

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

DIEGO LUNELLI

**CORRELAÇÃO ENTRE OS TIPOS DE COLÁGENO E A
EXPRESSÃO DE RECEPTORES HORMONAIIS ESTERÓIDES NA
FIBROSE ENDOMETRIAL EQUINA**

(Correlation between collagen types and expression of steroid hormone
receptors in equine endometrial fibrosis)

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2011

DIEGO LUNELLI

**CORRELAÇÃO ENTRE OS TIPOS DE COLÁGENO E A
EXPRESSÃO DE RECEPTORES HORMONAIS ESTERÓIDES NA
FIBROSE ENDOMETRIAL EQUINA**

(Correlation between collagen types and expression of steroid hormone
receptors in equine endometrial fibrosis)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Área de concentração: Patologia Animal e Comparada, Cirurgia e Clínica, do setor de Ciência Agrárias e Ambientais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2011

*Dedico esta obra a minha família,
Hélio, Beth, Mery e Selene.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me proporcionar mais esta conquista. Peço-Lhe que continue iluminando sempre meus passos e caminhos.

Aos meus pais, Hélio e Beth, pelo apoio em todas as minhas decisões e por sempre terem me guiado para o caminho certo. Meu amor por vocês é eterno.

A minha querida irmã Mery, que sempre torceu pelo meu sucesso.

Aos meus avós, mesmo estando longe, sempre estão presentes de alguma maneira para me auxiliar.

A minha namorada Selene. Obrigado pelo companheirismo, dedicação e pelas palavras de conforto nas horas difíceis. Com certeza esta caminhada não seria a mesma sem a sua presença. Amo você.

A Profa. Dra. Silvana Maris Cirio, pela dedicação e incentivo no desenvolvimento deste trabalho, e é claro pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki. Agradeço pela orientação e pela confiança depositada em mim, permitindo o desenvolvimento deste trabalho com liberdade e autonomia.

Ao Prof. Dr. Pedro Vicente Michellotto Júnior, por ter me ajudado na obtenção dos animais utilizados neste trabalho.

Aos meus parceiros Cadu, Dylon, Nilson e Rodrigo, verdadeiros irmãos. A faculdade terminou, mas a nossa amizade permanece.

Ao Carlos Eduardo Camargo, colega de profissão e amigo pessoal. Obrigado pelas oportunidades e pelos ensinamentos dentro da reprodução equina.

Ao Regimento de Polícia Montada Coronel Dulcídio, especialmente ao Coronel Heraldo, Tenente Aires e Tenente Carolina que permitiram a realização do experimento na Cavalaria. O trabalho de vocês é fundamental na segurança do Estado. Sempre haverá uma Cavalaria.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, especialmente a Marina e a Camila, que me ajudaram na confecção das

lâminas e interpretação das mesmas. Só elas sabem quantas lâminas foram feitas para determinar o protocolo correto para o experimento.

À todos meus familiares e amigos da faculdade e de infância, que direta ou indiretamente me ajudaram nesta conquista.

*“Não se pode obrigar um cavalo, uma pessoa a fazer as coisas pela força.
A violência não é a resposta. Amor, entendimento,
comunicação, é disso que o mundo precisa.”*

Monty Roberts

RESUMO

A endometrose é uma das causas mais frequentes de infertilidade em éguas, podendo comprometer a expressão de receptores hormonais, o que torna as células envolvidas incapazes de responder aos estímulos endócrinos cíclicos. O exame histopatológico do endométrio é a técnica definitiva para o diagnóstico de endometrites e pode determinar a presença de alterações morfológicas, permitindo o prognóstico para a capacidade do útero levar uma gestação a termo. Atualmente, o desenvolvimento de técnicas histoquímica e imunohistoquímica podem contribuir na avaliação histopatológica e determinar a capacidade reprodutiva de éguas com problemas de fertilidade. O presente estudo teve por objetivo determinar a influência do tipo de colágeno (I ou III) presente na fibrose endometrial, na expressão de receptores de estrógeno e progesterona durante as fases de estro e diestro. Foram utilizadas 25 biopsias endometriais, de cada fase do ciclo estral, classificadas histologicamente de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986). Através da técnica histoquímica do Picosirius Red o colágeno foi tipificado e quantificado; e pela imunohistoquímica os receptores hormonais esteróides foram identificados. Os resultados evidenciaram predomínio do colágeno tipo III em todas as amostras endometriais, independente da classificação em categorias. Observou-se que a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona variou de acordo com a fase do ciclo estral nas regiões avaliadas. Além disso, neste estudo foi possível concluir que o tipo de colágeno presente na fibrose endometrial não interferiu na expressão de receptores esteróides.

Palavras-chaves: endometrose; Picosirius Red; imunohistoquímica; éguas

ABSTRACT

The endometriosis is one of the most common causes of infertility in mares, and can compromise the hormonal receptors expression, making involved cells unable to respond to the cyclical endocrine stimuli. The endometrium histopathology is the definitive technique for endometritis diagnose and may determine the presence of morphological changes, allowing the prognosis for the ability of the uterus to maintain the pregnancy. Currently, the development of histochemical and immunohistochemical techniques may help to the histopathological evaluation and to determine the reproductive capacity of mares with fertility problems. This study aimed to determine the influence of collagen type (I or III) present in the endometrial fibrosis, in the estrogen and progesterone receptors expression during the estrus and diestrus stages. Twenty five endometrial biopsies were used, of each cycle phase, and histologically classified according to the criteria by Kenney and Doig (1986). By Picosirius Red histochemistry technique, the collagen was typed and measured, and by immunohistochemistry the steroid hormone receptors have been identified. the results showed the predominance of type III collagen in all endometrial samples, regardless of the categorization. It was observed that the estrogen and progesterone expression varied with the stage of the estrous cycle in the regions studied. Furthermore, in this study it was possible to conclude that the collagen type present in the endometrial fibrosis did not affect the expression of steroid receptors.

Key-words: endometriosis; Picosirius Red; immunohistochemistry; mares

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Endométrio equino. Células colunares altas (setas) do epitélio luminal durante a fase de estro. Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 400x.	19
Figura 2 – Endométrio equino. Redução da concentração das glândulas endometriais (círculo) devido a presença de edema (seta) durante a fase de estro. Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 100x.	19
Figura 3 - Endométrio equino. Células colunares baixas (setas) do epitélio luminal durante a fase de diestro. Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 400x.	20
Figura 4 – Endométrio equino. Glândulas endometriais concentradas (círculo) devido a ausência de edema durante a fase de diestro. Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 100x.	20

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Biopsia endometrial de fêmea equina obtida na fase de estro. A) Antes da fixação em solução de Bouin. B) Após a fixação em solução de Bouin.	43
Figura 2 – Endométrio equino classificado na categoria I. Fase de diestro. Ausência de alterações inflamatórias e fibróticas. Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 100x.	50
Figura 3 – Endométrio equino classificado na categoria IIA. Fase de diestro. Presença de fibrose periglandular (seta). Tricrômico de Mallory. Aumento: 1000x.	51
Figura 4 – Endométrio equino classificado na categoria IIA. Fase de diestro. Dilatação glandular evidente (círculo). Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 100x.	51
Figura 5 – Endométrio equino classificado na categoria IIB. Fase de estro. Presença de ninho fibrótico (círculo) e hemossiderófagos (seta). Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 400x.	52
Figura 6 – Endométrio equino classificado na categoria IIB. Fase de diestro. Infiltrado inflamatório monomorfonuclear (círculo). Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 100x.	53
Figura 7 – Endométrio equino. Fase de diestro. Distribuição do colágeno. A) Tipo I (vermelho) e tipo III (verde). B) Tipo I (amarelo) e tipo III (verde). Picrosirius Red. Aumento: 200x.	54
Figura 8 – Comparação entre as áreas dos colágenos tipo I e III presentes na fibrose endometrial de amostras coletadas na fase de diestro e classificadas na categoria IIA de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986). ** Diferença estatística significativa ($p < 0,01$).	55
Figura 9 – Comparação entre as áreas dos colágenos tipo I e III presentes na fibrose endometrial de amostras coletadas na fase de diestro e classificadas na	

categoria IIB de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986). ** Diferença estatística significativa ($p < 0,01$).	55
Figura 10 – Endométrio equino. Fase de diestro. Receptores para progesterona. Variação na intensidade da expressão hormonal no epitélio glandular profundo. A) Ausente. B) Discreta. C) Moderada. D) Acentuada. Imunohistoquímica. Aumento: 400x.	56
Figura 11 – Endométrio equino durante a fase de estro. Receptores para progesterona. Ausência de expressão nas glândulas profundas (círculo) e resposta intensa nas células estromais superficiais e profundas (setas). Imunohistoquímica. Aumento: 100x.	57
Figura 12 – Endométrio equino durante a fase de diestro. Receptores para progesterona. Expressão evidente nas glândulas profundas (setas). Imunohistoquímica. Aumento: 100x.	58
Figura 13 – Médias das porcentagens para receptores de estrógeno durante a fase de estro nas regiões do endométrio equino, nas diferentes categorias classificadas de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986).	59
Figura 14 – Médias das porcentagens para receptores de progesterona durante a fase de estro nas regiões do endométrio equino, nas diferentes categorias classificadas de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986).	59
Figura 15 – Médias das porcentagens para receptores de estrógeno durante a fase de diestro nas regiões do endométrio equino, nas diferentes categorias classificadas de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986).	60
Figura 16 – Médias das porcentagens para receptores de progesterona durante a fase de diestro nas regiões do endométrio equino, nas diferentes categorias classificadas de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986).	60
Figura 17 – Endométrio equino. Receptores para progesterona. Expressão hormonal presente em ninhos fibróticos. Imunohistoquímica. Aumento: 400x.	61
Figura 18 – Endométrio equino. Receptores para progesterona. Ausência de expressão hormonal em glândula na fibrose endometrial. Imunohistoquímica. Aumento: 400x.	61

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1 – Probabilidade da égua em levar a gestação a termo de acordo com a classificação histopatológica da biopsia endometrial (KENNEY e DOIG, 1986). 27

CAPÍTULO 2

Quadro 1 - Classificação histopatológica do endométrio de éguas segundo Kenney e Doig (1986). 44

Quadro 2 – Distribuição das 25 amostras de endométrio equino coletadas na fase de estro e classificadas de acordo com Kenney e Doig (1986). 48

Quadro 3 – Distribuição das 25 amostras de endométrio equino coletadas na fase de diestro e classificadas de acordo com Kenney e Doig (1986). 48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

@ – Arroba

α – alfa

β – beta

® – Marca registrada

Ang II – Angiotensina II

ANOVA – *Analysis of Variance*

DAB – Diaminobenzidina

D0 – Dia da ovulação

D8 – Oito dias após a ovulação

D18 – Dezoito dias após a ovulação

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EGF – *Epidermal Growth Factor*

FGF – *Fibroblast Growth Factor*

HRP – Horseradish Peroxidase

IL – Interleucina

MMPs – metaloproteinases

PAS – Ácido Periódico-Schiff

PDGF – *Platelet-Deriver Growth Factor*

RE – Receptor para estrógeno

RP – Receptor para progesterona

TGF – *Transforming Growth Factor*

TNF – *Tumor Necrosis Factor*

Tris – hidroximetil aminometano

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	14
1. INTRODUÇÃO	16
2. CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DAS FÊMEAS EQUINAS..	17
3. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO ENDOMÉTRIO EQUINO	18
4. AVALIAÇÃO DO ENDOMÉTRIO EQUINO	21
4.1 ENDOMETROSE	22
4.2 HISTOPATOLOGIA	25
4.3 HISTOQUÍMICA	28
4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA	29
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
6. REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2	39
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 TÉCNICA HISTOQUÍMICA – PICROSIRIUS RED	45
2.2 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA	45
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1 TÉCNICA HISTOQUÍMICA – PICROSIRIUS RED	54
3.2 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA	56
3.3 INFLUÊNCIA DO TIPO DE COLÁGENO PRESENTE NA FIBROSE ENDOMETRIAL NA EXPRESSÃO DE RECEPTORES HORMONAIS ESTERÓIDES	62
4. CONCLUSÕES	63
5. REFERÊNCIAS	63

CAPÍTULO 1

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO ENDOMÉTRIO
DE ÉGUAS – Uma revisão**

(Evaluation histopathology of mare's endometrium – A Review)

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS – Uma revisão

(Evaluation histopathology of mare's endometrium – A Review)

Diego Lunelli¹, Silvana Maris Cirio², Selene Cirio Leite³, Carlos Eduardo Camargo⁴,
Luiz Ernandes Kozicki⁵

¹ Médico Veterinário, Mestrado em Ciência Animal, PUCPR
dilunelli@hotmail.com

² Médica Veterinária Autônoma, Doutora
silvana.cirio@gmail.com

³ Médica Veterinária Autônoma, Mestranda
selene_leite@gmail.com

⁴ Médico Veterinário, Mestre, Professor do Curso de Medicina Veterinária da PUCPR
kadu_camargo@hotmail.com

⁵ Médico Veterinário, Doutor, Professor do Mestrado em Ciência Animal da PUCPR
kozicki.l@pucpr.br

RESUMO: A endometrose é uma das causas mais frequentes de infertilidade em éguas, comprometendo a função das glândulas envolvidas e consequentemente a nutrição do embrião/feto, podendo resultar em aborto. O exame histopatológico do endométrio é a técnica definitiva para o diagnóstico de endometrites e pode determinar a presença de alterações morfológicas, permitindo o prognóstico para a capacidade do útero de levar uma gestação a termo. O presente artigo tem como objetivo descrever as características reprodutivas das fêmeas equinas, assim como os métodos histoquímico e imunohistoquímico passíveis de aplicabilidade no endométrio equino, visando determinar a capacidade reprodutiva de éguas com problemas de fertilidade.

Palavras-chave: endometrose; histopatologia; imunohistoquímica; éguas

ABSTRACT: Endometrosis is one of the most common causes of infertility in mares, compromising the function of involved glands and consequently the nutrition of the embryo/fetus, may result in abortion. The endometrium histopathology is the definitive technique for diagnosis of endometritis and may determine the presence of morphological changes, allowing the prognosis for the ability of the uterus to maintain a pregnancy. This article aims to describe the reproductive characteristics of female equine, as well as histochemical and immunohistochemical methods capable of application in the equine endometrium, to determine the reproductive capacity of mares with fertility problems

Key-words: endometrosis; histopathology; immunohistochemistry; mares

1. INTRODUÇÃO

Por muito tempo, a fertilidade da espécie equina tem sido considerada como a menor entre as espécies domésticas, fato este associado especialmente a problemas relacionados ao manejo reprodutivo (GINTHER, 1992; PORTO, 2006). A infertilidade é um dos maiores problemas na reprodução equina, causando substancial perda econômica pela redução na produção anual de potros (CONCHA-BERMEJILLO e KENNEDY, 1982). Segundo Walter *et al.* (2001) a endometrose é uma das razões mais frequentes da infertilidade em éguas, levando a alterações graves dos tecidos conjuntivo e glandular uterinos. Atualmente, a etiopatogenia desta alteração uterina permanece desconhecida (HOFFMANN *et al.* 2009a).

O útero é um órgão central para a reprodução, permitindo e favorecendo o acesso do espermatozóide até o oviduto, sendo altamente capacitado e adaptado a reconhecer e nutrir o produto da fertilização, desde a implantação até o parto (ROSSDALE, 1997; HAFEZ e JAINUDEEN, 2000). Devido ao papel desempenhado por este órgão, o seu estudo fornece informações que contribuem para o entendimento da sua fisiologia, assim como favorece a avaliação da fertilidade na espécie equina.

A biopsia endometrial fornece amostras representativas para o estudo histológico do endométrio equino, permitindo observar modificações histofisiológicas e até mesmo avaliar a real capacidade reprodutiva de éguas com problemas de fertilidade ou com idade avançada (KENNEY, 1978). Algumas alterações uterinas, como a fibrose periglandular e as endometrites não purulentas, só são diagnosticáveis através deste procedimento (KELLER *et al.*, 2004).

Com o desenvolvimento de métodos de histoquímica e imunohistoquímica, a avaliação histopatológica ganhou uma ferramenta de enorme utilidade, resultando em grandiosos avanços para o diagnóstico e prognóstico de animais subférteis ou inférteis, possibilitando aplicar biotécnicas da reprodução e contornar estes problemas. Desta maneira, o presente artigo tem por objetivo descrever as características reprodutivas das fêmeas equinas, assim como de métodos histoquímicos e imunohistoquímicos aplicados no

endométrio equino, a fim de determinar a capacidade reprodutiva de éguas com problemas de fertilidade.

2. CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DAS FÊMEAS EQUINAS

A égua é considerada poliéstrica estacional, demonstrando atividade cíclica sexual durante a primavera e verão em zonas de clima temperado e poucas são reprodutivamente ativas durante o outono e inverno, onde normalmente encontram-se sem atividade sexual, ou seja, em anestro (DAELS e HUGHES, 1993). Segundo Hafez e Hafez (2000), algumas éguas parecem ser poliéstricas anuais, porém não se encontra na literatura uma explicação plausível para estes acontecimentos.

O ciclo estral das éguas, com uma duração média de 22 dias, pode ser dividido em duas fases distintas: folicular ou estro; e luteal ou diestro. A duração da primeira varia de cinco a sete dias, correspondendo ao período em que ocorre a ovulação e as éguas encontram-se receptíveis ao garanhão, em decorrência do estrogênio secretado pelos folículos em desenvolvimento. O diestro tem uma duração de 14 a 15 dias e neste período a égua não está receptiva ao garanhão. O corpo lúteo formado após a ovulação secreta a progesterona e no final dessa fase sofrerá luteólise, normalmente de um a dois dias antes do início do estro (DAELS e HUGHES, 1993).

O útero da égua é composto por três camadas: endométrio (mucosa), miométrio (muscular) e perimétrio (serosa), sendo a mucosa revestida por células epiteliais que repousam sobre uma membrana basal. Abaixo do epitélio está a lâmina própria, a qual é dividida em estrato compacto, formado por células do estroma e capilares; e estrato esponjoso, composto por algumas células do estroma, artérias, veias, vasos linfáticos e glândulas endometriais (KENNEY, 1978).

O epitélio luminal é formado por uma camada simples de células, às vezes pseudoestratificado, que podem variar de cúbicas a colunares altas, dependendo da fase do ciclo estral. As alterações histológicas cíclicas no

endométrio são notáveis e podem ser usadas para detectar anormalidades cíclicas e hormonais (CAMP, 1988).

3. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO ENDOMÉTRIO EQUINO

Doig e Waelchli (1993) afirmam que as características histológicas, cíclicas ou estacionais, incluem a altura do epitélio luminal, configuração das glândulas e a quantidade de edema na lâmina própria.

Kenney (1978) relata que durante o anestro, o endométrio não está sob a influência de estrogênio e progesterona, o que determina a sua completa inatividade e sua quase total atrofia. O epitélio luminal é revestido por células cúbicas, as quais apresentam aumento da basofilia do citoplasma. A presença de edema na lâmina própria é incomum. As glândulas aparecem em grande quantidade e relativamente retas, sem tortuosidade e com epitélio colunar baixo a cúbico. Entre a junção do ducto com a porção superior de muitas glândulas, pode ocorrer o inspissamento de secreção.

No estro, as células epiteliais do lúmen e das glândulas são colunares a colunares altas (Figura 1), sendo que o epitélio luminal pode apresentar vacúolos na porção basal. Na lâmina própria pode existir edema considerável. A quantidade de glândulas por área é menor devido ao edema (Figura 2), e apresentam variação em seu formato. Em cortes transversais, as glândulas têm um diâmetro largo, enquanto que em longitudinais aparecem retas e sem tortuosidades. A presença de neutrófilos é frequente nos capilares abaixo do epitélio e ao longo da margem das veias da lâmina própria (DOIG e WAELCHLI, 1993).

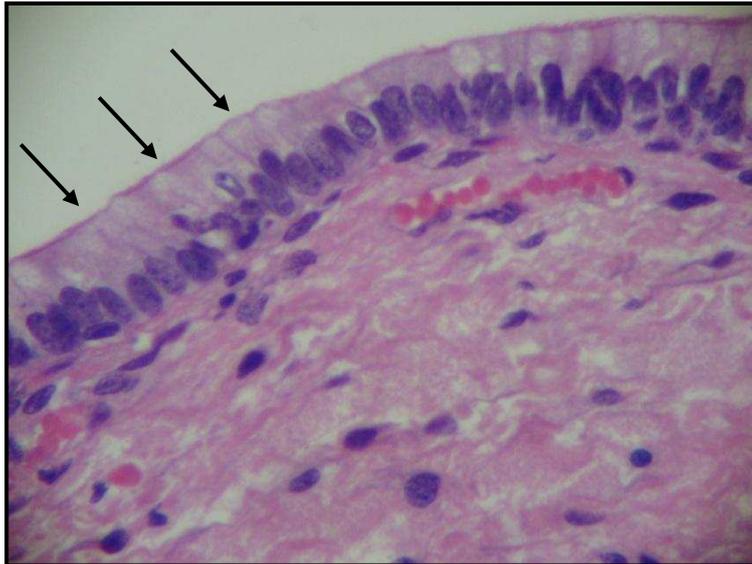


Figura 1 – Endométrio equino. Células colunares altas (setas) do epitélio luminal durante a fase de estro. Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 400x.



Figura 2 – Endométrio equino. Redução da concentração das glândulas endometriais (círculo) devido a presença de edema (seta) durante a fase de estro. Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 100x.

O diestro é caracterizado pela diminuição da altura das células epiteliais de colunares altas para baixas (Figura 3), devido ao aumento de progesterona e falta do estrogênio. Ocorre uma diminuição do edema da lâmina própria, o que torna as glândulas mais concentradas (Figura 4) e tortuosas (KENNEY,

1978). As ramificações glandulares, em cortes longitudinais, podem adotar uma aparência descrita como “string of pearls” (DOIG e WAELCHLI, 1993).

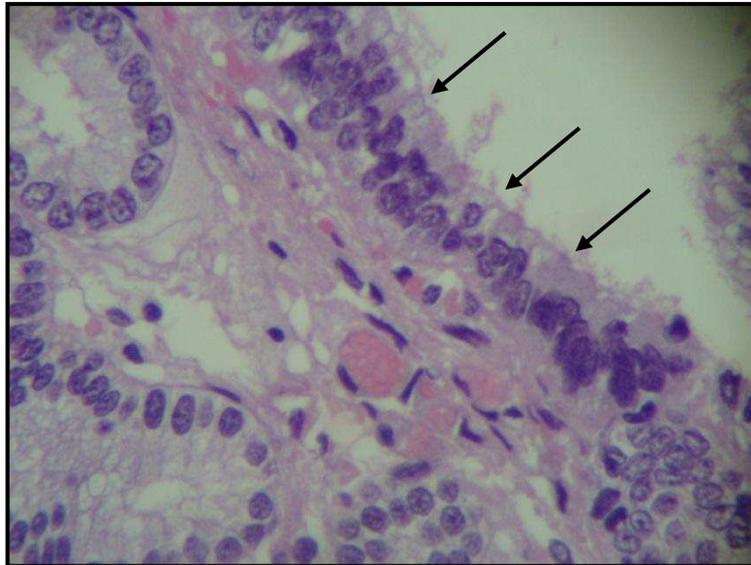


Figura 3 - Endométrio equino. Células colunares baixas (setas) do epitélio luminal durante a fase de diestro. Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 400x.



Figura 4 – Endométrio equino. Glândulas endometriais concentradas (círculo) devido a ausência de edema durante a fase de diestro. Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 100x.

4. AVALIAÇÃO DO ENDOMÉTRIO EQUINO

A endometrite é considerada uma das principais causas de infertilidade nas éguas, além de ser o problema de maior importância clínica nos equinos depois da cólica e das enfermidades do trato respiratório (TRAUB-DARGATZ *et al.*, 1991; TROEDSSON, 1999; LIU e TROEDSSON, 2008). Segundo Medice *et al.* (1991), o exame histopatológico do endométrio é a técnica definitiva para o diagnóstico de endometrites. Kenney (1975) afirma que este exame pode determinar a presença de alterações morfológicas, permitindo o prognóstico para a capacidade do útero de levar uma gestação a termo. O valor desta técnica é reconhecido internacionalmente na avaliação da fertilidade em éguas, especialmente naquelas que não apresentam sinais clínicos ou têm dificuldade para engravidar (DOIG *et al.*, 1981). Estudos mais recentes, comparando a biópsia endometrial a outras técnicas diagnósticas, concluem que a biópsia ainda é o método mais sensível e específico para o diagnóstico de endometrite na égua (LIU e TROEDSSON, 2008).

A investigação histopatológica tem demonstrado importância diagnóstica e prognóstica, tornando a biópsia o método mais preciso por permitir a avaliação da situação morfofuncional do endométrio (SCHOON e SCHOON, 2003). Além disso, com o desenvolvimento de técnicas de histoquímica e imunohistoquímica, a avaliação histopatológica ganhou ferramentas que podem contribuir para o diagnóstico de alterações uterinas e principalmente para estudos sobre os mecanismos patológicos que iniciam a endometrose.

Kenney (1992) substituiu o termo “endometrite degenerativa crônica” para endometrose, o qual engloba diferentes alterações do endométrio equino (SCHOON *et al.*, 1992). Este processo pode afetar glândulas isoladas, caracterizando a fibrose periglandular, ou pode formar ninhos glandulares, onde várias glândulas estão envolvidas por feixes de colágeno. Os estudos tentam elucidar a etiologia e a patogenia desta afecção, uma vez que esta é a principal causa da infertilidade na espécie equina (RAILA *et al.*, 1997;

HOFFMANN *et al.*, 2003; HOFFMANN *et al.*, 2009a; HOFFMANN *et al.*, 2009b).

4.1 ENDOMETROSE

Troedsson (1999) denomina a fibrose periglandular associada à dilatação glandular como endometrose ou endometrite degenerativa crônica, sendo esta uma condição observada não só em éguas suscetíveis a endometrite persistente, mas também naquelas com idade avançada sem histórico conhecido de inflamação. Isto sugere um processo fibroplásico degenerativo do endométrio e, portanto, muito mais uma consequência do envelhecimento do que da inflamação uterina. Desta forma, conforme progride a endometrose, possivelmente há diminuição da quantidade de glândulas endometriais, o que pode culminar com a atrofia endometrial (PORTO, 2009). Nas glândulas fibróticas, o epitélio se diferencia irregularmente, além de haver modificação das secreções glandulares. Portanto, nos casos mais severos, mesmo que ocorra implantação embrionária, a redução ou alteração dessas secreções podem causar a nutrição inadequada do feto, podendo resultar em aborto (WALTER *et al.*, 2001).

A forma pela qual a endometrose é desencadeada ainda não está completamente conhecida, porém Cadario *et al.* (2002) demonstraram que a expressão aumentada ou descontrolada de citocinas poderia estar envolvida no processo de formação da fibrose. O fator de crescimento transformante β (TGF- β) é uma citocina produzida predominantemente por células T, podendo também ser sintetizada por plaquetas, neutrófilos, ossos, placenta, rins, endométrio e células malignas (CHIN *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2005). Esse fator de crescimento é um potente estimulante da produção de matriz extracelular *in vivo* e está envolvido na síntese de colágeno pelos fibroblastos (KAPOOR *et al.*, 2006). Ganjam e Evans (2006) relataram que as concentrações de TGF- β 1 aumentaram proporcionalmente com o grau de severidade da fibrose periglandular, sugerindo um suposto papel desta citocina na progressão do

processo (SUN *et al.*, 1997). Segundo Porto (2009) o TGF- β 1 está presente nos endométrios normais e com alterações inflamatórias e degenerativas, porém em seu estudo não observou relação entre a sua presença e a gravidade das endometrites, nem com o tipo de apresentação morfológica, tampouco com a proliferação celular e apoptose.

As metaloproteinases (MMPs) são enzimas que degradam alguns componentes da matriz extracelular como proteoglicanas, glicoproteínas e colágenos da membrana basal, estando envolvidas em processos fisiológicos de reparação tecidual, mas normalmente aparecem em processos fibróticos (OSTEEN *et al.*, 1994; ZHANG e SALAMONSEN, 2002). A produção dessas enzimas é regulada por fatores que induzem (IL-1, TNF- α , TGF- α , EGF, FGF e PDGF) ou suprimem (TGF- β e IL-4) a transcrição dos genes (RA e PARKS, 2007). Estudos recentes afirmam que o grau de expressão do TGF- β 1 não foi relacionado a expressão maior ou menor de MMPs no endométrio de éguas (PORTO, 2009).

Pacientes humanos com doença cardíaca hipertensiva apresentam acúmulo excessivo de colágeno fibrilar (WEBER e BRILLA, 1991). Nestes pacientes, elevados níveis sanguíneos de angiotensina II (Ang II), TGF- β 1 e/ou aldosterona tem sido observado. Estudos de cultivo celular utilizando fibroblastos cardíacos confirmaram o papel da Ang II, TGF- β 1 e aldosterona na produção de colágeno fibrilar (OU *et al.*, 1996; SUN *et al.*, 1997). Na fibrose endometrial, Ganjam e Evasn (2006) concluíram que a angiotensina II inicia a expressão do TGF- β 1 resultando na transformação dos miofibroblastos.

Os fibroblastos são as principais células envolvidas na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Além de produzirem colágeno, os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico da célula (HILDEBRAND *et al.*, 2005). Muitos destes fibroblastos adquirem alguns aspectos morfológicos e bioquímicos de células musculares lisas, sendo denominados miofibroblastos (DESMOULIE`RE e GABBIANI, 1996).

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

contração da ferida (TOMASEK *et al.*, 2002). Hoffmann *et al.* (2009a) relatam que as células estromais da fibrose periglandular são aptas a secretar componentes da matriz extracelular e fibronectina, contribuindo ainda mais para o acúmulo da matriz nesta região. Estes mesmos autores afirmam que algumas destas células expressam moléculas que as caracterizam fenotipicamente como miofibroblastos. Masseno (2009) afirma que este tipo celular está presente no endométrio de éguas normais e portadoras de lesões crônicas endometriais, se localizando preferencialmente ao redor de estruturas glandulares, sendo mais expressiva a sua presença nos processos crônicos endometriais. Além disso, o maior acúmulo de miofibroblastos coincidiu com as regiões onde ocorre a deposição de colágeno denso (tipo I), indicando sua relação com o processo fibrótico.

Raila *et al.* (1997) afirmam que o início da endometrose é caracterizado pela presença de feixes periglandulares de colágeno e camadas concêntricas de fibroblastos e fibrócitos, sendo que estágios precoces não podem ser reconhecidos por microscopia óptica. Este processo está mais relacionado ao avanço da idade do que ao número de partições (RICKETTS e ALONSO, 1991). Keller *et al.* (2004) afirmam que 30% das éguas com menos de 9 anos apresentam endometrose, mas nenhuma com grau severo; éguas com idade entre 9 e 14 anos, 60% apresentam esta alteração; e nas éguas com mais de 14 anos, 90% o processo está em progressão.

As inflamações do endométrio causadas por infecções uterinas repetidas ou persistentes podem desenvolver a fibrose periglandular (KENNEY, 1975; CARNEVALE e GINTHER, 1992). Porto (2006) verificou que, entre as lesões encontradas nas endometrites mais graves, as alterações fibróticas foram as mais frequentemente observadas, sendo verificadas nas regiões periglandular, intersticial e perivascular. Estudos sobre a classificação dos tipos de colágeno e tipificação do infiltrado inflamatório procuram caracterizar o processo (NUNES, 2003), enquanto pesquisas mais recentes envolvendo enzimas envolvidas na degradação da matriz extracelular, a caracterização das células que estão presentes na fibrose periglandular e sua associação com fatores que promovem a fibrólise buscam elucidar parte de sua patogênese ainda não totalmente compreendida (NUNES, 2006; PORTO, 2006; MASSENO, 2009).

4.2 HISTOPATOLOGIA

Os padrões de distribuição da fibrose e do infiltrado inflamatório são as principais características para o diagnóstico das endometrites (DOIG *et al.*, 1981), sendo que a infecção e inflamação transitórias do endométrio são consequências inevitáveis da cobertura, ocorrendo tanto por inseminação artificial como monta natural. A instalação dessa reação inflamatória aguda é induzida pela deposição de sêmen e pela contaminação bacteriana que ocorre durante o coito (KATILA, 1996). Esta endometrite aguda transitória é considerada fisiológica, devendo estar completamente sanada em 36-48 horas após a cobertura nas éguas resistentes, devido a mecanismos de defesa eficientes. Em algumas éguas, denominadas de susceptíveis, este processo pode não ocorrer e a inflamação passa a ser patológica, sendo este quadro denominado endometrite persistente pós-cobertura (MALSCHITZKY *et al.*, 2007). Em processos inflamatórios agudos, os neutrófilos estão presentes no epitélio luminal e no estrato compacto, raramente invadem camadas mais profundas. Em inflamações crônicas, o infiltrado linfocitário é observado nos estratos compacto e esponjoso, sendo que os plasmócitos são menos comuns (KENNEY e DOIG, 1986).

A fibrose é um processo de reparação do tecido lesionado, sendo este substituído por tecido conjuntivo formando de células e da matriz extracelular. Esta matriz representa um complexo dinâmico de macromoléculas no qual se incluem o colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas. Alterações fisiológicas ou patológicas nessa matriz resultam no desequilíbrio da degradação e síntese desses componentes da matriz (UENO *et al.*, 1996). A fibrose é um dos principais elementos da reação tecidual, no endométrio uma vez que o processo se inicia, continua a despeito da cessação da injúria, caracterizando-se então por ser progressiva e irreversível (RICKETTS e ALONSO, 1991). Sabe-se que os processos fibróticos apresentam condições distintas do tecido normal, as quais levam a modificações do padrão de proliferação celular e morte por apoptose (CHUJO *et al.*, 2009). Desta maneira, a determinação de seu arranjo, localização e composição são importantes para

se avaliar o grau de comprometimento do endométrio e as chances de regressão da lesão já estabelecida (NUNES, 2003).

A fibrose periglandular compromete seriamente a função das glândulas envolvidas, devido à separação do epitélio da rede capilar subjacente. O fato de que o colágeno interfere com a integridade do epitélio é evidenciado pela hipertrofia epitelial observada em estágios iniciais, e pela atrofia e pleomorfismo em estágios avançados. Quando a fibrose ocorre logo abaixo da membrana basal do epitélio luminal, também é possível observar uma interferência na associação íntima dos capilares com as células epiteliais (KENNEY, 1978). Essa alteração compromete a integridade e a função das glândulas endometriais, estruturas necessárias desde o período de pré-implantação embrionária até o desenvolvimento placentário completo, por serem responsáveis pela síntese e secreção de substâncias histotróficas (GRAY *et al.*, 2001).

A dilatação cística das glândulas frequentemente é encontrada em fibroses periglandulares (KENNEY, 1978; DOIG e WAELCHLI, 1993). Porém, a mesma também pode ser observada sem qualquer evidência de fibrose com inspissamento de secreção, o que é característico do anestro e período transicional. Em alguns casos, o número de glândulas dilatadas durante o transicional pode ser bastante elevado, com o endométrio adquirindo aparência de “queijo Suíço”. Entretanto, na maioria dos casos, ocorre o desaparecimento dessas glândulas quando inicia a temporada de monta. Se ocorrer a persistência da dilatação cística glandular não fibrótica sem o material inspissado, a fertilidade pode estar comprometida (DOIG e WAELCHLI, 1993). A dilatação cística glandular ou figuras mitóticas no epitélio glandular podem estar associadas à inflamação crônica ou irritação endometrial (LEBLANC, 2008).

Baseado na incidência e extensão das alterações histopatológicas, Kenney (1978) propôs um modelo de classificação das endometrites crônicas em três categorias. Na Categoria I não existem alterações patológicas ou quando presentes, estas são discretas e focais. Na Categoria II é possível observar, de forma leve a moderada, infiltrado inflamatório difuso no estrato compacto ou focos isolados no estrato compacto e esponjoso, além de ninhos fibróticos e lacunas linfáticas. Na Categoria III, o infiltrado inflamatório

apresenta-se de forma moderada a grave, a quantidade de fibrose é intensa e as lacunas linfáticas presentes são palpáveis via retal.

Kenney e Doig (1986) reclassificaram as endometrites em quatro categorias, subdividindo a categoria II em IIA e IIB. Na categoria IIA o infiltrado inflamatório é difuso no estrato compacto ou focal nos estratos compacto e esponjoso; numerosas glândulas apresentam fibrose, onde o número de camadas varia de uma a três; lacunas linfáticas também estão presentes. Na categoria IIB o infiltrado inflamatório é mais difuso ou multifocal, a fibrose está presente, porém o número de camadas é superior a quatro. Estes mesmos autores ainda relataram a probabilidade da égua em levar a gestação a termo de acordo com a classificação histopatológica da biopsia endometrial (Quadro 1).

Quadro 1 – Probabilidade da égua levar a gestação a termo de acordo com a classificação histopatológica da biopsia endometrial (KENNEY e DOIG, 1986).

CATEGORIA DA BIOPSIA ENDOMETRIAL	CAPACIDADE DA ÉGUA
I	80 – 90%
IIA	50 – 80%
IIB	10 – 50%
III	10%

Ricketts e Alonso (1991) propuseram outro modelo de classificação para as endometrites, baseado na presença ou ausência de infiltrado mononuclear. Aquelas que apresentam sinais de inflamação foram denominadas de endometrite crônica infiltrativa, enquanto que aquelas com ausência de infiltrado inflamatório, porém com alterações fibróticas, foram denominadas de endometrite degenerativa crônica ou endometrose. A formação da fibrose neste processo ocorre devido à alteração do depósito de colágeno na membrana basal do epitélio luminal, no estrato compacto e esponjoso, podendo levar a formação de ninhos glandulares de tamanhos variados. O número de camadas e a frequência de aparecimento de focos fibróticos na amostra podem ser utilizados para determinar a severidade (KENNEY e DOIG, 1986).

4.3 HISTOQUÍMICA

O colágeno presente na fibrose endometrial pode ser identificado através da técnica histoquímica do Tricrômico de Masson ou Tricrômico de Mallory, onde a fibroplasia é observada pela coloração azul. O Tricrômico de Shorr também evidencia a presença de fibras colágenas, porém com a coloração verde-claro (BEHMER, 1976; BLANCHARD, 1987). A tipificação do colágeno pode ser realizada para determinar a cronologia da lesão, sendo que em processos reparativos e fibróticos, o colágeno tipo III é o primeiro a ser depositado, o qual será posteriormente substituído pelo do tipo I (MARTINEZ-HERNANDES, 1999; BOCHSLER e SLAUSON, 2002). O Picrosirius Red é um método utilizado para essa tipificação, o qual diferencia os colágenos pela intensidade da birrefringência das fibras em microscópio óptico de luz polarizada. Dessa forma, diferentes tonalidades são observadas conforme o tipo de arranjo molecular presente, onde o colágeno tipo III aparece com coloração verde, enquanto que o do tipo I com amarela a avermelhada (JUNQUEIRA et al., 1978; MONTES e JUNQUEIRA, 1991; BORGES et al., 2007). Schlafer (2007) afirma que este método histoquímico é promissor na avaliação do endométrio equino no que diz respeito à fibrose. Nunes (2003) empregou este método em amostras endometriais e comprovou que o colágeno do tipo I foi mais frequente nas lesões fibróticas periglandulares nas biopsias que apresentavam lesões mais graves.

Outro método capaz de diferenciar o colágeno presente na fibrose é a técnica da Reticulina, onde as fibras reticulares formadas por proteína colágena são argirofílicas, ou seja, podem ser coradas com prata para serem distinguidas de outras fibras do tecido conjuntivo (BACHA JUNIOR e BACHA, 2003). Porto (2006) relata que através deste método é possível distinguir a membrana basal tanto na região subepitelial como das glândulas endometriais, sendo nítida a diferenciação dos tipos de colágeno devido a sua característica argirófila (tipo III) e não argirófila (tipo I).

A coloração azul de Alcian pode ser empregada para determinar componentes da matriz extracelular, como as glicoproteínas e as

proteoglicanas, também denominadas de glicoconjugados. Essas proteínas sintetizadas pelos fibroblastos estão dispostas entre as células e as fibras do tecido conjuntivo. Quando da presença de degeneração desse tecido, ocorre a destruição dessas proteínas, determinando grandes áreas de concentração da coloração azul, o que não acontece no tecido normal (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995; TROYER, 1980). O pH é importante para este tipo de coloração, pois os glicoconjugados que possuem radicais carboxilados necessitam de pH 2,5 para serem corados, enquanto que aqueles com radicais sulfatados se coram no pH 2,5 e 0,5 (LEV e SPICER, 1964).

Segundo Walter *et al.* (2001) em éguas com degeneração endometrial crônica, os padrões dos glicoconjugados das glândulas uterinas demonstram alteração. Hoffmann *et al.* (2009a) também relataram que ocorre deposição de proteoglicanas dentro da matriz extracelular fibrótica de éguas com endometrose.

Os mucopolissacarídeos estão presentes no endométrio, porém sua função é desconhecida. Sabe-se que ocorre aumento deles durante o processo inflamatório, sugerindo um envolvimento no *clearance* de bactérias e patógenos (BRUNCKHORST *et al.*, 1991). Com a coloração de azul de Alcian, Hoffmann *et al.*, (2009b) observaram diferentes concentrações de mucopolissacarídeos nas endometroses, porém uma significativa correlação entre a expressão destes e o grau da endometrose não foi confirmado. No mesmo estudo, estes autores utilizaram a coloração de ácido periódico-Schiff (PAS) para identificar a presença de glicogênio dentro das glândulas epiteliais.

4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

A técnica de imunohistoquímica se tornou uma ferramenta de enorme utilidade, permitindo avanços espetaculares para o diagnóstico de algumas enfermidades, assim como contribuindo para a avaliação histopatológica. (GIMENO, 1995). No endométrio equino esta técnica já foi empregada por Mansour *et al.* (2003) para estudar componentes da matriz extracelular. Estes

autores afirmam que não existe diferença na expressão de colágeno tipo IV, laminina e fibronectina durante as fases ciclo estral. O colágeno tipo IV esteve presente na membrana basal das glândulas endometriais e do epitélio luminal, assim como nos vasos sanguíneos. A expressão da laminina foi observada na membrana basal das glândulas endometriais e dos vasos sanguíneos. No interstício e nos vasos sanguíneos do endométrio, a fibronectina estava presente. Aupperle *et al.* (2004) avaliaram 151 biopsias endometriais para determinar a expressão de filamentos intermediários e observou que a expressão destes diferiu na endometriose quando comparado com endométrios normais ou aqueles com endometrites.

A presença da fibrose endometrial pode comprometer a expressão de receptores hormonais. Hoffmann *et al.* (2009a) relataram que as células estromais da fibrose periglandular expressam receptores hormonais de forma inadequada. Como resultado estas células tornam-se incapazes de responder aos estímulos endócrinos cíclicos e tornam-se independentes dos mecanismos de controle hormonais do útero. O mesmo fato já havia sido comprovado por Aupperle *et al.* (2000), os quais afirmaram que a expressão de receptores de estrógeno e progesterona em glândulas fibróticas é menor quando comparada com áreas não afetadas pela fibrose.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação histopatológica do endométrio de fêmeas equinas é considerada o método definitivo para o diagnóstico da endometriose, assim como para o prognóstico da capacidade do útero em levar uma gestação a termo. Atualmente, com o desenvolvimento de técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas, a avaliação histopatológica ganhou ferramentas de enorme utilidade, resultando em grandiosos avanços no que diz respeito à identificação de animais com problemas de fertilidade. Desta forma, a aplicação do método histoquímico de Picrosirius Red, o qual permite a tipificação de colágeno e conseqüentemente a cronologia da lesão, associado à imunohistoquímica para a identificação de receptores hormonais, pode

contribuir para avaliar a real capacidade reprodutiva de éguas com endometrose.

6. REFERÊNCIAS

AUPPERLE, H.; OZGEN SCHOON, H.A.; SCHOON D.; HOPPEN H.O.; SIEME H.; TANNAPFEL A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, p. 228-232, 2000.

AUPPERLE, H., SCHOON, D., SCHOON, H.A. Physiological and pathological expression of intermediate filaments in the equine endometrium. **Research of Veterinary Science**, v. 76, p. 249–255, 2004.

BACHA JÚNIOR, W. J.; BACHA, L. M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2ª ed. São Paulo: Roca. 2003. 457 p.

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

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

BORGES, L.F.; GUTIERREZ, P.S.; MARANA, H.R.C.; TABOGA, S.R. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapsed lesions. **Micron**, v.38, p.580-583, 2007.

BRUNCKHORST, D.; SCHOON, H. A.; BADER, H.; SIEME, H. Morphologische, enzym- und immunhistochemische Charakteristika des endometrialen Zyklus bei der Stute. Abstract. **Fertilität**, v. 07, p. 44-51, 1991.

CADARIO, M. E.; LOSINNO, L.; GIGUERE, S.; AGUILAR, J.; JACK, T.J.; MACPHERSON, M.; FITZPATRICK, C.; UHL, E.W. Uterine expression of fibrogenic cytokines in the mare. **Theriogenology**, v. 58, p. 449-452, 2002.

CAMP, S. D. V. Endometrial biopsy of the mare. In: CAMP, S. D. V. **The Veterinary Clinics of North America**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1988. p. 229-245.

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v. 37, p. 1101-1115, 1992.

CHIN, D., BOYLE, G.M., PARSONS, P.G., COMAN. W.B. What is transforming growth factor-beta (TGF- β)? **The British Association of Plastic Surgeons**, v. 57, p. 215-21, 2004.

CHUJO, S., SHIRASAKI, F., KONDO-MIYAZAKI, M., IKAWA, Y., TAKEHARA, K. Role of connective tissue growth factor and its interaction with basic fibroblast growth factor and macrophage chemoattractant protein-1 in skin fibrosis. **Journal of Cellular Physiology**, v.220, p. 189-95, 2009.

CONCHA-BERMEJILLO, A.; KENNEDY, P.C. Prognostic value of endometrial biopsy in the mare: a retrospective analysis. **Journal of the American Veterinary Medical Association** v. 181, p. 680-681, 1982.

DAELS, P. F.; HUGHES, J. P. The normal estrous cycle. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. p. 121-132.

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

DOIG, P. A.; WAELCHLI, R. O. Endometrial Biopsy. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. p. 225-233.

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

GANJAM, V.K., EVANS, T.J. Equine endometrial fibrosis correlates with 11 β -HSD2, TGF- β 1 and ACE activities. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 248, p. 104-8, 2006.

GIMENO, E.J. Fundamentos de Imunohistoquímica Aplicada a Patologia Veterinária. In: 7 ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 7., 1995, Belo Horizonte. **Proceedings...**1995, 35 p.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects**. 2nd ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1992.

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

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2000.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M.R. **Reproductive Cycles**. In: HAFEZ, E.S.E.; Williams & Wilkins, 2000. p. 55-66.

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

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

HOFFMANN, C., ELLENBERGER, C., MATTOS, R.C., AUPPERLE, H., DHEIN, S., STIEF, B., SCHOON, H.-A. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. **Animal Reproduction Science**, v.111, p.261-78, 2009a.

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

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

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 8ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1995. 433p.

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

KAPOOR, M., NOMIYAMA, T., BRUEMMER, D., KOJIMA, F., CROFFORD, L.J. Growth factors and cytokines: emphasis on their role in wound healing and atherosclerosis. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 17, p. 13-20, 2006.

KATILA, T. Uterine defence mechanisms in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 197-204, 1996.

KELLER, A.; PIRES, A.N.; AUPPERLE, H.; STEIGER, K.; SCHOON, H.A.; KLUG, E.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Exame histopatológico do endométrio da égua após infecções experimentais repetidas e cinco diferentes tratamentos: aspectos inflamatórios. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 215-223, 2004.

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

KENNEY, R. M. Prognostic value of endometrial biopsy of the mare. **Journal of the Reproduction and Fertility**, supl. 23, p. 347-348, 1975.

KENNEY, R.M. The aetiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis. In: Hughes, J.P (Ed.), Workshop on Equine Endometritis. Newmarket, UK. **Equine Veterinary Journal**. v. 25, p. 186, 1992.

KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D. A. **Current Therapy in Theriogenology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 723-729.

LEBLANC, M.M. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. **Theriogenology**, v.70, n.3, p.421-9, 2008.

LEV, R., SPICER, S. S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v. 12, p. 309, 1964.

LIU, I.K.M., TROEDSSON, M.H.T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: yesterday and today. **Theriogenology**, v.70, n.3, p.415-20, 2008.

LU, L., SAULIS, A.S., LIU, W.R., ROY, N.D., CHAO, J.D., LEDBETTER, S., MUSTOE, T.A. The temporal effects of anti-TGF- β 1, 2 and 3 monoclonal antibody on wound healing and hypertrophic scar formation. **Journal of American College of Surgeons**, v. 201, p. 391-7, 2005.

MALSCHITZKY, E. JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Endometrite na égua, novos conceitos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 17-26, 2007.

MANSOUR, G.D.; HENRY, M.; FERREIRA, A.M.R. Immunoistochemical study of equine endometrial extracellular 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.

MASSENHO, A.P.B. **Caracterização imunoistoquímica dos miofibroblastos endometriais e da expressão de MMP-2 nas endometrites crônicas das éguas**. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009. 69 p.

MEDICE, E.B., MERKT, H., POLHENS, J.F., BRUNKHORST, D. Considerations on the use of ancillary diagnostic aids in the diagnosis of endometritis due to infection in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl., v. 44, p. 700-3, 1991.

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

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

NUNES, L.C. **Expressão de metaloproteinases, TIMP-1 e da esclerose vasculares endometrites crônicas das éguas.** Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006. 84 p.

OSTEEN, K.G., RODGERS, W.H., GAIRE, M., HARGROVE, J.T., GORSTEIN, F. Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 91, p. 10129-33, 1994.

OU, R., SUN, Y., GANJAM, V.K., WEBER, K.T. In situ production of angiotensin II by fibroblasts in rat myocardium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 28, p.1319–1327, 1996.

PORTO, C.D. **Caracterização histoquímica do colágeno e expressão de MMP- 2, MMP-9 e TIMP-1 nas endometrites crônicas das éguas.** Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006. 102 p.

PORTO, C.D. **Expressão de TGF- β 1, metaloproteinases e avaliação dos índices de proliferação celular e apoptótico nas endometrites crônicas das éguas.** Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009. 125 p.

RA, H.-J., PARKS, W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biology**, v.26, n.8, p.587-96, 2007.

RAILA, G.; SCHOON, H.A.; WREDE, S.; KLUG, E. Pathogenesis of equine endometrosis – an ultrastructural investigation. Abstract. **Pferdeheilkunde**, v.13, p. 550-551, 1997

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

ROSSDALE, D. The uterus, an organ of many roles. Abstract. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 427-439, 1997.

SCHLAFER, D.H. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? **Theriogenology**, v.68, p.413-22, 2007.

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

SCHOON, H.-A., SCHOON, D. The category I mare (Kenney and Doig 1986): Expected foaling rate 80-90% - fact or fiction? Abstract. **Pferdeheilkunde**, v.19, n.6, p.698-701, 2003.

SUN, Y., RAMIRES, F.J., ZHOU, G., GANJAM, V.K., WEBER, K.T. Fibrous tissue and angiotensin II. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 29, p. 2001–2012, 1997.

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

TRAUB-DARGATZ, J.L., SALMAN, M.D., VOSS, J.L. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 10, p. 1745-7, 1991.

TROEDSSON, M.H.T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, p. 461-71, 1999.

TROYER, H. **Principles and techniques of histochemistry**, Boston, Little, Brown, 1980. 431p.

UENO, T., TAMAKI, S., SUGAWARA, H., INUZUKA, S., TORIMURA, T., SATA, M., TANIKAWA, K. Significance of serum tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in various liver diseases. **Journal of Hepatology**, v.24, p.177-84, 1996.

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

WEBER, K.T., BRILLA, C.G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin–angiotensin–aldosterone system. **Circulation**, v. 83, p. 1849–1865, 1991.

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.

CAPÍTULO 2

**CORRELAÇÃO ENTRE OS TIPOS DE COLÁGENO E A
EXPRESSÃO DE RECEPTORES HORMONAIS ESTERÓIDES NA
FIBROSE ENDOMETRIAL EQUINA**

CORRELAÇÃO ENTRE OS TIPOS DE COLÁGENO E A EXPRESSÃO DE RECEPTORES HORMONAIS ESTERÓIDES NA FIBROSE ENDOMETRIAL EQUINA

(Correlation between collagen types and expression of steroid hormone receptors in equine endometrial fibrosis)

Diego Lunelli¹, Silvana Maris Cirio², Selene Cirio Leite³, Carlos Eduardo Camargo⁴, Luiz Ernandes Kozicki⁵

¹ Médico Veterinário, Mestrado em Ciência Animal, PUCPR
dilunelli@hotmail.com

² Médica Veterinária Autônoma, Doutora
silvana.cirio@gmail.com

³ Médica Veterinária Autônoma, Mestranda
selene_leite@gmail.com

⁴ Médico Veterinário, Mestre, Professor do Curso de Medicina Veterinária da PUCPR
kadu_camargo@hotmail.com

⁵ Médico Veterinário, Doutor, Professor do Mestrado em Ciência Animal da PUCPR
kozicki.l@pucpr.br

RESUMO: A endometrose é caracterizada pela presença da fibrose periglandular e/ou ninhos fibróticos, os quais podem comprometer a expressão de receptores hormonais, o que torna as células envolvidas incapazes de responder aos estímulos endócrinos cíclicos. Desta maneira, o presente estudo teve por objetivo determinar a influência do tipo de colágeno (I ou III) presente na fibrose endometrial, na expressão de receptores de estrógeno e progesterona durante as fases de estro e diestro. Foram utilizadas 25 biopsias endometriais, de cada fase do ciclo estral, classificadas histologicamente de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986). Através da técnica histoquímica do Picosirius Red o colágeno foi tipificado e quantificado; e pela imunohistoquímica os receptores hormonais esteróides foram identificados. Os resultados evidenciaram predomínio do colágeno tipo III em todas as amostras endometriais, independente da classificação em categorias. Observou-se que a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona variou de acordo com a fase do ciclo estral nas regiões avaliadas. Além disso, neste estudo foi possível concluir que o tipo de colágeno presente na fibrose endometrial não interferiu na expressão de receptores esteróides.

Palavras-chave: endometrose; Picosirius Red; imunohistoquímica; éguas

ABSTRACT: The endometrosis is characterized by the presence of periglandular fibrosis and/or fibrotic nests, which can compromise hormonal receptors expression, making the involved cells unable to respond to the cyclical endocrine stimuli. Thus, the aim of this study is determinate the influence of collagen type (I or III) present in endometrial fibrosis at the expression of estrogen and progesterone receptors during estrus and diestrus stages. Were used 25 endometrial biopsies, of each estrous cycle, histologically

classified according to the criteria by Kenney & Doig (1986). By Picrosirius Red histochemistry technique, the collagen was typed and quantified, and by immunohistochemistry the steroid hormone receptors has been identified. The results showed the predominance of type III collagen in all endometrial samples, regardless of the categorization. It was observed that the estrogen and progesterone receptors expression varied with the estrous cycle stage in the evaluated regions. Furthermore, in this study it was possible to conclude that the collagen type present in endometrial fibrosis did not affect the steroid receptors expression.

Key-words: endometriosis; Picrosirius Red; immunohistochemistry; mares

1. INTRODUÇÃO

A endometriose é caracterizada pela presença da fibrose periglandular, comprometendo seriamente a função das glândulas envolvidas, devido à separação do epitélio da rede capilar subjacente. O fato de que o colágeno interfere com a integridade do epitélio é evidenciado pela hipertrofia epitelial observada em estágios iniciais, e pela atrofia e pleomorfismo em estágios avançados. Quando a fibrose ocorre logo abaixo da membrana basal do epitélio luminal, também é possível observar uma interferência na associação íntima dos capilares com as células epiteliais (KENNEY, 1978). Essa alteração compromete a integridade e a função das glândulas endometriais, estruturas necessárias desde o período de pré-implantação embrionária até o desenvolvimento placentário completo, por serem responsáveis pela síntese e secreção de substâncias histotróficas (GRAY *et al.*, 2001).

O início da endometriose é determinado pela presença de feixes periglandulares de colágeno e camadas concêntricas de fibroblastos e fibrócitos, sendo que estágios precoces não podem ser reconhecidos por microscopia óptica (RAILA *et al.*, 1997). O tipo de colágeno presente na endometriose expressa a cronologia da lesão, sendo que em processos reparativos e fibróticos, o colágeno tipo III é o primeiro a ser depositado, o qual será posteriormente substituído pelo do tipo I (MARTINEZ-HERNANDES, 1999; BOCHSLER e SLAUSON, 2002). O *Picrosirius Red* é uma técnica utilizada para essa tipificação, o qual diferencia os colágenos pela intensidade da

birrefringência das fibras em microscópico óptico de luz polarizada. Dessa forma, diferentes tonalidades são observadas conforme o tipo de arranjo molecular presente, onde o colágeno tipo III aparece com coloração verde, enquanto que o do tipo I com amarela a avermelhada (JUNQUEIRA *et al.*, 1978; MONTES e JUNQUEIRA, 1991; BORGES *et al.*, 2007). Segundo Schlafer (2007) este método histoquímico é promissor na avaliação do endométrio equino no que diz respeito à fibrose. Nunes (2003) empregou esta técnica em amostras endometriais e comprovou que o colágeno do tipo I foi mais frequente nas lesões fibróticas periglandulares nas biopsias que apresentavam lesões mais graves.

A presença da fibrose endometrial pode comprometer a expressão de receptores hormonais. Hoffmann *et al.* (2009) relatam que as células estromais da fibrose periglandular expressam receptores hormonais de forma inadequada. O mesmo fato já havia sido relatado por Aupperle *et al.* (2000), os quais afirmaram que a expressão de receptores de estrógeno e progesterona em glândulas fibróticas é menor quando comparada com áreas não afetadas pela fibrose.

Com o desenvolvimento de técnicas de imunohistoquímica, a avaliação histopatológica ganhou uma ferramenta de enorme utilidade, resultando em grandiosos avanços para o diagnóstico e prognóstico de animais com problemas de fertilidade. Sendo assim, a determinação da quantidade de fibrose endometrial e a detecção de receptores hormonais em éguas com idade avançada ou com histórico de infertilidade, podem contribuir para o prognóstico reprodutivo das mesmas, possibilitando aplicar biotécnicas da reprodução e contornar os problemas de fertilidade. Desta maneira, o presente estudo teve por objetivo determinar as áreas de colágeno tipo I e III presentes na fibrose endometrial, correlacionando-os com a expressão de receptores de estrógeno e progesterona durante as fases de estro e diestro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, foram utilizadas 25 fêmeas equinas, SRD, sem histórico de infertilidade, com idade entre cinco e 17 anos. Duas amostras foram coletadas de cada égua, sendo uma na fase de estro e outra no diestro, totalizando 50 biopsias endometriais. Para isso, o controle folicular ovariano foi realizado através de exames de palpação retal e de ultrassonografia para identificar a presença de folículos com diâmetro entre 35 e 40 mm, aproximadamente aos 18 dias do ciclo estral (D18), assim como determinar o dia da ovulação (D0). Ao se observar a presença de um ou mais folículos com o tamanho previamente estabelecido, a biopsia endometrial era realizada, assim como no D8, oito dias após a ovulação. Antes do procedimento, a cauda da égua era enfaixada e deslocada lateralmente, e a região do períneo higienizada com água e sabão. Com a mão enluvada e lubrificada, a pinça de biopsia previamente desinfetada com amônia quaternária a 30% durante 20 minutos, era introduzida via vaginal até que a cervice fosse ultrapassada. Uma vez no lúmen uterino, a pinça era direcionada à bifurcação cornual (transição entre os dois cornos), com um leve desvio para o corno esquerdo, quando da coleta no estro, e com um leve desvio para o corno direito, para a coleta no diestro. Após a coleta, as amostras obtidas foram fixadas em solução de Bouin (Figura 1) por oito horas e em seguida acondicionadas em álcool 90%.

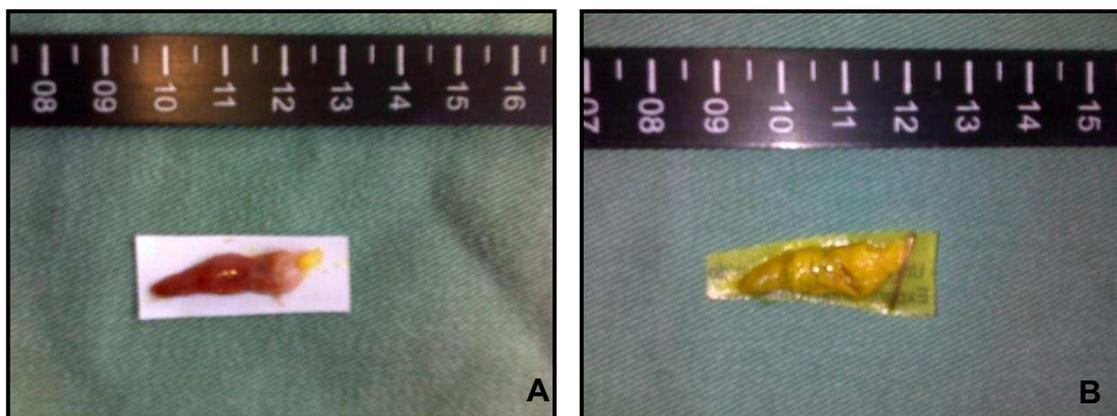


Figura 1 – Biopsia endometrial de fêmea equina obtida na fase de estro. A) Antes da fixação em solução de Bouin. B) Após a fixação em solução de Bouin.

Em seguida, todas as amostras foram processadas em protocolo padrão para a avaliação histopatológica, onde os fragmentos passaram por soluções consecutivas crescentes de álcool, clareados em xilol, impregnados pela parafina e por fim incluídos em molde retangular, contendo parafina fundida. Os blocos de parafina contendo os fragmentos de endométrio foram cortados com cinco micrômetros de espessura e corados com Hematoxilina de Harris e Eosina, e Tricrômico de Mallory. Durante a avaliação histopatológica os endométrios foram classificados em categorias conforme as recomendações de Kenney e Doig (1986), listadas no quadro 1.

Quadro 1 – Classificação histopatológica do endométrio de éguas segundo Kenney e Doig (1986).

Parâmetro Avaliado	Categoria I	Categoria IIA	Categoria IIB	Categoria III
Infiltrado inflamatório		Leve a moderado no estrato compacto ou focos freqüentes no estrato compacto e esponjoso	Difuso em focos moderadamente Severos	Difuso e severo
Alterações fibróticas		Discretas e freqüentes em glândulas individuais com qualquer grau de severidade ou menos de 2 ninhos por campo linear de 5,5 mm (média de 4 campos)	Difusa com distribuição uniforme e 4 ou mais camadas (2 a 4 ninhos por campo linear de 5,5 mm – média de 4 campos)	Difusa e uniforme em glândulas com 5 ou mais ninhos por campo linear de 5,5 mm (média de 4 campos)
Lacunas linfáticas		Extensas	Extensas	Severas
Outras alterações		Éguas com atrofia endometrial parcial no fim da estação de monta são incluídas nesta categoria		Éguas com atrofia endometrial severa na estação de monta estão incluídas nesta categoria
Severidade das lesões	Ausentes ou discretas	Leves	Moderadas	Severas

2.1 TÉCNICA HISTOQUÍMICA – PICROSIRIUS RED

Para esta coloração, foram obtidos cortes com quatro micrômetros de espessura. As lâminas contendo estes cortes foram posicionadas em cubas de coloração e submetidas aos processos de desparafinização e hidratação. O material foi imerso em xilol a 60°C por 10 minutos e posteriormente lavado em água corrente e água destilada. Após este processo, permaneceu imerso em solução de Picrosirius Red por 60 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e mergulhadas em solução de Hematoxilina de Harris por 10 minutos. Depois destas etapas, o material foi encaminhado para desidratação, diafanização e montagem em resina sintética (Entellan®).

Nas lâminas coradas com Picrosirius Red, utilizando-se microscópio de luz polarizada (Olympus Bx40), foi realizada a classificação qualitativa do colágeno presente na fibrose endometrial, sendo possível identificar o colágeno do tipo III (fibrilar - imaturo), com refringência verde, e o colágeno do tipo I (denso - maduro), que apresenta refringência amarelada a avermelhada. Para a análise quantitativa, foram obtidas imagens de cinco campos diferentes de cada lâmina, em aumento de 200x, através de câmera digital acoplada ao mesmo microscópio utilizado para a avaliação qualitativa. As imagens foram armazenadas e avaliadas, respectivamente, pelos softwares DinoCapture® e Image - Pró Plus®. Durante a avaliação foi mensurado o acúmulo de colágeno ao redor de glândulas individuais e de ninhos fibróticos, sendo assim determinada a área de cada tipo de colágeno (I e III). A média das áreas obtidas nos cinco campos foi armazenada para posterior correlação com os dados da imunohistoquímica.

2.2 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA

As lâminas para a avaliação imunohistoquímica foram confeccionadas em laboratório particular, onde cortes com três micrômetros de espessura

foram posicionados sobre lâminas pré tratadas com adesivo e mantidos em estufa a 60° C por 18 horas. Após este período, as lâminas foram submetidas à desparafinização por 10 minutos em xilol à temperatura ambiente, e reidratadas em álcool absoluto e álcool 80% por 10 minutos em cada solução. Em seguida procedeu-se a recuperação antigênica em Tris-EDTA (pH 9.0) a 96° C por 20 minutos e resfriadas em temperatura ambiente por mais 40 minutos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em solução de peridrol por 15 a 30 minutos, seguido da lavagem das lâminas em água destilada. O corte foi coberto com o anticorpo primário e incubado por um período de 12 a 14 horas (“overnight”) em câmara úmida a 4°C, seguido de nova lavagem com água destilada. A solução amplificadora foi aplicada e incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. Novamente o corte foi lavado em água destilada, seguido da aplicação do HRP Polymer e incubado por 20 minutos em temperatura ambiente. O corte foi lavado em água destilada e coberto com cromógeno (DAB) por 3 a 20 minutos em temperatura ambiente observando o desenvolvimento da coloração. Uma última lavagem foi realizada e as lâminas foram montadas. O anticorpo primário utilizado para a identificação de receptores para estrógeno (RE) foi o clone 1D5 (DAKO®) e para a progesterona (RP) o clone Y85 (Cell Marque®). Como controle positivo foi utilizado amostras de placenta humana.

Durante a avaliação quantitativa e qualitativa da expressão dos receptores hormonais, as células de diferentes regiões do endométrio foram analisadas, sendo elas: epitélio luminal, epitélio glandular superficial e profundo, células estromais superficiais e profundas. Além disso, nas éguas onde a fibrose endometrial foi identificada, também foi analisado o epitélio glandular e as células estromais da glândula fibrótica.

Durante a avaliação quantitativa e qualitativa da expressão dos receptores hormonais esteróides, as células de diferentes regiões do endométrio foram analisadas conforme as recomendações de Porto (2009), sendo elas: epitélio luminal, epitélio glandular superficial e profundo, células estromais superficiais e profundas. Além disso, nos endométrios com fibrose endometrial, também foi analisado o epitélio glandular e as células estromais de glândulas fibróticas. As células com núcleo de coloração castanha foram consideradas positivas para a expressão do hormônio esteróide avaliado

(estrógeno ou progesterona), sendo que a quantidade de células com esta resposta foi analisada em cinco campos selecionados de forma randômica em cada região determinada. Posteriormente uma média destes campos foi determinada e este valor transformado em porcentagem. A intensidade da coloração observada nas células positivas de cada campo e região avaliada foi graduada em ausente, discreta, moderada ou acentuada.

Em aumento de 400x, 30 células foram contadas no epitélio luminal, 20 células no epitélio glandular superficial e 30 células estromais, perfazendo o total de 150, 100 e 150 células respectivamente. No extrato esponjoso foram contadas 80 células do epitélio glandular, 80 células de epitélio glandular com fibrose periglandular, 130 células estromais e 130 células estromais em região de fibrose periglandular em cada campo, totalizando 400, 400, 650 e 650 células respectivamente.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a tipificação do colágeno e a determinação da porcentagem de células positivas para a expressão do hormônio esteróide avaliado, os dados obtidos foram interpretados e as diferenças estatísticas foram determinadas pela correlação de Spearman. Para determinar o predomínio do tipo de colágeno presente na fibrose endometrial em cada categoria foi utilizado o teste t. O nível de significância adotado para todas as análises estatísticas foi de 5% ($\alpha=0,05$). Todos os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* version 3.00 for Windows, San Diego – Califórnia, EUA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliou-se histologicamente as 50 biopsias de endométrio equino de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986), seis destas amostras endometriais coletadas na fase de estro foram classificadas na categoria I (24%), 13 na categoria IIA (52%) e seis na categoria IIB (24%). Das 25 amostras endometriais coletadas na fase de diestro, seis foram classificadas na categoria I (24%), 14 na categoria IIA (56%) e cinco na categoria IIB (20%). Independente da fase do ciclo estral, nenhuma amostra foi classificada na categoria III. Os resultados das classificações das amostras avaliadas estão apresentados nos quadros 2 e 3.

Quadro 2 – Distribuição das 25 amostras de endométrio equino coletadas na fase de estro e classificadas de acordo com Kenney e Doig (1986).

Categoria	Quantidade de amostras	Percentual
I	06	24
IIA	13	52
IIB	06	24
III	0	0
Total	25	100

Quadro 3 – Distribuição das 25 amostras de endométrio equino coletadas na fase de diestro e classificadas de acordo com Kenney e Doig (1986).

Categoria	Quantidade de amostras	Percentual
I	06	24
IIA	14	56
IIB	05	20
III	0	0
Total	25	100

Houve diferença na classificação das amostras endometriais dentro das categorias, coletadas em diferentes fases do ciclo estral. Das 25 éguas, 18 tiveram a mesma classificação independente da fase em que a amostra foi coletada, porém sete éguas obtiveram classificações diferentes de acordo com a fase do ciclo estral. Destas, três éguas classificadas na categoria IIB em amostras endometriais coletadas na fase de estro foram classificadas como IIA em amostras endometriais coletadas na fase de diestro. Duas éguas classificadas na categoria IIA na fase de estro foram classificadas na categoria

I na fase de diestro. Uma égua classificada na categoria I na fase de estro foi classificada na categoria IIA na fase de diestro. E por fim, uma égua classificada na categoria I na fase de estro foi classificada na categoria IIB na fase de diestro.

Kenney (1975) afirma que apesar de uma amostra endometrial compreender apenas 0,1% de toda a superfície do endométrio, ela é representativa quando as alterações patológicas são distribuídas de forma difusa (BERGMAN e KENNEY, 1975; WAELCHLI e WINDER, 1989). Porém Keller *et al.* (2006) levantaram a hipótese de que uma única biópsia endometrial pode não ser representativa quando a fibrose endometrial é considerada isoladamente. Ao avaliar o efeito de sucessivas infecções experimentais no progresso da fibrose endometrial, em períodos curtos de tempo, os autores observaram uma grande variação na classificação em categorias. No período de 12 meses em que o estudo foi realizado, 9 éguas apresentaram variações de duas categorias e 10 apresentaram em três categorias. As classificações foram para categorias superiores ou inferiores e algumas foram observadas em um intervalo de 10 dias. Recentemente esta hipótese foi confirmada por Fiala *et al.* (2010), os quais relataram que o local em que a amostra endometrial é retirada, interfere na classificação em categorias.

Nos endométrios classificados na categoria I (Figura 2), apenas uma amostra coletada na fase de estro (16,66%) não apresentou infiltrado inflamatório; as demais apresentaram esta alteração, caracterizada pela presença de monomorfonucleares em focos discretos. Uma égua apresentou hemossiderófagos nas duas amostras (estro e diestro), representando 33,33%. Esse tipo celular é definido quando macrófagos carregados de hemossiderina em seu interior são identificados, especialmente no estrato esponjoso, podendo estar associados a infiltrado inflamatório crônico ou em endométrios sem alterações, como no caso de hemorragias no parto, os quais podem ser vistos após alguns meses (BARROS e MASUDA, 2009).

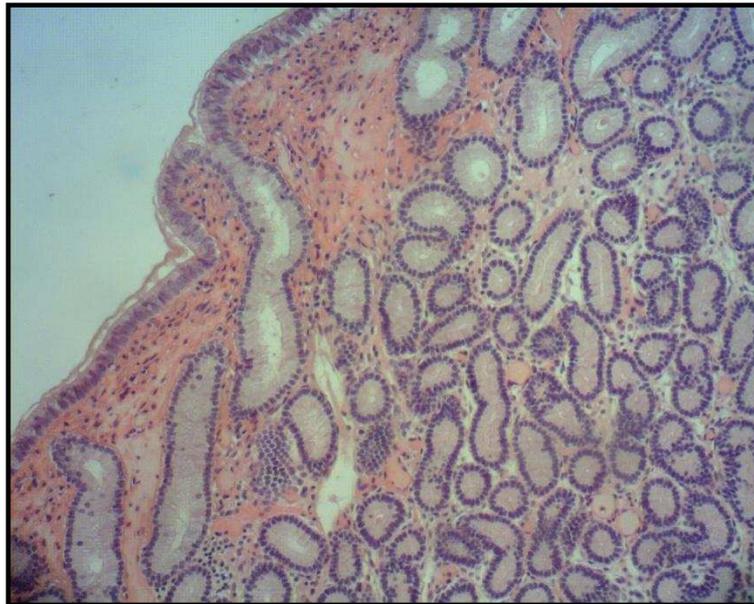


Figura 2 – Endométrio equino classificado na categoria I. Fase de diestro. Ausência de alterações inflamatórias e fibróticas. Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 100x.

Das amostras classificadas na categoria IIA, 46,15% coletadas na fase de estro apresentaram deposição de colágeno ao redor de glândulas individuais, caracterizando a fibrose periglandular (Figura 3). Na fase de diestro, 57,14% apresentaram a mesma alteração. Ninhos fibróticos foram observados em 23,07% das amostras do estro e 28,57% do diestro. O infiltrado inflamatório monomorfonuclear esteve presente de maneira leve a moderada, principalmente no estrato compacto, em 73,92% das amostras do estro e 85,71% do diestro. Os hemossideróforos foram observados em duas éguas nas amostras do estro e do diestro (14,81%). Houve presença de lacunas linfáticas em quatro amostras do estro e duas do diestro, e dilatação glandular (Figura 4) no endométrio de uma égua, em ambas as amostras do ciclo estral.

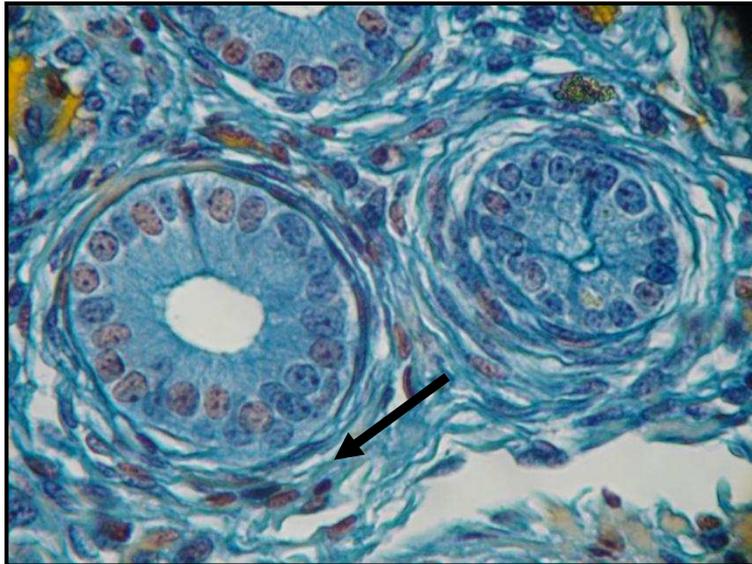


Figura 3 – Endométrio equino classificado na categoria IIA. Fase de diestro. Presença de fibrose periglandular (seta). Tricrômico de Mallory. Aumento: 1000x.



Figura 4 – Endométrio equino classificado na categoria IIA. Fase de diestro. Dilatação glandular evidente (círculo). Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 100x.

As amostras classificadas na categoria IIB apresentaram 81,81% de fibrose periglandular, e em apenas uma amostra do estro e outra do diestro esta alteração não esteve presente. A formação de ninhos fibróticos (Figura 5) foi observada em 72,72% das amostras do estro e do diestro, com média de

três ninhos nos campos avaliados. A presença de infiltrado inflamatório monomorfonuclear (Figura 6) esteve evidenciada em 90,9% das amostras do estro e do diestro, distribuído principalmente de forma difusa em focos moderadamente severos. Apenas uma égua apresentou hemossiderófagos (Figura 5) nas duas amostras (estro e diestro). Lacunas linfáticas extensas foram observadas em três amostras do estro (50%) e quatro do diestro (80%), enquanto que a dilatação glandular em 66,66% das amostras do estro e 60% das do diestro.

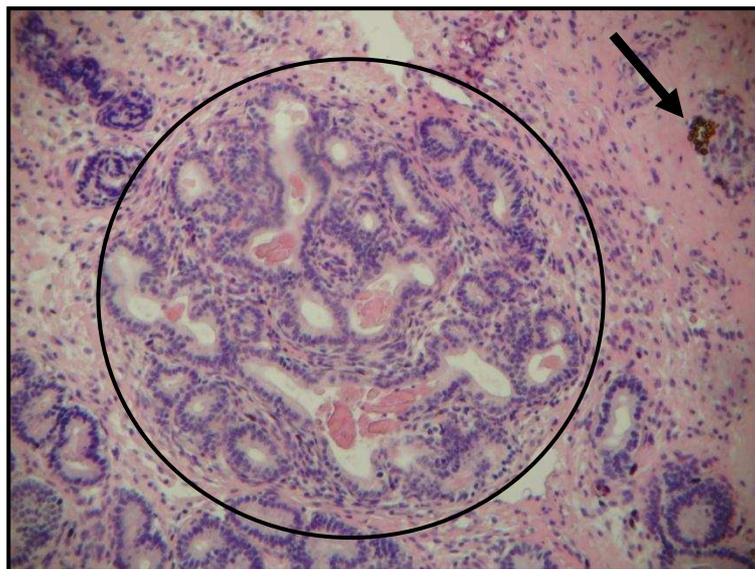


Figura 5 – Endométrio equino classificado na categoria IIB. Fase de estro. Presença de ninho fibrótico (círculo) e hemossiderófagos (seta). Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 400x.



Figura 6 – Endométrio equino classificado na categoria IIB. Fase de diestro. Infiltrado inflamatório monomorfonuclear (círculo). Hematoxilina de Harris e Eosina. Aumento: 100x.

Independente da fase do ciclo estral, todas as amostras apresentaram congestão e hemorragia. Com relação ao epitélio luminal, houve variação na altura deste epitélio de acordo com a fase do ciclo estral, assim como na presença de edema nos estratos compacto e esponjo. Nas amostras coletadas na fase de estro, as células do epitélio luminal foram definidas como colunares ou colunares altas, e foi possível observar edema em ambos os estratos. No diestro as células epiteliais do lúmen uterino se apresentaram como colunares baixas, e nos estratos não foi possível observar edema. Barros e Masuda (2009) afirmam que as manobras para obtenção das biopsias induzem alterações vasculares e glandulares não relacionadas com a patologia do endométrio, sendo que essas não devem ser levadas em consideração na avaliação histológica, mas sim consideradas como artefatos. Dentre os artefatos de natureza circulatória estão a congestão, a hemorragia e o edema. Este quando ocorre durante o estro deve ser diferenciado daquele produzido pelas manobras por ocasião da biopsia. O edema do estro deve sempre estar acompanhado das outras características histológicas desta fase do ciclo.

3.1 TÉCNICA HISTOQUÍMICA – PICROSIRIUS RED

Borges *et al.* (2007) consideram a coloração de Picrosirius Red um método de grande utilidade na distinção do arranjo do colágeno, o qual pode ser relacionado com sua estrutura molecular. Neste estudo, a técnica histoquímica de Picrosirius Red permitiu identificar os focos de fibrose, assim como a quantificação e tipificação do colágeno (Figura 7) presente na fibrose endometrial.

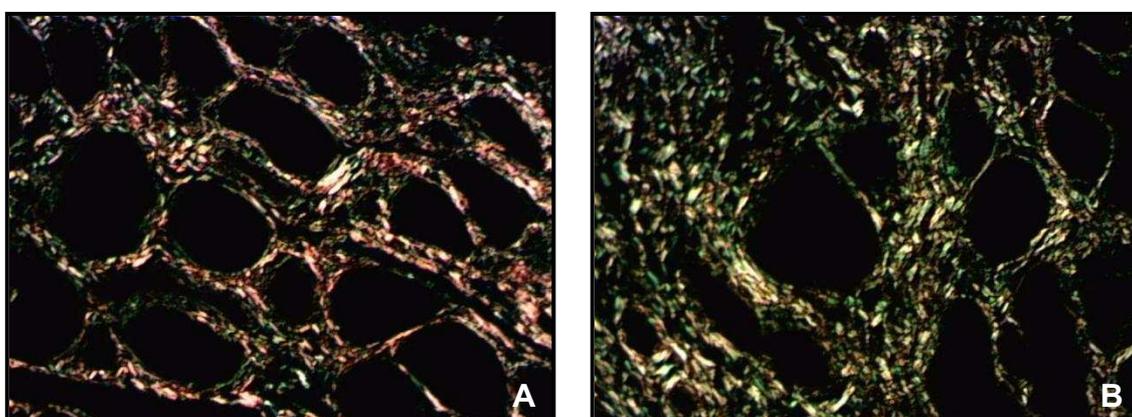


Figura 7 – Endométrio equino. Fase de diestro. Distribuição do colágeno. A) Tipo I (vermelho) e tipo III (verde). B) Tipo I (amarelo) e tipo III (verde). Picrosirius Red. Aumento: 200x.

Após a classificação em categorias, todas as amostras endometriais apresentaram predomínio do colágeno tipo III, detectando-se diferença estatística significativa ($P < 0,01$) nas amostras coletadas no diestro e classificadas nas categorias IIA e IIB (Figura 8 e 9). Bochsler e Slauson (1999) afirmam que em processos fibróticos ocorre deposição dos colágenos tipo I e III, os quais promovem o desenvolvimento do tecido cicatricial com maior força tensora. O colágeno tipo III, predominante nas amostras de endométrio sadio, é substituído gradativamente pelo colágeno do tipo I, conforme ocorre o aumento das alterações fibróticas (PORTO, 2006; MASSENO, 2009). Segundo Walter *et al.* (2001), o colágeno do tipo I não estará aumentado na fibrose endometrial

severa das éguas, e a sua proporção é semelhante à dos endométrios saudáveis. Em contrapartida, Nunes (2003) afirma que o colágeno tipo I é mais frequente nas lesões fibróticas periglandulares nas biópsias que apresentam lesões mais graves.

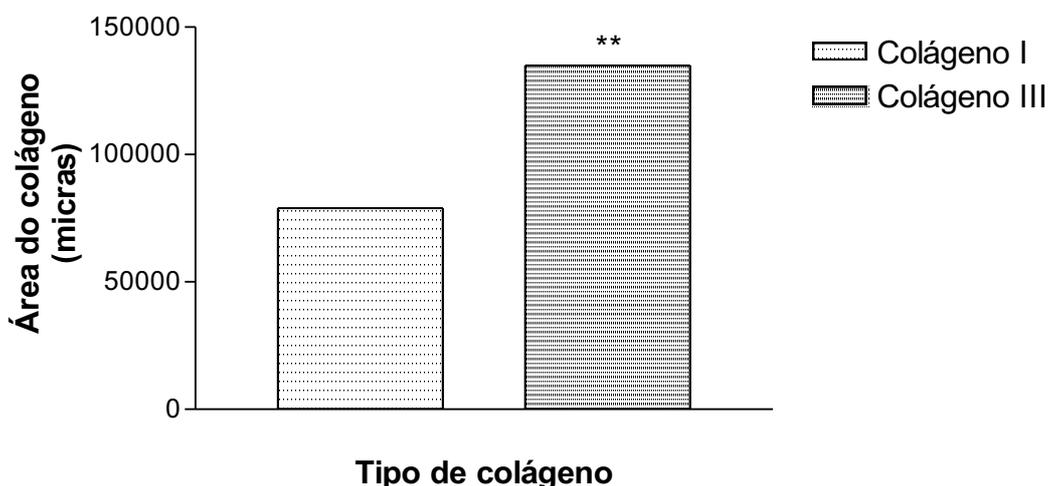


Figura 8 – Comparação entre as áreas dos colágenos tipo I e III presentes na fibrose endometrial de amostras coletadas na fase de diestro e classificadas na categoria IIA de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986). ** Diferença estatística significativa ($p < 0,01$).

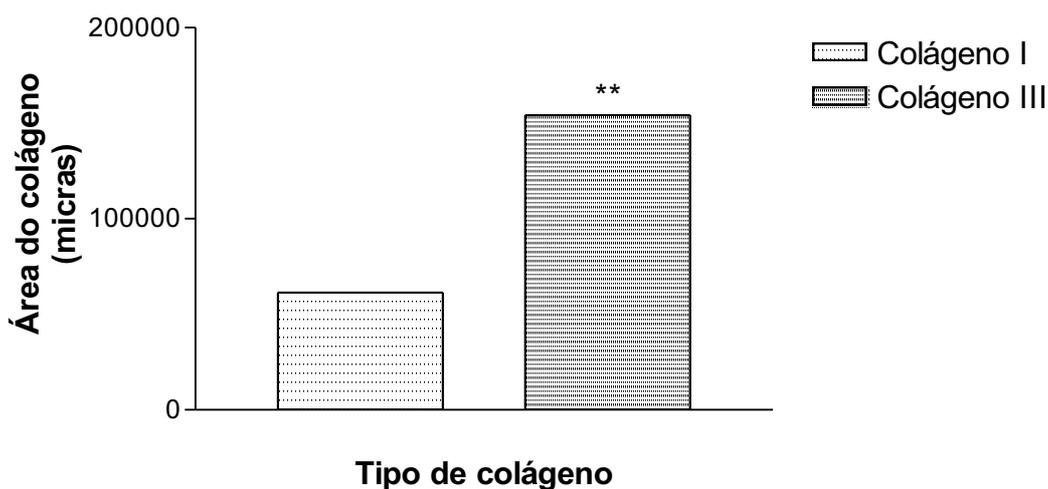


Figura 9 – Comparação entre as áreas dos colágenos tipo I e III presentes na fibrose endometrial de amostras coletadas na fase de diestro e classificadas na categoria IIB de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986). ** Diferença estatística significativa ($p < 0,01$).

3.2 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA

A técnica imunohistoquímica possibilita a pesquisa de diferentes proteínas e a determinação dos locais onde estas são expressadas no tecido, em processos fisiológicos e patológicos. Dessa forma, permite estudos que buscam relacionar os mecanismos moleculares envolvidos no processo de manutenção ou quebra da homeostasia tissular (PORTO, 2009).

Neste estudo, receptores de estrógeno e progesterona foram pesquisados nas fases de estro e diestro, para posterior correlação com o tipo de colágeno presente na fibrose endometrial. A qualidade da expressão foi determinada pela intensidade da coloração observada nas células positivas e variou de ausente a acentuada (Figura 10).

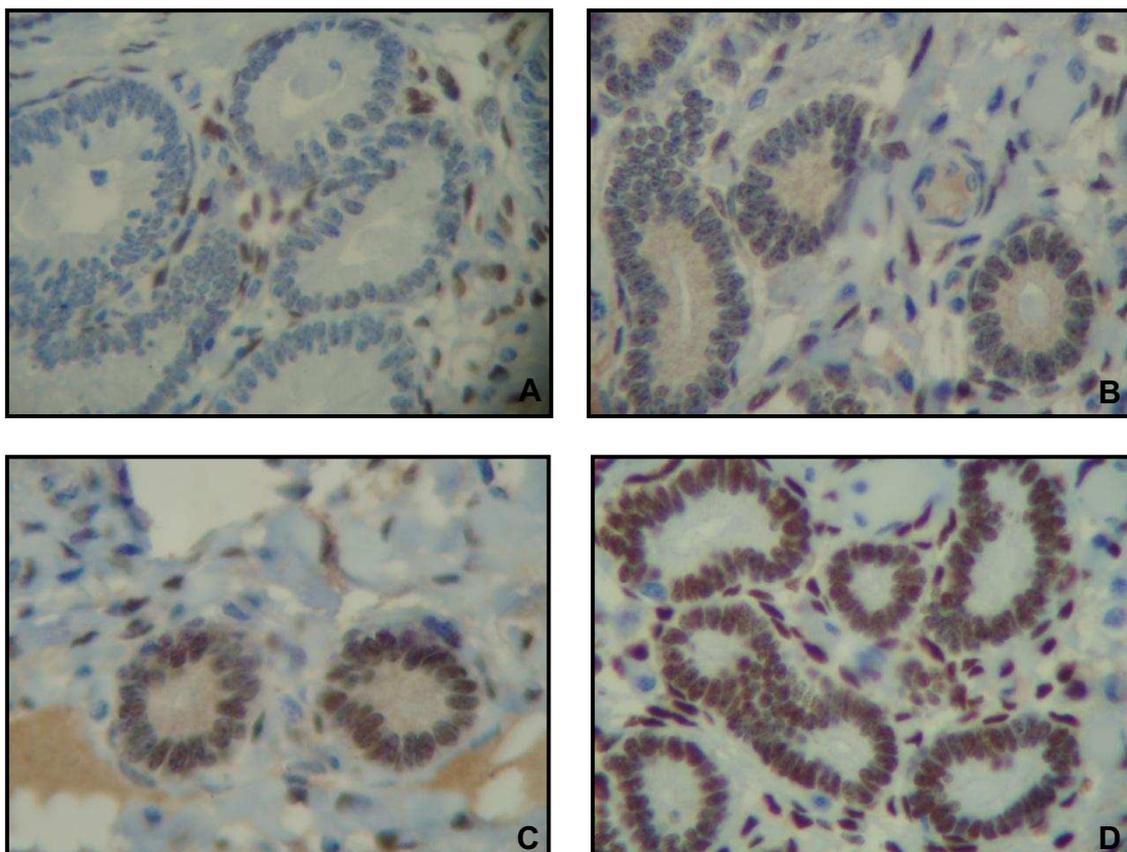


Figura 10 – Endométrio equino. Fase de diestro. Receptores para progesterona. Variação na intensidade da expressão hormonal no epitélio glandular profundo. A) Ausente. B) Discreta. C) Moderada. D) Acentuada. Imunohistoquímica. Aumento: 400x.

As células positivas do estroma superficial e profundo apresentaram qualidade de expressão moderada e acentuada para receptores de progesterona e estrógeno durante o estro, enquanto que as glândulas profundas não apresentaram tal resposta (Figura 11). Porém durante a fase de diestro, a expressão dos receptores de hormônios esteróides foi observada no epitélio glandular com predomínio da intensidade acentuada (Figura 12). Segundo Watson *et al.* (1992), os receptores para progesterona coram mais intensamente no estroma durante o estro, enquanto que a expressão dos receptores de hormônios esteróides é evidente no epitélio glandular durante o diestro (AUPPERLE *et al.* 2000).



Figura 11 – Endométrio equino durante a fase de estro. Receptores para progesterona. Ausência de expressão nas glândulas profundas (círculo) e resposta intensa nas células estromais superficiais e profundas (setas). Imunohistoquímica. Aumento: 100x.



Figura 12 – Endométrio equino durante a fase de diestro. Receptores para progesterona. Expressão evidente nas glândulas profundas (setas). Imunohistoquímica. Aumento: 100x.

A proliferação e diferenciação celular é a resposta do endométrio aos hormônios estrógeno e progesterona (CLARK *et al.*, 1985). Esta resposta é possível devido a presença de receptores de alta afinidade que podem ser identificados por técnicas de imunohistoquímica (TOMANELLI *et al.*, 1991) durante as fases do ciclo estral, através da coloração castanha do núcleo nas células positivas para os receptores esteróides. Neste estudo, durante o estro e o diestro, a porcentagem de células positivas se manteve estável para os receptores hormonais esteróides nas regiões avaliadas, onde no estroma se observou alta porcentagem de células positivas; porcentagem mediana no epitélio glandular profundo e baixa porcentagem no epitélio luminal e glandular superficial (Figuras 13, 14, 15 e 16). Aupperle *et al.* (2000) relataram expressão maior de receptores hormonais esteróides na fase de estro, enquanto que no diestro a expressão é menor. Este fato ocorre devido ao estímulo estrogênico que leva a um aumento na expressão dos receptores de estrógeno e progesterona (WATSON *et al.*, 1992). Além disso, no quinto dia após a ovulação os receptores para progesterona tiveram sua expressão máxima, baixando até o final do diestro e aumentando novamente com o início do novo estro (AUPPERLE *et al.*, 2000).

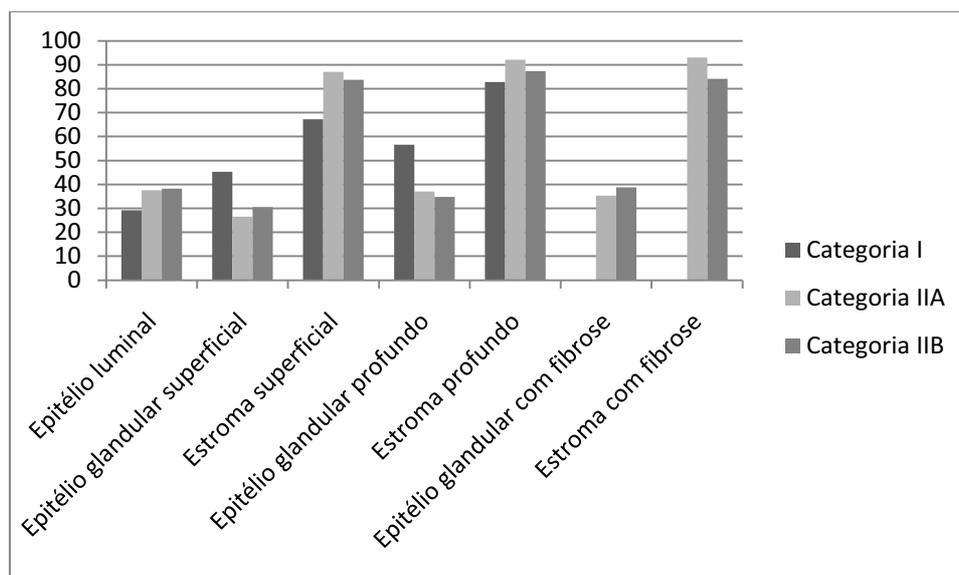


Figura 13 – Médias das porcentagens para receptores de estrógeno durante a fase de estro nas regiões do endométrio equino, nas diferentes categorias classificadas de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986).

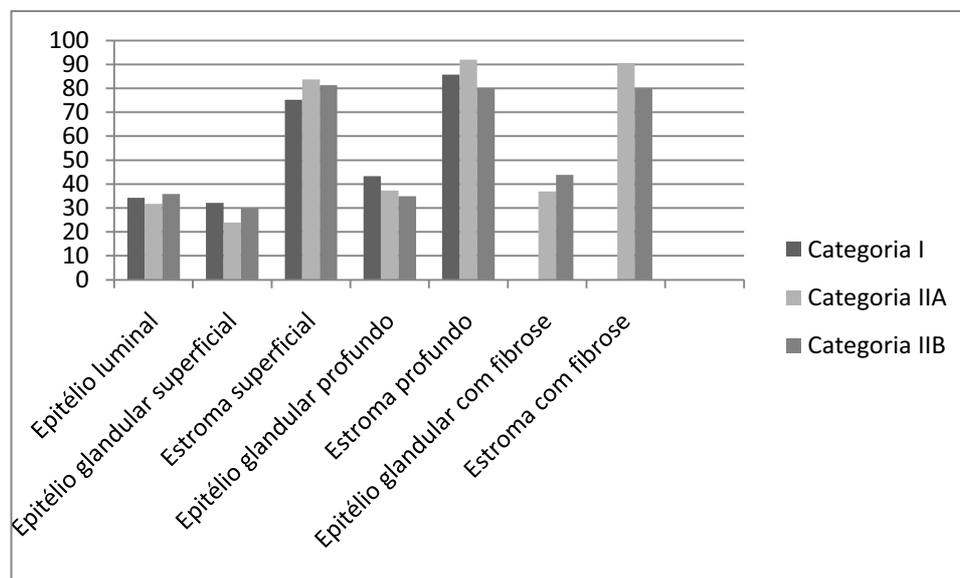


Figura 14 – Médias das porcentagens para receptores de progesterona durante a fase de estro nas regiões do endométrio equino, nas diferentes categorias classificadas de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986).

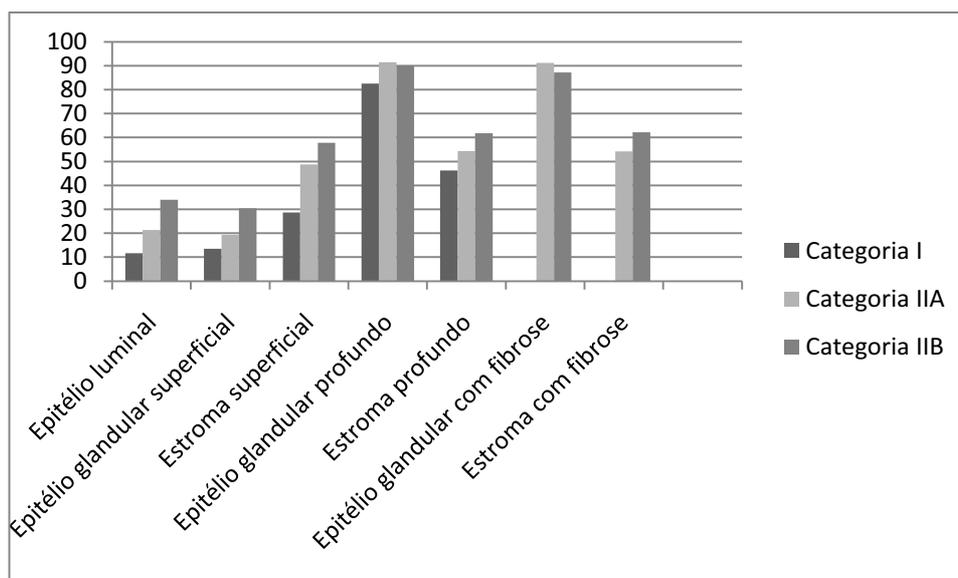


Figura 15 – Médias das porcentagens para receptores de estrógeno durante a fase de diestro nas regiões do endométrio equino, nas diferentes categorias classificadas de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986).

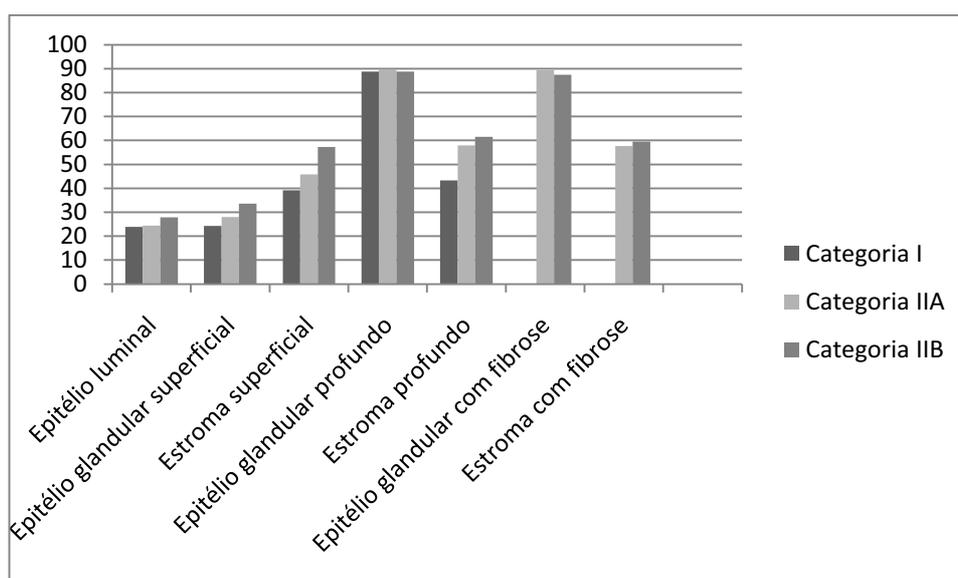


Figura 16 – Médias das porcentagens para receptores de progesterona durante a fase de diestro nas regiões do endométrio equino, nas diferentes categorias classificadas de acordo com os critérios de Kenney e Doig (1986).

A presença de ninhos fibróticos e de fibrose periglandular influenciou na expressão dos receptores hormonais, sendo possível observar no endométrio de uma mesma égua que estas alterações fibróticas não interferiram na expressão hormonal (Figura 17), assim como comprometeram esta expressão

(Figura 18). Hoffmann *et al.* (2009) relatam que as células estromais da fibrose periglandular expressam receptores hormonais de forma inadequada. Como resultado estas células tornam-se incapazes de responder aos estímulos endócrinos cíclicos e tornam-se independentes dos mecanismos de controle hormonais do útero. O mesmo fato já havia sido relatado por Aupperle *et al.* (2000), os quais pela avaliação imunohistoquímica afirmaram que a expressão de receptores de estrógeno e progesterona em glândulas fibróticas é menor quando comparada com áreas não afetadas pela fibrose.

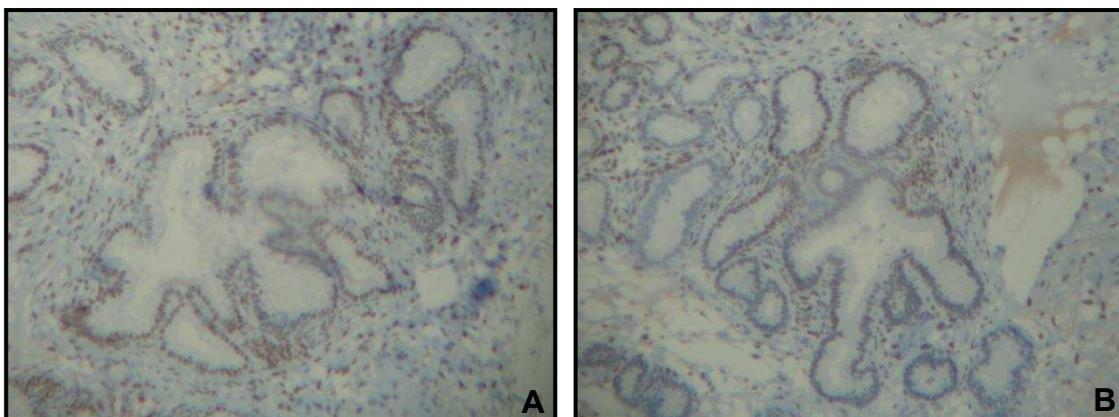


Figura 17 – Endométrio equino. Receptores para progesterona. Expressão hormonal presente em ninhos fibróticos. Imunohistoquímica. Aumento: 400x

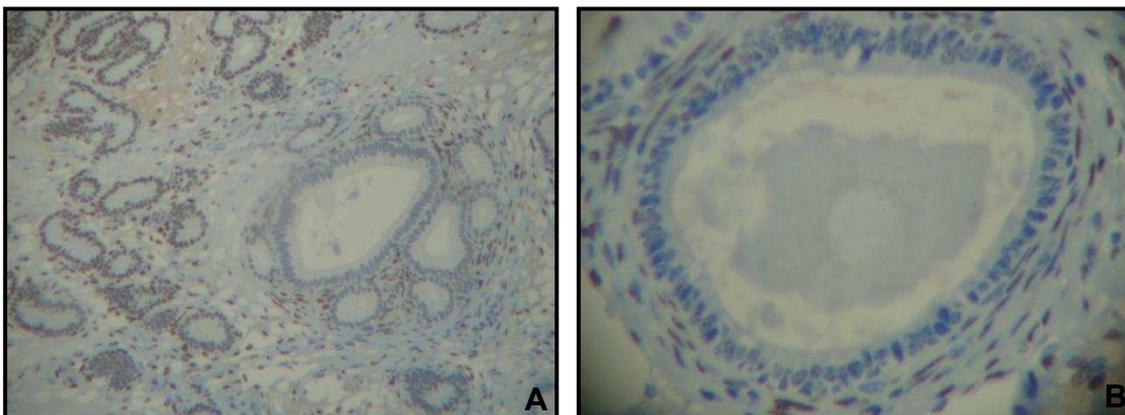


Figura 18 – Endométrio equino. Receptores para progesterona. Ausência de expressão hormonal em glândula na fibrose endometrial. Imunohistoquímica. Aumento: 400x

3.3 INFLUÊNCIA DO TIPO DE COLÁGENO PRESENTE NA FIBROSE ENDOMETRIAL NA EXPRESSÃO DE RECEPTORES HORMONAIS ESTERÓIDES

Após a correlação entre as áreas dos tipos de colágeno presentes na fibrose endometrial com a porcentagem de células positivas para os receptores de estrógeno e progesterona, em cada região avaliada, não foi observado diferença significativa. Acredita-se que a heterogenicidade das amostras avaliadas possa ter interferido nos resultados, assim como pelo fato de nenhuma das amostras terem sido classificadas na categoria III. Endométrios com esta classificação apresentam extensas áreas de fibrose distribuídas de maneira uniforme entre as glândulas endometriais, que podem influenciar diretamente na expressão de receptores hormonais esteróides. A fibrose é um dos principais elementos da reação tecidual, sendo 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). Porém, sabe-se que a fibrose endometrial, uma vez iniciada, continua a despeito da cessação da injúria, caracterizando-se então por ser progressiva e irreversível (RICKETTS e ALONSO, 1991). Desta forma, conforme há o progresso da endometrose, possivelmente há diminuição da quantidade de glândulas endometriais, culminando com a atrofia endometrial (PORTO, 2009). Além disso, em glândulas com comprometimento fibrótico a expressão de receptores de estrógeno e progesterona é menor quando comparada com áreas não afetadas pela fibrose (AUPPERLE *et al.*, 2000).

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados foi possível observar predomínio do colágeno tipo III em todas as amostras endometriais, independente da classificação em categorias; houve variação na expressão dos receptores para estrógeno e progesterona de acordo com a fase do ciclo estral (estro ou diestro); não foi possível observar influência do tipo de colágeno (I ou III) presente na fibrose endometrial sobre a expressão de receptores para estrógeno e progesterona, possivelmente pelo fato das amostras endometriais avaliadas não apresentarem extensas áreas de fibrose localizadas entre as glândulas uterinas.

5. REFERÊNCIAS

AUPPERLE, H.; OZGEN SCHOON, H.A.; SCHOON D.; HOPPEN H.O.; SIEME H.; TANNAPFEL A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, p. 228-232, 2000.

BARROS, S. S.; MASUDA, E. K. **Biopsia endometrial na égua: diagnóstico e prognóstico**, 2009. 30 p.

BERGMAN, R. V.; KENNEY, R. M. Representativeness of a uterine biopsy in the mare. **Proceedings of American Association Equine Practice**, p. 355-361, 1975.

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

BORGES, L.F.; GUTIERREZ, P.S.; MARANA, H.R.C.; TABOGA, S.R. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapsed lesions. **Micron**, v.38, p.580-583, 2007.

CLARK, J.H.; SCRADER, W.T.; O'MALLEY, B.W. Mechanisms of steroid hormone action. In: WITSON, J.D.; FORTEC, D.W. **Textbook of Endocrinology**. Philadelphia, W.B. Saunders, 1985, p. 33-75.

FIALA, S.; ESMERALDINO, A. M. T.; JOBIM, M. I. M.; GARBADE, P.; WOLF, C. A.; RICHTER, G.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Endometrial fibrotic changes. Is one biopsy enough to diagnose degenerative changes? **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 89-90, 2010.

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

HOFFMANN, C., ELLENBERGER, C., MATTOS, R.C., AUPPERLE, H., DHEIN, S., STIEF, B., SCHOON, H.-A. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. **Animal Reproduction Science**., v.111, p.261-78, 2009.

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

KELLER, A.; NEVES, A. P.; AUPPERLE, H.; STEIGER, K.; GARBADE, P.; SCHOON, H. A.; KLUG, E.; MATTOS, R. C. Repetitive experimental bacterial infections do not affect the degree of uterine degeneration in the mare. **Animal Reproduction Science**., v. 94, p. 276-279, 2006.

KENNEY, R. M. Prognostic value of endometrial biopsy of the mare. **Journal of the Reproduction and Fertility**, supl. 23, p. 347-348, 1975.

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

KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D. A. **Current Therapy in Theriogenology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 723-729.

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

MASSENSO, A.P.B. **Caracterização imunoistoquímica dos miofibroblastos endometriais e da expressão de MMP-2 nas endometrites crônicas das éguas.** Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009. 69 p.

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

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

PORTO, C.D. **Caracterização histoquímica do colágeno e expressão de MMP- 2, MMP-9 e TIMP-1 nas endometrites crônicas das éguas.** Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006. 102 p.

PORTO, C.D. **Espressão de TGF- β 1, metaloproteinases e avaliação dos índices de proliferação celular e apoptótico nas endometrites crônicas das éguas.** Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009. 125 p.

RAILA, G.; SCHOON, H.A.; WREDE, S.; KLUG, E. Pathogenesis of equine endometrosis – an ultrastructural investigation. Abstrat. **Pferdeheikunde**, v.13, p. 550-551, 1997.

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

SCHLAFER, D.H. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? **Theriogenology**, v.68, p.413-22, 2007.

TOMANELLI, R.N.; SERTICH, P.L.; WATSON, E.D. Concentrations of oestrogen and progesterone receptor in the endometrium of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.44 (suplemento), p. 267-273, 1991.

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

WÄELCHLI, R. O.; WINDER, N. C. Distribution of histological lesions in the equine endometrium. **Veterinary Record**, v. 124, p. 274-276, 1989.

WATSON, E.D.; SKOLNIK, S.B.; ZANECOSKY, H.G. Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. **Theriogenology**, v.38, p.575-580, 1992.