

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

**AVALIAÇÃO DA FIBROSE ENDOMETRIAL E
DOS MIOFIBROBLASTOS NAS
ENDOMETROSES ATIVA E INATIVA DAS
ÉGUAS**

ANA PAULA BATISTA MASSENO

ORIENTADOR: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

BOTUCATU - SP

2012

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

**AVALIAÇÃO DA FIBROSE ENDOMETRIAL E
DOS MIOFIBROBLASTOS NAS
ENDOMETROSES ATIVA E INATIVA DAS
ÉGUAS**

ANA PAULA BATISTA MASSENO

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

Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

BOTUCATU - SP

2012

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

Masseno, Ana Paula Batista.

Avaliação da fibrose endometrial e dos miofibroblastos nas endometroses
ativa e inativa das éguas / Ana Paula Batista Masseno. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Julio Lopes Sequeira

Capes: 50503006

1. Patologia veterinária. 2. Égua – Doenças. 3. Endométrio - Doenças.
4. Infecundidade em animais.

Palavras-chave: Égua; Endométrio; Endometrose.

Nome do Autor: Ana Paula Batista Masseno

Título: AVALIAÇÃO DA FIBROSE ENDOMETRIAL E DOS MIOFIBROBLASTOS
NAS ENDOMETROSES ATIVA E INATIVA DAS ÉGUAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Adj. Dr^a. Noeme Sousa Rocha
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Adj. Dr. Carlos Alberto Hussni
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
UNOESTE

Prof^a. Adj. Dr^a. Louisiane de Carvalho Nunes
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
UFES

Data da Defesa: 28 de Maio de 2012.

“Família: Alicerce da vida”
(Autor desconhecido)

Dedico a DEUS por iluminar a minha jornada, me guiar e me abençoar.

À minha FAMÍLIA pelo amor e pelo apoio. Dedico a minha Mãe, por sempre estar ao meu lado me dando suporte e por acreditar em mim.

*“Quando os ventos de mudança sopram,
umas pessoas levantam barreiras,
outras constroem moinhos de vento.”*

Érico Veríssimo

Agradeço ao meu orientador, Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira, por todo ensinamento, pelo apoio nos momentos mais difíceis. Exemplo de ser humano que tenho como referência, e pela amizade ao longo desse tempo.

AGRADECIMENTOS

- À Prof^a Dr^a Noeme Sousa Rocha, Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, pelos incontáveis conselhos e ensinamentos.
- À Prof^a Dr^a Renée Laufer Amorim, Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, pelo coleguismo.
- Ao Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, pelo material cedido durante a concretização do projeto.
- Ao Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP – Botucatu, pela ajuda indireta para a realização da imunoistoquímica.
- Aos amigos adquiridos ao longo dos anos e àqueles de longas datas.
- A todos os pós-graduandos, residentes e estagiários da Patologia Veterinária pelo convívio amigo.
- Aos técnicos de necropsia Maury Raul, Claudinei Domingues pelo exemplo de simplicidade e força, pelos seus ensinamentos de vida e profissionais.
- Aos técnicos do Laboratório de Histologia da UNESP Noel Almeida Melo, e Maria Valéria Dalanezi por cada coloração, por cada processamento de material.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação das endometroses de acordo com Hoffmann (2009)... 36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Corte esquemático do corno uterino da égua.....	09
FIGURA 2 - Corte esquemático do endométrio.....	09
FIGURA 3 - Esquema da possível patogênese da endometrose.....	21
FIGURA 4 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa. Glândulas envoltas por células estromais fibróticas (seta) com núcleos ovóides, hipocromáticas. Hematoxilina Eosina. Objetiva: 40x.....	40
FIGURA 5 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa. Fibrose periglandular intensa. Masson. Objetiva: 40x.....	40
FIGURA 6 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa. Glândulas endometriais hiperplásicas com dilatação de ácinos e acúmulo de secreção (seta). Hematoxilina Eosina. Objetiva: 40x.....	41
FIGURA 7 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa. Fibrose perivascular discreta e acúmulo de secreção em luz glandular. Masson. Objetiva: 40x.....	41
FIGURA 8 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa Destrutiva. Figuras de mitose (seta). Hematoxilina Eosina. Objetiva: 40x.....	42
FIGURA 9 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa Destrutiva. Glandular fibróticas com acúmulo de secreção glandular. Masson. Objetiva: 40x.....	42
FIGURA 10 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa Destrutiva. Glândulas com células epiteliais apresentando destruição multifocal	43

(seta). Hematoxilina Eosina. Objetiva: 40x.....	
FIGURA 11 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa Destrutiva. Focos de glândulas endometriais hiperplásicas e fibrose perivascular. Masson. Objetiva: 40X.....	43
FIGURA 12 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa. Colágeno com arranjo reticular. Picrosirius Red – Polarização. Objetiva: 40x.....	47
FIGURA 13 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa. Colágeno denso em região periglandular. Picrosirius Red – Polarização. Objetiva: 40x.....	47
FIGURA 14 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa Destrutiva. Colágeno reticular periglandular. Picrosirius Red – Polarização. Objetiva: 40x.....	48
FIGURA 15 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa Destrutiva. Colágeno denso em estrato esponjoso. Picrosirius Red – Polarização. Objetiva: 40x.....	48
FIGURA 16 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa. Marcação imunoistoquímica de α -SMA positiva na parede dos vasos (seta) e ao redor de estruturas glandulares dilatadas e repletas de secreção (seta). Objetiva: 40x.....	52
FIGURA 17 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa. Marcação imunoistoquímica de α -SMA positiva fraca em região periglandular. Objetiva: 40x.....	52
FIGURA 18 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa Destrutiva. Marcação imunoistoquímica de α -SMA ao redor estruturas glandulares dilatadas e figuras de mitose (seta). Objetiva: 40x.....	53
FIGURA 19 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa Destrutiva. Marcação imunoistoquímica de α -SMA positiva moderada em região periglandular (seta) e ao redor de vasos (seta). Objetiva: 40x.....	53

5.2. Avaliação imunoistoquímica.....	49
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
8. CONCLUSÕES.....	65
9. REFERÊNCIAS.....	67
10. TRABALHO CIENTÍFICO.....	76

RESUMO

MASSENO, A.P.B. Avaliação da fibrose endometrial e dos miofibroblastos nas endometroses ativa e inativa das éguas. 2012. 110p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

A endometrite é a principal causa de redução da fertilidade em éguas. Nas endometroses, 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. Este estudo teve como objetivo avaliar a fibrose endometrial das éguas considerando as características histomorfológica, histoquímica e imunoistoquímica da endometrose ativa, endometrose inativa, endometrose inativa destrutiva e endometrose ativa destrutiva, procurando esclarecer a participação dos miofibroblastos nestes processos que podem influenciar a progressão da doença. No presente trabalho pode-se constatar que o arranjo das fibras colágenas e suas características, está relacionado com o tipo de evolução do processo e, eventualmente, com a sua possível origem. O processo de endometrose mostra variações morfológicas que permitem diferenciar subtipos definidos. O picrosírio red demonstrou que nas endometroses ativa e ativa destrutiva o tipo de colágeno predominante é o que possui arranjo reticular, menos denso, enquanto que nas endometroses inativa e inativa destrutiva o predomínio foi de um colágeno mais denso. O colágeno de arranjo reticular predomina nas lesões fibróticas nas endometroses ativa e ativa destrutiva. O colágeno denso predomina nas lesões fibróticas das endometroses inativa e inativa destrutivas. As lesões fibróticas vasculares mais graves acompanham as endometroses inativa e ativa destrutiva sugerindo que estes dois tipos de endometroses tenham origem naquelas

lesões. A expressão mais fraca de α -SMA nos ninhos fibróticos das endometroses inativas reflete a predominância de fibrócitos nestas lesões.

Palavras-chave: Égua, endométrio, endometrose.

ABSTRACT

MASSENO, A.P.B. Assessment of endometrial fibrosis and myofibroblasts in endometriosis active and inactive mares. 2012. 110p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

Endometritis is the leading cause of impaired fertility in horses. In endometroses, dilated glands filled with secretion and cell debris are seen frequently in equine endometrium, as well as non-dilated glands showing marked fibrotic reaction. This study aimed to evaluate the endometrial fibrosis considering the characteristics of mares histomorphological, histochemical and immunohistochemical studies of endometriosis active, inactive endometriosis, endometriosis endometriosis active and inactive destructive destructive, seeking to clarify the involvement of myofibroblasts in these processes that may influence disease progression. In the present work can be seen that the arrangement of collagen fibers and their characteristics, is related to the type of process evolution and eventually to their possible origin. The process of endometriosis shows morphological variations defined to differentiate between subtypes. The picrosirius red showed that the active endometroses active and destructive type of collagen is the predominant reticular arrangement that has less dense, whereas in endometroses inactive and inactive destructive was the predominance of a more dense collagen. The lattice arrangement of collagen predominates in the fibrotic lesions in the active and active endometroses destrutiva.O dense collagen predominates in the fibrotic lesions of endometroses inactive and inactive destructive. The most severe vascular fibrotic lesions accompanying endometroses inactive and active destructive suggesting that these two types of endometroses originate in those lesions. The weaker expression of α -

SMA in fibrotic nests of endometrioses inactive fibrocytes reflects the predominance of these lesions.

Keywords: Mare, endometrium, endometriosis.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A endometrite é a principal causa de redução da fertilidade em éguas sendo considerada o problema de maior importância clínica em eqüinos depois da cólica (TRAUB-DARGATZ et al., 1991) e dos problemas de claudicação, seguidos dos problemas respiratórios (ROSSDALE et al., 1985; HERNANDEZ e HAWKINS, 2001).

Mesmo com a presença de mecanismos de defesa contra infecções uterinas, como a contratilidade, barreiras anatômicas, imunoglobulinas, substâncias bactericidas, fatores mecânicos e o sistema imune (WATSON, 2000; TROEDSSON et al., 1993), algumas éguas não conseguem superar a infecção e a endometrite se torna crônica ou se resolve tardiamente (ABSURY, 1986).

Vários estudos têm relacionado à falha no *clearence* físico uterino a maior suscetibilidade a infecções (EVANS et al., 1986; LEBLANC et al., 1998).

As éguas têm o poder de eliminar a infecção desde que isso ocorra em um determinado espaço de tempo e por isso podem ser classificadas como suscetíveis ou resistentes as endometrites (LEBLANC, 2003). Quando a endometrite persiste e se prolonga por mais de cinco dias o ambiente citotóxico uterino não permite a manutenção da gestação (WATSON, 2000).

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

A endometrose é um processo progressivo e irreversível e é um fator importante na infertilidade da égua. No que diz respeito à patogênese da endometrose são delineadas morfologicamente as fases de evolução do processo fibrótico denominadas de endometrose ativa, endometrose inativa, endometrose inativa destrutiva e endometrose ativa destrutiva. O sinal inicial de endometrose é a diferenciação morfológica e funcional atípica das células estromais periglandulares endometriais (HOFFMANN et al., 2003).

Os fibroblastos que permeiam as glândulas uterinas fibróticas nas endometroses mostram forte imunoreatividade para α -SMA, sendo denominados de miofibroblastos. Estas células são reconhecidas como a fonte principal de colágeno denso e de citocinas fibrogênicas/inflamatórias nas lesões fibróticas. Estudos anteriores demonstraram que no processo fibrótico do endométrio das éguas ocorre a substituição gradativa do colágeno fibrilar com distribuição reticular, predominante nas amostras de endométrio sadio, pelo colágeno denso, conforme aumenta o grau das lesões endometriais.

Nas endometroses, 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. Assim sendo, 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.

Este estudo teve como objetivo avaliar a fibrose endometrial das éguas considerando as características histomorfológica, histoquímica e imunoistoquímica da endometrose ativa, endometrose inativa, endometrose inativa destrutiva e endometrose ativa destrutiva, procurando esclarecer a participação dos miofibroblastos nestes processos que podem influenciar a progressão da doença.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO ÚTERO DA ÉGUA

O útero da égua é formado por três camadas: a camada interna, endométrio (mucosa), a média, miométrio (camada muscular) e a externa, 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, que foi dividida por Kenney (1978) em estrato compacto e esponjoso.

O estrato compacto é caracterizado por uma maior densidade de células do estroma e se encontra junto ao epitélio luminal, apresenta ductos glandulares, porém não exibe glândulas. No estrato esponjoso, cuja malha de delicadas fibras reticulares lembra uma estrutura esponjosa se encontram as glândulas uterinas em meio a um estroma com menor densidade de células. Nesta porção são observadas ainda artérias, veias e vasos linfáticos. A camada superficial mais delgada é composta pelo epitélio de superfície ou epitélio luminal e pela lâmina própria. O lúmen uterino é revestido por um epitélio caracterizado principalmente pela presença de células secretoras e ciliadas ou glândulas, denominada estrato compacto Burkitt et al. (1994).

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. Externamente, justaposto ao miométrio fica o perimétrio, formado por tecido conjuntivo frouxo, vasos e nervos, recobertos por mesotélio peritoneal (DELLMAN e BROWN, 1987).

As características histológicas observadas nas biópsias endometriais podem ser fisiológicas (cíclicas ou estacionais), patológicas ou ter origem em 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).

O ciclo estral da égua tem duração de 18 a 22 dias, tempo entre uma ovulação e outra, e foi dividido por Brunckhorst e Schoon (1991) e Schoon et al. (1992) nas seguintes fases:

- Proliferativa (8 a 9 dias) → Pró-estro (3 dias);
- Estro (2-3 dias);
- Pós-estro (3 dias);
- Secretória (9 dias) → Inter-estro inicial e intermediário;
- Involutiva (4 dias) → Inter-estro final.

Na fase proliferativa, as células do epitélio luminal e do epitélio das glândulas são prismáticas altas, com grande núcleo oval a redondo, hipocromático. As glândulas estão distendidas. Na fase secretória, as células do epitélio luminal variam de isoprismáticas a cúbicas, com núcleo ovalado ou redondo. As glândulas são tortuosas, o lúmen está aumentado e seu epitélio de revestimento é baixo, com vacúolos secretórios na porção apical. Neste período, as estruturas glandulares começam a perder a tortuosidade (BRUNCKHORST et al., 1991). No anestro, são observadas células atróficas do epitélio luminal demonstram uma forma cúbica, com citoplasma escasso e mais basofílico. Os ductos glandulares e os ramos glandulares proximais exibem células epiteliais mais altas do que aquelas das glândulas das regiões mais profundas (BARROS e MASUDA, 2009), dados representados nas Figuras 1 e 2.

Figura 1. Corte esquemático do corno uterino da égua.

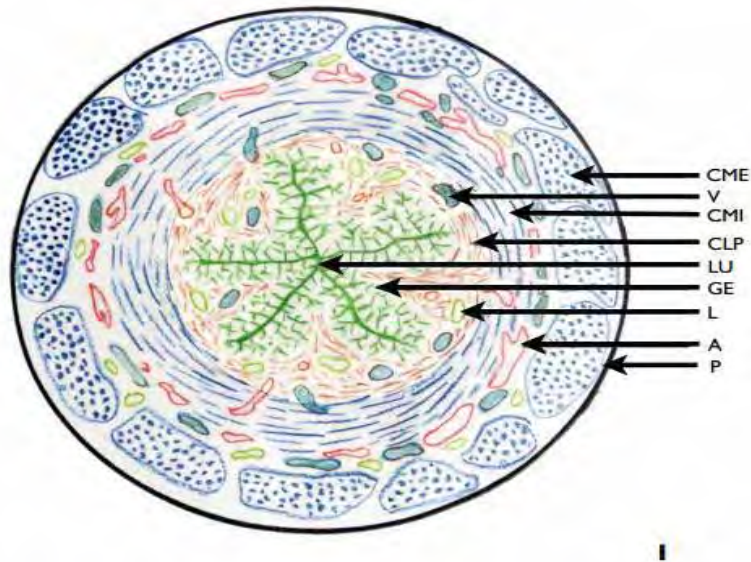


Figura 1 - Corte esquemático do corno uterino da égua. CME – Camada muscular externa; V - Vênula; CMI - Camada muscular interna; CLP - Conjuntivo da lâmina própria; LU - Luz do corno uterino; GE - Glândulas endometriais; L - Linfático; A - Arteriola; P - Perimétrio.

FONTE: Barros e Masuda, 2009.

Figura 2. Corte esquemático do endométrio.

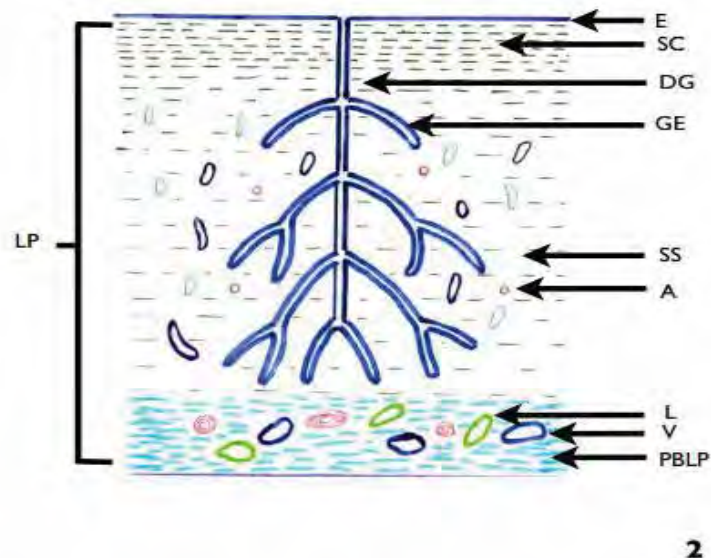


Figura 2 - Corte esquemático do endométrio. E - Epitélio luminal; SC - *Stratum compactum*; DG - Ducto glandular; G - Glândula endometrial; SS – *Stratum spongiosum*; A - Arteriola; L - Linfático; V - Vênula; PBLP - Porção basal da lâmina própria; LP - Lâmina própria.

FONTE: Barros e Masuda, 2009.

2.2. A IMPORTÂNCIA E AS INDICAÇÕES DA BIÓPSIA UTERINA

O diagnóstico de endometrite deve incluir o exame clínico, a palpação transretal, ultra-sonografia do trato reprodutivo, o exame vaginal, cultivo microbiológico, citologia e biópsia endometrial (REISWIG et al., 1993; BOURKE et al.; 1997; DASCANIO et al., 1997; CARD, 2005; AGUILAR et al.; 2006).

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 a uma terapia uterina específica (DOIG e WAELCHLI, 1993). A biópsia endometrial é indicada em qualquer égua não gestante com suspeita de alteração uterina.

A biópsia uterina é indicada nas seguintes situações, conforme Kenney (1978):

1. Constatação de alterações do trato genital;
2. Infertilidade após inseminações ou coberturas em três ou mais ciclos numa mesma temporada de monta, com sêmen de comprovada fertilidade;
3. Éguas com histórico de perda embrionária precoce ou aborto;
4. Comportamento de anestro durante a temporada fisiológica de monta, bem como hipoplasia de ovários e genitália;
5. Antes e depois de uma intervenção cirúrgica no trato genital;
6. Casos de piometra e mucometra;
7. Avaliação de fertilidade;
8. Monitoração dos resultados de uma terapia uterina.

A retirada da amostra uterina pode ser feita em qualquer fase do ciclo estral (KENNEY, 1977; KENNEY e DOIG, 1986), sem causar problemas clínicos.

Segundo Neely (1983), porém, para uma avaliação correta do grau de fibrose endometrial, o diestro é a melhor fase do ciclo para a coleta da amostra, pois o útero, sob influência luteal, apresenta maior concentração de glândulas. Um endométrio em anestro é hipoplásico e subdesenvolvido, sendo difícil a avaliação da fibrose. Da mesma forma, durante o estro, as glândulas estão presentes em menor quantidade, separadas pelo edema, que pode ser consequência da influência do estrógeno ou de uma inflamação. Gross e Leblanc (1984) coletaram amostras mensais de endométrio de éguas durante um ano e observaram que as mudanças sazonais se refletiam sobre o estroma e as glândulas, influenciando a avaliação quantitativa destas estruturas, o que resultava na mudança de classificação das endometroses.

Retiradas sequenciais de amostras não têm efeito negativo sobre a taxa de parição, segundo Watson e Sertich (1992) que coletaram biópsias endometriais de duas, três ou quatro vezes num período de 50 dias, inclusive durante os dias de cobertura, e observaram que seis das sete éguas avaliadas ficaram prenhes.

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).

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.

Um critério utilizado no diagnóstico de qualquer forma de endometrite na égua, é a presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear no estrato compacto em um exame histopatológico, e tem sido adotado como uma análise

padrão (KENNEY, 1978; DOIG et al, 1981; KENNEY e DOIG, 1986; WAELCHLI et al, 1988; VAN CAMP, 1988).

Nas últimas décadas, vários estudos têm demonstrado que, uma biópsia para análise de processos inflamatórios e degenerativos no endométrio, é representativa para todo o órgão (BERGMAN e KENNEY, 1975; BLANCHARD et al, 1987; WAELCHLI, 1989). Outros estudos em éguas, no entanto, apresentaram variações consideráveis dentro de áreas diferentes do útero (FIALA et al, 2010; DYBAL et al, 1991).

Segundo Palm *et al.* (2008), a quantidade de polimorfonuclear (PMN), no estrato compacto, aumentou após a infusão uterina com sêmen, soro fisiológico ou plasma seminal com agentes inflamatórios.

Portanto, a ocorrência de polimorfonuclear (PMN) no estrato compacto, é utilizada como "o melhor padrão" para diagnóstico de endometrite e para determinar a sensibilidade e especificidade do exame bacteriológico e citológico (OVERBECK et al., 2011).

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).

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).

A utilização dos métodos histoquímicos para identificação de colágeno, como tricrômico de masson e picrosirius-polarização, permite a identificação dos focos

de fibrose, bem como sua distribuição e quantificação, além da identificação dos tipos de colágeno presente na fibrose.

Nas endometrites conforme as lesões se tornam mais severas, há uma substituição de colágeno do tipo fibrilar para o colágeno do tipo denso, (CALDINI, 1992; EVANS et al., 1998; NUNES, 2003). Masseno (2009) observou nas biópsias maior distribuição de colágeno periglandular, perivascular e no estrato esponjoso.

2.3. REPRESENTATIVIDADE DE UMA AMOSTRA

Apesar de uma amostra de biópsia uterina abranger apenas 0,1% de toda a superfície endometrial (KENNEY, 1975), ela é representativa quando as lesões se localizam de maneira difusa no tecido uterino da égua (BERGMAN e KENNEY, 1975; WAELCHLI e WINDER, 1989). Quando existem alterações focais, observadas ao exame clínico, a amostra deve ser coletada nestes locais (KENNEY, 1977; SCHOON et al., 1994). Ricketts e Alonso (1991) indicam a coleta de duas biópsias uterinas, uma antes e outra após um tratamento uterino específico, levando em consideração a capacidade da égua em responder ao tratamento, tendo assim melhor prognóstico reprodutivo.

Os processos fibróticos do endométrio, segundo Runge (1995) e Schoon et al. (1995), são mais comuns no corpo do útero. Conforme Blanchard et al. (1987), que coletaram amostras de 12 locais diferentes do útero de 5 éguas, não existe diferença na distribuição das lesões fibróticas do endométrio. Vários autores concordam que as alterações inflamatórias se distribuem de maneira uniforme pelo útero (BERGMAN e KENNEY, 1975; BLANCHARD et al., 1987; RUNGE, 1995). As amostras retiradas da cérvis não são representativas (BLANCHARD et al., 1987; RUNGE, 1995), devido à densidade glandular menor, não devendo ser interpretada como atrofia por desequilíbrio hormonal (BLANCHARD et al., 1987).

2.4. CLASSIFICAÇÃO DAS ENDOMETRITES CRÔNICAS EM ÉGUAS

Levando em consideração alterações histopatológicas como processos inflamatórios agudos ou crônicos e alterações crônicas degenerativas como fibrose, dilatação cística e lacunas linfáticas, Kenney e Doig (1986) classificaram o endométrio eqüino em quatro categorias (I, IIA, IIB e III) de acordo com a presença, distribuição e intensidade das lesões observadas. Neste sistema, quanto maior o grau de classificação da biópsia, menor é a probabilidade do endométrio suportar uma gestação.

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 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). A endometrite provavelmente tem origem multifatorial sendo que a falha do *clearance* uterino certamente contribui para isto. A endometrose é definida como uma condição degenerativa que resulta da inflamação. As éguas com endometrose podem não conseguir conceber e manter a prenhez e isto pode resultar em infecções crônicas uterinas (DASCANIO et al., 1998).

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. A também denominada endometrose não é uma condição pós-cobertura, embora esteja associada à falha do *clearance* uterino, mas também pode ser resultado de repetidas inflamações e do avanço da idade (WATSON, 2000).

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, cujo principal sinal morfológico é a presença de leucócitos seja um sinal de resposta imune local e que a endometrite degenerativa, que prepondera a fibrose, seja a resposta à inflamação crônica, ao envelhecimento e/ou a possíveis fatores endócrinos (RICKETTS e ALONSO, 1991).

Na literatura medical, existem dois termos com definições distintas, a endometrose e a endometriose. E mesmo nas referências literárias, os termos são usados de forma incorreta e permanecem sem correção. A endometriose é definida como implantação extra-uterina de tecido endometrial e é relatado em mulheres (BULUN, 2009). Em animais, se observa espontaneamente em fêmeas primatas não-humanas do Velho Mundo (D'HOOGE et al., 2009). O termo endometrose, conforme definido para o endométrio das éguas, foi cunhado inicialmente por Kenney (1992) para substituir o termo endometrite crônica degenerativa (ALLEN, 1993).

O termo em si determina cronicidade, alterações degenerativas vistas em equídeos (ALLEN, 1993) e mais especificamente, é definida como fibrose grave seguida por dilatação cística das glândulas (HOFFMANN et al., 2009). A patogênese da endometrose em éguas, com avaliação imunoistoquímica, foi realizada por Hoffmann (2009). A etiologia e a patogenia da endometrose são desconhecidas (HOFFMANN et al., 2003).

Além da fibrose, outras alterações que foram incluídas neste conceito, foi o acúmulo de linfa, adesões transluminais, formação de divertículos e os efeitos de urovagina sobre o útero. No entanto, Schoon et al., (1995) relataram que no termo endometrose seriam definidas somente a fibrose periglandular e/ou do estroma endometrial e as alterações glandulares dentro das áreas de fibrose. Conforme estes pesquisadores, as alterações como disfunções glandulares fora das áreas de fibrose, anomalias de função glandular (atrofia e hipoplasia) e angiopatias, devem ter um estudo à parte e, posteriormente a elucidação de sua importância no prognóstico reprodutivo.

A endometrose é um processo progressivo e irreversível, está correlacionada com a idade e é agravada por estímulos recorrentes como coito, infecções ou gestação (RICKETTS e ALONSO, 1991).

Dascanio et al. (1998) relataram que éguas com endometrose podem apresentar cistos. Isto pode estar relacionado à idade, visto que éguas com idade avançada apresentam fibrose uterina aumentada quando comparadas com éguas jovens. Ricketts e Alonso (1991) observaram que com o aumento da idade das éguas surgem sinais avançados de doença degenerativa endometrial, independentemente de alterações relacionadas às infecções, prenhez, partos e/ou involução uterina pós-parto.

A atrofia do endométrio também interfere na 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 et al. 1991).

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).

Nestas lesões a deposição de colágeno ocorre mais comumente ao redor das glândulas ou associada à membrana basal. Essa alteração compromete a integridade e a função das glândulas endometriais, estruturas necessárias desde o período de pré-implantação embrionária até o desenvolvimento placentário completo. Nas glândulas fibróticas, o epitélio se diferencia irregularmente, além de ocorrer à modificação das secreções glandulares. Portanto, nos casos mais severos, mesmo que ocorra implantação embrionária, a redução ou alteração dessas secreções podem causar a nutrição inadequada do feto, o que pode resultar em aborto (WALTER et al., 2001).

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, comprometendo o fluxo de

secreção e resultando em dilatação glandular e formação de cistos (AMARAL, 2002).

A técnica do Tricrômico de Masson é o método que tem sido utilizado para a avaliação do tecido conjuntivo normal e fibrótico. Com este método identifica-se e gradua-se a fibrose endometrial patológica em biópsias uterinas de éguas (BLANCHARD et al., 1987).

O aumento da birrefringência promovida pelo método do Picrosirius – Polarização é específico para estruturas colagenosas compostas de agregados de moléculas orientadas, já que as moléculas do corante se alinham paralelamente ao longo do eixo de cada molécula de colágeno. Este método ainda hoje é empregado, considerado de grande utilidade na distinção do arranjo do colágeno, o qual pode ser relacionado com sua estrutura molecular (BORGES et al., 2007). Segundo Andrade et al. (1999), este método representa um eficiente meio para estudar a cronologia das lesões fibróticas e também para estudar a distribuição dos colágenos dos tipos denso e fibrilar nos tecidos. O primeiro aparece na forma de fibras espessas, amareladas ou avermelhadas, birrefringentes e o segundo mostra birrefringência fraca e caracteriza-se pela presença de 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 deste processo reside na substituição do colágeno do tipo fibrilar, presente na maior parte da lâmina própria do endométrio, por colágeno do tipo denso. Estudos anteriores realizados demonstraram que no processo fibrótico do endométrio das éguas ocorre à substituição gradativa do colágeno do tipo fibrilar com distribuição reticular, predominante nas amostras de endométrio sadio, pelo colágeno denso, conforme aumenta o grau das lesões endometriais. Este tipo de colágeno é mais denso, e é encontrado preferencialmente na região periglandular (NUNES, 2003; PORTO, 2006; NUNES, 2006 e MASSENO, 2009). Isso reforça a hipótese de que ocorre a substituição gradativa do tecido funcional endometrial por fibrose, o que conduz à atrofia. Com isso, há comprometimento da

produção de histotrófo, incapacidade de nidificação do embrião e continuidade da gestação (GRAY et al., 2001; AMARAL, 2002).

Para que se entenda o mecanismo patológico da fibrose é necessário que, primeiramente, se compreenda o funcionamento normal dos mecanismos da interação célula-matriz extracelular. A regulação da composição desta matriz promove a integridade dos tecidos e fornece sinais bioativos que podem afetar o comportamento celular (BRUNER et al., 1995).

Durante os processos fibróticos, os fibroblastos expressam fatores de diferenciação muscular, como a actina de músculo liso- α (α -SMA), 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). Esta diferenciação pode ser induzida por estímulos locais (SCHMITT-GRAF et al., 1994).

Os miofibroblastos podem ser encontrados no tecido normal de diversos órgãos, atuando fisiologicamente na sua contração ou no seu remodelamento (SCHURCH et al., 1998). Entretanto, também são observados durante o processo de 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).

No que diz respeito ao endométrio eqüino, os fibroblastos que circundam as glândulas uterinas fibróticas nas endometroses mostram forte imunoreatividade para α -SMA. Mais ainda, glândulas císticas são circundadas por uma camada de células positivas para esta proteína (WALTER et al., 2001). 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 endometriose, 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 -SMA (WALTER et al., 2001).

Arthur (2000) observou estudando a fibrose hepática que as células estreladas hepáticas quando ativadas exibem fenótipo de miofibroblastos e que a indução deste processo se dá pela presença de colágeno denso, que predomina no fígado fibrótico. Estas células são reconhecidas como a fonte principal de colágeno denso e de citocinas fibrogênicas/inflamatórias nas lesões fibróticas (ZHANG et al., 1994; PHAN, 2002). Masseno (2009) verificou que o colágeno denso predominou nos endométrios que mostraram graus de lesão mais acentuados, depositando-se principalmente nas lesões fibróticas periglandulares e, na medida em que estas lesões se tornavam mais graves, eram mais numerosas as células que expressavam α -SMA. Embora se possa admitir a função de suporte dos miofibroblastos localizados ao redor de glândulas dilatadas e fibróticas, sua função 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 (MASSENO, 2009).

Os fatores etiológicos que induzem o desenvolvimento da fibrose metabolicamente inativa são também de grande importância, mas continuam desconhecidos. Porém, a contratilidade e o arranjo paralelo dos miofibroblastos ao redor das glândulas permitem que ocorra o estresse mecânico que seria o responsável pela dilatação cística glandular e pela destruição focal do epitélio, observada neste tipo de endometriose (HOFFMANN et al., 2009). Deve-se ressaltar que já foi verificado que nos quadros graves de fibrose endometrial, as células estromais que se concentram em torno de estruturas glandulares mostram índices apoptóticos menores. Este achado pode representar um mecanismo de

perpetuação destas células no foco fibrótico, o que se relaciona a deposição gradativa de colágeno nestas áreas (PORTO, 2009). Desta forma depreende-se que, no processo de endometriose, ainda existem inúmeras dúvidas sobre a função dos miofibroblastos.

O primeiro sinal de endometriose é a diferenciação morfológica e funcional atípica de células estromais do endométrio. A primeira etapa da fibrose é caracterizada por grandes células estromais poligonais periglandulares que sintetizam fibras de colágeno denso. No processo fibrótico avançado, onde é possível se identificar células estromais metabolicamente ativas ou inativas, não ocorre síntese de colágeno (RAILA, 2000), e um predomínio de miofibroblastos simultaneamente (EVANS et al., 1998; RAILA, 2000; WALTER et al., 2001). Dilatação glandular pode ocorrer em função da capacidade de contratilidade dos miofibroblastos que também apresentam capacidade de afetar a composição e a quantidade de matriz extracelular (EVANS et al., 1998; RAILA, 2000; WALTER et al., 2001).

A presença mais expressiva dos miofibroblastos nas lesões fibróticas e a sua associação com a deposição de colágeno denso no endométrio nos leva a relacionar estas células 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 (MASSENO, 2009).

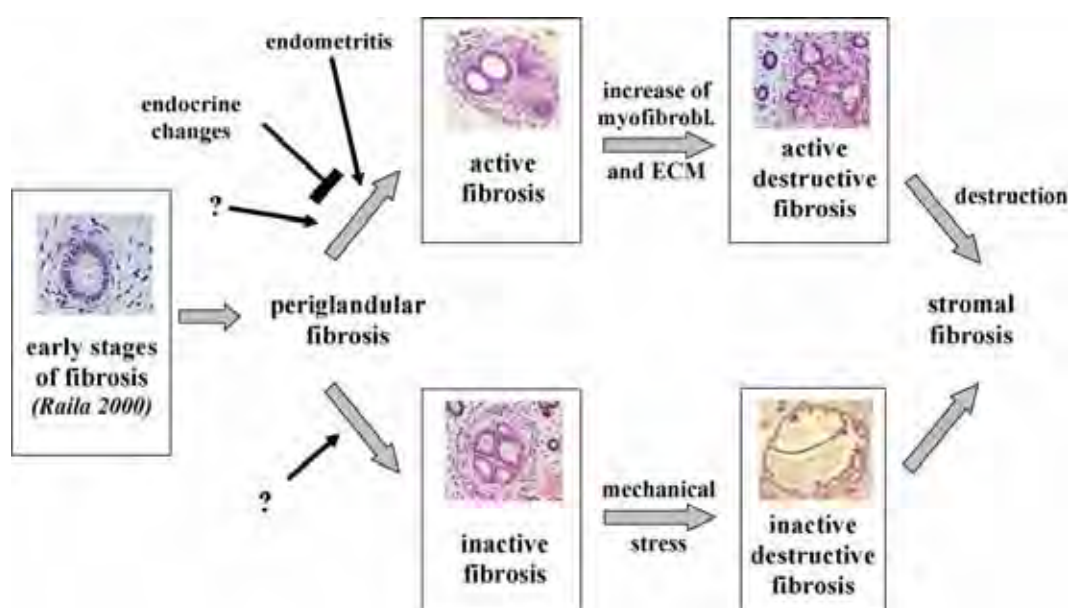
A investigação por biópsia do endométrio para má diferenciação celular representa uma inovação na avaliação da saúde do endométrio. Inicialmente, um grupo de pesquisa de Schoon e colaboradores realizaram uma descrição mais abrangente (SCHOON et al. 2000) de má diferenciação celular endometrial e foi publicado em 2000, embora relatos iniciais tenham sido divulgados anteriormente, em 1990 (SCHOON, 1997 e SCHOON,1999). Schoon et al. (2000) indicam que indiferenciação celular foi detectável em hematoxilina e eosina (SCHOON et al. 2000) e relataram uma prevalência de 7% das biópsias de rotina (SCHOON et al. 2000 e ELLENBERGER et al. 2002). O diagnóstico de má diferenciação foi complementado por técnicas de imunistoquímica para avaliar a expressão de receptores de hormônio, a proliferação celular e análise de filamentos

intermediários, tais como vimentina, desmina e citoqueratina (SCHOON et al. 2000).

Primeiramente, levando em consideração o distúrbio morfológico funcional, a má diferenciação celular foi dividida em dois tipos distintos: 1) em desiguais e 2) em irregulares. Má diferenciação desigual foi caracterizada por uma amostra única de tecido apresentando dois padrões fisiológicos diferentes, um que se relaciona ao ciclo ovariano, os outros que se desviam desse padrão. Os autores atribuíram esse padrão de má diferenciação para alterações endometriais idiopáticas onde ocorre expressão de receptor de hormônio esteróide alterada. Má diferenciações irregulares, comprometendo todas as glândulas numa única espécie, foi distinguida por padrões anormais de proliferação ou secretora não correlacionadas a qualquer tipo de transtornos ovarianos e tumores, tratamentos hormonais e causas idiopáticas (SCHOON et al. 2000 e SCHOON, 2003).

Schoon et al. (2000) advertiram que má diferenciação deve ser considerada na avaliação de biópsias como um parâmetro significativo que induza problemas de fertilidade (SCHOON, 1997; SCHOON, 1999; ELLENBERGER et al.; 2002). Em resumo, a hipótese concebível da patogênese da endometriose está resumida no esquema da Figura 3.

Figura 3 - Esquema da possível patogênese da endometriose.



FONTE: Hoffmann, 2009.

Em trabalho recente HOFFMANN et al., (2009), conceberam uma hipótese provável para a patogênese da endometriose e descrevem morfologicamente as fases de evolução do processo fibrótico denominados de endometriose ativa, endometriose inativa, endometriose inativa destrutiva e endometriose ativa destrutiva. Estes autores postulam que os estágios iniciais da fibrose são caracterizados por alterações discretas da membrana basal e acúmulo focal de células estromais com capacidade de sintetizar fibras colágenas.

Propõem ainda que a proliferação de células estromais e sua diferenciação em miofibroblastos assim como o aumento da síntese de matriz extracelular respondem à ação sinérgica e autoinduzida de mediadores, resultando em fibrose periglandular. A concomitância do processo de endometrite seria uma das causas da ativação metabólica das células estromais fibróticas. Desta forma, ainda segundo os mesmos autores, teríamos em seqüência as etapas denominadas de fibrose ativa e fibrose destrutiva ativa que levariam a fibrose estromal característica da endometriose.

Algumas destas etapas da progressão do processo fibrótico endometrial estão de acordo com observações anteriores de outros autores (BORDER e NOBLE, 1994; RAILA, 2000; MENKE e ADLER, 2002). Contudo, como vimos anteriormente, em alguns processos fibróticos endometriais predominam células estromais metabolicamente inativas sem capacidade de síntese de colágeno (HOFFMANN et al., 2009).

Os fatores etiológicos que induzem o desenvolvimento da fibrose metabolicamente inativa são também de grande importância, mas continuam desconhecidos. Porém, a contratilidade e o arranjo paralelo dos miofibroblastos ao redor das glândulas permitem que ocorra o estresse mecânico que seria o responsável pela dilatação cística glandular e pela destruição focal do epitélio, observada neste tipo de endometriose (HOFFMANN et al., 2009).

Deve-se ressaltar que já foi verificado que nos quadros graves de fibrose endometrial, as células estromais que se concentram em torno de estruturas glandulares mostram índices apoptóticos menores. Este achado pode representar um mecanismo de perpetuação destas células no foco fibrótico, o que se relaciona a deposição gradativa de colágeno nestas áreas. Desta forma se compreende que, no processo de endometrose, ainda existem inúmeras dúvidas sobre a função dos miofibroblastos (PORTO, 2009).

O endométrio acometido pelo processo fibrótico torna-se incapaz de produzir substâncias histotróficas de qualidade e em quantidades adequadas. Nas éguas o trofoblasto não é invasivo e as secreções uterinas são consideradas essenciais para a manutenção do desenvolvimento e a sobrevivência do embrião. Como resultados deste quadro surgem diferenças marcantes entre o padrão das secreções produzidas pelo epitélio glandular nos focos fibróticos e o das glândulas não afetadas (HOFFMAN et al., 2009).

Vários estudos tem relacionado a falha no *clearance* físico uterino a maior suscetibilidade a infecções (EVANS et al., 1986; LEBLANC et al., 1998). As secreções uterinas são ricas em muco e apesar de ser reconhecido como um agente protetor de outras mucosas, a função do muco na defesa do endométrio não esta ainda esclarecida (CAUSEY, 2007). Entre os componentes da secreção mucosa uterina contam-se substância bacteriostáticas como a lisozima e a lactoferrina, assim como outros fatores protetores como imunoglobulinas e surfactante (SLEIGH et al., 1988; SNOECK et al., 2006; MCGUIRE, 2002).

Na endometrose, glândulas dilatadas e repletas de secreção e restos celulares são observadas com freqüência 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 à fibrose, células positivas para α -SMA (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 parece ser mais complexa. O arranjo do tecido fibroso que envolve as estruturas glandulares endometriais mostra variações que podem indicar maior ou menor atividade celular. Assim sendo, 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. A compreensão das várias interrelações entre estes diferentes processos é necessária para que possamos esclarecer os processos que acometem as glândulas uterinas (CAUSEY, 2007).

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 contribuem para a fibrose endometrial associado a caracterização dos tipos celulares que participam deste processo são necessários para que sejam identificados os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das endometrites crônicas das éguas. Da mesma forma são poucos os estudos que abordam as modificações que ocorrem na secreção das glândulas uterinas durante os processos inflamatórios e fibróticos endometriais. Pesquisas referentes à distribuição de matriz extracelular nos focos de fibrose são escassas e os resultados são contraditórios. Raila (2000) descreveu um tipo de colágeno misto, que está correlacionado ao grau de endometrose, ainda à atividade de células estromais periglandulares e à existência de ninhos glandulares.

Objetivos

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

3.1. Objetivo Geral:

Avaliar a fibrose endometrial das éguas considerando as características morfológicas das endometrose ativa, endometrose inativa, endometrose inativa destrutiva e endometrose ativa destrutiva, procurando esclarecer a participação dos miofibroblastos nestes processos.

3.2. Objetivos específicos:

Avaliar a distribuição e o arranjo do colágeno endometrial utilizando o método de Picosirius Red no endométrio de éguas sadias e portadoras de endometrose.

Detectar a presença e a distribuição de miofibroblastos por meio de método imunistoquímico no endométrio de éguas sadias e portadoras de endometrose.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PROCEDÊNCIA DO MATERIAL

Foram utilizadas no presente trabalho 40 biópsias endometriais que constavam do arquivo de blocos do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu – SP. Este material era proveniente da rotina do diagnóstico do Hospital Veterinário da FMVZ e também de amostras de clínicas privadas e profissionais autônomos. A partir das 40 amostras foram selecionadas 25 biópsias, que tiveram os dados referentes a identificação de cada um dos animais retirados dos Livros de Registros de biópsias e dos arquivos de relatórios histopatológicos. Em seguida, as lâminas de cada caso foram analisadas novamente para a ratificação do diagnóstico de endometrite crônica.

4.2. PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO

Todo o material utilizado foi submetido ao procedimento padrão para processamento histopatológico do Serviço de Patologia da FMVZ.

As biópsias uterinas foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas. Após este período foram lavadas em água corrente e transferidas para a solução de álcool a 70%. Posteriormente, as amostras foram submetidas aos processos de rotina para inclusão em parafina.

De cada uma das amostras foram confeccionados cortes com três micrômetros de espessura em micrótomo rotativo.

Para análise e classificação histológica das endometrites crônicas, os cortes corados pelo método de Hematoxilina-Eosina de acordo, com Luna (1968). Além disto, foram utilizadas colorações específicas para tecido conjuntivo 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 utilizadas amostras de endométrio equino, colhidos durante exame necroscópico, com diagnóstico de endometrite crônica. As amostras de endométrio foram processadas da mesma maneira que as biópsias uterinas, ou seja, fixados em solução de Bouin 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 a 60 °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.

4.2.2. TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA

A padronização da técnica de imunistoquímica 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. ALFA-ACTINA DE MÚSCULO LISO

O anticorpo primário utilizado neste trabalho foi:

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

O 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.). A concentração testada foi: 1:1250.

Cortes de três micrômetros das biópsias uterinas foram colocados em lâminas histológicas, previamente tratadas com solução de Poli-L-Lisina (P8920-Sigma), desparafinizados e hidratados. As lâminas, em seguida, foram colocadas em estufa a 60^oC por 24 horas, para que houvesse boa adesão do tecido à lâmina. Após este procedimento, os cortes foram submetidos aos processos de desparafinização e hidratação.

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 10 minutos.

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

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

Conforme a orientação do fabricante, o Sistema de visualização, *Novolink™ 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.

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. APLICAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DAS ENDOMETRITES CRÔNICAS EM ÉGUAS

Para cada caso, o tipo histológico foi 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). A caracterização dos diferentes tipos de endometrose foi realizada de acordo com a classificação morfológica proposta por Hoffmann et al., (2009), da forma como se segue:

Endometrose Ativa - Glândulas isoladas que se mostram circundadas por células estromais fibróticas, que apresentam núcleos ovóides hipocromáticos de tamanho médio ou grande e citoplasma pálido.

Endometrose Inativa – Ninhos glandulares circundados por células estromais fusiformes que se caracterizam por apresentar núcleo hipercromático e alongado, estas células estromais fibróticas arranjam-se paralelamente ao eixo das glândulas adjacentes.

Endometrose Inativa Destrutiva – Glândulas isoladas circundadas por células estromais fusiformes que se caracterizam por apresentar núcleo hipercromático e alongado, estas células estromais fibróticas arranjam-se paralelamente ao eixo

das glândulas adjacentes, sendo que nestas lesões é observada também a destruição multifocal de células epiteliais individuais e a retenção da secreção no lúmen da glândula.

Endometrose Ativa Destrutiva - Glândulas isoladas que se mostram circundadas por células estromais fibróticas, que apresentam núcleos ovóides hipocromáticos de tamanho médio ou grande e citoplasma pálido, associadas camadas fibróticas de aspecto desordenado. As células estromais fibróticas são invasivas, penetrando o lúmen da glândula e algumas células epiteliais mostram-se degeneradas.

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.

Foram utilizadas as amostras classificadas na categoria I da classificação de Kenney e Doig (1986), como representativas do endométrio hígado, para que fossem estabelecidos os parâmetros de comparação.

4.4. 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 refração das fibras sob polarização de luz: as fibras espessas e de coloração amarelada a avermelhada foram classificadas como colágeno denso e as fibrilas delgadas e de coloração esverdeada, como de colágeno fibrilar. 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 refração 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.

Os cortes corados com Picrosirius Red foram avaliados pelo uso do programa computacional Axiovision Software Rel. versão 4.3 (Zeiss Vision, Alemanha). Para a diferenciação dos tipos de colágeno presente nas endometrioses e endometrites crônicas infiltrativas a análise foi qualitativa.

4.5. 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 reação imunoistoquímica foi avaliada como fraca moderada ou acentuada.

A imunoexpressão do miofibroblasto foi avaliada de maneira quantitativa, conforme se identificou a sua reação em camadas de fibrose, assim como a sua localização.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS ENDOMETROSES

Na classificação histológica dos 40 casos de endometrites de acordo com a descrição de Kenney e Doig (1986), 15 animais foram incluídos na categoria I, 09 na categoria IIA, 04 na categoria IIB e 12 na categoria III. Os resultados da classificação histológica das 40 amostras de acordo com a descrição de Ricketts e Alonso (1991) demonstraram que 15 dos animais apresentavam endométrio normal e 25 animais apresentaram endometrite crônica degenerativa.

Após a classificação histológica das 40 biópsias de acordo com a descrição de Hoffmann et al. (2009), 06 animais foram incluídos na classificação de endometrose ativa, 07 animais na endometrose inativa, 06 animais na endometrose ativa destrutiva e 06 amostras foram classificadas como endometrose inativa destrutiva. Os resultados da classificação histológica das 40 amostras de acordo com a descrição de Hoffmann et al. (2009) demonstraram que 15 dos animais apresentavam endométrio normal.

Os resultados da classificação histológica dos 25 casos de endometroses estão apresentados na Tabela 1, quando classificados de acordo com Hoffmann (2009).

Tabela 1. Classificação das endometroses de acordo com Hoffmann et al. (2009).

Endometroses	Número de Casos	Percentual (%)
Endometrose ativa	06	24
Endometrose inativa	07	28
Endometrose ativa destrutiva	06	24
Endometrose inativa destrutiva	06	24
TOTAL	25	100

Nas três classificações, os endométrios sem alterações são os mesmos, representados pela categoria I segundo Kenney e Doig (1986), grupo hígido de Ricketts e Alonso (1991) e Hoffmann et al. (2009).

Histopatologicamente, os endométrios saudáveis se caracterizaram por apresentar epitélio luminal cilíndrico baixo com áreas compostas por epitélio cilíndrico alto e pseudoestratificado. Apresentaram alterações fibróticas, caracterizadas por acúmulo do colágeno na região perivascular e intersticial de forma discreta e focal. As alterações observadas foram predominantemente de origem circulatória: congestão, edema, dilatação de vasos linfáticos, hemorragia e hemossiderose.

As biópsias classificadas como IIA demonstraram epitélio luminal cilíndrico e eventualmente epitélio pseudoestratificado. Fibrose periglandular discreta foi encontrada e foi definida pela deposição discreta de colágeno e média de quatro ninhos fibróticos por campo. Fibrose perivascular e fibrose periglandular discretas foram observadas nestas amostras de endométrio. Lacunas linfáticas e dilatação das glândulas endometriais também foram visualizadas.

As biópsias classificadas como IIB apresentaram epitélio luminal cilíndrico e eventualmente epitélio pseudoestratificado. Entre as alterações fibróticas, a fibrose periglandular foi encontrada e caracterizou-se por deposição moderada de colágeno e média de cinco ninhos fibróticos por campo de cinco milímetros lineares. Fibrose intersticial e perivascular também foram observadas com frequência nessas amostras. Lacunas linfáticas bem como dilatações glandulares estavam presentes.

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).

Nos casos diagnosticados como endometriose o tipo de epitélio luminal mais freqüentemente observado foi similar ao das endometrites infiltrativas. A fibrose intersticial, principalmente de forma difusa, e a fibrose perivascular foram observadas. Houve alta incidência de ninhos fibróticos em todas as amostras.

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

Nas biópsias que foram classificadas como endometriose ativa (Figuras 4 e 5), foi observado epitélio luminal colunar baixo, fibrose periglandular. Presença de ninhos fibróticos (de quatro a seis ninhos por campo). Ainda foram identificadas glândulas individuais circundadas por células estromais fibróticas com núcleos ovóides, hipocromáticas, de tamanho médio a grande. Em alguns casos se observou acúmulo de secreção no lúmen glandular. Presença de ninhos fibróticos (de quatro a seis ninhos por campo). Infiltrado inflamatório mononuclear discreto em estrato compacto. Dilatação de lacunas linfáticas e acúmulo de linfa no estrato compacto, edema intersticial moderado, congestão moderada em estrato esponjoso.

Naquelas que foram classificadas como endometriose inativa (Figuras 6 e 7), se observaram um epitélio pseudoestratificado colunar alto, se observou glândulas isoladas envoltas por células estromais fusiformes com núcleos hiper cromáticos e alongados que estavam arranjadas paralelamente ao eixo das glândulas adjacentes. Ninhos fibróticos que variavam entre um número de quatro a cinco por campo de visualização, fibrose perivascular discreta e acúmulo de secreção em luz glandular. Focos de glândulas endometriais hiperplásicas com dilatação de ácinos e raras glândulas atróficas também foram identificados. Ainda foi identificado um infiltrado inflamatório mononuclear discreto periglandular. Hemossiderose e congestão acentuada em estrato esponjoso e moderada em estrato compacto, edema difuso discreto. Edema intersticial também foi identificado nas amostras.

Nos casos diagnosticados como endometriose ativa destrutiva (Figuras 8 e 9) foi identificado nas amostras de endométrio, epitélio pseudoestratificado colunar alto. Foram observadas glândulas distintas circundadas por células estromais

fibróticas com núcleos ovóides, hipocromáticos de tamanho que variou entre médio a grande e citoplasma pálido, eventualmente células epiteliais glandulares degeneradas eram observadas em algumas glândulas. Estas apresentavam citoplasma vacuolizado. Em algumas amostras foram observadas figuras de mitose, 20 figuras por campo, em objetiva de 20x. Epitélio glandular alto, acúmulo de secreção glandular. Ninhos fibróticos isolados foram notados em algumas amostras, sendo que até dez ninhos em um campo, avaliado no aumento de 10x. Infiltrado inflamatório mononuclear discreto em estrato compacto, congestão difusa moderada, edema intersticial moderado, dilatação de lacunas linfáticas com acúmulo de linfa, dilatação de glândulas endometriais e retenção de linfa no estroma. Edema intersticial também foi observado.

Nas amostras que apresentaram endometrose inativa destrutiva (Figuras 10 e 11) foi identificado um epitélio luminal colunar baixo. Foram observadas glândulas isoladas circundadas por células estromais fusiformes com núcleos alongados e hipercromáticos, arranjadas paralelamente ao eixo das glândulas contíguas. Ainda se identificou destruição multifocal de células epiteliais glandulares. Ninhos fibróticos acima de quinze por campo. Em algumas amostras foi identificada retenção de secreção no lúmen glandular. Em uma das amostras, se identificou uma área de retração cicatricial, com ausência de glândulas. Ainda se observou fibrose perivascular acentuada, proliferação de fibroblastos e dilatação de vasos linfáticos com acúmulo de linfa, presença de infiltrado inflamatório mononuclear periglandular, além da presença de eosinófilos em determinada amostra. Ainda se observaram focos de glândulas endometriais hiperplásicas e fibrose perivascular. Congestão moderada em estrato esponjoso.



FIGURA 4 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa. Glândulas envoltas por células estromais fibróticas (seta) com núcleos ovóides, hipocromáticas. Hematoxilina Eosina. Objetiva: 40x.

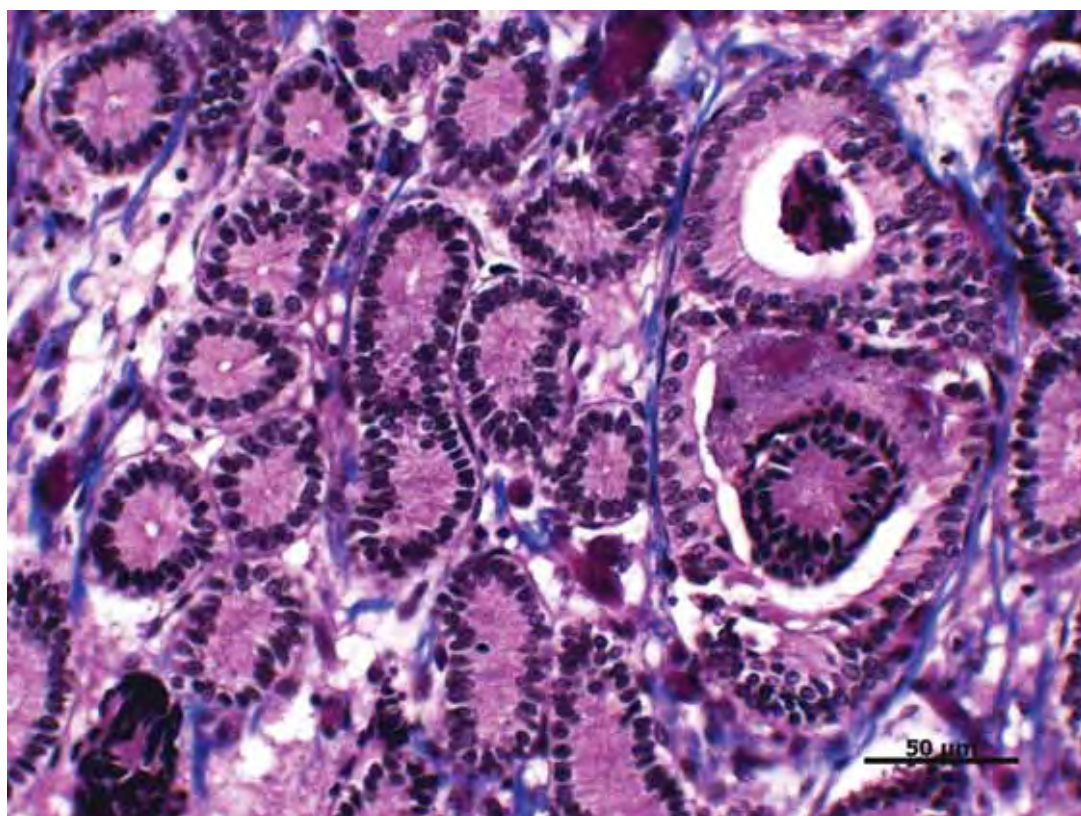


FIGURA 5 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa. Fibrose periglandular intensa e difusa. Masson. Objetiva: 40x.

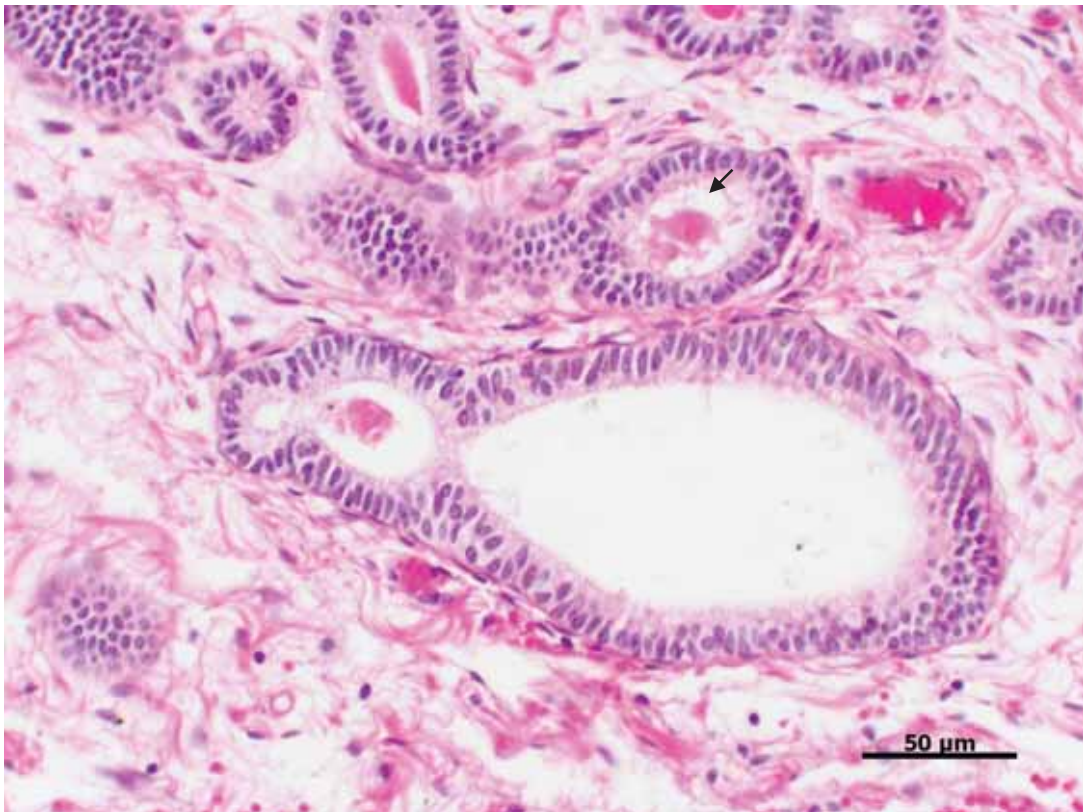


FIGURA 6 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa. Glândulas endometriais hiperplásicas com dilatação de ácinos e acúmulo de secreção (seta). Hematoxilina Eosina. Objetiva: 40x.

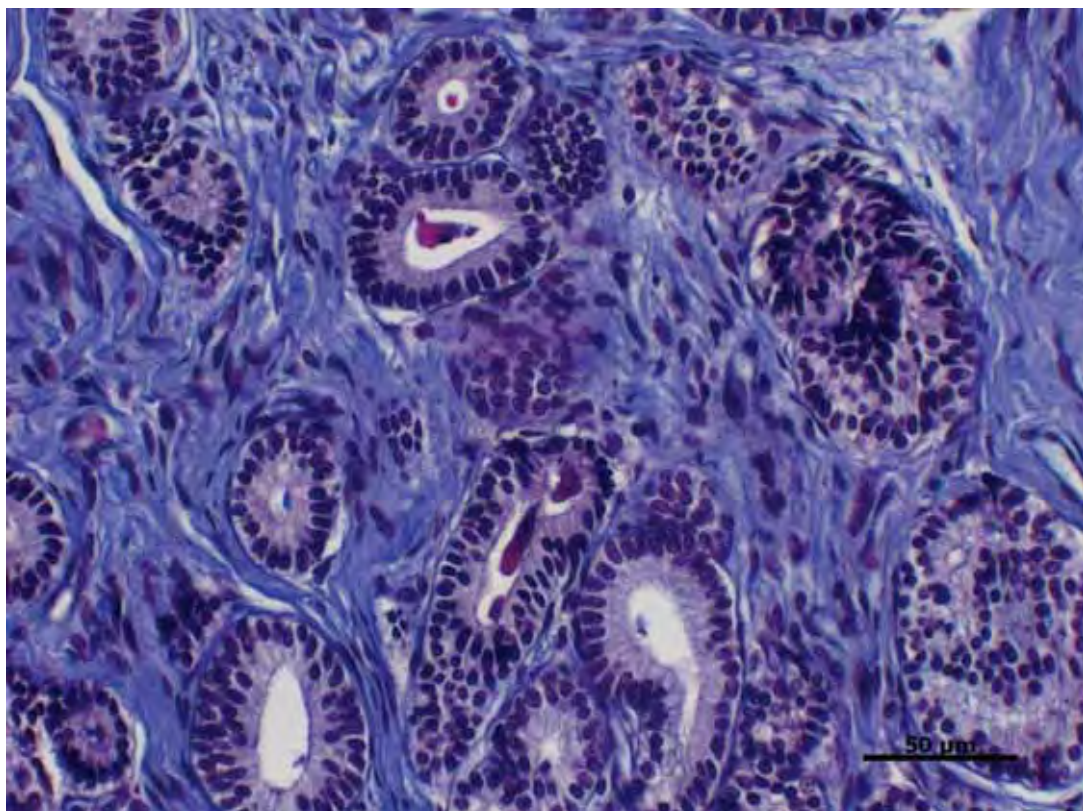


FIGURA 7 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa. Fibrose perivascular discreta e acúmulo de secreção em luz glandular. Masson. Objetiva: 40x.

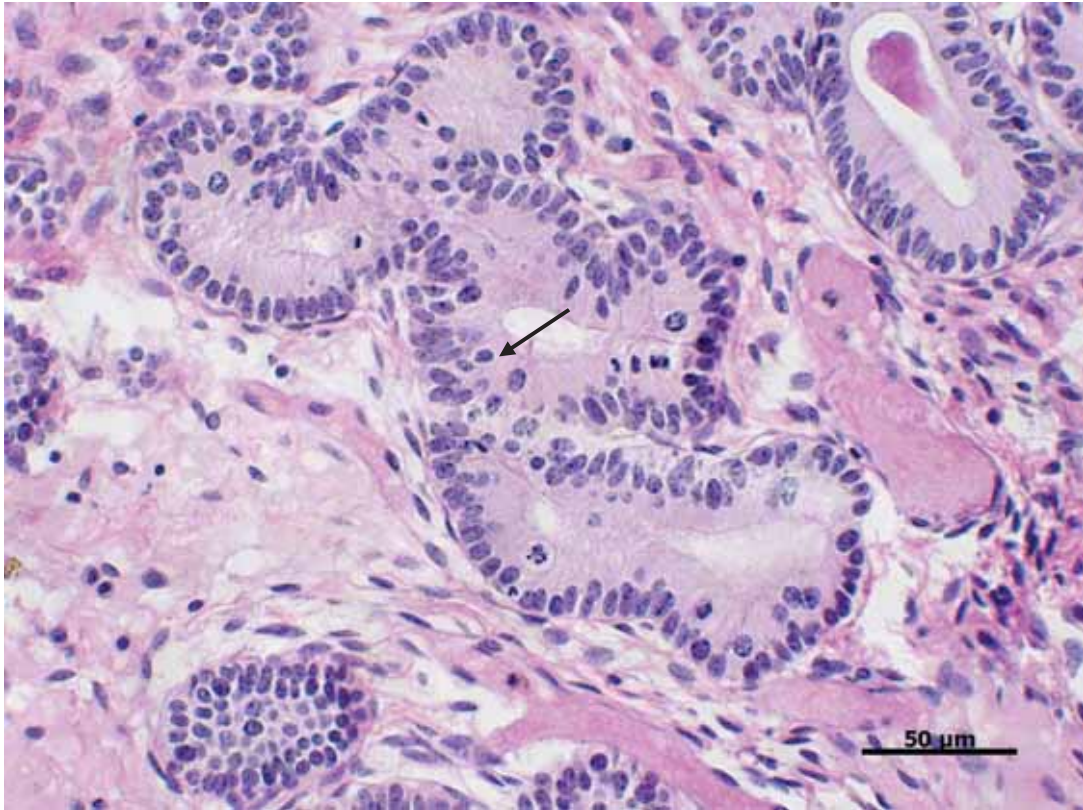


FIGURA 8 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa Destrutiva. Figuras de mitose (seta). Hematoxilina Eosina. Objetiva: 40x.

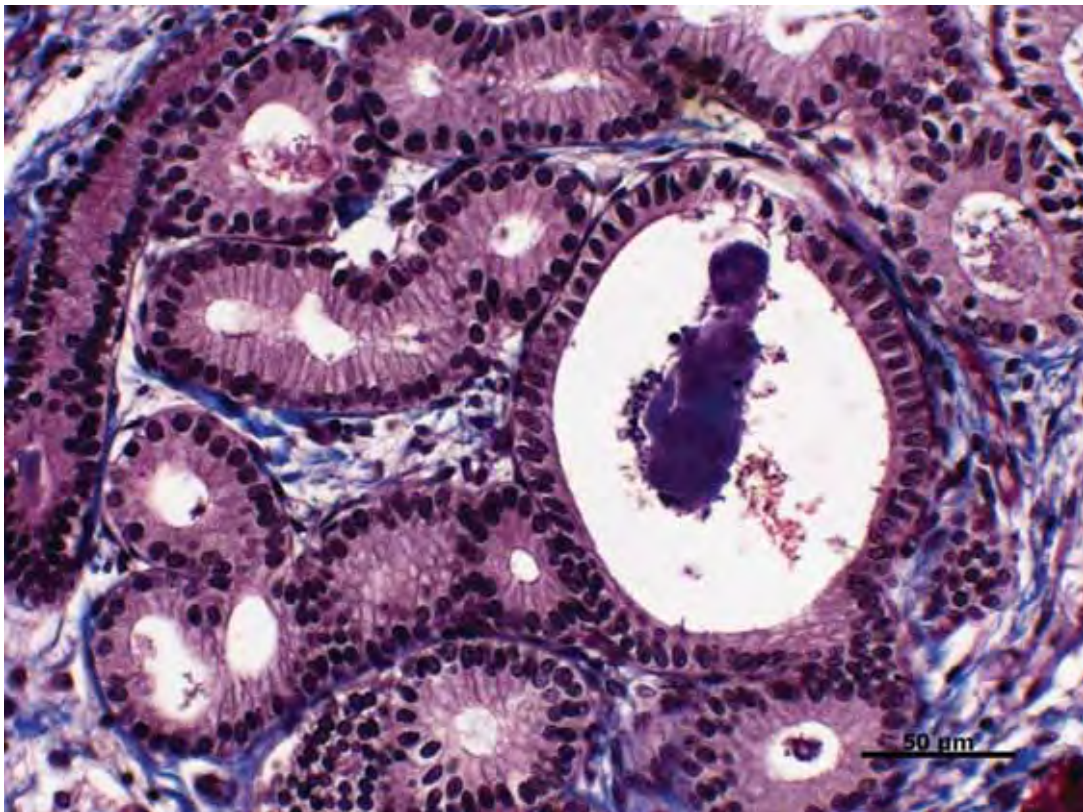


FIGURA 9 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa Destrutiva. Glândulas fibróticas com acúmulo de secreção glandular. Masson. Objetiva: 40x.

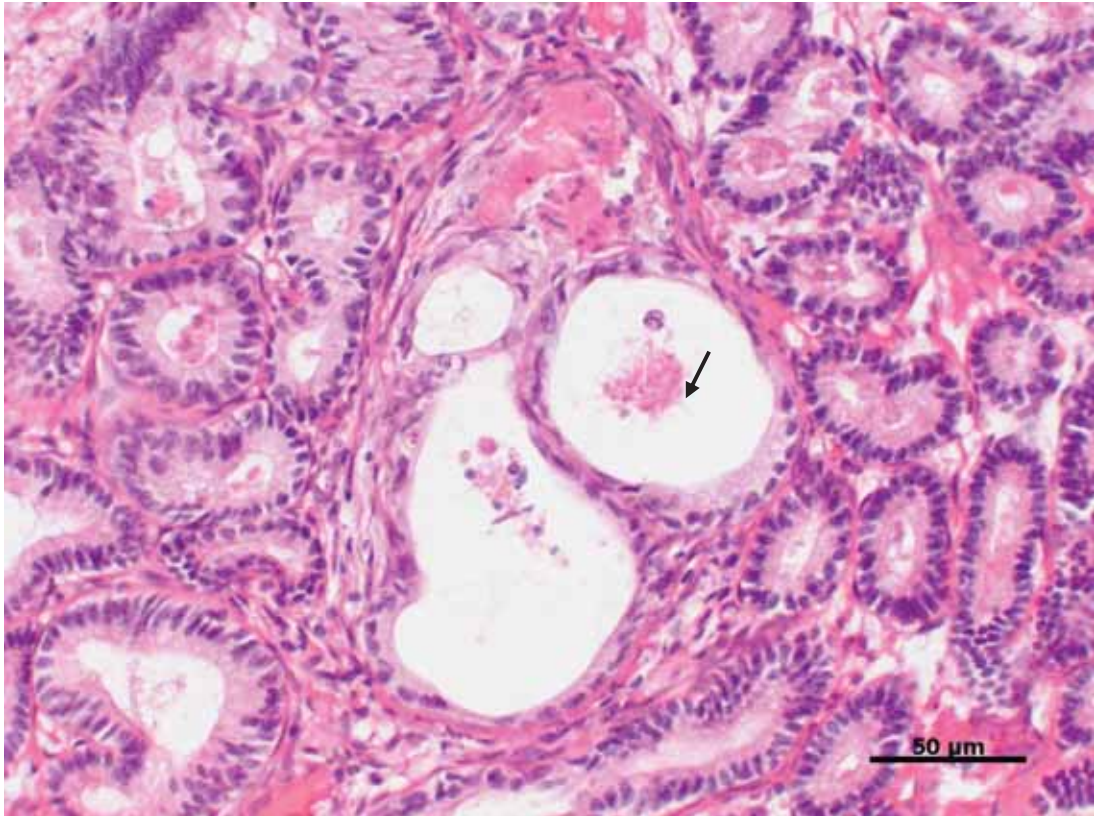


FIGURA 10 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa Destrutiva. Glândulas com células epiteliais apresentando destruição multifocal (seta). Hematoxilina Eosina. Objetiva: 40x.

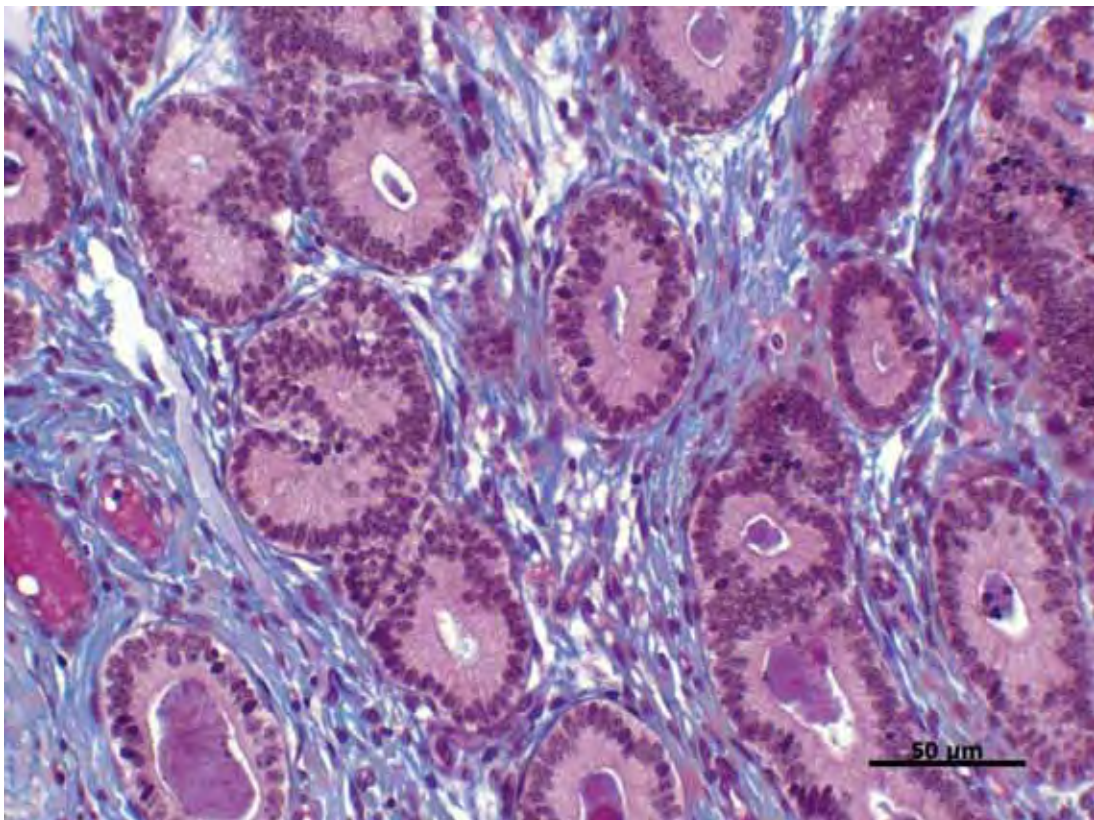


FIGURA 11 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa Destrutiva. Focos de glândulas endometriais hiperplásicas e fibrose perivascular. Masson. Objetiva: 40X.

5.2. AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DAS ENDOMETROSES

Nas amostras de endométrios saudáveis, houve predominância de colágeno fibrilar, com distribuição reticular pelo endométrio. A região que apresentou maior deposição de colágeno denso foi a perivascular.

Na categoria IIA, os estratos compacto e esponjoso, assim como a região periglandular, apresentaram a deposição de colágeno discreta e na região perivascular ocorreu de forma moderada. Todas as regiões avaliadas demonstraram predominância do colágeno denso.

Na categoria IIB, os estratos compacto e esponjoso, além da região periglandular, mostraram deposição de colágeno moderada, e na região perivascular ocorreu de forma acentuada. Em todas as regiões avaliadas, se observou uma predominância do colágeno denso, com exceção da região subepitelial, onde o tipo misto foi observado.

A categoria III se caracterizou 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.

Quando aplicada a classificação de Ricketts e Alonso (1991), nas endometroses houve deposição acentuada de colágeno em todas as regiões analisadas, exceto na região subepitelial, onde a intensidade foi moderada. Os locais de maior deposição de colágeno foram as regiões periglandular e perivascular. Nesse processo, o colágeno denso 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.

Nas biópsias que foram classificadas como endometrose ativa (Figura 12), em algumas poucas glândulas isoladas apresentando até duas camadas de

fibrose ao redor, com formação de até dois ninhos fibróticos. Ainda foram identificados focos de fibrose perivascular discreta. Em algumas amostras se identificou fibrose intersticial severa. Nestas amostras, os locais de maior deposição de colágeno foram as regiões estrato esponjoso, inclusive na região periglandular. Nesse processo, o colágeno do tipo denso predominou em todas as amostras.

Ao redor das glândulas fibróticas se observou uma deposição acentuada de colágeno amarelado e avermelhado.

As amostras classificadas como endometrose inativa (Figura 13), se caracterizaram pela deposição acentuada de colágeno em todas as regiões, sendo observada a predominância do tipo denso. A região que apresentou maior acúmulo de colágeno foi o estrato esponjoso. Fibrose perivascular e intersticial, com até cinco camadas. Presença de até treze ninhos de fibrose por campo. Ainda foram identificadas glândulas dilatadas com aspecto cístico. Os tipos de colágenos observados ao redor das glândulas variaram entre o esverdeado e o amarelado, sendo que predominou o colágeno esverdeado. Algumas amostras de endométrio demonstraram deposição de colágeno amarelado em região perivascular, sobrepondo a presença do colágeno mais esverdeado.

Em determinadas biópsias se identificou a deposição acentuada de colágeno amarelo ao redor de glândulas endometriais fibróticas. Em amostras que demonstraram um número maior que quatro camadas de fibrose periglandular, foram possíveis determinar o predomínio de colágeno amarelado. Além disto, se identificou ainda uma deposição discreta de colágeno esverdeado e acentuada de amarelado em região perivascular.

Nos casos diagnosticados como endometrose ativa destrutiva (Figura 14) se observou que os locais de maior deposição de colágeno foram as regiões do estrato esponjoso e periglandular. Nesse processo, o colágeno do tipo fibrilar predominou em todas as amostras.

Foram identificados focos de fibrose perivascular acentuada, além de fibrose intersticial em estrato esponjoso. Um número de até vinte ninhos fibróticos foi identificado, com glândulas envoltas por até cinco camadas de fibrose ao seu

redor. Nesta categoria, algumas amostras apresentaram deposição discreta de colágeno fibrilar, onde predomina a coloração esverdeada, em região periglandular.

Nas amostras que apresentaram endometrose inativa destrutiva (Figura 15), houve predominância de colágeno denso, com distribuição reticular pelo endométrio. A região que apresentou maior deposição de colágeno denso foi a periglandular. Foi observada fibrose intersticial conspícua moderada, fibrose perivascular acentuada, proliferação de fibroblastos, vasos linfáticos dilatados, edema em estrato compacto, uma média de oito até vinte ninhos fibróticos por campo, em algumas amostras de endométrio. Glândulas com entre duas a quatro camadas de fibrose ao seu redor. Nas amostras de endométrio equino, foi observada uma deposição discreta de colágeno amarelado em região periglandular, em outras se identificou deposição mista de colágeno ao redor das glândulas fibróticas, assim como a região perivascular apresentou uma quantidade moderada de colágeno misto. Naquelas amostras que apresentaram mais de quinze ninhos glandulares fibróticos por campo, com deposição de três a quatro camadas de colágeno, se identificou uma quantidade acentuada de colágeno denso (amarelo). Além de uma deposição moderada de colágenos amarelado em região perivascular. Em amostras que apresentaram mais de vinte ninhos fibróticos por campo e formação de mais de quatro camadas de fibrose periglandular, demonstraram uma quantidade acentuada de colágeno denso, mais amarelado e ausência de colágeno fibrilar (verde). Além de apresentar as mesmas características citadas em região perivascular.

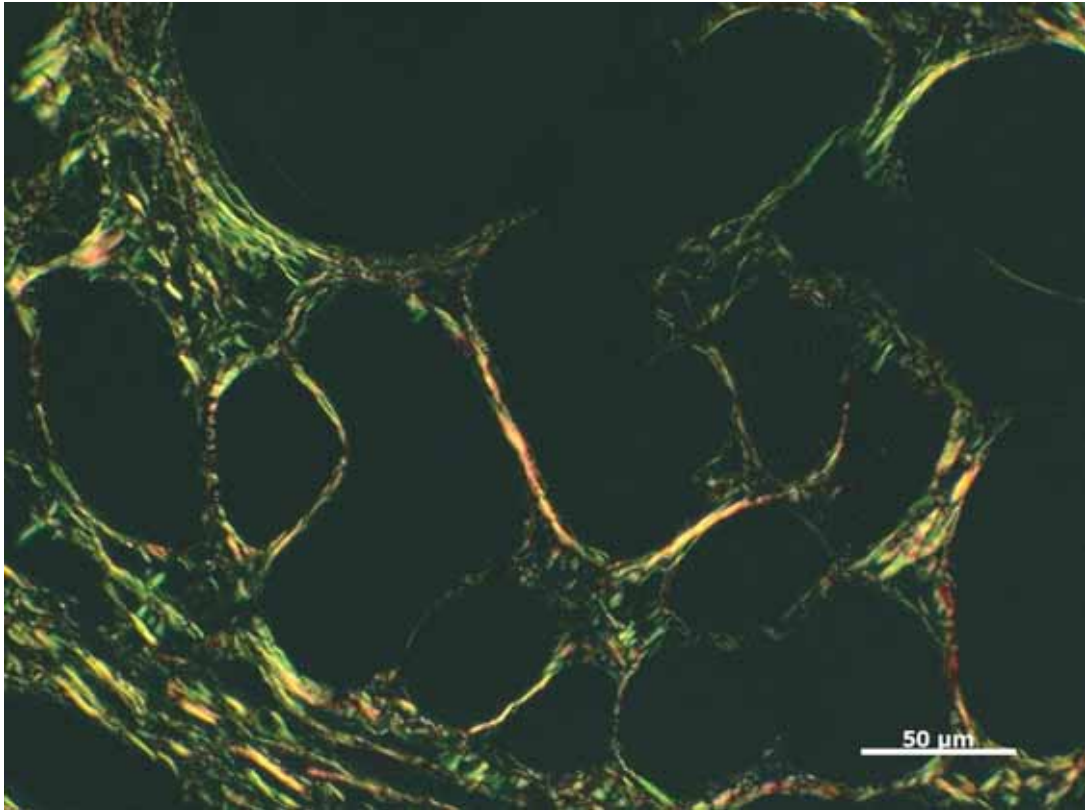


FIGURA 12 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa. Colágeno fibrilar com arranjo reticular. Picrosirius Red – Polarização. Objetiva: 40x.

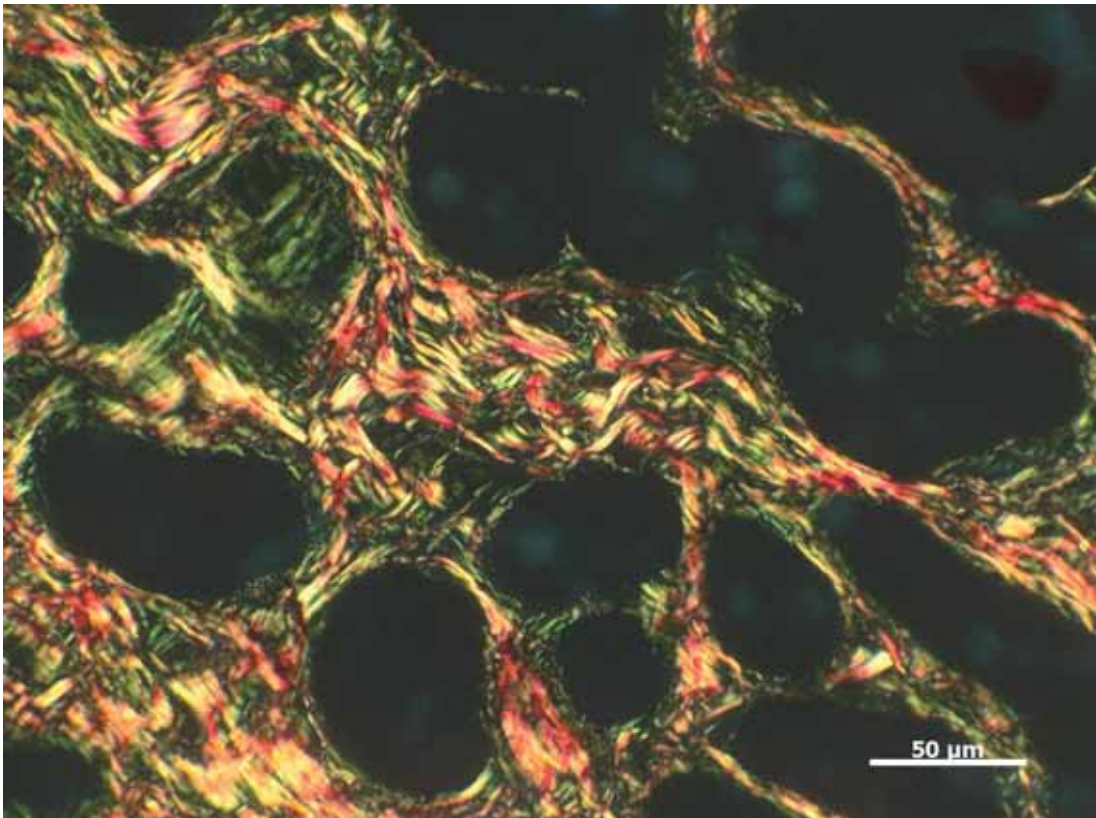


FIGURA 13 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa. Colágeno denso em região periglandular. Picrosirius Red – Polarização. Objetiva: 40x.

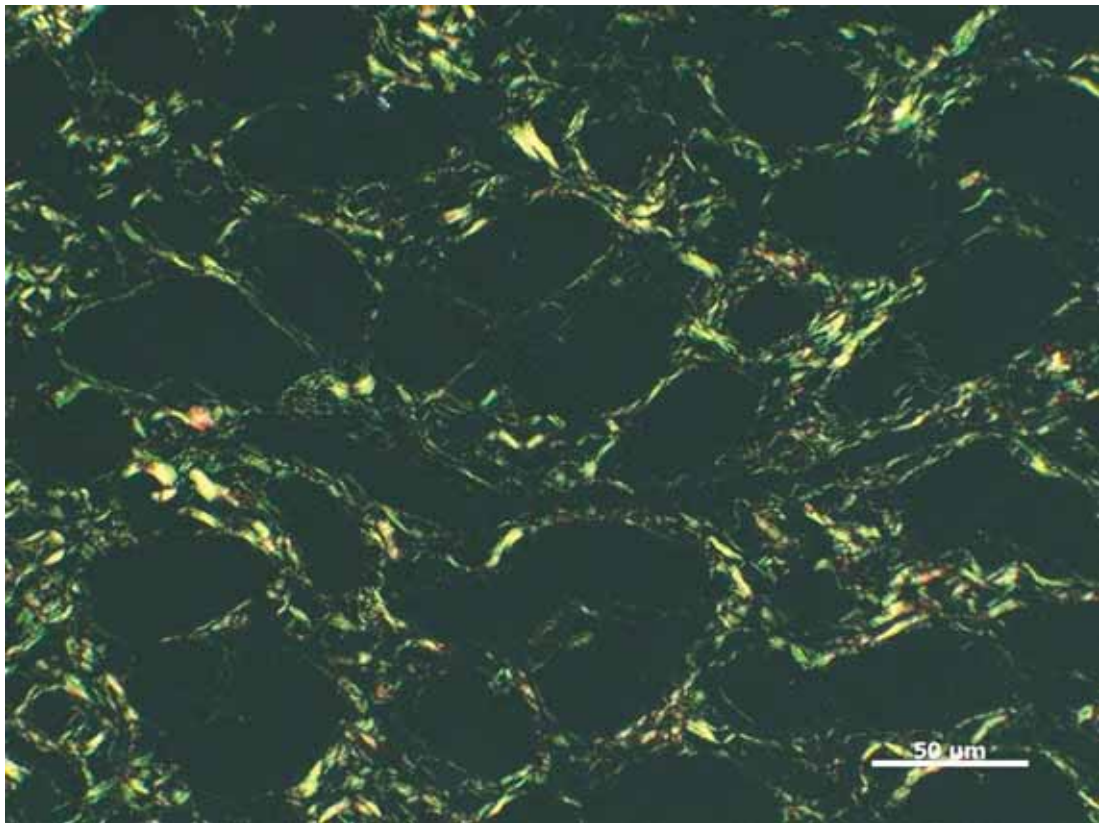


FIGURA 14 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa Destrutiva. Colágeno fibrilar com arranjo reticular periglandular. Picrosirius Red – Polarização. Objetiva: 40x.

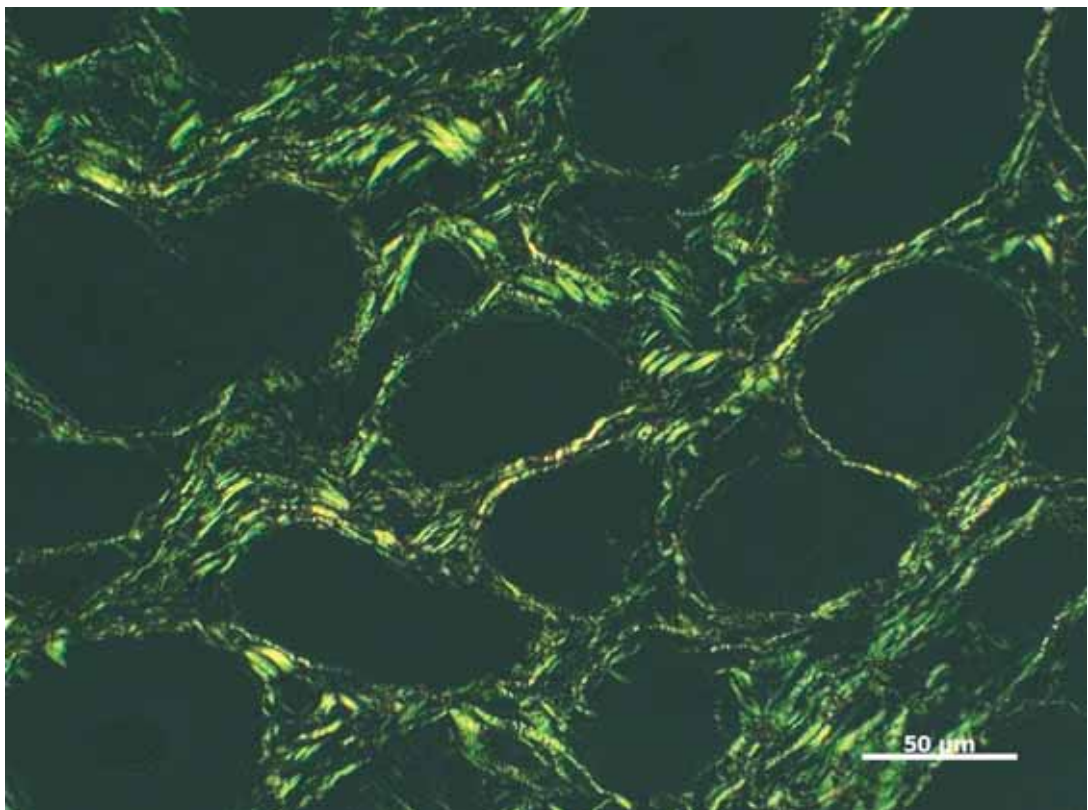


FIGURA 15 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa Destrutiva. Colágeno denso em estrato esponjoso. Picrosirius Red – Polarização. Objetiva: 40x.

5.2. AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS ENDOMETROSES

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

Foi observada marcação acentuada 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, além dos vasos sanguíneos, a expressão de α -actina de músculo liso estava presente ao redor de glândulas dilatadas esparsas em 60% das amostras. Uma ou duas camadas de fibrose circundavam estas glândulas individualizadas, que eventualmente mostravam acúmulo de secreção.

Na categoria IIA, marcação acentuada 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 freqüência maior de expressão nesta categoria ocorreu ao redor de glândulas endometriais dilatadas e individuais, 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, 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 endometrose representaram 44% da marcação positiva para α -SMA. A maior positividade para este anticorpo estava presente ao redor das glândulas endometriais fibróticas dilatadas.

Nas biópsias que foram classificadas como endometrose ativa (Figura 16), se observou a marcação intensa nas regiões periglandular e perivascular, variando entre três a sete 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 se estabeleceu na imunoexpressão de uma camada de fibrose periglandular. A intensidade da reação da imunoexpressão da α -actina de músculo liso foi moderada.

Aquelas biopsias que foram classificadas como endometriose inativa (Figura 17), se diferenciaram pela marcação discreta em regiões perivascular e periglandular, sendo que o número de glândulas fibróticas individualizadas variou entre dez e treze glândulas por campo de observação. Além de marcação moderada em ninhos fibróticos. Em determinadas amostras, a imunexpressão da camada de fibrose ocorreu somente em parte da circunferência glandular, o que determinou uma intensidade de reação leve.

Nos casos diagnosticados como endometriose ativa destrutiva (Figura 18) a marcação mais evidente foi verificada ao redor das glândulas fibróticas. Uma média de seis ninhos fibróticos foi observada por campo. O número de camadas de fibrose periglandular oscilou entre quatro a cinco camadas. Glândulas individualizadas em número de até vinte por campo, dilatadas com acúmulo de secreção no lúmen. Glândulas fibróticas envoltas por camadas com duas a três camadas de miofibroblastos, com imunexpressão variando em intensidade de moderada. Foi observada imunexpressão em região perivascular.

Nas amostras que apresentaram endometriose inativa destrutiva (Figura 19), além dos vasos sanguíneos, a expressão de α -actina de músculo liso estava presente ao redor de glândulas dilatadas esparsas, que variou entre dezessete a vinte glândulas por campo. E o número de camadas de fibrose periglandular variou de três a quatro ao redor de ninhos fibróticos e glândulas individuais, que variou em número de dez por campo de análise. Estas glândulas apresentaram uma imunexpressão que oscilou em intensidade de grau dois a três, e com presença de até quatro camadas de fibrose. Ninhos fibróticos foram identificados em até seis por campo.

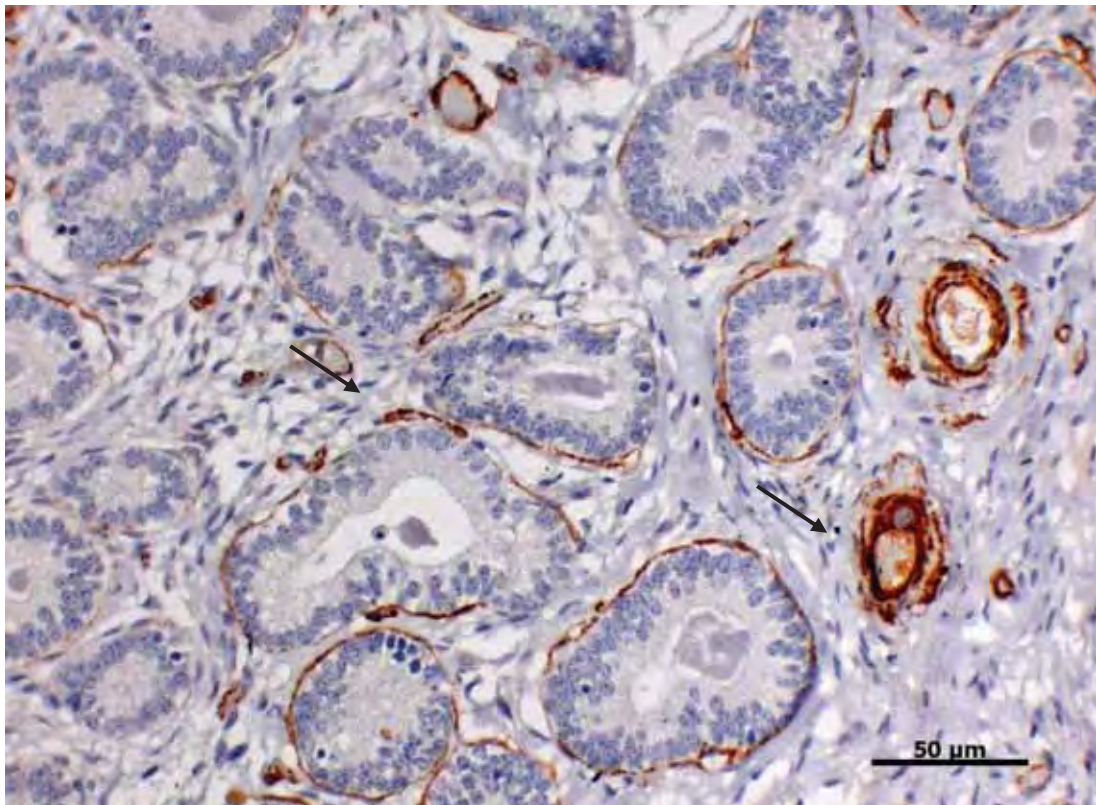


FIGURA 16 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa. Marcação imunoistoquímica de α -SMA positiva na parede dos vasos (seta) e ao redor de estruturas glandulares dilatadas e repletas de secreção (seta). Objetiva: 40x.

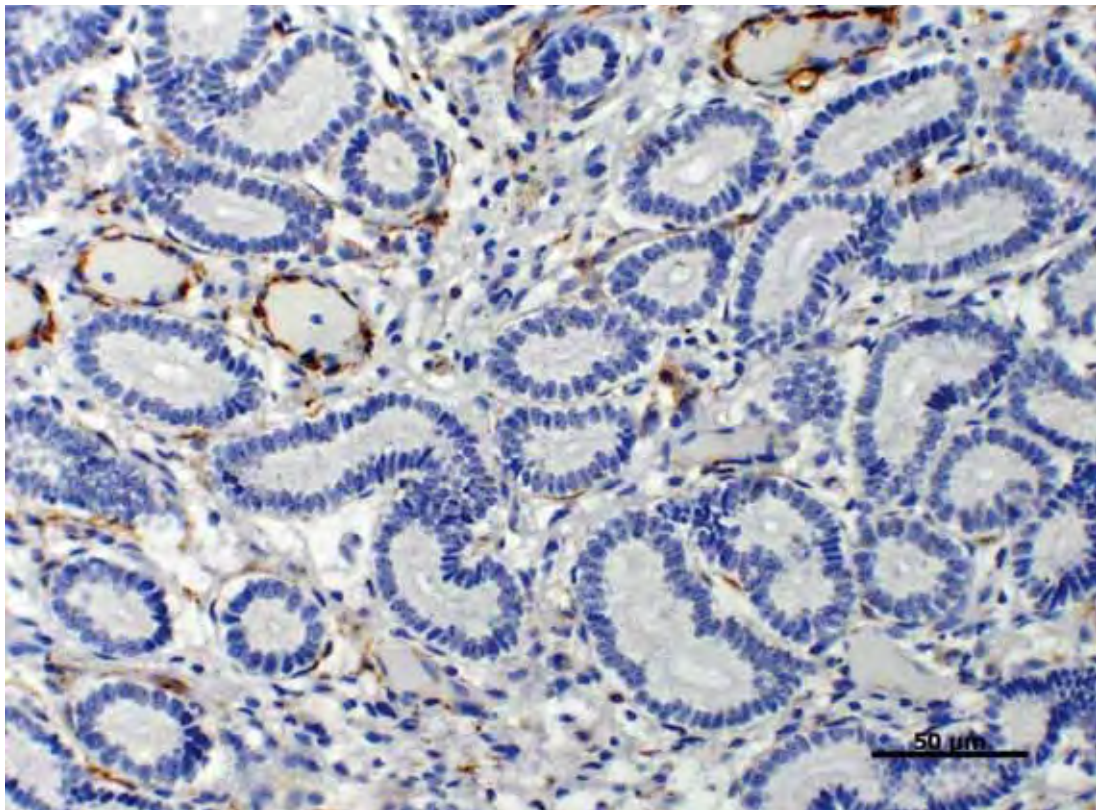


FIGURA 17 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa. Marcação imunoistoquímica de α -SMA positiva fraca em região periglandular. Objetiva: 40x. 52

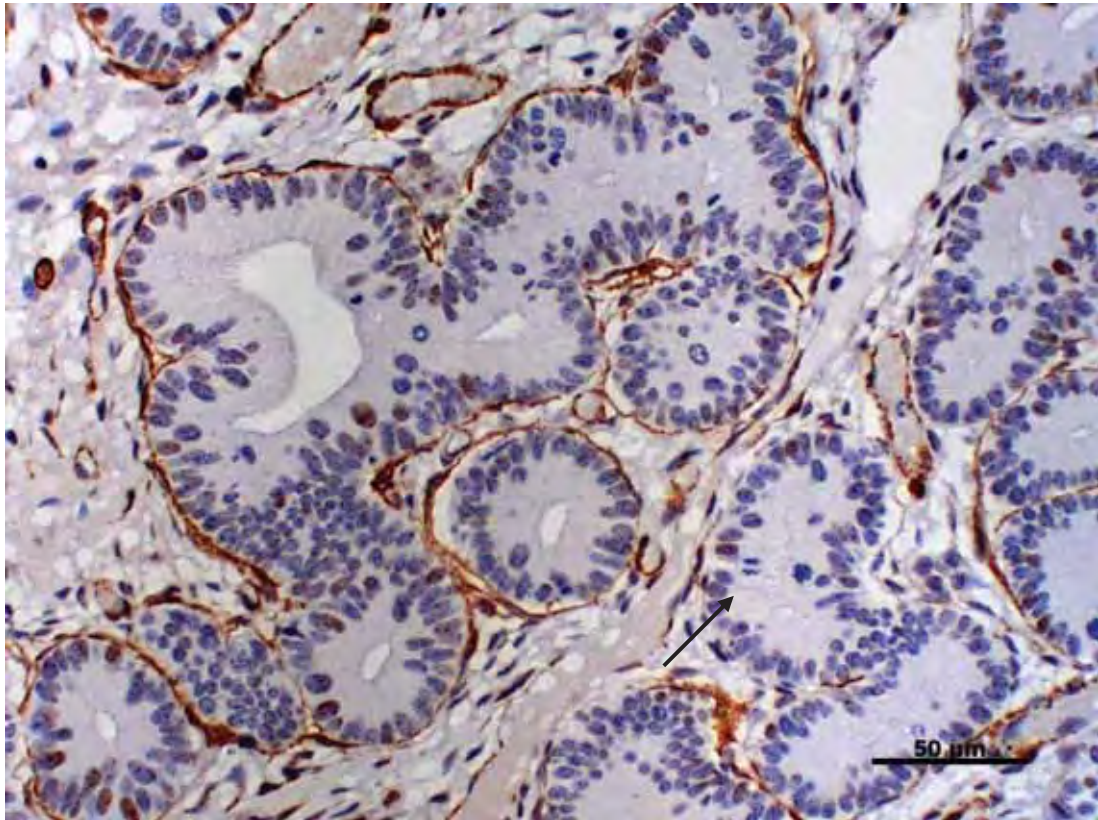


FIGURA 18 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Ativa Destrutiva. Marcação imunohistoquímica de α -SMA ao redor estruturas glandulares dilatadas e figuras de mitose (seta). Objativa: 40x

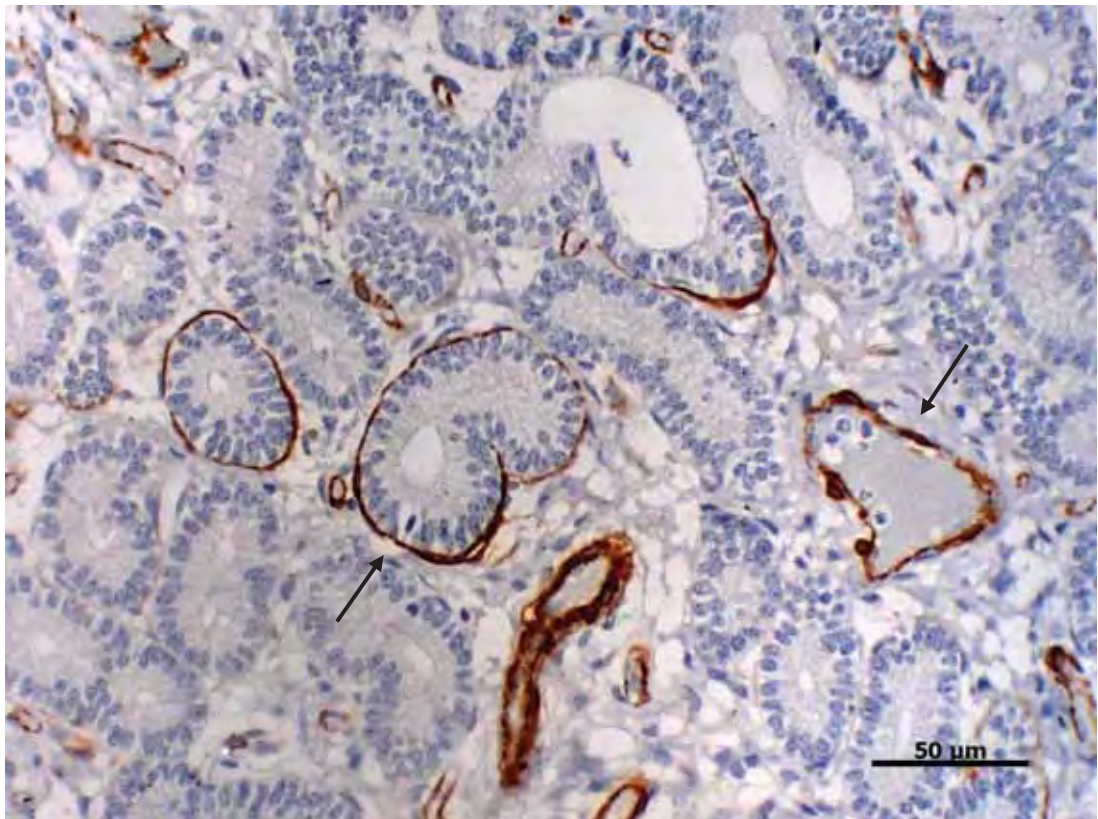


FIGURA 19 – Fotomicrografia de endométrio eqüino. Endometrose Inativa Destrutiva. Marcação imunohistoquímica de α -SMA positiva moderada em região periglandular (seta) e ao redor de vasos (seta). Objativa: 40x.

Discussão

6. DISCUSSÃO

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 fibróticas foram as lesões de maior importância identificadas nas biópsias endometriais equinas. Os primeiros dados sobre amostras de endométrio equino foram descritos por Ricketts (1975). O grau de fibrose periglandular e inflamação foram os critérios usados por Kenney e Doig (1986) e Ricketts e Alonso (1991) para classificarem as amostras de biópsias uterinas. 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).

Nas últimas décadas, vários estudos têm demonstrado que uma biópsia é representativa para a determinação das alterações presentes no endométrio como um todo (BLANCHARD et al., 1987; BERGMAN e KENNEY, 1975; WAELCHLI, 1989). Outros estudos em éguas, no entanto, apresentaram variações consideráveis dentro de áreas diferentes do útero (FIALA et al., 2010; DYBAL et al., 1991).

No presente estudo foram utilizados três critérios de classificação das endometroses nas éguas. Empregando a classificação de Kenney e Doig (1986) para as endometrites crônicas e a definição de endometrite crônica degenerativa (endometrose), descrita por Ricketts e Alonso (1991). A caracterização dos diferentes tipos de endometrose foi realizada de acordo com a classificação morfológica proposta por Hoffmann et al., (2009).

Dentre as quinze amostras de endométrio, alterações fibróticas como fibrose perivascular e intersticial foram observadas em um número significativo de amostras, sendo o acúmulo do colágeno na região perivascular e intersticial de forma discreta e focal, em amostras de endométrio classificadas como categoria I. Estes critérios não considerados na classificação de Kenney e Doig (1986).

As amostras inseridas na categoria III, conforme Kenney e Doig (1986) mostraram fibrose periglandular intensa, com deposição acentuada de colágeno e ninhos fibróticos frequentes.

Conforme a classificação de Hoffmann et al. (2009), neste estudo foi observada nas biópsias com endometrose ativa, glândulas individuais circundadas por células estromais fibróticas com núcleos ovóides, hipocromáticas, de tamanho médio a grande. Em alguns casos se observou acúmulo de secreção no lúmen glandular. O endométrio acometido pelo processo fibrótico se torna incapaz de produzir substâncias histotróficas de qualidade e em quantidades adequadas. Nas éguas o trofoblasto não é invasivo e as secreções uterinas são consideradas essenciais para a manutenção do desenvolvimento e a sobrevivência do embrião. Como resultados deste quadro surgem diferenças marcantes entre o padrão das secreções produzidas pelo epitélio glandular nos focos fibróticos e o das glândulas não afetadas (HOFFMANN et al., 2009).

Nas biópsias endometriais que foram classificadas como endometrose ativa destrutiva foram observadas células estromais fibróticas com núcleos ovóides, hipocromáticos de tamanho que variou entre médio a grande e citoplasma pálido. Além disto, células epiteliais glandulares degeneradas em raras glândulas, com núcleo picnótico e citoplasma vacuolizado. Sendo que em algumas amostras, foram identificadas figuras de mitose.

Nas amostras de endométrio que tiveram endometrose inativa destrutiva foram observadas glândulas isoladas circundadas por células estromais fusiformes com núcleos alongados e hipercromáticos, arranjadas paralelamente ao eixo das glândulas contíguas. Ainda se identificou destruição multifocal de células epiteliais glandulares. Conforme trabalho realizado por Hoffmann et al. (2003) foi possível distinguir endometroses destrutiva de uma não destrutiva. Enquanto uma

endometrose não destrutiva é caracterizada por alterações leves do epitélio glandular, as glândulas da endometrose destrutiva, ocorrendo em 25% dos casos avaliados, mostraram sinais de uma grave degeneração epitelial com perda da morfologia glandular. Subtipos de endometrose ativa (núcleo ovóide e hipocromático) e inativa (núcleo fusiforme e hiperchromático) deram origem a fibrose periglandular. A concomitância de ambos os tipos é frequente em uma biópsia.

Segundo a descrição de Hoffmann et al. (2009), no que se refere à morfologia das células estromais periglandulares, nos focos de fibrose na endometrose, uma diferenciação ativa e inativa pode ser estabelecida. Porém, em contraste com as células estromais inalteradas, alterações endócrinas sazonais ou cíclicas não apresentam influência notável sobre a atividade das células do estroma fibrótico. Ainda, se observou distintamente reduzida expressão de células estromais fibróticas, quando comparado ao estroma hígido, definindo um processo de endometrose. Observações semelhantes têm sido descritos em processos neoplásicos de endométrio humano (CHU et al., 2003; AMANT et al., 2004).

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

Neste estudo foram empregados os métodos histoquímicos para identificação de colágeno, como Tricrômico de Masson e Picrosirius-Polarização, o que permitiu a identificação dos focos de fibrose com maior nitidez, bem como sua distribuição e quantificação, além da identificação dos tipos de colágeno presente na fibrose.

Nas biópsias classificadas como categoria I, alterações fibróticas como fibrose perivascular e intersticial foram observadas em um número significativo de casos, sendo que o tipo de colágeno predominante foi do tipo fibrilar. Conforme já observado por Nunes (2003, 2006), Porto (2006, 2009) e Masseno (2009).

As biópsias inclusas na categoria IIA de Kenney e Doig (1986) demonstraram moderada quantidade de ninhos fibróticos e fibrose periglandular e perivascular e deposição discreta de colágeno. Conforme ressaltado por Nunes (2003) houve casos em que a fibrose esteve presente de maneira inconspícua.

No presente estudo, as biópsias classificadas como categoria III, conforme Kenney e Doig (1986) demonstraram fibrose periglandular intensa, com deposição acentuada de colágeno e ninhos fibróticos freqüentes.

Quando usada a classificação de Ricketts e Alonso (1991) todas as amostras utilizadas de endometrose alterações degenerativas foram notadas com maior ocorrência.

Quando utilizada a classificação de Hoffmann et al. (2009), nas amostras classificadas como endometrose ativa, foram encontradas poucas glândulas isoladas apresentando até duas camadas de fibrose ao redor (de duas a três camadas de fibrose), com formação de até dois ninhos fibróticos. Ainda foram identificados focos de fibrose perivascular discreta. Em algumas amostras se identificou fibrose intersticial severa. Nestas amostras, os locais de maior deposição de colágeno foram as regiões estrato esponjoso e periglandular. Nesse processo, o colágeno do tipo denso predominou em todas as amostras. Ao redor das glândulas fibróticas se observou uma deposição acentuada de colágeno amarelo.

Já naquelas que foram identificadas como endometrose inativa destrutiva, se observou uma predominância de colágeno denso, com distribuição reticular pelo endométrio. A região que apresentou maior deposição de colágeno denso foi a periglandular. Foi observada fibrose intersticial conspícua moderada, fibrose perivascular acentuada, proliferação de fibroblastos, vasos linfáticos dilatados, edema em estrato compacto, uma média de oito até vinte ninhos fibróticos por campo de visualização, em algumas amostras de endométrio. Glândulas com entre duas a quatro camadas de fibrose ao seu redor. Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo demonstraram que no processo fibrótico do endométrio das éguas ocorre a substituição gradativa do colágeno fibrilar com distribuição reticular, predominante nas amostras de endométrio sadio, pelo colágeno denso, conforme aumenta o grau das lesões endometriais.

Este tipo de colágeno é mais denso, e é encontrado preferencialmente na região periglandular (NUNES, 2003; PORTO, 2006; NUNES, 2006 e MASSENO, 2009). Isso reforça a hipótese de que ocorre a substituição gradativa do tecido

funcional endometrial por fibrose, o que conduz à atrofia. Com isso, há comprometimento da produção de histotrófo, incapacidade de nidação do embrião e continuidade da gestação (GRAY et al., 2001; AMARAL, 2002).

De forma geral não foi constatada no presente trabalho uma variação importante na distribuição das fibras colágenas entre os diferentes tipos de endometrose descritas por Hoffmann et al. (2009). No entanto, notou-se que nas endometroses ativa e ativa destrutiva o tipo de colágeno predominante é o que possui arranjo reticular, menos denso, enquanto que nas endometroses inativa e inativa destrutiva o predomínio foi de um colágeno mais denso. Além disso, nestes dois últimos tipos era evidente a concomitância de comprometimento periglandular e perivascular, sugerindo uma possível origem vascular para as alterações endometriais. Nunes (2006) relatou que todas as amostras de endometrose apresentaram lesões vasculares, classificadas como fibroelastose, porém estas foram consideradas como graves em apenas 16,65% das amostras. A relação entre o desenvolvimento da endometrose e alterações vasculares já havia sido citada por Inoue et al. (2000), porém não foi ainda estabelecida a patogênese deste processo.

A técnica de imunistoquímica se baseia na capacidade que têm os anticorpos específicos de se ligarem a antígenos correspondentes. Além do inestimável auxílio ao diagnóstico de diferentes tipos de lesões, as reações imunistoquímicas têm permitido a identificação de diferentes tipos de marcadores biológicos (enzimas, receptores, produtos de genes) (BOENISH, 1989).

Foi observado no presente estudo que as amostras de endometrose ativa destrutiva apresentaram maior expressão da alfa actina de músculo liso. Uma maior quantidade de glândulas fibróticas isoladas demonstrou a expressão desta proteína, uma marcação entre três a quatro camadas de células. No entanto, o que demonstrou reação com menor expressão foram as amostras de endométrio classificadas em endometrose ativa, o que também corrobora os dados encontrados por Hoffmann et al. (2003), que relataram expressão de 20 a 40% de células marcadas. Neste estudo, foi identificado um número de três a sete glândulas que expressavam α -SMA por campo.

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

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). No 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). Miofibroblastos participam do processo de formação da fibrose periglandular ([EVANS et al., 1998](#); [RAILA, 2000](#)). Dessa forma, a co-expressão de α -SMA no estroma pode ser observada principalmente em focos de fibrose destrutiva, o que corrobora com a imunomarcagem descrita anteriormente para a marcação típica de miofibroblastos (SAPPINO et al., 1990).

Uma variabilidade distinta em todos os tipos de endometrose foi visto na imunexpressão de microfilamentos α -actina de músculo liso. No entanto, as células estromais observadas nas endometroses destrutivas, em particular no endometrose destrutiva ativa, tendiam a expressar mais acentuadamente α -SMA.

Em trabalho realizado por Hoffmann et al. (2003), foi identificada a imunexpressão de alfa actina de músculo liso entre moderada a acentuada, nas biópsias classificadas como endometrose ativa destrutiva. Nas demais categorias, a imunomarcagem se apresentou como leve a moderada.

Segundo este mesmo autor (HOFFMANN et al., 2009), amostras de endométrio classificadas como endometrose ativa destrutiva apresentaram imunomarcagem de α -SMA mais evidente em 50 a 80% das amostras avaliadas. Estes dados confirmam que a proliferação de células estromais e sua diferenciação em miofibroblastos assim como o aumento da síntese de matriz extracelular respondem à ação sinérgica e autoinduzida de mediadores, resultando em fibrose periglandular. A concomitância do processo de endometrite seria uma das causas da ativação metabólica das células estromais fibróticas. Algumas destas etapas da progressão do processo fibrótico endometrial estão de

acordo com observações anteriores de outros autores (BORDER e NOBLE, 1994; RAILA, 2000; MENKER e ADLER, 2002). Além disso, os estágios iniciais da fibrose são diferenciados por alterações discretas da membrana basal e acúmulo focal de células estromais com capacidade de sintetizar fibras colágenas. Contudo, como citado anteriormente, em alguns processos fibróticos endometriais predominam células estromais metabolicamente inativas sem capacidade de síntese de colágeno (HOFFMANN et al., 2009).

O primeiro sinal de endometriose é a diferenciação morfológica e funcional atípica das células estromais periglandulares endometriais. No estágio inicial, estas células mostram-se grandes e poligonais, sendo capazes de sintetizar fibras colágenas. Na fibrose avançada, predominam células estromais metabolicamente ativas ou inativas sem capacidade de síntese de colágeno, assim como miofibroblastos (EVANS et al., 1998; RAILA, 2000; WALTER et al., 2001). A contratibilidade destas pode levar a constrição das glândulas uterinas, o que resulta em dilatação glandular (HOFFMANN et al., 2009). Deve ser ressaltado que já se verificou que nos quadros graves de fibrose endometrial, células estromais periglandulares mostram índices apoptóticos menores. Este achado pode representar um mecanismo de perpetuação destas células no foco fibrótico, o que se relaciona a deposição gradativa de colágeno nestas áreas (PORTO, 2009). Desta forma se depreende que, no processo de endometriose, ainda existem inúmeras dúvidas sobre a função dos miofibroblastos.

O princípio da fibrose é caracterizado por células estromais poligonais grandes que sintetizam fibras de colágeno com arranjo reticular. Na fibrose avançada, são identificadas as células estromais ativas ou inativas metabolicamente sem síntese de colágeno, bem como os miofibroblastos como células predominantes (RAILA, 2000). Subsequentemente ocorrem a degeneração epitelial e uma dilatação glandular (SCHOON et al., 1992).

Como resultado ocorrem alterações marcantes nos focos fibróticos e seus padrões histoquímicos (SCHOON et al., 1995), bem como na expressão dos receptores de hormônios esteróides, na intensidade de proliferação (AUPPERLE et al., 1999) e nos filamentos intermediários (AUPPERLE et al., 1997). Essas

modificações nas glândulas fibróticas podem ter como consequências alterações qualitativas e quantitativas das secreções endometriais e, portanto, um desequilíbrio do microambiente intrauterino (HEIN, 2000).

Considerações Finais

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A endometriose é um processo crônico que acomete que se caracteriza pela fibrose e pela alteração morfo-funcional do endométrio. Um dos seus sinais mais característicos é a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno redor das glândulas endometriais, o que tem por consequência o comprometimento do funcionamento destas estruturas que são vitais para o desenvolvimento do embrião.

A origem da endometriose não está ainda estabelecida, porém os dados obtidos até o momento permitem diferenciar conjuntos de alterações morfológicas sequenciais que indicam os estágios de evolução deste processo. No presente trabalho pode-se constatar que o arranjo das fibras colágenas e suas características, está relacionado com o tipo de evolução do processo e, eventualmente, com a sua possível origem. Exemplos disto são a presença do arranjo mais denso do colágeno ao redor de glândulas e vasos sanguíneos nas endometrioses inativas, o que pode indicar as alterações vasculares como causadoras da endometriose nestes casos. O conhecimento das funções dos miofibroblastos nos processos fibróticos do endométrio continua necessitando de estudos mais amplos, porém sua atuação no suporte físico da estrutura glandular e o estresse mecânico exercido sobre as glândulas devido a sua capacidade de contração são funções destas células já descritas. Além disto, estas células têm relação direta com a deposição de colágeno nas regiões onde estão presentes. Sendo assim, acreditamos que as investigações sobre as características evolutivas do processo de endometriose nas éguas, a partir de dados morfológicos, podem contribuir para a ampliação dos conhecimentos sobre os mecanismos do processo e conseqüentemente sugerir ações terapêuticas que possam reverter interromper ou retardar sua evolução.

Entretanto, as células estromais associadas à fibrose mostraram índices proliferativos significativamente menores do que as células estromais não associadas à fibrose.

Conclusões

8. CONCLUSÕES

- ✓ O processo de endometriose mostra variações morfológicas que permitem diferenciar subtipos definidos.
- ✓ O colágeno de arranjo reticular predomina nas lesões fibróticas nas endometrioses ativa e ativa destrutiva.
- ✓ O colágeno denso predomina nas lesões fibróticas das endometrioses inativa e inativa destrutivas.
- ✓ As lesões fibróticas vasculares mais graves acompanham as endometrioses inativa e ativa destrutiva sugerindo que estes dois tipos de endometrioses tenham origem naquelas lesões.
- ✓ A expressão mais fraca de α -SMA nos ninhos fibróticos das endometrioses inativas reflete a predominância de fibrócitos nestas lesões.

Referências

9. REFERÊNCIAS

ABSURY, A. C. Endometritis in mare. In MORROW, D. A. **Cur. T. in theriogenology.**, 2. Ed. Philadelphia: W. B. Sanders, p1143, 1986.

AGUILAR, J.; HANKS, M.; SHAW, D.J.; ELSE, R.; WATSON, E. Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares. **Theriogenology.**, v.66, p. 423-30, 2006.

ALLEN, W.R. Proceedings of the John P. Hughes international workshop on equine endometritis. **Journal E. Vet.**, v.25, p.186, 1993.

AMANT, F.; SCHURMANS, K.; STEENKISTE, E.; VERBIST, L.; ABELER, V.M.; TULUNAY, G. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor positivity in uterine adenocarcinoma. **Gynecol. Oncol.**, v.93, p. 680–685, 2004.

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

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

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

AUPEPPERLE, H. **Imunohistologische Untersuchungen am Endometrium der Stute.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária de Leipzig, Alemanha, 1997.

AUPPERLE, H.; OZGEN, H.; SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; H.O.; SIEME, H.; TANNAPFEL.A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. **Equine Veterinary Journal.**, v.32, p.228-232, 1999.

BARROS, S.S.; MASUDA, E.K., **Biópsia Endometrial na Égua. Diagnóstico e Prognóstico.**, 2009.

BERGMAN, R.V.; KENNEY, R.M. Representativeness of a uterine biopsy in the mare. **AAEP Proc.**, v. 21, p. 355-62, 1975.

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. 445-50, 1987.

BOENISH, T. **Immunochemical staining methods.**, Denmark: DakoCytomation; 1989.

BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. **N. Engl. J. Med.**, 331, p.1286-1292, 1994.

BORGES, L. F.; GUTIERREZ, P. S.; MARANA, H. R. C.; TABOGA, S. R. Picrosiriuspolarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapsed lesions. **Micron.**, v.38, p.580-3, 2007.

BOURKE, M.; MILLS, J.N.; BARNES, A.L. Collection of endometrial cells in the mare. **Aust. Vet. J.**, v.75; p. 75-755, 1997.

BRUNCKHORST, D.; SCHOON, H.A.; BADER, H.; SIEME, H. Morphologische, enzym- und immunhistochemische Charakteristika des endometrialen Zyklus der Stute. **Fertilität.**, v.7, p. 44-51, 1991.

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

BULUN SE. Endometriosis. **N Engl J Med.**, v.79, p.268-360, 2009.

BURKITT, H.G.; YOUNG, B.; HEATH, J.W.; **Histologia Funcional.** 3ed. Guanabara Koogan, 1994.

CALDINI, E. T. E. G. **Estudo histoquímico e ultra-estrutural do colágeno na fibrose periglandular do endométrio eqüino.** 1992. 123p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

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

CHU, M.C.; MOR, G.; LIM, C.; ZHNEG, W.; PARKASH, V.; SCHWARTZ, P.E. Low-grade endometrial stromal sarcoma:hormonal aspects. **Gynecol. Oncol.**, v.90, p.170–176, 2003.

CONCHA-BERMEJILLO, A.; KENNEDY, P.C. Prognostic value of endometrial biopsy in the mare: a retrospective analysis. **JAVMA.**, v.181, n.7, p680-1, 1982.

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.

DASCANIO, J. J. et al. Magnesium sulfate intrauterine therapy in the mare. **Equine pract.**, v. 20, p. 10-13, 1998.

DASCANIO, J. J.; LEY, W.B.; BOWEN, J.M. How to perform and interpret uterine cytology. **AAEP Proc.**, v.43, p.182– 6, 1997.

DELLMANN, H.D.; BROWN, E.M. **Textbook of veterinary histology.**, Filadélfia: Lea & Febiger. v.3.; p.330-4, 1987.

D'HOOGHE, T.M.; KYAMA, C.M.; CHAI, D.; FASSBENDER, A.; VODOLAZKAIA, A.; BOKOR, A.; MWENDA, J.M. Nonhuman primate models for translational research in endometriosis. **Reprod. Sci.**, v.16.; p.152–61. 2009.

DOIG, P.A.; WAELCHLI, R.O. Endometrial biopsy. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reprod.**, Filadélfia: Lea & Febiger, p.225-33, 1993.

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

DYBAL, N.O.; DAELS, P.F.; COUTO, M.A.; HUGHES, J.P.; KENNEDY, P.C. Investigation of the reliability of a single endometrial biopsy sample, with a note on the correlation between uterine cysts on biopsy grade. **ISER Proc.**, v.5, p. 697, 1991.

EKICI, H. et al. A diagnosis and handling of chronic degenerative endometritis in mares with endometrial biopsy. **Veterinary Facultesi Dergisi.**, v. 27, n. 1, p. 59-74, 2001.

ELLENBERGER, C.; AUPPERLE, H.; BARTMANN, C.P.; HOPPEN, H.O.; SCHOON, D.; SCHOON, H.A. Endometrial maldifferentiation caused by ovarian disorders in the mare—morphological and immunohistochemical studies. **Theriogenology.**, v.58, p. 499 –502, 2002.

EVANS, M. J.;HAMER, J. M.; GANSON, L. M; GRAHAM, C.S.; ASBURY, A.C.; IRVINE, C.H.G. Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intrauterine inoculation into maiden mares: effect of steroid hormone environment. **Theriogenology.**, v. 26, p.37-50, 1986.

EVANS, T.J.; MILLER, M.A.; GANJAM, V.K. Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. **Am. J. Vet. Res.**, v. 59, p. 1209-14, 1998.

FIALA, S.M.; ESMERALDINO, A.; JOBIM, M.I.M.; GARBADE, P.; WOLF, C.A.; RICHTER, G.; GREGORY AND MATTOS. Endometrial fibrotic changes. **Anim Reprod. Sci.**, v.121s, p. 89-90, 2010.

GRAY, C. A.; BARTOL, F.F.; TARLETON, B. J.; WILLEY, A. A.; JOHNSON, G. G.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Developmental biology of uterine glands. **Biol. Reprod.**, v.65, p.1311-23, 2001.

GROSS, T.L.; LEBLANC, M.M. Seasonal variation of histomorphologic features of equine endometrium. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 184, n.11, p.1379-82, 1984.

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 Int. J. of Bio. & Cell Bio.**, v. 38, p. 135-151, 2006.

HEILKENBRINKER, T.; KOSSIN, C.; SCHERBARTH, R.; FRERKING, H. A field study to evaluate the efficacy of case historical and clinical parameters in increasing the precision of predicting the course of subsequent pregnancy. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, v. 104, p. 313– 6, 1997.

HEIN, K. **Morpho-funktionelle Untersuchungen an der Cervix uteri und am Endometrium der Stute im Verlauf des Zyklus.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha, 2000.

HERNANDEZ, J.; HAWKINS, D.L. Training failure among yearling horses. **Am. J. Vet. Res.**, v.62, n.9, p.1418-1422, set.2001. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/ajvr.2001.62.1418>>. Acesso em: 23 dez. 2010. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.1418.

HOFFMAN, C.; ELLENBERGER, C.; MATTOS, R. C.; AUPPERLE, H.; DHEIN, S.; STIEF, B.; SCHOON, H. A. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. **Anim. Reprod. Sci.**, v.111, p.261-78, 2009.

HOFFMANN, C.; BAZER, F.W.; KLUG, J.; ALLENM W.R.; AUPPERLE, H.; ELLENBERGER, C.; SCHOON, H.A. Morpho-functional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions – preliminary results. **Pferdeheilkunde.**, v.19, p. 666-669, 2003.

INOUE, Y.; ITO, K.; TERADA, T.; NISHIMURA, N.; HATAZOE, T.; SATO, K. Degenerative changes in the endometrial vasculature of the mare detected by videoendoscopic examination. **AAEP Proceedings.**, v. 46, p. 325-9, 2000.

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. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 138, p. 273, 1980.

JUNQUEIRA, L.C.U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R.R. Diferencial staining of collagens typé I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Arch. Histol. Jon.**, v.41, p.267-74, 1978.

- KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. in: MORROW, D.A. (ed.). **Cur. Therapy Theriogenol.**, Philadelphia: WB Saunders, 1986. p. 723-9.
- KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.172, p. 241-62, 1978.
- KENNEY, R.M. Clinical aspects of endometrial biopsy in fertility evaluation of the mare. In: Proc. 23rd. **Ann. Conv. Americ. Assoc. Equine Pract.**, p.105-22, 1977.
- KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. **Proc. Am. Ass. Equine Pract.** p.237-336, 1975.
- LEBLANC, M.M.; NEUWIRTH, L.; JONES, L.; CAGE, C.; MAURAGIS, D. Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. **Theriogenology.**, v. 50, p.49-54, 1998.
- 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.
- LUNA, L.G. **Manual of histological staining methods of armed forces institute of pathology.** Washington: MacGraw Hill, 1968. 258p.
- MASSENO, A. P. B.; **Caracterização imunoistoquímica dos miofibroblastos endometriais e da expressão de MMP-2 nas endometrites crônicas das éguas.** Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009. 99 p.
- MEDICE, E. B.; MERKT, H.; POLHENS, J. F.; BRUNKHORST, D. Considerations on the use of ancillary diagnostic aids in the diagnosis of endometrites due to infection in mares. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl., v44, p.700-3, 1991.
- MENKER, A.; ADLER, G. TGF β -induced fibrogenesis of the pancreas. **Int. J. Gastrointest.**, Cancer 31, p.41-46, 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.
- NEELY, D.P. Evaluation and Therapy of Genital Disease in the Mare. In: NEELY, D.P.; LIU, I.K.M.; HILLMAN, R.B.: **Equine Reprod.**, Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, New Jersey, p.40-56, 1983.
- NIELSEN, J.M Endometrits in mares: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology**, v. 64, p. 510-518, 2005.
- NUNES, L. C. **Avaliação da expressão de metaloproteinases, TIMP-1 da esclerose vascular nas endometrites das éguas.** Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006. 99 p.

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

OVERBECK, W.; WITTE, T.S.; HEUWISER, W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. [Theriogenology](#), v. 75, p. 1311-8, 2011.

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

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

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

RAILA G. ZUR. **Pathogenese der Endometrose der Stute. Morphologisch-funktionelle Untersuchungen** [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2000.

REISWIG, J.D.; THRELFALL, W.R.; ROSOL, T.J. A comparison of endometrial biopsy, culture and cytology during oestrus and dioestrus in the horse. **Equine Vet. J.**, v.1, p.240-1, 1993.

RICKETS, S.W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. **J. Reprod. Fertil.**, v.23, p. 341-345, 1975.

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

ROSSDALE, P.D.. Epidemiological study of wastage among racehorses: 1982-1983. **Vet. Record**, v.116, n.3, p.66-69, 1985. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/116/3/66.abstract>>. Acesso em: 23 dez 2010.doi:10.1136/vr.116.3.66

RUNGE, A. Zur. **Repräsentanz histologischer Untersuchungsbefunde an Uterusbiopsien bei der Diagnose endometrial bedingter Fertilitätsstörungen der Stute.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária de Leipzig, Alemanha, 1995.

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

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

SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. **Pferdeheilkunde.**, v.8, p. 355– 62, 1992.

SCHOON, D.; SCHOON, H.A.; KLUG, E. Angiopathien im Endometrium der Stuten: Diagnose und prognostische Bedeutung. **In: Dtsch. Vet. Med. Gesellschaft (Hrsg.), Tagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten DVG, Wiesbaden, v.13, p.17-28, 1994.**

SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KÖTTER, B.; RUNGE, A.; KLUG, E. Zur Pathogenese und Prognose der Endometrose der Stute. **In: Dtsch. Vet. Med. Gesellschaft: Bericht des 21. Kongresses der DVG, Bad Nauheim, p.273-82, 1995.**

SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KLUG, E. The endometrial biopsy in the mare with regard to clinical correlations. **Pferdeheilkunde.**, v.13, p. 453– 64, 1997.

SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; WIEGANDT, I.; BARTMANN, C.P.; AUPPERLE, H. "Endometrial maldifferentiation" - a clinically significant diagnosis in equine reproduction? **Pferdeheilkunde.**, v.15, p. 555–9, 1999.

SCHOON, H.A.; WIEGANDT, I.; SCHOON, D.; AUPPERLE, H.; BARTMANN, C.P. Functional disturbances in the endometrium of barren mares: A histological and immunohistochemical study. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v.56, p.381–91, 2000.

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

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

SILVA, C. A. M.; BARROS, S. S.; ESQUERRE, R. A. A biópsia endometrial na avaliação da fertilidade da égua. **Pesq. Vet. Bras.**, v.7, p.131-3, 1987.

TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONIER, C.; BROWN, R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 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 practitioners. **JAVMA.**, v. 198, n. 10, p. 1745-7, 1991.
- TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M. Uterine clearance of non-antigenic markers (⁵¹Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. **J. Reprod. Fertil.**, suppl. 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 zooepidermicus*. **Am. J. Vet. Res.**, v.54,p. 570-2, 1993.
- 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 zooepidermicus*. **Am. J. Vet. Res.**, v.54,p. 570-2, 1993.
- VAN CAMP, S.D. Endometrial biopsy of the mare: A review and update. **Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.**, v.4, p. 229-45, 1988.
- VOGEL, H.J.; HUMKE, E. Der Formenzyklus der Uterindrüsen der Stute im Vergleich anderer Säugetiere und des Menschen. **Anat. Histol. Embryol.**, v.2; p. 271-79, 1973.
- WAELCHLI, R.O.; WINDER, N.C. Distribution of histological lesions in the equine endometrium. **Vet. Rec.**, v. 124, p. 271-3, 1989.
- WAELCHLI, R.O.; CORBOZ, L.; WINDER, N.C. Comparison of histological, cytological and bacteriological findings in the endometrium of the mare. **Zentralbl Veterinarmed.**, v.35, p. 442-9, 1988.
- WALTER, I.; HANDLER, J.; REIFINGER, M.; AURICH, C. Association of endometrosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. **Reproduction.**, v.121, p. 581-6, 2001.
- WATSON, E. D. Post breeding endometritis in the mare. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 221-32, 2000.
- WATSON, E.D.; SERTICH, P.L. Effect of repeated collection of multiple endometrial biopsy specimens on subsequent pregnancy in mares. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 201, n.3, p. 438-40, 1992.
- 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. **Am. J. of Pathol.**, v.145, p.114-125, 1994.

Trabalho Científico

10. TRABALHO CIENTÍFICO

AVALIAÇÃO DA FIBROSE ENDOMETRIAL E DOS MIOFIBROBLASTOS NAS ENDOMETROSES ATIVA E INATIVA DAS ÉGUAS

(ASSESSMENT OF ENDOMETRIAL FIBROSIS AND MYOFIBROBLASTS IN ENDOMETROSIS ACTIVE AND INACTIVE MARES)

Ana Paula Batista MASSENO¹, Julio Lopes SEQUEIRA² Louisiane de Carvalho NUNES³, Camila Dias PORTO⁴ Marco Antônio ALVARENGA⁵ Deilson Elgui de OLIVEIRA⁶

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

2. Docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu, SP.

3. Docente do Centro de Ciência Agrárias – UFES, Campus de Alegre, ES.

4. Docente da Faculdade Integrado de Campo Mourão, PR.

5. Docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu, SP.

6. Docente da Faculdade de Medicina – UNESP, Campus de Botucatu, SP.

Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

FMVZ – UNESP Dept^o. Clínica Veterinária

Distrito de Rubião Jr, s/n

CEP 18618-000 Botucatu - SP

sequeira@fmvz.unesp.br

1. RESUMO

A endometrite é a principal causa de redução da fertilidade em éguas. Nas endometroses, 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. Este estudo teve como objetivo avaliar a fibrose endometrial das éguas considerando as características histomorfológica, histoquímica e imunoistoquímica da endometrose ativa, endometrose inativa, endometrose inativa destrutiva e endometrose ativa destrutiva, procurando esclarecer a participação dos miofibroblastos nestes processos que podem influenciar a progressão da doença. A origem da endometrose não está ainda estabelecida, porém os dados obtidos até o momento permitem diferenciar conjuntos de alterações morfológicas sequenciais que indicam os estágios de evolução deste processo. No presente trabalho pode-se constatar que o arranjo das fibras colágenas e suas características, está relacionado com o tipo de evolução do processo e, eventualmente, com a sua possível origem. Exemplos disto são a presença do arranjo mais denso do colágeno ao redor de glândulas e vasos sanguíneos nas endometroses inativas, o que pode indicar as alterações vasculares como causadoras da endometrose nestes casos. O conhecimento das funções dos miofibroblastos nos processos fibróticos do endométrio continua necessitando de estudos mais amplos, porém sua atuação no suporte físico da estrutura glandular e o estresse mecânico exercido sobre as glândulas devido a sua capacidade de contração são funções destas células já descritas. Além disto, estas células têm relação direta com a deposição de colágeno nas regiões onde estão presentes.

Palavras-chave: Égua, endométrio, endometrose.

2. ABSTRACT

Endometritis is the leading cause of impaired fertility in horses. In endometroses, dilated glands filled with secretion and cell debris are seen frequently in equine endometrium, as well as non-dilated glands showing marked fibrotic reaction. This study aimed to evaluate the endometrial fibrosis considering the characteristics of mares histomorphological, histochemical and immunohistochemical studies of endometriosis active, inactive endometriosis, endometrios active and inactive destructive destructive, seeking to clarify the involvement of myofibroblasts in these processes that may influence disease progression. The origin of endometriosis is not yet established, but the data obtained so far allow to differentiate sets of sequential morphological changes that indicate the stages of evolution of this process. In the present work can be seen that the arrangement of collagen fibers and their characteristics, is related to the type of process evolution and eventually to their possible origin. Examples include the presence of the denser arrangement of collagen around glands and blood vessels in endometroses inactive, which may indicate the cause of vascular disorders such as endometriosis in these cases. Knowledge of the functions of myofibroblasts in fibrotic processes of the endometrium is still in need of further studies, but its performance in physical support of the glandular structure and the mechanical stress exerted on the gland due to its ability to contract are functions of these cells already described. Moreover, these cells are directly related to the deposition of collagen in the regions where they are present.

Keywords: Mare, endometrium, endometrosis.

3. INTRODUÇÃO

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).

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. A também denominada endometrose não é uma condição pós-cobertura, embora esteja associada à falha do *clearance* uterino, mas também pode ser resultado de repetidas inflamações e do avanço da idade (WATSON, 2000).

O termo em si determina cronicidade e se caracteriza por alterações degenerativas (ALLEN, 1993) e mais especificamente, é definida como fibrose grave seguida por dilatação cística das glândulas endometriais (HOFFMANN et al., 2009). A etiologia e a patogenia da endometrose são desconhecidas (HOFFMANN et al., 2003).

A endometrose é um processo progressivo e irreversível, está correlacionada com a idade e é agravada por estímulos recorrentes como coito, infecções ou gestação (RICKETTS e ALONSO, 1991).

Ricketts e Alonso (1991) observaram que com o aumento da idade das éguas surgem sinais avançados de doença degenerativa endometrial, independentemente de alterações relacionadas às infecções, prenhez, partos e/ou involução uterina pós-parto.

Nestas lesões a deposição de colágeno ocorre mais comumente ao redor das glândulas ou associada à membrana basal. Essa alteração compromete a integridade e a função das glândulas endometriais, estruturas necessárias desde o período de pré-implantação embrionária até o desenvolvimento placentário

completo. Nas glândulas fibróticas, o epitélio se diferencia irregularmente, além de ocorrer à modificação das secreções glandulares. Portanto, nos casos mais severos, mesmo que ocorra implantação embrionária, a redução ou alteração dessas secreções podem causar a nutrição inadequada do feto, o que pode resultar em aborto (WALTER et al., 2001).

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, comprometendo o fluxo de secreção e resultando em dilatação glandular e formação de cistos (AMARAL, 2002).

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 deste processo reside na substituição do colágeno do tipo fibrilar, presente na maior parte da lâmina própria do endométrio, por colágeno do tipo denso. Estudos anteriores realizados demonstraram que no processo fibrótico do endométrio das éguas ocorre à substituição gradativa do colágeno do tipo fibrilar com distribuição reticular, predominante nas amostras de endométrio sadio, pelo colágeno denso, conforme aumenta o grau das lesões endometriais. Este tipo de colágeno é mais denso, e é encontrado preferencialmente na região periglandular (NUNES, 2003; PORTO, 2006; NUNES, 2006 e MASSENO, 2009).

Masseno (2009) verificou que o colágeno denso predominou nos endométrios que mostraram graus de lesão mais acentuados, depositando-se principalmente nas lesões fibróticas periglandulares e, na medida em que estas lesões se tornavam mais graves, eram mais numerosas as células que expressavam α -SMA, descritas como miofibroblastos.

Deve-se ressaltar que já foi verificado que nos quadros graves de fibrose endometrial, as células estromais que se concentram em torno de estruturas glandulares mostram índices apoptóticos menores. Este achado pode representar um mecanismo de estabilização destas células no foco fibrótico, o que se relaciona a deposição gradativa de colágeno nestas áreas (PORTO, 2009). Desta

forma depende-se que, no processo de endometriose, ainda existem inúmeras dúvidas sobre a função dos miofibroblastos.

A presença mais expressiva dos miofibroblastos nas lesões fibróticas e a sua associação com a deposição de colágeno denso no endométrio nos leva a relacionar estas células 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 (MASSENO, 2009).

Em trabalho recente HOFFMANN et al., (2009) que a proliferação de células estromais e sua diferenciação em miofibroblastos assim como o aumento da síntese de matriz extracelular respondem à ação sinérgica e autoinduzida de mediadores, resultando em fibrose periglandular. Estes autores descrevem morfológicamente as fases de evolução do processo fibrótico na endometriose denominando-as de endometriose ativa, endometriose inativa, endometriose inativa destrutiva e endometriose ativa destrutiva.

Este estudo teve como objetivo avaliar a fibrose endometrial das éguas considerando as características histomorfológica, histoquímica e imunoistoquímica das prováveis fases evolutivas do processo de endometriose nas éguas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas no presente trabalho 40 biópsias endometriais que constavam do arquivo de blocos do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu – SP. As biópsias uterinas foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas, lavadas em água corrente e transferidas para a solução de álcool a 70%. Posteriormente, as amostras foram submetidas aos processos de rotina para inclusão em parafina. De cada uma das amostras foram confeccionados cortes com três micrômetros de espessura em micrótomo rotativo que foram corados pelos métodos de hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e Picrosirius Red. Cortes do mesmo material foram submetidos aos procedimentos imunoistoquímicos. Nos procedimentos imunoistoquímicos O anticorpo primário utilizado neste trabalho foi

anticorpo anti- α -SMA (cód. M0851, Clone 1A4 - Dako). O anticorpo primário 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.). A concentração utilizada foi de 1:1250.

Cortes de três micrômetros das biópsias uterinas foram colocados em lâminas histológicas, previamente tratadas com solução de Poli-L-Lisina (P8920-Sigma), desparafinizados e hidratados. 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, os cortes foram submetidos aos processos de desparafinização e hidratação. 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 10 minutos.

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. Em seguida, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com leite desnatado Molico® 3% em TRIS 10mM, pH 7,5. Conforme a orientação do fabricante, o Sistema de visualização, *Novolink™ 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.

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.

A caracterização dos diferentes tipos de endometriose foi realizada de acordo com a classificação morfológica proposta por Hoffmann et al., (2009). 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. 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). Nesta análise foi realizada uma avaliação detalhada da distribuição do colágeno, determinando-se as estruturas de sua maior concentração no endométrio. 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 denso e as fibrilas delgadas e de coloração esverdeada, como de colágeno fibrilar. A avaliação descritiva para a imuno-reatividade foi realizada considerando-se os tipos celulares positivos entre as diferentes estruturas marcadas

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS ENDOMETROSES

Após a classificação histológica das 25 biópsias de acordo com a descrição de Hoffmann et al. (2009), 06 animais foram incluídos na classificação de endometrose ativa, 06 animais na endometrose ativa destrutiva, 07 animais na endometrose inativa e 06 amostras foram classificadas como endometrose inativa destrutiva. Os resultados da classificação histológica dos 25 casos de endometroses estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação das endometroses de acordo com Hoffmann et al. (2009).

Endometroses	Número de Casos	Percentual (%)
Endometrose ativa	06	24
Endometrose inativa	07	28
Endometrose ativa destrutiva	06	24
Endometrose inativa destrutiva	06	24
TOTAL	25	100

Nas biópsias que foram classificadas como endometriose ativa foi observado que o epitélio luminal era constituído por células colunares baixas. O estrato compacto apresentava infiltrado inflamatório mononuclear difuso em grau discreto. No estrato esponjoso o edema intersticial moderado e a lacunas linfáticas eram as alterações vasculares que chamavam a atenção. A fibrose periglandular estava presente em glândulas individuais ou formando ninhos fibróticos, geralmente de quatro a seis ninhos por campo de observação no aumento de 10 vezes. Estas glândulas eram circundadas por até quatro camadas de células estromais fibróticas com núcleos ovóides, hipocromáticos, de tamanho médio a grande. Em algumas destas estruturas era nítido o acúmulo de secreção no lúmen glandular, muitas vezes associados a dilatação cística da glândula.

Nos casos diagnosticados como endometriose ativa destrutiva o epitélio luminal era formado por células colunares altas de arranjo pseudoestratificado. Foram observadas glândulas distintas circundadas por células estromais fibróticas com núcleos ovóides, hipocromáticos de tamanho que variou entre médio a grande e citoplasma pálido, eventualmente células epiteliais glandulares degeneradas com citoplasma vacuolizado eram observadas em algumas glândulas. O epitélio glandular era alto, inclusive nas glândulas fibróticas e em uma das amostras foi observada a presença de figuras de mitose frequentes. Até dez ninhos foram observados, em cada amostra. Infiltrado inflamatório mononuclear discreto em estrato compacto, congestão difusa moderada, edema intersticial moderado, dilatação de lacunas linfáticas com acúmulo de linfa, dilatação de glândulas endometriais e retenção de linfa no estroma. Edema intersticial também foi observado.

Naquelas que foram classificadas como endometriose inativa, se observaram um epitélio pseudoestratificado colunar alto, se observou glândulas isoladas envoltas por células estromais fusiformes com núcleos hipercromáticos e alongados que estavam arranjadas paralelamente ao eixo das glândulas adjacentes. Ninhos fibróticos que variavam entre um número de quatro a cinco por campo de visualização, fibrose perivascular discreta e acúmulo de secreção em luz glandular. Focos de glândulas endometriais hiperplásicas com dilatação de

ácinos e raras glândulas atroficas também foram identificados. Ainda foi identificado um infiltrado inflamatório mononuclear discreto periglandular. Hemossiderose e congestão acentuada em estrato esponjoso e moderada em estrato compacto, edema difuso discreto. Edema intersticial também foi identificado nas amostras.

Nas amostras que apresentaram endometrose inativa destrutiva foi identificado um epitélio luminal colunar baixo. Foram observadas glândulas isoladas circundadas por células estromais fusiformes com núcleos alongados e hiper cromáticos, arranjadas paralelamente ao eixo das glândulas contíguas. Ainda se identificou destruição multifocal de células epiteliais glandulares. Ninhos fibróticos acima de quinze por campo. Em algumas amostras foi identificada retenção de secreção no lúmen glandular. Em uma das amostras, se identificou uma área de retração cicatricial, com ausência de glândulas. Ainda se observou fibrose perivascular acentuada, proliferação de fibroblastos e dilatação de vasos linfáticos com acúmulo de linfa, presença de infiltrado inflamatório mononuclear periglandular, além da presença de eosinófilos em determinada amostra. Ainda se observaram focos de glândulas endometriais hiperplásicas e fibrose perivascular. Congestão moderada em estrato esponjoso.

5.2. AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DAS ENDOMETROSES

Nas biópsias que foram classificadas como endometrose ativa), em algumas poucas glândulas isoladas apresentando até duas camadas de fibrose ao redor, com formação de até dois ninhos fibróticos. Ainda foram identificados focos de fibrose perivascular discreta. Em algumas amostras se identificou fibrose intersticial severa. Nestas amostras, os locais de maior deposição de colágeno foram as regiões estrato esponjoso, inclusive na região periglandular. Nesse processo, o colágeno do tipo denso predominou em todas as amostras.

Ao redor das glândulas fibróticas se observou uma deposição acentuada de colágeno amarelado e avermelhado.

As amostras classificadas como endometriose inativa, se caracterizaram pela deposição acentuada de colágeno em todas as regiões, sendo observada a predominância do tipo denso. A região que apresentou maior acúmulo de colágeno foi o estrato esponjoso. Fibrose perivascular e intersticial, com até cinco camadas. Presença de até treze ninhos de fibrose por campo. Ainda foram identificadas glândulas dilatadas com aspecto cístico. Os tipos de colágenos observados ao redor das glândulas variaram entre o esverdeado e o amarelado, sendo que predominou o colágeno esverdeado. Algumas amostras de endométrio demonstraram deposição de colágeno amarelado em região perivascular, sobrepondo a presença do colágeno mais esverdeado.

Em determinadas biópsias se identificou a deposição acentuada de colágeno amarelo ao redor de glândulas endometriais fibróticas. Em amostras que demonstraram um número maior que quatro camadas de fibrose periglandular, foram possíveis determinar o predomínio de colágeno amarelado. Além disto, se identificou ainda uma deposição discreta de colágeno esverdeado e acentuada de amarelado em região perivascular.

Nos casos diagnosticados como endometriose ativa destrutiva se observou que os locais de maior deposição de colágeno foram as regiões do estrato esponjoso e periglandular. Nesse processo, o colágeno do tipo fibrilar predominou em todas as amostras.

Foram identificados focos de fibrose perivascular acentuada, além de fibrose intersticial em estrato esponjoso. Um número de até vinte ninhos fibróticos foi identificado, com glândulas envoltas por até cinco camadas de fibrose ao seu redor. Nesta categoria, algumas amostras apresentaram deposição discreta de colágeno fibrilar, onde predomina a coloração esverdeada, em região periglandular.

Nas amostras que apresentaram endometriose inativa destrutiva, houve predominância de colágeno denso, com distribuição reticular pelo endométrio. A região que apresentou maior deposição de colágeno denso foi a periglandular. Foi observada fibrose intersticial conspícua moderada, fibrose perivascular acentuada, proliferação de fibroblastos, vasos linfáticos dilatados, edema em estrato

compacto, uma média de oito até vinte ninhos fibróticos por campo, em algumas amostras de endométrio. Glândulas com entre duas a quatro camadas de fibrose ao seu redor. Nas amostras de endométrio equino, foi observada uma deposição discreta de colágeno amarelado em região periglandular, em outras se identificou deposição mista de colágeno ao redor das glândulas fibróticas, assim como a região perivascular apresentou uma quantidade moderada de colágeno misto. Naquelas amostras que apresentaram mais de quinze ninhos glandulares fibróticos por campo, com deposição de três a quatro camadas de colágeno, se identificou uma quantidade acentuada de colágeno denso (amarelo). Além de uma deposição moderada de colágenos amarelado em região perivascular. Em amostras que apresentaram mais de vinte ninhos fibróticos por campo e formação de mais de quatro camadas de fibrose periglandular, demonstraram uma quantidade acentuada de colágeno denso, mais amarelado e ausência de colágeno fibrilar (verde). Além de apresentar as mesmas características citadas em região perivascular.

5.2. AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS ENDOMETROSES

A expressão de α -actina de músculo liso foi observada marcação acentuada 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.

Nas biópsias que foram classificadas como endometrose ativa, se observou a marcação intensa nas regiões periglandular e perivascular, variando entre três a sete 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 se estabeleceu na imunoexpressão de uma camada de fibrose periglandular. A intensidade da reação da imunoexpressão da α -actina de músculo liso foi moderada.

Aquelas biopsias que foram classificadas como endometrose inativa, se diferenciaram pela marcação discreta em regiões perivascular e periglandular, sendo que o número de glândulas fibróticas individualizadas variou entre dez e treze glândulas por campo de observação. Além de marcação moderada em ninhos fibróticos. Em determinadas amostras, a imunoexpressão da camada de fibrose ocorreu somente em parte da circunferência glandular, o que determinou uma intensidade de reação leve.

Nos casos diagnosticados como endometrose ativa destrutiva a marcação mais evidente foi verificada ao redor das glândulas fibróticas. Uma média de seis ninhos fibróticos foi observada por campo. O número de camadas de fibrose periglandular oscilou entre quatro a cinco camadas. Glândulas individualizadas em número de até vinte por campo, dilatadas com acúmulo de secreção no lúmen. Glândulas fibróticas envoltas por camadas com duas a três camadas de miofibroblastos, com imunoexpressão variando em intensidade de moderada. Foi observada imunoexpressão em região perivascular.

Nas amostras que apresentaram endometrose inativa destrutiva, além dos vasos sanguíneos, a expressão de α -actina de músculo liso estava presente ao redor de glândulas dilatadas esparsas, que variou entre dezessete a vinte glândulas por campo. E o número de camadas de fibrose periglandular variou de três a quatro ao redor de ninhos fibróticos e glândulas individuais, que variou em número de dez por campo de análise. Estas glândulas apresentaram uma imunoexpressão que oscilou em intensidade de grau dois a três, e com presença de até quatro camadas de fibrose. Ninhos fibróticos foram identificados em até seis por campo.

6. CONCLUSÃO E DISCUSSÃO

As alterações fibróticas foram as lesões de maior importância identificadas nas biópsias endometriais equinas. As primeiras amostras de endométrio equino foram realizadas por Ricketts (1975). O grau de fibrose periglandular e inflamação foram os critérios usados por Kenney e Doig (1986) e Ricketts e Alonso (1991) para classificarem as amostras de biópsias uterinas. 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 caracterização dos diferentes tipos de endometrose foi realizada de acordo com a classificação morfológica proposta por Hoffmann et al., (2009).

Conforme a classificação de Hoffmann et al. (2009), neste estudo foi observada nas biópsias com endometrose ativa, glândulas individuais circundadas por células estromais fibróticas com núcleos ovóides, hipocromáticas, de tamanho médio a grande. Em alguns casos se observou acúmulo de secreção no lúmen glandular. O endométrio acometido pelo processo fibrótico se torna incapaz de produzir substâncias histotróficas de qualidade e em quantidades adequadas. Nas éguas o trofoblasto não é invasivo e as secreções uterinas são consideradas essenciais para a manutenção do desenvolvimento e a sobrevivência do embrião. Como resultados deste quadro surgem diferenças marcantes entre o padrão das secreções produzidas pelo epitélio glandular nos focos fibróticos e o das glândulas não afetadas (HOFFMANN et al., 2009).

Nas biópsias endometriais que foram classificadas como endometrose ativa destrutiva foram observadas células estromais fibróticas com núcleos ovóides, hipocromáticos de tamanho que variou entre médio a grande e citoplasma pálido. Além disto, células epiteliais glandulares degeneradas em raras glândulas, com núcleo picnótico e citoplasma vacuolizado. Sendo que em algumas amostras, foram identificadas figuras de mitose.

Nas amostras de endométrio que tiveram endometrose inativa destrutiva foram observadas glândulas isoladas circundadas por células estromais fusiformes com núcleos alongados e hipercromáticos, arrançadas paralelamente ao eixo das glândulas contíguas. Ainda se identificou destruição multifocal de células epiteliais

glandulares. Conforme trabalho realizado por Hoffmann et al. (2003) foi possível distinguir endometroses destrutiva de uma não destrutiva. Enquanto uma endometrose não destrutiva é caracterizada por alterações leves do epitélio glandular, as glândulas da endometrose destrutiva, ocorrendo em 25% dos casos avaliados, mostraram sinais de uma grave degeneração epitelial com perda da morfologia glandular. Subtipos de endometrose ativa (núcleo ovóide e hipocromático) e inativa (núcleo fusiforme e hiperchromático) deram origem a fibrose periglandular. A concomitância de ambos os tipos é frequente em uma biópsia.

Segundo a descrição de Hoffmann et al. (2009), no que se refere à morfologia das células estromais periglandulares, nos focos de fibrose na endometrose, uma diferenciação ativa e inativa pode ser estabelecida. Porém, em contraste com as células estromais inalteradas, alterações endócrinas sazonais ou cíclicas não apresentam influência notável sobre a atividade das células do estroma fibrótico. Ainda, se observou distintamente reduzida expressão de células estromais fibróticas, quando comparado ao estroma hígido, definindo um processo de endometrose.

Neste estudo foram empregados os 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.

Quando utilizada a classificação de Hoffmann et al. (2009), nas amostras classificadas como endometrose ativa, foram encontradas poucas glândulas isoladas apresentando até duas camadas de fibrose ao redor (de duas a três camadas de fibrose), com formação de até dois ninhos fibróticos. Ainda foram identificados focos de fibrose perivascular discreta. Em algumas amostras se identificou fibrose intersticial severa. Nestas amostras, os locais de maior deposição de colágeno foram as regiões estrato esponjoso e periglandular. Nesse processo, o colágeno do tipo denso predominou em todas as amostras. Ao redor das glândulas fibróticas se observou uma deposição acentuada de colágeno amarelo.

Já naquelas que foram identificadas como endometrose inativa destrutiva, se observou uma predominância de colágeno denso, com distribuição reticular pelo endométrio. A região que apresentou maior deposição de colágeno denso foi a periglandular. Foi observada fibrose intersticial conspícua moderada, fibrose perivascular acentuada, proliferação de fibroblastos, vasos linfáticos dilatados, edema em estrato compacto, uma média de oito até vinte ninhos fibróticos por campo de visualização, em algumas amostras de endométrio. Glândulas com entre duas a quatro camadas de fibrose ao seu redor. Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo demonstraram que no processo fibrótico do endométrio das éguas ocorre a substituição gradativa do colágeno fibrilar com distribuição reticular, predominante nas amostras de endométrio sadio, pelo colágeno denso, conforme aumenta o grau das lesões endometriais. Este tipo de colágeno é mais denso, e é encontrado preferencialmente na região periglandular (NUNES, 2003; PORTO, 2006; NUNES, 2006 e MASSENO, 2009).

De forma geral não foi constatada no presente trabalho uma variação importante na distribuição das fibras colágenas entre os diferentes tipos de endometrose descritas por Hoffmann et al. (2009). No entanto, notou-se que nas endometroses ativa e ativa destrutiva o tipo de colágeno predominante é o que possui arranjo reticular, menos denso, enquanto que nas endometroses inativa e inativa destrutiva o predomínio foi de um colágeno mais denso. Além disso, nestes dois últimos tipos era evidente a concomitância de comprometimento periglandular e perivascular, sugerindo uma possível origem vascular para as alterações endometriais. Nunes (2006) relatou que todas as amostras de endometrose apresentaram lesões vasculares, classificadas como fibroelastose, porém estas foram consideradas como graves em apenas 16,65% das amostras. A relação entre o desenvolvimento da endometrose e alterações vasculares já havia sido citada por Inoue et al. (2000), porém não foi ainda estabelecida a patogênese deste processo.

Foi observado no presente estudo que as amostras de endometrose ativa destrutiva apresentaram maior expressão da alfa actina de músculo liso. Uma maior quantidade de glândulas fibróticas isoladas demonstrou a expressão desta

proteína, uma marcação entre três a quatro camadas de células. No entanto, o que demonstrou reação com menor expressão foram as amostras de endométrio classificadas em endometrose ativa, o que também corrobora os dados encontrados por Hoffmann et al. (2003), que relataram expressão de 20 a 40% de células marcadas. Neste estudo, foi identificado um número de três a sete glândulas que expressavam α -SMA por campo.

7. REFERÊNCIAS

- ALLEN, W.R. Proceedings of the John P. Hughes international workshop on equine endometritis. **Journal E. Vet.**, v.25, p.186, 1993.
- AMARAL, D. **Estudo morfológico e histoquímico do endométrio de éguas PSI**. 2002. 65p. Tese (Doutorado) – Escola de veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- CALDINI, E. T. E. G. **Estudo histoquímico e ultra-estrutural do colágeno na fibrose periglandular do endométrio eqüino**. 1992. 123p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.
- DOIG, P.A.; WAELCHLI, R.O. Endometrial biopsy. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reprod.**, Filadélfia: Lea & Febiger, p.225-33, 1993.
- HERNANDEZ, J.; HAWKINS, D.L. Training failure among yearling horses. **Am. J. Vet. Res.**, v.62, n.9, p.1418-1422, set.2001. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/ajvr.2001.62.1418>>. Acesso em: 23 dez. 2010. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.1418.
- HOFFMAN, C.; ELLENBERGER, C.; MATTOS, R. C.; AUPPERLE, H.; DHEIN, S.; STIEF, B.; SCHOON, H. A. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. **Anim. Reprod. Sci.**, v.111, p.261-78, 2009.
- HOFFMANN, C.; BAZER, F.W.; KLUG, J.; ALLENM W.R.; AUPPERLE, H.; ELLENBERGER, C.; SCHOON, H.A. Morpho-functional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions – preliminary results. **Pferdeheilkunde.**, v.19, p. 666-669, 2003.
- INOUE, Y.; ITO, K.; TERADA, T.; NISHIMURA, N.; HATAZOE, T.; SATO, K. Degenerative changes in the endometrial vasculature of the mare detected by videoendoscopic examination. **AAEP Proceedings.**, v. 46, p. 325-9, 2000.
- KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. in: MORROW, D.A. (ed.). **Cur. Therapy Theriogenol.**, Philadelphia: WB Saunders, 1986. p. 723-9.

KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.172, p. 241-62, 1978.

MASSENO, A. P. B.; **Caracterização imunoistoquímica dos miofibroblastos endometriais e da expressão de MMP-2 nas endometrites crônicas das éguas.** Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009. 99 p.

MEDICE, E. B.; MERKT, H.; POLHENS, J. F.; BRUNKHORST, D. Considerations on the use of ancillary diagnostic aids in the diagnosis of endometrites due to infection in mares. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl., v44, p.700-3, 1991.

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

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

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

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

RICKETS, S.W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. **J. Reprod. Fertil.**, v.23, p. 341-345, 1975.

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

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

WATSON, E. D. Post breeding endometritis in the mare. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 221-32, 2000.

