

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

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES,
TIMP-1 E DA ESCLEROSE VASCULAR NAS ENDOMETRITES
CRÔNICAS DAS ÉGUAS**

LOUISIANE DE CARVALHO NUNES

BOTUCATU, MARÇO DE 2006

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

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES,
TIMP-1 E DA ESCLEROSE VASCULAR NAS ENDOMETRITES
CRÔNICAS DAS ÉGUAS**

LOUISIANE DE CARVALHO NUNES

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 Concentração: Patologia Animal).

ORIENTADOR: JULIO LOPES SEQUEIRA

BOTUCATU, MARÇO DE 2006

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

Nunes, Louisiane de Carvalho.

Avaliação da expressão de metaloproteinases, TIMP-1 e da esclerose vascular nas endometrites crônicas das éguas / Louisiane de Carvalho Nunes.
– Botucatu : [s.n.], 2006.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2006.

Orientador: Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira.

Assunto CAPES: 50503006

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

CDD 636.1089607

Palavras chave: Colágeno; Endométrio; Equino; Metaloproteinase; Vasculatura.

TESE DE DOUTORADO
LOUISIANE DE CARVALHO NUNES

Composição da Banca Examinadora

Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira

Prof^a. Dra. Ana Maria Reis Ferreira

Prof. Ass. Dr. Alexandre Hataka

Prof^a. Ass. Dra. Noeme Sousa Rocha

Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga

Botucatu, 06 de março de 2006.

*As coisas que amamos,
as pessoas que amamos
são eternas até certo ponto.
Duram o infinito variável
no limite de nosso poder
de respirar a eternidade...*

(Carlos Drummond de Andrade)

À minha filha Alice Nunes Viana por ser a grande razão da minha vida, pelas descobertas de cada dia e por acreditar que todos os esforços realizados nos dão a chance de um futuro melhor.

Ao meu pai José de Ribamar Nunes Silva pela incansável busca pelo saber e por me ensinar que o amor supera todos os momentos ruins da vida.

Aos meus irmãos Emanuel de Carvalho Nunes e Emerson Abraão Nunes da Silva pelo carinho de sempre e por nunca deixarem de acreditar em mim.

DEDICO

*Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam a vida inteira.
Esses são os imprescindíveis.
(Bertolt Brecht)*

Ao meu eterno orientador, Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira, pela amizade ao longo destes anos, pela ajuda nos momentos difíceis, pelo exemplo de vida e por me ensinar que a ética é a maior qualidade do ser humano.

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.
- À pós-graduanda Camila Dias Porto pela parceria na execução deste trabalho, pela busca incansável pelo perfeccionismo e pela amizade dispensada ao longo destes oito anos de convivência.
- À professora Dra. Noeme Sousa Rocha, Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, pelo exemplo de vida, de pesquisadora e por todos os seus ensinamentos.
- À professora Dra. Reneé Laufer Amorim, Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, pela amizade, pela confiança e por toda ajuda na área de imunoistoquímica.
- Ao professor Dr. Marco Antônio Alvarenga, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ, UNESP, Botucatu, pela ajuda na catalogação dos blocos de arquivo para a realização deste trabalho.
- Ao professor Dr. Deilson Elgui de Oliveira do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP - Botucatu, por toda a ajuda com as metaloproteinases e pela amizade.
- Ao funcionário do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP - Botucatu, Marcos Roberto Franchi pela ajuda valiosa na padronização das técnicas de imunoistoquímica e histoquímica.
- Ao professor Dr. José Tarcísio da Silva Oliveira, Departamento de Engenharia Rural do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade da realização da análise morfométrica junto ao Laboratório de Ciência da Madeira do NEDTEC e pela amizade.
- Ao professor Dr. Sebastião Martins Filho, Departamento de Engenharia Rural do CCA da Universidade Federal do Espírito Santo pela realização da análise estatística deste trabalho.
- Aos funcionários e residentes do Serviço de Patologia Veterinária da UNESP pelo convívio amigo e por toda a ajuda dispensada.

- Aos todos os pós-graduandos da Medicina Veterinária, em especial a Christianne, Adriana Wanderley, Anne, Gaspar, Fábio, Sara e Fabíola pelo convívio amigo e por transformar nossas tristezas em momentos de muita alegria.
- Ao Departamento de Zootecnia e Economia Rural do CCA da Universidade Federal do Espírito Santo pela liberação para a conclusão deste trabalho.
- Aos novos amigos, professores e alunos, do CCA da Universidade Federal do Espírito Santo pelo apoio de sempre.
- A todos os meus familiares, piauienses, pelas orações feitas e pelo carinho demonstrado mesmo à distância.

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Classificação dos 82 casos de endometrites crônicas diagnosticados no Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, UNESP de acordo com Kenney e Doig (1986).....	31
FIGURA 2. Classificação dos 82 casos de endometrites crônicas diagnosticados no Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, UNESP de acordo com Ricketts e Alonso (1991).....	31
FIGURA 3. Amostra P223/01. Endométrio eqüino normal – epitélio luminal (EL), estrato compacto (EC), estrato esponjoso (EE) e glândulas endometriais (G) sem sinais de inflamação e/ou fibrose. Coloração de hematoxilina e eosina.....	38
FIGURA 4. Amostra P96/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / categoria III. Infiltrado inflamatório mononuclear (seta) e presença de ninho fibrótico (NF) na região do estrato esponjoso. Coloração de HE.....	38
FIGURA 5. Amostra P100/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica degenerativa / categoria III. Fibrose intersticial difusa (F), presença de ninhos fibróticos (NF), dilatação glandular (DG) e lacunas linfáticas (L) na região do estrato esponjoso. Coloração de HE.....	39
FIGURA 6. Amostra B15/92. Endométrio eqüino com endometrite crônica degenerativa / categoria III. Fibrose intersticial difusa na região do estrato esponjoso (seta). Coloração de tricrômico de Masson.....	39
FIGURA 7. Amostra P207/01. Endométrio eqüino normal. Presença predominante de colágeno fibrilar (seta) - fibras esverdeadas – colágeno tipo III na região do estrato esponjoso. Coloração de picrosirius red sob polarização.....	40
FIGURA 8. FIGURA 8. Amostra B27/92. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / IIB. Presença de colágeno fibrilar e áreas esparsas com colágeno denso (seta) - fibras avermalhadas – tipo I na região do estrato esponjoso. Coloração de picrosirius red sob polarização.....	40
FIGURA 9. Amostra P81/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Presença predominante de colágeno denso - tipo I (seta) ao redor de ninho fibrótico (NF). Coloração de picrosirius red sob polarização.....	41
FIGURA 10. Amostra P203/02. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Espessamento da parede vascular (seta), fibrose perivascular acentuada (FPV) e presença de lacunas linfáticas (L) na região do estrato esponjoso. Coloração de Verhoeff Van Gieson.....	41
FIGURA 11. Amostra P203/02. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Fibrose privascular (seta) e fibroelastose (FE) tipo 3 na região do estrato esponjoso. Coloração de Verhoeff Van Gieson.....	42

	Página
FIGURA 12. Amostra P98/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica categoria infiltrativa / III. Alteração vascular grave caracterizada por fibroelastose (FE) tipo 4, fibrose perivascular (seta) e lacunas linfáticas (L) na região do estrato esponjoso. Coloração de Verhoeff Van Gieson.....	42
FIGURA 13. Amostra P90/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica categoria degenerativa / III. Marcação positiva de MMP-1 (1:100) nas células do epitélio glandular (EG), na fibrose periglandular (FPG) na região do estrato compacto e nas células do epitélio luminal (EL).....	57
FIGURA 14. Amostra P90/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica degenerativa / III. Marcação positiva de MMP-1 (1:100) nas células do epitélio glandular e na fibrose periglandular na região do estrato compacto.....	57
FIGURA 15. Amostra P92/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / IIB. Marcação positiva de MMP-2 (1:200) nas células do epitélio glandular (EG) no estrato esponjoso.....	58
FIGURA 16. Amostra P99/04. Endométrio eqüino com endometrite infiltrativa / IIB. Marcação positiva de MMP-2 (1:200) na parede vascular (PV) e células estromais (setas) no estrato esponjoso.....	58
FIGURA 17. Amostra P208/01. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / IIB. Marcação positiva de MMP-7 (1:100) nas células inflamatórias intra-epiteliais luminais (seta).....	59
FIGURA 18. Amostra P202/02. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Marcação positiva de MMP-7 (1:100) em células inflamatórias intra-epiteliais glandulares (setas) na região do estrato esponjoso.....	59
FIGURA 19. Amostra P91/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Marcação positiva de MMP-9 (1:100) nas células do epitélio luminal (EL), epitélioglandular (EG) e nas células endoteliais (seta) na região do estrato compacto.....	60
FIGURA 20. Amostra P201/02. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Intensa marcação positiva de MMP-9 (1:100) nas células do epitélio glandular (EG) e estromais (seta) na região do estrato compacto.....	60
FIGURA 21. Amostra P03/05. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Intensa marcação positiva de TIMP-1 (1:100) nas células do epitélio luminal (EL) e nas células inflamatórias na região do estrato compacto (seta).....	61
FIGURA 22. Amostra P82/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Intensa marcação positiva de TIMP-1 (1:100) nas células do epitélio glandular (EG) e na parede vascular (seta) na região do estrato esponjoso.....	61

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Anticorpos primários, concentrações testadas e utilizadas nas reações imunoistoquímicas das biópsias uterinas de éguas com endometrite crônica.....	25
TABELA 2. Classificação das endometrites crônicas de acordo com Kenney e Doig, (1986).....	27
TABELA 3. Classificação das endometrites crônicas de acordo com Ricketts e Alonso (1991).....	27
TABELA 4. Classificação das alterações vasculares do endométrio eqüino de acordo com Inoue et al. (2000).....	28
TABELA 5. Tipo de colágeno predominante nas 82 amostras de endometrites crônicas diagnosticadas no Serviço de Patologia Veterinária da UNESP, Botucatu, SP.....	34
TABELA 6. Tipo de colágeno predominante nas diferentes categorias de endometrites crônicas eqüinas diagnosticadas de acordo com Kenney e Doig (1986).....	34
TABELA 7. Tipo de colágeno predominante nas diferentes categorias de endometrites crônicas eqüinas diagnosticadas de acordo com Ricketts e Alonso (1991).....	34
TABELA 8. Distribuição do colágeno total no endométrio eqüino nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas de acordo com Kenney e Doig (1986).....	35
TABELA 9. Distribuição do colágeno total no endométrio eqüino nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas de acordo com Ricketts e Alonso (1991).....	35
TABELA 10. Graus de fibroelastose (INOUE et al., 2000) nas 82 amostras de endometrites crônicas diagnosticadas no Serviço de Patologia Veterinária da UNESP, Botucatu, SP.....	36
TABELA 11. Graus de fibroelastose vascular (INOUE et al., 2000) observados nas diferentes categorias de endometrites crônicas eqüinas diagnosticadas de acordo com Kenney e Doig (1986).....	36
TABELA 12. Graus de fibroelastose vascular (INOUE et al., 2000) observados nas diferentes categorias de endometrites crônicas eqüinas diagnosticadas de acordo com Ricketts e Alonso (1991).....	37

TABELA 13. Valores medianos dos graus de fibroelastose da vasculatura endometrial (INOUE et al., 2000) nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).....	37
TABELA 14. Valores medianos dos graus de fibroelastose da vasculatura endometrial (INOUE et al., 2000) nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991)..	37
TABELA 15. Valores percentuais da fibrose periglandular nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).....	44
TABELA 16. Valores percentuais da fibrose periglandular nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).....	44
TABELA 17. Valores percentuais da fibrose perivascular nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).....	44
TABELA 18. Valores percentuais da fibrose perivascular nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).....	44
TABELA 19. Valores medianos da expressão de MMP-1 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).....	46
TABELA 20. Valores medianos da expressão de MMP-1 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).....	46
TABELA 21. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-1 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).....	47
TABELA 22. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-1 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991)..	47
TABELA 23. Valores medianos da expressão de MMP-2 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).....	49
TABELA 24. Valores medianos da expressão de MMP-2 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).....	49

	Página
TABELA 25. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-2 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).....	49
TABELA 26. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-2 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991)..	50
TABELA 27. Valores medianos da expressão de MMP-7 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).....	51
TABELA 28. Valores medianos da expressão de MMP-7 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).....	51
TABELA 29. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-7 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).....	51
TABELA 30. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-7 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).....	52
TABELA 31. Valores medianos da expressão de MMP-9 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).....	53
TABELA 32. Valores medianos da expressão de MMP-9 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991)	53
TABELA 33. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-9 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).....	53
TABELA 34. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-9 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991)..	54
TABELA 35. Valores medianos da expressão de TIMP-1 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).....	55
TABELA 36. Valores medianos da expressão de TIMP-1 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).....	55

	Página
TABELA 37. Valores medianos da intensidade da marcação de TIMP-1 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).....	56
TABELA 38. Valores medianos da intensidade da marcação de TIMP-1 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991)..	56

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
1 INTRODUÇÃO.....	03
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivos gerais.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Procedência do material.....	20
4.2 Levantamento dos casos.....	20
4.3 Processamento do material.....	20
4.4 Avaliação histoquímica.....	21
4.4.1 Método de Tricrômico de Masson.....	21
4.4.2 Método de Picrosirius Red.....	22
4.4.3 Método de Verhoeff Van Gieson.....	22
4.5 Avaliação imunoistoquímica.....	23
4.5.1 Padronização das técnicas de imunofenotipagem	23
4.5.2 Anticorpos utilizados.....	24
4.5.3 Roteiro de aplicação da técnica de imunoistoquímica.....	24
4.5.3.1 Preparação das lâminas.....	24
4.5.3.2 Obtenção dos cortes histológicos.....	24
4.5.3.3 Bloqueio da peroxidase endógena.....	24
4.5.3.4 Recuperação antigênica.....	25
4.5.3.5 Incubação com o anticorpo primário.....	25
4.5.3.6 Complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC).....	26
4.5.3.7 Revelação.....	26
4.6 Análise do material.....	26
4.6.1 Aplicação da classificação das endometrites crônicas equínas.....	26
4.6.2 Análise qualitativa do colágeno endometrial.....	27
4.6.3 Análise da esclerose e fibroelastose vascular.....	28
4.6.4 Análise morfométrica.....	29
4.6.5 Análise imunoistoquímica.....	29
4.7 Análise estatística.....	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Classificação histológica das endometrites crônicas.....	31
5.2 Avaliação histoquímica.....	32
5.2.1 Tricrômico de Masson.....	32
5.2.2 Picrosirius Red.....	32
5.2.3 Verhoeff Van Gieson.....	35
5.3 Análise morfométrica.....	43
5.4 Avaliação imunoistoquímica.....	45
5.4.1 Metaloproteinase 1 (MMP-1).....	45
5.4.2 Metaloproteinase 2 (MMP-2).....	47
5.4.3 Metaloproteinase 7 (MMP-7).....	50

	Página
5.4.4 Metaloproteinase 9 (MMP-9).....	52
5.4.5 Inibidor tecidual de metaloproteinases 1 (TIMP-1).....	54
6 DISCUSSÃO.....	62
6.1 Considerações finais.....	73
7 CONCLUSÕES.....	75
8 BIBLIOGRAFIA.....	77
9 TRABALHO CIENTÍFICO.....	85

RESUMO

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

A endometrite é a principal causa de subfertilidade em éguas sendo o processo fibrótico fator limitante no desempenho reprodutivo nesta espécie. Este trabalho teve por objetivos avaliar o colágeno presente nas endometrites crônicas das éguas, a expressão das enzimas que degradam o colágeno e de seus inibidores e as alterações vasculares. 82 biópsias uterinas recebidas na FMVZ, UNESP, Botucatu, SP foram classificadas histologicamente e a fibrose foi avaliada pelos métodos de tricrômico de Masson e picrosirius red. A avaliação vascular foi feita pelo VVG. Verificou-se a expressão das enzimas MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 e TIMP-1 por método imunistoquímico. A quantidade de colágeno na fibrose endometrial foi maior nas regiões periglandulares, perivasculares e no estrato esponjoso, predominando o colágeno tipo I. Quanto maior o grau de endometrite mais acentuada era a esclerose vascular e a fibroelastose. Não houve diferença na expressão das MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 e TIMP-1 entre éguas normais e com endometrites. Porém houve diferença em relação à intensidade de marcação notando-se que esta aumentava em determinadas regiões do endométrio. As MMPs e o TIMP-1 estão envolvidos nos processos fibróticos endometriais das éguas uma vez que estas enzimas variam em expressão e intensidade de reação conforme o grau de endometrite.

Palavras-chave: endométrio, eqüino, MMP, TIMP, vasculatura, colágeno

ABSTRACT

NUNES, L.C. **Metalloproteinases and TIMP-1 expressions and evaluation of the vascular sclerosis in chronic endometritis of mares**. 2006. 99p. Thesis (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

Endometritis is the main cause of mare subfertility and the associated uterine fibrotic process is a limitant factor for the reproductive performance. The aim of this work was to evaluate the collagen distribution and type, the enzymes that are responsible for collagen degradation and its inhibitors, and vascular changes in the endometrium of normal and chronic endometritis carrying mares. So a prospective and comparative study was conducted at Veterinary Hospital of Veterinary College UNESP, Botucatu-SP. Eighty-two uterine biopsy were histologically classified in paraffin sections stained with hematoxylin and eosin, Masson's Trichrome and Verhoeff van Gieson (VVG) stains examined under the light microscope. Picrosirius red polarization was also used for collagen evaluation. The MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, and TIMP-1 expressions was obtained by immunohistochemical method. The collagen concentration in fibrotic endometrium was higher at periglandular, perivascular and stratum spongiosum regions with collagen type I predominance. In the most severe endometritis had more advanced grades of vascular sclerosis and fibroelastosis. No difference was found in MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, and TIMP-1 expressions between normal and chronic endometritis samples, but the immunohistochemical reaction was more intense in some regions of fibrotic endometrium. In conclusion, the MMPs and TIMP-1 showed variation in expression and reaction intensity in the normal and chronic affected endometrium and may plays a role in the endometrial fibrotic process.

Key Words: endometrium, equine, MMP, TIMP, vasculature, collagen

1 INTRODUÇÃO

As endometrites crônicas são tidas como a principal causa de subfertilidade nas éguas. O estudo realizado por Traub-Dargatz, Salman e Voss (1991) nos Estados Unidos revelou que a endometrite é o terceiro maior problema que ocorre em eqüinos adultos levando a redução anual do número de potros e, conseqüentemente, grandes perdas econômicas.

As endometrites crônicas exibem padrões morfológicos caracterizados por lesões inflamatórias e fibróticas. A fibrose representa um fator limitante na performance reprodutiva da égua uma vez que é irreversível e contribui de maneira significativa para a morte embrionária precoce. A patogênese da fibrose ainda permanece desconhecida, embora a idade, o número de partições e os processos inflamatórios crônicos do útero sejam indicados como fatores contributivos.

A deposição de colágeno em torno das estruturas endometriais durante os processos fibróticos está associada ao remodelamento tecidual que envolve a síntese e a degradação da matriz extracelular. As metaloproteinases (MMPs) são enzimas que participam deste processo e são secretadas por vários tipos celulares e estimuladas por vários fatores dentre estes as citocinas e os fatores de crescimento. Estas enzimas podem ser inativadas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) que previnem a ação descontrolada das MMPs.

Por outro lado, as alterações vasculares podem estar relacionadas aos processos de degeneração do endométrio, mas também podem estar relacionadas com a idade avançada. Alguns autores sugerem que as alterações vasculares contribuem para o aparecimento da fibrose endometrial, mas a relação destas com o ambiente uterino e a idade dos animais e a influência destes fatores na endometrose ainda não estão esclarecidos.

Com base nestes dados este trabalho foi realizado no intuito de entender melhor os mecanismos envolvidos nas endometrites crônicas das éguas avaliando as alterações vasculares, a deposição de colágeno e a participação das enzimas envolvidas neste processo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O útero eqüino é constituído de três camadas: o endométrio (camada mucosa interna), o miométrio e o perimétrio mais externamente (BANKS, 1992).

O endométrio por sua vez é composto por duas camadas: o epitélio luminal e a lâmina própria. Esta última se estende da membrana basal do epitélio luminal à camada circular interna do miométrio. O epitélio luminal consiste de células cuboidais a colunares altas, sobre a membrana basal e variam de tamanho de acordo com o ciclo estral (KENNEY, 1978). Este epitélio é composto por células ciliadas e não ciliadas ou células secretoras que apresentam microvilosidades (CHIARINI-GARCIA, 1999).

A lâmina própria, onde se localizam as numerosas glândulas endometriais, é composta pelos estratos compacto e esponjoso, de acordo com a densidade das células do estroma. O estrato compacto é caracterizado por alta densidade celular, numerosos capilares localizados logo baixo da membrana basal e um delicado emaranhado de fibras reticulares. Já o estrato esponjoso é caracterizado, principalmente, por baixa densidade celular, conferindo-lhe uma aparência esponjosa pela presença de capilares, arteríolas, vênulas, pequenas artérias musculares e numerosos vasos linfáticos (AMARAL, 2002)

As glândulas endometriais tubulares presentes na lâmina própria são conectadas ao epitélio luminal por meio de ductos, localizadas principalmente no estrato compacto. Estes ductos normalmente não apresentam ramificações como acontece nas porções médias e basal, localizadas no estrato esponjoso, onde as glândulas endometriais podem apresentar cerca de dez ou mais ramificações primárias e secundárias (KENNEY, 1978).

Os produtos da secreção dos epitélios luminal e glandular incluem muco, lipídios, glicogênio e proteínas (BANKS, 1992). Segundo Gray et al (2001) as glândulas endometriais sintetizam e secretam ou transportam um complexo grupo de proteínas e substâncias denominadas histotróficas que são essenciais para o desenvolvimento do concepto (embrião e membranas placentárias associadas).

As secreções uterinas são importantes para a sobrevivência e desenvolvimento do conceptoo particularmente em ovelhas, vacas, porcas e éguas onde um prolongado período de pré-implantação do embrião precede à adesão e placentação (GRAY et al., 2001).

Em uma égua normal o útero está protegido das contaminações externas pelas barreiras físicas que consiste da vulva, do vestibulo, da vagina e da cérvix e qualquer comprometimento em uma destas barreiras pode levar à infecção crônica do útero (TROEDSSON, 1999).

Um estudo realizado nos Estados Unidos demonstrou que a endometrite é o terceiro maior problema que acomete animais adultos, sendo o primeiro a cólica seguida dos problemas do trato respiratório (TRAUB-DARGATZ; SALMAN e VOSS, 1991).

Até relativamente recente as éguas eram classificadas como suscetíveis ou resistentes às endometrites baseadas na sua capacidade de eliminar infecções uterinas dentro de um determinado período de tempo ou baseado no escore da biópsia endometrial (WATSON, 2000). Éguas férteis realizam a limpeza uterina dentro de 24 a 36 horas após a cobertura. Isto ocorre antes do embrião entrar no útero, cerca de 5,5 dias após a ovulação (LEBLANC, 2003). Segundo Troedsson (1999), após a fertilização o zigoto permanece no oviduto de cinco a seis dias sendo, depois deste período, o conceptoo transportado até o lúmen uterino. Quando a endometrite persiste por mais de cinco dias, quando o embrião entra no lúmen uterino, o ambiente citotóxico não permite a manutenção da gestação (WATSON, 2000).

De acordo com Alghamdi et al. (2001) em éguas normais há um influxo de polimorfonucleares (PMNs) para o lúmen uterino dentro de uma hora após a cobertura. Estas células aumentam em número de seis a 12 horas e diminuem de 24 a 48 horas. Entretanto esta inflamação pode se desenvolver em condição patológica se a égua não eliminar os fluidos e produtos inflamatórios adequadamente.

Estudos em camundongo sugerem que a presença de fluido, bactérias e produtos inflamatórios são incompatíveis com a sobrevivência do embrião, se isto também se aplicar às éguas, o útero de uma égua normal pode ser capaz de espontaneamente desenvolver endometrite pós-cobertura e causar a morte embrionária (TROEDSSON, 1999).

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

A deposição de sêmen no ambiente intra-uterino predispõe a uma reação inflamatória resultando de contaminação bacteriana do ejaculado ou dos espermatozóides. Em um estudo recente, aproximadamente 15% da população de éguas normais desenvolveu endometrite persistente pós-cobertura (TROEDSSON, 1999).

Troedsson (1999) cita que a inflamação persistente do endométrio resulta em luteólise prematura e perda embrionária precoce devido ao aumento das concentrações de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). No entanto, Ghinter (1992) afirma que a relação entre a inflamação uterina com luteólise secundária e baixos níveis de progesterona induzem à morte embrionária precoce.

Segundo Silva et al. (1987) éguas com afecções severas do endométrio não são completa e definitivamente estéreis, exceto aquelas com problemas genéticos graves como aberrações cromossômicas.

A biópsia uterina, quando associada ao histórico reprodutivo e exame ginecológico, é uma ferramenta valiosa utilizada freqüentemente na avaliação da fertilidade da égua (RICKETTS, 1975). Esta técnica tem se mostrado de grande valor no auxílio ao diagnóstico de processos patológicos do endométrio fornecendo uma base para o prognóstico e tratamento de éguas subférteis (MANSOUR; FERREIRA e FONSECA, 1999).

A biópsia endometrial pode ser utilizada em éguas vazias após a estação de monta, com repetição de cio, com histórico de morte embrionária precoce e com endometrite clínica ou piometra. A biópsia também pode ser de grande valor para o prognóstico de correções cirúrgicas de anormalidades da genitália como urovagina, adesões ou lacerações cervicais e neoplasias do trato genital (KENNEY e DOIG, 1986).

Estudos de microscopia de luz no endométrio eqüino têm revelado: padrões do desenvolvimento cíclico endometrial, morfologia celular no pós-parto e alterações patológicas do endométrio (FERREIRA-DIAS; NEQUIN e KING, 1999).

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

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

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

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

A endometrite crônica infiltrativa e a doença endometrial degenerativa crônica são as duas alterações histopatológicas mais comumente observadas nas biópsias endometriais de éguas inférteis e subférteis (RICKETTS e ALONSO, 1991). Ricketts e Barrelet (1997) realizaram um estudo retrospectivo em 4241 biópsias uterinas eqüinas e encontraram que 92% das amostras revelaram endometrite crônica infiltrativa, 56% endometrite degenerativa e 55% mostraram endometrite aguda com infiltrado inflamatório polimorfonuclear.

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 de inflamação aguda. As éguas

com endometriose podem falhar para conceber e manter a prenhez e isto pode resultar em infecções crônicas uterinas (DASCANIO et al., 1998).

Doig, McNight e Miller (1981) citaram que a doença endometrial degenerativa crônica é uma condição progressiva inevitável e está associada mais com os efeitos da idade do que com o número de partos. Já Watson (2000) afirma que a endometriose 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.

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

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

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

Dascanio et al. (1998) relataram que éguas com endometriose podem ter cistos ou problemas de *clearance* uterinos. Isto pode ser devido à idade, visto que éguas velhas apresentam má conformação perineal, baixo tônus miometrial e fibrose uterina aumentada quando comparadas com éguas jovens. Ricketts e Alonso observaram que éguas velhas, independente das alterações relacionadas ao sêmen, infecções, prenhez, partos e/ou involução uterina pós-parto apresentaram sinais avançados de doença degenerativa endometrial.

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

Ferreira-Dias, Nequin e King (1999) encontraram uma população dominante de células claras ricas em estruturas degeneradas e poucas células ciliadas nas glândulas endometriais de éguas classificadas na categoria III sugerindo que estes achados sejam sinais de processos patológicos nestas éguas. Estes mesmos autores afirmaram que se as células claras são células glandulares lesadas isto pode ser resultado de suprimento sanguíneo inadequado para as glândulas ou devido à barreira fibrótica depositada em torno destas.

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; MORAES e LIU, 1993).

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

A fibrose é um dos principais elementos da reação tecidual, sendo, portanto, importante a determinação de seu arranjo, localização e composição para se avaliar o grau de comprometimento do endométrio (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; MILLER e GANJAM, 1998).

A avaliação do grau de fibrose endometrial é importante, pois, ao contrário das alterações inflamatórias, é permanente. Nestas lesões a deposição de colágeno ocorre mais comumente ao redor das glândulas ou associada à

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

É comum na prática laboratorial utilizar colorações como o tricrômico de Masson para avaliação de amostras endometriais. Este método tem sido utilizado para identificar a fibrose endometrial patológica (BLANCHARD et al., 1987). O aumento do número de camadas de tecido conjuntivo em volta das glândulas endometriais correlaciona-se significativamente com baixa fertilidade: éguas com uma média menor do que três camadas de fibrose periglandular têm 75% de probabilidade de levar uma gestação a termo, enquanto que éguas com uma média maior do que 3,5 camadas apresentam um prognóstico pior (25%) para fertilidade (LEISCHMAN; MILLER e DOIG, 1982)

Embora as fibras colágenas apareçam geralmente bem coradas por este método, outras estruturas que contém colágeno (como as fibras reticulares e as membranas basais) não são coradas seletivamente pelos métodos tricrômicos. Deste modo, os vários tipos de colágeno não podem ser distinguidos (CALDINI, 1992).

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

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

Há evidências de que, em lesões granulomatosas com fibrose persistente, ocorre formação progressiva de pontes de ligação de colágeno e conseqüente

bloqueio de sítios de reação com as enzimas colagenolíticas, o que impede a degradação das moléculas de colágeno (ANDRADE et al., 1999).

A presença de quantidades crescentes de colágeno ao redor das glândulas e logo abaixo da membrana basal do epitélio luminal provavelmente interfere na fisiologia normal das células glandulares e do epitélio luminal, uma vez que impedem o intercâmbio normal entre estas estruturas e os capilares adjacentes (KENNEY, 1978).

No que diz respeito ao endométrio eqüino o estudo histoquímico e ultra-estrutural do colágeno na fibrose periglandular revelou que a base molecular da fibrose endometrial eqüina reside na substituição do colágeno tipo III, presente na maior parte da lâmina própria do endométrio, por colágeno do tipo I, o que demonstra que o colágeno está envolvido nas bases moleculares desta patologia (CALDINI, 1992).

Walter et al. (2001) avaliaram a presença de colágeno tipo I, III, IV, laminina e fibronectina em éguas normais e com endometrose e observaram que a distribuição do colágeno tipo I foi dependente do estágio no ciclo estral. Estes mesmos autores demonstraram que as éguas com endometrose apresentaram arranjo das fibras colágenas tipo I e III semelhante ao das éguas normais.

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

Walter et al. (2001) afirmaram que a fibrose periglandular em amostras com endometrose não é caracterizada pelo aumento da incidência de fibras colágenas, mas pelo arranjo de fibroblastos periglandulares, em uma ou mais camadas. Segundo estes mesmos autores os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos e trazem sérias conseqüências ao epitélio glandular uterino ou às células estromais, tendo em vista que os miofibroblastos são capazes de produzir citocinas e que estas interferem com a produção e degradação da matriz extracelular.

Segundo Montenegro e Franco (1999) o que leva as células do tecido conjuntivo a proliferar e secretar os componentes da matriz extracelular são mensageiros químicos sob a forma de peptídeos secretados por vários tipos celulares (citocinas). Entre estas células, os macrófagos e os linfócitos T estão entre as mais importantes. Segundo Walter et al. (2001) os fibroblastos representam um papel essencial na síntese e regulação do tecido conjuntivo e estão envolvidos no processo fibrótico.

Vários estudos têm revelado que a matriz extracelular não apenas fornece aos tecidos um suporte estrutural, mas também troca informações com as células, modulando uma série de processos que incluem: desenvolvimento, migração celular, adesão, diferenciação e reparo (BRANTON e KOPP, 1999; MARTINEZ-HERNANDEZ, 1999). A síntese e degradação da matriz acompanham dentre outros fatores os processos fibróticos (COTRAN; KUMAR e COLLINS, 1999).

Mansour, Henry e Ferreira (2003) verificaram a distribuição de componentes da matriz extracelular em amostras de endométrio equino durante o ciclo estral. Estes autores encontraram que o colágeno IV estava presente na membrana basal das glândulas endometriais e do epitélio luminal e, ainda, nos capilares sangüíneos. Também foi verificada a expressão de laminina e fibronectina. A laminina foi observada na membrana basal das glândulas endometriais e dos capilares sangüíneos e a fibronectina no interstício endometrial e nos vasos sangüíneos.

Segundo Branton e Kopp (1999) em circunstâncias normais, no remodelamento tecidual, a taxa de síntese das proteínas da matriz são balanceadas por proteínas de degradação, catalizadas por várias famílias de enzimas, incluindo plasmina e metaloproteinasas (MMPs).

O plasminogênio é produzido no fígado e nos rins e é liberado para outros tecidos pela circulação. A plasmina é a enzima na forma ativa e degrada fibrina, fibronectina e laminina e ativa as gelatinases, colagenases e fator transformador do crescimento β (TGF- β) (BRANTON e KOPP, 1999).

As MMPs constituem mais de 20 tipos e são divididas em quatro grupos: as colagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) que degradam os colágenos fibrilares I, II e III; as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) que degradam o colágeno amorfo e fibronectina; as estromalisinas (MMP-3, MMP-7 e MMP-10)

que degradam componentes da membrana basal como colágeno IV e V, laminina e outras proteínas como a fibronectina; as metaloproteinases tipo membrana (MT-MMP) que degradam colágeno I e III, fibronectina, laminina, entactina/nidogênio, tenascina e perlecan e ainda ativam outras MMPs (BRANTON e KOPP, 1999; GOFFIN et al., 2003).

Segundo Contran, Kumar e Collins (1999) as MMPs são secretadas por macrófagos, neutrófilos, células epiteliais, fibroblastos, células sinoviais, dentre outras. A secreção é induzida por vários fatores dentre estes as citocinas e os fatores de crescimento. De acordo com Branton e Kopp (1999) as MMPs podem ser inativadas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3) que são produzidos principalmente por células mesenquimais e previnem a ação descontrolada das MMPs.

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

As metaloproteinases da família das estromalinas estão envolvidas em algumas funções do trato reprodutivo humano incluindo ovulação, placentação, implantação, partos e involução uterina pós-parto (OSTEEN et al., 1994). Estes mesmos autores citam que as estromalinas também participam de outros processos como a morfogênese dos órgãos durante o desenvolvimento embrionário e processos patológicos de neoplasias invasivas e metástases.

A avaliação da expressão de MMP-2, MMP-9 e TIMPs foi realizada por Riley et al (2001) durante o crescimento folicular em ovários eqüinos. Os resultados desta avaliação mostraram que a MMP-2 e a MMP-9 estavam localizadas nas células estromais, células da granulosa e da teca. Os TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 estavam presentes nas células da granulosa e da teca dos folículos e associados ao estroma ovariano. Os autores deste estudo sugerem que as MMPs e os TIMPs estejam envolvidos na regulação da matriz

extracelular durante o desenvolvimento folicular e migração do folículo para a fossa ovulatória.

Song, Porter e Coomber (1999) acreditam que as células estromais ovarianas da égua produzem importantes componentes da matriz extracelular e que estes representam papel fundamental no remodelamento tecidual durante o crescimento folicular. Estes autores observaram a presença de MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 nas células estromais ovarianas nesta espécie.

Segundo Noguchi et al. (2003) o endométrio humano produz diferentes tipos de MMPs. No endométrio normal, as MMP-1 e MMP-3 foram observadas nas células estromais durante as fases pré-menstrual e menstrual. As MMP-2 e MMP-9 foram observadas nas células estromais e epitélio glandular durante o ciclo menstrual ou na fase secretória. A MT1-MMP foi observada no epitélio endometrial durante o ciclo menstrual.

Liu, He e Peng (2002) verificaram a expressão de MMP-9 no endométrio eutópico e ectópico de mulheres e mostraram que os tecidos com endometriose processam níveis de gelatinases mais altos do que o tecido normal e acreditam que a MMP-9 possa ser importante para o crescimento invasivo e a implantação do tecido endometriótico.

No útero humano, a MMP-2 é a que se encontra mais amplamente distribuída. É detectada na maioria das células endometriais, sejam epiteliais, estromais, vasculares, mas não nos leucócitos, porém observada em maior intensidade no tecido menstrual em degeneração. Já a MMP-9 é encontrada no epitélio somente durante a fase secretória precoce e durante a menstruação está presente predominantemente em leucócitos (ZHANG e SALAMONSEN, 2002).

Po-Yin Chu et al. (2002) avaliando o papel das MMPs no endométrio de 30 cadelas, observaram que a MMP-2 (forma latente e ativa) e a MMP-9 (forma latente) foram detectadas no endométrio de todos os animais. A forma latente da MMP-7 e a forma ativa da MMP-9 foram observadas somente em uma cadela em anestro e nas cadelas com hiperplasia cística endometrial, piometra e nos animais entre duas e três semanas pós-parto. Os autores concluíram que o estudo das MMPs no endométrio canino pode representar um importante

papel na hiperplasia cística endometrial, piometra e no pós-parto. Porém, não observaram envolvimento das MMPs com a degeneração do epitélio luminal.

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

Porto et al (2005) avaliaram a expressão de MMP-2 e MMP-9 no endométrio eqüino e observaram que o tecido intersticial apresentou marcação positiva difusa para MMP-2, tanto no estrato compacto quanto no estrato esponjoso. Além disso, as células do epitélio luminal, do epitélio glandular e a parede de algumas arteríolas também apresentaram imuno-reatividade para esta enzima. A expressão da MMP-9 foi detectada principalmente na periferia dos focos fibróticos periglandulares do estrato esponjoso. A expressão desta metaloproteinase foi observada, de forma esparsa, em células inflamatórias presentes nos focos fibróticos intersticiais. Com base nestes dados os autores sugerem que pode haver envolvimento das metaloproteinases no processo fibrótico que ocorre na endometrite crônica das éguas. Walter et al. (2005) avaliaram a expressão de MMP-2 na fibrose periglandular das éguas e verificaram que a expressão desta enzima estava associada com a dilatação e fibrose glandular. Quanto à distribuição no endométrio, estes autores observaram que a MMP-2 estava localizada no estrato compacto no endométrio de éguas saudáveis e com endometrose. Os autores sugerem que a MMP-2 tenha um papel importante nas alterações da homeostase da matriz extracelular em regiões de fibrose endometrial.

Alguns autores citam que as MMPs podem sofrer influências hormonais e que isto pode levar a alterações na expressão destas enzimas. Osteen et al. (1994) em humanos e demonstraram através de cultivo celular que a progesterona é um importante inibidor das estromalinas.

Um estudo realizado por González et al. (2002) sobre a presença das MMPs e TIMPs em lesões cardíacas e sarcoidose pulmonar em humanos revelou que a MMP-1 foi bastante expressa pelas células gigantes multinucleadas e de forma moderada pelas células endoteliais e pelas células da musculatura lisa bronquiais nos granulomas pulmonares. Neste mesmo trabalho, a MMP-2 foi mais expressa pelas células epitelióides e macrófagos

enquanto que a MMP-7 e a MMP-9, pelas células gigantes multinucleadas, células epitelióides e macrófagos. Observou-se, ainda, que a marcação da MMP-7 foi bem mais fraca que MMP-1 e MMP-2 e que a MMP-3, embora tenha apresentado marcação positiva, não apresentou padrões distintos de localização em nenhum tipo celular.

Arthur (2000) observaram em estudos de fibrose hepática que as células estreladas hepáticas quando ativadas, exibindo fenótipo de miofibroblastos, secretam pro-MMP-2, induzidas pela presença de colágeno do tipo I, o principal no fígado fibrótico. A pro-MMP-9, no fígado, tem como principal fonte as células de Kupffer ativadas. O aumento da atividade colagenolítica está associado à diminuição rápida e significativa do nível de TIMP .

Tem sido demonstrado que os TIMPs inibem a invasão celular (*in vitro*), tumorigênese, metástases (*in vivo*) e angiogênese. Os TIMP-1 e TIMP-2 têm atividade mitogênica em variados tipos celulares, entretanto a alta expressão destes inibidores reduz o crescimento tumoral. O TIMP-2 age como inibidor do fator de crescimento de fibroblastos (NAGASE e WOESSNER JR, 1999).

Lenhart et al. (2002) demonstraram que no útero suíno a expressão dos inibidores das metaloproteinases está relacionada ao aumento da expressão de relaxina durante a fase precoce da prenhez, sugerindo que esta estimula o crescimento uterino durante a placentação.

Freitas et al. (1999) realizaram um estudo para verificar a expressão das MMPs e TIMPs nos vasos sanguíneos no endométrio humano e constataram que tanto as MMPs quanto TIMPs participam dos processos de remodelamento durante a angiogênese e menstruação e sugerem que as alterações cíclicas envolvem componentes vasculares.

A degeneração vascular endometrial também contribui para o retardo do *clearance* uterino. A esclerose (angiose) das veias, artérias e arteríolas também conhecidas como esclerose da prenhez em humanos tem sido observada em biópsias eqüinas (SCHOON; SCHOON e KLUG, 1999). As alterações degenerativas observadas incluem elastose, fibrose e fibroelastose dos vasos bem como a fibrose perivascular e a calcificação (LEBLANC, 2003).

A angiose parece reduzir indiretamente a fertilidade pela redução da perfusão endometrial e pelos distúrbios de drenagem uterina causados pela redução da função das veias (LEBLANC, 2003). Segundo Inoue et al (2000) as

alterações patológicas no útero produzidas pela esclerose vascular podem contribuir para a endometriose ou a esclerose e a progressão para a endometriose podem ocorrer simultaneamente como resultado da idade.

A maior evidência clínica de angiose nas éguas é a persistência do edema endometrial após a ovulação. Durante o estro ocorre uma linfangiectasia fisiológica que resulta em edema típico. O edema desaparece rapidamente após a ovulação, demonstrando que os mecanismos de drenagem estão funcionalmente intactos. Quando isto não ocorre resulta em edema patológico caracterizado por linfangiectasia persistente que é comum em éguas velhas e multíparas (LEBLANC, 2003).

Um estudo sobre as alterações vasculares observadas no endométrio eqüino revelou que os animais que apresentaram os maiores graus de endometriose com ninhos glandulares difusos e/ou cistos associados a fibrose periglandular grave ou estromal difusa, apresentaram alterações vasculares severas (INOUE et al., 2000). Oikawa et al. (1993) relataram que as artérias uterinas de éguas que tiveram mais de uma gestação exibiam elastose da íntima ou adventícia.

Através da videoendoscopia, Inoue et al. (2000) observaram que pequenas artérias localizadas abaixo do endométrio apareciam com a coloração mais clara. Com base nestes dados estes autores propuseram uma classificação histológica para as alterações vasculares divididas em quatro grupos a saber: tipo 1 – lesões arteriais não são significativas; tipo 2 – observa-se espessamento da camada íntima com multiplicação da lâmina elástica; tipo 3 – moderada elastose caracterizada por espessamento da camada íntima e aumento das fibras elásticas na camada adventícia; tipo 4 – **severa** elastose tanto na camada íntima quanto na adventícia.

Grüninger et al. (1998) realizaram estudo sobre a relação entre as angiopatias e a idade a número de partições em éguas e observaram que a perivasculite foi observada em apenas 20,5% das amostras enquanto que a angiose foi notada em 88,9%. Foi verificado neste mesmo estudo que as éguas virgens não mostraram alterações vasculares graves, entretanto, nas éguas velhas (entre 13 e 19 anos) e multíparas, observou-se moderada degeneração da membrana elástica interna e perifibrose ou perifibroelastose.

A relação entre o ambiente uterino, a esclerose vascular e a idade e como estes fatores interferem com a endometriose ainda não são claros (INOUE et al., 2000).

O resultados dos estudos morfológicos das endometrites crônicas das éguas têm adicionado dados importantes para o entendimento da etiologia, patogênese, diagnóstico, tratamento e prognóstico deste processo. No entanto, por se tratar de um processo patológico complexo, estudos recentes demonstram que esta afecção continua sendo um problema sério nas criações de eqüinos.

A análise histopatológica das lesões crônicas endometriais fornece informações sobre o estado funcional da mucosa uterina e a evolução do processo inflamatório. A identificação dos tipos celulares presentes nesta resposta, através da imunofenotipagem, permite um melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no processo. Por outro lado, sendo a fibrose um dos elementos principais da reação tecidual, a determinação do seu arranjo, localização e composição poderão ajudar na identificação do grau de comprometimento do endométrio e das chances de regressão da lesão já estabelecida. O estudo dos tipos de colágeno que se acumulam na fibrose endometrial é necessário para que seja realizada a correlação cronológica com as alterações encontradas na histopatologia. A avaliação da esclerose vascular poderá trazer dados importantes sobre a habilidade reprodutiva das éguas em relação à idade. Estudos sobre a expressão das metaloproteinases e seus inibidores poderão auxiliar no entendimento deste processo, pois tais enzimas participam ativamente do remodelamento tecidual e ainda não se conhece o verdadeiro papel das MMPs e dos TIMPs no endométrio eqüino.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar o tipo de colágeno, a expressão das enzimas que degradam o colágeno e de seus inibidores e as alterações vasculares presentes nas endometrites crônicas das éguas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Categorizar as endometrites crônicas das éguas nos sistemas de classificação histológica descritos por Kenney e Doig (1986) e Ricketts e Alonso (1991);
- Avaliar a fibrose endometrial caracterizando os tipos e a proporção de colágeno envolvidos neste processo;
- Avaliar a esclerose vascular e o grau de fibroelastose presente nos processos crônicos endometriais das éguas;
- Verificar a expressão e a distribuição das metaloproteinases (MMPs) e dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) no endométrio de éguas normais e portadoras de endometrites crônicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Procedência do material

Foram utilizadas 163 biópsias uterinas provenientes dos Serviços de Patologia Veterinária e de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Campus de Botucatu, SP. Este material incluiu biópsias provenientes da rotina de diagnóstico do Hospital Veterinário, bem como aquelas enviadas por clínicas particulares e profissionais autônomos durante o período de 1987 a 2004. Do total de casos levantados foram selecionados apenas 82 biópsias.

Os dados clínicos referentes aos 82 casos não foram utilizados devido à dificuldade de acesso às fichas clínicas dos animais. Apenas as biópsias das quinze éguas normais possuía histórico reprodutivo.

4.2 Levantamento dos casos

Após o levantamento dos casos nos arquivos de fichas, foram selecionadas as lâminas e os blocos de parafina, correspondentes, no Laboratório de Histopatologia da FMVZ. De cada bloco foram obtidos novos cortes histológicos e as lâminas foram reavaliadas para a confirmação do diagnóstico. As amostras utilizadas neste estudo foram selecionadas de acordo com a qualidade do material emblocado.

4.3 Processamento do material

Tanto as biópsias correspondentes ao material recuperado do arquivo do Serviço de Patologia Veterinária e de Reprodução Animal como os casos encaminhados durante o desenvolvimento deste trabalho foram submetidos ao mesmo tipo de processamento laboratorial, ou seja, fixação em solução de Bouin durante 24 horas seguida da imersão em álcool 70% e posterior inclusão em parafina, de acordo com as técnicas de rotina histopatológica.

Dos blocos selecionados, foram obtidos cortes com espessura variando de três a cinco micrômetros (μm) para coloração pelos métodos de Hematoxilina e Eosina - HE (LUNA, 1968), Tricrômico de Masson (LUNA, 1968), Picrosirius Red (JUNQUEIRA, COSSERMELI e BRENTANI, 1978) e

Verhoeff Van Gieson (VERHÖEFF, 1908). Do mesmo material foram também retirados os cortes para o processamento imunoistoquímico.

4.4 Avaliação histoquímica

4.4.1 Método de Tricrômico de Masson

A técnica utilizada foi descrita por Luna (1968) e segue o roteiro da Apostila de Técnicas de Colorações Específicas do Laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ. Para a padronização desta técnica foram utilizados fragmentos de endométrio eqüino com diagnóstico de endometrite crônica, colhidos durante exame necroscópico. Os fragmentos de endométrio foram processados da mesma maneira que as biópsias uterinas, ou seja, fixados em solução de Bouin a 10% por 24 horas e, em seguida, colocados em solução de álcool a 70%. Após o processamento histológico e a inclusão em parafina foram feitos cortes com cinco micrômetros de espessura.

As lâminas foram submetidas ao processamento de rotina de desparafinização e hidratação e em seguida, colocadas em solução de Bouin à 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 Weight 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.

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

4.4.2 Método de Picrosirius Red

A utilização desta técnica, descrita por Junqueira, Cossermelli e Brentani (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. Os fragmentos, com cinco micrômetros de espessura foram processados da mesma maneira que as biopsias 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 Chemical C.O., St. Louis M.O., E.U.A) dissolvido em ácido pícrico a 1,5% (aquoso saturado) durante 110 minutos;
- Imersão em solução de ácido clorídrico a 0,1N por dois minutos.

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

Para a verificação do padrão de qualidade da coloração e a confirmação da refringência das fibras colágenas, as lâminas foram observadas no microscópio de luz polarizada (campo escuro), modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha) do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, UNESP, Botucatu, SP.

4.4.3 Método de Verhoeff Van Gieson

A utilização desta técnica, descrita por Verhoeff (1908), seguiu o roteiro da Apostila de Técnicas de Colorações Específicas do Laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ. Para a padronização do método, foram utilizados fragmentos de aorta e endométrio equinos, colhidos de animais encaminhados para necropsia no Serviço de Patologia.

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

- Deposição do corante de Verhoeff sobre as lâminas por 15 minutos e em seguida lavagem em água corrente e água destilada;
- Diferenciação por 20 segundos em cloreto férrico aquoso a 2%, observando em água ao microscópio, até que as fibras elásticas aparecessem em preto e os núcleos em cinza;
- Quando diferenciadas em excesso, as lâminas eram novamente coradas com o Verhoeff;
- Lavagem em água corrente;
- Imersão em solução de tiosulfato de sódio a 5% por um minuto para retirada do excesso de iodo;
- Lavagem em água corrente e água destilada;
- Imersão em solução de Van Gieson por cinco minutos;
- Lavagem em álcool a 95% rapidamente.

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

4.5 Avaliação imunoistoquímica

4.5.1 Padronização das técnicas

A padronização da técnica de imunoistoquímica foi realizada no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, UNESP, Botucatu, SP e no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP.

Para a padronização desta técnica foram utilizados fragmentos de endométrio eqüino, fixados em Bouin e blocos de parafina contendo amostras de tecido de granulação em pele de eqüino e de carcinoma mamário de cadela, provenientes do Serviço de Patologia Veterinária. Também foram utilizadas amostras de placenta e de carcinoma mamário humano obtidas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. As amostras de tecido de granulação, placenta e carcinoma mamário (canino e humano) foram utilizadas como controle positivo para as MMPs e TIMP-1.

4.5.2 Anticorpos utilizados

TIMP-1 (C-20 SC 6832) – Anticorpo policlonal humano que reconhece a glicoproteína TIMP-1 (inibidor tecidual de metaloproteinases – 1) expressa em vários tipos celulares.

MMP-1 (RDI-MMP1abm-E5) – Anticorpo monoclonal humano que se liga às formas latente e ativa da enzima MMP-1.

MMP-2 (RDI-MMP2abm-5D) – Anticorpo monoclonal humano que se liga às formas latente e ativa da enzima MMP-2.

MMP-7 (RDI-MMP7amb-B2) – Anticorpo monoclonal humano que se liga à forma da pró-enzima MMP7, mas não à sua forma ativa.

MMP-9 (C-20 SC 6840) – Anticorpo policlonal humano que se liga às formas latente e ativa da enzima MMP-9.

4.5.3 Roteiro de aplicação da técnica de imunohistoquímica

4.5.3.1 Preparação das lâminas

As lâminas foram inicialmente mergulhadas em álcool a 70% e depois de secas, imersas em cola líquida a base de organossilano (A3648 – SIGMA, St. Louis, E.U.A.).

4.5.3.2 Obtenção dos cortes histológicos

Cortes histológicos com três micrômetros de espessura foram feitos em micrótomo rotativo e as lâminas, em seguida, permaneceram na estufa a 60°C por 24 horas para fixação do tecido à lâmina.

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

4.5.3.3 Bloqueio da peroxidase endógena

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em solução de água oxigenada a 10 volumes por 10 minutos para os anticorpos MMP-1, MMP-2 e MMP-7.

Para os anticorpos MMP-9 e TIMP-1 o bloqueio foi realizado em solução de água oxigenada 30% diluída na concentração de 1:9 em metanol. Após este

procedimento foi realizada lavagem com TBS pH 7,5 seguida do bloqueio de proteínas com leite em pó Molico a 3% em TBS por uma hora.

4.5.3.4 Recuperação antigênica

Para a recuperação antigênica do material foram utilizados dois protocolos:

- Solução tampão de citrato 10 mM, pH 6,0, em forno de microondas, na potência máxima (700W) por cinco minutos para os anticorpos MMP-9 e TIMP-1;
- Solução tampão de citrato 10 mM, pH 6,0, em forno de microondas, na potência máxima (700W) por 20 minutos para os anticorpos cinco minutos para os anticorpos MMP-1, MMP-2 e MMP-7.

Após o procedimento, o material foi resfriado até atingir a temperatura ambiente.

4.5.3.5 Incubação com o anticorpo primário

Os anticorpos MMP-1, MMP-2 e MMP-7 foram diluídos em solução a 0,1% de albumina sérica bovina em solução tampão de TRIS (TRIZMA base, D5637 Sigma Chemical C.O., St. Louis, E.U.A.).

Os anticorpos MMP-9 e TIMP-1 foram diluídos em solução a 1% de albumina sérica bovina em solução de água destilada.

O material foi submetido à incubação com os anticorpos primários, em câmara úmida por 18 horas a 4°C.

As concentrações testadas e utilizadas em cada uma das reações são apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1. Anticorpos primários, concentrações testadas e utilizadas nas reações imunoistoquímicas das biopsias uterinas de éguas com endometrite crônica.

Anticorpo	Concentrações testadas	Concentração utilizada
TIMP-1	1:50, 1:100 e 1:200	1:100
MMP-1	1:50, 1:100, 1:200	1:100
MMP-2	1:50, 1:100, 1:200 e 1:400	1:200
MMP-7	1:50, 1:100, 1:200	1:100
MMP-9	1:50, 1:100, 1:200	1:100

4.5.3.6 Complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC)

As lâminas foram lavadas com solução de TRIS e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse (BA2000-VECTOR) por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em solução de TRIS e incubadas com o KIT ABC (PK6100 – VECTASTAIN ELITE) por 30 minutos à temperatura ambiente. O KIT ABC foi preparado 30 minutos antes do uso.

4.5.3.7 Revelação

Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3'-diaminobenzidina (Liquid DAB – K3466 DakoCytomation) durante cinco minutos à temperatura ambiente.

Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, por 35 segundos e, em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e submetidas aos processos de desidratação e montagem em resina sintética.

4.6 Análise do material

4.6.1 Aplicação da classificação das endometrites crônicas eqüinas

Para cada caso, o tipo histológico foi categorizado 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).

No presente estudo, visando a avaliação dos processos fibróticos endometriais, foram utilizadas somente as amostras classificadas como endometrite crônica categoria IIB e III, crônica infiltrativa e crônica degenerativa. As amostras classificadas como categoria I (éguas normais) serviram de parâmetro para comparação e as amostras categoria IIA não foram utilizadas neste estudo.

Nas Tabelas 2 e 3 estão apresentadas as características morfológicas das classificações propostas para as endometrites crônicas utilizadas no presente trabalho.

TABELA 2. Classificação das endometrites crônicas de acordo com Kenney e Doig, (1986)

CATEGORIAS DE ENDOMETRITE	ACHADOS MORFOLÓGICOS
Categoria I	O endométrio não é atrófico ou hipoplásico e as alterações fibróticas e inflamatórias são ausentes ou, quando aparecem, são discretas e esparsas.
Categoria IIA	As alterações inflamatórias são moderadas e difusas. As lesões fibróticas podem envolver ramos individuais de glândulas em qualquer grau de severidade (mas geralmente com 1 a 3 camadas de células). Menos que 2 ninhos fibróticos são vistos por 5,5mm de campo linear
Categoria IIB	As alterações inflamatórias são difusas e moderadamente severas. A fibrose é mais severa e extensa do que na categoria IIA. Há envolvimento de 4 ou mais camadas de células ao redor de glândulas individuais. Os ninhos fibróticos são observados, em média, de 2 a 4, por 5,5mm de campo linear.
Categoria III	A inflamação severa e difusa em qualquer grau inclui a égua nesta categoria. A fibrose é ampla e são observados 5 ou mais ninhos fibróticos por 5,5mm de campo linear. As lacunas linfáticas são observadas com frequência.

TABELA 3. Classificação das endometrites crônicas de acordo com Ricketts e Alonso (1991)

CATEGORIAS DE ENDOMETRITE	ACHADOS MORFOLÓGICOS
Égua normal	O endométrio não é atrófico ou hipoplásico e as alterações fibróticas e inflamatórias são ausentes ou, quando aparecem, são discretas e esparsas.
Endometrite crônica infiltrativa	Presença de células mononucleares, incluindo histiócitos e plasmócitos, infiltrando o estroma.
Endometrite crônica degenerativa (endometrose)	Presença de alterações degenerativas glandulares (ninhos e/ou cistos) associadas à fibrose periglandular e/ou fibrose estromal difusa.

4.6.2 Análise qualitativa do colágeno endometrial

O material corado pelo método de Picrosirius Red foi analisado em microscópio de luz polarizada (campo escuro), modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha) do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, UNESP, Botucatu, SP.

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

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 tipo I e as fibrilas delgadas e de coloração esverdeada, como de colágeno tipo III. Quando não era possível determinar a predominância de um dos tipos, considerou-se que havia os dois tipos de colágeno na mesma amostra.

4.6.3 Análise da esclerose e fibroelastose vascular

O material corado com VVG foi utilizado para a avaliação da esclerose e do grau de fibroelastose vascular e seguiu a classificação descrita por Inoue et al. (2000). Em cada amostra eram avaliadas todas as arteríolas para a observação da fibroelastose e esclerose vascular. Para cada arteríola era dado um grau de fibroelastose e ao final da análise se obtinha uma média com base no número de arteríolas observadas, chegando-se a classificação adequada. Para a análise estatística cada grau de fibroelastose encontrado foi substituído por um valor numérico variando de um a quatro, conforme a classificação morfológica. Na Tabela 4 estão apresentadas as características morfológicas da classificação para fibroelastose proposta por Inoue et al. (2000).

TABELA 4. Classificação das alterações vasculares do endométrio equino de acordo com Inoue et al. (2000)

ALTERAÇÕES VASCULARES	ACHADOS MORFOLÓGICOS
Tipo 1	Quando não são observadas lesões vasculares significativas.
Tipo 2	Presença de discreto espessamento da camada íntima, mas sem alterações nas camadas média e adventícia.
Tipo 3	Moderada elastose com espessamento da íntima e aumento das fibras elásticas na adventícia.
Tipo 4	Presença de elastose acentuada observada tanto na camada íntima quanto na adventícia.

4.6.4 Análise morfométrica

Para a análise morfométrica da fibrose periglandular foram utilizados os cortes histológicos corados pelo método do Picrosirius Red. A morfometria foi realizada de acordo com Nunes (2003), utilizando-se microscópio de luz polarizada (campo escuro), modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), contendo câmera digital modelo AxioCam MRc (Zeiss Vision, Alemanha) equipado com programa de análise de imagem Axio Vision Software Rel. versão 4.3 (Zeiss Vision, Alemanha) do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, UNESP, Botucatu, SP. Foram avaliadas todas as amostras que apresentavam fibrose periglandular, em ramos individuais ou em ninhos fibróticos. A área de fibrose era calculada subtraindo-se a área do lúmen glandular da área total da fibrose em volta da glândula. Este valor era dividido pela área total da amostra e multiplicado por 100. O número final correspondia ao percentual total de fibrose periglandular existente na amostra.

Para a análise morfométrica da esclerose vascular endometrial foi utilizada a mesma técnica feita para a avaliação da fibrose periglandular descrita por Nunes (2003). Foram utilizadas nesta análise as lâminas coradas com VVG. As lâminas coradas pelo Tricrômico de Masson serviram para avaliação complementar da esclerose.

A morfometria da esclerose vascular foi realizada utilizando-se microscópio modelo Physis, câmera de captura tipo CCB (Sony) e programa de análise de imagem *Image Pro Plus* versão 1.0 do Laboratório de Ciência da Madeira do Núcleo de Estudos e de Difusão em Tecnologia em Floresta, Recursos Hídricos e Agricultura Sustentável (NEDTEC) da Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES.

4.6.5 Análise imunoistoquímica

Para cada anticorpo utilizado, a intensidade da reação era estimada conforme a marcação positiva. Porém, por tratar-se de anticorpos monoclonais e policlonais a marcação positiva variava de intensidade sendo necessário caracterizar cada marcador, visto que alguns apresentavam marcação fraca enquanto que outros eram fortemente marcados. Para esta avaliação foram utilizados dois observadores.

Para cada região onde a enzima foi observada, adotou-se um valor para a intensidade da marcação, sendo: 0=negativo, 1=marcação fraca, 2=marcação moderada e 3=marcação acentuada. Os locais observados foram: epitélio luminal, epitélio glandular, parede vascular, célula endotelial, célula inflamatória e célula estromal.

Para a avaliação do grau de expressão de cada enzima foram utilizados valores numéricos variando de zero a seis. O valor zero correspondia à ausência da marcação. Para cada local era atribuído o valor um. A expressão da enzima era calculada com base no somatório dos locais onde esta enzima estava presente, ou seja, de zero a seis.

4.7 Análise estatística

Para cada variável utilizada no experimento, as três categorias de endometrites foram comparadas utilizando-se as diferentes classificações (KENNEY e DOIG, 1986; RICKETTS e ALONSO, 1991). O teste estatístico utilizado foi o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (ZAR, 1996), adotando-se o nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Classificação histológica das endometrites crônicas

Após a classificação histológica das 82 biópsias de acordo com a descrição de Kenney e Doig (1986), 15 animais foram incluídos na categoria I (18,29%), 18 na categoria IIB (21,95%) e 49 na categoria III (59,76%). Os resultados da classificação histológica das 82 amostras de acordo com a descrição de Ricketts e Alonso (1991) demonstraram que 15 dos animais apresentavam endométrio normal (18,29%), 50 apresentaram endometrite crônica infiltrativa (60,98%) e 17 animais apresentaram endometrite crônica degenerativa (endometrose) (20,73%). Os percentuais dos 82 casos nas diferentes classificações para endometrites crônicas estão dispostos nas Figuras 1 e 2.

FIGURA 1. Classificação dos 82 casos de endometrites crônicas diagnosticados no Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, UNESP de acordo com Kenney e Doig (1986).

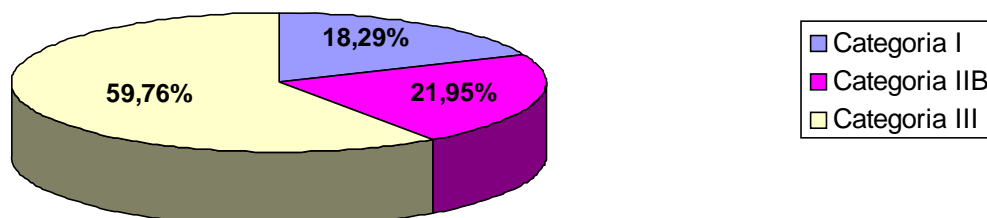
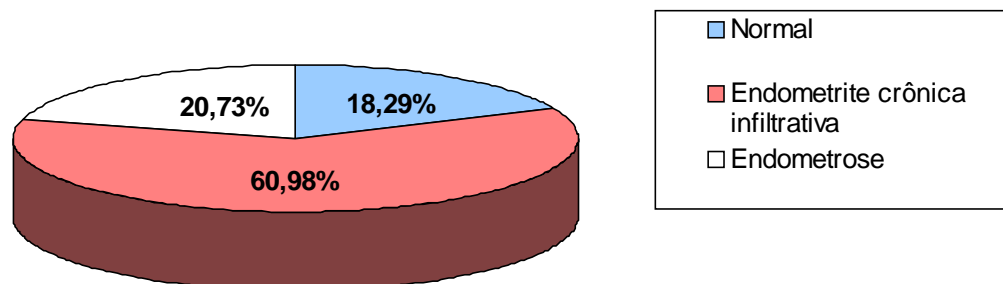


FIGURA 2. Classificação dos 82 casos de endometrites crônicas diagnosticados no Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, UNESP de acordo com Ricketts e Alonso (1991).



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

5.2 Avaliação histoquímica

5.2.1 Tricrômico de Masson

A fibrose endometrial, evidenciada pelo método de tricrômico de Masson, foi caracterizada pelo acúmulo de camadas de células, fibras colágenas e elásticas coradas em tons de azul que se distribuíam preferencialmente ao redor das glândulas endometriais, dos vasos sangüíneos e abaixo da membrana basal do epitélio luminal. Nossos resultados revelaram que este método contribuiu para a observação dos acúmulos de tecido conjuntivo nas amostras e permitiu a avaliação da fibrose intersticial difusa, que não é evidenciada pelo método de HE. Os dados obtidos neste estudo revelaram que todas as amostras das endometroses apresentaram fibrose intersticial acentuada. As amostras de endometrite crônica categoria IIB, categoria III e infiltrativa também revelaram a presença de fibrose intersticial.

A avaliação da esclerose vascular mostrou que em 72 amostras (92,68%) apresentaram fibrose perivascular, sendo que destas, a esclerose vascular total foi observada em seis casos.

As lesões fibróticas evidenciadas pelo método de tricrômico de Masson encontradas nas endometrites crônicas estão ilustradas na Figura 6.

5.2.2 Picrosirius Red

Os resultados obtidos em relação ao tipo de colágeno presente nas endometrites crônicas das éguas revelaram que o colágeno tipo I, representado pelas fibras espessas, foi o tipo predominante. Das 82 amostras utilizadas neste estudo 53 (64,63%) apresentaram predominância do colágeno tipo I, 24 (29,27%) apresentaram predominância do colágeno fibrilar, tipo III, e apenas 5 (6,10%) revelaram a presença dos dois tipos de colágeno na mesma amostra. Estes dados estão dispostos na Tabela 5.

Quando avaliado o tipo de colágeno presente em cada categoria de endometrite os resultados encontrados revelaram que as amostras classificadas na categoria I mostraram predominância do colágeno tipo III, representando 66,67% dos casos. Nas endometrites crônicas mais graves o colágeno predominante foi o do tipo I, representando 66,67% nas amostras da categoria IIB, 77,55% da categoria III, 72,00% das endometrites infiltrativas e 82,36% das endometroses. O colágeno tipo I, denso, também foi observado nas amostras de endométrio normais porém em baixa frequência (20,00% dos casos analisados). Os dados referentes ao tipo de colágeno presente em cada categoria de endometrite estão expostos nas Tabelas 6 e 7.

A avaliação da distribuição do colágeno nas diversas categorias de endometrites crônicas revelou que nas amostras normais o colágeno era observado de forma difusa. À medida que o grau de endometrite se agravava mais acentuado era o acúmulo de colágeno ao redor das estruturas. Os resultados obtidos revelaram que a maior concentração de colágeno nas amostras encontrava-se na região periglandular. No endométrio normal observou-se que a distribuição de colágeno estava mais concentrada na região periglandular (53,34% das amostras) sendo o colágeno tipo III o predominante nestas amostras. Nas amostras com endometrite a distribuição do colágeno foi observada com maior frequência também na região periglandular, porém o tipo de colágeno predominante nestes casos foi o tipo I.

A distribuição do colágeno também foi observada de forma acentuada nas regiões perivasculares e no estrato esponjoso de todas as amostras analisadas. Em 13,33% das amostras normais, 27,78% das endometrites categoria IIB, 30,62% categoria III, 28,00% infiltrativa e 23,53% das endometroses mostraram a distribuição de colágeno predominantemente no estrato esponjoso. A deposição perivascular foi observada em 20,00% das amostras normais, 27,78% das endometrites categoria IIB, 12,24% das endometrites categoria III, 18,00% das infiltrativas e 17,65% das endometroses. A presença predominante de colágeno na região subepitelial não foi observada em nenhuma das amostras analisadas.

Os dados referentes à distribuição do colágeno nas categorias de endometrite estão apresentados nas Tabela 8 e 9 e as Figuras 7, 8 e 9 ilustram os tipos de colágeno presentes nas endometrites crônicas das éguas.

TABELA 5. Tipo de colágeno predominante nas 82 amostras de endometrites crônicas diagnosticadas no Serviço de Patologia Veterinária da UNESP, Botucatu, SP.

Tipo de Colágeno	Número de amostras
Tipo I	53 (64,63%)*
Tipo III	24 (29,27%)
Tipo I/III	5 (6,10%)
Total	82 (100,00%)

*Valores percentuais entre parênteses

TABELA 6. Tipo de colágeno predominante nas diferentes categorias de endometrites crônicas eqüinas diagnosticadas de acordo com Kenney e Doig (1986).

Tipo de colágeno	Categoria I	Categoria IIB	Categoria III
Tipo I	3 (20,00%)*	12 (66,67%)	38 (77,55%)
Tipo III	10 (66,67%)	5 (27,78%)	9 (18,37%)
Tipo I/III	2 (13,33%)	1 (5,55%)	2 (4,08%)
Total	15 (100,00%)	18 (100,00%)	49 (100,00%)

*Valores percentuais entre parênteses.

TABELA 7. Tipo de colágeno predominante nas diferentes categorias de endometrites crônicas eqüinas diagnosticadas de acordo com Ricketts e Alonso (1991).

Tipo de Colágeno	Normal	Endometrite Infiltrativa	Endometrose
Tipo I	3 (20,00%)*	36 (72,00%)	14 (82,36%)
Tipo III	10 (66,67%)	12 (24,00%)	2 (11,76%)
Tipo I/III	2 (13,33%)	2 (4,00%)	1 (5,88%)
Total	15 (100,00%)	50 (100,00%)	17 (100,00%)

*Valores percentuais entre parênteses.

TABELA 8. Distribuição do colágeno total no endométrio eqüino nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas de acordo com Kenney e Doig (1986).

Regiões do endométrio	Categoria I	Categoria IIB	Categoria III
Subepitelial	0 (0,00%)*	0 (0,00%)	0 (0,00%)
Estrato Compacto	0 (0,00%)	1 (5,55%)	2 (4,08%)
Estrato Esponjoso	2 (13,33%)	5 (27,78%)	15 (30,62%)
Periglandular	8 (53,34%)	6 (33,34%)	23 (46,94%)
Perivascular	3 (20,00%)	5 (27,78%)	6 (12,24%)
Difuso	2 (13,33%)	1 (5,55%)	3 (6,12%)
Total	15 (100,00%)	18 (100,00%)	49 (100,00%)

*Valores percentuais entre parênteses.

TABELA 9. Distribuição do colágeno total no endométrio eqüino nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas de acordo com Ricketts e Alonso (1991).

Regiões do endométrio	Normal	Endometrite Infiltrativa	Endometrose
Subepitelial	0 (0,00%)*	0 (0,00%)	0 (0,00%)
Estrato Compacto	0 (0,00%)	1 (2,00%)	4 (23,53%)
Estrato Esponjoso	2 (13,33%)	14 (28,00%)	4 (23,53%)
Periglandular	8 (53,34%)	22 (44,00%)	6 (35,29%)
Perivascular	3 (20,00%)	9 (18,00%)	3 (17,65%)
Difuso	2 (13,33%)	4 (8,00%)	0 (0,00%)
Total	15 (100,00%)	50 (100,00%)	17 (100,00%)

*Valores percentuais entre parênteses.

5.2.3 Método de Verhoeff Van Gieson

A vasculatura endometrial, evidenciada pelo método de VVG, demonstrou que todas as amostras de endométrio de éguas normais e portadoras de endometrites crônicas apresentavam fibroelastose. No entanto, observou-se que as alterações vasculares se tornavam mais graves à medida que o grau de endometrite aumentava.

Do total de 82 casos analisados 7 (8,53%) apresentaram fibroelastose tipo 1, 28 (34,15%) tipo 2, 28 (34,15%) tipo 3 e 19 (23,17%) mostraram lesões do tipo 4. Com relação à esclerose vascular os resultados encontrados foram os mesmos observados com o Tricrômico de Masson, ou seja, 92,68% das amostras apresentaram algum grau de fibrose vascular, independentemente da categoria de endometrite. Os dados referentes à fibroelastose no total de amostras estão apresentados na Tabela 10.

Nas amostras classificadas como categoria I as lesões vasculares mais freqüentemente observadas foram do tipo 2 (discretas), representando 60% dos casos analisados. Nas endometrites crônicas categoria III foram mais observadas alterações vasculares do tipo 3 (moderada) (42,86% dos casos). As endometrites infiltrativas mostraram alterações vasculares diversas sendo observada fibroelastose do tipo 2 (discreta) em 22% dos casos, tipo 3 (moderada) em 40% das amostras e tipo 4 (severa) em 28 % dos casos analisados. Todas as amostras de endometrose apresentaram fibroelastose, sendo que em 52,94% das amostras foram observadas lesões discretas e em 29,41% lesões moderadas. As alterações vasculares severas, nesta classe de endometrite, representaram 17,65% das amostras. No entanto, a fibroelastose não mostrou diferença significativa entre as categorias de endometrites. Estes dados estão expostos nas Tabelas 11, 12, 13 e 14.

As Figuras 10, 11 e 12 ilustram as alterações vasculares, evidenciadas pelo método do VVG, observadas nas amostras de endométrio eqüino.

TABELA 10. Graus de fibroelastose (INOUE et al., 2000) nas 82 amostras de endometrites crônicas diagnosticadas no Serviço de Patologia Veterinária da UNESP, Botucatu, SP.

Grau de fibroelastose	Número de amostras
Tipo 1	7 (8,53%)*
Tipo 2	28 (34,15%)
Tipo 3	28 (34,15%)
Tipo 4	19 (23,17%)
Total	82 (100,00%)

*Valores percentuais entre parênteses.

TABELA 11. Graus de fibroelastose vascular (INOUE et al., 2000) observados nas diferentes categorias de endometrites crônicas eqüinas diagnosticadas de acordo com Kenney e Doig (1986).

.Grau de fibroelastose	Categoria I	Categoria IIB	Categoria III
Tipo1	2(13,34%)*	3(16,67%)	2(4,08%)
Tipo 2	9(60,00%)	5(27,78%)	14(28,57%)
Tipo 3	2(13,33%)	5(27,78%)	21(42,86%)
Tipo 4	2(13,33%)	5(27,77%)	12(24,49%)
Total	15(100,00%)	18(100,00%)	49(100,00%)

*Valores percentuais entre parênteses.

TABELA 12. Graus de fibroelastose vascular (INOUE et al., 2000) observados nas diferentes categorias de endometrites crônicas eqüinas diagnosticadas de acordo com Ricketts e Alonso (1991).

Grau de fibroelastose	Normal	Endometrite Infiltrativa	Endometrose
Tipo1	2(13,34%)*	5(10,00%)	0(0,00%)
Tipo 2	9(60,00%)	11(22,00%)	9(52,94%)
Tipo 3	2(13,33%)	20(40,00%)	5(29,41%)
Tipo 4	2(13,33%)	14(28,00%)	3(17,65%)
Total	15(100,00%)	50(100,00%)	17(100,00%)

*Valores percentuais entre parênteses.

TABELA 13. Valores medianos dos graus de fibroelastose da vasculatura endometrial (INOUE et al., 2000) nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Categoria de Endometrite	Grau de fibroelastose vascular
Categoria I	2,0a ¹
Categoria IIB	3,0a
Categoria III	3,0a

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

TABELA 14. Valores medianos dos graus de fibroelastose da vasculatura endometrial (INOUE et al., 2000) nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).

Categoria de endometrite	Grau de fibroelastose vascular
Égua normal	2,0a ¹
Endometrite crônica infiltrativa	3,0a
Endometrose	3,0a

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

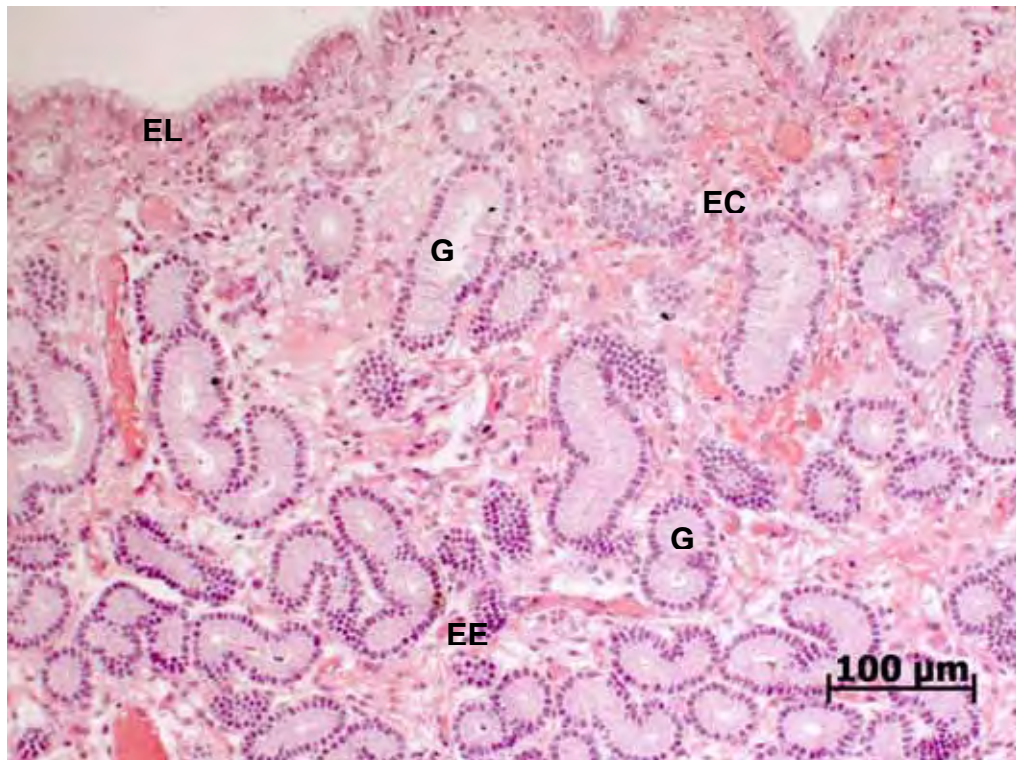


FIGURA 3. Amostra P223/01. Endométrio eqüino normal – epitélio luminal (EL), estrato compacto (EC), estrato esponjoso (EE) e glândulas endometriais (G) sem sinais de inflamação e/ou fibrose. Coloração de hematoxilina e eosina.

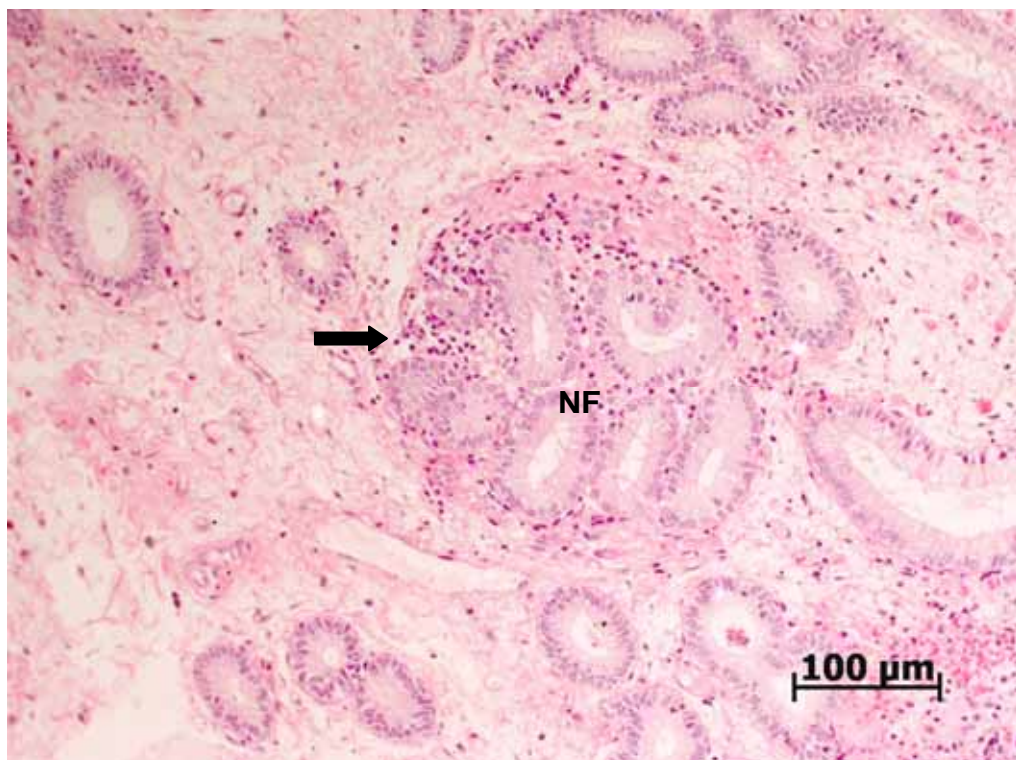


FIGURA 4. Amostra P96/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / categoria III. Infiltrado inflamatório mononuclear (seta) e presença de ninho fibrótico (NF) na região do estrato esponjoso. Coloração de HE.

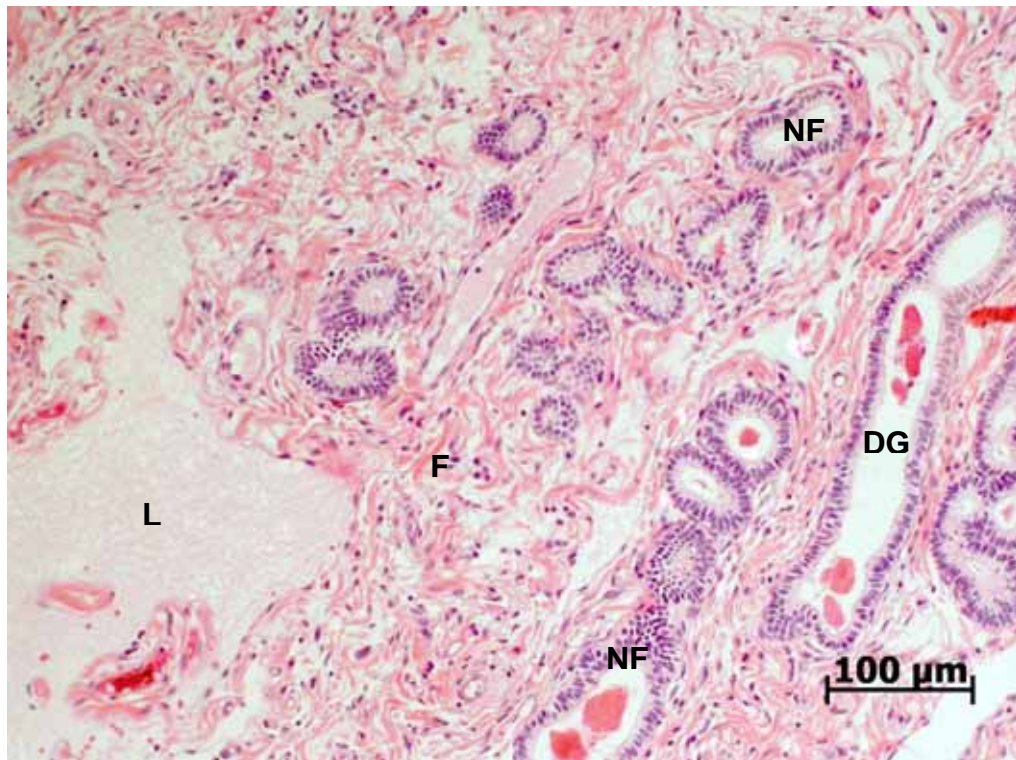


FIGURA 5. Amostra P100/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica degenerativa / categoria III. Fibrose intersticial difusa (F), presença de ninhos fibróticos (NF), dilatação glandular (DG) e lacunas linfáticas (L) na região do estrato esponjoso. Coloração de HE.

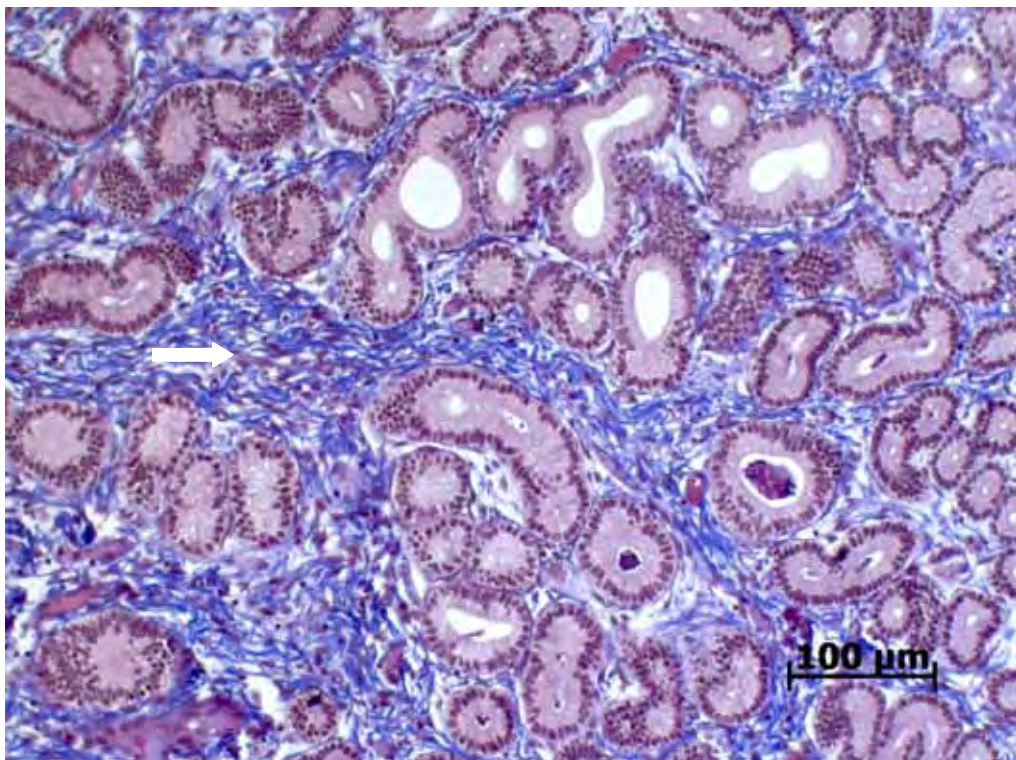


FIGURA 6. Amostra B15/92. Endométrio eqüino com endometrite crônica degenerativa / categoria III. Fibrose intersticial difusa na região do estrato esponjoso (seta). Coloração de tricrômico de Masson.

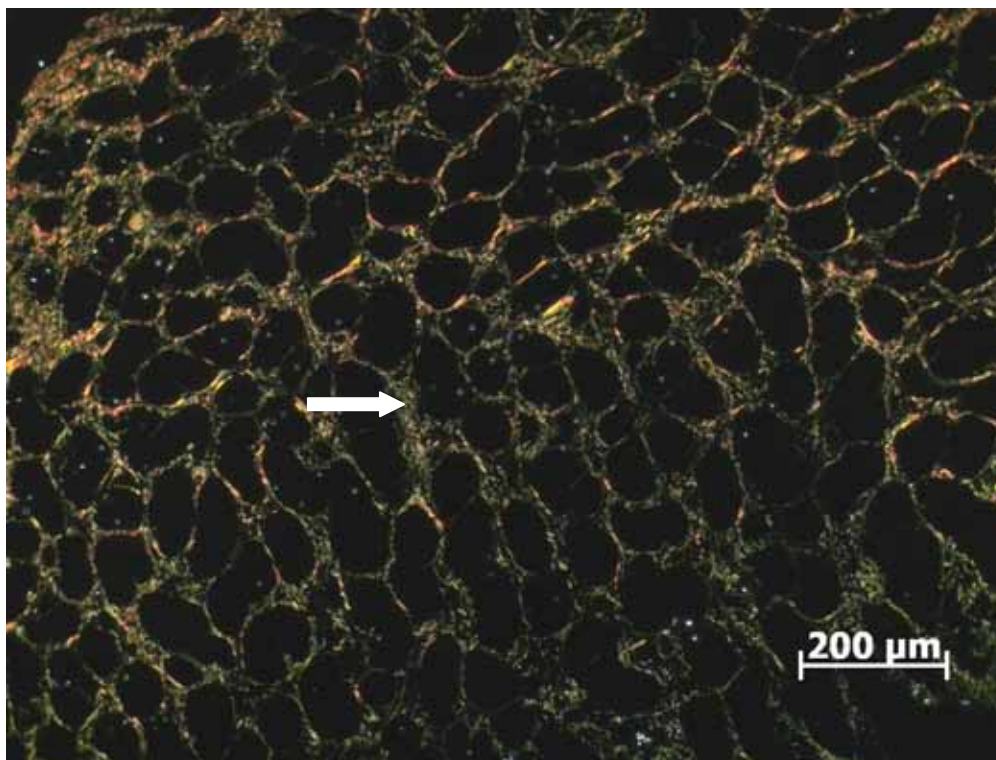


FIGURA 7. Amostra P207/01. Endométrio eqüino normal. Presença predominante de colágeno fibrilar (seta) - fibras esverdeadas – colágeno tipo III na região do estrato esponjoso. Coloração de picrosirius red sob polarização.

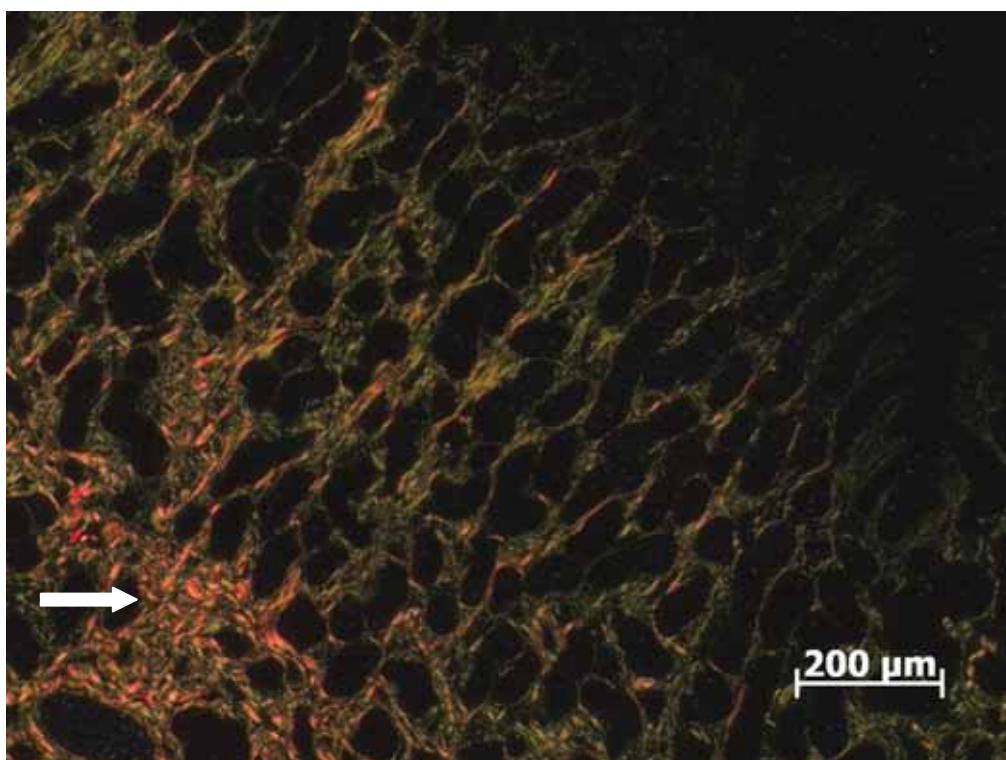


FIGURA 8. Amostra B27/92. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / IIB. Presença de colágeno fibrilar e áreas esparsas com colágeno denso (seta) - fibras avermelhadas – tipo I na região do estrato esponjoso. Coloração de picrosirius red sob polarização.

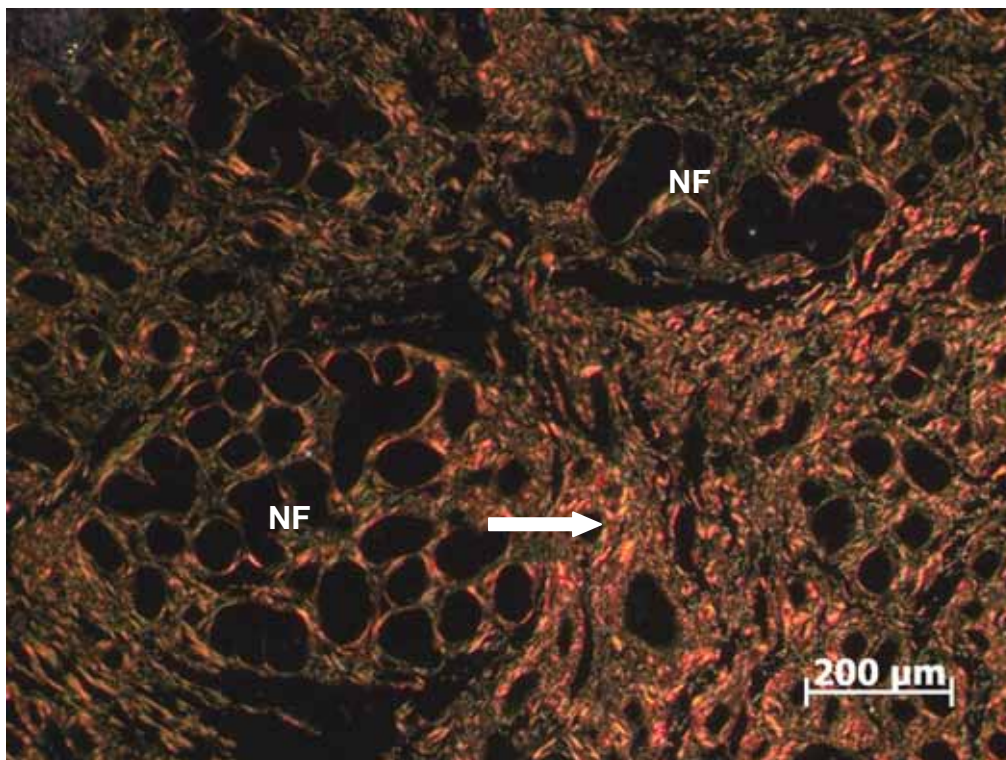


FIGURA 9. Amostra P81/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Presença predominante de colágeno denso - tipo I (seta) ao redor de ninho fibrótico (NF). Coloração de picosirius red sob polarização.

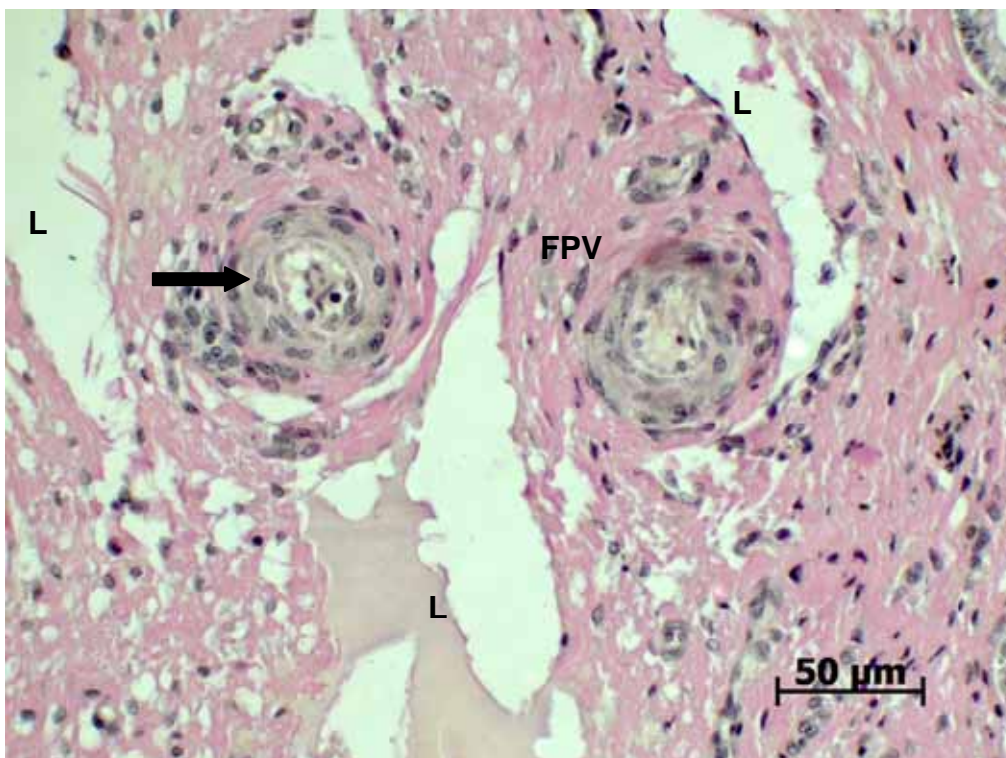


FIGURA 10. Amostra P203/02. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Espessamento da parede vascular (seta), fibrose perivascular acentuada (FPV) e presença de lacunas linfáticas (L) na região do estrato esponjoso. Coloração de Verhoeff Van Gieson.

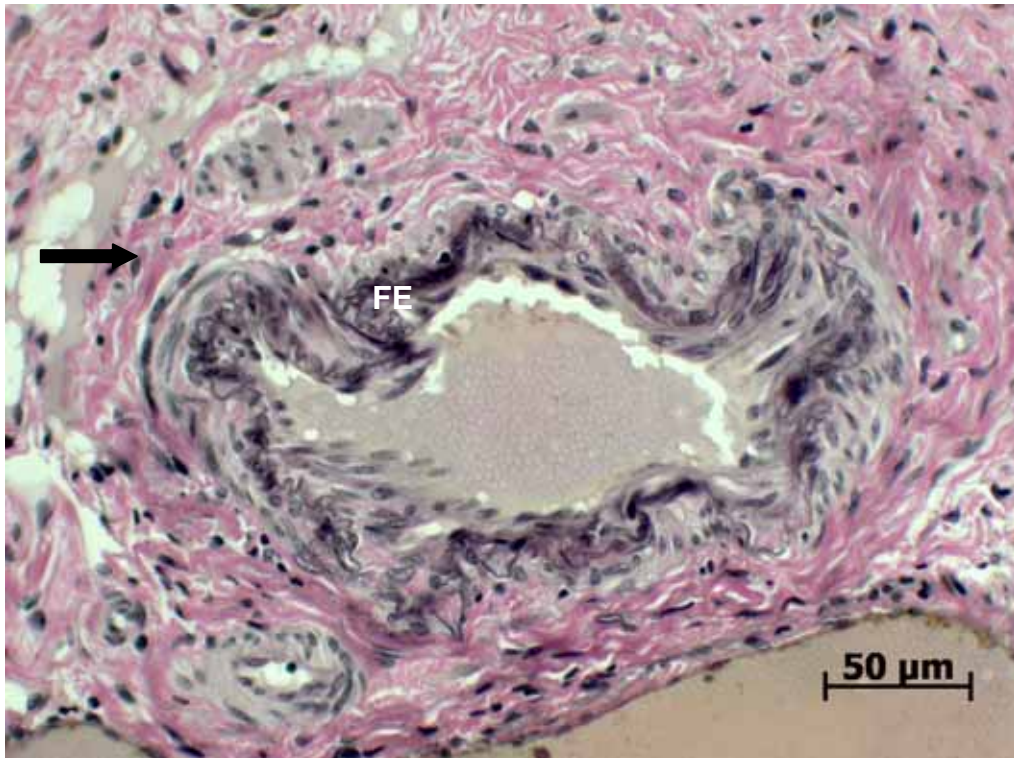


FIGURA 11. Amostra P203/02. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Fibrose privascular (seta) e fibroelastose (FE) tipo 3 na região do estrato esponjoso. Coloração de Verhoeff Van Gieson.

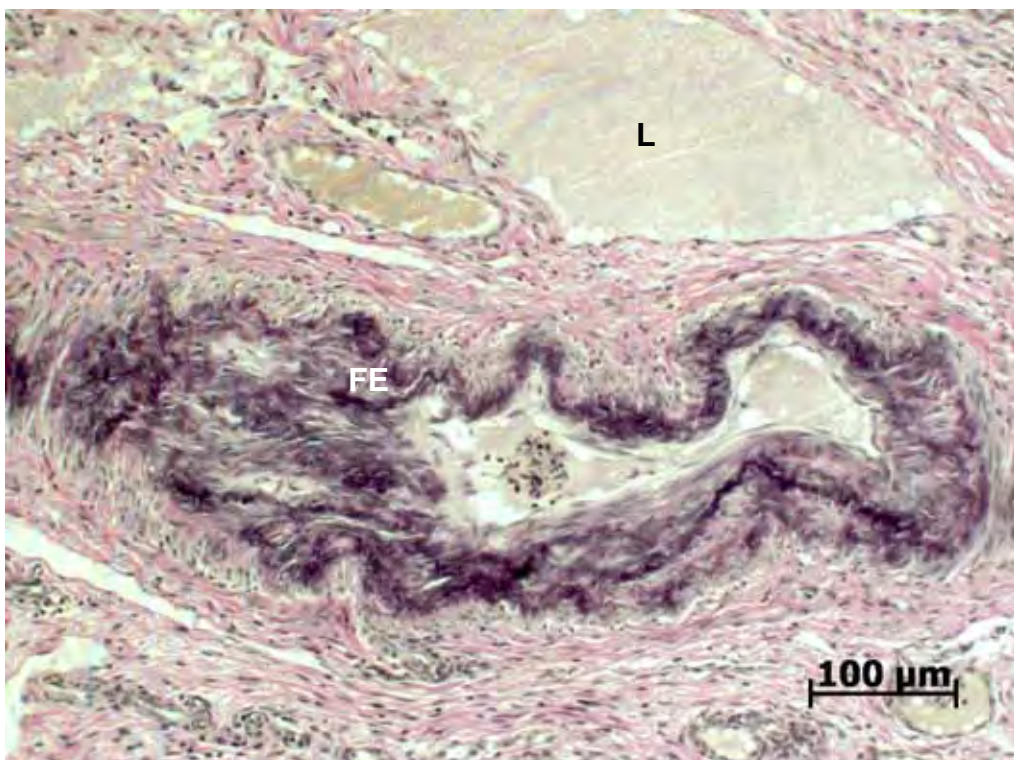


FIGURA 12. Amostra P98/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica categoria infiltrativa / III. Alteração vascular grave caracterizada por fibroelastose (FE) tipo 4, fibrose perivascular (seta) e lacunas linfáticas (L) na região do estrato esponjoso. Coloração de Verhoeff Van Gieson.

5.3 Análise morfométrica

A análise morfométrica da fibrose periglandular revelou que quanto maior é o grau de endometrite mais acentuada é a lesão fibrótica localizada em torno das glândulas endometriais. Os resultados deste estudo mostraram que as éguas com lesões endometriais mais graves, categoria IIB, categoria III, infiltrativa e endometrose, apresentaram significativamente os maiores percentuais de fibrose periglandular maiores quando comparadas com as éguas normais, conforme os dados da Tabelas 15 e 16.

O valor percentual médio para a fibrose periglandular foi de 0,92% nas éguas normais, 3,67% nas éguas com endometrite crônica categoria IIB, 5,02% nas éguas com endometrite crônica categoria III, 4,67% nas endometrites infiltrativas e 4,72% nas endometroses. Os maiores valores percentuais de fibrose periglandular foram observados nas endometrites crônicas categoria III e nas endometroses.

A morfometria da fibrose perivascular revelou dados semelhantes aos encontrados na avaliação da fibrose periglandular. Foi observado que quanto maior é o grau de endometrite mais graves também se tornam as alterações vasculares. Nas amostras classificadas como endometrite crônica categoria III o percentual de esclerose vascular foi significativamente maior que nas éguas normais. Porém não houve diferença significativa entre as éguas normais e com endometrites infiltrativas ou endometroses em relação às alterações vasculares. Estes dados estão apresentados nas Tabelas 17 e 18.

O percentual de fibrose perivascular médio observado nas amostras de éguas normais e com endometrites crônicas categoria IIB, categoria III, infiltrativas e endometroses foram 5,39%, 10,75%, 12,06%, 11,70%, 10,99% respectivamente. Os resultados observados demonstram que as alterações vasculares mais graves foram observadas nas endometrites crônicas categoria III e infiltrativas.

TABELA 15. Valores percentuais da fibrose periglandular nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Categoria de Endometrite	Percentual de fibrose periglandular
Categoria I	0,80a ¹
Categoria IIB	3,81b
Categoria III	4,35b

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

TABELA 16. Valores percentuais da fibrose periglandular nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).

Categoria de endometrite	Percentual de fibrose periglandular
Égua normal	0,80a ¹
Endometrite crônica infiltrativa	4,42b
Endometrose	3,83b

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

TABELA 17. Valores percentuais da fibrose perivascular nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Categoria de Endometrite	Percentual de fibrose perivascular
Categoria I	5,00a ¹
Categoria IIB	6,56ab
Categoria III	8,09b

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

TABELA 18. Valores percentuais da fibrose perivascular nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).

Categoria de endometrite	Percentual de fibrose perivascular
Égua normal	5,00a ¹
Endometrite crônica infiltrativa	7,85a
Endometrose	7,37a

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

5.4 Avaliação imunoistoquímica

5.4.1 Metaloproteinase 1 (MMP-1)

Na análise qualitativa da expressão da enzima MMP-1 foi verificada marcação fraca a moderada na maioria das amostras. A MMP-1 foi expressa por todos os tipos celulares e regiões do endométrio avaliadas. Em apenas duas amostras, sendo uma classificada como endometrite crônica categoria III e uma como endometrose, houve ausência da marcação de MMP-1.

Das 15 amostras classificadas como categoria I quatro casos revelaram escore de expressão 6, indicando que a MMP-1 foi observada em diferentes tipos celulares no endométrio normal. Nas amostras com endometrites crônicas foram observados os seguintes resultados: na categoria IIB a maioria das amostras apresentou escore 2 e 5 (cinco amostras em cada escore); na categoria III, onze casos revelaram escore 5 e 14 escore 6; na endometrite infiltrativa, 14 casos obtiveram escore 5 e na endometrose oito apresentaram o escore 6. Estes resultados revelaram que as éguas com endometrite crônica apresentaram os maiores escores (5 e 6), na maioria dos casos, indicando que a enzima é expressa por mais tipos celulares durante o processo crônico.

Embora os dados tenham revelado que nas endometrites a expressão das enzimas aumenta, a MMP-1 não apresentou diferença significativa, com relação à expressão, nas diferentes categorias de endometrite ao nível de 5% de probabilidade, conforme as Tabelas 19 e 20.

Com relação à distribuição da MMP-1 no endométrio equino, os dados revelaram que esta enzima foi expressa em todas as regiões analisadas, porém não houve diferença significativa na sua intensidade de marcação, independente do local observado, em cada categoria de endometrite.

Quando observada quanto à intensidade da marcação da MMP-1, em cada local do endométrio, observou-se que na categoria I, embora esta enzima fosse expressa por vários tipos celulares, a marcação era fraca ou moderada na maioria das amostras. A marcação intensa só foi observada em três amostras. Também foi observado que nas células dos epitélios luminal e glandular a marcação da MMP-1 foi ausente na maioria das amostras (nove casos). Nas endometrites crônicas a intensidade da marcação era moderada a

intensa e a maioria das células expressavam MMP-1. Estes resultados demonstraram que a intensidade da marcação de MMP-1 foi maior nas éguas com endometrites mostrando diferença significativa entre as categorias. Nas endometrites categoria III a MMP-1 foi observada com maior intensidade nas células do epitélio glandular em relação às éguas normais. Nas endometroses também foi observada diferença significativa na intensidade de marcação sendo a MMP-1 mais observada no epitélio glandular em relação às éguas normais. Os dados estão expostos na Tabela 21 e 22.

As Figuras 13 e 14 ilustram a expressão da MMP-1 no endométrio equino.

TABELA 19. Valores medianos da expressão de MMP-1 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Categoria de endometrite	Expressão de MMP-1
Categoria I	3,0a ¹
Categoria IIB	3,0a
Categoria III	5,0a

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

TABELA 20. Valores medianos da expressão de MMP-1 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).

Categoria de endometrite	Expressão de MMP-1
Normal	3,0a ¹
Endometrite crônica infiltrativa	4,0a
Endometrose	5,0a

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

TABELA 21. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-1 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Local no endométrio	Categoria I	Categoria IIB	Categoria III
Epitélio luminal	0aA ¹	1aA	1aA
Epitélio glandular	0aA	1aAB	2aB
Célula endotelial	1aA	2aA	1aA
Parede vascular	1aA	0,5aA	1aA
Célula inflamatória	2aA	2aA	2aA
Célula estromal	1aA	1aA	1aA

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

TABELA 22. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-1 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).

Local no endométrio	Normal	Endometrite Infiltrativa	Endometrose
Epitélio luminal	0aA ¹	1aA	1aA
Epitélio glandular	0aA	1aAB	2aB
Célula endotelial	1aA	1aA	2aA
Parede vascular	1aA	1aA	1aA
Célula inflamatória	2aA	2aA	2aA
Célula estromal	1aA	1aA	1aA

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

5.4.2 Metaloproteinase 2 (MMP-2)

Na análise da expressão da enzima MMP-2 foi verificada que a marcação variou de fraca a intensa. Com relação ao escore de expressão observou-se que independente da categoria de endometrite a maioria das amostras foi atribuído o escore 3, o que demonstra que somente alguns tipos celulares expressaram esta enzima. As células endoteliais e inflamatórias não revelaram marcação de MMP-2 em nenhuma das amostras analisadas.

A ausência de marcação para MMP-2 foi observada em uma amostra normal, sete amostras categoria III, quatro amostras de endometrite infiltrativa

e em três amostras de endometriose. Porém notou-se que não existem diferenças significativas entre a expressão desta enzima nas diferentes categorias de endometrite, conforme as Tabelas 23 e 24.

Considerando-se o local do endométrio no qual ocorria a marcação positiva para MMP-2, notou-se que havia diferença significativa entre as regiões observadas dentro da mesma categoria de endometrite. Estes dados mostraram que as éguas da categoria I apresentaram intensidade de marcação maior para MMP-2 na parede vascular e nas células estromais, sendo a diferença significativa em relação ao epitélio luminal, a células endoteliais e as células inflamatórias. Nas éguas das categorias IIB, III e infiltrativa a MMP-2 foi expressa com maior intensidade pelas células do epitélio glandular, parede vascular e células estromais em relação aos outros locais avaliados e nas endometrioses a expressão foi maior nas células estromais. Todos estes resultados mostraram diferença significativa.

Quando a expressão da enzima, por região do endométrio, foi comparada dentro de cada categoria de endometrite notou-se que a intensidade de expressão da MMP-2 nas células do epitélio glandular foi significativamente maior nas amostras classificadas como endometrite crônica categoria III em relação as éguas normais. As éguas das categorias IIB e III também expressaram MMP-2 com menor intensidade na parede vascular em relação às éguas normais havendo diferença significativa. Os dados estão dispostos na Tabela 25.

Nas endometrites crônicas infiltrativas e nas endometrioses observou-se intensidade significativamente menor de expressão da enzima MMP-2 na parede vascular em relação às éguas normais. Nas endometrites infiltrativas também houve expressão significativamente maior desta enzima nas células do epitélio glandular em relação às éguas normais e às portadoras de endometriose. Os dados estão dispostos na Tabela 26.

As Figuras 15 e 16 ilustram a expressão da MMP-2 no endométrio equino.

TABELA 23. Valores medianos da expressão de MMP-2 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Categoria de endometrite	Expressão de MMP-2
Categoria I	3,0a ¹
Categoria IIB	2,5a
Categoria III	3,0a

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

TABELA 24. Valores medianos da expressão de MMP-2 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).

Categoria de endometrite	Expressão de MMP-2
Normal	3,0a ¹
Endometrite crônica infiltrativa	3,0a
Endometrose	3,0a

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

TABELA 25. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-2 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Local no endométrio	Categoria I	Categoria IIB	Categoria III
Epitélio luminal	0aA ¹	0aA	0aA
Epitélio glandular	1abA	1bAB	2bB
Célula endotelial	0aA	0aA	0aA
Parede vascular	2bA	1bB	1bB
Célula inflamatória	0aA	0aA	0aA
Célula estromal	2bA	1,5bA	2bA

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

TABELA 26. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-2 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).

Local no endométrio	Normal	Endometrite Infiltrativa	Endometrose
Epitélio luminal	0aA ¹	0aA	0aA
Epitélio glandular	1abA	2bB	1abA
Célula endotelial	0aA	0aA	0aA
Parede vascular	2bA	1bB	1abB
Célula inflamatória	0aA	0aA	0aA
Célula estromal	2bA	2bA	2bA

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

5.4.3 Metaloproteinase 7 (MMP-7)

Na análise da expressão da enzima MMP-7 foi verificada que a marcação variou de fraca a moderada. A marcação intensa foi observada em apenas três amostras. Esta enzima foi expressa por vários tipos celulares, porém a marcação na parede vascular foi ausente em todas as amostras analisadas.

Com relação ao escore de expressão observou-se que independente da categoria de endometrite a maioria das amostras apresentou escore 1, sendo nove amostras da categoria I, sete da categoria IIB, 26 da categoria III, 21 do tipo infiltrativa e 12 de endometrose.

A ausência de marcação para MMP-7 foi observada em apenas duas amostras, sendo uma da categoria III e uma endometrite infiltrativa. Os resultados referentes à MMP-7 revelaram que não existem diferenças significativas entre a expressão desta enzima nos diferentes tipos de processo, independentemente da classificação histológica, conforme demonstram as Tabelas 27 e 28.

No que diz respeito a intensidade de marcação para MMP-7 observou-se que, independente da classificação utilizada, as células que expressaram escores de intensidade significativamente maiores para esta enzima foram as células inflamatórias em relação aos outros elementos avaliados. Não houve diferença entre a intensidade da expressão nos diferentes locais do endométrio

entre as categorias de endometrite. Estes resultados estão apresentados nas Tabelas 29 e 30.

As Figuras 17 e 18 ilustram a expressão da MMP-7 no endométrio eqüino.

TABELA 27. Valores medianos da expressão de MMP-7 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Categoria de endometrite	Expressão de MMP-7
Categoria I	1,0a ¹
Categoria IIB	2,0a
Categoria III	1,0a

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

TABELA 28. Valores medianos da expressão de MMP-7 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).

Categoria de endometrite	EXPRESSÃO DE MMP-7
Normal	1,0a ¹
Endometrite crônica infiltrativa	2,0a
Endometrose	1,0a

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

TABELA 29. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-7 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Local no endométrio	Categoria I	Categoria IIB	Categoria III
Epitélio luminal	0aA ¹	0aA	0aA
Epitélio glandular	0aA	0aA	0aA
Célula endotelial	0aA	0aA	0aA
Parede vascular	0aA	0aA	0aA
Célula inflamatória	1bA	2bA	1bA
Célula estromal	0aA	0aA	0aA

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

TABELA 30. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-7 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).

Local no endométrio	Normal	Endometrite Infiltrativa	Endometrose
Epitélio luminal	0aA ¹	0aA	0aA
Epitélio glandular	0aA	0aA	0aA
Célula endotelial	0aA	0aA	0aA
Parede vascular	0aA	0aA	0aA
Célula inflamatória	1bA	1bA	1bA
Célula estromal	0aA	0aA	0aA

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

5.4.4 Metaloproteinase 9 (MMP-9)

Na análise da expressão da enzima MMP-9 foi verificada marcação difusa e intensa na maioria das amostras. A ausência de marcação não foi observada em nenhum caso analisado.

A enzima MMP-9 foi expressa em todos os locais avaliados neste estudo e observou-se escore 6 de expressão para a maioria das amostras, sendo nove da categoria I, oito da categoria IIB, 28 da categoria III, 29 do tipo infiltrativa e 7 com endometrose. Não foram observadas diferenças significativas entre a expressão desta enzima nas diferentes categorias de endometrite, conforme as Tabelas 31 e 32.

Quando comparada a intensidade da marcação nos diferentes locais do endométrio dentro de cada categoria notou-se que as éguas com endometrite categoria III apresentaram expressão significativamente menor no epitélio glandular e na parede vascular. Por outro lado, as éguas com endometrite infiltrativa expressaram a MMP-9 com intensidade significativamente menor na parede vascular em relação a intensidade de marcação apresentada pelo epitélio luminal, célula endotelial, célula inflamatória e célula estromal, mas não em relação ao epitélio glandular desta mesma categoria. Os dados estão dispostos na Tabelas 33 e 34.

As Figuras 19 e 20 ilustram a expressão da MMP-9 no endométrio equino.

TABELA 31. Valores medianos da expressão de MMP-9 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Categoria de endometrite	Expressão de MMP-9
Categoria I	6,0a ¹
Categoria IIB	5,0a
Categoria III	6,0a

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

TABELA 32. Valores medianos da expressão de MMP-9 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).

Categoria de endometrite	Expressão de MMP-9
Normal	6,0a ¹
Endometrite crônica infiltrativa	6,0a
Endometrose	5,0a

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

TABELA 33. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-9 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Local no endométrio	Categoria I	Categoria IIB	Categoria III
Epitélio luminal	3aA ¹	3aA	3aA
Epitélio glandular	2aA	2aA	2bA
Célula endotelial	3aA	3aA	3aA
Parede vascular	2aA	1aA	2bA
Célula inflamatória	3aA	3aA	3aA
Célula estromal	3aA	2aA	3aA

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

TABELA 34. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-9 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).

Local no endométrio	Normal	Endometrite Infiltrativa	Endometrose
Epitélio luminal	3aA ¹	3aA	3aA
Epitélio glandular	2aA	2abA	2aA
Célula endotelial	3aA	3aA	3aA
Parede vascular	2aA	1,5bA	2aA
Célula inflamatória	3aA	3aA	2aA
Célula estromal	3aA	3aA	3aA

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

5.4.5 Inibidor tecidual de metaloproteinases 1 (TIMP-1)

Na análise da expressão do inibidor tecidual de metaloproteinases 1 (TIMP-1) verificou-se marcação moderada a intensa e de padrão difuso na maioria das amostras. A ausência da marcação deste inibidor não foi observada em nenhuma das amostras estudadas.

Com relação ao escore de expressão observou-se que independente da categoria de endometrite a maioria das amostras apresentou escore 6, revelando que em todas as regiões avaliadas do endométrio o TIMP-1 foi observado. O TIMP foi observado com escore 6 em seis casos de endometrite crônica categoria I, seis casos de endometrite crônica categoria IIB, 22 de endometrite crônica categoria III, 21 do tipo endometrite infiltrativa e em sete casos de endometrose. Não foram observadas diferenças significativas entre a expressão deste inibidor nas diferentes categorias de endometrite, conforme as Tabelas 35 e 36.

Quando foi avaliada a intensidade da marcação do TIMP-1 nas amostras de endométrio observou-se que na maioria destas a marcação era acentuada, independentemente da classificação utilizada. Nas éguas categoria I observou-se que a intensidade de marcação foi maior nas células estromais e endoteliais em relação aos demais locais avaliados, mostrando diferença significativa. Nas éguas com endometrite categoria IIB a intensidade de marcação foi significativamente maior nas células do epitélio luminal, células estromais e

células endoteliais em relação à parede vascular. Nas éguas categoria III a intensidade de marcação foi significativamente maior nas células do epitélio luminal, células estromais, células inflamatórias e células endoteliais em relação à parede vascular e o epitélio glandular. As éguas com endometrite infiltrativa revelaram intensidade de marcação mais intensa nas células do epitélio luminal, células estromais, células inflamatórias e células endoteliais em relação à parede vascular e o epitélio glandular. Nas éguas com endometrose a intensidade de marcação foi significativamente maior nas células do epitélio luminal, células estromais e células endoteliais em relação à parede vascular.

Quando a expressão da enzima, por região do endométrio, foi comparada entre as categorias de endometrite não foi observada diferença significativa na intensidade de marcação entre éguas normais e portadoras de endometrites crônicas, independentemente da classificação utilizada. Os dados referentes a estas análises estão dispostos nas Tabelas 37 e 38.

As Figuras 21 e 22 ilustram a expressão do TIMP-1 no endométrio equino.

TABELA 35. Valores medianos da expressão de TIMP-1 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Categoria de endometrite	Expressão de TIMP-1
Categoria I	4,0a ¹
Categoria IIB	5,0a
Categoria III	5,0a

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

TABELA 36. Valores medianos da expressão de TIMP-1 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).

Categoria de endometrite	Expressão de TIMP-1
Normal	4,0a ¹
Endometrite crônica infiltrativa	5,0a
Endometrose	5,0a

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

TABELA 37. Valores medianos da intensidade da marcação de TIMP-1 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Local no endométrio	Categoria I	Categoria IIB	Categoria III
Epitélio luminal	2aA ¹	3bA	3bA
Epitélio glandular	2aA	2abA	2aA
Célula endotelial	3bA	3bA	3bA
Parede vascular	1aA	0,5aA	1aA
Célula inflamatória	2aA	2abA	3bA
Célula estromal	3bA	3bA	3bA

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

TABELA 38. Valores medianos da intensidade da marcação de TIMP-1 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Ricketts e Alonso (1991).

Local no endométrio	Normal	Endometrite Infiltrativa	Endometrose
Epitélio luminal	2aA	3bA	3bA
Epitélio glandular	2aA	2aA	2abA
Célula endotelial	3bA	3bA	3bA
Parede vascular	1aA	1aA	0aA
Célula inflamatória	2aA	3bA	2abA
Célula estromal	3bA	3bA	3bA

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

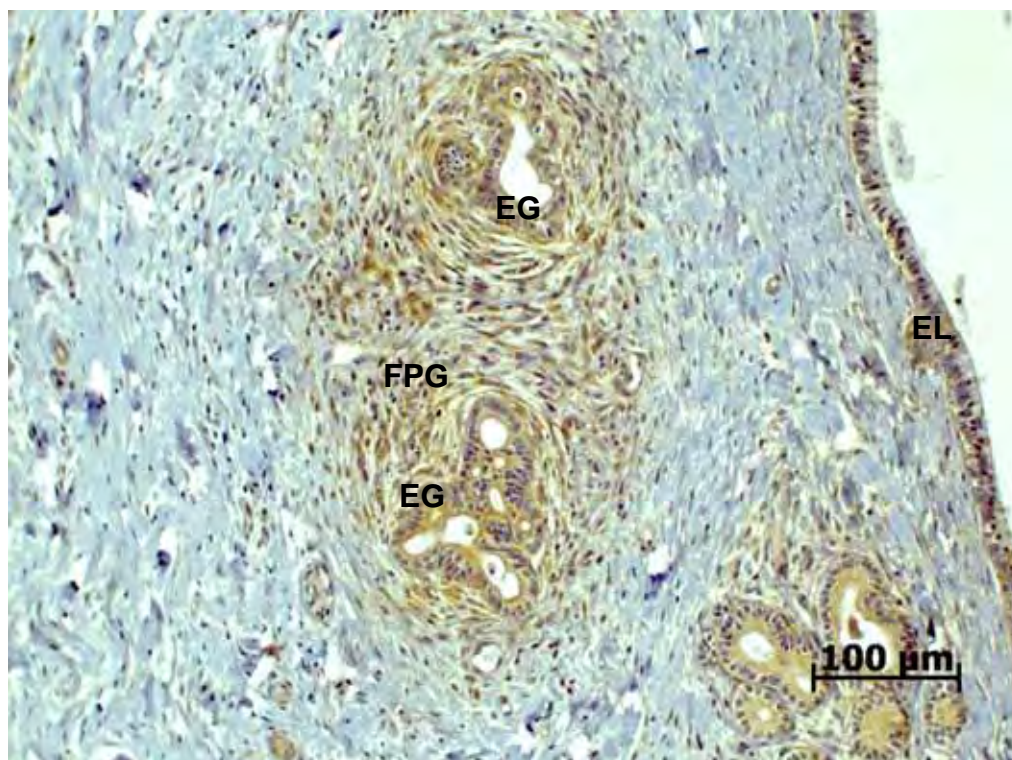


FIGURA 13. Amostra P90/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica categoria degenerativa / III. Marcação positiva de MMP-1 (1:100) nas células do epitélio glandular (EG), na fibrose periglandular (FPG) na região do estrato compacto e nas células do epitélio luminal (EL).

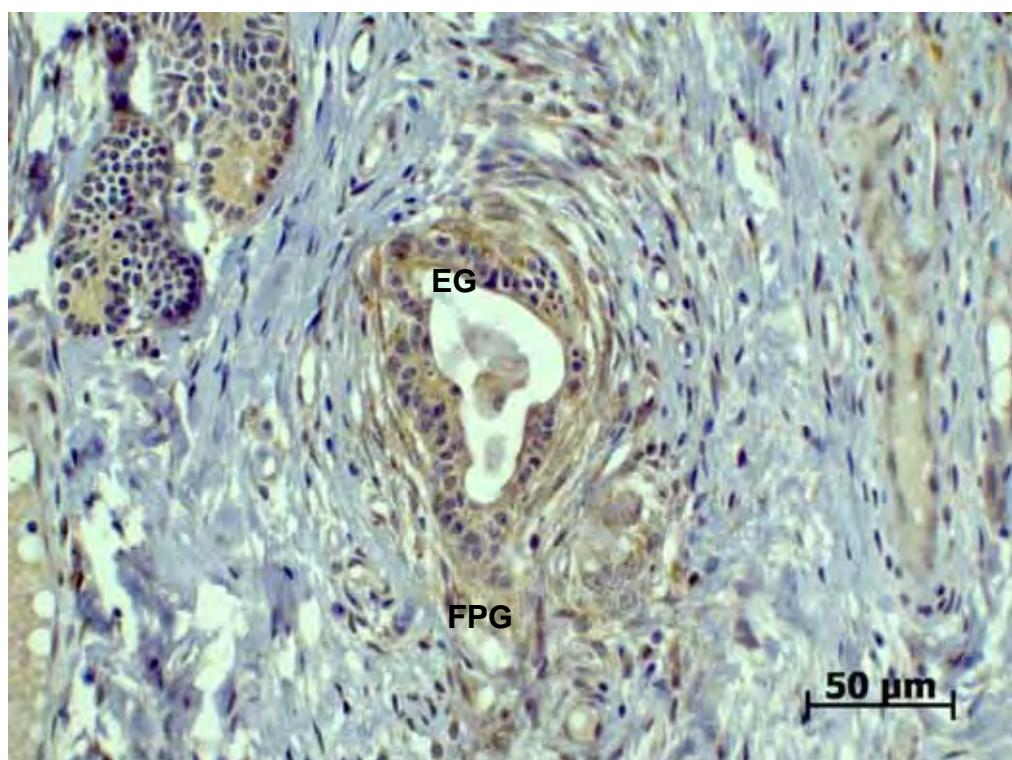


FIGURA 14. Amostra P90/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica degenerativa / III. Marcação positiva de MMP-1 (1:100) nas células do epitélio glandular e na fibrose periglandular na região do estrato compacto.

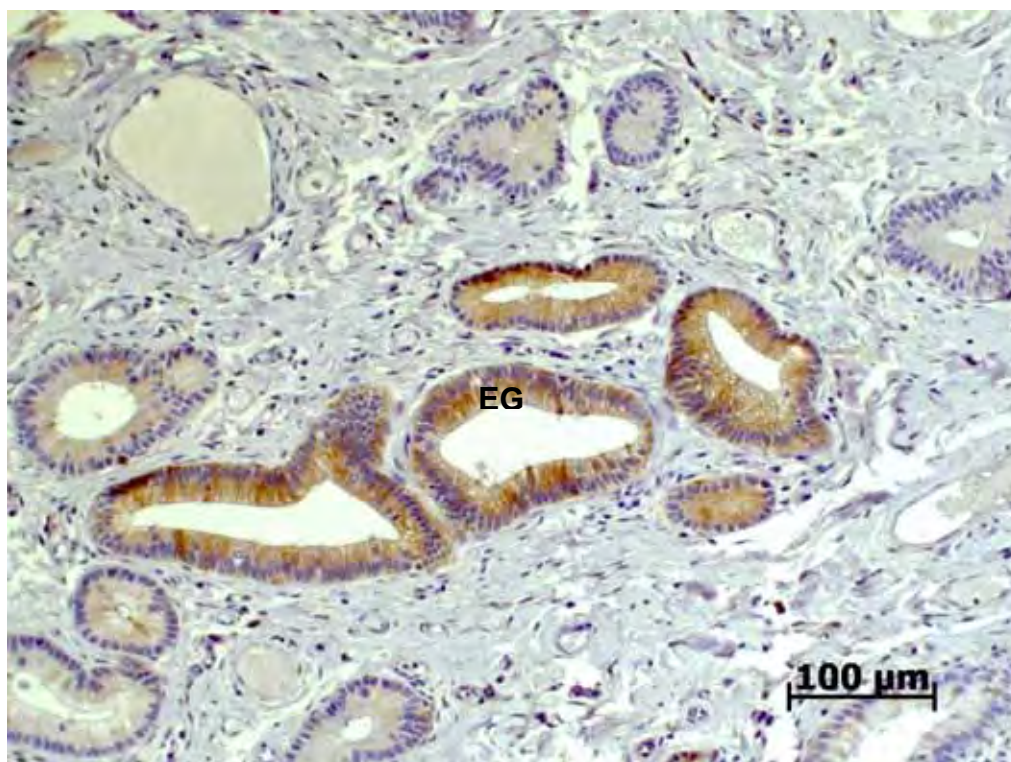


FIGURA 15. Amostra P92/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / IIB. Marcação positiva de MMP-2 (1:200) nas células do epitélio glandular (EG) no estrato esponjoso.

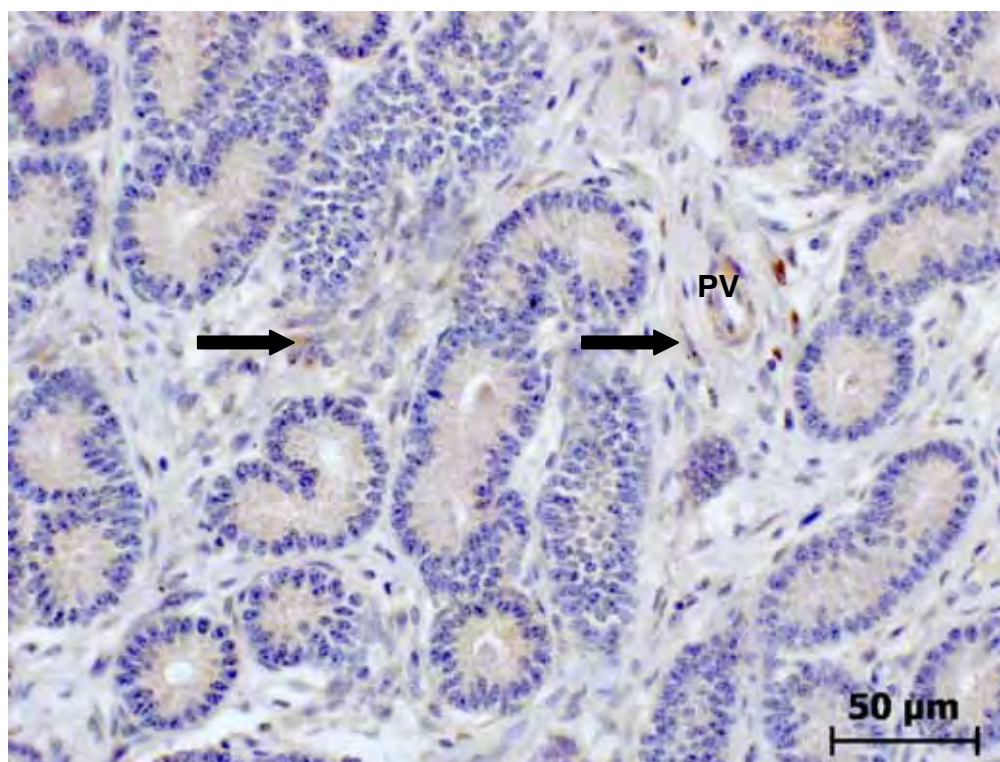


FIGURA 16. Amostra P99/04. Endométrio eqüino com endometrite infiltrativa / IIB. Marcação positiva de MMP-2 (1:200) na parede vascular (PV) e células estromais (setas) no estrato esponjoso.

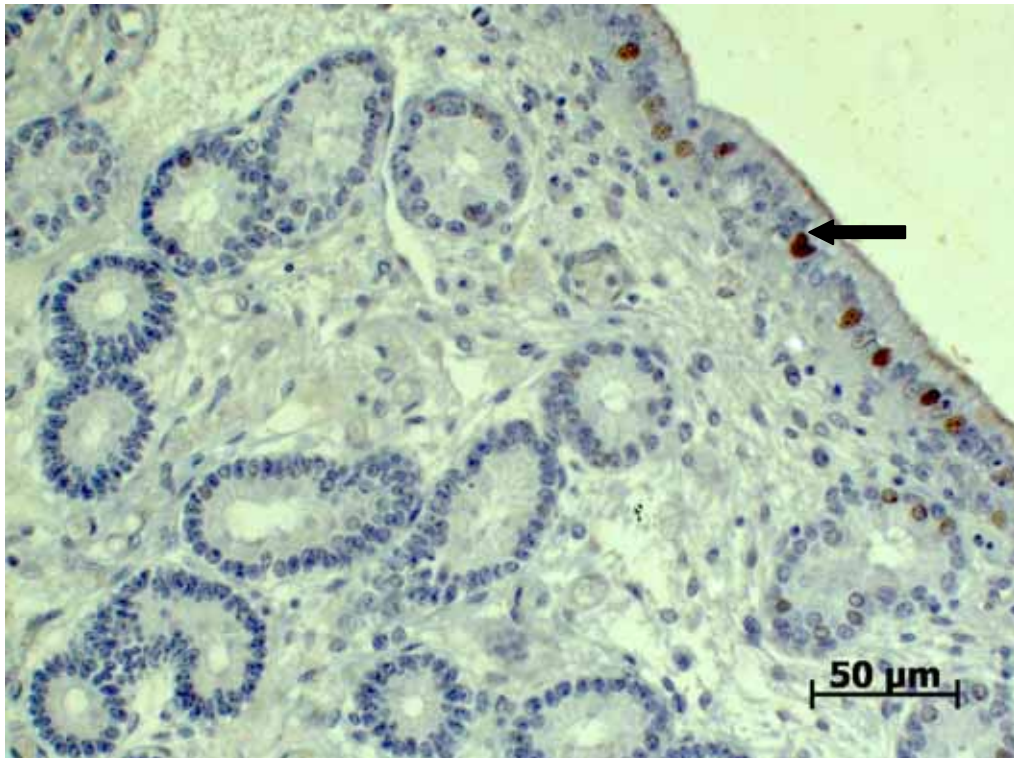


FIGURA 17. Amostra P208/01. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / IIB. Marcação positiva de MMP-7 (1:100) nas células inflamatórias intra-epiteliais luminiais (seta) (Barra = 50 μ m).

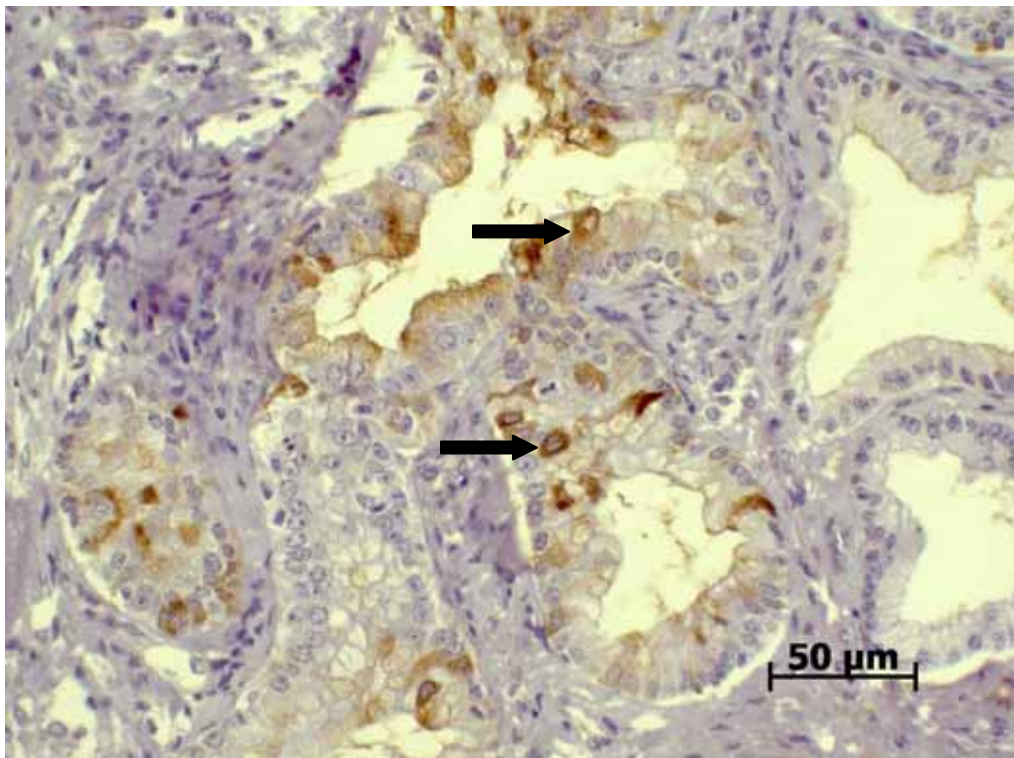


FIGURA 18. Amostra P202/02. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Marcação positiva de MMP-7 (1:100) em células inflamatórias intra-epiteliais glandulares (setas) na região do estrato esponjoso (Barra = 50 μ m).

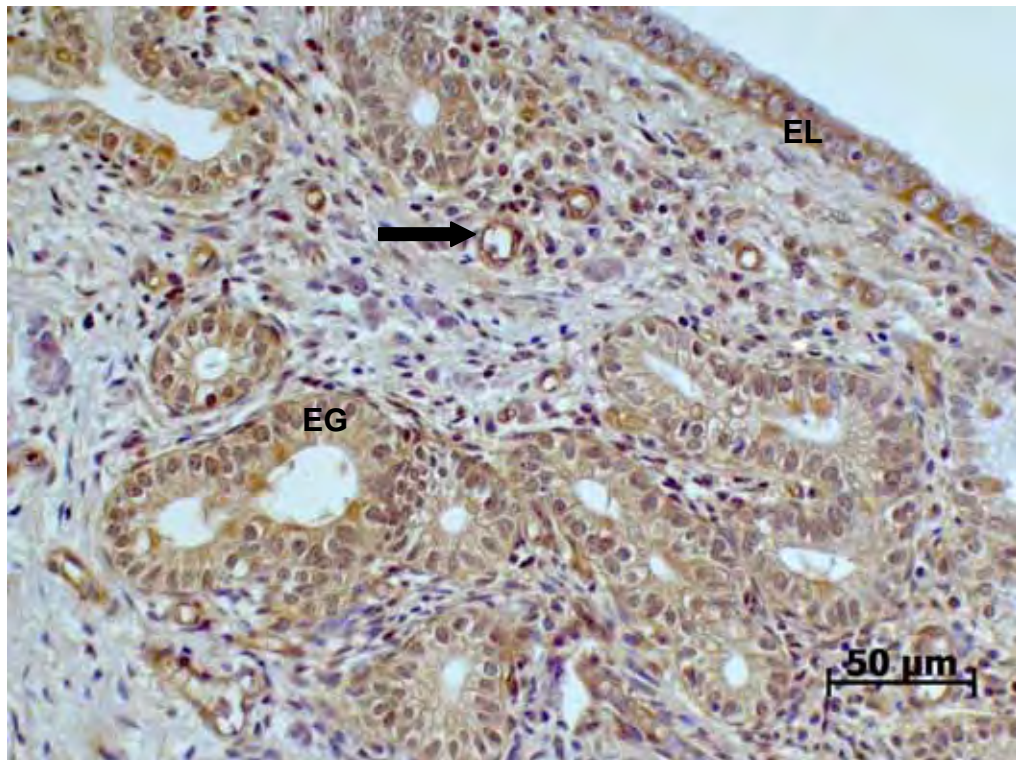


FIGURA 19. Amostra P91/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Marcação positiva de MMP-9 (1:100) nas células do epitélio luminal (EL), epitélioglandular (EG) e nas células endoteliais (seta) na região do estrato compacto.

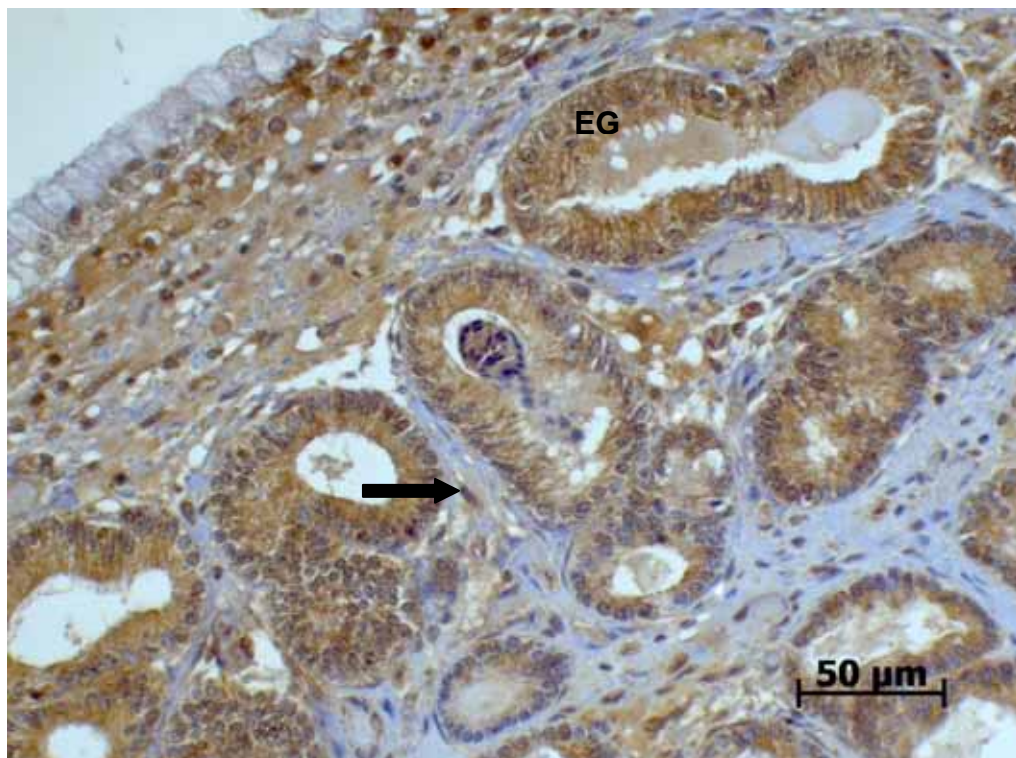


FIGURA 20. Amostra P201/02. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Intensa marcação positiva de MMP-9 (1:100) nas células do epitélio glandular (EG) e estromais (seta) na região do estrato compacto.

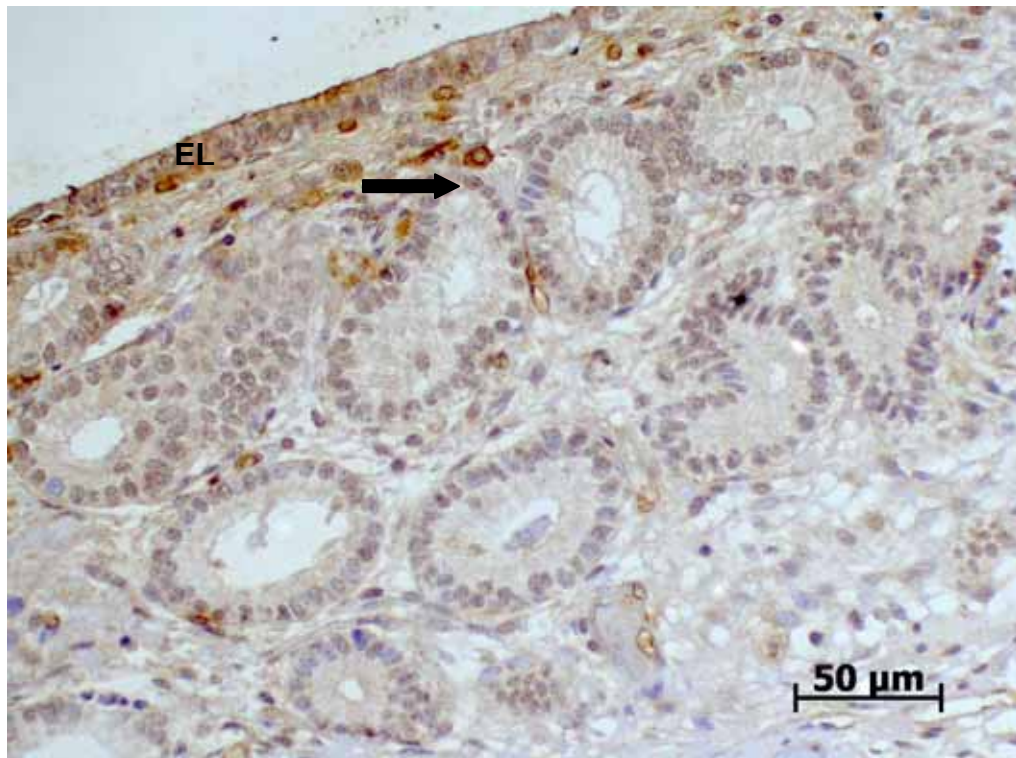


FIGURA 21. Amostra P03/05. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Intensa marcação positiva de TIMP-1 (1:100) nas células do epitélio luminal (EL) e nas células inflamatórias na região do estrato compacto (seta).

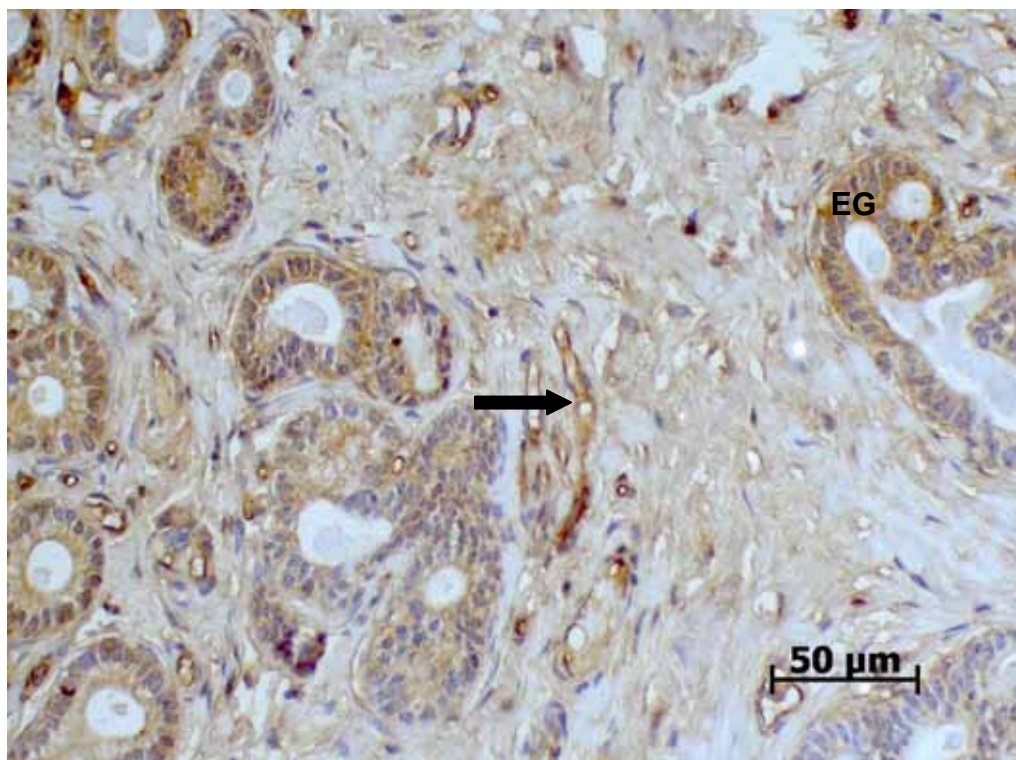


FIGURA 22. Amostra P82/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Intensa marcação positiva de TIMP-1 (1:100) nas células do epitélio glandular (EG) e na parede vascular (seta) na região do estrato esponjoso.

6 DISCUSSÃO

As alterações fibróticas e inflamatórias foram as lesões de maior relevância nas biópsias endometriais eqüinas. Ricketts (1975) foi o primeiro autor a avaliar amostras de endométrio eqüino. Kenney e Doig (1986) e Ricketts e Alonso (1991) classificaram as amostras de biópsias uterinas de acordo com o grau de fibrose periglandular e inflamação. Segundo Evans, Miller e Ganjam (1998) vários esquemas de classificação, incluindo o sistema modificado de Kenney e Doig (1986), têm auxiliado no prognóstico dos problemas reprodutivos na espécie eqüina. Estes mesmos autores afirmaram que embora estas classificações descrevam a localização, a freqüência e a severidade da fibrose periglandular as avaliações são semi-quantitativas e que a fibrose periglandular necessita de avaliação mais detalhada do tamanho dos focos fibróticos, número de células envolvidas no foco fibrótico e percentual de glândulas endometriais individuais circundadas por duas ou mais camadas de fibroblastos. No sistema de Kenney e Doig (1986) o conjunto destas alterações poderia ser classificado, em uma mesma amostra, como categoria IIA, IIB ou III, dependendo da severidade da fibrose.

Nossos resultados mostraram que a intensidade do infiltrado inflamatório e o grau das alterações fibróticas foram os achados mais importantes. Deve-se destacar, no entanto, seguindo-se a classificação proposta por Kenney e Doig (1986), que as lesões fibróticas por si só, quando muito acentuadas, são suficientes para que a lesão uterina seja classificada como pertencente a categoria III, mesmo que sejam acompanhadas de infiltrado inflamatório discreto. Ainda segundo os nossos resultados, quando aplicada a classificação de Ricketts e Alonso (1991) as amostras de endometrite infiltrativa englobavam amostras que, pelo método de Kenney e Doig (1986) foram consideradas como pertencentes a categoria IIB ou categoria III, mostrando o caráter predominantemente inflamatório da maioria das amostras (60,98%). As alterações degenerativas foram observadas com baixa freqüência (20,73%). No entanto, muitas das éguas utilizadas no presente estudo, classificadas como portadoras de endometrite crônica categoria III, mostraram lesões compatíveis com àquelas observadas nos casos de endometrose.

A avaliação histoquímica de biópsias endometriais representam um método bastante eficaz para o estabelecimento de diagnósticos mais precisos. Segundo Blanchard et al (1987) os métodos de colorações tricrômicos auxiliam nesta avaliação.

No presente trabalho, a utilização do tricrômico de Masson permitiu a identificação dos focos de fibrose endometrial, facilitando a análise de sua distribuição e a avaliação da intensidade dessa alteração nas diferentes categorias de lesão crônica do endométrio. Estas alterações, no entanto podem ser observadas em colorações de rotina como a hematoxilina e eosina. A vantagem da utilização deste método reside na observação minuciosa da fibrose estromal difusa, presente na maioria dos casos de endometrose e endometrites crônicas categorias IIB e III. Blanchard et al. (1987) já haviam realizado estudo utilizando o tricrômico de Masson na avaliação da fibrose endometrial eqüina e concluíram também que não houve diferença entre a utilização do método tricrômico em relação ao método de HE para a detecção da incidência e severidade da fibrose periglandular focal. No entanto observaram que este método foi bastante útil para a detecção da frequência, severidade e distribuição do tecido conjuntivo estromal.

Neste estudo observou-se que a fibrose endometrial se localiza preferencialmente em torno das glândulas, dos vasos sangüíneos e difusa no estrato esponjoso conforme descrito por Kenney (1978). Estes dados também foram notados por Leischman, Miller e Doig (1982) que observaram que o aumento do número de camadas de tecido conjuntivo em volta das glândulas endometriais correlaciona-se significativamente com baixa fertilidade: éguas com uma média menor do que três camadas de fibrose periglandular têm 75% de probabilidade de levar uma gestação a termo, enquanto que éguas com uma média maior do que 3,5 camadas apresentam um prognóstico pior (25%) para fertilidade.

Assim também, a avaliação da esclerose vascular utilizando-se o método de tricrômico de Masson revelou resultados bastante satisfatórios, pois permitiu a detecção do colágeno depositado em torno dos vasos, mesmo aqueles mais discretos. As classificações de Kenney e Doig (1986) e Ricketts e Alonso (1991) não contemplam as alterações vasculares entre os critérios de avaliação da endometrite. No entanto, deve-se considerar que a angiose pode reduzir

indiretamente a fertilidade pela redução da perfusão endometrial, pelos distúrbios de drenagem uterina causados pela redução da função das veias e que as alterações patológicas no útero produzidas pela esclerose vascular podem contribuir para endometriose (INOUE et al., 2000; LEBLANC, 2003).

O método de picosirius red, também utilizado neste estudo, revelou resultados bastante vantajosos em relação ao tricrômico de Masson. Estes dados são semelhantes aos descritos por Caldini (1992) que relatou que embora as fibras colágenas apareçam geralmente bem coradas pelo método de Masson, outras estruturas que contêm colágeno (como as fibras reticulares e as membranas basais) não são coradas seletivamente pelos métodos tricrômicos e, por isto, os vários tipos de colágeno não podem ser distinguidos. De acordo com Luna (1968) é fato conhecido que o tricrômico de Masson não é especialmente útil para o estudo das fibras que contêm colágeno. Mesmo assim, Caldini (1992) afirma que existe um efeito significativo desta coloração sobre o diagnóstico da presença e da severidade do processo fibrótico nos endométrios eqüinos.

Através da simples coloração com o picosirius red é possível a detecção de fibras que contêm colágeno no estroma dos endométrios eqüinos, conferindo a estas fibras um tom vermelho profundo. A associação deste método à polarização de luz promove um aumento da sensibilidade e resolução das imagens, permitindo a distinção entre os tipos de colágeno, fibrilar e denso, destacados pela refringência das fibras, em decorrência do efeito de campo escuro obtido na polarização (CALDINI, 1992).

Vários trabalhos têm sido realizados utilizando-se o método de picosirius red. Este método é empregado não só para evidenciar a presença do colágeno nos órgãos e estruturas normais (JUNQUEIRA et al, 1980), mas também para a separação dos seus tipos em lesões fibróticas (ANDRADE et al., 1999). Assim sendo, o uso rotineiro do método de picosirius red sob polarização poderia ser de grande valor na avaliação do tipo de colágeno presente na fibrose periglandular endometrial eqüina.

A avaliação da distribuição do colágeno nas diversas categorias de endometrites crônicas revelou que quanto mais grave o grau da endometrite mais acentuado era o acúmulo de colágeno. Nas éguas com endometrites

crônicas verificou-se maior distribuição periglandular, perivascular e no estrato esponjoso. Nunes (2003) encontrou resultados semelhantes ao estudar o padrão de distribuição e tipos de colágeno nas endometrites crônicas. Esta autora observou que havia maior concentração de colágeno nas regiões periglandular e perivascular e no estrato esponjoso. Ao correlacionar a gravidade da endometrite com a distribuição do colágeno, concluiu que quanto mais grave o grau, mais acentuado o acúmulo de colágeno ao redor das glândulas. Assim sendo, a estrutura glandular afetada tem sua função comprometida e as conseqüências deste comprometimento são o prejuízo no desenvolvimento microcotiledonário, a redução da taxa de crescimento fetal e a alteração das secreções endometriais, que, em última análise, vão influenciar negativamente a performance reprodutiva da égua (KENNEY e DOIG, 1986; EVANS; MILLER e GANJAM, 1998).

Nas lesões fibróticas de qualquer natureza são importantes não só a determinação do grau de intensidade e a distribuição, mas também os tipos de colágeno que as compõe. A utilização do método de picrosirius red associado à microscopia de polarização é extremamente útil nesta avaliação. Andrade et al. (1999), avaliaram as alterações fibróticas em granulomas hepáticos e constataram que o método de picrosirius red pode auxiliar o estudo da cronologia destas lesões. Estes autores observaram que, à medida que os granulomas se organizavam, havia o aumento progressivo da espessura das fibras de colágeno e, portanto, a substituição das fibras mais delgadas do colágeno do tipo III pelas fibras mais densas e compactas do colágeno do tipo I.

Os resultados obtidos neste experimento revelam que o colágeno tipo III foi o mais freqüentemente observado nas amostras de éguas normais enquanto que nas éguas portadoras de endometrites crônicas o colágeno predominante foi o tipo I. Estes dados estão de acordo com Caldini (1992) que afirmou que a base molecular da fibrose endometrial eqüina reside na substituição do colágeno tipo III, presente na maior parte da lâmina própria de endométrio, por colágeno do tipo I, demonstrando que o colágeno está envolvido nas bases moleculares deste processo patológico. Nunes (2003)

verificou que o colágeno do tipo I foi mais freqüente nas lesões fibróticas periglandulares nas biópsias incluídas nas categorias IIB e III.

Os dados obtidos por meio da análise morfométrica demonstraram que as lesões fibróticas localizam-se preferencialmente ao redor das estruturas glandulares e vasculares.

A análise morfométrica da fibrose periglandular revelou que quanto maior é o grau de endometrite mais acentuada é a lesão fibrótica localizada em torno das glândulas endometriais. Os resultados deste estudo mostraram que as éguas com lesões endometriais mais graves, ou seja categoria IIB, categoria III, endometrites infiltrativa e endometrose, apresentaram percentuais de fibrose periglandular significativamente maiores do que as éguas normais. O valor percentual médio para a fibrose periglandular foi de 0,92% nas éguas normais, 3,67% nas éguas com endometrite crônica categoria IIB, 5,02% nas éguas com endometrite categoria III, 4,67% nas endometrites infiltrativas e 4,72% nas endometroses. Estes dados concordam com os descritos por Evans, Miller e Ganjam (1998) que encontraram fibrose ausente ou mínima nos endométrios classificados como categoria I e que relataram que a fração do volume do colágeno periglandular endometrial tem correlação positiva com a categoria da endometrite crônica, encontrando como valores médios de percentual de fibrose 0,05% nas éguas categoria I e 13,47% nas éguas categoria III. Isto se deve a presença de grandes ninhos fibróticos e a fibrose em torno de ramos glandulares individuais, que são mais freqüentes e mais graves nas endometrites crônicas categoria III. Estes autores encontraram diferença significativa entre cada uma das categorias.

A técnica de VVG permitiu avaliar a quantidade de fibras elásticas presentes na vasculatura endometrial e correlacioná-las com a quantidade de fibrose existente, caracterizando assim, os processos de esclerose vascular no endométrio eqüino. Observou-se, no entanto, que poucas fibras elásticas eram marcadas pelo corante. Segundo Caldini (1992), apenas as fibras elásticas maduras são coradas pela Hematoxilina Férrica de Verhoeff. Isto pode ser explicado pelo fato de que nem toda a elastina detectável bioquimicamente é Verhoeff-positiva e, assim, apenas as fibras maduras (que contém grande quantidade de elastina) são coradas por esta técnica. Um outro fator observado

é a instabilidade deste corante, sendo necessária a sua utilização a fresco para obtenção de resultados confiáveis. Além disto, o processo de diferenciação da coloração com a utilização do cloreto férrico a 2% requer bastante atenção, sendo o tempo de 20 segundos de imersão nesta solução o mais adequado para amostras de endométrio eqüino.

A fibroelastose da vasculatura endometrial, evidenciada pelo método de VVG demonstrou que nas endometrites crônicas eqüinas as alterações vasculares se tornavam mais graves à medida que o grau de endometrite aumentava. No entanto, todas as amostras mostraram algum grau de fibroelastose. Estes dados reforçam os descritos por Inoue et al. (2000) que relataram que há relação entre as endometroses e a esclerose da íntima e da adventícia de pequenas artérias observadas no endométrio.

A avaliação morfométrica da fibrose perivascular revelou que quanto maior é o grau de endometrite as alterações vasculares também se agravavam. Nas amostras classificadas como endometrite categoria III e infiltrativa o percentual de esclerose vascular foi significativamente maior que nas éguas normais. Porém não houve diferença significativa com relação às alterações vasculares entre as éguas normais e com endometrites infiltrativas ou endometroses. Estes dados estão de acordo com Walter et al (2001) que revelaram que as alterações escleróticas não necessariamente estão ligadas às endometroses. Sabe-se, no entanto, que alterações no ambiente uterino produzidas pela esclerose das artérias podem contribuir para a progressão da endometrose ou esta pode ocorrer como resultado da idade. No entanto, a patogênese deste processo ainda permanece desconhecida.

Segundo Schoon, Schonn e Klug (1999) a degeneração vascular endometrial também contribui para o retardo do *clearance* uterino. Desta forma, a falha da limpeza uterina favorece o aparecimento das endometrites. Por outro lado, a endometrose é definida como uma condição degenerativa que resulta de inflamação aguda e as éguas com endometrose podem ser incapazes de conceber ou manter a prenhez e isto pode resultar em infecções crônicas uterinas (DOIG; MCNIGHT e MILLER, 1981; DASCANIO et al., 1998). Inoue et al (2000) citaram que o grau de comprometimento dos vasos acompanha a gravidade da lesão uterina e que esta afecção pode ser conseqüência da idade, de inflamação crônica e possivelmente de fatores endócrinos.

Grüniger et al. (1998) realizaram estudo sobre a incidência de angiopatias em relação à idade e ao número de partos em éguas e observaram que a perivasculite foi observada em apenas 20,5% das amostras enquanto que a angiose foi notada em 88,9%. Nossos resultados revelaram que 92,68% das amostras apresentaram comprometimento vascular caracterizado pela deposição de colágeno em torno das arteríolas, não havendo, nesses casos, sinais de processo inflamatório vascular.

Com relação à fibroelastose nossos resultados revelaram que 8,53% das amostras apresentaram fibroelastose tipo 1, 34,15% tipo 2, 34,15% tipo 3 e 23,17% tipo 4. Nas éguas normais verificou-se que 60,00% das amostras revelaram alterações vasculares discretas (tipo 2) enquanto que, nas éguas com endometrite, as alterações observadas foram do tipo moderada (tipo 3) na maioria das amostras. Estes dados concordam com Grüniger et al (1998) que constataram que éguas virgens não mostram alterações vasculares severas, entretanto, nas éguas mais idosas (entre 13 e 19 anos) e multíparas, observa-se moderada degeneração da membrana elástica interna e perifibrose ou perifibroelastose. Assim também, Oikawa et al. (1993) observaram que as artérias uterinas de éguas que tiveram mais de uma gestação mostravam graus variáveis de elastose das camadas íntima e adventícia.

A utilização dos métodos imunohistoquímicos em biopsias endometriais eqüinas introduz um elemento importante de avaliação no diagnóstico e prognóstico da fertilidade em éguas (MANSOUR, 2000). Estudos imunohistoquímicos têm sido realizados em diferentes espécies no sentido de detectar a expressão destas enzimas no endométrio (ZHANG e SALAMONSEN, 2002).

Neste estudo foram utilizados anticorpos monoclonais e policlonais anti-humanos para metaloproteinases e um de seus inibidores. A ausência de marcação dos anticorpos monoclonais MMP-1, MMP-2 e MMP-7 em algumas amostras provavelmente se deve a falhas no processamento histológico do material de arquivo. Este problema não ocorreu com os anticorpos policlonais. As MMP-1, MMP-9 e TIMP-1 foram expressas por células epiteliais luminiais e glandulares, pelas células endoteliais, estromais e inflamatórias e pela parede vascular. A MMP-2 não foi expressa pelas células endoteliais e inflamatórias e a MMP-7 não foi observada na parede vascular. Estes locais de expressão de

cada enzima variaram em intensidade em éguas normais e portadoras de endometrite. Na maioria dos casos, observou-se aumento na intensidade da expressão das enzimas nas endometrites crônicas mais graves. As MMP-1 e MMP-7 revelaram marcação imunoistoquímica fraca quando comparada com as outras enzimas estudadas. González et al. (2002) também observaram que a marcação da MMP-7 foi bem mais fraca que MMP-1 e MMP-2.

A MMP-1 foi expressa por diferentes tipos celulares em éguas normais e com endometrites crônicas, porém, nos quadros crônicos observou-se aumento da intensidade da marcação o que sugere o envolvimento desta enzima nestes processos. Os resultados revelaram também que a intensidade de marcação da MMP-1 nas células do epitélio glandular foi significativamente maior nas endometrites crônicas III e nas endometroses do que nas éguas normais. Os estudos no endométrio humano revelaram que na fase pré-menstrual e menstrual, do endométrio normal, são encontradas as MMP-1 e MMP-3, nas células estromais (NOGUCHI et al., 2003). No presente estudo a MMP-1 foi expressa pelas células estromais com baixa intensidade e não revelou diferença significativa entre as amostras normais e com endometrites crônicas.

A MMP-1 representa uma enzima do grupo das collagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) que degradam os colágenos fibrilares I, II e III (BRANTON e KOPP, 1999; GOFFIN et al., 2003). Nas amostras analisadas neste estudo observou-se a deposição dos colágenos I e III. As amostras normais mostraram predominância do colágeno tipo III enquanto que nas amostras de endometrite prevaleceu o colágeno tipo I. Nas endometrites crônicas categoria III e nas endometrites degenerativas, onde a intensidade da MMP-1 foi maior, o colágeno tipo I era predominante.

As enzimas do grupo das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) que degradam o colágeno amorfo e fibronectina também foram avaliadas e revelaram que a MMP-2 foi expressa por vários tipos celulares, mas não foi observada nas células endoteliais e inflamatórias. Os resultados obtidos por Zhang e Salamonsen (2002) no útero humano demonstraram que esta enzima se encontra mais amplamente distribuída, sendo detectada na maioria das células endometriais, sejam epiteliais, estromais, vasculares, mas não nos leucócitos, porém observada em maior intensidade no tecido menstrual em degeneração.

Nossos resultados também revelaram que a maioria das amostras apresentou escore 3 para expressão da MMP-2. Isto indica que, em média, apenas três locais do endométrio, por amostra, expressavam esta enzima.

Nas amostras de éguas normais a MMP-2 foi expressa com maior intensidade pela parede vascular e pelas células estromais. Nas endometrites categoria IIB, III e infiltrativa a expressão desta enzima se deu nas células do epitélio glandular, parede vascular e células estromais e nas endometroses nas células estromais.

Os dados revelaram que quanto maior o grau de endometrite maior é a intensidade da expressão desta enzima nas células epiteliais glandulares, parede vascular e células estromais. Estes dados concordam com os achados de Noguchi et al. (2003) que demonstraram que as MMP-2 e MMP-9 são expressas no estroma e epitélio glandular em todo o ciclo menstrual ou na fase secretória das mulheres. Walter et al. (2005) observaram que a MMP-2 estava localizada no estrato compacto no endométrio de éguas saudáveis e com endometrose. Os autores sugerem que a MMP-2 tenha um papel importante nas alterações da homeostase da matriz extracelular em regiões de fibrose endometrial.

A presença de colágeno do tipo I em lesões fibróticas pode estar relacionada a produção de MMP-2. De acordo com Arthur (2000) as células estreladas hepáticas quando ativadas e exibindo fenótipo de miofibroblastos, secretam pro-MMP-2, induzidas pela presença de colágeno do tipo I, o mais abundante no fígado fibrótico. Nas amostras endometriais deste estudo também foi observado o colágeno do tipo I como o tipo predominante, indicando que a MMP-2 pode ter a sua expressão aumentada devido a presença do colágeno mais espesso. Porto et al (2005) afirmaram que existem evidências de que a MMP-2 e a MMP-9 participem do processo fibrótico que ocorre na endometrite crônica das éguas. Walter et al. (2005) avaliaram a expressão de MMP-2 na fibrose periglandular das éguas e verificaram que a expressão desta enzima estava associada com a dilatação e a fibrose glandular.

A MMP-9, outra enzima do grupo das gelatinases, foi expressa por células epiteliais luminiais e glandulares, pelas células endoteliais, estromais e

inflamatórias e pela parede vascular. A marcação da MMP-9 em todas as amostras foi difusa e acentuada. Nas éguas com endometrite crônica categoria III notou-se expressão significativamente maior no epitélio glandular e na parede vascular, em relação às outras categorias. As éguas com endometrite infiltrativa expressaram a MMP-9 com intensidade significativamente menor na parede vascular em relação à intensidade de marcação apresentada pelo epitélio luminal, célula endotelial, célula inflamatória e célula estromal, mas não em relação ao epitélio glandular desta mesma categoria. De acordo com Zhang e Salamonsen (2002) a MMP-9 é encontrada no epitélio somente durante a fase secretória precoce e durante a menstruação nas mulheres. De acordo com estes mesmos autores a MMP-9 está presente predominantemente em leucócitos. González et al. (2002) também encontraram expressão de MMP-9 pelas células gigantes multinucleadas, células epitelióides e macrófagos.

Nas éguas, também foi verificada presença das MMP-2 e MMP-9, no fluido folicular, em todos os estágios de desenvolvimento dos folículos ovarianos, indicando sua necessidade durante o remodelamento tecidual no crescimento e desenvolvimento folicular (RILEY et al., 2001). Song, Porter e Coomber (1999) acreditam que as células estromais ovarianas da égua produzem importantes componentes da matriz extracelular e que estes representam papel fundamental no remodelamento tecidual durante o crescimento folicular.

Dentre as estromalisinas (MMP-3, MMP-7 e MMP-10) que degradam componentes da membrana basal como colágeno IV e V, laminina e outras proteínas como a fibronectina, a MMP-7 foi a única avaliada no presente estudo.

A MMP-7 neste estudo foi expressa pelas células epiteliais luminiais e glandulares, pelas células estromais, endoteliais e inflamatórias. Porém independentemente do grau de endometrite as células inflamatórias foram o tipo celular que mais expressou esta enzima. Po-Yin Chu et al. (2002) observaram a presença de MMP-7 e MMP-9 no endométrio de cadelas com anestro, hiperplasia cística endometrial, piometra e durante o pós-parto. Todos estes fatores induzem a uma resposta inflamatória do endométrio o que

permite supor que quanto maior a quantidade de células inflamatórias, de acordo com os resultados deste estudo, maior seria a expressão da MMP-7.

De acordo com Branton e Kopp (1999) as MMPs podem ser inativadas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3) que são produzidos principalmente por células mesenquimais e previnem a ação descontrolada das MMPs. Os TIMP-1 e TIMP-2 têm atividade mitogênica em variados tipos celulares, entretanto a alta expressão destes inibidores reduz o crescimento tumoral (NAGASE e WOESSNER JR, 1999). O TIMP-1 foi expresso pelas células estromais em diferentes estudos. No presente trabalho, a marcação imunohistoquímica do TIMP-1 no endométrio eqüino, revelou-se intensa e difusa em todas as amostras. Nas éguas normais o TIMP-1 foi expresso com maior intensidade pelas células estromais e endoteliais. Nos animais com endometrite os resultados foram variados, no entanto a expressão foi maior nas células do epitélio luminal, células estromais, células endoteliais e células inflamatórias. A expressão deste tipo de inibidor de metaloproteinase já foi identificada em outros órgãos do sistema genital. Song, Porter e Coomber (1999) e Riley et al. (2001) também observaram expressão de TIMP-1 pelas células estromais durante o crescimento ovariano.

Lenhart et al. (2002) demonstraram que no útero suíno a expressão dos inibidores das metaloproteinases está relacionada ao aumento da expressão de relaxina durante a fase precoce da prenhez, sugerindo que esta estimula o crescimento uterino durante a placentação. Um estudo realizado por Freitas et al. (1999) verificando a expressão das MMPs e TIMPs nos vasos sanguíneos do endométrio humano constatou que ambas participam dos processos de remodelamento durante a angiogênese e menstruação e sugerem que as alterações cíclicas envolvem componentes vasculares.

6.1 Considerações finais

Os resultados dos estudos morfológicos das endometrites crônicas das éguas têm adicionado dados importantes para o entendimento da etiologia, patogênese, diagnóstico, tratamento e prognóstico deste processo. No entanto, por se tratar de uma alteração morfológica complexa, as dificuldades enfrentadas são inúmeras.

As endometrites apresentam etiologias diversas e que muitas vezes nos casos naturais não são identificadas pelos meios de diagnóstico rotineiros. O próprio sêmen quando introduzido no útero de éguas sadias altera a população de células de defesa do endométrio, gerando uma resposta inflamatória transitória. A resposta a esta grande variedade de agentes deve mostrar variações mesmo que sutis.

A avaliação do histórico reprodutivo da égua torna-se bastante importante para adicionar dados aos achados morfológicos. Dados como a idade das éguas e o número de partos seriam fundamentais, pois permitiriam correlacionar os achados referentes às endometroses e às alterações vasculares.

A análise histopatológica das lesões crônicas do endométrio fornece informações sobre o estado funcional da mucosa uterina e a evolução do processo inflamatório. Nestas lesões predominam o infiltrado leucocitário e as alterações fibróticas. Nossos resultados, aqui apresentados, assim como os de outros trabalhos na mesma linha, mostram que a utilização de métodos histoquímicos, aliados a análise morfométrica, podem permitir a obtenção de dados que esclareçam pontos importantes relacionados aos estudos morfológicos das endometrites crônicas das éguas. Sendo a fibrose um dos elementos principais da reação tecidual, a determinação do seu arranjo, localização e composição podem auxiliar na determinação do grau de comprometimento do endométrio e das chances de regressão da lesão já estabelecida.

A avaliação da expressão das metaloproteinases, através da imunohistoquímica, sugere que as MMPs e os TIMPs desempenham papel importante no remodelamento tecidual do endométrio equino. O estudo destas

enzimas no endométrio normal deve ser continuado no que diz respeito às alterações cíclicas endometriais e fases de placentação e implantação embrionária, além das pesquisas referentes às endometrites crônicas. O estudo das MMPs e TIMPs no endométrio eqüino pode vir a esclarecer pontos importantes como a patogênese e a evolução das endometrites nas éguas, bem como, poderá auxiliar na descoberta de novos métodos de tratamento para esta enfermidade.

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram concluir que:

- As endometrites crônicas foram na sua maioria classificadas como categoria III no sistema de Kenney e Doig (1986) e crônicas infiltrativas pelo sistema de Ricketts e Alonso (1991), mostrando que prevaleceram as alterações do tipo inflamatórias e fibróticas;
- A distribuição do colágeno presente na fibrose endometrial das éguas foi preferencialmente nas regiões periglandulares e perivasculares e no estrato esponjoso;
- O tipo de colágeno predominante na fibrose periglandular nas amostras endometriais de éguas normais e portadoras de endometrite foi o do tipo I;
- A esclerose vascular e o grau de fibroelastose aumentam no endométrio eqüino conforme aumenta o grau de endometrite crônica;
- A MMP-1, MMP-9 e TIMP-1 foram expressas pelas células epiteliais luminais e glandulares, estromais, endoteliais e inflamatórias e pela parede vascular de éguas normais e com endometrites crônicas;
- A MMP-2 foi expressa pelas células epiteliais luminais e glandulares, estromais e pela parede vascular de éguas normais e com endometrites crônicas;
- A MMP-7 foi expressa pelas células epiteliais luminais e glandulares, estromais, endoteliais e pelas células inflamatórias em amostras de éguas normais e com endometrites crônicas;
- A MMP-1 foi expressa com maior intensidade pelas células do epitélio glandular nas endometrites crônicas categoria III e nas endometroses do que nas éguas normais;
- A MMP-2 revelou maior intensidade nas células do epitélio glandular, parede vascular e células estromais nas endometrites categoria IIB, III e infiltrativa e nas células estromais nas endometroses;

- A MMP-2 mostrou reação menor na parede vascular das éguas com endometrite e mais intensa no epitélio glandular das éguas com endometrites III e infiltrativas;
- A MMP-7 foi expressa com maior intensidade pelas células inflamatórias em amostras normais e com endometrites crônicas;
- A MMP-9 foi expressa com maior intensidade pelo epitélio luminal, e pelas células endoteliais, inflamatórias e estromais nas endometrites crônicas categoria III e infiltrativas;
- O TIMP-1 foi expresso com maior intensidade pelas células estromais e endoteliais nas éguas normais e pelas células do epitélio luminal, células estromais, endoteliais e inflamatórias nas éguas com endometrite;
- As MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 e o TIMP-1 estão envolvidos nos processos fibróticos endometriais das éguas uma vez que há variação na expressão destas enzimas nas diferentes regiões do endométrio conforme o grau de endometrite.

8. BIBLIOGRAFIA

ALGHAMDI, A. et al. Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. **Theriogenology**, v. 55, p. 1019-1028, 2001.

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. et al. Use of the Picrosirius-polarization method to age fibrotic lesions in the hepatic granulomas produced in experimental murine schistosomiasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 93, p. 265-272, 1999.

ARTHUR, M.J.P. MMPs and TIMPs in liver fibrosis. **American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 279, p.245-249, 2000.

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

BLANCHARD, T.L. et al. Investigation of the representativeness of a single endometrial sample and the use of trichrome staining to aid in the detection of endometrial fibrosis in the mare. **Theriogenology**, v. 28, p. 445-450, 1987.

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

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

CHIARINI-GARCIA, H. et al. Scanning electron procedures to analyse endometrial biopsies of mares: comparative study between two techniques. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 289-291, 1999.

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

DASCANIO, J.J. et al. Magnesium sulfate intrauterine therapy in the mare. **Equine practice**, v. 20, n. 6, p. 10-13, 1998.

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

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

EVANS, T.J.; MILLER, M.A.; GANJAM, V.K. Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. **American Journal Veterinary Research**, v. 59, n. 10, 1998.

FERREIRA-DIAS, G.M.; NEQUIN, L.G.; KING, S.S. Morphologic comparisons among equine endometrium categories I, II, and III, using light and transmission electron microscopy. **American Journal Veterinary Research**, v. 60, n. 1, 1999.

FREITAS, S. et al. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1070-1082, 1999.

GHINTER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2. ed. Wiscosin: Equiservices, Cross Plains, 1992. 642p.

GOFFIN, F. et al. Expression pattern of metalloproteinases and TIMPs in cycling human endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 976-984, 2003.

GONZÁLEZ, A.A. et al. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lesions of cardiac and pulmonary sarcoidosis: an immunohistochemical study. **Human Pathology**, v. 33, n. 12, p.1158-1164, 2002.

GRAY, C.A. et al Developmental biology of uterine glands. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1311-1323, 2001.

GRÜNINGER, B. et al. Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares in relationship to age and parity. **Journal of Comparative Pathology**, v. 119, p. 293-309, 1998.

INOUE, Y. et al. Degenerative changes in the endometrial vasculature of the mare detected by videoendoscopic examination. **AAEP Proceedings**, v.46, p. 325-329, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.U., COSSERMELLI, W., BRENTANI, R.R. Diferencial staining of collagens type I, II, and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Archives of Histology Japanese**, v. 41, p. 267-74, 1978.

JUNQUEIRA, L.C.U. et al. Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilatation. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v. 138, p.273, 1980.

KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 1, p. 241-262, 1978.

KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology II**. Philadelphia: W. S. Saunders, 1986, 1143p. p. 723-729.

LEBLANC, M.M. Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment. In: BALL, B.A. **Recent Advances in Equine Reproduction**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2003. Disponível em: <http://www.ivis.org>. Acesso em: 31 mar. 2005.

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

LENHART, J.A. et al. Relaxin increases secretion of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and -2 during uterine and cervical growth and remodeling in the pig. **Endocrinology**, v. 143, p. 91-98, 2002.

LIU, X.J.; HE, Y.L.; PENG, D.X. of metalloproteinase-9 in ectopic endometrium in women with endometriosis. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao**, v. 22, n. 5, p. 467-469, 2002.

LUNA, L.G. **Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology**. Washington: McGraw Hill, 1968, 258p.

MANSOUR, G.D.; FERREIRA, A.M.R.; FONSECA, E.C. Avaliação imuno-histoquímica da proliferação celular em biópsias endometriais eqüinas. **Journal Brasileiro de Patologia**, v. 35, n. 2, abr/jun, p.167, 1999. (Suplemento, XXII Congresso Brasileiro de Patologia).

MANSOUR, G.D. **Avaliação imuno-histoquímica da proliferação celular e de componentes da matriz extracelular do endométrio eqüino**. 2000. 95 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2000.

MANSOUR, G.D.; HENRY, M.; FERREIRA, A.M.R. Immunoistochemical study of equine endometrial extracelular matrix during the oestrous cycle. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, p. 316-319, 2003.

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

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**, 4. ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1999. 320p.

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.

NAGASE, H.; WOESSNER JR, J.F. Matrix metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 31, p. 21491-21494, 1999.

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

NOGUCHI, Y. et al. A. Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle *in vivo* and *in vitro*. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 12, p. 6063-6072, 2003.

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

OIKAWA, M. et al. Microscopical characteristics of uterine wall arteries in barren aged mares. **Journal of Comparative Pathology**, v. 108, p. 411-415, 1993.

OSTEEN, K.G. et al. Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America**, v. 91, p. 10129-10133, 1994.

PAPA, F.O. et al. Early embryonic death in mares: clinical and hormonal aspects. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 35, n. 4, p. 170-173, 1998.

PORTO, C.D. et al. Expressão de MMP-2 e MMP-9 no processo fibrótico endometrial das éguas. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2005.

PO-YIN CHU et al. Matrix metalloproteinases (MMPs) in the endometrium of bitches. **Reproduction**, v.123, p. 467-477, 2002.

RICKETTS, S.W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl. 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 Veterinary Journal**, v. 23, n. 3, p. 189-192, 1991.

RICKETTS, S.W.; BARRELET, A. A retrospective review of the histopathological features seen in a series of 4241 endometrial biopsy samples collected from UK Thoroughbred mares over a 25 year period. **Pferdeheilkunde**, v. 13 (set/out), p. 525-530, 1997.

RILEY, S.C. et al. Secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases into follicular fluid during follicle development in equine ovaries. **Reproduction**, v. 121, n. 4, p. 553-560, 2001.

SILVA, C.A.M. et al. A biópsia endometrial na avaliação da fertilidade na égua. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 131-133, 1987.

SCHOON, D.; SCHOON, H. A.; KLUG, E. Angioses in the equine endometrium – pathogenesis and clinical correlations. **Pferdeheilkunde**, v. 15, p. 541-546, 1999.

SONG, L.; PORTER, D.G.; COOMBER, B.L. Production of gelatinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by equine ovarian stromal cells in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 1, p. 1-7, 1999.

TRAUB-DARGATZ, J.L.; SALMAN, M.D.; VOSS, J.L. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. **Journal American Veterinary Research**, v. 198, p.1745-1747, 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. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl. 44, p. 283-288, 1991.

TROEDSSON, M.H.T.; MORAES, M.J.; LIU, I.K.M. Correlations between histologic endometrial lesions in mares and clinical response to intrauterine exposure with *Streptococcus zooepidemicus*. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 4, p. 570-572, 1993.

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

VAGNONI, K.E.; GINTHER, O.J.; LUNN, D.P. Metalloproteinase activity has a role in equine chorionic girdle cell invasion. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 800-805, 1995.

VERHÖEFF, F.H. Some new staining methods of wide applicability. Including a rapid differential stain for elastic tissue. **Journal American Medical Association**, v. 50, p. 876-877, 1908.

WALTER, I. et al. Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. **Reproduction**, v. 121, p. 581-586, 2001.

WALTER, I. et al. Matrix metalloproteinases 2 (MMP-2) and tissue transglutaminase (TG2) are expressed in periglandular fibrosis in horse mares with endometriosis. **Histologic Histopathology**, v. 20, n. 4, p. 1105-1113, 2005.

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

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

ZHANG, J.; SALAMONSEN, L.A. In vivo evidence for active matrix metalloproteinases in human endometrium supports their role in tissue breakdown at menstruation. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, p. 2346-51, 2002.

9. TRABALHO A SER ENVIADO PARA A REVISTA “ ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences”

EXPRESSÃO DE MMP-1 E MMP-7 NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS NORMAIS E PORTADORAS DE ENDOMETRITES

Louisiane de Carvalho NUNES¹, Camila Dias PORTO², Julio Lopes SEQUEIRA³, Marco Antônio ALVARENGA⁴, Deilson Elgui de OLIVERA⁵, Sebastião Martins FILHO⁶

¹Professora Assistente do Departamento de Zootecnia e Economia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil

²Pós-graduanda do curso de Mestrado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³Professor Assistente Doutor do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

⁴Professor Doutor do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

⁵Professor Assistente Doutor do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

⁶Professor Adjunto do Departamento de Economia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil

Endereço:

Julio Lopes Sequeira

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

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar a expressão das enzimas MMP-1 e MMP-7 no endométrio de éguas normais e portadoras de endometrites. Foram utilizadas 82 biópsias uterinas recebidas pelo Serviço de Patologia Veterinária e de Reprodução Animal da FMVZ, UNESP, Botucatu, SP. As biópsias uterinas foram fixadas em bouin por até 24 horas e transferidas solução de álcool a 70%. O material foi incluído em parafina e corado pelo método de HE para a classificação histológica (Kenney e Doig, 1986) e submetido à técnica de imunohistoquímica. Os anticorpos utilizados foram MMP-1 (RDI-MMP1abm-E5) e MMP-7 (RDI-MMP7amb-B2). A análise histológica revelou que prevaleceram as alterações dos tipos inflamatórias e fibróticas. A MMP-1 e MMP-7 foram expressas por diversos tipos celulares no endométrio normal e com endometrite crônica. A intensidade de marcação da MMP-7 foi maior nas células inflamatórias tanto nas éguas normais quanto com endometrites. A intensidade de marcação da MMP-1 foi significativamente maior nas células do epitélio glandular nas endometrites crônicas categoria III em relação às amostras normais.

Palavras-chave: endométrio, eqüino, MMP-1, MMP-7.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the expression of the enzymes MMP-1 and MMP-7 in normal and chronic endometritis samples. eighty two uterine biopsies received at Veterinary Pathology Service and Animal Reproduction Service of the FMVZ, UNESP, Botucatu, SP were classified according to endometrial histopathological alterations. The uterine biopsies were fixed in bouin's fixative for up to 24 hours and transferred to 70% alcohol solution, embedded in paraffin wax and staining with hematoxylin-eosin. The samples was classified according to Kenney and Doig (1986). The evaluation of matrix metalloproteinaes was made by the immunohistochemical technique using as primary antibodies MMP-1 (RDI-MMP1abm-E5) and MMP-7 (RDI-MMP7amb-B2). Inflammatory and fibrotics were the predominant changes in endometrial samples. The the MMP-1 and MMP-7 expressions did not showed significant difference between normal endometrium and endometritis. The intensity of the MMP-1 expression was higher in the glandular epithelium cells of category III chronic endometritis when

compared to normal endometrium. The MMP-7 labeled intensity was more intense in inflammatory cells in both normal and endometritis samples.

Key-words: endometrium, equine, MMP-1 e MMP-7.

INTRODUÇÃO

Desde a década de 70, o exame histopatológico de biópsias endometriais tem sido incluído na avaliação reprodutiva de éguas subférteis (Evans; Miller e Ganjam, 1998). Esta técnica permite evidenciar a situação morfológica do endométrio e fornece dados sobre a situação funcional, representando, portanto, uma ajuda valiosa no diagnóstico e prognóstico da infertilidade na égua (Doig; Mcknight e Miller, 1981; Mansour et al., 1997).

As alterações mais frequentemente observadas nas análises de biópsias endometriais de éguas são a endometrite crônica e a doença endometrial degenerativa crônica (endometroses) (Evans; Miller e Ganjam, 1998).

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

A fibrose é um dos principais elementos da reação tecidual, sendo, portanto, importante a determinação de seu arranjo, localização e composição para se avaliar o grau de comprometimento do endométrio e as chances de regressão da lesão já estabelecida (Nunes, 2003). Este processo não apenas interfere com a habilidade da égua de levar uma gestação a termo, como também mostra pouco ou nenhuma resposta ao tratamento (Amaral, 2002).

Durante os processos de reparo e nos processos de fibrose em geral os fibroblastos proliferam em larga escala em resposta à injúria, constituindo a resposta do tecido conjuntivo à inflamação (Cotran; Kumar e Collins, 1999). Segundo Montenegro e Franco (1999) o que leva as células do tecido conjuntivo a proliferar e secretar os componentes da matriz extracelular são mensageiros químicos sob a forma de peptídeos

secretados por vários tipos celulares (citocinas). Entre estas células, os macrófagos e os linfócitos T estão entre as mais importantes. Segundo Walter et al. (2001) os fibroblastos representam um papel essencial na síntese e regulação do tecido conjuntivo e estão envolvidos no processo fibrótico.

Vários estudos têm revelado que a matriz extracelular não apenas fornece aos tecidos um suporte estrutural, mas também troca informações com as células, modulando uma série de processos que incluem: desenvolvimento, migração celular, adesão, diferenciação e reparo (Branton e Kopp, 1999; Martinez-Hernandez, 1999). A síntese e degradação da matriz acompanham dentre outros fatores os processos fibróticos (Cotran; Kumar e Collins, 1999).

Segundo Branton e Kopp (1999) em circunstâncias normais, no remodelamento tecidual, a taxa de síntese das proteínas da matriz são balanceadas por proteínas de degradação, catalizadas por várias famílias de enzimas, incluindo plasmina e metaloproteinases (MMPs).

A degradação da matriz extracelular envolve muitas enzimas, mas as metaloproteinases (MMP) são as mais importantes nesse processo, e a interação das MMP ativas e seus inibidores (inibidor tecidual de metaloproteinase - TIMP) é regulada de tal forma que evita o dano tecidual desnecessário (Arthur, 2000; Lenhart et al., 2002). As metaloproteinases são uma família de enzimas que degradam alguns componentes da matriz extracelular como proteoglicanos, glicoproteínas e colágenos da membrana basal. Acredita-se que esse grupo de enzimas desempenha papel fundamental no remodelamento e reparo em vários processos (Osteen et al, 1994; Yokota et al., 2002). Elas são divididas em vários subgrupos distintos, baseados na especificidade ao substrato ou semelhanças estruturais: as collagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) que degradam os colágenos fibrilares I, II e III; as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) que degradam o colágeno amorfo e fibronectina; as estromalisinas (MMP-3, MMP-7 e MMP-10) que degradam componentes da membrana basal como colágeno IV e V, laminina e outras proteínas como a fibronectina; as metaloproteinases tipo membrana (MT-MMP-1 a 6) que degradam colágeno I e III, fibronectina, laminina, entactina/nidogênio, tenascina e perlecan e ainda ativam outras MMPs; e, ainda, existe um grupo formado por enzimas de características estruturais e ações variadas, que inclui MMP-12, MMP-18 a 26 (Branton e Kopp, 1999; Goffin et al., 2003).

Estudos imunoistoquímicos têm sido realizados em diferentes espécies no sentido de detectar a expressão destas enzimas no endométrio. Goffin et al. (2003) relatam que em humanos as MMP são responsáveis pelo remodelamento do colágeno uterino nas fases pré-menstruais. Especificamente no trato reprodutivo feminino, estão relacionadas ao remodelamento e reparo tecidual em eventos como ovulação, implantação embrionária, útero pós-parto e involução da glândula mamária (Bruner et al., 1995).

Segundo Noguchi et al. (2003), o endométrio humano produz diferentes classes de MMPs. Na fase pré-menstrual e menstrual, do endométrio normal, são encontradas as MMP-1 e MMP-3, nas células estromais. As MMP-2 e MMP-9 são expressas no estroma e epitélio glandular em todo o ciclo menstrual ou na fase secretória. A MMP-TM1 é expressa no epitélio endometrial em todas as fases do ciclo menstrual.

Po-Yin Chu et al. (2002) avaliaram a relação entre a atividade das metaloproteinases e a ocorrência de degeneração do epitélio luminal, hiperplasia cística endometrial, piometra e remodelamento uterino pós-parto em cadelas. A MMP-2 e a MMP-9 foram detectadas no útero de todas as cadelas. A MMP-7 e a MMP-9 foram observadas somente em uma cadela em anestro e nas cadelas com hiperplasia cística endometrial, piometra e nos animais entre duas e três semanas pós-parto. Os autores concluíram que o estudo das MMPs no endométrio canino pode representar um importante papel na hiperplasia cística endometrial, piometra e no pós-parto. Porém, não observaram envolvimento das MMPs com a degeneração do epitélio luminal. Em eqüinos ainda não existem estudos sobre o papel destas enzimas no endométrio.

O presente trabalho teve por objetivos avaliar a expressão das metaloproteinases 1 e 7 no endométrio de éguas normais e portadoras de endometrites.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados neste estudo 82 amostras de biópsias uterinas eqüinas recebidas no Serviço de Patologia Veterinária e Reprodução Animal da FMVZ, UNESP, no período de 1987 a 2004. Este material incluiu biópsias provenientes da rotina de diagnóstico do Hospital Veterinário, bem como aquelas enviadas por clínicas particulares e profissionais autônomos. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo processamento, ou seja, fixação em solução de Bouin durante 24 horas seguida da imersão em álcool 70% e posterior inclusão em parafina, de acordo com as técnicas de

rotina histopatológica. Dos blocos, foram obtidos cortes com cinco micrômetros (μm) de espessura para coloração pelo método de Hematoxilina e Eosina e para a imunoistoquímica.

A técnica de imunoistoquímica foi realizada no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP. Os anticorpos utilizados foram MMP-1 (RDI-MMP1abm-E5) e MMP-7 (RDI-MMP7amb-B2).

As lâminas permaneceram na estufa a 60°C por 24 horas para fixação do tecido e, em seguida, foram submetidas aos processos de desparafinização e hidratação. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em solução de água oxigenada a 10 volumes por 15 minutos. Para a recuperação antigênica dos anticorpos foi utilizada a solução tampão de citrato 10 mM, pH 6,0, em forno de microondas, na potência máxima por 20 minutos. Após o procedimento, o material foi resfriado até atingir a temperatura ambiente.

Cada anticorpo foi diluído em solução a 0,1% de albumina sérica bovina em solução tampão de TRIS (TRIZMA base, D5637 Sigma Chemical C.O., St. Louis, E.U.A.). Foi empregado o anticorpo secundário anti-mouse (BA2000-VECTOR) e o kit ABC (PK6100 – VECTASTAIN ELITE). As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários por 18 horas a 4°C , lavadas em solução TRIS pH 7,4 (Trizma Base Reagent Grade – T1503 SIGMA) e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse à temperatura ambiente por 30 minutos. Após a reação com o anticorpo secundário o material foi lavado com TRIS e as lâminas incubadas com o kit ABC, preparado 30 minutos antes do uso, à temperatura ambiente por 30 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.

Para cada caso, o tipo histológico foi caracterizado segundo a classificação proposta por Kenney e Doig (1986) para as endometrites crônicas, porém só foram utilizadas as amostras categorizadas como normais (categoria I) e as endometrites crônicas mais graves (IIB e III).

Para cada anticorpo utilizado, a reação imunoistoquímica foi estimada conforme a marcação positiva. Em cada região onde a enzima foi observada foi adotado um valor para a intensidade da marcação, sendo: 0=negativo, 1=marcação fraca, 2=marcação moderada e 3=marcação acentuada. Após esta análise estes valores eram transformados em mediana e então se obtinha a intensidade da enzima em cada elemento avaliado. Os locais avaliados foram: epitélio luminal, epitélio glandular, parede vascular, célula endotelial, célula inflamatória e célula estromal.

Para a avaliação do grau de expressão de cada enzima foram utilizados valores numéricos variando de zero a seis. O valor zero correspondia à ausência de marcação. Para cada local era atribuído o valor um. A expressão da enzima era calculada com base no somatório dos locais onde ocorria a expressão da enzima, ou seja, de zero a seis.

Para cada variável utilizada no experimento, as três categorias de endometrites foram comparadas utilizando-se a classificação de Kenney e Doig (1986). O teste estatístico utilizado foi o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Zar, 1996), adotando-se o nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a classificação histológica das 82 biópsias de acordo com a descrição de Kenney e Doig (1986), 15 animais foram incluídos na categoria I (18,29%), 18 na categoria IIB (21,95%) e 49 na categoria III (59,76%). Nossos resultados mostraram que a intensidade do infiltrado inflamatório e o grau das alterações fibróticas foram os achados mais importantes. Deve-se destacar, no entanto, seguindo-se a classificação proposta por Kenney e Doig (1986), que as lesões fibróticas por si só, quando muito acentuadas, são suficientes para que a lesão uterina seja classificada como pertencente a categoria III, mesmo que sejam acompanhadas de infiltrado inflamatório discreto.

Segundo Evans, Miller e Ganjam (1998) vários esquemas de classificação, incluindo o sistema modificado de Kenney e Doig (1986), têm auxiliado no prognóstico dos problemas reprodutivos na espécie equina. Estes mesmos autores afirmaram que embora estas classificações descrevam a localização, a frequência e a severidade da fibrose periglandular as avaliações são semi-quantitativas e que a fibrose periglandular necessita de avaliação mais detalhada do tamanho dos focos fibróticos, número de células envolvidas no foco fibrótico e percentual de glândulas endometriais individuais

circundadas por duas ou mais camadas de fibroblastos. No sistema de Kenney e Doig (1986) o conjunto destas alterações poderia ser classificado, em uma mesma amostra, como categoria IIA, IIB ou III, dependendo da severidade da fibrose.

Na análise qualitativa da expressão da enzima MMP-1 foi verificada marcação fraca a moderada na maioria das amostras. A MMP-1 foi expressa por todos os tipos celulares e regiões do endométrio avaliadas. Em apenas uma amostra classificada como endometrite crônica categoria III houve ausência da marcação de MMP-1.

Das 15 amostras classificadas como categoria I a maioria (quatro casos) revelou escore de expressão 6, indicando que a MMP-1 foi observada em diferentes tipos celulares no endométrio normal. Nas amostras com endometrites crônicas foram observados os seguintes resultados: na categoria IIB a maioria das amostras apresentou escore 2 e 5 (cinco amostras em cada escore) e na categoria III, onze casos revelaram escore 5 e 14 escore 6. Estes resultados revelaram que as éguas com endometrite crônica apresentaram os maiores escores (5 e 6), na maioria dos casos, indicando que a enzima é expressa por mais tipos celulares durante o processo crônico.

Embora os dados tenham revelado que nas endometrites a expressão das enzimas aumenta, a MMP-1 não apresentou diferença significativa, com relação à expressão, nas diferentes categorias de endometrite, conforme a Tab. 1.

Com relação à distribuição da MMP-1 no endométrio equino, os dados revelaram que esta enzima foi expressa em todas as regiões analisadas, porém não houve diferença significativa na sua intensidade de marcação, independente do local observado, em cada categoria de endometrite.

Quando observada quanto à intensidade da marcação da MMP-1, em cada local do endométrio, observou-se que na categoria I, embora esta enzima fosse expressa por vários tipos celulares, a marcação era fraca ou moderada na maioria das amostras. A marcação intensa só foi observada em três amostras. Também foi observado que nas células dos epitélios luminal e glandular a marcação da MMP-1 foi ausente na maioria das amostras (nove casos). Nas endometrites crônicas a intensidade da marcação era moderada a intensa e a maioria das células expressavam MMP-1. Estes resultados demonstraram que a intensidade da marcação de MMP-1 foi maior nas éguas com endometrites mostrando diferença significativa entre as categorias. Nas endometrites

categoria III a MMP-1 foi observada com maior intensidade nas células do epitélio glandular em relação às éguas normais, conforme mostra a Fig. 1 e a Tab. 2.

Segundo Cotran, Kumar e Collins (1999) as MMP-1 representam as collagenases e são responsáveis pela degradação dos colágenos fibrilares enquanto que a MMP-7, as estromalisinas, agem em uma variedade de componentes da matriz incluindo proteoglicanos, laminina, fibronectina e colágeno amorfo.

A MMP-1 foi expressa por diferentes tipos celulares em éguas normais e com endometrites crônicas, porém, nos quadros crônicos observou-se aumento da intensidade da marcação o que sugere o envolvimento desta enzima nestes processos. Os resultados revelaram também que a intensidade de marcação da MMP-1 nas células do epitélio glandular foi significativamente maior nas endometrites crônicas III do que nas éguas normais. Os estudos no endométrio humano revelaram que na fase pré-menstrual e menstrual, do endométrio normal, são encontradas as MMP-1 e MMP-3, nas células estromais (Noguchi et al., 2003). No presente estudo a MMP-1 foi expressa pelas células estromais com baixa intensidade e não revelou diferença significativa entre as amostras normais e com endometrites crônicas.

Na análise da expressão da enzima MMP-7 foi verificada que a marcação variou de fraca a moderada. A marcação intensa foi observada em apenas três amostras. Esta enzima foi expressa por vários tipos celulares, porém a marcação na parede vascular foi ausente em todas as amostras analisadas.

Com relação ao escore de expressão observou-se que independente da categoria de endometrite a maioria das amostras apresentou escore 1, sendo nove amostras da categoria I, sete da categoria IIB e 26 da categoria III. A ausência de marcação para MMP-7 foi observada em apenas uma amostra da categoria III. Os resultados referentes à MMP-7 revelaram que não existem diferenças significativas entre a expressão desta enzima nos diferentes tipos de processo, independentemente da classificação histológica, conforme demonstra a Tab.3.

No que diz respeito a intensidade de marcação para MMP-7 observou-se que, independente da classificação utilizada, as células que expressaram escores de intensidade significativamente maiores para esta enzima foram as células inflamatórias em relação aos outros elementos avaliados, conforme mostra a Fig. 2. Não houve

diferença entre a intensidade da expressão nos diferentes locais do endométrio entre as categorias de endometrite. Estes resultados estão apresentados na Tab. 4.

Dentre as estromalisinas (MMP-3, MMP-7 e MMP-10) que degradam componentes da membrana basal como colágeno IV e V, laminina e outras proteínas como a fibronectina, a MMP-7 foi a única avaliada no presente estudo.

A MMP-7 neste estudo foi expressa pelas células epiteliais luminiais e glandulares, pelas células estromais, endoteliais e inflamatórias. Porém independentemente do grau de endometrite as células inflamatórias foram o tipo celular que mais expressou esta enzima. Po-Yin Chu et al. (2002) observaram a presença de MMP-7 e MMP-9 no endométrio de cadelas com anestro, hiperplasia cística endometrial, piometra e durante o pós-parto. Todos estes fatores induzem a uma resposta inflamatória do endométrio o que permite supor que quanto maior a quantidade de células inflamatórias, de acordo com os resultados deste estudo, maior seria a expressão da MMP-7.

Nossos resultados, assim como os de outros trabalhos na mesma linha, mostraram que por meio da utilização da imunistoquímica podem ser obtidos dados morfológicos importantes sobre o endométrio equino. As metaloproteinases parecem ter influência no processo de reparo endometrial, visto que em algumas situações alguns tipos celulares mostraram maior intensidade de expressão de determinada enzima. No entanto os dados deste estudo não permitem concluir se MMP-1 e MMP-7 interferem ou não nos processos crônicos endometriais.

Tabela 1. Valores medianos da expressão de MMP-1 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Categoria de endometrite	Expressão de MMP-1
Categoria I	3,0a ¹
Categoria IIB	3,0a
Categoria III	5,0a

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

Tabela 2. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-1 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Local no endométrio	Categoria I	Categoria IIB	Categoria III
Epitélio luminal	0aA ¹	1aA	1aA
Epitélio glandular	0aA	1aAB	2aB
Célula endotelial	1aA	2aA	1aA
Parede vascular	1aA	0,5aA	1aA
Célula inflamatória	2aA	2aA	2aA
Célula estromal	1aA	1aA	1aA

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

Tabela 3. Valores medianos da expressão de MMP-7 nas diferentes categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Categoria de endometrite	Expressão de MMP-7
Categoria I	1,0a ¹
Categoria IIB	2,0a
Categoria III	1,0a

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

Tabela 4. Valores medianos da intensidade da marcação de MMP-7 nos diferentes locais do endométrio de acordo com as categorias de endometrites crônicas diagnosticadas segundo Kenney e Doig (1986).

Local no endométrio	Categoria I	Categoria IIB	Categoria III
Epitélio luminal	0aA ¹	0aA	0aA
Epitélio glandular	0aA	0aA	0aA
Célula endotelial	0aA	0aA	0aA
Parede vascular	0aA	0aA	0aA
Célula inflamatória	1bA	2bA	1bA
Célula estromal	0aA	0aA	0aA

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

Figura 1. Amostra P90/04. Endométrio eqüino com endometrite crônica categoria degenerativa / III. Marcação positiva de MMP-1 (1:100) nas células do epitélio glandular (EG), na fibrose periglandular (FPG) na região do estrato compacto e nas células do epitélio luminal (EL).

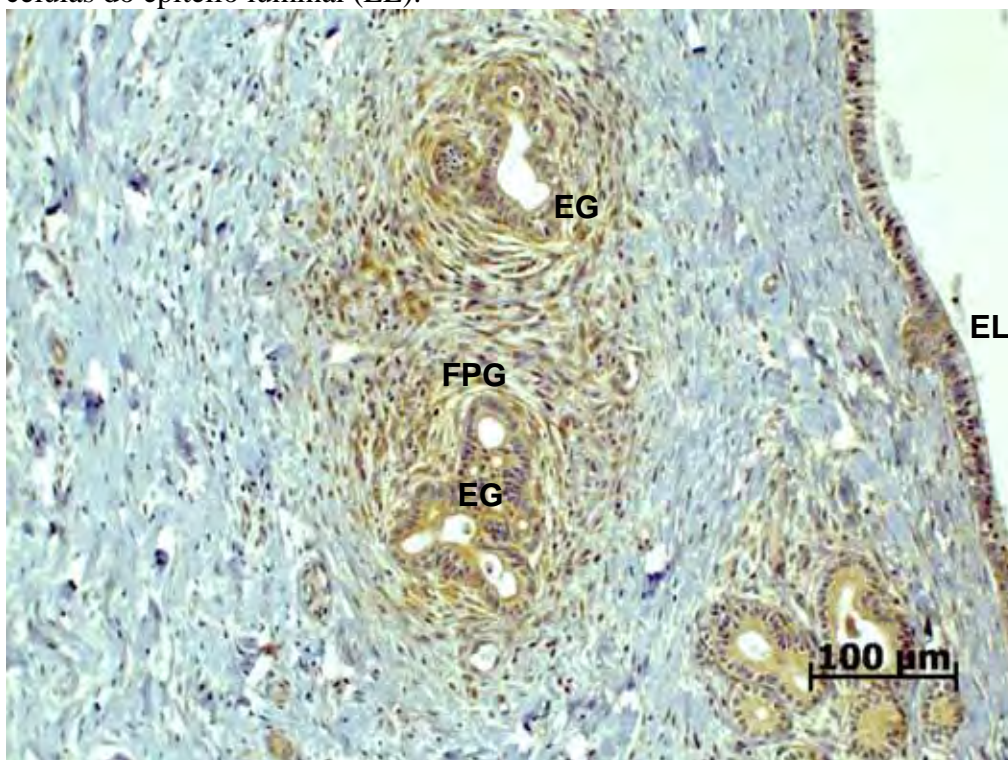
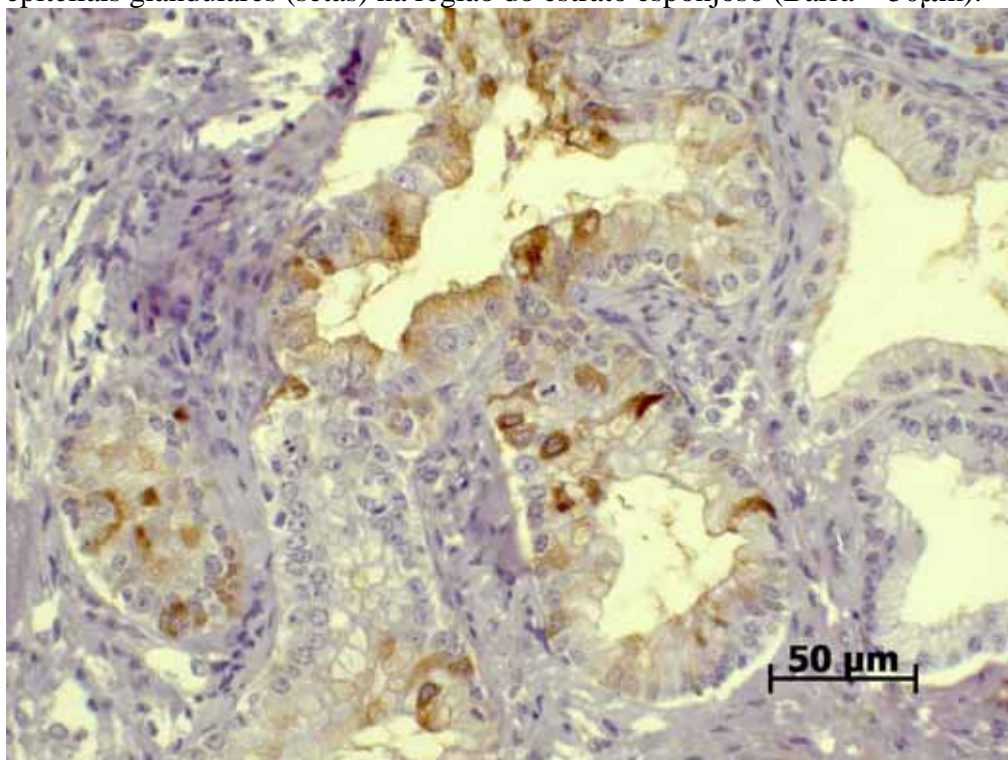


Figura 2. FIGURA 18. Amostra P202/02. Endométrio eqüino com endometrite crônica infiltrativa / III. Marcação positiva de MMP-7 (1:100) em células inflamatórias intra-epiteliais glandulares (setas) na região do estrato esponjoso (Barra = 50μm).



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ARTHUR, M.J.P. MMPs and TIMPs in liver fibrosis. *American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, v. 279, p.245-249, 2000.
- BRANTON, M.H.; KOPP, J.B. TGF- β and fibrosis. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 1349-1365, 1999.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: pathologic basis of disease**. 6. ed. Philadelphia: W. S. Saunders, 1999. 1425p.
- DOIG, P.A.; MCKNIGHT, J.D.; MILLER, R.B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Canadian Veterinary Journal*, v. 22, p. 72-76, 1981.
- EVANS, T.J.; MILLER, M.A.; GANJAM, V.K. Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. *American Journal Veterinary Research*. v. 59, p. 1209-1214, 1998.
- GOFFIN, F. et al. Expression pattern of metalloproteinases and TIMPs in cycling human endometrium. *Biology of Reproduction*, v. 69, p. 976-84, 2003.
- KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 1, p. 241-262, 1978.
- KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D. A. *Current therapy in theriogenology II*. Philadelphia: W. S. Saunders, 1986, 1143p.
- LENHART, J.A. et al. Relaxin increases secretion of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and -2 during uterine and cervical growth and remodeling in the pig. *Endocrinology*, v. 143, p. 91-98, 2002.
- MANSOUR, G.D. et al. M. Histomorfometria em amostras endometriais normais e patológicas de éguas. *Journal Brasileiro de Patologia*, v. 33, p. 145, 1997.
- MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Repair, regeneration and fibrosis. In: RUBIN, E., FABER, J.L. **Pathology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincot-Raven, 1999, 1664p.
- MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**, 4. ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1999. 320p.

- NOGUCHI, Y. et al. A. Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle *in vivo* and *in vitro*. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 12, p. 6063-6072, 2003.
- NUNES, L.C. Avaliação histopatológica, histoquímica, imunoistoquímica e morfométrica das endometrites crônicas em éguas. 2003. 108p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- OSTEEN, K.G. et al. Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America*, v. 91, p. 1129-1133, 1994.
- PO-YIN CHU et al. Matrix metalloproteinases (MMPs) in endometrium of bitches. *Reproduction*, v. 123, p. 467-477, 2002.
- WALTER, I. et al. Association of endometrosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. **Reproduction**, v. 121, p. 581-586, 2001.
- WATSON, E.D. Uterine defence mechanisms in mares resistant and susceptible to endometritis: a review. *Equine Veterinary Journal*, v. 20, p. 397-400, 1988.
- WATSON, E.D. Post-breeding endometritis in the mare. *Animal Reproductive Science*, v. 60-61, p. 221-232, 2000.
- YOKOTA, T. et al. Pancreatic stellate cell activation and MMP production in experimental pancreatic fibrosis. *Journal of Surgical Research*, v. 104, p. 106-111, 2002.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1996, 718p.
- ZHANG, J.; SALAMONSEN, L.A. In vivo evidence for active matrix metalloproteinases in human endometrium supports their role in tissue breakdown at menstruation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 87, p. 2346-51, 2002.