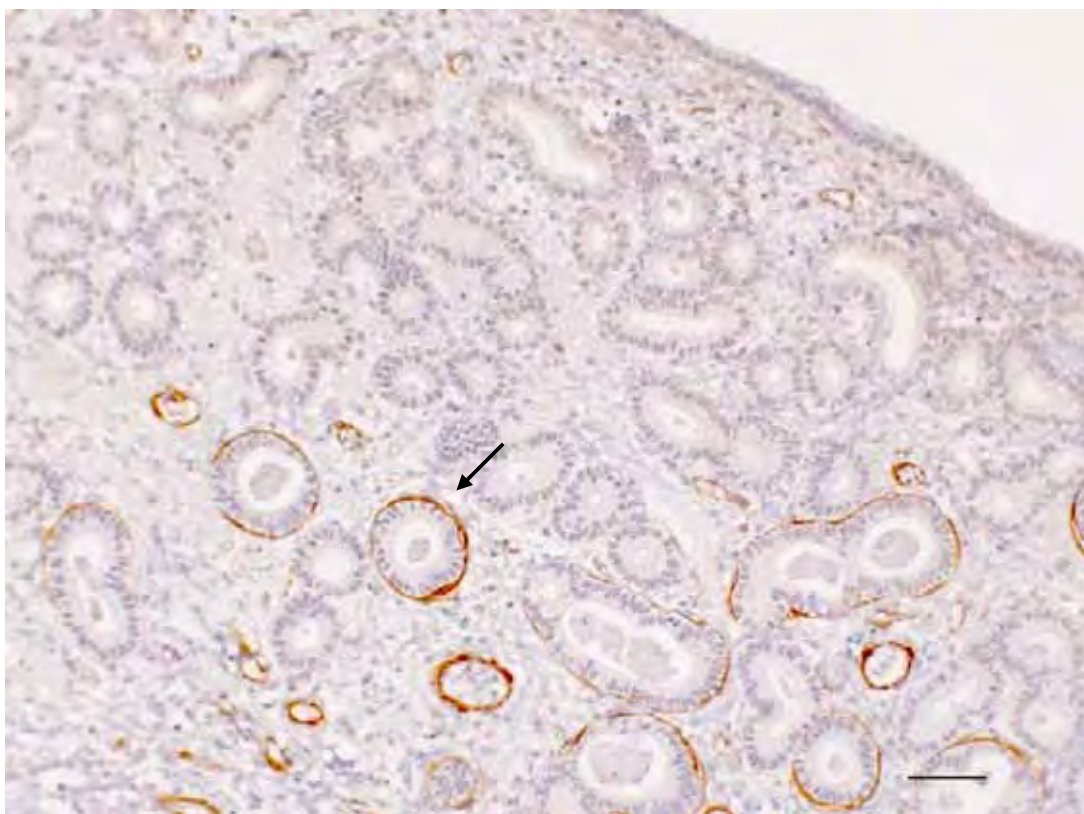


FIGURA 12 – Marcação imunoistoquímica para α -SMA. Endométrio eqüino. Categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva moderada em região periglandular (seta). Barra: 50 μ m

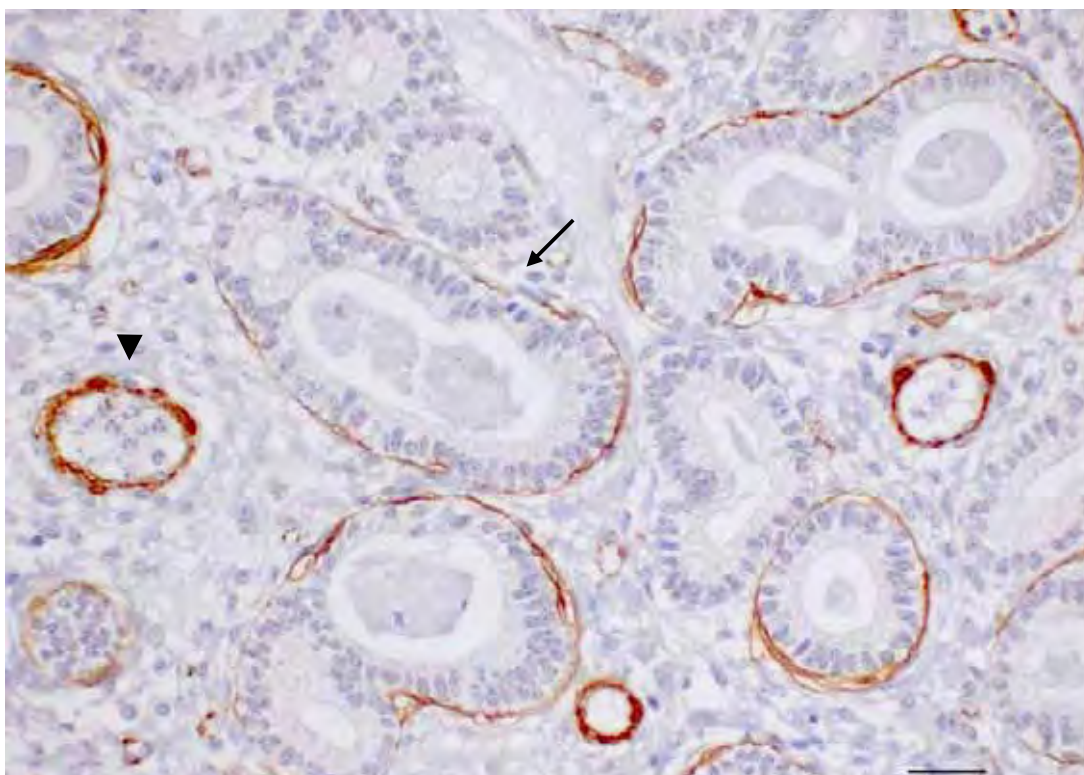


FIGURA 13 – Marcação imunoistoquímica para α -SMA. Endométrio eqüino. Categoria III – endometrite crônica infiltrativa. Marcação positiva na parede dos vasos (cabeça de seta) e ao redor de estruturas glandulares dilatadas e repletas de secreção (seta). Barra: 20 μ m

6. DISCUSSÃO

Nos casos classificados como categoria I, alterações fibróticas como fibrose perivascular e intersticial foram observadas em um número expressivo de amostras, sendo o acúmulo do colágeno na região perivascular (três casos) e intersticial de forma discreta e focal (dois casos). Estes critérios não considerados na classificação de Kenney e Doig (1986). Este tipo de comprometimento vascular necessita de mais investigações, para que sua função nos problemas reprodutivos da égua seja melhor elucidado, sendo que ocorre freqüentemente, em éguas consideradas normais (Nunes, 2003).

As biópsias incluídas na categoria IIA de Kenney e Doig (1986) apresentaram fibrose periglandular e perivascular e deposição discreta de colágeno. Assim como moderada quantidade de ninhos fibróticos. No entanto, conforme observado por Nunes (2003) houve casos em que a fibrose esteve presente de maneira inconspícua, acompanhada de infiltrado inflamatório acentuado.

Quando usada a classificação de Ricketts e Alonso (1991) as amostras de endometrite infiltrativa atrelaram amostras que, pelo método de Kenney e Doig (1986) foram analisadas pertencentes a categoria IIB ou categoria III, mostrando o caráter predominantemente inflamatório da maioria das amostras (60,98%). As alterações degenerativas foram notadas com menor ocorrência (20,73%).

As biópsias classificadas como categoria III, conforme Kenney e Doig (1986) demonstraram fibrose periglandular intensa, com deposição acentuada de colágeno e ninhos fibróticos freqüentes.

A tipificação do colágeno e a verificação da expressão da enzima das enzimas colagenolíticas investigadas, também foram utilizadas, no intuito de avaliar melhor os distintos processos endometriais, conforme as definições de Ricketts e Alonso (1991), baseadas na classificação de Ricketts datada em 1975 apud Ricketts e Alonso (1991), que define a enfermidade endometrial segundo sua origem inflamatória ou degenerativa.

Conforme Blanchard et al., (1987) os métodos de colorações tricrômicos auxiliam na avaliação histoquímica de biópsias endometriais representando um método eficaz para a afirmação de diagnósticos mais concisos.

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

O aumento do número de camadas de tecido conjuntivo em volta das glândulas endometriais correlaciona-se significativamente com a diminuição da fertilidade; já foi verificado em estudos prévios que éguas com uma média menor do que três camadas de fibrose periglandular têm 75% de probabilidade de levar uma gestação a termo, enquanto que éguas com uma média maior do que 3,5 camadas apresentam um prognóstico pior para fertilidade, ou seja, 25% de probabilidade de manter a gestação até o final (LEISCHMAN et al., 1982).

Nas endometrites com lesões mais severas, há uma predominância de colágeno do tipo III para o colágeno do tipo I, alteração também relatada por Nunes (2003), Evans et al., (1998) e Caldini (1992). Neste estudo, nas biópsias foi observada maior distribuição periglandular, perivascular e no estrato esponjoso.

As MMPs, principais enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular participando no remodelamento tecidual fisiológico e patológico (ARTHUR, 2000). A produção de MMPs está relacionada com determinados tipos celulares que estão presentes nos processos fibróticos em diversos órgãos.

O presente estudo demonstrou que as estruturas que apresentaram maior intensidade de marcação na categoria I foram a região de parede vascular, seguidas pelo epitélio glandular. As estruturas mais comumente marcadas foram as células estromais e a região da parede vascular. Na categoria IIA, as estruturas marcadas com maior frequência no endométrio foram as células estromais e o epitélio glandular. Marcação mais intensa ocorreu nas células estromais na categoria IIB. Na categoria III, as estruturas que apresentaram maior intensidade de marcação foram o epitélio glandular e as células estromais.

Nos endométrios hígidos houve maior intensidade da expressão da MMP-2 na parede vascular e células estromais. Nas endometrites crônicas infiltrativas a marcação mais intensa ocorreu no epitélio glandular e nas células estromais.

Walter et al., (2001) avaliaram a expressão de MMP-2 na fibrose periglandular das éguas e verificaram que a expressão desta enzima estava associada com a dilatação e fibrose

glandular. Quanto à distribuição no endométrio, estes autores observaram que a MMP-2 estava localizada no estrato compacto no endométrio de éguas saudáveis e com endometrose. Os autores sugerem que a MMP-2 tenha um papel importante nas alterações da homeostase da matriz extracelular em regiões de fibrose endometrial. A análise entre as categorias das biópsias classificadas de acordo com Kenney e Doig (1986) indica que a intensidade da imunomarcagem para a enzima MMP-2 tende a aumentar no epitélio glandular conforme aumenta a gravidade da lesão endometrial.

Conforme Porto et al., (2005) as células do epitélio luminal, do epitélio glandular e a parede de arteríolas apresentaram imuno-reatividade para esta enzima.

Resultados obtidos por Zhang e Salamonsen (2002) no útero humano demonstraram que esta enzima se encontra mais amplamente distribuída, sendo detectada na maioria das células endometriais, sejam epiteliais, estromais, vasculares, mas não nos leucócitos.

Arthur (2000) observou estudando a fibrose hepática que as células estreladas hepáticas quando ativadas exibem fenótipo de miofibroblastos e secretam pro-MMP-2. A indução deste processo se dá pela presença de colágeno do tipo I, que predomina no fígado fibrótico.

Nesse estudo, o colágeno do tipo I também foi o tipo predominante nos endométrios que mostraram graus de lesão mais acentuados, acompanhando o aumento da expressão de MMP-2 pelas estruturas endometriais. Provavelmente o mesmo tipo de indução observada no fígado fibrótico ocorre também no endométrio fibrótico.

Os miofibroblastos participam na síntese da matriz extracelular e na produção de força mecânica, com influência na reorganização da matriz e na contração da ferida (TOMASEK et al., 2002). Segundo Gabbiani (2003), sua atividade contrátil é responsável pelo fechamento das feridas após as lesões, processo conhecido como contração da ferida.

Durante os processos fibróticos, os fibroblastos expressam fatores de diferenciação muscular, como a α -actina de músculo liso, que conferem a estas células a capacidade de contração (SAPPINO et al., 1990).

Já foi demonstrada uma participação importante da α -actina de músculo liso (α -SMA) na produção de miofibroblasto *in vitro*, utilizando modelos que envolvem fibroblastos cultivados em substratos flexíveis e flutuantes utilizados em experimentos que envolvem o processo cicatricial de feridas em ratos (HINZ et al., 2001).

A marcação de α -SMA neste trabalho foi intensa em regiões periglandulares e perivasculares. Sendo que a expressão foi mais observada ao redor das glândulas endometriais dilatadas, as quais apresentavam acúmulo de secreção no lúmen.

A marcação positiva presente na parede vascular, independentemente do grau de comprometimento endometrial, se deve a presença das fibras musculares lisas. As células positivas ao redor de estruturas glandulares nas amostras de endométrio consideradas como pertencentes a categoria I ou hígdos, pode representar um processo inicial de fibrose ainda incipiente e difícil de ser detectado pelos métodos tradicionais. Segundo Walter et al., (2001) este achado poderia ser uma indicação para a identificação de eqüinos com tendência ao desenvolvimento de endometrose. No entanto, não podemos deixar de considerar que os miofibroblastos estão presentes também em tecidos normais, atuando na sua contração ou no seu remodelamento que ocorrem fisiologicamente, independentemente da presença de processos fibróticos (SCHURCH et al., 1998).

Neste estudo, na medida em que as lesões fibróticas periglandulares tornavam-se mais graves, as camadas de fibrose eram mais numerosas e a presença de células que expressavam α -actina de músculo liso era mais evidente. Levando-se em conta que os miofibroblastos possuem a capacidade de produzir citocinas, como por exemplo, as interleucinas (ZHANG et al., 1994); estas células podem estar envolvidas na estimulação da produção e da degradação de matriz extracelular, que são fenômenos modulados por estes tipos de fatores (WALTER et al., 2001).

No que diz respeito ao endométrio eqüino, os fibroblastos que circundam as glândulas uterinas fibróticas nas endometroses mostram forte imunoreatividade para α -actina de músculo liso. Mais ainda, glândulas císticas são circundadas por uma camada de células positivas para esta proteína (WALTER et al., 2001). Coincidentemente, foi constatado no presente trabalho que o epitélio glandular do útero fibrótico expressa MMP-2 com maior intensidade, principalmente nas estruturas denominadas de ninhos fibróticos, o que já havia sido observado anteriormente (NUNES, 2006; PORTO, 2006). Além disso, os fibroblastos que expressam a α -actina de músculo liso (α -SMA), denominados de miofibroblastos, são reconhecidos como a fonte principal de colágeno tipo I e de citocinas fibrogênicas/inflamatórias nas lesões fibróticas (ZHANG et al., 1994; PHAN, 2002). No presente trabalho o colágeno do tipo I

predominou nos endométrios que mostraram graus de lesão mais acentuados, se depositando predominantemente nas lesões fibróticas periglandulares.

Foi observada a expressão da α -actina de músculo liso ao redor de glândulas endometriais fibróticas individualizadas ou distribuídas em ninhos fibróticos. Nos endométrios saudáveis algumas apresentaram acúmulo de secreção intraluminal e camadas de fibrose que variaram no número de 1 a 2 por glândula individual. Além disso, foi observada marcação positiva em parede vascular.

Segundo Czernobilsky et al., (1993), a reação fibrótica periglandular endometrial seria um mecanismo de remodelamento tecidual para que a estrutura glandular suportasse a retenção de secreções. Na endometrose, glândulas dilatadas e repletas de secreção e restos celulares são observadas com frequência no endométrio eqüino, assim como glândulas não dilatadas que mostram acentuada reação fibrótica (EVANS et al., 1998). Em ambas as situações estão presentes, em meio ao tecido fibrótico, células positivas para α -actina de músculo liso (WALTER et al., 2001). Embora se possa admitir a função de suporte dos miofibroblastos localizados ao redor de glândulas dilatadas e fibróticas, a sua função nas camadas fibróticas ao redor de estruturas glandulares não dilatadas permanece desconhecida. De qualquer forma, o comprometimento das estruturas glandulares pelo processo fibrótico endometrial altera seu funcionamento e, conseqüentemente diminui a capacidade do animal de levar a gestação a termo.

Curiosamente, foi demonstrado que alguns processos que levam a cirrose hepática, anteriormente considerados como processos irreversíveis, podem ser remodelados com a diminuição da expressão do colágeno tipo I e TIMP, a ativação das MMPs e a apoptose de miofibroblastos (ISSA et al., 2004). Em tecidos lesados e não lesados, a positividade dos fibroblastos para α -actina de músculo liso sinalizam o remodelamento do tecido e passam a ser os alvos para intervenções terapêuticas (TOMASEK et al., 2002). Estas descobertas, se válidas para o endométrio, podem abrir boas perspectivas para intervenções terapêuticas nos distúrbios reprodutivos das éguas que tenham por base a fibrose endometrial.

Hoje em dia, pode-se afirmar com certeza que as classificações utilizadas para a determinação do grau de lesão endometrial nas éguas são extremamente úteis para o diagnóstico e o prognóstico dos problemas reprodutivos. Porém, muitos questionamentos surgiram no que diz respeito ao efeito específico de cada alteração morfológica sobre a função

reprodutiva, permanecendo ainda como matéria de debate e aguardando estudos mais aprofundados para o seu esclarecimento. No entanto, neste presente trabalho foi demonstrado que embora ainda sem uma função bem definida nos processos endometriais, os miofibroblastos são identificados no endométrio das éguas que mostram alterações fibróticas. Estas células são identificadas não somente, mas principalmente ao redor de glândulas que podem ou não mostrar alterações morfológicas. Contudo, o que chama atenção é a sua presença mais expressiva nas lesões fibróticas e a sua associação com a deposição de colágeno do tipo I no endométrio. Isso nos leva a relacionar os miofibroblastos com a alteração do estroma observada nos processos crônicos endometriais, que se manifesta muitas vezes pela substituição do colágeno fibrilar por um tipo de colágeno mais denso e menos sensível a ação de enzimas como as collagenases. Ao mesmo tempo em que estas alterações estão em desenvolvimento, nota-se uma maior expressão de enzimas relacionadas à degradação da matriz extracelular como a MMP-2 por diversas estruturas do endométrio. Esta nos parece uma nítida reação no sentido de restabelecer o equilíbrio entre a produção e a degradação da matriz, que embora expressiva como foi demonstrado, parece ser insuficiente. No presente estudo não foi possível identificar a participação direta dos miofibroblastos neste fenômeno específico.

Nos parece que o aprofundamento dos estudos sobre a função ou funções dos miofibroblastos nos processos fibróticos uterinos, principalmente aquelas relacionadas a modulação da produção e degradação da matriz extracelular, poderá resultar em melhores perspectivas para novas abordagens terapêuticas.

7. CONCLUSÕES

- Os miofibroblastos estão presentes no endométrio de éguas normais e portadoras de lesões crônicas endometriais.
- A localização preferencial dos miofibroblastos no endométrio é ao redor de estruturas glandulares, sendo mais expressiva a sua presença nos processos crônicos endometriais.
- O acúmulo maior de miofibroblastos coincide com as regiões onde ocorre a deposição de colágeno denso (colágeno do tipo I), indicando sua relação com o processo fibrótico.
- Não foi possível indicar uma relação direta entre a presença de miofibroblastos e a maior expressão de MMP-2 pelo endométrio nos processos crônicos.

8. REFERÊNCIAS¹

ABE, R.; DONNELLY, S.C.; PENG, T.; BUCALA, R.; METZ, C.N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. **The Journal Immunology**, v. 166, p.7556–7562, 2001.

ADAM, P.J.; REGAN, C.P.; HAUTMANN, M.B.; OWENS, G.K. Positive- and negative-acting Kruppel-like transcription factors bind a transforming growth factor beta control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22alpha in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p.37798–37806, 2000.

AMADEU, T.P.; COULOMB B, B.; DESMOULIERE, A.; COSTA, A.M.A. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v.2, n.2, p.60-68, 2003.

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

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. 265-272, 1999.

ARTHUR, M.J.P. MMPs and TIMPs in liver fibrosis. **American Journal of Physiology and Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, G245-G249, 2000.

BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 629.

BLANCHARD, T.L.; GARCIA, M.C.; KINTER, L.D.; KENNEY, R.M. Investigation of the representatives of a single endometrial sample and in the detection of endometrial fibrosis in the mare. **Theriogenology**, v.28, p. 445-450, 1987.

BOGATKEVICH, G.S.; TOURKINA, E.; SILVER, R.M.; LUDWICKA-BRADLEY, A. Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.45184–4592, 2001.

¹ ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. *Normas para publicação da ABNT*. 58 2008.

BOGATKEVICH, G.S.; TOURKINA, E.; ABRAMS, C.S.; HARLEY, R.A.; SILVER, R.M.; LUDWICKA-BRADLEY, A. Contractile activity and smooth muscle alpha actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.52, p. 82–90, 2003.

BRANTON, M.H.; KOPP, J. B. TGF- β and fibrosis. **Microbes and Infection**, v.1, p. 1349-1365, 1999.

BUCALA, R.; SPIEGEL, L.A.; CHESNEY, J.; HOGAN, M.; CERAMI, A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. **Molecular Medicine**, v.1, p.71–81, 1994.

CALDINI, E.T.E.G. **Estudo histoquímico e ultra-estrutural do colágeno na fibrose periglandular do endométrio equino**. 1992. 123f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. **Journal of Pathology**, v.2004, p.386-395, 2004.

CHAQOUR, B.; YANG, R.; SHA, Q. Mechanical stretch modulates the promoter activity of the profibrotic factor CCN2 through increased actin polymerization and NF-kappaB activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p.20608–20622, 2006.

CHANG, H.Y.; CHI, J.T.; DUDOIT, S.; BONDRE, C.; VAN DE RIJN, M.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, p.12877–12882, 2002.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: pathologic basis of disease**. 6. ed. Philadelphia: W.S. Saunders, 1999. 1425p.

CZERNOBILSKY, B.; REMADI, S.; GABBIANI, G. Alpha-smooth muscle actin and other stromal markers in endometrial mucosa. **Virchows Archive**, v.422, p.313–317, 1993.

DARBY, I.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Laboratory Investigation**, v.63, p.21–29, 1990.

- DARBY, I.A.; BISUCCI, T.; PITTET, B.; GARBIN, S.; GABBIANI, G.; DESMOULIE`RE, A. Skin flap induced regression of granulation tissue correlates with reduced growth factor and increased metalloproteinase expression. **The Journal of Pathology**, v.197, p.117–27, 2002.
- DASCANIO, J. J. LEY, W.B.; PARKER, N.A.; SPONENBERGER, D.R.; WARNICK, L.D. Magnesium sulfate intrauterine therapy in the mare. **Equine Practice**, v. 20, n. ., p. 10-13, 1998.
- DE WEVER, O.; MAREEL, M. Role of myofibroblasts at the invasion front. **Journal of Biological Chemistry**, v.383, p.55–67, 2002.
- DE WEVER, O.; WESTBROEK, W.; VERLOES, A.; BLOEMEN, N.; BRACKE, M.; GESPACH, C.; BRUYNEEL, E.; MAREEL, M. Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF- β or wounding. **Journal of Cell Science**, v.117, p.4691–4703, 2004.
- DELLMAN, H.D.; BROWN, E.M. **Textbook of veterinary histology**. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987. p.330-334.
- DERDAK, S.; PENNEY, D.P.; KENG, P.; FELCH, M.E.; BROWN, D.; PHIPPS, R.P. Differential collagen and fibronectin production by Thy 11 and Thy 12 lung fibroblast subpopulations. **American Journal Physiology**, v.263, p.283–290, 1992.
- DESMOULIE`RE, A.; GEINOZ, A.; GABBIANI, F.; GABBIANI, G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, v.122, p.103–111, 1993.
- DESMOULIE`RE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **American Journal of Pathology**, v.146, p.56–66, 1995.
- DESMOULIÉRE, A.; GABBIANI, G. The role of myofibroblasts in wound healing and fibrocontractive diseases. In: CLARK, R.A.F. (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum, 1996. p.391-423.
- DESMOULIE`RE, A.; DARBY, I.A.; GABBIANI, G. Normal and pathological soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. **Laboratory Investigation**, v.83, p.1689–1707, 2003.
- DESMOULIE`RE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. **Wound Repair and Regeneration**, v.13, p.7-12, 2005.

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

DOIG, P.A.; WAELCHLI, R.O. Endometrial biopsy. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.223-225.

EKICI, H.; GÜREL, A.; ÖZGUR, Y.; AYYILDIZ, G.; IKIZ, S.; SENUNVER, A.. A diagnosis and handling of chronic degenerative endometritis in mares with endometrial biopsy. **Veteriner Facultesi Dergisi (Istanbul)**, v. 27, p. 59-74, 2001.

EVANS, T.J.; MILLER, M.A.; GANJAM, V.K. Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 1209-1214, 1998.

FRID, M.G.; KALE, V.A.; STENMARK, K.R. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. **Circulation Research**, v.90, p.1189–1196, 2002.

FURUKAWA, F.; MATSUZAKI, K.; MORI, S.; TAHASHI, Y.; YOSHIDA, K.; SUGANO, Y.; YAMAGATA, H.; MATSUSHITA, M.; SEKI, T.; INAGAKI, Y. p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. **Hepatology**, v.38, p.879–889, 2003.

GABBIANI, G.; RYAN, G.B.; MAJNE, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia**, v.27, p.549–550, 1971.

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **American Journal of Pathology**, v.200, p.500-503, 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. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 976-984, 2003.

GONZÁLEZ, A.A.; SEGURA, A.M.; HORIBA, K.; QIAN, S.; YU, Z.; STEVENSON, W.S.; WILLERSON, J.T.; MCALLISTER, H.A.; FERRANS, V.J. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lesions of cardiac and pulmonary sarcoidosis: an immunohistochemical study. **Human Pathology**, v. 33, p. 1158-1164, 2002.

GRINNELL, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. **Trends in Cell Biology**, v.13, p.264–269, 2003.

GUYOT, C.; LEPREUX, S.; COMBE, C.; DOUDNIKOFF, E.; BIOULAC-SAGE, P.; BALABAUD, C.; DESMOULIÈRE, A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.38, p.135-151, 2006.

HASHIMOTO, N.; JIN, H.; LIU, T.; CHENSUE, S.W.; PHAN, S.H. Bone marrow derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.113, p.243–252, 2004.

HAGOOD, J.S.; PRABHAKARAN, P.; KUMBLA, P.; SALAZAR, L.; MACEWEN, M.W.; BARKER, T.H.; ORTIZ, L.A.; SCHOEB, T.; SIEGAL, G.P.; ALEXANDER, C.B. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. **American Journal of Pathology**, v.167, p.365–379, 2005.

HEUGHAN, C.; NIINIKOSKI, J.; HUNT, T.K. Atherosclerosis and healing. In: HUNT, T.K. (Ed). **Wound healing and wound infection**. Theory and surgical practice. New York: Appleton Century Crofts, 1980. p. 72-80.

HILDEBRAND, K.A.; GALLANT-BEHM, C.L.; KYDD, A.S.; HART, A.D. The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v.13, p.136-144, 2005.

HINZ, B.; CELETTA, G.; TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; CHAPONNIER, C. α -Smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. **Molecular Biology of the Cell**, v.12, p.2730–2741, 2001.

HINZ, B.; GABBIANI, G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. **Current Opinion Biotechnology**, v.14, p.538–546, 2003.

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

HU, B.; WU, Z.; PHAN, S.H. Smad3 mediates transforming growth factor β -induced α -smooth muscle actin expression. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.29, p.397–404, 2003.

HU, B.; WU, Z.; LIU, T.; ULLENBRUCH, M.R.; JIN, H.; PHAN, S.H. Gut-enriched Kruppel-like factor interaction with Smad3 inhibits myofibroblast differentiation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.36, p.78–84, 2007.

ISSA, R.; ZHOU, X.; CONSTANDINOU, C.M.; FALLOWFIELD, J.; MILLWARD-SADLER, H.; GACA, M.D.; SANDS, E.; SULIMAN, I.; TRIM, N.; KNORR, A.; ARTHUR, M.J.; BENYON, R.C.; IREDALE, J.P. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix crosslinking. **Gastroenterology**, v.126, p.1795–1808, 2004.

IWANO, M.; PLIETH, D.; DANOFF, T.M.; XUE, C.; OKADA, H.; NEILSON, E.G. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.110, p.341–350, 2002.

JEFFCOTT, L.B.; ROSSDALE, P.D.; FREESTONE, J.; FRANK, C.J.; TOWERS-CLARK, P.F. An assessment of wastage in Thoroughbred racing from conception to 4 years of age. **Equine Veterinary Journal**, v.14, p.185-198, 1982.

JESTER, J.V.; HUANG, J.; PETROLL, W.M.; CAVANAGH, H.D. TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. **Experimental Eye Research**, v.75, p.645–657, 2002.

JOHNSON, G.L.; LAPADAT, R. Mitogen-Activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. **Science**, v. 298, p.1911-1912, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.U.; ZUGAIB, M.; MONTES, G.S.; TOLEDO, O.M.S.; KRISZTAN, R.M.; SHIGIHARA, K.M. Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilatation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 138, p. 273, 1980.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.p.488.

KATOH, K.; KANO, Y.; AMANO, M.; ONISHI, H.; KAIBUCHI, K.; FUJIWARA, K. Rho-kinase-mediated contraction of isolated stress fibers. **The Journal of Cell Biology**, v.153, p.569–584, 2001.

KATZENSTEIN, A.A.; MYERS, J.L. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.157, p.1301–1315, 1998.

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, p. 241-262, 1978.

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

KISSELEVA, T.; UCHINAMI, H.; FEIRT, N.; QUINTANA-BUSTAMANTE, O.; SEGOVIA, J.C.; SCHWABE, R.F.; BRENNER, D.A. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v.45, p.429–438, 2006.

KOUMAS, L.; SMITH, T.J.; FELDON, S.; BLUMBERG, N.; PHIPPS, R.P. Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes. **American Journal of Pathology**, v.163, p.1291–1300, 2003.

LAMA, V.N.; PHAN, S.H. The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/ progenitor cells and beyond. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v.3, p.373–376, 2006.

LAMA, V.N.; SMITH, L.; BADRI, L.; FLINT, A.; ANDREI, A.C.; MURRAY, S.; WANG, Z.; LIAO, H.; TOEWS, G.B.; KREBSBACH, P.H.; PETERS-GOLDEN, M.; PINSKY, D.J.; MARTINEZ, F.J.; THANNICKAL, V.J. et al. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, p.989–996, 2007.

LEISCHMAN, D.; MILLER, R.B.; DOIG, P.A.A. A quantitative study of the histological morphology of the endometrium of normal and barren mares. **Canadian Journal Compendium on Medicine**, v. 46, p. 17-20, 1982.

LIU, T.; ULLENBRUCH, M.; NOZAKI, Y.; PHAN, S.H. Regulation of telomerase activity in lung fibroblasts. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.26, p.534–540, 2002.

LIU, T.; HU, B.; CHUNG, M.J.; ULLENBRUCH, M.; JIN, H.; PHAN, S.H. Telomerase regulation of myofibroblast differentiation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.34, p.625–633, 2006.

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

MACHESNEY, M.; TIDMAN, N.; WASEEM, A.; KIRBY, L.; LEIGH, I. Activated keratinocytes in the epidermis of hypertrophic scars. **American Journal of Pathology**, v.152, p.1133–1141, 1998.

MANSOUR, G.D.; SILVA, T.M.W.; FERREIRA, A.M.R.; ALMEIDA, E.C.P.; MARTINS, D.C. M. Histomorfometria em amostras endometriais normais e patológicas de éguas. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 33, p. 145, 1997.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology**, v.20, p.599-607, 2005.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Repair, regeneration and fibrosis. in: RUBIN, E.; FABER, J.L. **Pathology** 3. ed. Philadelphia: Lippincot-Raven, 1999, 1664 p.

MATSUOKA, H.; ARAI, T.; MORI, M.; GOYA, S.; KIDA, H.; MORISHITA, H.; FUJIWARA, H.; TACHIBANA, I.; OSAKI, T.; HAYASHI, S. A p38 MAPK inhibitor, FR-167653, ameliorates murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.283, p.L103–L112, 2002.

METZ, C.N. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.60, p.1342-1350, 2002.

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

MORI, L.; BELLINI, A.; STACEYM M.A.; SCHIMIDT, M.; MATTOLI, S. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. **Experimental Cell Research**, v.304, p.81-90, 2005.

MOULIN, V.; LAROCHELLE, S.; LANGLOIS, C.; THIBAUT, I.; LOPEZ-VALLE, C.A.; ROY, M. Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inducers. **Journal of Cell Physiology**, v.198, p.350–358, 2004.

NIELSEN, J.M Endometrits in mares: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology**, v. 64, p. 510-518, 2005.

NOZAKI, Y.; LIU, T.; HATANO, K.; GHARAE-KERMANI, M.; PHAN, S.H. Induction of telomerase activity in fibroblasts from bleomycin-injured lungs. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.23, p.460–465, 2000.

NUNES, L.C. **Avaliação histopatológica, histoquímica, imunoistoquímica e morfométrica das endometrites crônicas em éguas**. 2003. 108f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

NUNES, L.C. **Avaliação da expressão de metaloproteinases, TIMP-1 da esclerose vascular nas endometrites das éguas**. 2006. 99f. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- OLASO, E.; SALADO, C.; EGILEGOR, E.; GUTIERREZ, V.; SANTISTEBAN, A.; SANCHO-BRU, P.; FRIEDMAN, S.L.; VIDAL-VANACLOCHA, F. Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. **Hepatology**, v.37, p.674–685, 2003.
- ORTIZ, L.A.; DUTREIL, M.; FATTMAN, C.; PANDEY, A.C.; TORRES, G.; GO, K.; PHINNEY, D.G. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the anti-inflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, p.11002–11007, 2007.
- PAPA, F.O.; LOPES, M.D.; ALAVARENGA, M.A.; MEIRA, C.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LANGONI, H.; RIBEIRO, E.F.; AZEDO, A.E.; BOMFIM, A.C.M. Early embryonic death in mares: clinical and hormonal aspects. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 35, p. 170-173, 1998.
- PETROV, V.V.; FAGARD, R.H.; LIJNEN, P.J. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. **Hypertension**, v.39, p.258–263, 2002.
- PHAN, S.H. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. **Chest**, v.122, p.286S–289S, 2002.
- PHILLIPS, R.J.; BURDICK, M.D.; HONG, K.; LUTZ, M.A.; MURRAY, L.A.; XUE, Y.Y.; BELPERIO, J.A.; KEANE, M.P.; STRIETER, R.M. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.114, p.438–446, 2004.
- PORTO, C.D. **Caracterização histoquímica do colágeno e expressão de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 nas endometrites crônicas das éguas**. 2006. 101f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- QUAN, T.E.; COWPER, S.; WU, S.P.; BOCKENSTEDT, L.K.; BUCALA, R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p.598-606, 2004.
- RICKETTS, S.W.; ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, 189-192, 1991.
- RICKETS, S.W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23, p. 341-345, 1975.

ROSS, R.; EVERETT, N.B.; TYLER, R. Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. **The Journal of Cell Biology**, v.44, p.645–654, 1970.

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

SCHMIDT, M.; SUN, G.; STACEY, M.A.; MORI, L.; MATTOLI, S. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. **The Journal of Immunology**, v.171, p.380–389, 2003.

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

SCHÜRCH, W.; SEEMAYER, T.; GABBIANI, G. The myofibroblast. A quarter century after is discovery. **American Journal of Surgical Pathology**, v.22, p.141-147, 1998.

SHI, Y.; O'BRIEN, J.E.; FARD, A.; MANNION, J.D.; WANG, D. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. **Circulation**, v.94, p.1655–1664, 1996.

SHI-WEN, X.; CHEN, Y.; DENTON, C.P.; EASTWOOD, M.; RENZONI, E.A.; BOUGHARIOS, G.; PEARSON, J.D.; DASHWOOD, M.; DU BOIS, R.M.; BLACK, C.M.; LEASK, A.; ABRAHAM, D.J. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. **Molecular Biology of the Cell**, v.15, p.2707–2719, 2004.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v.341, p.738-746, 1999.

SORRELL, J.M.; CAPLAN, A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **Journal of Cell Science**, v.117, p.667–675, 2004.

SUMMERFIELD, N.J.; WATSON, E.D. Endometrial macrophage populations in genitally normal mares at oestrus and dioestrus and in mares susceptible endometrits. **Equine Veterinary Journal**, v. 30, p.79-81, 1998.

TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONIER, C.; BROWN, R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.3, p.349–363, 2002.

TRAUB-DARGATZ, J.L.; SALMAN, M.D.; VOSS, J.L. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practioners. **JAVMA**, v. 198, p. 1745-1747, 1991.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M. Uterine clearance of non-antigenic markers (^{51}Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resitant to chronich uterine infections. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.44, p. 283-288, 1991.

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

TROEDSSON, M.H.T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, p. 461-471, 1999.

VOGEL, H.J.; HUMKE, E. Der Formenzyklus der Uterindrüsen der Stute im Vergleich anderer Säugetiery und des Menschen. **Anatomia Histologia Embryologia**, v.2, p.271-279,1973.

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

WANG, J.; FAN, J.; LASCHINGER, C.; ARORA, P.D.; KAPUS, A.; SETH, A.; McCULLOCH, C.A. Smooth muscle actin determines mechanical force-induced p38 activation. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.7273–7284, 2005.

WANG, X.M.; ZHANG, Y.; KIM, H.P.; ZHOU, Z.; FEGHALI-BOSTWICK, C.A.; LIU, F.; IFEDIGBO, E.; XU, X.; OURY, T.D.; KAMINSKI, N.; CHOI, A.M. Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.203, p.2895–2906, 2006.

WATSON, E. D. Post breeding endometrits in the mare. **Animal Reproduction. Science**, v. 60-61, p. 221-232, 2000.

WILBORN, J.; CROFFORD, L.J.; BURDICK, M.D.; KUNKEL, S.L.; STRIETER, R.M.; PETERS- GOLDEN, M. Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic

pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. **The Journal of Clinical Investigation**, v.95, p.1861–1868, 1995.

YAMAGUCHI, Y.; ITAMI, S.; WATABE, H.; YASUMOTO, K.; ABDEL-MALEK, Z.A.; KUBO, T.; ROUZAUD, F.; TANEMURA, A.; YOSHIKAWA, K.; HEARING, V.J. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. **The Journal of Cell Biology**, v.165, p.275–285, 2004.

YANG, L.; SCOTT, P.G.; GIUFFRÉ, J.; SHANKOWSKY, H.A.; GHAHARY, A.; TREDGET, E.E. Peripheral blood fibrocytes from burn patients: identification and quantification of fibrocytes in adherent cells cultured from peripheral blood mononuclear cells. **Laboratory Investigation**, v.82, p.1183–1192, 2002.

ZHANG, K.; REKHTER, M.D.; GORDON, D.; PHAN, S.H. Co-expression of α -smooth muscle actin and type I collagen in fibroblast-like cells of rat lungs with bleomycin-induced pulmonary fibrosis: a combined immuno-histochemical and in situ hybridization study. **American Journal of Pathology**, v.145, p.114–125, 1994.

9. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista “*Veterinária e Zootecnia*”.

MIOFIBROBLASTOS: REVISÃO DE LITERATURA (MYOFIBROBLASTS: A REVIEW)

**Ana Paula Batista MASSENO¹, Camila Dias PORTO¹, Louisiane de Carvalho NUNES²,
Julio Lopes SEQUEIRA³, Marco Antônio ALVARENGA³**

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

2 Docente do Centro de Ciência 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

MIOFIBROBLASTOS: REVISÃO DE LITERATURA
(MYOFIBROBLASTS: A REVIEW)
MIOFIBROBLASTOS: REVISIÓN DE LA LITERATURA

1. RESUMO

A cicatrização é um fenômeno complexo que restabelece a integridade morfológica e funcional de qualquer tecido ou órgão lesado. A reconstituição consiste numa perfeita e ordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a recomposição do tecido. Os fibroblastos são as principais células envolvidas na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular. A endometrite é uma importante causa de subfertilidade na égua. Infecções uterinas persistentes ou repetidas levam ao desenvolvimento de fibrose periglandular. A biópsia uterina é um método diagnóstico auxiliar importante na reprodução equina. Algumas alterações uterinas, como a fibrose periglandular e as endometrites não purulentas, só são diagnosticadas por meio de uma biópsia uterina. Os miofibroblastos são componentes importantes durante a reparação do tecido lesionado e aparecem após o término dos fenômenos inflamatórios iniciais. Miofibroblastos expressando α -actina de músculo liso (α -SMA) não só promovem a contração, mas também sintetizam níveis elevados de proteases degradantes da matriz extracelular. No endométrio equino, os fibroblastos que circundam as glândulas uterinas fibróticas nas endometroses mostram forte imunoreatividade para actina de músculo liso- α .
Palavras-chave: endométrio, equino, α -SMA, miofibroblasto.

2. ABSTRACT

The healing is a complex phenomenon which restores the morphological and functional integrity of any tissue or organ injured. The recovery is a perfect and orderly cascade of cellular and molecular events that interact to have the rebuilding of tissue. The fibroblasts are the main cells involved in wound healing and have the main function to maintain the integrity of the tissue, the synthesis of components of extracellular matrix. The endometritis is a major cause of subfertility in the mare. Uterine persistent or repeated infections lead to the development of fibrosis periglandular. The uterine biopsy is an important diagnostic aid in equine reproduction. Some uterine changes such as fibrosis periglandular and not purulent endometritis, are only diagnosed by means of a uterine biopsy. The

myofibroblasts are important components for the repair of injured tissue and appear after the end of the initial inflammatory phenomena. Myofibroblasts expressing α -actin of smooth muscle (α -SMA) promotes not only the contraction but also synthesize high levels of proteases degrading the extracellular matrix. Equine endometrium in the fibroblasts surrounding the uterine glands in the fibrotic endometroses to show strong immunoreactivity for smooth muscle actin.

Key words: endometrium, equine, α -SMA, myofibroblasts.

3. RESUMEN

La curación es un fenómeno complejo que se restaura la integridad morfológica y funcional de cualquier tejido u órgano lesionado. La recuperación es una perfecta y ordenada cascada de eventos celulares y moleculares que interactúan de manera que la reconstrucción del tejido se produce. Los fibroblastos son las principales células implicadas en la cicatrización de la herida y el papel principal en el mantenimiento de la integridad del tejido conjuntivo, la síntesis de los componentes de la matriz extracelular. La endometritis es una de las principales causas de la subfertilidad en la yegua. Uterino persistente o repetidas infecciones llevar al desarrollo de la fibrosis periglandular. La biopsia de útero es un importante diagnóstico de ayuda en la reproducción equina. Algunos cambios uterinos como la fibrosis periglandular endometritis y no purulenta, sólo se diagnostica por medio de una biopsia de útero. Los miofibroblastos son importantes componentes para la reparación del tejido lesionado y aparecen después de la final de la inicial de los fenómenos inflamatorios. Miofibroblastos expresando α -actina del músculo liso (α -SMA) promueve no sólo la contracción, sino también una síntesis de altos niveles de proteasas de la matriz extracelular degradantes. Equina en el endometrio uterino fibroblastos que rodean las glándulas en la fibrosis endometroses mostrar fuerte inmunorreactividad para actina del músculo liso.

Palabras-clave: endometrio, equina, α -SMA, miofibroblastos.

4. INTRODUÇÃO

A cicatrização é um fenômeno complexo que restabelece a integridade morfológica e funcional de qualquer tecido ou órgão lesado. A reconstituição consiste numa perfeita e ordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a recomposição do tecido (MARTIN e LEIBOVICH, 2005).

Os fibroblastos são as principais células envolvidas na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Os fibroblastos são estimulados a produzir e a depositar componentes da matriz extracelular e, na pele, esses eventos são necessários para permitir e promover a reepitelização (AMADEU et al., 2003). Eles são suscetíveis a alterações devido às forças mecânicas as quais são submetidos durante situações patológicas ou fisiológicas e, assim, organizam as fibras colágenas e estão diretamente relacionados à formação do tecido de granulação. Além de produzirem colágeno, os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico da célula (HILDEBRAND et al., 2005).

Fibroblastos são células mesenquimais encontradas no estroma de variados tecidos. No pulmão adulto normal, podem ser encontradas na adventícia de estruturas vasculares e vias aéreas. Apresentam morfologia fusiforme e expressam colágeno intersticial (tipos I e III), mas não expressam marcadores de outras células diferenciadas. Estudos sugerem a sua importância no desenvolvimento e presumivelmente em regeneração, manutenção de células-tronco, cicatrização, lesão tecidual e reparação / remodelação / fibrose (PHAN, 2008).

Durante a formação do tecido de granulação, fibroblastos e células endoteliais se movem para o interior da ferida, produzindo matriz extracelular e angiogênese (SINGER e CLARK, 1999). Muitos destes fibroblastos adquirem alguns aspectos morfológicos e bioquímicos de células musculares lisas, sendo denominados miofibroblastos (DESMOULIE`RE e GABBIANI, 1996). Os miofibroblastos participam na síntese da matriz extracelular e na produção de força mecânica, com influência na reorganização da matriz e na contração da ferida (TOMASEK et al., 2002). Segundo Gabbiani (2003), sua atividade contrátil é responsável pelo fechamento das feridas após as lesões, processo conhecido como contração da ferida.

Os fibrócitos são fibroblastos inativos cuja atividade celular é o desenvolvimento da fibrose (BANKS, 1992). Eles são considerados importantes no processo cicatricial por participarem do mecanismo de formação dos granulomas, na atividade antigênica, na produção de colágeno e na formação de matriz protéica, e na inflamação como fonte rica de citocinas (ABE et al., 2001; QUAN, 2004). Além disso, produzem fatores de crescimento, fatores angiogênicos, contribuindo para a formação de novos vasos sanguíneos e no surgimento de desordens fibróticas (METZ, 2002; QUAN, 2004).

Durante a cicatrização, os fibrócitos podem ser recrutados do tecido adjacente não-lesado se revertendo para o estado de fibroblasto e reativando sua capacidade de síntese (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Os fibrócitos podem ser encontrados em vários tecidos, tanto em condições

fisiológicas quanto patológicas (BUCALA et al., 1994). Eles são derivados de precursores da medula óssea e contribuem para a presença de miofibroblastos no tecido cicatricial (MORI et al., 2005).

4.1. FUNÇÃO DOS MIOFIBROBLASTOS

Os miofibroblastos são componentes importantes durante a reparação do tecido lesionado e aparecem após o término dos fenômenos inflamatórios iniciais (GABBIANI et al., 1971).

Na maioria dos órgãos, a lesão tecidual ativa fibrócitos locais que na presença dos fatores de crescimento derivados dos macrófagos se diferenciam em miofibroblastos contráteis, que são caracterizados pela expressão da α -actina de músculo liso (α -SMA) (TOMASEK et al., 2002; GABBIANI, 2003).

Segundo Shi Y (1996), quando as lesões ocorrem em locais onde não se encontram os fibrócitos, como nas paredes arteriais ou na córnea, os miofibroblastos são provenientes das células musculares lisas adjacentes (VSMCs) ou queratinócitos, respectivamente (JESTER, 2002). Miofibroblastos também são encontrados em condições patológicas caracterizadas por fibrose e arteriosclerose assim como durante a invasão e crescimento de tumores (HEUGHAN, 1980; DE WEVER, 2002; GABBIANI, 2003). Em tecidos lesado e não lesado, a positividade destas células para α -SMA sinalizam um remodelamento do tecido e representam ações alvos para intervenções terapêuticas (TOMASEK et al., 2002).

4.2. HETEROGENEIDADE DOS FIBROBLASTOS

As lesões fibróticas, se destacam pela predominância de fibroblastos, ou de células com características morfológicas semelhantes aos fibroblastos (KATZENSTEIN et al., 1998). No entanto, devido à expressão de diferentes fatores, incluindo o colágeno tipo I, Thy-1, a α -actina de músculo liso (α -SMA), a cicloxigenase (COX)-2, a telomerase e a caveolina-1 estas células parecem ser heterogêneas, talvez representando subpopulações distintas (DERDAK et al., 1992; WANG et al., 2006).

Recentes estudos indicam a existência de subtipos distintos de fibroblastos em regiões diferentes do corpo, baseados em testes do padrão da expressão genética (CHANG et al., 2002). Este fato ressalta a presença de diferentes progenitores que poderiam gerar diferentes fenótipos durante a resposta do tecido à lesão. Em todo caso, a notável diferenciação dos subtipos dos fenótipos, pode ser importante na indução da fibrose em tecidos lesados, como acontece Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI) (ZHANG

et., 1994). Dessa forma, os fibroblastos que expressam a α -actina de músculo liso (α -SMA), denominados de miofibroblastos, são reconhecidos como a fonte principal de colágeno tipo I e de citocinas fibrogênicas/inflamatórias nas lesões fibróticas (ZHANG et al., 1994; PHAN, 2002). A deficiência de caveolina-1 está associada com o desenvolvimento de lesões fibróticas no pulmão, enquanto que a sua expressão determina alguma proteção contra fibrose (WANG et al., 2006).

A expressão negativa de Thy-1 e caveolina-1 por fibroblastos ou células que apresentem característica morfológicas de fibroblastos, está associada com a fibrose pulmonar, no entanto estes marcadores não são expressos pelos miofibroblastos (HAGOOD et al., 2005; WANG et al., 2006), determinando seu papel no desenvolvimento da fibrose. O significado da expressão da telomerase em uma determinada subpopulação, que seja distinta dos miofibroblastos ainda não foi elucidado (NOZAKI et al., 2000; LIU et al., 2002; LIU et al., 2006). Este tipo de análise do fenótipo de fibroblastos determinou o papel fisiopatológico, destas diferentes subpopulações no processo fibrótico, sugerindo sua possível interação, como ocorre na fibrose pulmonar. Estes distintos fenótipos podem representar diferentes fases de diferenciação dos miofibroblastos resultantes de subpopulações progenitoras variadas. Em função disso, uma rigorosa e completa análise destes subtipos ou subpopulações diferenciadas de fibroblastos, podem fornecer informações sobre a patogênese da fibrose em resposta a certos tipos de lesão pulmonar.

4.3. SUBPOPULAÇÕES DIFERENCIADAS DE FIBROBLASTOS

As subpopulações diferenciadas de fibroblastos descritas acima podem contribuir para a resposta fibrótica conforme a característica de seus respectivos fenótipos. Devido a capacidade dos miofibroblastos poderem expressar elevados níveis de citocinas, matriz extracelular e α -actina de músculo liso (α -SMA), estas células podem desempenhar funções fundamentais na inflamação e na deposição de tecido conectivo (PHAN, 2002). O aumento da sobrevivência destas células pode resultar numa expansão da população precursora, com potencial de se diferenciarem em miofibroblastos sobre a influência do Fator Transformante do Crescimento (TGF)- β , que é altamente expresso em lesões fibróticas. Como alternativa, ou adicionalmente, o aumento da sobrevivência das células telomerase positivas pode contribuir para a produção de citocinas fibrogênicas ou mediadores que poderiam, então, estimular a diferenciação em miofibroblastos progenitores (WANG et al., 2006). Inversamente, a expressão reduzida da telomerase pelos fibroblastos é relatada na Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI) em tecido pulmonar normal.

O papel anti-fibrótico da caveolina-1 é confirmado pelo aumento da sua expressão, e dessa forma suprimindo a diferenciação dos miofibroblastos, sendo que, a sua deficiência resulta em fibrose pulmonar.

A diminuição da expressão da COX-2 pelos fibroblastos também é característica na Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI). Isto se explica pelo caso, pela ação anti-fibrótica da COX-2, via elaboração de prostanóides, que são conhecidos pela capacidade de inibirem a produção de colágeno, bem como a proliferação de fibroblastos (WILBORN, 1995).

Assim a presença de três dessas características, ou seja, expressão de baixos níveis de Thy-1, Caveolina-1 ou de Cox-2 orientam sua diferenciação para um fenótipo fibrótico. Portanto, esta célula apresenta a perda de características do fenótipo antifibrótico.

A perda de propriedades anti-fibróticas sugere que, em tecidos normais, mecanismos ativos para suprimir a fibrose constitutiva, têm importância na manutenção da homeostase tecidual. Conseqüentemente, a perda ou a desregulação nestes mecanismos homeostáticos ativos teriam influência na patogênese da fibrose. A função do fibroblasto na fibrose é elaboração da matriz extracelular e, talvez, a elaboração de citocinas e da regulação das propriedades mecânicas do tecido. Entretanto, no contexto da interferência fibroblasto-epitelial, como postulado para componentes celulares dos focos fibróticos, estudos recentes confirmam que os elementos fibroblásticos têm influência considerável sobre fenótipo epitelial (CHANG et al., 2002 ; YAMAGUCHI et al., 2004).

5. ORIGEM DO MIOFIBROBLASTO

Já foi demonstrado que os miofibroblastos presentes nas lesões teciduais podem determinar o recrutamento local de fibroblastos da derme circunvizinha e do tecido subcutâneo (ROSS et al., 1970). Pericitos ou células musculares lisas da parede vascular representam outra possível fonte de miofibroblastos. Durante a fibrogênese renal, foi demonstrado que fibroblastos surgem em grande número da transição epitelial-mesenquimal local. Células precursoras, denominadas fibrócitos migram na ferida e contribuem para a formação da população miofibroblástica do tecido de granulação (BUCALA et al., 1994).

A reação estromal, reconhecida em diversos tumores epiteliais, tem como um de seus componentes os miofibroblastos. Estes interagem com as células tumorais do tecido, controlando fenômenos tais como a capacidade de invasão e a angiogênese. (OLASO et al., 2003; DE WEVER et al., 2004).

Estas células podem, quando estimuladas pelo TGF- β 1, ser induzidas expressarem α -SMA (ABE et al., 2001). Estudos demonstram que fibrócitos circulantes representam uma importante fonte de fibroblastos durante a cicatrização de feridas extensas, nas quais a migração para os bordos da lesão seja dificultada (YANG et al., 2002).

5.1. DIFERENCIAÇÃO DOS MIOFIBROBLASTOS

O miofibroblasto é responsável pelas principais características da fibrose ativa por sua capacidade em expressar elevados níveis de citocinas fibrogênicas, contribuindo para alteração das propriedades do tecido afetado. Há evidências de que a produção de colágeno pelos fibroblastos, em função do estímulo do TGF- β , seja uma consequência da diferenciação do miofibroblasto (PETROV et al., 2002). Além disso, este efeito sobre a produção de colágeno é irreversível, persistindo mesmo após a remoção do TGF- β . Isto indica que o aumento da expressão gênica da matriz seja uma característica fenotípica do miofibroblasto. Recentemente, foi relacionada à expressão da α -actina de músculo liso (α -SMA) a inibição do Fator de Crescimento do Tecido Conectivo (CTGF), que está associada com a reduzida translocação nuclear do Fator Nuclear (NF)- κ B (CHAQOUR et al., 2006). Assim a manifestação da α -actina de músculo liso (α -SMA) expressando seu fenótipo pode ser crucial para aquisição de características do miofibroblasto totalmente diferenciado, o que pode representar um avanço importante na indução e progressão da fibrose.

Além de ser um dos principais marcadores na diferenciação do miofibroblasto e do seu papel na regulação da expressão gênica do colágeno e CTGF, a α -actina de músculo liso (α -SMA) tem importância também nas interações com sinalização dos componentes de transcrição de genes diferentes (CHAQOUR et al., 2006; WANG et al., 2005; FURUKAWA et al., 2003).

Esta interação com a sinalização de componentes e/ou fatores de transcrição pode facilitar a translocação nuclear de fatores, bem como a localização de componentes para boa sinalização. A ativação da p38 induzida por estresse sobre as células exige a presença de α -actina de músculo liso (α -SMA) (WANG et al., 2005).

A p38 é uma enzima caracterizada pela regulação de várias citocinas, sendo ativada por células do sistema imune citocinas inflamatórias e tem um importante papel na resposta imunológica (JOHNSON e LAPADAT, 2002). Similar à mediação da sinalização de TGF- β pela p38, o princípio acima mencionado da expressão de CTGF pela α -actina de músculo liso (α -SMA) é igualmente dependente da p38 (CHAQOUR et al., 2006). Estes mecanismos mediados pela p38 que promovem a

diferenciação do miofibroblasto podem servir de base para os inibidores da p38, e dessa forma suprime a fibrose pulmonar em modelos experimentais em animais (MATSUOKA et al., 2002).

O efeito conhecido do TGF- β na expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) ocorre na diferenciação dos miofibroblastos sugere a importância da associação do TGF- β . Estudos *in vitro*, indicam a importância do gene Smad3 na expressão da α -actina de músculo liso (α -SMA) pelos fibroblastos do pulmão (HU et al., 2003). Por outro lado, estudos *in vivo*, mostram que a deficiência de Smad3 conduz a uma significativa redução na fibrose pulmonar (HU et al., 2007).

Distintos fenótipos de fibroblastos foram recuperados a partir de tecidos submetidos à remodelação ou fibrose, com muitas propriedades que sugerem a sua contribuição para o processo fibrótico. Suas origens, as potenciais interrelações, interações e os mecanismos que deram origem a esses fenótipos foram caracterizados de forma limitada, em uma forma compartimentada, que impede a plena compreensão do seu papel exato na patogênese das doenças fibróticas progressivas (ADAM et al., 2000).

6. FATORES ENVOLVIDOS NA DIFERENCIAÇÃO MIOFIBROBLÁSTICA

O miofibroblasto foi identificado inicialmente por meio da microscopia eletrônica de transmissão no tecido de granulação e nas cicatrizes como um fibroblasto modificado, exibindo características de células de músculo liso, tais como agrupamentos de microfilamentos (GABBIANI et al., 1971). A partir daí a presença de miofibroblastos foi descrita sucessivamente em praticamente todos os processos fibróticos caracterizados pela retração do tecido e pela remodelação (DESMOULIE'RE et al., 2003). Pesquisas têm contribuído para definir essas células morfológicamente, ao demonstrarem que suas estruturas contráteis são representadas por filamentos de actina, e bioquimicamente, mostrando que a atividade das fibras expressam proteínas contráteis típicas de células de músculo liso, em particular de células musculares lisas vasculares, tais como α -actina de músculo liso (α -SMA) (DARBY et al., 1990). Atualmente se admite que a diferenciação miofibroblástica dos fibroblastos tenha início no protomiofibroblasto, cujos filamentos de actina contêm somente actinas β - e α -citoplasmáticas e evoluem, mas não necessariamente sempre, para o miofibroblasto diferenciado que possui filamentos que contêm α -SMA (TOMASEK et al., 2002). Miofibroblastos podem, de acordo com situações clínicas ou experimentais, expressarem outras proteínas contráteis de células de músculo liso, tais como miosina-MS que representa o principal marcador seguro do fenótipo miofibroblástico (TOMASEK et al., 2002).

A modificação a partir de protomiofibroblastos diferenciados para os miofibroblastos têm sido relacionados com a produção pelas células inflamatórias e, possivelmente, por fibroblastos, de Fator Transformador de Crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (DESMOULIE`RE et al., 1993). Mais recentemente, os mecanismos pelos quais a trombina e endotelina-1 são capazes de promover a indução do miofibroblasto têm sido investigados (BOGATKEVICH et al., 2001; SHI-WEN et al., 2004). Além disso, está sendo cada vez mais aceita a hipótese de que os fatores mecânicos desempenham um papel importante em ambas as transições (HINZ e GABBIANI, 2003).

A questão relativa à reversibilidade da diferenciação dos miofibroblastos é importante. Fibroblastos remanescentes no tecido de granulação, após a reepitelização, reverteram a um fenótipo quiescente, não contrátil e que não apresenta os microfilamentos que estiveram presentes durante o processo cicatricial. Entretanto, esta modulação positiva e negativa do fenótipo do miofibroblasto ainda não foi claramente demonstrada *in vivo*, embora a reversão do fenótipo já tenha sido observada *in vitro*. Além disso, considera-se que os fibroblastos residuais representem uma subpopulação de células que não evoluíram até o fenótipo de miofibroblasto durante o processo de cicatrização, e assim resistem (DESMOULIE`RE et al., 2005).

7. PAPEL DO MIOFIBROBLASTO NA CONTRAÇÃO DA FERIDA

Recentemente, foi demonstrada uma participação importante da α -actina de músculo liso (α -SMA) na produção de miofibroblasto *in vitro*, utilizando modelos que envolvem fibroblastos cultivados em substratos flexíveis e flutuantes utilizados em experimentos que envolvem o processo cicatricial de feridas em ratos (HINZ et al., 2001). Células expressando esta proteína, ou seja, diferenciadas em miofibroblastos, possuem uma forte atividade retrátil, em comparação aos protomiofibroblastos que apresentam ausência de qualquer outra alteração na expressão da proteína contrátil (KATOH et al., 2001; BOGATKEVICH et al., 2003).

7.1. CONTRAÇÃO MIOFIBROBLÁSTICA E FORMAÇÃO HIPERTRÓFICA DA CICATRIZ

Um dos problemas importantes que não foram solucionados no entendimento da biologia do miofibroblasto é a evolução da diferenciação e na sua persistência nos eventos patológicos que envolvem cicatrizes hipertróficas e desenvolvimento da fibrose. Nas cicatrizes hipertróficas é intensa a expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) pelos miofibroblastos, sendo que estes estão envolvidos na contratilidade da cicatriz. Uma possível hipótese é a inibição da apoptose destas células

que caracteriza uma fase terminal da cicatrização da ferida (DESMOULIE`RE et al, 1995). No entanto, esta hipótese ainda não foi confirmada em situações clínicas e não existem modelos animais experimentais confiáveis de cicatrizes hipertróficas. Além disso, mesmo que os miofibroblastos sofram apoptose durante a cicatrização, pouco se conhece sobre os mecanismos que regulam este fenômeno nestas células. O ponto de partida para esta morte celular pode estar relacionada a redução da concentração de fatores tróficos locais, devido a reepitelização e depleção de células inflamatórias que ocorrem após a cicatrização de feridas. A remodelação da matriz extracelular pelas metaloproteinases (MMPs) pode também desempenhar um papel importante, interferindo na aderência do miofibroblasto à matriz extracelular como têm sido sugeridos por estudos sobre a regressão de tecido de granulação na pele (DARBY et al., 2002).

No início do reparo, o equilíbrio entre MMPs como collagenases e gelatinases e seus inibidores teciduais endógenos de metaloproteinases (TIMPs), favorece a produção da matriz extracelular. Mais tarde, na cicatriz em remodelação, é possível que esta tendência mude e favoreça a degradação da matriz. Como mencionado anteriormente, esta mudança pode ser o aumento na apoptose. Alterações no estresse físico causado pelo estiramento do tecido de granulação podem também contribuir para a perda de células pelo mecanismo apoptótico como têm sido sugerido em estudos *in vitro* sobre a estrutura do colágeno derivado dos fibroblastos (GRINNELL, 2003). A persistência de queratinócitos ativados tem sido observada na epiderme que recobre cicatrizes hipertróficas, o que implica em interações epidérmico-mesenquimais anormais, sugerindo que os mecanismos celulares envolvidos na patogênese das cicatrizes hipertróficas sejam mais complexos do que fenômenos cutâneos isolados (MACHESNEY et al., 1998). Contudo, recentemente respostas diferentes a indutores apoptóticos foram observadas entre a pele normal ferida e miofibroblastos de cicatrizes hipertróficas, confirmando a hipótese de defeitos no mecanismo de apoptose e de crescimento durante a formação da cicatriz patológica, impedindo o desaparecimento do miofibroblasto no final do processo de cicatrização (MOULIN et al., 2004).

7.1.2. CONTRAÇÃO E FIBROSE

O processo adequado de reparação do tecido conjuntivo, num determinado órgão exige a adequada reconstituição da sua função. Miofibroblastos expressando α -actina de músculo liso (α -SMA) não só promovem a contração, mas também sintetizam níveis elevados de proteases degradantes da matriz extracelular. Os estudos sobre miofibroblastos sugerem essa possibilidade para os tecidos adultos e indicam novos mecanismos possíveis para esta ação. As interações entre miofibroblastos e a

matriz extracelular desempenham um papel importante nas propriedades mecânicas do tecido e, a persistência de miofibroblastos na lesão leva à fibrose cicatricial excessiva com comprometimento funcional do órgão afetado (HINZ e GABBIANI, 2003). Curiosamente, foi demonstrado que em alguns processos que levam a cirrose hepática anteriormente considerados como processos irreversíveis, podem ser remodelados com a diminuição da expressão do colágeno tipo I e TIMP, a ativação das MMPs e a apoptose de miofibroblastos (ISSA et al., 2004).

No fígado, como em muitos órgãos, diferentes subpopulações de células fibroblásticas podem adquirir o fenótipo miofibroblástico (por exemplo, células hepáticas estreladas – células de Ito - e fibroblastos portais). Dessa forma, supõe-se que nestas diferentes populações, os mecanismos que conduzem a expressão da α -SMA e a persistência em situações patológicas sejam diferentes. Dentre as células capazes de expressarem α -SMA, podemos distinguir células fibroblásticas e células “pericyte-like”. Estas últimas podem modular a expressão de α -SMA em resposta a alterações da pressão arterial. No entanto, ambas as populações podem ser envolvidas em processos fibróticos. É importante ressaltar que, nos diferentes órgãos os fibroblastos representam uma população heterogênea de células definidas de acordo com sua localização no órgão (KOUMAS et al., 2003; SORRELL e CAPLAN, 2004). Entre essas populações, diferenças fenotípicas são óbvias, como exemplo, a síntese de matriz extracelular e remodelação, a produção de fatores de crescimento e citocinas, e de envolvimento em processos de reparação de tecido. Esta distinção entre subtipos de fibroblastos tem importantes consequências no tecido normal ou na formação excessiva de cicatriz.

8. FIBROBLASTOS PROGENITORES DOS MIOFIBROBLASTOS NO PULMÃO

Recentes pesquisas relacionadas à plasticidade em células-tronco têm indicado a possibilidade de que células mesenquimais possam surgir a partir de células progenitoras na medula óssea ou de células-tronco adultas da medula óssea, o que já foi relatado para células epiteliais e outros tipos de células diferenciadas. No caso do pulmão, as células-tronco mesenquimais derivadas da medula, possuem ação protetora contra a fibrose (ORTIZ et al., 2007). No entanto, outros estudos têm revelado que fibroblastos ou “fibroblast-like cells” obtidas a partir da medula óssea parecem promover a fibrose neste órgão (LAMA e PHAN, 2006). Estudos utilizando células da medula óssea de ratos para detectar a migração de progenitores de medula óssea, indicam infiltração de “fibroblast-like cells” em tecidos em remodelação (HASHIMOTO et al., 2007; KISSELEVA et al., 2006). Esta conclusão é coerente com a presença de fibroblastos derivados de fibrócitos circulantes detectados em estudos em modelos animais (ABE et al., 2002; PHILLIPS et al., 2004). No entanto, existem dúvidas no que diz respeito ao fenótipo de células “fibroblast-like”, a célula que é recrutada na fibrose pulmonar. Alguns estudos

utilizando marcadores de fibrócitos (CD34, CD45 e colágeno I) determinam uma fonte significativa de miofibroblastos em pulmões fibróticos (SCHMIDT et al., 2003; PHILLIPS et al., 2004). A presença de fibroblastos no tecido como uma fonte de miofibroblastos foi bem documentada em tecidos, primeiramente por estudos destas células em cultivo de tecido, no qual a diferenciação em miofibroblasto pode ser induzida pelo tratamento com TGF- β e outras citocinas. Isto implica na presença no pulmão de células progenitoras do miofibroblasto normal ou de células pluripotentes mesenquimais progenitoras, ou mesmo de células epiteliais e de transição endotelial-mesenquimal (ZHANG et al., 1994; IWANO et al., 2002; FRID et al., 2002; HINZ et al., 2007; LAMA et al., 2007). A real contribuição destes mecanismos para a população total de miofibroblastos permanece incerta, especialmente *in vivo*.

9. CONCLUSÃO

A cicatrização é um elemento complexo que restabelece a integridade morfológica e funcional de qualquer tecido ou órgão lesado. Os fibroblastos são células mesenquimais localizadas no estroma dos tecidos, estão envolvidos na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular.

Durante o processo de formação do tecido de granulação, fibroblastos e células endoteliais se movem para o interior da ferida, sendo que alguns destes fibroblastos sofrem diferenciação morfológica e bioquímica, adquirindo características de células musculares lisas, sendo denominados miofibroblastos.

Os miofibroblastos participam na síntese da matriz extracelular e na produção de força mecânica, com influência na reorganização da matriz e na contração da ferida.

A lesão tecidual ativa fibrócitos locais que na presença dos fatores de crescimento derivados dos macrófagos se diferenciam em miofibroblastos contráteis, que são caracterizados pela expressão da α -actina de músculo liso (α -SMA).

Estudos sugerem a existência de subtipos distintos de fibroblastos em regiões diferentes do corpo, baseados em testes do padrão da expressão genética. Este fato ressalta a presença de diferentes progenitores que poderiam gerar diferentes fenótipos durante a resposta do tecido à lesão. Estas subpopulações diferenciadas de fibroblastos podem contribuir para a resposta fibrótica conforme a característica de seus respectivos fenótipos.

Sendo assim, é de extrema importância a investigação detalhada referente ao significado da presença de miofibroblastos nas lesões fibróticas, para que se possa estabelecer o papel desempenhado por estas células.

10. REFERÊNCIAS

- ABE, R.; DONNELLY, S.C.; PENG, T.; BUCALA, R.; METZ, C.N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. **The Journal Immunology**, v. 166, p.7556–7562, 2001.
- ADAM, P.J.; REGAN, C.P.; HAUTMANN, M.B.; OWENS, G.K. Positive- and negative-acting Kruppel-like transcription factors bind a transforming growth factor beta control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22alpha in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p.37798–37806, 2000.
- AMADEU, T.P.; COULOMB B, B.; DESMOULIERE, A.; COSTA, A.M.A. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v.2, n.2, p.60-68, 2003.
- BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 629.
- BOGATKEVICH, G.S.; TOURKINA, E.; SILVER, R.M.; LUDWICKA-BRADLEY, A. Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.45184–4592, 2001.
- BOGATKEVICH, G.S.; TOURKINA, E.; ABRAMS, C.S.; HARLEY, R.A.; SILVER, R.M.; LUDWICKA-BRADLEY, A. Contractile activity and smooth muscle alpha actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.52, p. 82–90, 2003.
- BUCALA, R.; SPIEGEL, L.A.; CHESNEY, J.; HOGAN, M.; CERAMI, A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. **Molecular Medicine**, v.1, p.71–81, 1994.
- CHAQOUR, B.; YANG, R.; SHA, Q. Mechanical stretch modulates the promoter activity of the profibrotic factor CCN2 through increased actin polymerization and NF-kappaB activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p.20608–20622, 2006.
- CHANG, H.Y.; CHI, J.T.; DUDOIT, S.; BONDRE, C.; VAN DE RIJN, M.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, p.12877–12882, 2002.
- DARBY, I.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Laboratory Investigation**, v.63, p.21–29, 1990.
- DARBY, I.A.; BISUCCI, T.; PITTET, B.; GARBIN, S.; GABBIANI, G.; DESMOULIE`RE, A. Skin flap induced regression of granulation tissue correlates with reduced growth factor and increased metalloproteinase expression. **The Journal of Pathology**, v.197, p.117–27, 2002.

DE WEVER, O.; MAREEL, M. Role of myofibroblasts at the invasion front. **Journal of Biological Chemistry**, v.383, p.55–67, 2002.

DE WEVER, O.; WESTBROEK, W.; VERLOES, A.; BLOEMEN, N.; BRACKE, M.; GESPACH, C.; BRUYNEEL, E.; MAREEL, M. Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF- β or wounding. **Journal of Cell Science**, v.117, p.4691–4703, 2004.

DERDAK, S.; PENNEY, D.P.; KENG, P.; FELCH, M.E.; BROWN, D.; PHIPPS, R.P. Differential collagen and fibronectin production by Thy 11 and Thy 12 lung fibroblast subpopulations. **American Journal Physiology**, v.263, p.283–290, 1992.

DESMOULIE`RE, A.; GEINOZ, A.; GABBIANI, F.; GABBIANI, G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, v.122, p.103–111, 1993.

DESMOULIE`RE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **American Journal of Pathology**, v.146, p.56–66, 1995.

DESMOULIÈRE, A.; GABBIANI, G. The role of myofibroblasts in wound healing and fibrocontractive diseases. In: CLARK, R.A.F. (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum, 1996. p.391–423.

DESMOULIE`RE, A.; DARBY, I.A.; GABBIANI, G. Normal and pathological soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. **Laboratory Investigation**, v.83, p.1689–1707, 2003.

DESMOULIE`RE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. **Wound Repair and Regeneration**, v.13, p.7–12, 2005.

FRID, M.G.; KALE, V.A.; STENMARK, K.R. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. **Circulation Research**, v.90, p.1189–1196, 2002.

FURUKAWA, F.; MATSUZAKI, K.; MORI, S.; TAHASHI, Y.; YOSHIDA, K.; SUGANO, Y.; YAMAGATA, H.; MATSUSHITA, M.; SEKI, T.; INAGAKI, Y. p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. **Hepatology**, v.38, p.879–889, 2003.

GABBIANI, G.; RYAN, G.B.; MAJNE, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia**, v.27, p.549–550, 1971.

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **American Journal of Pathology**, v.200, p.500–503, 2003.

GRINNELL, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. **Trends in Cell Biology**, v.13, p.264–269, 2003.

HASHIMOTO, N.; JIN, H.; LIU, T.; CHENSUE, S.W.; PHAN, S.H. Bone marrow derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.113, p.243–252, 2004.

HAGOOD, J.S.; PRABHAKARAN, P.; KUMBLA, P.; SALAZAR, L.; MACEWEN, M.W.; BARKER, T.H.; ORTIZ, L.A.; SCHOEB, T.; SIEGAL, G.P.; ALEXANDER, C.B. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. **American Journal of Pathology**, v.167, p.365–379, 2005.

HEUGHAN, C.; NIINIKOSKI, J.; HUNT, T.K. Atherosclerosis and healing. In: HUNT, T.K. (Ed). **Wound healing and wound infection**. Theory and surgical practice. New York: Appleton Century Crofts, 1980. p. 72-80.

HILDEBRAND, K.A.; GALLANT-BEHM, C.L.; KYDD, A.S.; HART, A.D. The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v.13, p.136-144, 2005.

HINZ, B.; CELETTA, G.; TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; CHAPONNIER, C. α -Smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. **Molecular Biology of the Cell**, v.12, p.2730–2741, 2001.

HINZ, B.; GABBIANI, G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. **Current Opinion Biotechnology**, v.14, p.538–546, 2003.

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

HU, B.; WU, Z.; PHAN, S.H. Smad3 mediates transforming growth factor β -induced α -smooth muscle actin expression. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.29, p.397–404, 2003.

HU, B.; WU, Z.; LIU, T.; ULLENBRUCH, M.R.; JIN, H.; PHAN, S.H. Gut-enriched Kruppel-like factor interaction with Smad3 inhibits myofibroblast differentiation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.36, p.78–84, 2007.

ISSA, R.; ZHOU, X.; CONSTANDINO, C.M.; FALLOWFIELD, J.; MILLWARD-SADLER, H.; GACA, M.D.; SANDS, E.; SULIMAN, I.; TRIM, N.; KNORR, A.; ARTHUR, M.J.; BENYON, R.C.; IREDALE, J.P. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix crosslinking. **Gastroenterology**, v.126, p.1795–1808, 2004.

IWANO, M.; PLIETH, D.; DANOFF, T.M.; XUE, C.; OKADA, H.; NEILSON, E.G. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.110, p.341–350, 2002.

JESTER, J.V.; HUANG, J.; PETROLL, W.M.; CAVANAGH, H.D. TGF β induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGF β , PDGF and integrin signaling. **Experimental Eye Research**, v.75, p.645–657, 2002.

JOHNSON, G.L.; LAPADAT, R. Mitogen-Activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. **Science**, v. 298, p.1911-1912, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.p.488.

KATOH, K.; KANO, Y.; AMANO, M.; ONISHI, H.; KAIBUCHI, K.; FUJIWARA, K. Rho-kinase-mediated contraction of isolated stress fibers. **The Journal of Cell Biology**, v.153, p.569–584, 2001.

KATZENSTEIN, A.A.; MYERS, J.L. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.157, p.1301–1315, 1998.

KISSELEVA, T.; UCHINAMI, H.; FEIRT, N.; QUINTANA-BUSTAMANTE, O.; SEGOVIA, J.C.; SCHWABE, R.F.; BRENNER, D.A. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v.45, p.429–438, 2006.

KOUMAS, L.; SMITH, T.J.; FELDON, S.; BLUMBERG, N.; PHIPPS, R.P. Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes. **American Journal of Pathology**, v.163, p.1291–1300, 2003.

LAMA, V.N.; PHAN, S.H. The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/ progenitor cells and beyond. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v.3, p.373–376, 2006.

LAMA, V.N.; SMITH, L.; BADRI, L.; FLINT, A.; ANDREI, A.C.; MURRAY, S.; WANG, Z.; LIAO, H.; TOEWS, G.B.; KREBSBACH, P.H.; PETERS-GOLDEN, M.; PINSKY, D.J.; MARTINEZ, F.J.; THANNICKAL, V.J. et al. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, p.989–996, 2007.

LIU, T.; ULLENBRUCH, M.; NOZAKI, Y.; PHAN, S.H. Regulation of telomerase activity in lung fibroblasts. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.26, p.534–540, 2002.

LIU, T.; HU, B.; CHUNG, M.J.; ULLENBRUCH, M.; JIN, H.; PHAN, S.H. Telomerase regulation of myofibroblast differentiation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.34, p.625–633, 2006.

MACHESNEY, M.; TIDMAN, N.; WASEEM, A.; KIRBY, L.; LEIGH, I. Activated keratinocytes in the epidermis of hypertrophic scars. **American Journal of Pathology**, v.152, p.1133–1141, 1998.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology**, v.20, p.599–607, 2005.

MATSUOKA, H.; ARAI, T.; MORI, M.; GOYA, S.; KIDA, H.; MORISHITA, H.; FUJIWARA, H.; TACHIBANA, I.; OSAKI, T.; HAYASHI, S. A p38 MAPK inhibitor, FR-167653, ameliorates murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.283, p.L103–L112, 2002.

METZ, C.N. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.60, p.1342–1350, 2002.

MORI, L.; BELLINI, A.; STACEYM M.A.; SCHMIDT, M.; MATTOLI, S. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. **Experimental Cell Research**, v.304, p.81-90, 2005.

MOULIN, V.; LAROCHELLE, S.; LANGLOIS, C.; THIBAUT, I.; LOPEZ-VALLE, C.A.; ROY, M. Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inducers. **Journal of Cell Physiology**, v.198, p.350–358, 2004.

NOZAKI, Y.; LIU, T.; HATANO, K.; GHARAEE-KERMANI, M.; PHAN, S.H. Induction of telomerase activity in fibroblasts from bleomycin-injured lungs. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.23, p.460–465, 2000.

OLASO, E.; SALADO, C.; EGILEGOR, E.; GUTIERREZ, V.; SANTISTEBAN, A.; SANCHE-BRU, P.; FRIEDMAN, S.L.; VIDAL-VANACLOCHA, F. Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. **Hepatology**, v.37, p.674–685, 2003.

ORTIZ, L.A.; DUTREIL, M.; FATTMAN, C.; PANDEY, A.C.; TORRES, G.; GO, K.; PHINNEY, D.G. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the anti-inflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, p.11002–11007, 2007.

PETROV, V.V.; FAGARD, R.H.; LIJNEN, P.J. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. **Hypertension**, v.39, p.258–263, 2002.

PHAN, S.H. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. **Chest**, v.122, p.286S–289S, 2002.

PHILLIPS, R.J.; BURDICK, M.D.; HONG, K.; LUTZ, M.A.; MURRAY, L.A.; XUE, Y.Y.; BELPERIO, J.A.; KEANE, M.P.; STRIETER, R.M. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.114, p.438–446, 2004.

QUAN, T.E.; COWPER, S.; WU, S.P.; BOCKENSTEDT, L.K.; BUCALA, R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p.598-606, 2004.

ROSS, R.; EVERETT, N.B.; TYLER, R. Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. **The Journal of Cell Biology**, v.44, p.645–654, 1970.

SANDERS, Y.Y.; KUMBLA, P.; HAGOOD, J.S. Enhanced myofibroblastic differentiation and survival in Thy-1(2) lung fibroblasts. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.36, p.226–235, 2007.

SCHMIDT, M.; SUN, G.; STACEY, M.A.; MORI, L.; MATTOLI, S. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. **The Journal of Immunology**, v.171, p.380–389, 2003.

SHI, Y.; O'BRIEN, J.E.; FARD, A.; MANNION, J.D.; WANG, D. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. **Circulation**, v.94, p.1655–1664, 1996.

SHI-WEN, X.; CHEN, Y.; DENTON, C.P.; EASTWOOD, M.; RENZONI, E.A.; BOU-GHARIOS, G.; PEARSON, J.D.; DASHWOOD, M.; DU BOIS, R.M.; BLACK, C.M.; LEASK, A.; ABRAHAM, D.J. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. **Molecular Biology of the Cell**, v.15, p.2707–2719, 2004.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v.341, p.738–746, 1999.

SORRELL, J.M.; CAPLAN, A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **Journal of Cell Science**, v.117, p.667–675, 2004.

TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONIER, C.; BROWN, R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.3, p.349–363, 2002.

WANG, J.; FAN, J.; LASCHINGER, C.; ARORA, P.D.; KAPUS, A.; SETH, A.; Mc CULLOCH, C.A. Smooth muscle actin determines mechanical force-induced p38 activation. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.7273–7284, 2005.

WANG, X.M.; ZHANG, Y.; KIM, H.P.; ZHOU, Z.; FEGHALI-BOSTWICK, C.A.; LIU, F.; IFEDIGBO, E.; XU, X.; OURY, T.D.; KAMINSKI, N.; CHOI, A.M. Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.203, p.2895–2906, 2006.

WILBORN, J.; CROFFORD, L.J.; BURDICK, M.D.; KUNKEL, S.L.; STRIETER, R.M.; PETERS-GOLDEN, M. Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. **The Journal of Clinical Investigation**, v.95, p.1861–1868, 1995.

YAMAGUCHI, Y.; ITAMI, S.; WATABE, H.; YASUMOTO, K.; ABDEL-MALEK, Z.A.; KUBO, T.; ROUZAUD, F.; TANEMURA, A.; YOSHIKAWA, K.; HEARING, V.J. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. **The Journal of Cell Biology**, v.165, p.275–285, 2004.

YANG, L.; SCOTT, P.G.; GIUFFRE, J.; SHANKOWSKY, H.A.; GHAFARY, A.; TREDGET, E.E. Peripheral blood fibrocytes from burn patients: identification and quantification of fibrocytes in adherent cells cultured from peripheral blood mononuclear cells. **Laboratory Investigation**, v.82, p.1183–1192, 2002.

ZHANG, K.; REKHTER, M.D.; GORDON, D.; PHAN, S.H. Co-expression of α -smooth muscle actin and type I collagen in fibroblast-like cells of rat lungs with bleomycin-induced pulmonary fibrosis: a combined immuno-histochemical and in situ hybridization study. **American Journal of Pathology**, v.145, p.114–125, 1994.

Vet. Zootec.
v.14, n.2, dez., 2007
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
ISSN 0102 -5716
Botucatu - SP – Brasil

INSTRUÇÕES AOS AUTORES
ARTIGOS CIENTÍFICOS

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, no qual somente a primeira letra de cada palavra deve ser maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, centralizado e em negrito. Digitá-los, separados por vírgulas, com **chamadas** de rodapé numeradas e em sobrescrito, **que indicarão** o cargo e o endereço profissional dos autores (inclusive endereço eletrônico), seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;
- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com

informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1,5, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen, devem ser tradução fiel do resumo. Se for apresentado em inglês, deve conter também, resumos em português e espanhol; se for em espanhol, resumos em português e inglês.

- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, key words, e palabras-clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. **Fotografias** podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de **desenhos originais**, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade. Se o trabalho for apresentado na língua portuguesa ou espanhola, os enunciados das tabelas e figuras bem como das variáveis apresentadas deverão estar também escritos em inglês.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas da ABNT, e o arranjo deve ser em ordem alfabética por sobrenome do autor (modelos anexos).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, **em três vias (uma original e duas cópias)** impressas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas em folhas separadas. Encaminhar cópia em disquete 3 ½” de alta densidade ou CD, identificado com título do artigo e nome dos autores. Nas duas cópias **deve(m) ser omitido(s) o(s) nome(s) do(s) autor(es), o local onde se realizou o trabalho, bem como o rodapé.**

Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

ARTIGOS DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo, palavras chave, abstract, key words, resumen, palabras-clave, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas com 60 referências.

RELATOS DE CASO

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo, palavras-chave, abstract, key words, resumen, palabras-clave e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

COMUNICAÇÕES CURTAS

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, três páginas, uma tabela e cinco referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

CITAÇÕES NO TEXTO

Geral: é normalizada segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas –ABNT/NBR 10520: <http://biblioteca.inpa.gov.br/NBR10520.htm> ou

<http://www.creupi.br/biblioteca/normas.htm>

1 Citação no final do parágrafo: indica-se entre parênteses o sobrenome do autor em letras maiúsculas e ano.

1.1 Trabalho com um único autor: citar o sobrenome seguido de vírgula e o ano entre parênteses. Exemplo: (ALVES, 1999).

1.2 Vários trabalhos de autores diferentes: devem ser citados em ordem cronológica, crescente e separados por “;” (ponto e vírgula). Exemplo: (FONSECA, 1999; RAHAL, 2005).

1.3 Trabalho com dois autores no mesmo artigo: citar os sobrenomes de ambos separados pela conjunção “e”, acompanhados por vírgula e o ano. Exemplo: (SILVA e LOPES, 1998).

1.4 Trabalho com três autores: citar o sobrenome do primeiro, seguido da expressão et al., e posteriormente vírgula e o ano. Exemplo: (CASTRO et al., 1998).

1.5 Trabalhos do mesmo autor no mesmo ano devem ser identificados por letra minúscula do alfabeto. Exemplo: (CASTRO, 1998b).

1.6 Vários trabalhos do mesmo autor: citar o sobrenome do autor e os anos em ordem cronológica. Exemplo: (FONTANA, 1996, 2000, 2003).

2 Citação no início do parágrafo: o sobrenome do autor deverá ter apenas a primeira letra em maiúscula e apenas a data entre parênteses.

2.1 Trabalho com um único autor: citar o sobrenome seguido de vírgula e o ano entre parênteses. Exemplo: Conforme Luna (1990), destacou-se...

2.2 Vários trabalhos de autores diferentes: devem ser citados em ordem cronológica, crescente e separados por “;” (ponto e vírgula). Exemplo: Segundo Fonseca (1999); Rahal (2005), o sistema de análise estatísticas...

2.3 Trabalho com dois autores no mesmo artigo: citar os sobrenomes de ambos separados pela conjunção “e”, acompanhados por vírgula e o ano. Exemplo: Para Silva e Lopes (1998), as enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos...

2.4 Trabalho com três autores: citar o sobrenome do primeiro, seguido da expressão et al., e posteriormente vírgula e o ano. Exemplo: Conforme Castro et al. (1998), a cadeia produtiva da carne de aves no Brasil...

2.5 Trabalhos do mesmo autor no mesmo ano devem ser identificados por letra minúscula do alfabeto. Exemplo: Segundo Castro (1998b), estudos experimentais em cães comprovaram...

2.6 Vários trabalhos do mesmo autor: citar o sobrenome do autor e os anos em ordem cronológica. Exemplo: Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* em pastejo, segundo Euclides (1996, 2000, 2003), possibilita...

REFERÊNCIA

1 Obras de responsabilidade de uma entidade coletiva (a entidade é tida como autora)

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12.ed. Washington, 1975. 1094p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **SAEG**: sistema de análises estatísticas e genéticas. Viçosa, 1997. 150p. (Manual do usuário- versão 7.1).

2 Livros

MODOLO, J.R. et al. **Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2003. 78p.

3 Capítulo de livro (autor do livro é o mesmo do capítulo)

CORRÊA, M.C.; CORRÊA, C.N.M. Estafilococias em geral. In: _____.

Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. pt.2, cap.8, p.91-103.

4 Capítulo de livro (autor do capítulo diferente do autor do livro)

MENDES, A.A.; SALDANHA, E.S.P.B. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil.

In: MENDES, A.A.; NAAS, I.A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte.**

Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5 Artigo de revista

ANDRADE, S.F.; SAKATE, M. Intoxicação por amitraz: revisão. **Vet. Not.**, v.10, n.2, p.1-15, 2004.

6 Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

MALHADO, C.H.M. et al. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de

codornas. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 3., 2004,

Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba, 2004. p.1-3

7 Teses e Dissertações

MORTARI, A.C. **Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico:** estudo experimental em cães. 2004. 101f.

Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

8 Citação de trabalhos publicados em CD ROM

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* em pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** São Paulo: Gmosis, 1999. CD-ROM. (Forragicultura. Avaliação com animais. FOR-020).

9 Publicações disponíveis na internet

VASCONCELOS, J.L.M. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. **Radares Técnicos-Reprodução**, Campinas, 2004. p.1-2. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br>>. Acesso