

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**REMODELAÇÃO TECIDUAL NO ENDOMÉTRIO EQUINO: FIBRAS DE
COLÁGENOS E COLAGENASES**

LUIZ AUGUSTO MACHADO CENTENO

PORTO ALEGRE

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**REMODELAÇÃO TECIDUAL NO ENDOMÉTRIO EQUINO: FIBRAS DE
COLÁGENOS E COLAGENASES**

Autor: Luiz Augusto Machado Centeno

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Animal:
Equinos da Faculdade de Medicina
Veterinária UFRGS como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre.**

Orientadora: Dra. Mara I. Batistella Rubin

PORTO ALEGRE

2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Centeno, Luiz Augusto Machado
REMODELAÇÃO TECIDUAL NO ENDOMÉTRIO EQUINO: FIBRAS
DE COLÁGENOS E COLAGENASES / Luiz Augusto Machado
Centeno. -- 2019.
79 f.
Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal:
Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. endometrose. 2. picrosírius red. 3. colágeno.
4. mRNA. 5. fibrose. I. Rubin, Mara Iolanda
Batistella, orient. II. Título.

Luiz Augusto Machado Centeno

**REMODELAÇÃO TECIDUAL NO ENDOMÉTRIO EQUINO: FIBRAS DE
COLÁGENOS E COLAGENASES**

Aprovado em: 19/12/2019

APROVADO POR:



Prof. Dr^a. Mara Iolanda Batistella Rubin
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr^a. Janislene Mach Trentin
Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky
Membro da Comissão

Dr. Henrique Boll de Araujo Bastos
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, Adão Mozart Centeno, Erly Soares Centeno, Ernani José Machado e Ilma Senhorinha Vargas Machado pelas experiências, de trabalho, de honestidade, pela paciência, pelo amor e principalmente pela construção de uma base familiar sólida e linda.

À minha família, em especial aos meus pais Paulo Roberto Soares Centeno (*in memoriam*) e Lourdes Helena Vargas Machado e minha irmã Bárbara Machado Centeno, por sempre priorizarem o estudo, por me orientarem nas escolhas certas, por me darem forças nos momentos difíceis e por fazerem o possível e impossível nas distintas etapas na minha vida.

À minha namorada, Dandara Xavier Ferreira pelo companheirismo de estar sempre ao meu lado durante essa conquista.

À Professora Dr.^a Mara Iolanda Batistella Rubin pela orientação e incentivo, desde 2011 ainda na graduação, por seus conhecimentos e experiência oferecidos.

Ao Professor Dr. Rodrigo Costa Mattos, que abriu as portas do REPROLAB para o desenvolvimento da pesquisa, além de estar sempre disponível a auxiliar e esclarecer dúvidas. Sua colaboração foi extremamente importante para a realização deste projeto.

A Dra. Sandra Fiala Rechstelner, por me receber em Pelotas, pelos seus ensinamentos.

Ao Dr. Nelson Alexandre Kretzmann, pela significativa contribuição na área de biologia molecular.

Aos meus amigos e colegas Henrique Bastos, Verônica La Cruz Bueno, Janislene Mach Trentin, Mariani Farias Fiorenza, Gustavo Rupp Larentis, Giovani Camozzato e Gabriel de Oliveira Santos por todo desenvolvimento científico e pelo trabalho em conjunto no REPROLAB.

Ao setor de Patologia, Imunologia da UFRGS e Dr. Reno Roldi de Araujo pela receptividade para a execução da pesquisa.

Aos inúmeros colaboradores e colegas do REPROLAB, agradeço pela convivência.

RESUMO

A remodelação tecidual no endométrio de éguas ocorre durante a patogênese da endometrose, este processo é caracterizado pela mudança no perfil dos componentes da matriz extracelular. Esse distúrbio degenerativo crônico culminará com a modificação da arquitetura e funcionalidade no útero de éguas. O objetivo do presente estudo foi quantificar morfometricamente a deposição de colágeno endometrial e avaliar a expressão gênica de colágeno tipo 2 (COL-2), tipo 3 (COL-3), metaloproteinases de matriz 1 (MMP-1) e 2 (MMP-2), seu inibidor tecidual (TIMP-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em biópsias uterinas de éguas com diferentes graus de fibrose. Uma amostra uterina foi obtida através de biópsia transvaginal de éguas cíclicas (n=34) entre o dia 5 e dia 10 pós-ovulação e foi seccionada em dois fragmentos. Um fragmento foi utilizado para avaliação histopatológica e o outro foi encaminhado para análise de expressão gênica. Na histologia as amostras foram classificadas e agrupadas conforme frequência e distribuição das alterações relacionadas à fibrose no endométrio em Grau I (n=12), Grau II (n=12) e Grau III (n=10). A quantificação de colágeno foi determinada através da coloração Sirius Red, onde se detectou uma variação na deposição de colágeno nos grupos Grau I ($11,72 \pm 1,394$ %), Grau II ($17,76 \pm 1,296$ %) e Grau III ($24,15 \pm 1,870$ %). Nas avaliações de transcritos identificou-se maior expressão de COL-2 nas amostras de éguas Grau II comparada ao Grau I e Grau III. O COL-3 não apresentou diferenças significativas quando submetidos às análises estatísticas. A MMP-1 apresentou aumento na expressão de mRNA nas amostras endometriais do Grau II vs Grau III. Maior expressão de MMP-2 foi observada nas éguas Grau III comparada a éguas Grau I e Grau II. A TIMP-2 exibiu menor expressão de mRNA no Grau III vs Grau I e Grau II. A expressão gênica do TNF- α endometrial foi significativamente maior nas fêmeas Grau II que Grau I e Grau III. Em conclusão, os resultados encontrados elucidam parte dos mecanismos envolvidos na patogênese da fibrose endometrial na égua. Nesta pesquisa ficou demonstrado que a alteração na quantificação das fibras de colágeno e na expressão de colagenases e seu inibidor tecidual estão envolvidos no processo de fibrogênese e fibrinólise endometrial. Assim a expressão de COL-2 MMP-1, MMP-2, TIMP-2 e TNF- α pode modular a reorganização tecidual e representar importantes marcadores no diagnóstico de éguas com endometrose.

Palavras-chave: endometrose, picrossírius red, colágeno, mRNA, fibrose, éguas

ABSTRACT

Tissue remodeling in the mares endometrium occurs during the pathogenesis of endometrosis, this process is characterized by a change in the profile of the extracellular matrix components. This chronic degenerative disorder will culminate with the modification of the architecture and functionality in the uterus of mares. The aim of the present study was to morphometrically quantify the deposition of endometrial collagen and to evaluate the gene expression of collagen type 2 (COL-2), type 3 (COL-3), matrix metalloproteinases 1 (MMP-1) and 2 (MMP-2), its tissue inhibitor (TIMP-2) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in uterine biopsies from mares with different degrees of fibrosis. A uterine sample was obtained by transvaginal biopsy of cyclic mares (n = 34) between day 5 and day 10 post-ovulation and was divided into two fragments. One fragment was used for histopathological evaluation and the other was sent for analysis of gene expression. In histology the samples were classified and grouped according to the frequency and distribution of changes related to fibrosis in the endometrium in Grade I (n = 12), Grade II (n = 12) and Grade III (n = 10). The quantification of collagen was determined using Sirius Red staining, where a variation in collagen deposition was detected in the Grade I ($11.72 \pm 1.394\%$), Grade II ($17.76 \pm 1.296\%$) and Grade III ($24, 15 \pm 1.870\%$). In the transcript evaluations, greater COL-2 expression was identified in the samples of Grade II mares compared to Grade I and Grade III. COL-3 showed no significant differences when submitted to statistical analysis. MMP-1 showed an increase in mRNA expression in Grade II vs Grade III endometrial samples. Higher expression of MMP-2 was observed in Grade III mares compared to Grade I and Grade II mares. TIMP-2 exhibited less mRNA expression in Grade III vs Grade I and Grade II. Gene expression of endometrial TNF- α was significantly higher in Grade II than Grade I and Grade III females. In conclusion, the results found elucidate part of the mechanisms involved in the pathogenesis of endometrial fibrosis in the mare. In this research it was demonstrated that the alteration in the quantification of collagen fibers and in the expression of collagenases and their tissue inhibitor are involved in the process of fibrogenesis and endometrial fibrinolysis. Thus, the expression of COL-2 MMP-1, MMP-2, TIMP-2 and TNF- α can modulate tissue reorganization and represent important markers in the diagnosis of mares with endometrosis.

Keywords: endometrosis, picosirius red, collagen, mRNA, fibrosis, mares

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 -** Análises da quantificação de colágeno com PSR através do software ImageJ em amostras uterinas de éguas. ^{acb} Letras indicam diferenças significativa entre os grupos ($P < 0.05$)..... 36
- FIGURA 2 -** Imagens histopatológicas do endométrio das éguas, com diferentes graus de endometroses, segundo Kenney (1978). Endometroses Grau I (A), Grau II (B), Grau III (C) corados com hematoxilina e eosina; endometrose Grau I (D), Grau II (E), Grau III (F) corado com picrossirius red. Imagens de A – F em magnificação x500..... 36
- FIGURA 3 -** Quantificação relativa (QR) da expressão gênica (\pm S.E.D.) do mRNA de COL-2, COL-3, MMP-1, MMP-2, TIMP-2 e TNF- α no endométrio de éguas com diferentes graus de fibrose. Letras ^{ab} diferentes indicam diferenças entre os grupos ($P < 0.05$), assim com, # indica tendência descendente..... 37

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 -** Sequências de primers e temperatura de anelamento utilizados para amplificação gênica e detecção de mRNA através da RT-qPCR. Iniciadores específicos *Equus Cabalus* (Eq) demonstrado antes da nomenclatura dos genes 34
- TABELA 2 -** Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis: idade, % de colágeno e expressão gênica de COL-2, COL-3, MMP-1, MMP-2, TIMP-2 e TNF- α de éguas com diferentes graus de endometrose 38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Fisiologia uterina	13
2.2 Endometrose.....	15
2.3 Biópsia uterina.....	17
2.4 Matriz extracelular	19
2.4.1. Colágeno.....	21
2.5 Picrosirius Red.....	22
2.6 Expressão gênica.....	24
2.6.1 Metaloproteinases de Matriz	26
2.6.2 Inibidores Teciduais de Metaloproteinases.....	26
2.6.3 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α).....	27
3. ARTIGO	29
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
APÊNDICE A – METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO ENDOMETRIAL DE ÉGUAS ATRAVÉS DO SOFTWARE IMAGEJ 1.52A. ...	66
APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA: JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE.	78
APÊNDICE C – RESUMO APRESENTADO NO XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL.....	80

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o quarto maior rebanho de equinos do mundo com aproximadamente 5,5 milhões de cabeças (FAOstat, 2017), atrás apenas de Estados Unidos, México e China. A equideocultura desempenha um papel importante na formação econômica e social do país e atualmente é explorada em todo território nacional, com movimentação anual de quase R\$ 17 bilhões gerando mais de três milhões de postos de trabalho, direta e indiretamente (IBGE, 2017).

Dentro de um sistema de criação de equinos as alterações reprodutivas podem representar significativa perda econômica para os criadores ao considerar que a espécie equina apresenta baixos índices de fertilidade quando comparada as demais espécies (SULLIVAN et al., 1975; MCKINNON e VOSS, 1993). Tendo em vista que a seleção genética dos animais ocorre, na maioria das vezes, em cima de aspectos zootécnicos e desempenho em competições, logo não considera índices de fertilidade. Desta forma, importantes fatores fisiológicos capazes de modular negativamente a reprodução podem também ser selecionados (LEON et al., 2013).

A eficiência reprodutiva em éguas diminui com a idade e tem sido demonstrado que fêmeas com mais de 14 anos possuem menores taxas de prenhez, por ciclo, comparado com éguas mais jovens (MORRIS e ALLEN, 2002). O desenvolvimento de fibrose no útero de éguas é conhecido também como endometrose. A fibrose endometrial pode apresentar-se periglandular e/ou estromal incluindo alterações glandulares nos focos fibróticos e afetando glândulas simples e/ou ninhos glandulares (SCHOON et al., 1995; HOFFMANN 2003). O grau de endometrose aumenta com a idade da égua; no entanto, não há correlação com números de partos (SCHOON et al., 1997). Essas disfunções das glândulas fibróticas podem levar a alterações qualitativas e quantitativas das secreções endometriais e, conseqüentemente, a uma alteração do microambiente intrauterino (HEIN, 2000) e assim reduzir a capacidade da fêmea levar a gestação a termo.

Portanto, uma maior compreensão do mecanismo que desencadeia o processo fibrótico no endométrio das fêmeas equinas se faz necessário. Tendo

em vista o desafio que os profissionais de campo possuem para prevenir, diagnosticar e aplicar eventuais tratamentos para éguas com diferentes graus de fibrose. A aplicação de técnicas moleculares para avaliação da expressão gênica tornou-se rotina em pesquisas biomédicas (SCHLAFER, 2007). Assim, o objetivo do presente trabalho foi quantificar morfometricamente a deposição de colágeno endometrial e avaliar a expressão gênica de colágeno tipo 2 (COL-2), tipo 3 (COL-3), metaloproteinases de matriz 1 (MMP-1) e 2 (MMP-2), seu inibidor tecidual (TIMP-2) e fator de necrose tumoral (TNF- α) em biópsias uterinas de éguas com diferentes graus de fibrose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fisiologia uterina

O sistema reprodutivo da égua compreende: ovários; órgãos tubulares; tuba uterina; útero; cervix; vagina, vestibulo e vulva. A fêmea equina é considerada poliéstrica estacional, regulada pelo fotoperíodo (GINTHER, 1979). Logo, algumas alterações que ocorrem no utero são mediadas pela presença de hormônios, no qual, irá variar de acordo com a fase do ciclo estral que a égua encontra-se (HERRERA et al., 2018).

Nos equinos, a atividade reprodutiva sazonal é estimulada por dias longos e noites curtas (PALMER e GUILLAUME, 1992), ou seja, maior quantidade de luz. Entretanto, a atividade ovariana pode ser influenciada por fatores externos como idade, *status* reprodutivo, nutrição, condição corporal e temperatura ambiental (AURICH, 2011). Logo, com a variação do aumento e diminuição da luminosidade durante o dia, faz com que a égua apresente quatro períodos característicos: período de transição de primavera, período de ciclicidade, período de transição de outono e período de anestro (AURICH, 2011).

O ciclo estral é definido como a sequência repetitiva de eventos que prepara a égua para a concepção. Na estação reprodutiva, a duração média do ciclo estral entre uma ovulação e outra é de 21 – 22 dias (GINTHER, 1992). Brunckhorst e Schoon (1991) e Schoon et al. (1992) dividiram o ciclo estral em fase folicular, de 5 a 7 dias e fase lútea, de 14 a 16 dias. Sendo o anestro a fase em que não apresenta atividade cíclica e corresponde a maior parte da vida da fêmea; o estro é a fase no qual o folículo ovulatório se desenvolve até ocorrer à ovulação. O comportamento de estro da égua é caracterizado pela receptividade da fêmea na presença do garanhão (CROWELL-DAVIS, 2007), ou seja, o período fértil. O diestro é a fase do ciclo que a égua não apresenta interesse no garanhão e o utero prepara-se para receber e nutrir o concepto (AURICH, 2011). Durante o diestro, o folículo ovulado desenvolve-se em um corpo lúteo (CL) que irá secretar progesterona e, na égua não gestante, regridirá 14 a 15 dias após a ovulação (GASTAL et al., 2008).

O útero equino possui um corpo uterino seguido da bifurcação uterina e dois cornos uterinos que são suspensos pelo ligamento largo (DYCE et al., 2009). As artérias que formam uma intensa anastomose e auxiliam o suprimento sanguíneo ao útero são a artéria uterina caudal, artéria uterina média e artéria uterina cranial (GINTHER, 1992). O útero da égua é formado por três camadas: a camada interna, endométrio, a média, miométrio e o perimétrio (BARROS e MASSUDA, 2013). A mucosa do lúmen uterino é revestida por células epiteliais, que variam de cúbicas a cilíndricas altas (RICKETTS, 1975). Abaixo do epitélio está a lâmina própria, que foi dividida por Kenney (1978) em estrato compacto e esponjoso. O estrato compacto é caracterizado por uma maior densidade de células do estroma e encontra-se junto ao epitélio luminal, apresenta ductos glandulares, porém não exibe glândulas (KENNEY, 1978; BARROS e MASSUDA, 2013). A camada superficial mais delgada é composta pelo epitélio luminal e pela lâmina própria. O lúmen uterino é revestido por um epitélio caracterizado principalmente pela presença de células secretoras e ciliadas ou glândulas (BURKITT et al., 1994). Vogel e Humke (1973) denominam a camada entre o endométrio e o miométrio de estrato subglandular, rico em vasos e pobre em glândulas. O miométrio é formado por uma espessa camada circular interna e uma fina camada longitudinal externa, e entre elas, está o estrato vascular. Externamente, justaposto ao miométrio fica o perimétrio, formado por tecido conjuntivo frouxo, vasos e nervos, recobertos por mesotélio peritoneal (DELLMAN e BROWN, 1987).

Os ductos glandulares desempenham um papel vital na manutenção da gestação equina, antes e depois da placentação (ODDSDÓTTIR et al., 2011). A vesícula embrionária equina é relativamente livre no lúmen uterino nos primeiros 35 dias de gestação e, portanto, depende das glândulas endometriais para suporte nutricional através do histotrofo (SAMUEL et al., 1977). Dado o período de pré-implantação prolongado, a secreção adequada de histotrofo é de particular importância para a manutenção de gestação (BRAMER et al., 2017). As glândulas mantêm uma função secretora durante todo o período de gestação, e possuem importância na transmissão de macro e micro moléculas hidrossolúveis da fêmea para o feto (STEVEN, 1982).

2.2 Endometrose

O termo endometrite refere-se a um processo inflamatório agudo ou crônico envolvendo o endométrio (PYCOCK, 2007) podendo estar associada a uma infecção bacteriana ou não (KENNEY, 1993). Na espécie equina, as endometrites são consideradas como uma das causas mais frequentes de infertilidade (BRINSKO et al., 2011), sendo consequência de falhas no mecanismo de limpeza do ambiente uterino através do sistema humoral, celular e linfático (ASBURY, 1982; KATILA, 1996; LEBLANC, 2003).

De acordo com a classificação proposta por Troedsson (1999), a endometrite em éguas é dividida em endometrite sexualmente transmissível, endometrite infecciosa crônica, endometrite persistente pós-cobertura e endometrite degenerativa crônica, também conhecida por endometrose. Em éguas, a endometrose é a patologia reprodutiva, silenciosa, mais importante do endométrio associada à infertilidade (LEHMANN et al., 2011).

A atípica diferenciação morfológica e funcional das células estromais endometriais, periglandulares, é o primeiro indicativo de endometrose (HOFFMANN et al., 2009a, BUCZKOWSKA et al., 2014). A endometrose é uma condição fibrótica grave de origem multifatorial, progressiva e irreversível que afeta o endométrio de égua (HOFFMANN et al., 2009a, b; ARESU et al., 2012). Onde sequelas inevitáveis, após inúmeros desafios naturais, como idade, cobertura, gestações repetidas, parição, involução uterina pós-parto, inflamação crônica, aumento de miofibroblastos endometriais e problemas endócrinos tornam-se fatores determinantes na patogenia das alterações degenerativas do endométrio (KENNEY e GANJAM, 1975; KENNEY et al., 1975; KENNEY, 1978; RICKETTS, 1978, DOIG et al., 1981; HOFFMANN et al. 2009; LEBLANC e CAUSEY, 2009; BUCZKOWSKA et al., 2014).

A endometrite degenerativa crônica é uma doença com alta prevalência em éguas mais velhas, maiores de 12 anos de idade, e está associada à diminuição da fertilidade, morte embrionária precoce e aborto (FLORES et al., 1995). A maioria das éguas continua exibindo ciclos estrais ovulatórios ao longo da vida, embora sua capacidade de produzir potros viáveis diminua por volta dos 15 anos de idade (SANDERSON e ALLEN, 1987; RICKETTS e YOUNG, 1990; RICKETTS e ALONSO 1991), informação corroborada por

Morris e Allen (2002), que indicam que a idade da égua é um dos fatores capaz de influenciar de forma negativa o *status* reprodutivo.

Inicialmente as alterações degenerativas no endométrio da égua foram descritas e classificadas por Kenney (1978), a fim de avaliar o efeito das alterações histológicas e correlacionar os achados a capacidade da fêmea levar uma gestação a termo. Seguindo esta proposta, foram avaliadas alterações crônicas degenerativas como fibrose, dilatação cística e lacunas linfáticas. Logo, classificadas em categorias I, categoria II e categoria III, de acordo com a presença, distribuição e intensidade das lesões observadas na lâmina própria.

Posteriormente, Kenney e Doig (1986) modificaram esta classificação para I, IIA, IIB e III, ao avaliar a fibrose endometrial e sua relação com a manutenção da gestação e a resposta do animal frente a terapias. Hoffmann e colaboradores (2009) sugeriram uma nova classificação baseada na morfologia e diferenciação funcional das células estromais periglandulares, classificando a evolução do processo fibrótico em endometrose ativa, endometrose inativa, endometrose inativa destrutiva e endometrose ativa destrutiva.

Fiala e colaboradores (2010) propuseram uma classificação com base na distribuição e severidade das alterações degenerativas, sem considerar células inflamatórias na categorização das biópsias definindo como Grau 1, sem fibrose periglandular ou ninhos periglandulares; Grau 2, moderada fibrose periglandular, difusa, com 1-3 camadas, menos de 2 ninhos por campo (400x) e poucas lacunas linfáticas; Grau 3, fibrose periglandular difusa com 5-10 camadas, 2-4 ninhos por campo e presença ocasional de lacunas linfáticas e Grau 4, endometrose severa, fibrose periglandular difusa com 10 ou mais camadas, com mais de 4 ninhos e muitas lacunas linfáticas.

O progresso do processo fibrótico do estroma e periglandular no endométrio da égua pode levar à hipóxia crônica, que provavelmente afetará a produção e liberação de citocinas fibrogênicas no endométrio (CADARIO et al., 2002). O grupo de Hoffmann (2009b) relatou que, após essa mudança morfológica, o endométrio de éguas com endometrose parece ser incapaz de produzir histotrofo suficiente, podendo resultar em perdas embrionárias. Assim como a fibrose reduz a eficácia dos mecanismos de defesa uterina e a capacidade de realizar a nutrição fetal (ODDSDOTTIR et al., 2008). Éguas

velhas com endometriose apresentam deficiências no fluxo sanguíneo uterino e alteração no desenvolvimento de microvilosidades da placenta, que pode contribuir para perdas gestacionais ou redução da vida útil do potro como atleta (FERREIRA et al., 2008; OUSEY et al., 2012).

Até a data de hoje, a etiologia da endometriose permanece incerta e nenhum tratamento efetivo está disponível (HOFFMANN et al., 2009; LEHMANN et al., 2011). De acordo com os estudos de Aresu et al. (2012), a inflamação está pouco correlacionada com o grau de fibrose. Achados similares aos encontrados por Hoffmann (2009) e Keller et al. (2006) demonstraram que as endometrites possuem uma baixa correlação com o grau de fibrose periglandular. No entanto, a diminuição da capacidade uterina para realizar *clearance*, de forma crônica, pode levar ao aumento da fibrose periglandular e diminuição das taxas de gestação em éguas (LIEPINA e ANTANE, 2010). Em outros órgãos, a fibrose é uma sequela patológica de doenças inflamatórias crônicas (OLMAN, 2009). Observa-se, portanto, que os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na fibrose endometrial ainda são controversos (REBORDÃO, 2014).

2.3 Biópsia uterina

Para o auxílio no diagnóstico das endometrites, em éguas, o exame clínico deve incluir a palpação transretal, ultrassonografia do trato reprodutivo, exame vaginal, cultivo microbiológico, citologia e biópsia endometrial (REISWIG et al., 1993; BOURKE et al.; 1997; AGUILAR et al., 2006; SNIDER, 2011). Logo, a avaliação da saúde uterina equina através da biópsia endometrial é um procedimento padrão em sistemas de reprodução (SCHLAFER, 2007).

Kenney (1978) descreveu a técnica histopatológica e interpretação de biópsias uterinas em éguas para auxiliar no diagnóstico e prognóstico da capacidade de levar uma gestação a termo. Tendo em vista, que muitas das éguas prenhes abortam como resultado de alterações patológicas no endométrio (SHIDELER et al., 1982). No entanto, nas últimas décadas, novas técnicas de diagnósticos foram utilizadas para estudar o endométrio, mas os métodos histopatológicos com base em fragmentos de tecido, corados com

hematoxilina e eosina (HE) continuam a ser o principal método de avaliação endometrial (SCHLAFER, 2007). A inflamação, fibrose e dilatação cística das glândulas são algumas das alterações observadas em amostras histopatológicas (RICKETTS, 1975).

Segundo estudos de Schoon et al. (1997), a biópsia endometrial é um procedimento confiável e seguro para o diagnóstico e prognóstico de distúrbios endometriais relacionados a infertilidade na égua. A interpretação da histopatologia requer uma avaliação detalhada do histórico reprodutivo das éguas e dos achados clínicos (RICKETTS, 1975). É importante distinguir dois diferentes tipos de lesão: inflamação do endométrio, definida como aguda ou crônica e alterações degenerativas crônicas (RICKETTS e ALONSO, 1991; BRACHER et al., 1997).

As características histológicas observadas nas biópsias endometriais podem ser fisiológicas, patológicas ou ter origem em artefatos de técnica (KENNEY, 1978). Desta forma, a interpretação correta de alterações depende do conhecimento das mudanças cíclicas e estacionais do endométrio. Segundo Buczkowska (2014) alguns dos limitantes da técnica histopatológica é a necessidade de um patologista experiente, longo período de espera pelos resultados e necessidade de instrumentais especiais para realizar o procedimento.

Nielsen (2005), Liu e Troedsson (2008) compararam a biópsia endometrial com outras técnicas de diagnósticos e concluíram que a biópsia endometrial ainda é o método mais sensível e específico para o diagnóstico da endometrite na égua. Logo, ainda é um exame complementar, definitivo, para o diagnóstico da endometrite crônica degenerativa e prognóstico de éguas com subfertilidade ou infertilidade (NIELSEN et al., 2012).

A técnica de retirada de um fragmento do endométrio uterino foi amplamente descrita na literatura (RICKETTS, 1975; KENNEY, 1978; KENNEY e DOIG, 1986; VAN CAMP, 1988) e representa 0,1% (KENNEY e DOIG, 1986) a 0,2% (KENNEY, 1975) da área total da superfície do endométrio. No entanto, cabe ressaltar que a representatividade deste material em relação ao endométrio inteiro foi avaliada (KENNEY, 1975; BLANCHARD et al., 1987; DYBDAL, 1991; KELLER, 2006; FIALA et al., 2010) e os resultados encontrados foram controversos. A coleta da biópsia do endométrio da égua

deve, quando possível, ser coletada durante a fase do diestro, uma vez que as mudanças do cio podem dificultar a interpretação (RICKETTS, 1975b). Conforme Sertich (2007) esse procedimento não requer anestesia ou tranquilização da fêmea, pois o útero equino não possui inervação sensorial.

2.4 Matriz extracelular

A regulação da composição da matrix extracelular (MEC) é crucial para integridade dos tecidos (KLASS, 2000). No entanto, os processos moleculares que controlam a deposição de MEC ainda são pouco compreendidos. A MEC é fundamental para a arquitetura e função dos tecidos conjuntivos moles (HUMPHREY, 2015), assim como, possuem capacidade de modular a função celular em diversos aspectos fundamentais da biologia celular (HYNES, 2009).

Como componente principal do microambiente de uma célula, a MEC participa da maioria dos comportamentos celulares básicos, desde a proliferação celular, adesão e migração, até a diferenciação e morte celular (SCHAWARTZ et al., 1995; HYNES, 2009; LU et al., 2011). A dinâmica da matriz extracelular pode resultar de alteração de sua composição, por exemplo, resultado da síntese ou degradação de um ou mais componentes que resultará em uma reorganização tecidual (LU et al., 2011). Evidências mostram como componentes individuais de MEC são estabelecidos e organizados por meio de modificações covalentes e não-covalentes e como eles podem influenciar os aspectos fundamentais do comportamento celular (ENGLER et al., 2009; EGEBLAD et al., 2010)

Bioquimicamente os componentes da matriz extracelular podem ser divididos em proteínas, proteoglicanos e glicoproteínas, com subcategorias e variadas propriedades físicas e bioquímicas (LU et al., 2011). Algumas das proteínas da MEC, incluindo colágenos fibrilares e elastina, contribuem para maior resistência e elasticidade dos tecidos (VAKONAKIS e CAMPBELL, 2007; DALEY et al., 2008).

Todos os componentes proteicos extracelulares ou intracelulares estão sujeitos a degradação e modificação (LU et al., 2011). As enzimas mais significativas no remodelamento da MEC são as metaloproteinases (CAWSTON e YOUNG, 2010). Logo, as principais proteases envolvidas na

degradação proteolítica da MEC são as metaloproteinases de matriz (MMP), desintegrinas e metaloproteinases com motivos trombospondina (ADAMTS) e seus inibidores teciduais (TIMPs) (REISS e SAFTIG, 2009; EGEBLAD et al., 2010).

O processo de remodelação do tecido endometrial pode ser um pré-requisito para obter o melhor ambiente uterino para o desenvolvimento inicial do embrião, como relatados em estudos com camundongos e humanos (CRAWFORD e MATRISIAN, 1996; COX et al., 2001; SALAMONSEN et al., 2002). A matriz extracelular (MEC) endometrial possui um papel importante, pois é o componente não celular encontrado em todos os tecidos e órgãos, responsável por fornecer suporte físico para as células uterinas (HYNES, 2009).

A constante remodelação da estrutura da MEC, mediada por enzimas ou meios não enzimáticos são de extrema importância para manter a homeostase dos tecidos (JARVELAINEN et al., 2009, SCHMIDT e FRIEDL, 2010). As principais biomoléculas pertencentes à MEC são as proteínas estruturais (como colágeno e elastina), proteínas especializadas (como fibrilinas, fibronectinas e laminina) e proteoglicanos (ALBERTS et al., 2002; KIM et al., 2011; HYNES e NABA, 2012; HUMPHREY et al., 2015). Estas proteínas possuem função estrutural, preencher os espaços extracelulares dos tecidos; funcional, mediar adesão, crescimento, migração e diferenciação e regulatório, controlando a liberação de fatores de crescimento e citocinas pela ação de peptidases que podem modular a fisiologia celular (SCHENK e QUARANTA, 2003; MOTT e WERB, 2004; JARVELAINEN et al., 2009).

Skinner e colaboradores (1999) relataram que, em mulheres, a síntese e degradação proteolítica resultam na composição de proteínas presente na MEC endometrial, e o desequilíbrio entre a ação dessas proteases no endométrio pode resultar em diversas irregularidades estruturais e funcional, e conseqüentemente, infertilidade. É provável que o endométrio equino sofra remodelação da matriz extracelular (MEC) também observada em vacas (KAIDI et al., 1991) e outras espécies, incluindo humanos (APLIN et al., 1988; STENBACK, 1989). Entretanto, sabe-se que as células fibroblásticas desempenham um papel essencial na síntese e regulação dos componentes da

matriz extracelular e estão envolvidos na patogênese da fibrose (WALTER, 2001).

2.4.1. Colágeno

Desde a descoberta do colágeno II por Miller e Matukas (1969), novos tipos de colágeno foram identificados. Porém, o avanço no estudo dos colágenos foi impulsionado pela biologia molecular (RICARD-BLUM, 2011).

O colágeno fibrilar desempenha um papel estrutural, contribuindo para a arquitetura molecular, forma e propriedades mecânicas dos tecidos, como a resistência à tração na pele e a resistência à tração nos ligamentos (RICARD-BLUM et al., 2000; KADLER et al., 2008). A característica estrutural comum dos colágenos é a presença de uma tripla hélice que pode variar de acordo com o tipo de molécula. Essa diversidade da família do colágeno é atribuída a inúmeras cadeias, isoformas moleculares e estruturas supramoleculares para um único tipo de colágeno (RICARD-BLUM, 2011).

A matriz extracelular possui inúmeros tipos de colágenos, concentrações relativas e orientação das fibras distintas que proporciona um ambiente ideal para o crescimento celular tanto *in vitro* como *in vivo* (BADILAK, 2002). Desta forma, a deposição excessiva de colágeno na matriz extracelular durante a fibrose e fibrogênese é um novo marcador para determinar a presença do processo fibrótico (CHUNG et al., 2008).

Nos equinos, a fibrose endometrial é resultado de uma deposição anormal de colágeno ao redor das glândulas endometriais ou no estroma (HOFFMANN et al., 2009). Vários estudos comprovaram que diferentes tipos de colágeno são constituintes da MEC normal, incluindo os colágenos fibrilares tipo I e III e o colágeno laminar tipo IV, que podem ser encontrados na membrana basal (MANSOUR et al., 2003). No entanto, por décadas não existia dados sobre a presença e distribuição de diferentes tipos de colágeno no útero de éguas saudáveis comparado a amostras endometriais de éguas afetadas pela endometrose (WALTER et al., 2001). Lunelli e colaboradores (2013) demonstraram que o tipo de colágeno presente na fibrose endometrial pode auxiliar na determinação cronológica da doença.

Durante o processo de fibrogênese, o colágeno tipo III, predominante no endométrio saudável, é gradualmente substituído por colágeno tipo I, com aumento das alterações fibróticas endometriais (SEPHÉL e WOODWARD, 2001; MASSENO, 2012; COSTA, 2015). Rebordão e colaboradores (2018) não conseguiram elucidar os mecanismos exatos de acúmulo excessivo de fibras de colágeno, que alteram a estrutura endometrial e resultam em falhas reprodutivas.

As células estromais da lâmina própria têm a capacidade de depositar colágeno como resposta a estímulos locais, como inflamação crônica. Evans (1998) com o auxílio de colorações específicas para detecção de colágeno, concluiu que o aumento da quantidade de colágeno foi devido a colágenos fibrilares, tipo I e tipo III. Contrapondo, outra pesquisa, que utilizou imunohistoquímica, constatou que em éguas com fibrose endometrial a distribuição dos colágenos tipos I e III não diferiu de éguas sem fibrose, mas sim, houve aumento de colágeno tipo IV em éguas com fibrose endometrial quando comparado a éguas sem alterações fibróticas (WALTER et al., 2001).

2.5 Picrosirius Red

O corante Sirius Red F3BA, inicialmente, foi utilizado na indústria têxtil (PUCHTLER et al., 1973) e posteriormente introduzido na histologia para avaliação de colágeno com a adição de ácido pícrico (SWEAT et al., 1964). A utilização de técnicas que empregam coloração saturada de ácido pícrico são mais simples de executar, mais fácil de interpretar e mais sensível às fibras de colágeno (CONSTANTINE e MOWRY, 1986).

A matriz extracelular é uma rede complexa de proteínas intimamente associadas (ROYCE e STEINMAN, 2003). Onde o colágeno é a proteína mais abundante dentro da MEC, com mais de 20 tipos de colágeno identificados (BADYLAK, 2002). A coloração histoquímica do Trichrome de Masson é amplamente utilizado para a detecção de fibrose endometrial (BLANCHARD, 1987). No entanto, algumas outras colorações já foram utilizadas (WALTER, 2001; LECTIN; WALTER, 2003; GANJAM et al., 2006). Destas, uma das colorações promissora é Picrosirius Red (PSR) como corante específico para detecção de colágeno (JUNQUEIRA et al., 1978).

Evans (1998) e Ganjam (2006) utilizaram o PSR em conjunto com sistemas computadorizado de análise quantitativa para avaliar éguas com endometriose. Constantine e Mowry (1968) apresentaram a coloração Sirius Red para técnicas histológicas e observaram que essa coloração aumentava a birrefringência das fibras de colágeno quando estudadas com microscopia de polarização. Além de distinguir fibras de colágeno I e III, associada à microscopia de polarização (JUNQUEIRA, 1978).

Utilizando coloração pelo Picosirius Red (F3BA), Junqueira et al. (1979) desenvolveram um método simples e sensível que identifica redes de colágeno fibrilar em cortes teciduais. Picosirius red (F3BA) é um forte corante aniônico compreendendo seis grupos sulfonados que podem associar ao longo de fibras de colágeno catiônico, e melhorar a sua natural birrefringência sob luz polarizada cruzada (JUNQUEIRA et al., 1979; MONTES e JUNQUEIRA, 1991). Na medicina humana, o uso da coloração PSR associada à análise de imagens morfométricas permite a caracterização qualitativa e quantitativa de alterações da rede de colágeno em patologias degenerativas (EIJEL et al., 2003; SANSIVELSTRI–MOREL et al., 2007).

Estudos recentes e em diferentes espécies utilizaram da coloração vermelha do Picosirius Red para identificar e distinguir pela intensidade da birrefringência das fibras ópticas diferentes tipos de colágeno de acordo com suas cores sob microscopia de luz polarizada (BINNEBÖSEL et al., 2010; COEN et al. 2013; LUNELLI, 2013; CAVALLO et al., 2014). Diferentes tons de cor são observados de acordo com o tipo do arranjo molecular. O colágeno tipo III aparece verde, enquanto o tipo I é de cor amarela a vermelha (JUNQUEIRA, 1978; BORGES et al., 2007). Segundo Schläfer (2007), esse método histoquímico pode ser usado para avaliar a fibrose endometrial equina.

Controversamente, outros autores relatam que as diferentes colorações do Picosirius red, avaliada com microscopia de polirização, dependem da espessura das fibras de colágeno, não sobre a composição específica dos feixes de colágeno (RICH e WHITTAKER, 2005; COLEMAN, 2011). Entretanto, associado a sistemas de análise morfométricas, esta técnica continua a ser um excelente método para quantificar a remodelação da rede de colágeno (BERTON et al. 2000; SÉQUIER et al. 2000).

2.6 Expressão gênica

A introdução de testes moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para estudar a genômica aplicada a reprodução é inevitável, pois fornece informações detalhadas sobre a biologia tecidual com base em análise de tecido endometrial (SCHLAFER, 2007). Pouco se sabe sobre os fatores genéticos que atuam na fertilidade (HINRICHS, 2013). Logo, a aplicação da biologia molecular para estudos de proteínas da MEC e seus genes contribuiu para a descoberta de muitas moléculas anteriormente desconhecidas (HYNES e NABA 2012).

Nos últimos anos, a égua tem sido utilizada intensivamente como um modelo animal para estudos na medicina reprodutiva humana (CARNEVALE, 2017). Entretanto, estudos de expressão gênica em equinos são relativamente escassos (SMITS et al., 2009), logo, melhores abordagens para a análise dos mecanismos moleculares por trás do desenvolvimento do processo fibrótico no útero de éguas auxiliariam no entendimento da etiopatogenia da endometrose. O isolamento de genes relacionados a possíveis marcadores e associados com características economicamente importantes, maximiza o desenvolvimento de testes específicos de diagnósticos, manejo preventivo e até mesmo tratamentos (BROSNAHAN et al., 2010).

PCR em tempo real, também referido como PCR quantitativo (RT-qPCR) é uma ferramenta altamente específica e sensível para determinar mudanças quantitativas de níveis de expressão de mRNA de genes específicos e é amplamente aplicado na pesquisa em biologia reprodutiva (BUSTIN, 2005; KUBISTA, 2006; KLEIN et al., 2011; CAI, 2014). O RT-qPCR fornece meios para comparar a abundância de determinados transcriptos de interesse em tecidos obtidos a partir de diferentes estados biológicos e elementos para avaliar o impacto de tratamentos experimentais na expressão de genes de interesse (KLEIN et al., 2011).

A precisão da mensuração da RT-qPCR é dependente da normalização adequada dos dados – realizada através da utilização de genes endógenos. Os genes endógenos são derivados de genes necessários para a manutenção das funções celulares basais, independentemente do seu papel no tecido (EISENBERG e LEVANON, 2013). A avaliação da expressão gênica de dois ou

até três genes endógenos são suficientes para normalizar os dados. (THOMAS et al., 2014; PAN et al., 2015; SAINT-MARCOUX et al., 2015; SUN, 2015).

A metodologia de RT-qPCR permite a amplificação *in vitro* de ácido desoxirribonucleico (DNA) de forma eficaz. Quando a sequência alvo é composta por RNA, a reação de RT-qPCR é precedida pela transcrição reversa, na qual o RNA será transcrito em DNA complementar (cDNA). O primeiro ciclo da síntese consiste na transcrição reversa do RNA em cDNA com a utilização de PRIMERS, oligonucleotídeos iniciadores (WONG e MEDRANO, 2005).

A análise da amplificação do DNA pela técnica de RT-qPCR é constituída de três etapas bem definidas: desnaturação, que consiste na separação da fita dupla de DNA em dois filamentos devido a altas temperaturas, que são capazes de degradar as pontes de hidrogênio que unem as fitas; anelamento, que ocorre no momento em que os oligonucleotídeos iniciadores reconhecem as extremidades da sequência-alvo e por fim acontece a etapa de polimerização ou extensão, realizada pela enzima DNA polimerase, derivada da bactéria termofílica *Thermus aquaticu*, que adiciona nucleotídeos à cadeia crescente de DNA. O diferencial da metodologia de RT-qPCR é a detecção do cDNA amplificado em tempo real a cada ciclo de amplificação, o que é dado pela adição de um oligonucleotídeo marcado com um fluoróforo (sonda) que pareia-se ao DNA-alvo (MACKAY et al., 2002).

Posteriormente a realização da quantificação, as médias da expressão gênica, do gene alvo, são comparadas para se avaliar a existência de possíveis diferenças estatisticamente significativas entre eles. Para possibilitar uma melhor análise estatística, gerando resultados significativos, recomenda-se que a técnica seja realizada em duplicata ou triplicada e que a concentração total de RNA seja a mesma em cada amostra (STAHLBERG et al., 2004; BUSTIN et al., 2009). Apesar de a técnica apresentar inúmeras vantagens, alguns pontos devem ser levados em consideração para não afetar o desempenho. Questões técnicas como a qualidade da amostra, reagentes, protocolo, eficiência enzimática e do primer devem ser levados em consideração (BUSTIN, 2004; CAPPELLI, 2008).

2.6.1 Metaloproteinases de Matriz

As macromoléculas da matriz extracelular são importantes para criar ambientes necessários durante desenvolvimento e morfogênese celular (VISSE e NAGASE, 2003). As metaloproteases de matriz (MMPs) são subfamília de metaloproteases, que irão participar da degradação da matriz extracelular por degradação proteolítica de praticamente todas as proteínas da MEC (WOESSNER, 1991; STERNLICHT e WERB, 2001).

As enzimas proteolíticas são classificadas como exopeptidases ou endopeptidases com base na clivagem das ligações peptídicas terminais ou internas (STERNLICHT e WERB, 2001). MMPs são endopeptidases que participam de processos fisiológicos normais e patológicos de remodelação como desenvolvimento embrionário, morfogênese, reparação tecidual, inflamação, desenvolvimento de tumores, metástase e processo fibrótico (STETLER-STEVENSON, 1993; BIRKEDAL-HANSEN, 1995; NELSON et al., 2000; RICARD-BLUM, 2011).

Em condições fisiológicas, a atividade das MMPs é modulada através de transcrições gênicas, ativação de zimogênios, interação com componentes da MEC e inibição por inibidores endogenos específicos (NAGASE e WOESSNER, 1999; STERNLICHT e WERB, 2001). O desequilíbrio da atividade das metaloproteinases pode resultar em doenças como artrite, câncer, aterosclerose, aneurismas, nefrite, úlceras teciduais e fibrose (NAGASE e WOESSNER, 1999). Evidências sugerem que além de desempenhar esse papel no remodelamento da matriz extracelular as MMPs possuem a habilidade de modular processos epigenéticos (CHERNOV et al., 2009).

Além dos componentes da MEC, as MMPs também clivam moléculas de superfície celular e outras proteínas não matriciais pericelulares, regulando assim o comportamento celular de várias maneiras (STERNLICHT et al., 2000)

2.6.2 Inibidores Teciduais de Metaloproteinases

As metaloproteinase de matriz e seus inibidores teciduais específicos desempenham um papel fundamental no equilíbrio da matrix extracelular. Bauer et al. (1975) descreveram a existência do primeiro inibidor de

metaloproteinases endógenas, chamados de inibidores tecidual de metaloproteinases (TIMPs). Essas proteínas são classificadas com base na similaridade estrutural, assim como sua capacidade de inibir as metaloproteinases.

A expressão das TIMPs nos tecido também interfere no processo de remodelação tecidual em condições fisiológicas para manter um equilíbrio no metabolismo da matriz extracelular (DAS et al., 1997). Um dos importantes papéis das TIMPs na remodelação tecidual é a habilidade em inibir diferentes grupos de MMPs, formando complexos enzima-inibidor.

Embora os diferentes subtipos de TIMPs liguem-se fortemente à maioria MMPs (MURPHY e WILLENBROCK 1995; LIU et al., 1997), algumas diferenças nas propriedades inibitórias entre diferentes TIMPs foram relatados (BREW et al., 2000). Desta forma, com o conhecido mecanismo das TIMPs na modulação de genes envolvidos na formação de fibrose (GRESSNER et al., 2007; ZHU et al., 2012), Rebordão et al. (2013) e Centeno et al. (2018) utilizaram a expressão da TIMP como marcadores de fibrose de endométrio de éguas *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. O entendimento do mecanismo biológico dos inibidores teciduais de metaloproteinase de matriz se faz necessário para compreender o desenvolvimento fibrótico no útero de éguas.

2.6.3 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular que atuam na intercomunicação celular (HAMBLIN, 1993). Estas proteínas são liberadas em decorrência de diferentes estímulos e interagem com os seus receptores regulando a função celular (ABBAS et al., 1998), além de estarem relacionadas ao processo inflamatório. Segundo a revisão de Atamas (2002) e achados de Wynn e Ramalingam (2012), a inflamação parece estar associada à fibrose na maioria dos tecidos do corpo através da sinalização parácrina via secreção de quimiocinas profibróticas, citocinas e outros fatores de células lesadas e células inflamatórias.

O factor de necrose tumoral- α (TNF- α) é uma citocina pleiotrópica produzida por uma variedade de células que pode desencadear múltiplas vias de sinalização envolvidas na inflamação, proliferação e apoptose. Na matriz

extracelular de humanos, o TNF- α causa um desequilíbrio entre a síntese e degradação dos componentes da MEC através da desregulação das MMPs e seus inibidores (TIMPs), determinando em aumento da remodelação da MEC (SIWIK e COLUCCI, 2004).

Nos equinos, Cadario (2002) demonstrou que existe uma desregulação da expressão de citocinas na patogênese da fibrose, no entanto, os mecanismos patogênicos por trás do desenvolvimento da fibrose endometrial não foram extensivamente investigados. Fatores de crescimento e citocinas atraem fibroblastos, regulam sua migração, liga-se a receptores específicos em sua superfície e estimulam a proliferação, assim como a síntese, deposição e degradação da MEC (GUALDIE et al., 1993). Alguns autores relatam que fibroblastos e células semelhantes a miofibroblastos são centrais para o processo fibrótico como mediadores de síntese, assimilação e degradação da MEC (MUTSAERS et al., 1997; PHAN, 2002; ATAMAS, 2002; COSTA, 2017). Estudos demonstraram que endométrio de éguas com endometrose é suscetíveis à endometrite, as citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas e TNF- α , apresentam um aumento na expressão de mRNA (FUMUSO et al., 2003; SZŐSTEK et al., 2013).

O envolvimento de citocinas na patogênese da fibrose em diferentes espécies e tecidos como pulmão, fígado ou rim (WYNN, 2008), deve ser considerado como um possível modelo para abordar os mecanismos de estabelecimento da endometrose. Até o momento, a função das citocinas pró-inflamatórias na expressão de componentes da MEC e MMPs no endométrio equino não foi totalmente compreendido.

Tendo em vista que estes aspectos podem ser estudados, elucidar e auxiliar no diagnóstico da fibrose endometrial. Assim, o objetivo da pesquisa foi correlacionar dados sobre idade, classificação histopatológica, porcentagem de fibras de colágeno e de expressão gênica para analisar a interação do colágeno com as collagenases e seus inibidores dentro de cada grau de fibrose e assim determinar biomarcadores moleculares para o diagnóstico na evolução da endometrose equina e para melhor compreensão da sua etiopatologia.

3. ARTIGO

ARTIGO PARA SUBMISSÃO NA THERIOGENOLOGY

COLAGENO E COLAGENASES NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS COM ENDOMETROSE

L.A.M. Centeno^{1,2*}, H.B.A. Bastos¹, V.L.C. Bueno¹, J.M. Trentin^{1,2}, M.F. Fiorenza², W. Panziera⁴, S. Fiala-Rechsteiner³, N.A. Kretzmann¹, R.C. Mattos¹, M.I.B. Rubin³

¹REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil;

²EMBRYOLAB - Curso de Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria-RS, Brazil

³HISTOREP - Instituto de Biologia, UFPEL, Pelotas-RS, Brazil

⁴SETOR DE PATOLOGIA - Faculdade de veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil.

* **Autor para correspondencia:** Luiz Augusto Machado Centeno, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil, Email: luizmachadocenteno@gmail.com ou Tel: +55 55 9 96824616.

RESUMO

A remodelação tecidual no endométrio de éguas ocorre durante a patogênese da endometrose, este processo é caracterizado pela mudança no perfil dos componentes da matriz extracelular. A inter-relação entre as metaloproteinases de matriz e seus inibidores específicos desempenha um papel importante nesse processo de remodelação. O objetivo do presente estudo foi quantificar morfometricamente a deposição de colágeno endometrial e avaliar a expressão gênica de colágeno tipo 2 (COL-2), tipo 3 (COL-3), metaloproteinases de matriz 1 (MMP-1) e 2 (MMP-2), seu inibidor tecidual (TIMP-2) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) em biópsias uterinas de éguas com diferentes graus de fibrose (I a III). Uma amostra uterina foi obtida através de biópsia transvaginal de éguas cíclicas (n=34) entre o dia 5 e dia 10 pós-ovulação e foi seccionada em dois fragmentos. Um fragmento foi encaminhado para avaliação histopatológica e o outro foi encaminhado para análise de expressão gênica. Na histologia as amostras foram classificadas e agrupadas conforme frequência e distribuição das alterações relacionadas à fibrose no endométrio em Grau I (n=12), Grau II (n=12) e Grau III (n=10). A quantificação de colágeno foi determinada através da coloração sirius red e foi encontrado um aumento na deposição de colágeno nos grupos

Grau I ($11,72 \pm 1,394$ %), Grau II ($17,76 \pm 1,296$ %) e Grau III ($24,15 \pm 1,870$ %). Nas avaliações de transcritos foi encontrada maior expressão de COL-2 nas amostras de éguas Grau II comparada ao Grau I e Grau III. A MMP-1 apresentou aumento na expressão de mRNA nas amostras endometriais do Grau II vs Grau III. Maior expressão de MMP-2 foi detectada nas éguas Grau III comparada a éguas Grau I e Grau II. A TIMP-2 apresentou menor expressão de mRNA no Grau III vs Grau I e Grau II. A expressão gênica do TNF- α endometrial foi significativamente maior nas Grau II em relação ao Grau I e Grau III. Em conclusão, os resultados encontrados elucidam parte dos mecanismos envolvidos na patogênese da fibrose endometrial na égua. Nesta pesquisa foi demonstrado que a alteração na quantificação das fibras colágeno e na expressão de colagenases e seu inibidos tecidual estão envolvidos no processo de fibrogênese e fibrinólise endometrial. Assim representar importantes marcadores no diagnóstico de éguas com endometrose.

Palavras-chave: MEC, endometrose, picrossírius red, colágeno, mRNA

1. Introdução

A saúde endometrial é um fator determinante para a fertilidade da égua. Relacionado a isso, a endometrose equina é caracterizada por alterações glandulares e fibrose periglandular no estroma endometrial, levando ao mau funcionamento da fisiologia uterina [1]. A fibrogênese tecidual ocorre quando há uma discordância entre degradação e síntese de componentes da matriz extracelular, mediada por proteinases específicas [2]. Nos mamíferos, a expressão, ativação ou inibição seletiva de grupos específicos de metaloproteinases da matriz (MMPs) modula o processo de remodelação uterina durante várias fases do ciclo estral, período periparto e pós-parto [3].

Nos equinos, a patogênese da fibrose uterina ainda não foi totalmente elucidada, mas também está relacionada à idade das éguas [4, 5]. Graus mais altos de endometroses causam alterações no padrão de interação celular, além de, resultar em uma intensa remodelação estrutural da matriz extracelular endometrial. Mudanças estruturais no endométrio incluem a ocorrência de progressiva proliferação focal das glândulas uterinas, que são concentrados em ninhos glandulares cercados por numerosas camadas de tecido fibroso [6]. Ganjam et al. [7] sugeriram que a fibrose endometrial

pode contribuir para perdas gestacionais devido a danos à superfície endometrial, atraso no desenvolvimento placentário, taxa de crescimento fetal retardada e secreção alterada de histotrofo pelo endométrio.

As fibras de colágeno desempenham um papel importante na sustentação e integridade dos tecidos sadios. No entanto, podem exercer importante papel em processos patológicos, independentemente da causa e do órgão afetado [8]. A ativação de vias através de sinalização parácrina, secreção de quimiocinas profibróticas, citocinas e outros fatores de células lesadas [9], estimula a transição de fibroblastos em miofibroblastos e aumenta a produção de componentes da matriz extracelular MEC.

O estudo da expressão genica de MMPs, seus inibidores teciduais (TIMPs) e TNF- α pode elucidar pontos importantes do desenvolvimento de fibrose endometrial; contribuindo para os métodos de classificação do processo fibrótico e encontrar um novo marcador de fibrose endometrial. O objetivo do presente estudo foi quantificar morfometricamente a deposição de colágeno endometrial e avaliar a expressão gênica de colágeno tipo 2 (COL-2), tipo 3 (COL-3), metaloproteinases de matriz 1 (MMP-1) e 2 (MMP-2), seu inibidor tecidual (TIMP-2) e fator de necrose tumoral alfa(TNF- α) em biópsias uterinas de éguas com diferentes graus de fibrose.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais

Éguas cíclicas (n=34) com idade média de $14,17 \pm 6,4$ e alojadas em diferentes fazendas no estado do Rio Grande do Sul/Brasil foram utilizadas para compor o estudo. Todos os animais eram mantidos em manadas, manejadas no sistema extensivo de exploração com campo nativo e água *ad libitum* conforme a propriedade de origem. Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil (Protocolo nº 5816261015).

A avaliação do status reprodutivo das éguas foi efetuada através de palpação retal e exame ultrassonográfico (SonoScape A6v, China). A análise ginecológica completa do trato reprodutivo foi realizada e as amostras endometriais de 34 éguas

foram coletadas através de biópsia uterina. As éguas foram separadas em três grupos de acordo com o grau de fibrose uterina descrito por Kenney [10]: Grau I (n = 12), Grau II (n = 12) e Grau III (n = 10).

Uma amostra de cada égua foi obtida do corno uterino pelo método transvaginal conforme Ricketts [11] e Hanada [12] durante a estação reprodutiva, na fase de diestro (D5 - D10) do ciclo estral. Posteriormente, a amostra do tecido foi seccionada transversalmente dando origem a dois fragmentos. O primeiro fragmento foi destinado para fixação em formalina 7% e outro foi acondicionando em solução estabilizante RNAlater® (Invitrogen™) e armazenado a - 80°C. Todas as amostras foram coletadas de éguas com histórico de falhas reprodutivas e agrupadas de acordo com o grau de fibrose.

2.2. Avaliação Histopatológica

Para a avaliação histopatológica e classificação de fibrose, todas as amostras foram submetidas ao mesmo processamento laboratorial sendo fixação em formalina 7% e inclusão em parafina. Posteriormente, as amostras foram seccionadas com auxílio de um micrótomo rotativo semi motorizado (Leica Biosystems® RM2245) em fragmentos de 4 µm de espessura, distribuídas em lâminas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Picosirius Red (PSR) [13].

A coloração HE foi utilizada para avaliação geral das amostras, pois fornece uma estimativa da morfologia celular, distribuição e frequência dos processos inflamatório e degenerativo do endométrio da égua [10,14-16]. As amostras histopatológicas foram processadas como procedimentos laboratoriais de rotina e analisados à microscopia ótica para avaliar a frequência e distribuição das alterações degenerativas.

2.3. Picosirius Red

A técnica de coloração de PSR é analisada com auxílio da microscopia de polarização ou através da microscopia ótica. O procedimento permite estudar a remodelação tecidual da matriz extracelular através da avaliação de distintos tipos de colágeno e também quantificar a deposição de colágeno nos tecidos [17, 18, 19]. O colágeno no endométrio equino foi avaliado morfometricamente e quantificado através

da coloração Direct Red 80 (Sigma-Aldrich 365548). A solução de 0,1% de Direct Red 80, saturada em solução aquosa de ácido pícrico foi preparada de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras de tecidos foram desparafinadas e na sequência, coradas com PSR e as lâminas foram montadas com meio de montagem rápida Entellan® (Merck, Alemanha) e lamínula de vidro.

2.4. Quantificação do colágeno

Oito imagens digitais de cada amostra foram capturadas em alta resolução (3.1 megapixels) com auxílio do microscópio óptico (Leica Microsystems DM500) conectado a câmera digital ICC50HD (Leica Microsystems) e processado pelo *software* LAS EZ (Leica Application Suite version 3.2.0) em magnificação 100x. As imagens capturadas e utilizadas no estudo foram realizadas de forma aleatória e sem sobreposição. O avaliador realizou o procedimento as cegas quanto a identidade das amostras e a natureza dos grupos. Em seguida, a técnica de análise e quantificação morfométrica das imagens digitais coradas com PSR foi realizada através do *software* ImageJ 1.52a (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) em quatro etapas bem definidas: ajuste das imagens de pixel para micrometros, conversão para *a grayscale*, delimitar o colágeno corado de vermelho usando o ícone *Threshold* e por fim, quantificar a área determinada pelo *Threshold*. Com as imagens já calibradas em micrometros o comando *RGB Stack* foi utilizado para dividir as imagens em canais vermelho, verde e azul. No entanto, todas as análises foram realizadas no canal verde, pois apresenta o melhor contraste para as avaliações [20]. A ferramenta *Threshold* foi utilizada para delimitar a área de colágeno e mensurar esta área em razão da área total da imagem (APÊNDICE A).

2.5. Expressão gênica (RT-qPCR)

Para a quantificação relativa da abundância dos transcritos foi conduzidos ensaios de RT-qPCR. Os fragmentos teciduais destinado a análises biomoleculares foram estabilizados e armazenados em tubos criogênico livre de DNase, RNase e nuclease (Kasvi, Canadá) em RNAlater® (Invitrogen™). Inicialmente, a extração de mRNA com TRIzol Reagent® (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante. Imediatamente após a extração, o mRNA foi quantificado por espectrofotometria. Em seguida, a transcrição reversa de mRNA em cDNA foi obtida

através do Kit SuperScript III® (Invitrogen™). O grau de pureza, das amostras submetidas à reação, foi determinado pela avaliação no espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare). Na qual amostras de cDNA com relação A260/A280 de 1.8 – 2.0 foram consideradas com alto grau de pureza. Posteriormente, a amplificação de cDNA foi realizada com intercalante fluoróforo SYBR Green Master Mix™ (Thermo Fisher Scientific) e submetidos a 40 ciclos de 95°C por 15 segundos no sistema StepOnePlus™ (Applied Biosystems) com temperatura de anelamento específica por 30 segundos e alongamento a 60°C por 30 segundos. O cálculo comparativo da expressão relativa de mRNA das amostras foi realizada com “cycle threshold” (CT) dos genes alvos através da fórmula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) e expresso em unidades arbitrárias. A quantificação dos genes alvo foi obtida utilizando primers específicos de equinos para COL-2, COL-3, MMP-1, MMP-2, TIMP-2 e TNF- α . Os genes constitutivos gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β -actina (ACTB) foram usados para realizar a normalização dos dados. Todas as reações foram realizadas em duplicata e um controle negativo foi incluído em cada corrida para avaliação de reações inespecíficas. Os primers de amplificação foram obtidos da Integrated DNA Technologies (IDT). As referências das sequências de primers utilizadas e temperaturas de anelamento são listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências de primers e temperatura de anelamento utilizados para amplificação gênica e detecção de mRNA através da RT-qPCR. Iniciadores específicos *Equus Cabalus* (Eq) demonstrado antes da nomenclatura dos genes.

Gene	Primer	Ane (T°C)	Ref.
EqCOL-2	F: 5'-TTAGACGCCATGAAGGTTTTCTG-3' R: 3'-CTCTTGCTGCTCCACCAGTTCT-5'	60	[21]
EqCOL-3	F: 5'-GGAAGTTGCTGAAGGAGGATGC-3' R: 3'-TGGAATCTCTGGGTTGGGACAG-5'	59	[22]
EqMMP-1	F: 5'-CATCGTGACAATTCTCCCTTTG-3' R: 3'-TACGTGGGCCTGGCTGAA-5'	59	[23]
EqMMP-2	F: 5'-ATGGCGCCCATTTACACGTA-3' R: 3'-AGCTCTGAATGCCCTTGATG-5'	59	[24]
EqTIMP-2	F: 5'-GGTGGACTCTGGGAACGACA-3' R: 3'-CGAGGAGGGAGCCGTGTAGA-5'	53	[25]
EqTNF- α	F: 5'-GCTCCAGACGGTGCTTGTG-3' R: 3'-GCCGATCACCCCAAAGTG-5'	59	[26]
EqGAPDH	R: 5'-GATTGTCAGCAATGCCTCCT-3' R: 3'-AAGCAGGGATGATGTTCTGG-5'	60	[27]
Eq β -actina	F: 5'-CGACATCCGTAAGCACCTGT-3' R: 3'-GTGGACAATGAGGCCAGAAT-5'	59	[27]

Abreviaturas: F: Primer Foward, R: Primer Revrse.

2.6. Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando *software* Statistix 8 e a avaliação de normalidade dos resultados foi utilizado o teste Shapiro-Wilks. Os valores para analisar a quantificação do colágeno endometrial foram calculados através do teste ANOVA seguidos do test T de Tukey e estão demonstrados na figura 1 a média, \pm SD (desvio padrão). Para cada análise da expressão gênica os dados de distribuição anormal, foram submetidos a testes estatísticos não paramétricos. Onde as variáveis dependentes (COL-2, COL-3, MMP-1, MMP-2, TIMP-2 e TNF- α) e independente (grau de fibrose) foram analisadas e a diferença foi determinada pelo Teste de Wilcoxon Rank e considerado significativo quando $P < 0,05$.

A correlação simples de Pearson foi escolhida para verificar relações entre as características estudadas. Com nível de significância de $P < 0,05$, foram consideradas correlações de média e alta intensidade as que compreendiam valores entre 0,40 a 0,60 e $> 0,60$ respectivamente. (Tabela 2).

3. Resultados

No presente estudo, a média de idade dos animais de Grau I foi de $9,91 \pm 4,44$, de Grau II foi de $13,41 \pm 4,54$ e de Grau III foi de $20,2 \pm 5,97$. A análise da área de colágeno tecidual corada com PSR revelou aumento significativo da deposição de colágeno conforme o grau de endometriose (Figura 1). Grau I ($11,72 \pm 1,394$ %), Grau II ($17,76 \pm 1,296$ %) e Grau III ($24,15 \pm 1,870$ %). A comparação entre os grupos revelou, Grau I vs Grau II ($P = 0,004$), Grau I vs Grau III ($P < 0,0001$) e Grau II vs Grau III ($P = 0,0096$) Foi encontrada uma correlação positiva entre a idade dos animais e a deposição de colágeno (Tabela 2). A figura 2 ilustra os resultados das colorações de HE e PSR em amostras endometriais de éguas com diferentes graus de fibrose.

Maior abundância de transcritos de COL-2 foi detectada nas amostras de éguas Grau II em relação a éguas Grau I ($P=0,026$) e éguas Grau III ($P=0,003$) (Figura 3.A.). A expressão basal de COL-3, embora sem diferença significativa, também apresentou um aumento na expressão de fêmeas Grau II em relação a animais Grau I ($P=0,412$) e Grau III ($P=0,303$). A MMP-1 apresentou tendência descendente na expressão de mRNA (Figura 3.C.) nas amostras endometriais classificadas como Grau I comparado ao grupo Grau III ($P = 0,081$) e Grau II ($P=0,907$), também ocorreu maior expressão no grupo II em relação ao grupo III ($P=0,009$). Maior expressão de MMP-2 ocorreu nas éguas Grau III comparado a éguas Grau I ($P = 0,009$). Assim como, nas de Grau III em relação a Grau II ($P = 0,007$) (Figura 3.D.). A TIMP-2 apresentou menor expressão de mRNA no Grau III confrontado as fêmeas Grau I ($P = 0,008$). Da mesma maneira que o Grau III em relação ao Grau II ($P = 0,019$) (Figura 3.E.). A expressão gênica do TNF- α endometrial foi significativamente maior nas Grau II contratado a Grau I ($P=0,012$) e Grau III ($P=0,002$) (Figura 3.F.).

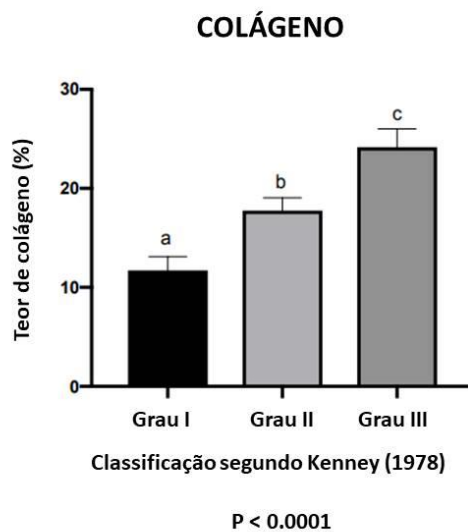


Figura 1. Análises da quantificação de colágeno com PSR através do software ImageJ em amostras uterinas de éguas. ^{acb} Letras indicam diferenças significativa entre os grupos (P<0.05).

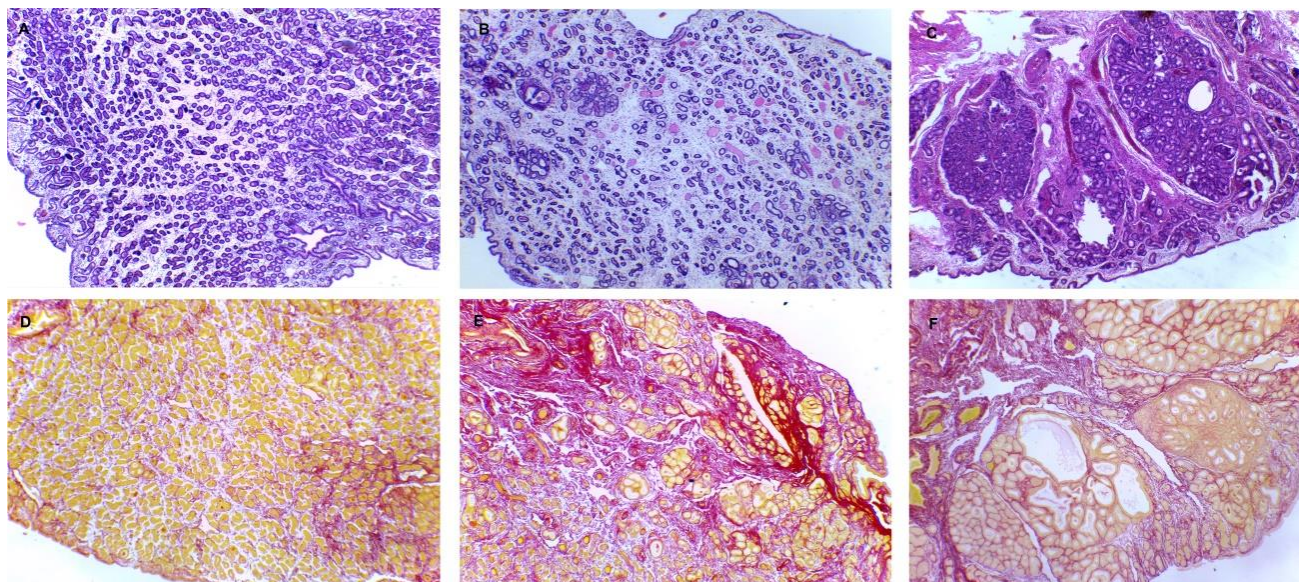


Figura 2. Imagens histopatológicas do endométrio das éguas, com diferentes graus de endometrioses, segundo Kenney [16]. Endométrio saudável Grau I (A), Grau II (B), Grau III (C) corados com hematoxilina e eosina; endométrio saudável Grau I (D), Grau II (E), Grau III (F) corado com picrosirius red. Imagens de A – F em magnificação x500.

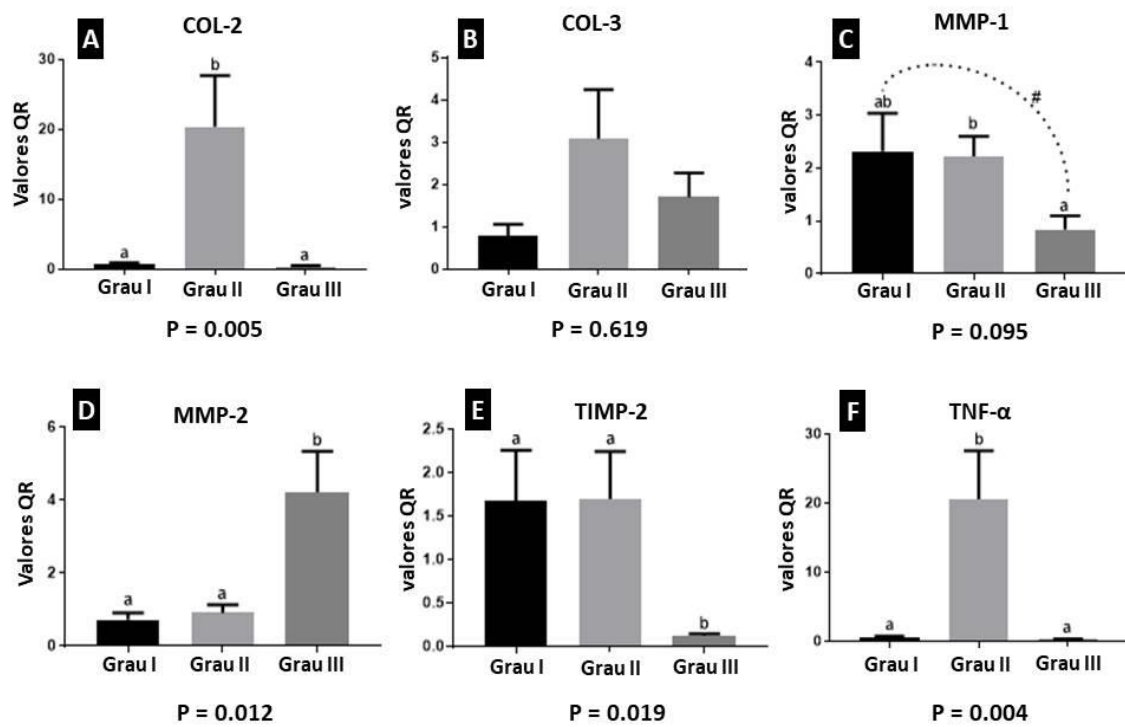


Figura 3. Quantificação relativa (QR) da expressão gênica (\pm S.E.D.) do mRNA de COL-2, COL-3, MMP-1, MMP-2, TIMP-2 e TNF- α no endométrio de éguas com diferentes graus de fibrose. ^{ab} Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos (P < 0.05), assim com, # indica tendência descendente.

Tabela 2. Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis: idade, % de colágeno e expressão genica de COL-2, COL-3, MMP-1, MMP-2, TIMP-2 e TNF- α de éguas com diferentes graus de endometrose.

	IDADE	SIRIUS RED	COL-2	COL-3	MMP-1	MMP-2	TIMP-2
SIRIUS RED	0.4984 0.0155*	-	-	-	-	-	-
COL-2	0.1315 0.5499	-0.3698 0.0824	-	-	-	-	-
COL-3	0.1074 0.6256	-0.0836 0.7046	0.6913 0.0003*	-	-	-	-
MMP-1	-0.1903 0.3845	-0.1018 0.6440	0.1430 0.5150	0.2112 0.3334	-	-	-
MMP-2	0.3750 0.0779	0.2750 0.2041	-0.1707 0.4362	-0.1806 0.4096	-0.4081 0.0532	-	-
TIMP-2	-0.5490 0.0067*	-0.2529 0.2443	-0.2801 0.1956	-0.1929 0.3779	0.0505 0.8191	-0.1618 0.4607	-
TNF-α	0.1363 0.5353	-0.2763 0.2019	0.9255 0.0000*	0.8875 0.0000*	0.2124 0.3305	0.2086 0.3395	-0.2467 0.2565

* Indica diferença estatística ($P < 0,05$).

4. Discussão

O envelhecimento é considerado o fator mais importante relacionado ao desenvolvimento da endometrose em éguas [1, 28-30]. No presente estudo observou-se que o agravamento das alterações degenerativas coincide com o aumento da idade das fêmeas. Além de possuir correlação positiva com a idade (Tabela 2), ocorreu aumento da deposição de colágeno no tecido endometrial analisado. Dados similares foram observados em vários estudos descritos na literatura [10, 28, 29, 31, 32, 33].

Excesso de deposição de colágeno leva à fibrose, base de doenças crônicas, em muitos órgãos, incluindo rim, pulmão, e fígado [34]. A quantidade de colágeno depositada pelos fibroblastos é resultado da síntese e catabolismo de colágeno [35]. Embora, o processo de fibrogenese e fibrólise também ocorra na remodelação de tecidos saudáveis. Apesar de inúmeros trabalhos abordando as alterações degenerativas do

endométrio, a etiologia da endometriose ainda não é totalmente esclarecida, muito devido à falta de modelos experimentais adequados para facilitar os estudos [36].

Lunelli e colaboradores [37] relataram que a coloração histoquímica do Picrosirius Red pode identificar e quantificar a fibrose endometrial em éguas. Assim, medidas quantitativas de patologias relacionadas à fibrose são essenciais para obtenção de resultados precisos e reprodutíveis [18, 38, 39]. Seguindo esta linha, a mensuração da morfometria do colágeno nos tecidos histológicos tornou-se um padrão em procedimento e pesquisa, pois fornece informações confiáveis sobre a organização estrutural do colágeno no tecido [40,41].

A classificação correta de amostras com ênfase nas alterações degenerativas depende de um avaliador experiente, pois pode ser influenciada por diversos fatores como: distribuição, tamanho dos ninhos fibróticos, número de camadas de fibrose e a quantidade de fibrose individual podem dificultar a interpretação [1, 42-45]. Assim, Evans et al. [31] desenvolveram um novo método computadorizado para a medição precisa da fibrose periglandular em éguas com auxílio de coloração específica para colágeno (Picrosirius Red). No entanto, poucos relatos na literatura descrevem metodologias para quantificação de fibrose endometrial em detalhes.

Embora esta metodologia não elimine completamente a influência do avaliador para determinar o grau de fibrose, reduz a dependência. O único aspecto dependente do investigador é a seleção inicial e aquisição de imagens nas regiões de interesse que se aplica a todas as amostras. Desta forma foi possível observar aumento significativo de deposição de colágeno em éguas classificadas como Grau II e Grau III comparado a fêmeas Grau I. As fibras de colágeno desempenham um papel vital não apenas na manutenção da integridade estrutural, mas também na determinação da função do tecido. Por exemplo, o aumento da fibrose endometrial leva a diminuição na função uterina [5, 46-51] e, portanto, a quantificação da fibrose tem sido sugerida como um método de avaliar o prognóstico.

A coloração com picrosirius red não distingue entre matriz fibrótica antiga e matriz fibrótica recém-formada [49]. Para minimizar esse problema uma das alternativas seria a realização de biópsia seriada, ou encontrar potenciais marcadores específicos. Em geral, a quantificação de tecido fibrótico seguida de análise computadorizada pode ser usada como um indicador de prognóstico da função endometrial. Seu valor prognóstico pode ser aumentado por técnicas que abordam a dinâmica da formação da matriz de fibrótica. Vantagens importantes da técnica

apresentada é o fato de ser simples, barata, de alta reprodutibilidade, além de análises imparciais da fibrose [50]. Por esta razão, esta técnica pode ter um papel importante em futuros análises de rotina que abordem detecção, quantificação e dinâmica do colágeno.

Possíveis alterações nas expressões gênicas podem revelar mudanças na função endometrial e pode estar associadas a efeitos adversos na fertilidade das éguas [51]. Desta forma, fornecemos evidências da influência das MMP-1, MMP-2, TIMP-2 e TNF- α , embora já comprovadas em processo fibróticos em diferentes espécies e tecidos [36, 52-56], na expressão de mRNA de COL-2 na matriz extracelular do endométrio equino.

Masseno [57] e Costa [58] afirmaram que na endometrose, o COL-3, predominante no endométrio saudável é gradualmente substituído pelo COL-1, com alterações fibróticas endometriais crescentes. No entanto, com base nos dados de RT-qPCR, observamos que embora haja similaridade nos transcritos do COL-3 nas amostras endometriais estudadas ($P > 0,05$; Figura. 2.B), o colágeno tipo 3 apresentou uma maior expressão em fêmeas classificadas com grau II. Isso pode sugerir uma mudança no perfil de colágeno na matriz extracelular conforme a o agravamento da endometrose. Szostek-Mioduchowska et al. [59] relataram o aumento da secreção basal de COL-3 em cultivos celulares de endométrio classificados com severo grau de endometrose. Não obstante se identifique controvérsias nos dados da literatura os mesmos são importantes, pois biomarcadores de colágeno tipo III têm sido amplamente associados à fibrogênese [60].

É interessante que a expressão genica de transcritos COL-2 no endométrio equino tenha aumentado em fêmeas classificadas como Grau II em comparação com tecidos saudáveis e com alterações degenerativas graves (Figura 2.A.). Na literatura existem poucos relatos a respeito da presença do colágeno tipo 2 em tecido endometrial. A maioria dos estudos de expressão genica de COL-2 refere sua presença predominante em tecido cartilaginoso [34] e envolvimento em patologias relacionadas a degenerações articulares em animais [61-63] e humanos [64, 65]. É provável que o aumento da transcrição genica seja acompanhado pelo aumento da produção da proteína colágeno tipo II. No entanto, a identificação e quantificação da proteína não foi avaliada neste estudo, portanto necessita de maiores abordagens.

Claramente, este estudo revelou que o COL-2 deve estar envolvido no progresso e diferenciação do endométrio saudável em endométrio com severo grau de endometrose. Isto é embasado pelo aumento intersticial de marcadores de colágeno tipo

II no decorrer da progressão da fibrose endometrial. Após estabilização, o processo de diferenciação do endométrio cessa a transcrição do gene. Consequentemente, é de grande importância considerar a presença de transcritos de COL-2 como uma ferramenta complementar que pode auxiliar na avaliação do desenvolvimento do processo fibrotico no útero de éguas. Em humanos, a mudança das fibras de colágeno em fígados fibrótico parece ser determinante para a progressão da cirrose hepática [66]. Está claro que variação do tipo de colágeno, concentração em conjunto com desequilíbrio entre a síntese e degradação do colágeno devem interferir no desenvolvimento da endometrose.

Por outro lado, a co-expressão do COL-2 e COL-3 foi confirmado em nosso estudo através da correlação positiva existente entre a expressão dos genes (Tabela 1, $r = 0.6913$, $P < 0.05$). Entretanto, Rebordão e colaboradores [67] não conseguiram elucidar os mecanismos exatos da produção excessiva e acúmulo das fibras de colágeno, que altera a estrutura endometrial e resulta em falha reprodutiva. Cabe ressaltar que os colágenos fibrilares modulam-se de forma lenta e geralmente são resistentes à digestão da proteinase, exceto pelas metaloproteinases da matriz [34].

O processo de fibrinogênese e fibrólise em diferentes espécies inicia-se pela mudança no perfil dos componentes da matriz extracelular, modulada por proteinases [68]. As MMPs mediam não apenas a degradação da MEC, mas também amplificam a resposta inflamatória e influenciam a progressão da remodelação tecidual [69]. No entanto, a resposta endometrial a proteases específicas como MMP-1 e MMP-2 apresentou valores de expressão inversa, sugerindo ações opostas na cascata de formação de fibrose endometrial. A expressão da MMP pelos miofibroblastos foi relatada em vários processos fibróticos em cavalos [70]. Wynn [71] revisou a origem do miofibroblasto e relatou que embora inicialmente se pensasse que os fibroblastos de tecidos locais ativados eram os principais produtores de componentes da MEC após lesão, acredita-se agora que os miofibroblastos são derivados de pelo menos duas fontes adicionais.

Nos equinos foi proposto que as MMPs poderiam ter um papel em diferentes processos patológicos. Clutterbuck et al. [72] relataram o envolvimento de MMPs em laminite, osteoartrite, obstrução recorrente das vias aéreas, reparo de feridas na pele, doenças degenerativas do sistema nervoso central, ceratite ulcerativa e câncer. Até onde sabemos apenas dois estudos [68, 73] relatou a expressão e a atividade da MMP-2 na endometrose equina.

O padrão de síntese e a regulação dos componentes da matriz extracelular muda de acordo com a gravidade do processo. A MMP-1 é uma colagenase relacionada à remodelação fisiológica do tecido do endométrio [3]. Isso é corroborado pelos achados do presente estudo, uma vez que houve maior expressão gênica da MMP-1 no endométrio de éguas classificadas como Grau I e II em relação ao Grau III (Figura 2.C., $p < 0.05$). A redução da expressão dessas colagenase pelo endométrio Grau III sugere que há comprometimento no remodelamento da matriz extracelular em diferentes fases do ciclo estral, levando ao aumento no grau de fibrose. Neste estudo, a MMP-2 apresentou maior expressão gênica no Grau III em comparação aos outros grupos, confirmando os achados de Han [2], em que ratos com fibrose hepática observou maior expressão da MMP-2. O aumento da MMP-2 também foi verificado no endométrio de éguas com endometroses [70, 73].

A inter-relação entre as metaloproteinases de matriz e seus inibidores específicos desempenha um papel importante nesse processo de remodelação uterina. As TIMPs são os inibidores endógenos mais importantes das MMPs, onde o domínio amino-terminal dos TIMPs liga-se e inibe o local ativo das MMPs [52]. Em nosso trabalho, a TIMP-2 apresentou menor expressão de mRNA no Grau III confrontado às éguas classificadas como Grau I. Similarmente ocorreu com achados de éguas Grau III em relação ao Grau II. Esse mecanismo de *feedback* negativo entre a expressão de MMP-2 e TIMP-2 nas éguas com severo grau de fibrose indica que o desequilíbrio entre a expressão dessas proteinases determina a complexa reorganização da matriz extracelular. Achados similares foram relatos por Aresu et al. [74] sugerindo que o TIMP-2 desempenha um papel duplo no controle da MMP-2 no processo da endometrose. O estudo desenvolvido por Kendzioriski e Belcher [36] também detectou diminuição da expressão genica de TIMP-2 em endométrios de ratos com fibrose periglandular.

Na presente pesquisa também testamos a hipótese de que a citocina pró-inflamatória (TNF- α) pode regular o metabolismo da matriz extracelular. A interação complexa entre células, citocinas e proteases resultará em uma maior ou menor reestruturação do tecido. Osawa et al. [75] afirmaram que entre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α um dos mais significantes e exerce funções pleiotrópicas, desencadeando eventos de sinalização celulares que levam à fibrose hepática em ratos. Embora o resultado da análise do TNF- α tenha revelado diferença (Figura 2.F.) na expressão de éguas Grau II comparadas com Grau I e Grau III, esses resultados indicam

que esta citocina parece ser importante no processo de sinalização celular para gerenciar o processo de diferenciação endometrial. O TNF- α estimulou a síntese de colágeno, pois, apresentou uma coexpressão altamente significativa ($p > 0.00001$) com a expressão dos colágenos tipo 2 e tipo 3 (Tabela 1). Cabe ressaltar que a síntese de colágeno é regulada tanto na transcrição quanto na pós-tradução [76].

5. Conclusão

Os resultados encontrados elucidam parte dos mecanismos envolvidos na patogênese da fibrose endometrial na égua. Foi demonstrado que endométrio equino saudável (Grau I) possui menor deposição de colágeno, baixa expressão gênica de COL-2, MMP-2 e TNF- α , além de maior expressão de MMP-1 e TIMP-2. Endométrio com moderado grau de endometrose (Grau II) teve um aumento na deposição de colágeno, menor expressão de MMP-2, aumento na abundâncias de transcritos de COL-2 e TNF- α , maior expressão de MMP-1 e TIMP-2. Fêmeas equinas com severo grau de endometrose (Grau III) apresentaram significativo aumento da deposição de colágeno, aumento da expressão basal de mRNA de MMP-2 e redução na expressão basal de COL-2, MMP-1, TIMP-2 e TNF- α . Desta forma alterações na quantificação das fibras colágeno e na expressão de colagenases, seu inibidores tecidual e TNF- α devem modular a reorganização tecidual envolvidos no processo de fibrogenese e fibrinólise endometrial assim representar importantes marcadores no diagnóstico de éguas com endometrose.

Referencias

- [1] Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R.C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B., Schoon, H. A. (2009). The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Animal reproduction science*, 111(2-4), 261-278.
- [2] Han, Y.P. (2006). Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 21, S88-S91.
- [3] Curry Jr, T.E., Osteen, K. G. (2003). The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrine reviews*, 24(4), 428-465.
- [4] Ricketts, S.W., Alonso, S. (1991). The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine veterinary journal*, 23(3), 189-192.

- [5] Hoffmann, C., Bazer, F.W., Klug, J., Aupperle, H., Ellenberger, C., Schoon, H. A. (2009). Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: Expression patterns for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology*, 71(2), 264-274.
- [6] Buczkowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M., Raś, A., Mrowiec, J. (2014). Endometrosis—significance for horse reproduction, pathogenesis, diagnosis, and proposed therapeutic methods. *Polish journal of veterinary sciences*, 17(3), 547-554.
- [7] Ganjam, V. K., Evans, T. J. (2006). Equine endometrial fibrosis correlates with 11 β -HSD2, TGF- β 1 and ACE activities. *Molecular and cellular endocrinology*, 248(1-2), 104-108.
- [8] Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 214(2), 199-210.
- [9] Wynn, T.A., Ramalingam, T.R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature medicine*, 18(7), 1028
- [10] Kenney, R.M. (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 172(3), 241-262.
- [11] RickettS, S.W. (1975). The technique and clinical application of endometrial biopsy in the mare. *Equine veterinary journal*, 7(2), 102-108.
- [12] Hanada, M., Maeda, Y., Oikawa, M. A. (2012). Equine endometrial gland density and endometrial thickness vary among sampling sites in thoroughbred mares. *Journal of equine science*, 23(3), 35-40.
- [13] Puchtler, H., Waldrop, F.S., Valentine, L. S. (1973). Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beiträge zur Pathologie*, 150(2), 174-187.
- [14] Brandt, G.W., Manning, J.P. (1969). Improved uterine biopsy technics for diagnosing infertility in the mare. *Veterinary medicine, small animal clinician: VM, SAC*, 64(11), 977-983.
- [15] Schlafer, D.H. (2007). Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques?. *Theriogenology*, 68(3), 413-422.
- [16] Herrera, M., Herrera, J. M., Cantatore, S., Aguilar, J., Felipe, A., & Fumuso, E. (2018). Comparative histomorphological study of endometrium in mares. *Anatomia, histologia, embryologia*, 47(2), 153-158.
- [17] Junqueira, L.C.U., Bignolas, G., Brentani, R. R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal*, 11(4), 447-455.
- [18] Hadi, A.M., Mouchaers, K.T., Schaliij, I., Grunberg, K., Meijer, G.A., Vonk-Noordegraaf, A. et al. (2011). Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. *Cellular oncology*, 34(4), 343-354.
- [19] Rittié, L. (2017). Method for picrosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. In *Fibrosis* (pp. 395-407). Humana Press, New York, NY.

- [20] Musah, S., Chen, J., Schlueter, C., Humphrey Jr, D.M., Stocke, K., Hoyle, M. I., Hoyle, G.W. (2019). Inhibition of chlorine-induced airway fibrosis by budesonide. *Toxicology and applied pharmacology*, 363, 11-21.
- [21] Barrachina, L., Remacha, A.R., Romero, A., Zaragoza, P., Vázquez, F.J., Rodellar, C. (2018). Differentiation of equine bone marrow derived mesenchymal stem cells increases the expression of immunogenic genes. *Veterinary immunology and immunopathology*, 200, 1-6.
- [22] Jacobsen, E., Dart, A. J., Mondori, T., Horadogoda, N., Jeffcott, L.B., Little, C.B., Smith, M. M. (2015). Focal experimental injury leads to widespread gene expression and histologic changes in equine flexor tendons. *PLoS one*, 10(4), e0122220.
- [23] Yuan, Z.Q., Nicolson, L., Marchetti, B., Gault, E. A., Campo, M.S., Nasir, L. (2008). Transcriptional changes induced by bovine papillomavirus type 1 in equine fibroblasts. *Journal of virology*, 82(13), 6481-6491.
- [24] Yuan, Z., Gobeil, P.A., Campo, M.S., Nasir, L. (2010). Equine sarcoid fibroblasts over-express matrix metalloproteinases and are invasive. *Virology*, 396(1), 143-151.
- [25] Sessions-Bresnahan, D.R., Carnevale, E. M. (2014). The effect of equine metabolic syndrome on the ovarian follicular environment. *Journal of animal science*, 92(4), 1485-1494.
- [26] Riihimäki, M., Raine, A., Pourazar, J., Sandström, T., Art, T., Lekeux, P., et al. (2008). Epithelial expression of mRNA and protein for IL-6, IL-10 and TNF- α in endobronchial biopsies in horses with recurrent airway obstruction. *BMC veterinary research*, 4(1), 8.
- [27] Coyne, M.J., Cousin, H., Loftus, J.P., Johnson, P.J., Belknap, J.K., Gradil, C.M., et al. (2009). Cloning and expression of ADAM-related metalloproteases in equine laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 129(3-4), 231-241.
- [28] Ricketts, S. W., Alonso, S. (1991). Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. *Equine Veterinary Journal*, 23(3), 185-188.
- [29] Flores J.M., Rodriguez A., Sanchez J., Gomez-Cuetara C., Ramiro F (1995). Endometrosis in Mares: Incidence of Histopathological Alteration. *Reprod Dom Anim* 30, 61-65.
- [30] Schoon, H.A., Schoon, D. (2003). The Category I mare (Kenney and Doig 1986): Expected foaling rate 80-90%-fact or fiction?. *Pferdeheilkunde*, 19(6), 698-701.
- [31] Evans, T.J., Miller, M.A., Ganjam, V.K., Niswender, K.D., Eilersieck, M.R., Krause, W. J., Youngquist, R. S. (1998). Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. *American journal of veterinary research*, 59(10), 1209-1214.
- [32] Bracher, V., Mathias, S., Allen, W. R. (1996). Influence of chronic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. *Equine Veterinary Journal*, 28(3), 180-188.
- [33] Walter, I., Handler, J., Reifinger, M., Aurich, C. (2001). Association of endometrosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction-Cambridge-*, 121(4), 581-586.
- [34] Sephel, G. C., Woodward, S. C. (2001). Repair, regeneration, and fibrosis. *Rubin's pathology*, 84-117.

- [35] Pinto-Bravo, P., Rebordão, M.R., Amaral, A., Fernandes, C., Cuello, C., Parrilla, I., et al. (2018). Is mare endometriosis linked to oviduct fibrosis?. *Pferdeheikunde-Equine Med*, 34, 1-4.
- [36] Kendzioriski, J.A., Belcher, S.M. (2015). Strain-specific induction of endometrial periglandular fibrosis in mice exposed during adulthood to the endocrine disrupting chemical bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, 58, 119-130.
- [37] Lunelli, D., Cirio, S.M., Leite, S.C., Camargo, C. E., Kozicki, L.E. (2013). Collagen types in relation to expression of estradiol and progesterone receptors in equine endometrial fibrosis. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(04), 599.
- [38] Laurinavicius, A., Laurinaviciene, A., Dasevicius, D., Elie, N., Plancoulaine, B., Bor, C., Herlin, P. (2012). Digital image analysis in pathology: benefits and obligation. *Analytical cellular pathology*, 35(2), 75-78.
- [39] Kayser, G., Kayser, K. (2013). Quantitative pathology in virtual microscopy: history, applications, perspectives. *Acta histochemica*, 115(6), 527-532.
- [40] Van Zuijlen, P. P., de Vries, H. J., Lamme, E. N., Coppens, J. E., Van Marle, J., Kreis, R. W., Middelkoop, E. (2002). Morphometry of dermal collagen orientation by Fourier analysis is superior to multi-observer assessment. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 198(3), 284-291.
- [41] Marcos-Garcés, V., Molina Aguilar, P., Bea Serrano, C., García Bustos, V., Benavent Seguí, J., Ferrández Izquierdo, A., Ruiz-Saurí, A. (2014). Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing—a morphometric and comparative study. *Journal of anatomy*, 225(1), 98-108.
- [42] Ricketts, S. W. (1975). Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (23), 341-345.
- [43] Kenney, R. M., Doig, P. A. (1986). Equine endometrial biopsy. *Current therapy in theriogenology*, 2, 723-729.
- [44] Keller, A., Neves, A. P., Aupperle, H., Steiger, K., Garbade, P., Schoon, H. A., et al. (2006). Repetitive experimental bacterial infections do not affect the degree of uterine degeneration in the mare. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 94, No. 1-4, 276-279)
- [45] Fiala, S.M., Esmeraldino, A., Jobim, M.I.M, Garbade P., Wolf, C.A., Richter G., Gregory R.M., MATTOS R.C. (2010). Endometrial fibrotic changes. Is one biopsy enough to diagnose degenerative changes?. *Anim. Reprod. Sci.*, 121, S89-S90.
- [46] LeBlanc, M.M., Causey, R. C. (2009). Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 10-22.
- [47] Lehmann, J., Ellenberger, C., Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Allen, W. R., et al. (2011). Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometriosis. *Theriogenology*, 76(7), 1326-1336.
- [48] Rebordão, M. R., Galvão, A., Szóstek, A., Amaral, A., Mateus, L., Skarzynski, D. J., Ferreira-Dias, G. (2014). Physiopathologic mechanisms involved in mare endometriosis. *Reproduction in domestic animals*, 49, 82-87.
- [49] Pape, L., Henne, T., Offner, G., Strehlau, J., Ehrich, J.H., Mengel, M., Grimm, P. C. (2003). Computer-assisted quantification of fibrosis in chronic allograft nephropathy

by picosirius red-staining: a new tool for predicting long-term graft function. *Transplantation*, 76(6), 955-958.

[50] Grimm, P. C., Nickerson, P., Gough, J., McKenna, R., Stern, E., Jeffery, J., Rush, D. N. (2003). Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(6), 1662-1668.

[51] Boakari, Y.L., El-Sheikh Ali, H., Dini, P., Loux, S., Fernandes, C.B., Scoggin, K., et al. (2019). A High Protein Model Alters the Endometrial Transcriptome of Mares. *Genes*, 10(8), 576.

[52] Craig, V.J., Zhang, L., Hagood, J.S., Owen, C.A. (2015). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 53(5), 585-600.

[53] Sangaralingham, S.J., Wang, B.H., Huang, L., Kumfu, S., Ichiki, T., Krum, H., Burnett Jr, J. C. (2016). Cardiorenal fibrosis and dysfunction in aging: imbalance in mediators and regulators of collagen. *Peptides*, 76, 108-114.

[54] Amaral, A., Fernandes, C., Lukasik, K., Szóstek-Mioduchowska, A., Baclawska, A., Rebordão, M. R., et al. (2018). Elastase inhibition affects collagen transcription and prostaglandin secretion in mare endometrium during the estrous cycle. *Reproduction in domestic animals*, 53, 66-69.

[55] Roeb, E. (2018). Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects). *Matrix Biology*, 68, 463-473.

[56] Szóstek-Mioduchowska, A.Z., Baclawska, A., Okuda, K., Skarzynski, D. J. (2019). Effect of proinflammatory cytokines on endometrial collagen and metalloproteinase expression during the course of equine endometrosis. *Cytokine*, 123, 154767.

[57] Masseno, A.P.B. (2012). Avaliação da fibrose endometrial e dos miofibroblastos nas endometroses ativa e inativa de éguas. Tese. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

[58] Costa, L.D.D. (2015). Caracterização histoquímica e imuno-histoquímica das alterações fibróticas nas endometroses das éguas. Tese. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

[59] Szóstek-Mioduchowska, A.Z., Lukasik, K., Skarzynski, D.J., Okuda, K. (2019). Effect of transforming growth factor- β 1 on α -smooth muscle actin and collagen expression in equine endometrial fibroblasts. *Theriogenology*, 124, 9-17.

[60] Karsdal, M.A., Genovese, F., Madsen, E.A., Manon-Jensen, T., Schuppan, D. (2016). Collagen and tissue turnover as a function of age: Implications for fibrosis. *Journal of hepatology*, 64(1), 103-109.

[61] Garvican, E.R., Vaughan-Thomas, A., Innes, J.F., Clegg, P. D. (2010). Biomarkers of cartilage turnover. Part 1: Markers of collagen degradation and synthesis. *The Veterinary Journal*, 185(1), 36-42.

[62] Broeckx, S., Zimmerman, M., Crocetti, S., Suls, M., Marien, T., Ferguson, S. J., et al. (2014). Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *PloS one*, 9(1), e85917.

- [63] Murata, D., Miyakoshi, D., Hatazoe, T., Miura, N., Tokunaga, S., Fujiki, M., et al. (2014). Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid. *The Veterinary Journal*, 202(1), 53-61.
- [64] Dejica, V.M., Mort, J.S., Laverty, S., Antoniou, J., Zukor, D.J., Tanzer, M., Poole, A. R. (2012). Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage. *Arthritis research & therapy*, 14(3), R113.
- [65] Liu, Q., Zhang, X., Dai, L., Hu, X., Zhu, J., Li, L., et al. (2014). Long noncoding RNA related to cartilage injury promotes chondrocyte extracellular matrix degradation in osteoarthritis. *Arthritis & rheumatology*, 66(4), 969-978.
- [66] Xu, X., Li, Y. M., Ji, H., Hou, C. Z., Cheng, Y. B., Ma, F. P. (2005). Changes of ECM and CAM gene expression profile in the cirrhotic liver after HCV infection: analysis by cDNA expression array. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11(14), 2184.
- [67] Rebordão, M.R., Amaral, A., Lukasik, K., Szóstek-Mioduchowska, A., Pinto-Bravo, P., Galvão, A., et al. (2018). Constituents of neutrophil extracellular traps induce in vitro collagen formation in mare endometrium. *Theriogenology*, 113, 8-18.
- [68] Centeno, L., Bastos, H., Bueno, V., Trentin, J., Fiorenza, M., Fiala-Rechsteiner, S., et al. (2018). Gene Expression of MMP-1, MMP-2 and TNF- α in the Endometrium of Mares With Different Degrees of Fibrosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, 143-144.
- [69] Wynn, T.A., Vannella, K. M. (2016). Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*, 44(3), 450-462.
- [70] Walter, I., Klein, M., Handler, J., Aurich, J.E., Reifinger, M., Aurich, C. (2001). Lectin binding patterns of uterine glands in mares with chronic endometrial degeneration. *American journal of veterinary research*, 62(6), 840-845.
- [71] Wynn, T.A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation*, 117(3), 524-529.
- [72] Clutterbuck, A.L., Harris, P., Allaway, D., Mobasheri, A. (2010). Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. *The veterinary journal*, 183(1), 27-38.
- [73] Walter, I., Handler, J., Miller, I., Aurich, C. (2005). Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue transglutaminase (TG 2) are expressed in periglandular fibrosis in horse mares with endometrosis. *Histology and histopathology*.
- [74] Aresu, L., Benali, S., Giannuzzi, D., Mantovani, R., Castagnaro, M., Falomo, M.E. (2012). The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. *Journal of veterinary science*, 13(2), 171-177
- [75] Osawa, Y., Hoshi, M., Yasuda, I., Saibara, T., Moriwaki, H., Kozawa, O. (2013). Tumor necrosis factor- α promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells. *PLoS One*, 8(6), e65251.
- [76] Laurent, G. J. (1987). Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 252(1), C1-C9.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É evidente a importância do estudo do perfil gênico para a elucidadação dos fatores envolvidos no desenvolvimento da endometriose equina. Os genes relacionados à modulação dos componentes da matrix extracelular endometrial revelaram significativo valor nesta pesquisa. Por esta razão, podem servir como biomarcadores da saúde do endométrio. Por esse motivo, buscou-se correlacionar diferentes graus de fibrose com possíveis genes envolvidos no processo fibrótico.

Os resultados deste estudo poderão direcionar futuras pesquisas, como o estudo de proteínas para avaliar se a expressão desses eventuais biomarcadores realmente se confirma com a identificação de proteínas no tecido endometrial de éguas com endometriose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, J.; HANKS, M.; SHAW, D. J.; ELSE, R.; WATSON, E. (2006). Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares. ***Theriogenology***, 66(2), 423-430.

ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WALTER P.; (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York, NY, USA: Garland Publishing.

APLIN, J.D.; CHARLTON, A.K.; AYAD, S. (1988). An immunohistochemical study of human endometrial extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. ***Cell and tissue research***, 253(1), 231-240.

ARESU, L.; BENALI, S.; GIANNUZZI, D.; MANTOVANI, R.; CASTAGNARO, M.; FALOMO, M. E. (2012). The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. ***Journal of Veterinary Science***, 13(2), 171-177.

ASBURY, A.C. (1982) Some observations on the relationship of histologic inflammation in the endometrium of mares to fertility. Proc. 28th Ann. Conf. Am. Ass. Equine Pract. 1982: 401-404.

ATAMAS, S.P. (2002). Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. ***Life sciences***, 72(6), 631-643.

AURICH, C. (2011). Reproductive cycles of horses. ***Animal Reproduction Science***, 124(3-4), 220-228.

BADYLAK, S. F. (2002). The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. In *Seminars in cell & developmental biology*. vol. 13, n. 5, 377-383).

BADYLAK, S.F. (2002). The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. In *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 13, n. 5, 377-383.

BALL B.A. (1993) Embryonic death in mares. In: Mckinnon AO, Voss JL, eds. Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, 517-531.

BARROS S.S.; MASSUDA E.K. (2009). Endometrial biopsy in the mare - diagnosis and prognosis. 2 edição.... Santa Maria, 49.

BAUER, E.A.; STRICKLIN, G.P.; JEFFREY, J.J.; EISEN, A.Z. (1975). Collagenase production by human skin fibroblasts. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, 64(1), 232-240.

BERTON, A.; GODEAU, G.; EMONARD, H.; BABA, K.; BELLON, P.; HORNEBECK, W.; BELLON, G. (2000). Analysis of the ex vivo specificity of human gelatinases A and B towards skin collagen and elastic fibers by computerized morphometry. *Matrix Biology*, 19(2), 139-148.

BINNEBÖSEL, M.; KLINK, C. D.; OTTO, J.; CONZE, J.; JANSEN, P.L.; ANUROV, M. et al. (2010). Impact of mesh positioning on foreign body reaction and collagenous ingrowth in a rabbit model of open incisional hernia repair. *Hernia*, 14(1), 71-77.

BIRKEDAL-HANSEN, H. (1995). Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current opinion in cell biology*, 7(5), 728-735.

BLANCHARD, T.L.; GARCIA, M.C.; KINTNER, L.D.; KENNEY, R.M. (1987). Investigation of the representativeness of a single endometrial sample and the use of trichrome staining to aid in the detection of endometrial fibrosis in the mare. *Theriogenology*, 28(4), 445-450.

BLANCHARD, T.L.; GARCIA, M.C.; KINTNER, L.D.; KENNEY, R.M. (1987). Investigation of the representativeness of a single endometrial sample and the use of trichrome staining to aid in the detection of endometrial fibrosis in the mare. *Theriogenology*, 28(4), 445-450.

BORGES, L.F.; GUTIERREZ, P.S.; MARANA, H.R.C.; TABOGA, S.R. (2007). Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron*, 38(6), 580-583.

BOURKE, M.; MILLS, J.N.; BARNES, A.L. (1997). Collection of endometrial cells in the mare. *Aust Vet J.* ;75 (10), 755-8.

BRACHER, V.; GERSTENBERG, C.; ALLEN, W.R. (1997). The influence of endometriosis on fertility, placentation and fetal development in the horse. *Pferdeheilkunde*, 13(5), 465.

BRAMER, S. A.; MACEDO, A.; KLEIN, C. (2017). Hexokinase 2 drives glycogen accumulation in equine endometrium at day 12 of diestrus and pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15(1), 4.

BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477(1-2), 267-283.

BRINSKO, S.P. (2011) Endometritis. In: **Manual of Equine Reproduction**, 3 ed. Estados Unidos: Mosby Elsevier, cap. 6, 73-84.

BROSNAHAN, M.M.; BROOKS, S.A.; ANTCZAK, D. F. (2010). Equine clinical genomics: A clinician's primer. *Equine Veterinary Journal*, 42(7), 658-670.

BRUNCKHORST, D., SCHOON, H. A., BADER, H., & SIEME, H. (1991). Morphologische, enzym-und immunhistochemische Charakteristika des endometrialen Zyklus bei der Stute. *Fertilität*, 7, 44–51.

BUCZKOWSKA, J.; KOZDROWSKI, R.; NOWAK, M.; RAŚ, A.; MROWIEC, J. (2014). Endometrosis–significance for horse reproduction, pathogenesis, diagnosis, and proposed therapeutic methods. *Polish journal of veterinary sciences*, 17(3), 547-554.

BUCZKOWSKA, J.; KOZDROWSKI, R.; NOWAK, M.; RAŚ, A.; STARONIEWICZ, Z.; SIEMIENIUCH, M. J. (2014). Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 27.

BURKITT, H.G.; YOUNG, B.; HEATH, J.W. (1994). **Histologia Funcional**. 3ed. BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3), 597-601.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*, 15(3), 155.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M. et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.

CADARIO, M.E.; LOSINNO, L.; GIGUERE, S.; AGUILAR, J.; JACK, T. J.; MACPHERSON, M. et al. (2002). Uterine expression of fibrogenic cytokines in the mare. *Theriogenology*, 58(2-4), 449-452.

CAI, J.; LI, T.; HUANG, B.; CHENG, H.; DING, H.; DONG, W. et al. (2014). The use of laser microdissection in the identification of suitable reference genes for normalization of quantitative real-time PCR in human FFPE epithelial ovarian tissue samples. *PloS One*, 9(4), e95974.

CAPPELLI, K.; FELICETTI, M.; CAPOMACCIO, S.; SPINSANTI, G.; SILVESTRELLI, M.; SUPPLIZI, A. V. (2008). Exercise induced stress in horses: selection of the most stable reference genes for quantitative RT-PCR normalization. *BMC Molecular Biology*, 9(1), 49.

CARNEVALE, E.M. (2017). The Mare as an Animal Model for Reproductive Aging in the Women. *En: Shatten H, Constantinescu GM.(ed). Animal Models and Human Reproduction. Hoboken, New Jersey, USA: Wiley Blackwell (John Wiley & Sons Inc.)*, 235-242.

CAVALLO, J.A., ROMA, A.A., JASIELEC, M.S., OUSLEY, J., CREAMER, J., PICHERT, M.D. et al. (2014). Remodeling characteristics and collagen distribution in synthetic mesh materials explanted from human subjects after abdominal wall reconstruction: an analysis of remodeling characteristics by patient risk factors and surgical site classifications. ***Surgical Endoscopy***, 28(6), 1852-1865.

CAWSTON, T.E.; YOUNG, D.A. (2010). Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. ***Cell and tissue research***, 339(1), 221.

CENTENO, L., BASTOS, H., BUENO, V., TRENTIN, J., FIORENZA, M., FIALA-RECHSTEINER, S. et al. (2018). Gene Expression of MMP-1, MMP-2 and TNF- α in the Endometrium of Mares With Different Degrees of Fibrosis. ***Journal of Equine Veterinary Science***, 66, 143-144.

CHERNOV, A.V.; SOUNNI, N. E.; REMACLE, A. G.; STRONGIN, A. Y. (2009). Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. ***Journal of Biological Chemistry***, 284(19), 12727-12734.

CHUNG, H.J.; STEPLEWSKI, A.; CHUNG, K.Y.; UITTO, J.; FERTALA, A. (2008). Collagen Fibril Formation A NEW TARGET TO LIMIT FIBROSIS. ***Journal of Biological Chemistry***, 283(38), 25879-25886.

COEN, M.; MENEGATTI, E.; SALVI, F.; MASCOLI, F.; ZAMBONI, P.; GABBIANI, G.; BOCHATON-PIALLAT, M. L. (2013). Altered collagen expression in jugular veins in multiple sclerosis. ***Cardiovascular Pathology***, 22(1), 33-38.

COLEMAN, R. (2011). Picrosirius red staining revisited. ***Acta histochemica***, 3(113), 231-233.

CONSTANTINE, V. S.; MOWRY, R. W. (1968). Selective staining of human dermal collagen: II. The use of picrosirius red F3BA with polarization microscopy. ***Journal of Investigative Dermatology***, 50(5), 419-423.

COSTA, L. D.; DIAS, M.C.; ALVARENGA, M.A.; SEQUEIRA, J.L. (2017). Identificação dos colágenos I, III, IV e α -SMA e participação dos miofibroblastos no processo fibrótico das endometroses equinas. ***Arq. Bras. Med. Vet. Zootec***, 69(6), 1398-1406.

COSTA, L.D.D. (2015). Caracterização histoquímica e imuno-histoquímica das alterações fibróticas nas endometroses das éguas. Tese. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

COX, K.E., PIVA, M.; SHARPE-TIMMS, K.L. (2001). Differential regulation of matrix metalloproteinase-3 gene expression in endometriotic lesions compared with endometrium. ***Biology of reproduction***, 65(4), 1297-1303.

CRAWFORD, H.C.; MATRISIAN, L.M. (1996). Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. ***Enzyme and Protein***, 49, 20-37.

CROWELL-DAVIS, S. L. (2007). Sexual behavior of mares. *Hormones and behavior*, 52(1), p. 12-17.

DALEY, W.P.; PETERS, S.B.; LARSEN, M. (2008). Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. ***Journal of cell science***, 121(3), 255-264.

DAS, S. K.; YANO, S.; WANG, J.; EDWARDS, D. R.; NAGASE, H.; DEY, S. K. (1997). Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. ***Developmental Genetics***, 21(1), 44-54.

DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. (1987) Textbook of veterinary histology, **Filadélfia: Lea & Febiger**, v. 3, p. 330-334.

DOIG, P. A.; MCKNIGHT, J. D.; MILLER, R. B. (1981). The use of endometrial biopsy in the infertile mare. ***The Canadian Veterinary Journal***, 22(3), 72.

DYBDAL, N.O.; DAELS, P.F.; COUTO, M. A.; HUGHES, J. P.; KENNEDY, P. C. (1991). Investigation of the reliability of a single endometrial biopsy sample, with a note on the correlation between uterine cysts on biopsy grade. ***Journal of Reproduction & Fertility, supplement***, 44, 967.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. (2009). Textbook of veterinary anatomy-E-Book. Elsevier Health Sciences. 563 – 585.

EGEBLAD, M.; RASCH, M.G.; WEAVER, V.M. (2010). Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. ***Current opinion in cell biology***, 22(5), 697-706.

EISENBERG, E.; LEVANON, E.Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. ***Trends in Genetics***, 29(10), 569-574.

EJEIL, A.L.; GAULTIER, F.; IGONDJO-TCHEN, S.; SENNI, K.; PELLAT, B.; GODEAU, G.; GOGLY, B. (2003). Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression?. ***Journal of Periodontology***, 74(2), 196-201.

ENGLER, A.J.; HUMBERT, P.O.; WEHRLE-HALLER, B.; WEAVER, V. M. (2009). Multiscale modeling of form and function. *Science*, 324(5924), 208-212.

EVANS, T.J., MILLER, M.A., GANJAM, V.K., NISWENDER, K.D., ELLERSIECK, M.R., KRAUSE, W.J.; YOUNGQUIST, R.S. (1998). Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. ***American Journal of Veterinary Research***, 59(10), 1209-1214.

FAOstat (2017). Statistical databases. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.

FERREIRA, J.C.; GASTAL, E.L.; GINTHER, O.J. (2008). Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. ***Reproduction***, 135(4), 541-550.

FIALA, S.M.; ESMERALDINO, A.; JOBIM, M.I.M; GARBADE P.; WOLF, C.A.; RICHTER G.; GREGORY R.M.; MATTOS R.C. (2010). Endometrial fibrotic changes. Is one biopsy enough to diagnose degenerative changes?. ***Anim. Reprod. Sci.***, 121, S89-S90.

FLORES J.M.; RODRIGUEZ A.; SANCHEZ J.; GOMEZ-CUETARA C.; RAMIRO F. (1995). Endometriosis in Mares: Incidence of Histopathological Alteration. *Reprod Dom Anim* 30, 61-65.

FUMUSO, E.; GIGUÈRE, S.; WADE, J.; ROGAN, D.; VIDELA-DORNA, I.; BOWDEN, R. A. (2003). Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. ***Veterinary Immunology and Immunopathology***, 96(1-2), 31-41.

GANJAM, V. K.; EVANS, T. J. (2006). Equine endometrial fibrosis correlates with 11 β -HSD2, TGF- β 1 and ACE activities. ***Molecular and Cellular Endocrinology***, 248(1-2), 104-108.

GASTAL, E. L., NEVES, A. P., MATTOS, R. C., PETRUCCI, B. P. L., GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. (2008). Miniature ponies: 1. Follicular, luteal and endometrial dynamics during the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(3), 376-385.

GAULDIE, J.; JORDANA, M.; COX, G. (1993). Cytokines and pulmonary fibrosis. ***Thorax***, 48(9), 931-935.

GINTHER, O. J. (1979). Reproductive biology of the mare-basic and applied aspects.

GINTHER, O. J. (1992). Reproductive biology of the mare. *Basic and applied aspects*, 75.

GRESSNER, O.A.; WEISKIRCHEN, R.; GRESSNER, A. M. (2007). Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. ***Clinica Chimica Acta***, 381(2), 107-113.

HAMBLIN, A.S. (1993) Cytokines and cytokine receptors. 2. ed. New York: Oxford University Press.

HEIN, K. (2000). Morpho-funktionelle Untersuchungen an der Cervix uteri und am Endometrium der Stute im Verlauf des Zyklus. Dissertation. *Hannover: Tierärztliche Hochschule.*

HERRERA, M., HERRERA, J. M., CANTATORE, S., AGUILAR, J., FELIPE, A.; FUMUSO, E. (2018). Comparative histomorphological study of endometrium in mares. *Anatomia, histologia, embryologia*, 47(2), 153-158.

HINRICHS, K. (2012). Assisted reproduction techniques in the horse. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(1), 80-93.

HOFFMANN, C., BAZER, F. W., KLUG, J., ALLEN, W. R., AUPPERLE, H., ELLENBERGER, C., & SCHOON, H. A. (2003). Morpho-functional studies regarding the pathogenesis of equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions-preliminary results. *Pferdeheilkunde*, 19(6), 666-669.

HOFFMANN, C.; BAZER, F. W.; KLUG, J.; AUPPERLE, H.; ELLENBERGER, C.; SCHOON, H. A. (2009). Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: Expression patterns for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology*, 71(2), 264-274.

HOFFMANN, C.; ELLENBERGER, C.; MATTOS, R. C.; AUPPERLE, H.; DHEIN, S.; STIEF, B.; SCHOON, H. A. (2009). The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Animal reproduction science*, 111(2-4), 261-278.

HUMPHREY, J.D.; DUFRESNE, E.R.; SCHWARTZ, M.A. (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(12), 802.

HYNES, R.O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326(5957), 1216-1219.

HYNES, R.O.; NABA, A. (2012). Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(1), a004903.

JÄRVELÄINEN, H.; SAINIO, A.; KOULU, M.; WIGHT, T. N.; PENTTINEN, R. (2009). Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 61(2), 198-223.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical Journal*, 11(4), 447-455.

JUNQUEIRA, L.C.U.; COSSERMELLI, W.A.; BRENTANI, R. (1978). Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Archivum histologicum japonicum*, 41(3), 267-274.

KADLER, K.E.; HILL, A.; CANTY-LAIRD, E. G. (2008). Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. ***Current Opinion in Cell Biology***, 20(5), 495-501.

KAIDI, R.; BROWN, P. J.; DAVID, J. S.; ETHERINGTON, D. J.; ROBINS, S. P. (1991). Uterine collagen during involution in cattle. ***Matrix***, 11(2), 101-107.

KATILA, T. (1996). Uterine defence mechanisms in the mare. ***Animal Reproduction Science***, 42(1-4), 197-204.

KELLER, A.; NEVES, A.P.; AUPPERLE, H.; STEIGER, K.; GARBADE, P.; SCHOON, H.A. et al. (2006). Repetitive experimental bacterial infections do not affect the degree of uterine degeneration in the mare. ***Animal Reproduction Science***, vol. 94, 1-4, 276-279.

KENNEY, R.M. (1993). The etiology, diagnosis and classification of CDE. ***Equine Veterinary Journal***, v. 25, n.3, 185-186. In: John P. Hughes International Workshop of Equine Endometritis, 1992, Davis, California.

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

KENNEY, R.M. (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. ***Journal of the American Veterinary Medical Association***, 172(3), 241-262.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. (1986). Equine endometrial biopsy. ***Current therapy in theriogenology***, 2, 723-729.

KENNEY, R.M.; GANJAM, V. K. (1975). Selected pathological changes of the mare uterus and ovary. ***Journal of Reproduction and Fertility. Supplement***, (23), 335-339.

KIM, S.H.; TURNBULL, J.; GUIMOND, S. (2011). Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. ***Journal of Endocrinology***, 209(2), 139-151.

KLASS, C.M.; COUCHMAN, J.R.; WOODS, A. (2000). Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan. ***J Cell Sci***, 113(3), 493-506.

KLEIN, C.; RUTLLANT, J.; TROEDSSON, M. H. (2011). Expression stability of putative reference genes in equine endometrial, testicular, and conceptus tissues. ***BMC Research Notes***, 4(1), 120.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K. et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. ***Molecular Aspects of Medicine***, 27(2-3), 95-125.

LE BLANC M.M. (2003). Persistent mating induced endometritis. *In*: Robinson, N.E. (ed.) *Current therapy in equine medicine* 5. Philadelphia: WB Saunders. 234-237.

LEBLANC, M. M.; CAUSEY, R. C. (2009). Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. ***Reproduction in Domestic Animals***, 44, 10-22.

LEHMANN, J.; ELLENBERGER, C.; HOFFMANN, C.; BAZER, F. W.; KLUG, J.; ALLEN, W. R. et al. (2011). Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. ***Theriogenology***, 76(7), 1326-1336.

LEON, P. M. M; CAMPOS, V. F; KAEFER, C.; BEGNINI, K. R.; MCBRIDE, A. J. A.; DELLAGOSTIN, O. A.; COLLARES, T. (2013). Expression of apoptotic genes in immature and in vitro matured equine oocytes and cumulus cells. ***Zygote***, 21(3), 279-285.

LIEPINA, E.; ANTANE, V. (2010). Endometrial histological changes and pregnancy rates in mares impaired cervical drainage. *In Proceedings of 29th International Scientific Conference Animals. Health. Food Higiene. Jelgava, Latvia*, 73-78.

LIU, I.K.M.; TROEDSSON, M.H.T. (2008). The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. ***Theriogenology***, 70(3), 415-420.

LIU, Y.E.; WANG, M.; GREENE, J.; SU, J.; ULLRICH, S.; LI, H. et al. (1997). Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). ***Journal of Biological Chemistry***, 272(33), 20479-20483.

LU, P.; TAKAI, K.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12), a005058.

LUNELLI, D.; CIRIO, S.M.; LEITE, S.C.; CAMARGO, C.E.; KOZICKI, L.E. (2013). Collagen types in relation to expression of estradiol and progesterone receptors in equine endometrial fibrosis. ***Advances in Bioscience and Biotechnology***, 4(04), 599.

MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E.; NITSCHKE, A. (2002). Real-time PCR in virology. ***Nucleic Acids Research***, 30(6), 1292-1305.

MANSOUR, G.D.; HENRY, M.; FERREIRA, A.M.R. (2003). Immunohistochemical study of equine endometrial extracellular matrix during the oestrous cycle. ***Journal of Comparative Pathology***, 129(4), 316-319.

MASSENO, A.P.B. (2012). Avaliação da fibrose endometrial e dos miofibroblastos nas endometroses ativa e inativa da éguas. Tese. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

MCKINNON A.O; VOSS J. (1993) Breeding the problem mare. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L Equine Reproduction, Filadelfia: Lea & Fabiger, 368-378.

MILLER, E.J.; MATUKAS, V.J. (1969). Chick cartilage collagen: a new type of $\alpha 1$ chain not present in bone or skin of the species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 64(4), 1264-1268.

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

MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R. (2002). Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine veterinary journal*, 34(1), 51-60.

MOTT, J. D.; WERB, Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current opinion in cell biology*, 16(5), 558-564.

MURPHY, G.; WILLENBROCK, F. (1995) Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. In *Methods in enzymology*, vol. 248, 496-510.

MUTSAERS, S.E.; BISHOP, J.E.; MCGROUTHER, G.; LAURENT, G. J. (1997). Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29(1), 5-17.

NAGASE H.; WOESSNER J.F. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-4

NELSON, A. R.; FINGLETON, B.; ROTHENBERG, M. L.; & MATRISIAN, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *Journal of Clinical oncology*, 18(5), 1135-1135.

NIELSEN, J.M. (2005). Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology*, 64(3), 510-518.

NIELSEN, J.M.; NIELSEN, F.H.; PETERSEN, M.R. (2012). Diagnosis of equine endometritis—Microbiology, cytology and histology of endometrial biopsies and the correlation to fertility. *Pferdeheilkunde*, 28(1), 8-13.

ODDSDÓTTIR, C. (2008). Development of endometrial fibrosis in the mare: factors involved in tissue remodelling and collagen deposition. Tesis. The University of Edinburgh, Edinburgh.

ODDSDÓTTIR, C.; RILEY, S. C.; LEASK, R.; SHAW, D. J.; AURICH, C.; PALM, F. et al. (2011). Dynamics of activities of matrix metalloproteinases-9 and-2, and the tissue inhibitors of MMPs in fetal fluid compartments during gestation and at parturition in the mare. *Theriogenology*, 75(6), 1130-1138.

OLMAN, M.A. (2009). Beyond TGF- β : a prostaglandin promotes fibrosis. *Nature Medicine*, 15(12), 1360.

OUSEY, J.C.; KÖLLING, M.; NEWTON, R.; WRIGHT, M.; ALLEN, W.R. (2012). Uterine haemodynamics in young and aged pregnant mares measured using Doppler ultrasonography. *Equine Veterinary Journal*, 44, 15-21.

PALMER, E.; GUILLAUME, D. (1992). Photoperiodism in the equine species-what is a long night?. *Animal Reproduction Science*, 28(1-4), 21-30.

PAN, H.; YANG, X.; SIEGFRIED, B.D.; ZHOU, X. (2015). A comprehensive selection of reference genes for RT-qPCR analysis in a predatory lady beetle, *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae). *PloS One*, 10(4), e0125868.

PHAN, S. H. (2002). The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest*, 122(6), 286S-289S.

PYCOCK JF. (2007) Therapy for Mares with Uterine Fluid. In: McKinnon AO et al. (Ed). Current Therapy in Equine Reproduction. St. Louis: Saunders Elsevier. 93-104.

PUCHTLER, H.; WALDROP, F. S.; VALENTINE, L. S. (1973). Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beiträge zur Pathologie*, 150(2), 174-187.

REBORDÃO, M. R.; GALVÃO, A.; SZÓSTEK, A.; AMARAL, A.; MATEUS, L.; SKARZYNSKI, D. J.; FERREIRA-DIAS, G. (2014). Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 82-87.

REBORDÃO, M.R.; AMARAL, A.; LUKASIK, K.; SZÓSTEK-MIODUCHOWSKA, A.; PINTO-BRAVO, P.; GALVÃO, A. et al. (2018). Constituents of neutrophil extracellular traps induce in vitro collagen formation in mare endometrium. *Theriogenology*, 113, 8-18.

REBORDÃO, M.R.; GALVÃO, A.; SZÓSTEK, A.; LUKASIK, K.; PIOTROWSKA-TOMALA, K.; SKARZYNSKI, D. J.; FERREIRA-DIAS, G. (2013). Neutrophil extracellular traps and cytokines on prostaglandins and markers of fibrosis (TIMP and TGF β 1) in the equine endometrium in vitro. *Reproductive Biology*, (13), 54-55.

REISS, K.; SAFTIG, P. (2009). The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. In *Seminars in cell & developmental biology*. vol. 20, n. 2, 126-137.

REISWIG, J. D.; THRELFALL, W. R.; ROSOL, T. J. (1993). A comparison of endometrial biopsy, culture and cytology during oestrus and dioestrus in the horse. ***Equine Veterinary Journal***, 25(3), 240-241.

RICARD-BLUM, S. (2011). The collagen family. ***Cold Spring Harbor Perspectives in Biology***, 3(1), a004978.

RICARD-BLUM, S., DUBLET, B., & VAN-DER-REST, M. (2000). *Unconventional Collagens: Types VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIV, XVI, and XIX*. Oxford University Press.

RICH, L.; WHITTAKER, P. (2005). Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. ***Journal of Morphological Sciences***, 22(2).

RICKETTS, S. W. (1975). Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. ***Journal of Reproduction and Fertility. Supplement***, (23), 341-345.

RICKETTS, S. W. (1975). The technique and clinical application of endometrial biopsy in the mare. ***Equine Veterinary Journal***, 7(2), 102-108.

RICKETTS, S.W. (1978). Histological and histopathological studies of the endometrium of the mare. Fellowship Thesis. *Royal College of Veterinary Surgeons, London*.

RICKETTS, S.W.; ALONSO, S. (1991). Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. ***Equine veterinary journal***, 23(3), 185-188.

RICKETTS, S.W.; YOUNG, A. (1990) Thoroughbred mare fertility. *Vet. Rec.* 126,68.

ROYCE, P. M.; STEINMANN, B. (2003). *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects*. John Wiley & Sons.

SAINT-MARCOUX, D., PROUST, H., DOLAN, L., LANGDALE, J.A. (2015). Identification of reference genes for real-time quantitative PCR experiments in the liverwort *Marchantia polymorpha*. ***PLoS One***, 10(3), e0118678.

SALAMONSEN, L. A.; ZHANG, J.; BRASTED, M. (2002). Leukocyte networks and human endometrial remodelling. ***Journal of Reproductive Immunology***, 57(1-2), 95-108.

SAMUEL, C. A.; ALLEN, W. R.; STEVEN, D. H. (1977). Studies on the equine placenta III. Ultrastructure of the uterine glands and the overlying trophoblast. ***Reproduction***, 51(2), 433-437.

SANDERSON, M. W.; ALLEN, W. R. (1987). Reproductive efficiency of Thoroughbred mares in the United Kingdom. *Proceedings of the 9th Bain Fallon Memorial Lectures*, 31-41.

SANSILVESTRI-MOREL, P.; FIORETTI, F.; RUPIN, A.; SENNI, K.; FABIANI, J. N.; GODEAU, G.; VERBEUREN, T. J. (2007). Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes?. *Clinical Science*, 112(4), 229-239.

SCHENK, S.; QUARANTA, V. (2003). Tales from the crypt [ic] sites of the extracellular matrix. *Trends in cell biology*, 13(7), 366-375.

SCHLAFER, D.H. (2007). Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques?. *Theriogenology*, 68(3), 413-422.

SCHMIDT, S.; FRIEDL, P. (2010). Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell and tissue research*, 339(1), 83.

SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KLUG, E. (1997). Die Endometriumbiopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. *Pferdeheilkunde*, 13(5), 453-64.

SCHWARTZ, M.A.; SCHALLER, M.D.; GINSBERG, M. H. (1995). Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11(1), 549-599.

SÉGUIER, S., GODEAU, G., BROUSSE, N. (2000). Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis. *Journal of Periodontology*, 71(7), 1079-1085.

SEPHEL, G.C.; WOODWARD, S.C. (2001). Repair, regeneration, and fibrosis. *Rubin's Pathology*, 84-117.

SERTICH, P.L. (2007). Intrauterine diagnostic procedures. In *Current therapy in equine reproduction*, WB Saunders. 36-43.

SHIDELER, R.K., MCCHESENEY, A.E., VOSS, J.L., & SQUIRES, E.L. (1982). Relationship of endometrial biopsy and other management factors on fertility of broodmares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2(1), 5-10.

SIWIK, D.A.; COLUCCI, W. S. (2004). Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Failure Reviews*, 9(1), 43-51.

SKINNER, J.L.; RILEY, S.C.; GEBBIE, A.E.; GLASIER, A.F.; CRITCHLEY, H.O. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. *Human Reproduction*, 14(3), 793-799.

SMITS, K.; GOOSSENS, K.; VAN SOOM, A.; GOVAERE, J.; HOOGEWIJS, M.; VANHAESEBROUCK, E.; EELMAN, L. (2009). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in equine in vivo and fresh and frozen-thawed in vitro blastocysts. **BMC Research Notes**, 2(1), 246.

SNIDER, T.A.; SEPOY, C.; HOLYOAK, G.R. (2011). Equine endometrial biopsy reviewed: observation, interpretation, and application of histopathologic data. **Theriogenology**, 75(9), 1567-1581.

STAHLBERG, A.; HAKANSSON, J.; XIAN, X.; SEMB, H.; KUBISTA, M. (2004). Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. **Clinical Chemistry**, 50(3), 509-516.

STENBÄCK, F. (1989). Collagen type III formation and distribution in the uterus: effects of hormones and neoplasm development. **Oncology**, 46(5), 326-334.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 17(1), 463-516.

STERNLICHT, M.D.; BISSELL, M.J.; WERB, Z. (2000). The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. **Oncogene**, 19(8), 1102.

STETLER-STEVENSON, W. G.; AZNAVOORIAN, S.; LIOTTA, L. A. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. **Annual Review of Cell Biology**, 9(1), 541-573.

STEVEN, D. H. (1982). Placentation in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, 31, 41.

SULLIVAN, J.J., TURNER, P.C., SELF, L.C., GUTTERIDGE, H.B. and BARTLETT, D.E. (1975) Survey of reproductive efficiency in the Quarterhorse and Thoroughbred. **J. Reprod. Fert., Suppl.** 23, 315-318.

SUN, M.; LU, M.X.; TANG, X.T.; DU, Y.Z. (2015). Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae). **PloS One**, 10(1), e0115979.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S. I. (1964). Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. **Archives of pathology**, 78, 69-72.

SZÓSTEK, A.Z.; LUKASIK, K.; GALVÃO, A. M.; FERREIRA-DIAS, G. M.; SKARZYNSKI, D.J. (2013). Impairment of the interleukin system in equine endometrium during the course of endometriosis. **Biology of Reproduction**, 89(4), 79-1.

THOMAS, K.C.; ZHENG, X.F.; SUAREZ, F.G.; RAFTERY, J.M.; QUINLAN, K.G.; YANG, N. et al. (2014). Evidence based selection of commonly used RT-

qPCR reference genes for the analysis of mouse skeletal muscle. ***PLoS One***, 9(2), e88653.

TROEDSSON, M.H.T. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. ***Theriogenology***, 52(3), 461-471.

VAKONAKIS, I.; CAMPBELL, I.D. (2007). Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. ***Current Opinion in Cell Biology***, 19(5), 578-583.

VAN CAMP, S.D. (1988). Endometrial biopsy of the mare: a review and update. ***Veterinary Clinics of North America: Equine Practice***, 4(2), 229-245.

VISSE, R.; NAGASE, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. ***Circulation Research***, 92(8), 827-839.

VOGEL, H. J.; HUMKE, E. (1973). Der Formenzyklus der Uterindrüsen der Stute im Vergleich zu dem anderer Säugetiere und des Menschen. ***Anatomia, Histologia, Embryologia***, 2(3), 271-279.

WALTER, I.; HANDLER, J.; REIFINGER, M.; AURICH, C. (2001). Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. ***Reproduction-Cambridge***, 121(4), 581-586.

WALTER, I.; HELMREICH, M.; HANDLER, J.; AURICH, C. (2003). Mineralised deposits in the uterine glands of mares with chronic endometrial degeneration. ***Veterinary Record***, 153(23), 708-710.

WALTER, I.; KLEIN, M.; HANDLER, J.; AURICH, J. E.; REIFINGER, M.; AURICH, C. (2001). Lectin binding patterns of uterine glands in mares with chronic endometrial degeneration. ***American journal of veterinary research***, 62(6), 840-845.

WOESSNER, J.F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. ***The FASEB Journal***, 5(8), 2145-2154.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. ***BioTechniques***. v. 39, 75–85.

WYNN, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. ***The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland***, 214(2), 199-210.

WYNN, T.A.; RAMALINGAM, T.R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. ***Nature Medicine***, 18(7), 1028.

ZHU, C.L.; LI, W.T.; LI, Y.; GAO, R.T. (2012). Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are correlated with liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. ***Journal of Digestive Diseases***, 13(11), 558-563.

APÊNDICE A – Metodologia para quantificação de colágeno endometrial de éguas através do software imageJ 1.52a.

OBJETIVO:

Quantificar o colágeno corado de vermelho em imagens de tecidos endometrial de éguas. As secções histológicas foram coradas com Sirius Red 80 (Sigma Aldrich) saturado em ácido pícrico.

PROCEDIMENTO:

- 1º passo: Abrir o software ImageJ 1.52a.
- 2º passo: Selecionar imagem a ser analisada.
- 3º passo: Alterar a escala da imagem de pixel para micrômetros.

Observar o tamanho da imagem indicado na margem superior da figura (2048 x 1536 pixel). Devemos converter a imagem de pixel para micrômetros através da medição da barra de escala.

- Ampliar a imagem a com o ícone *Magnifying glass* (décimo botão da esquerda para direita) para evidenciar a barra de escala (IMAGEM 1).
- Medir o comprimento da barra de escala utilizando o 5º ícone da esquerda para direita (IMAGEM 2).
- Observar que o comprimento da linha selecionada ao longo da barra é informada na borda inferior da barra de ferramenta do software ImageJ (length = 314.00) (IMAGEM 2).
- Após, inicialmente devemos selecionar o ícone *Analyze* e posteriormente o *Set Escala* (IMAGEM 3).
- A ferramenta *Set scale* do software irá se abrir (IMAGEM 4).
- Preencher as lacunas *Distance in pixel* com o valor do comprimento da barra de escala em pixel (314); *Known distance* com o comprimento da barra de escala (100 µm); *Pixel aspect ratio* manter o preenchimento padrão (1.0); *Unit length* completar com "um", que corresponde à unidade de comprimento micrometro; marcar o ícone *Global* para que todas as análises sejam realizadas com os mesmo parâmetros; clicar no ícone *OK* (IMAGEM 4).
- O tamanho da imagem será convertido automaticamente pelo ImageJ e indicado na borda superior da imagem (652.23x489.17 µm (2048x1536);RGB; 12MB)) (IMAGEM 5).

4º passo: Apagar a barra de escala

Para evitar que a barra de escala seja incluída na área calculada devemos apagá-la.

- Ampliar a imagem com o ícone *Magnifying glass* (décimo botão da esquerda para direita) para evidenciar a barra de escala (IMAGEM 6).

- Selecionar a ferramenta retangular (primeiro ícone da esquerda para direita) na barra de tarefas do ImageJ e pressionar Delete ou Backspace.
- A escala será deletada e irá ficar um retângulo de coloração preta (IMAGEM 7). Esse mesmo retângulo, deverá ser corado de branco com auxílio do ícone *Flood fill tool* (16º ícone da esquerda para direita) (IMAGEM 8).

5º passo: Converter a imagem para o formato *grayscale*

- Selecionar o ícone *Image > Tipe > RGB stack* (IMAGEM 9) para dividir a imagem em canais vermelho, verde e azul (IMAGEM 10) (necessário, pois a ferramenta *Thrshold* só trabalha com a imagem na função *grayscale*).
- Para poder visualizar os três canais ao mesmo tempo selecionar a ferramenta *Image, Stacks e Make Montage* (IMAGEM 11). Em seguida, irá abrir uma janela com os canais (IMAGEM 12).
- Como o canal verde possui a melhor definição de contraste da imagem, mova o controle deslizante (borda inferior da imagem; IMAGEM 13) para visualizar o canal verde.

6º passo: Abrir ferramenta *Thereshold*

- Com o canal verde selecionado, utilizar o ícone *Image, Adjust e Threshold* (IMAGEM 14).
- A ferramenta "Threshold" é aberta e o canal verde é automaticamente delimitado (IMAGEM 15).

7º passo: Ajuste manual do limiar da ferramenta *Thereshold*

- *Thereshold* deve ser ajustado de forma manual. O limite máximo definido automaticamente foi de 108 (IMAGEM 15). No entanto, deve ser definido manualmente para a metade, 108/2 ou 54 (IMAGEM 16). Esse ajuste, manual, deve ser realizado como padrão em todas as imagens avaliadas, pois diminui a chances de superestimar a quantificação de colágeno.

8º passo: Definir o que será avaliado pelo ImageJ

- Selecionar o ícone *Analyze e Set Measurements* (IMAGEM 17). Uma caixa irá abrir e devemos selecionar: "*Area*", "*Area Fraction*", "*Limit to Threshold*" e "*Display Label*" (IMAGEM 18). Para finalizar devemos selecionar *OK*.

9º passo: Mesurar a área de colágeno delimitada pelo *Thereshold*

- Pressionar na ferramenta *Analyse* e posteriormente *Measure* (IMAGEM 19).
- A área e a área percentual serão exibidas na janela "Resultados" (IMAGEM 20).

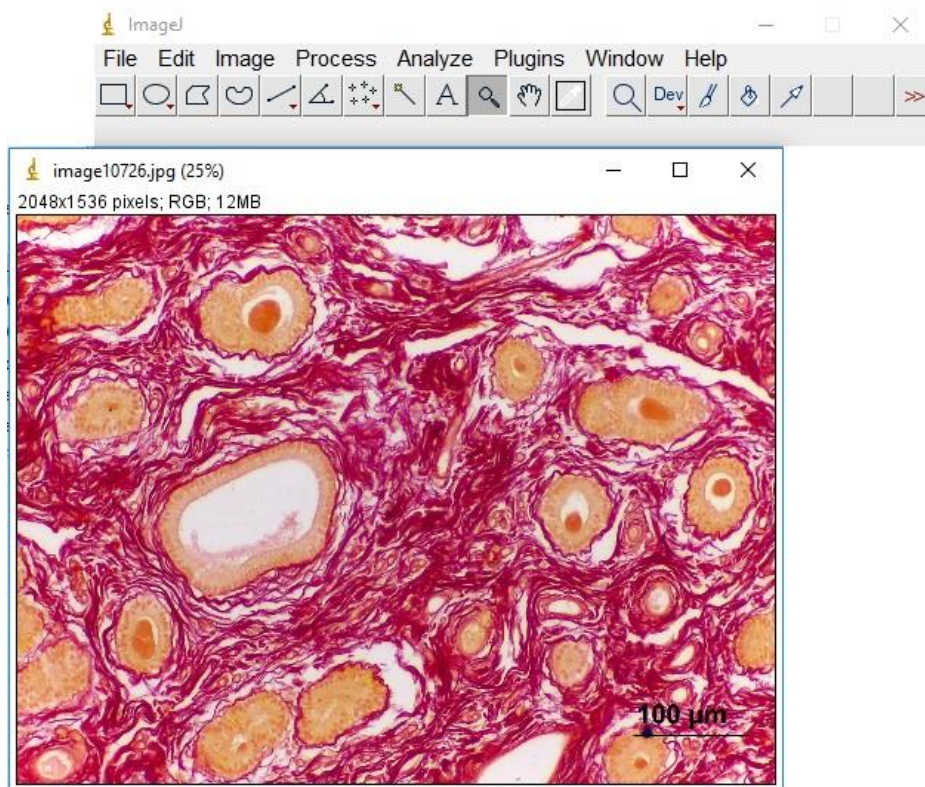
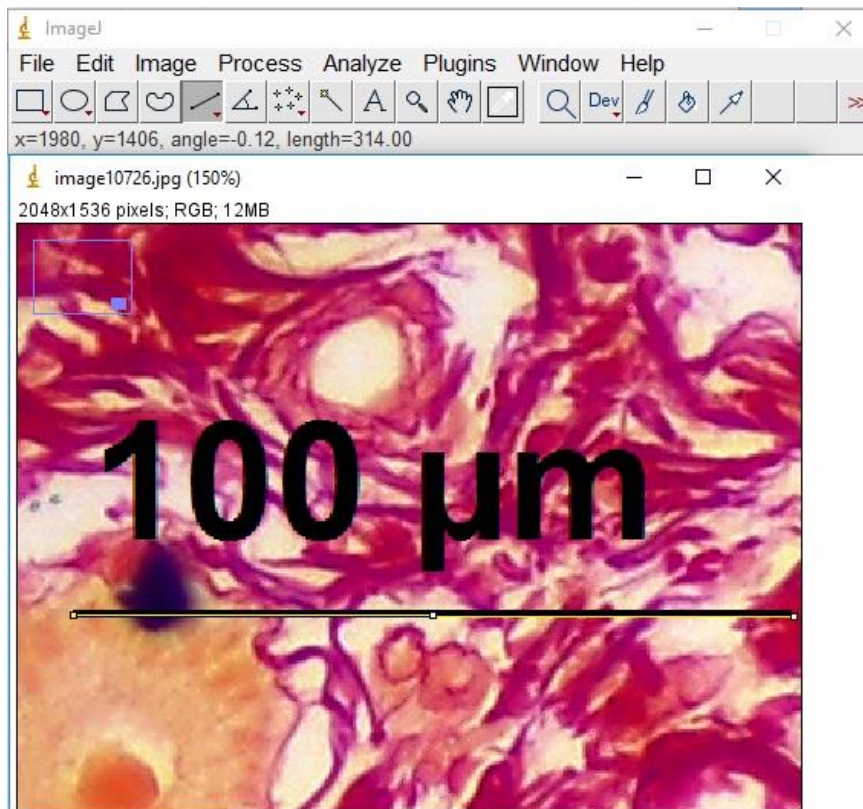
IMAGE 1**IMAGE 2**

IMAGE 3

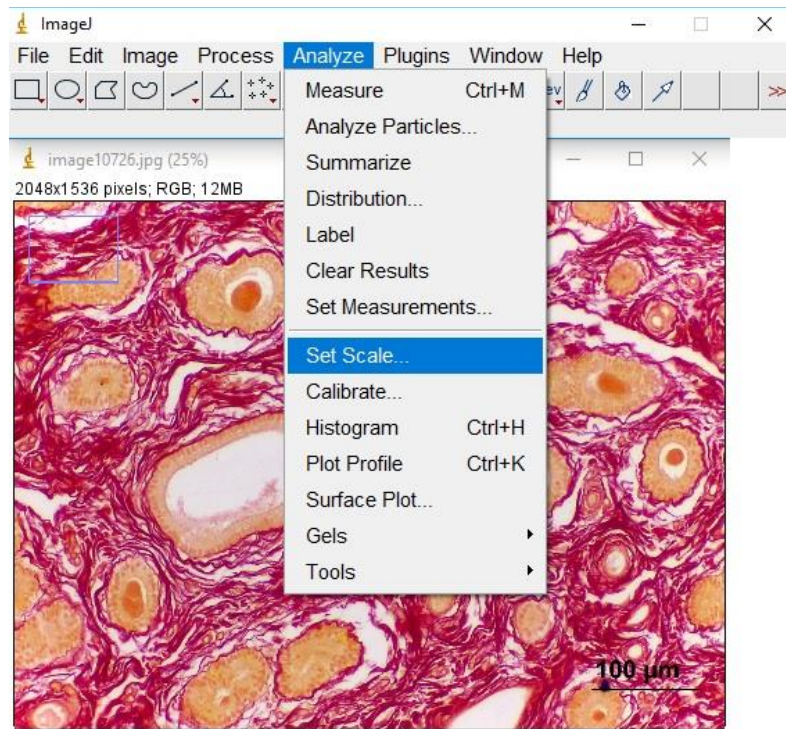


IMAGE 4

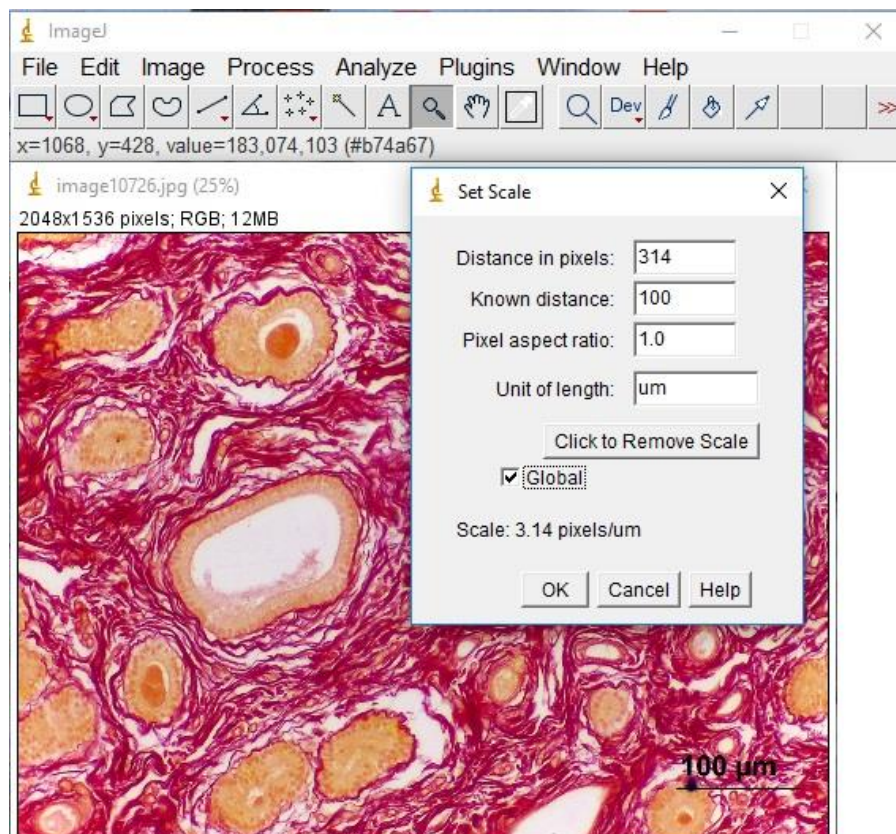


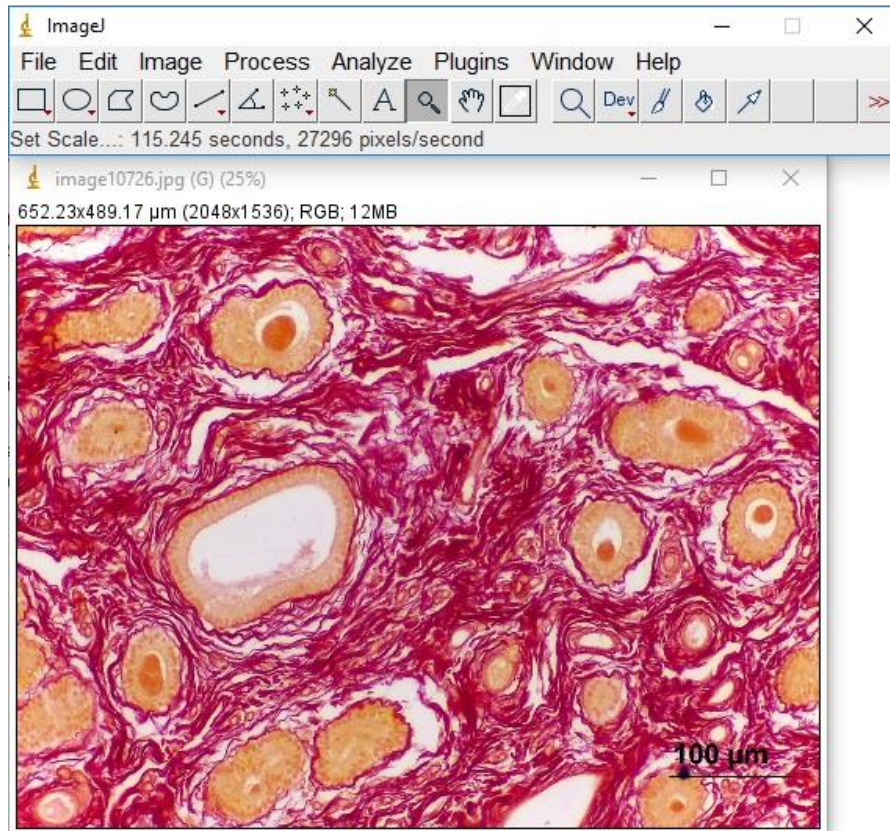
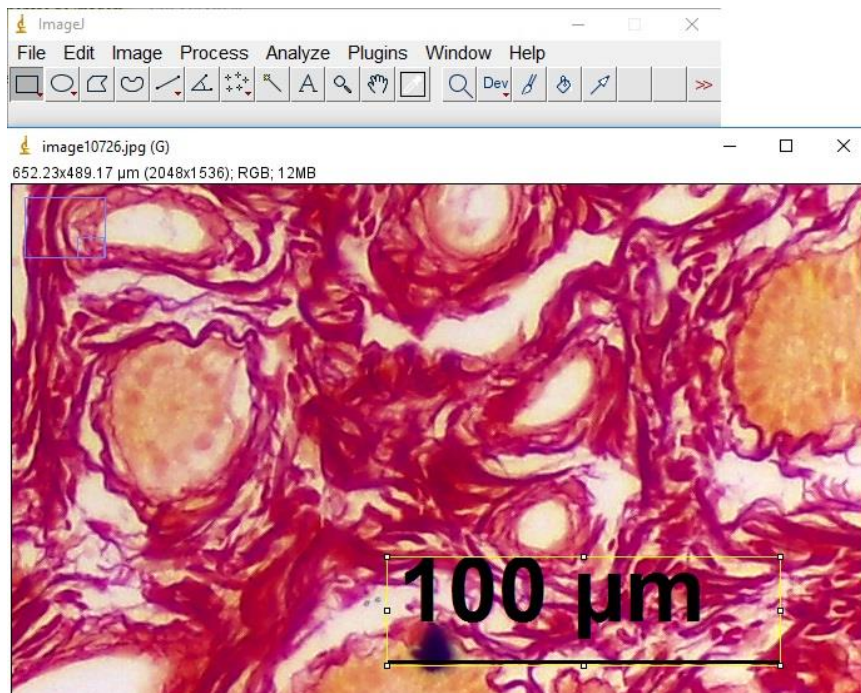
IMAGEM 5**IMAGEM 6**

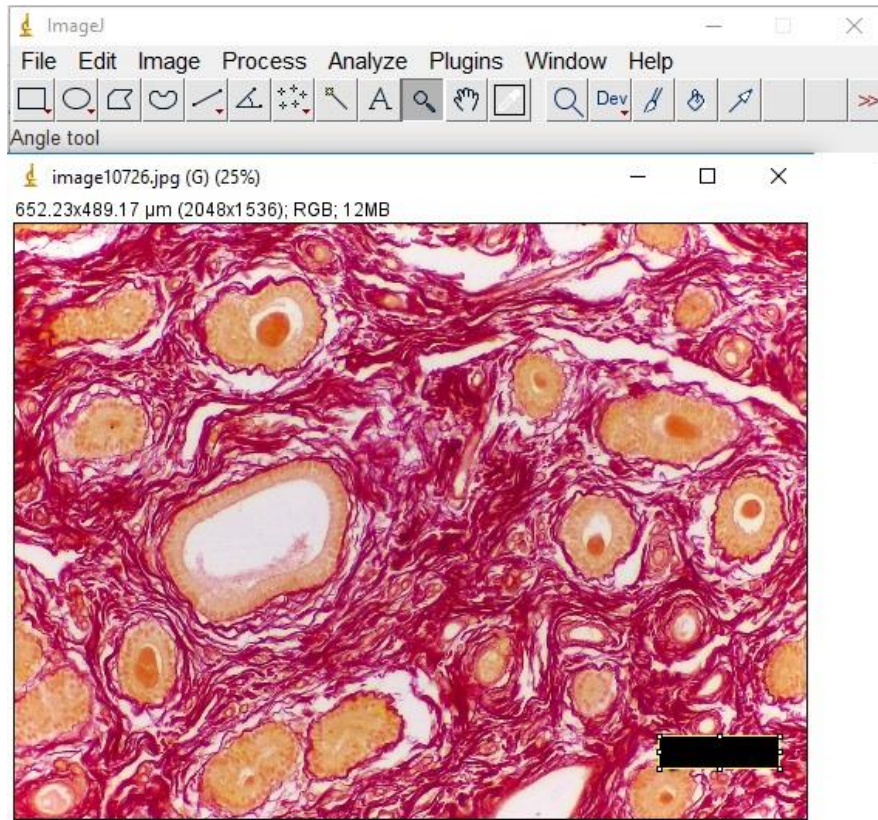
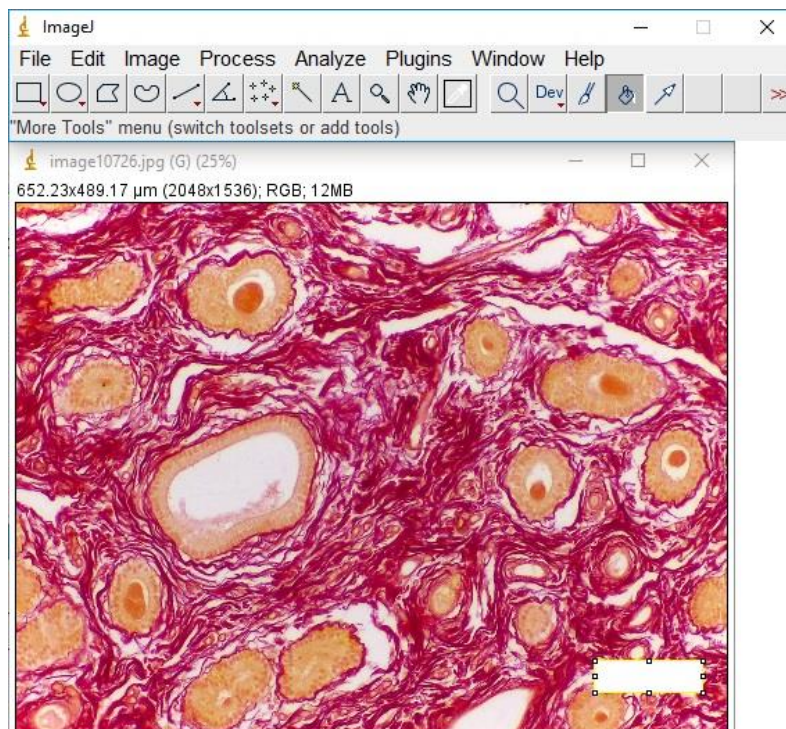
IMAGEM 7**IMAGEM 8**

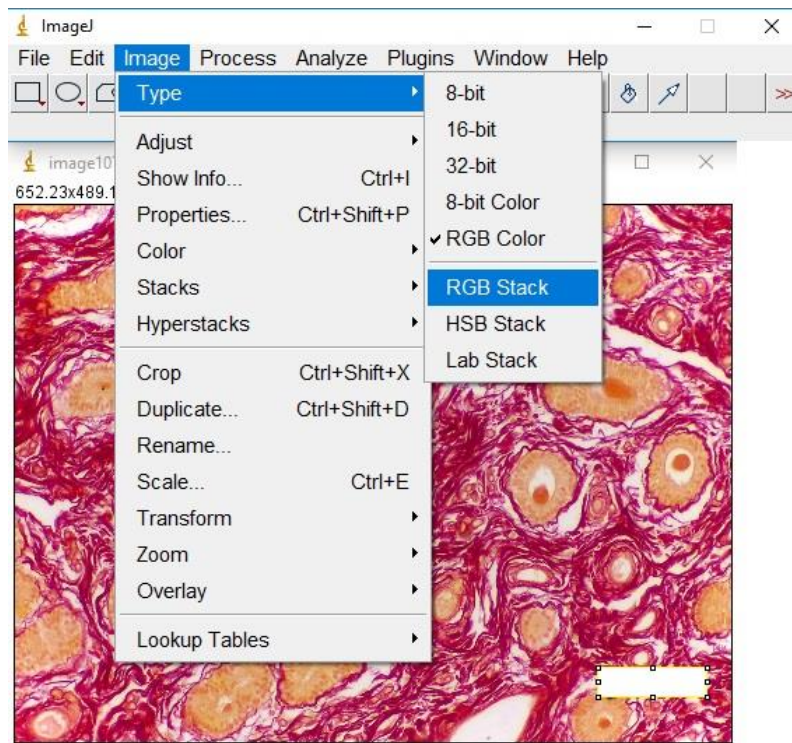
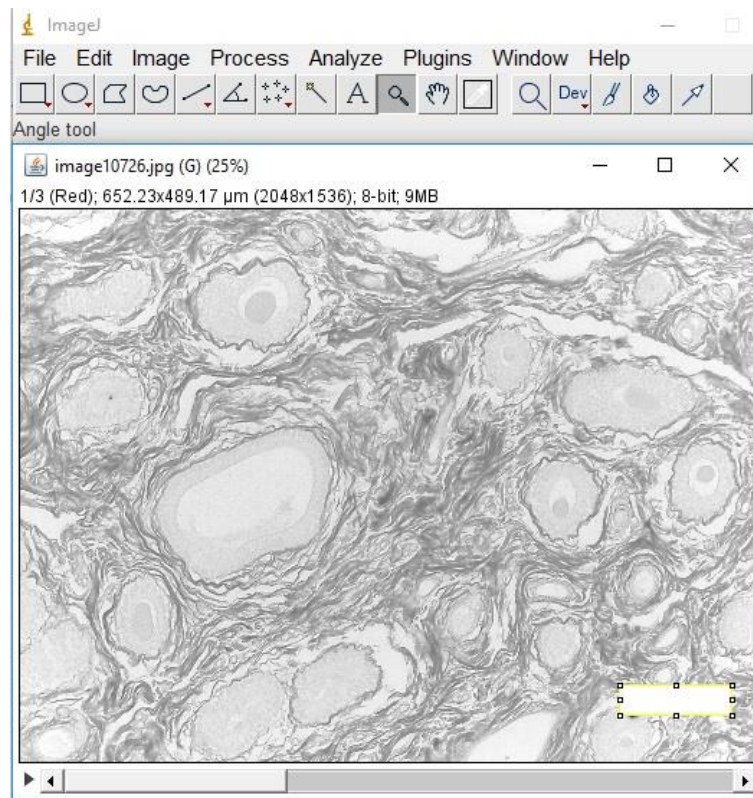
IMAGE 9**IMAGE 10**

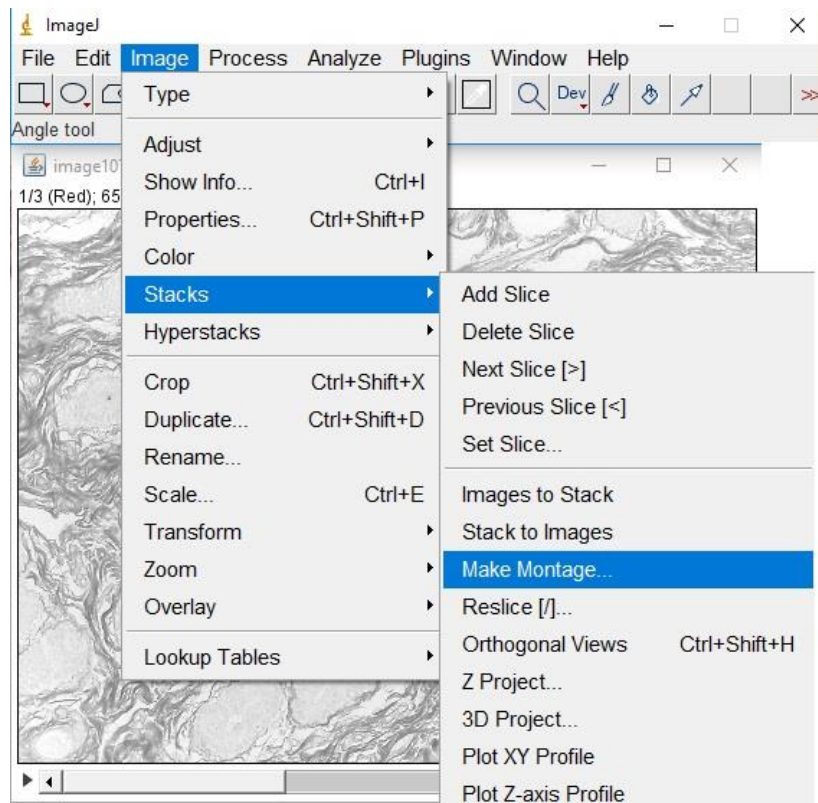
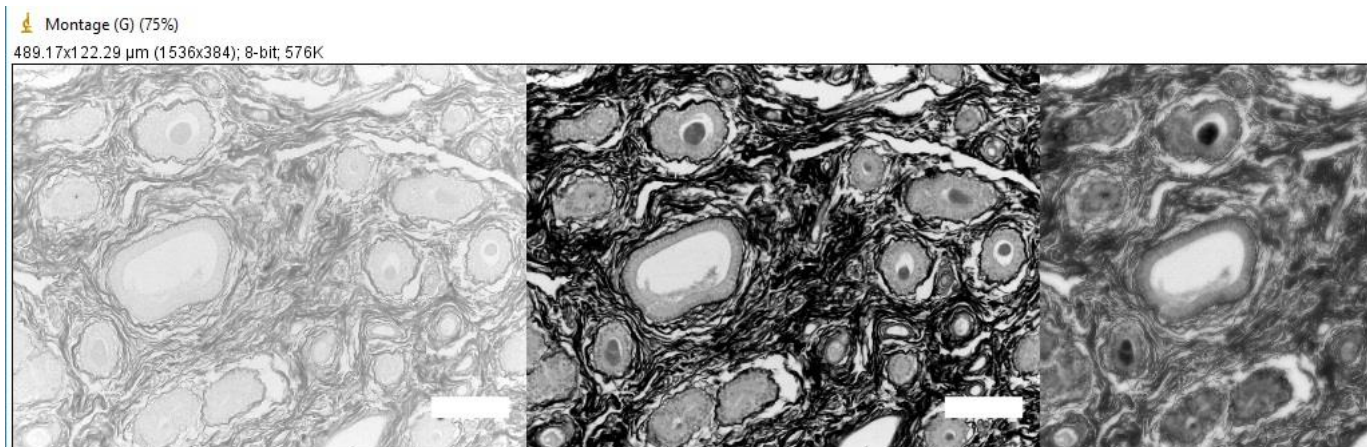
IMAGEM 11**IMAGEM 12**

IMAGEM 13

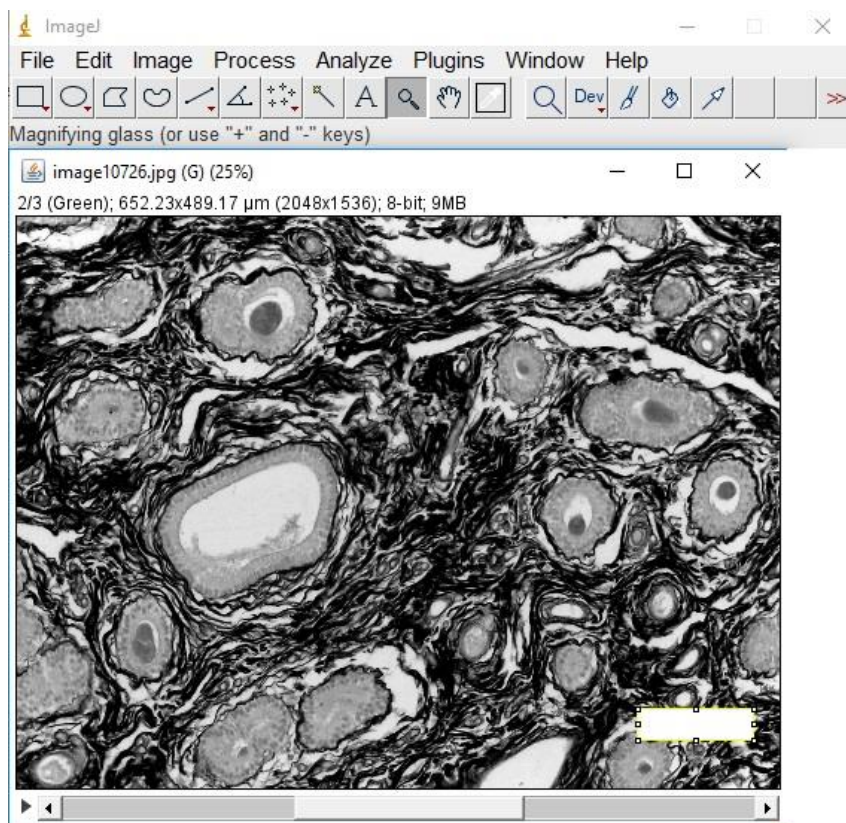


IMAGEM 14

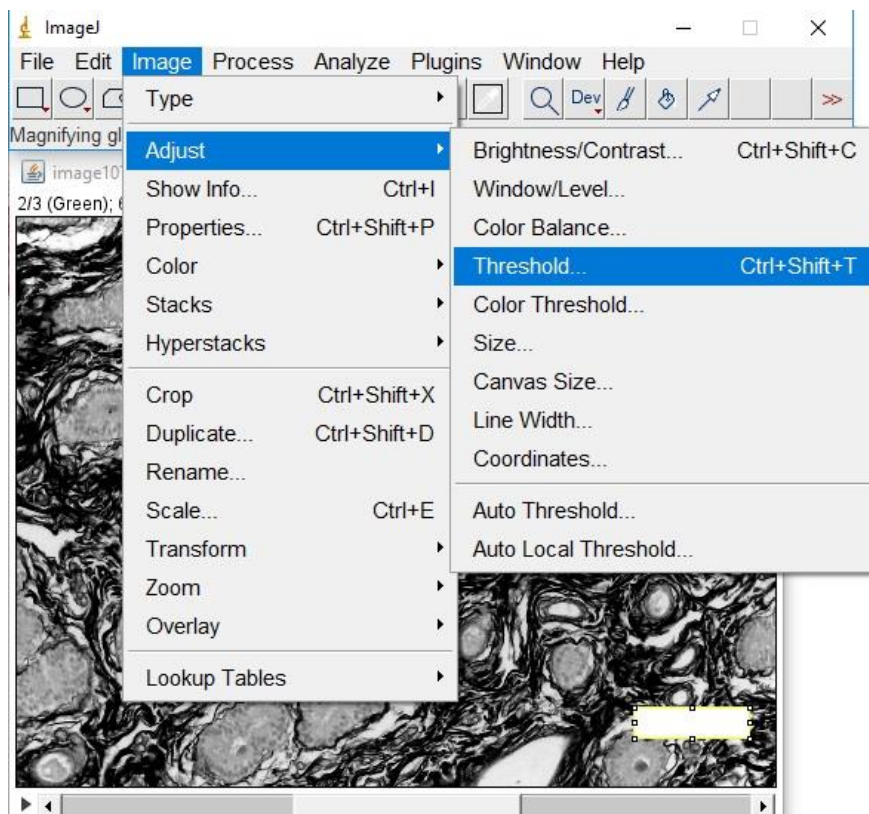


IMAGEM 15

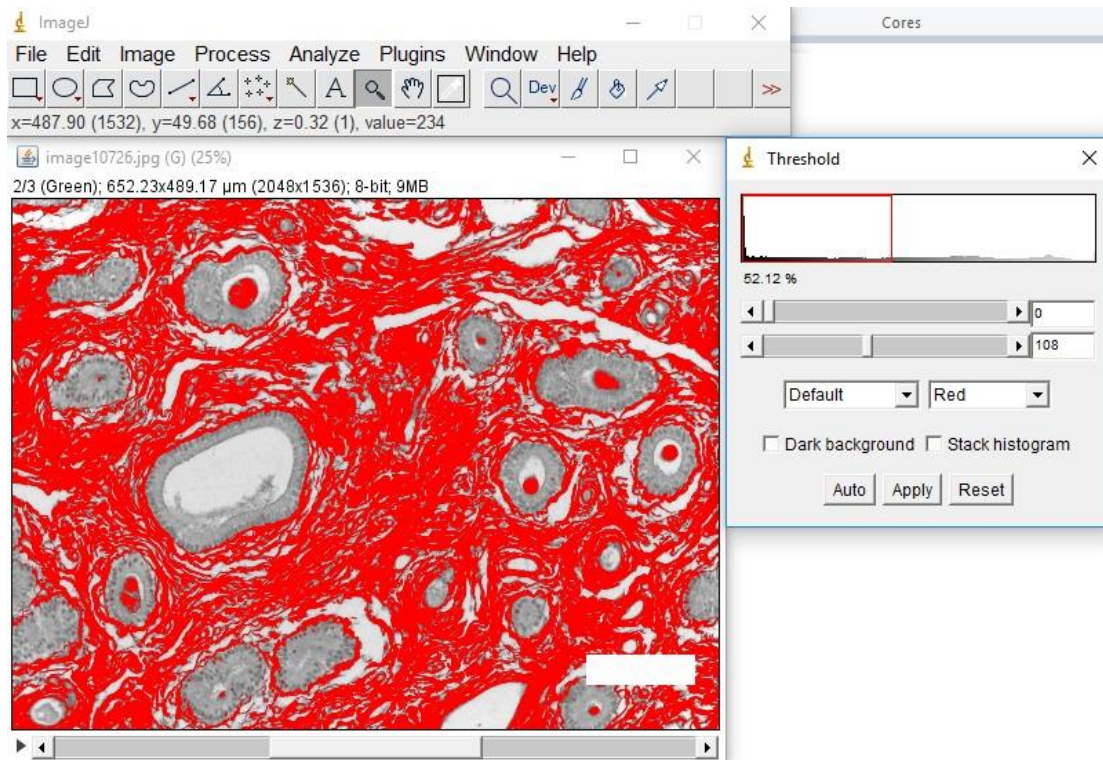


IMAGEM 16

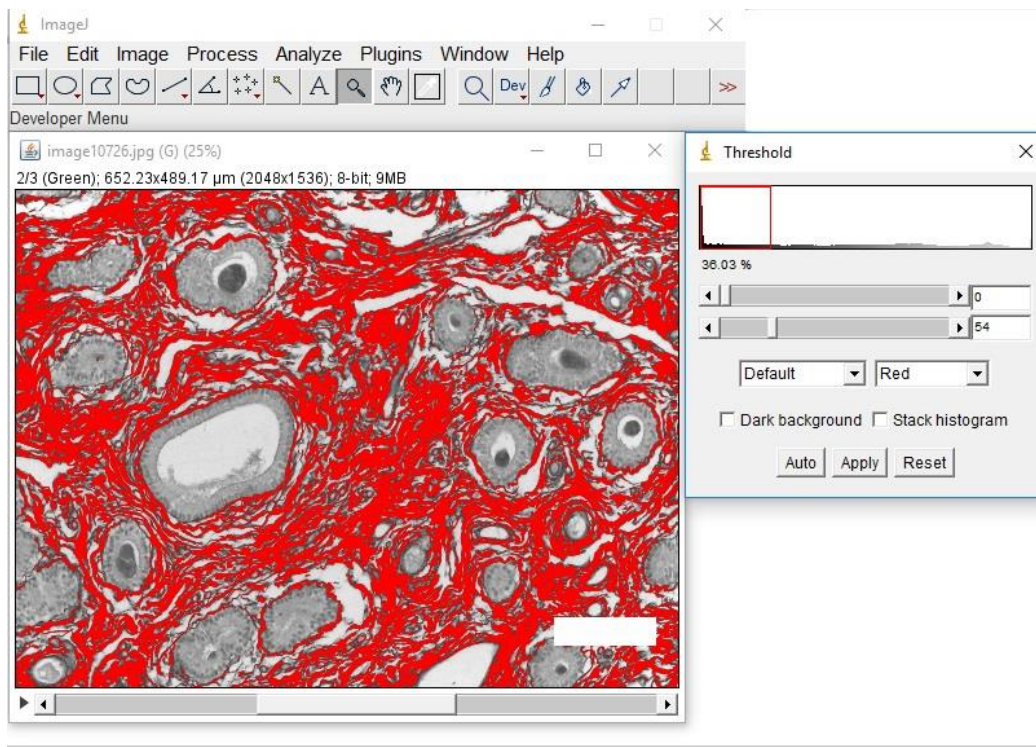


IMAGEM 17

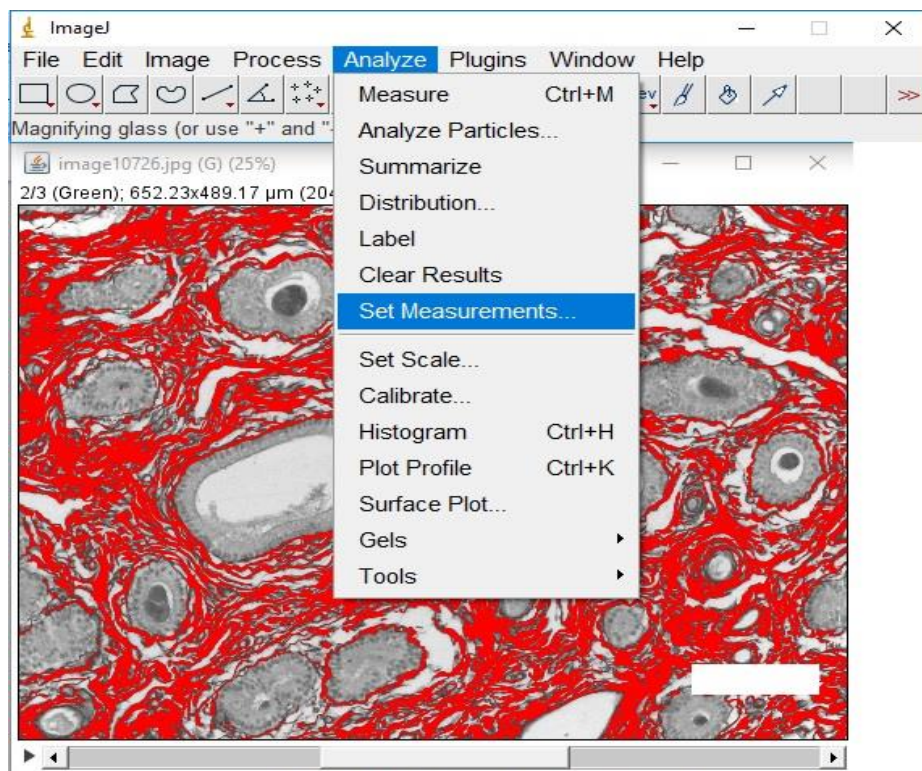


IMAGEM 18

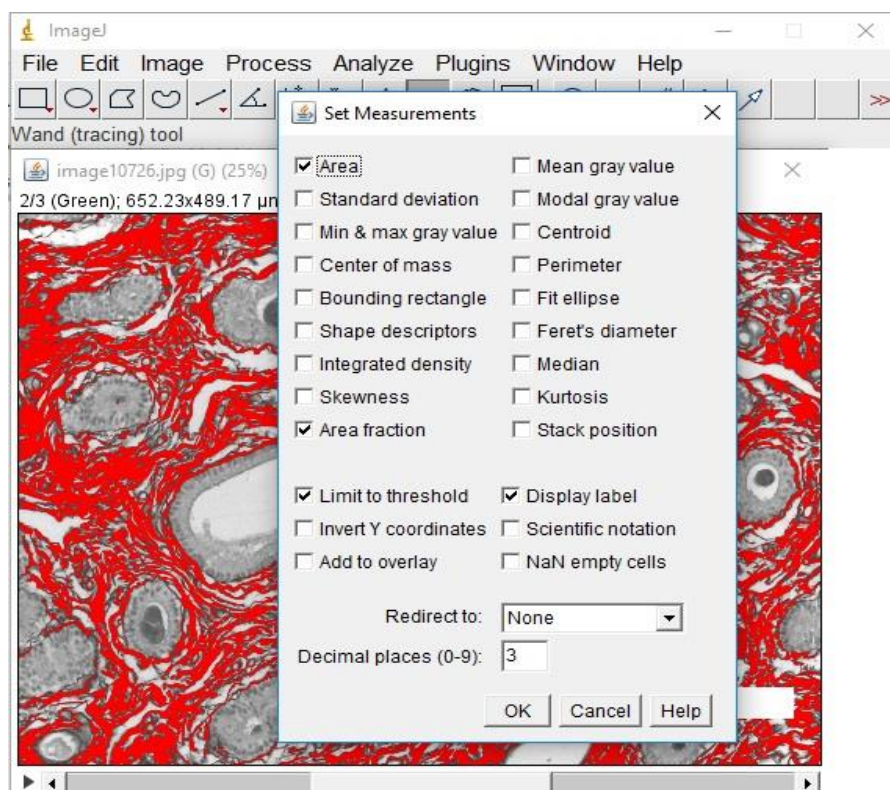


IMAGEM 19

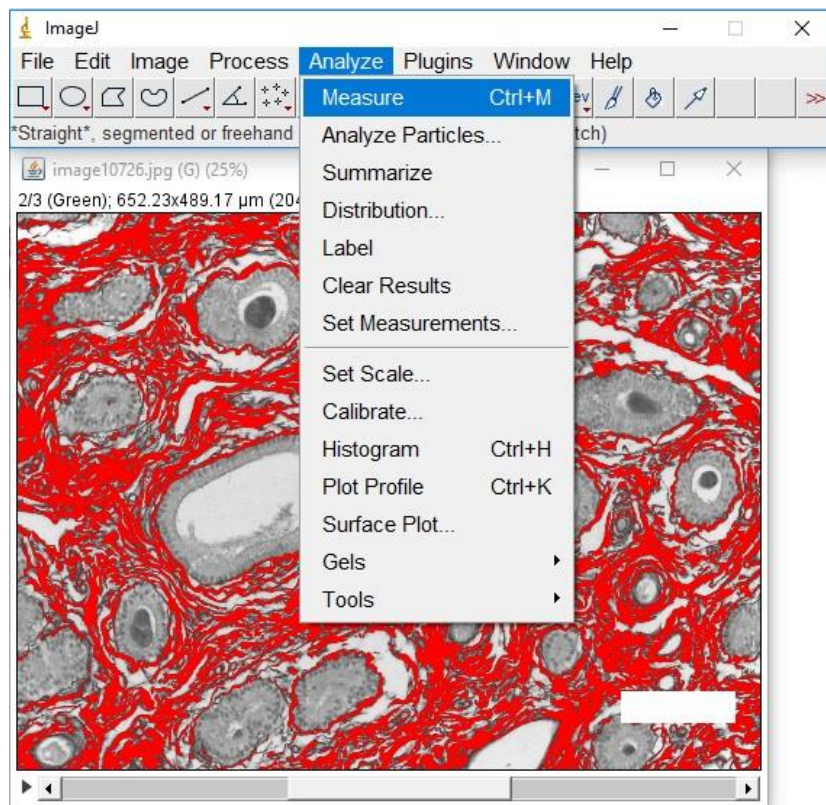
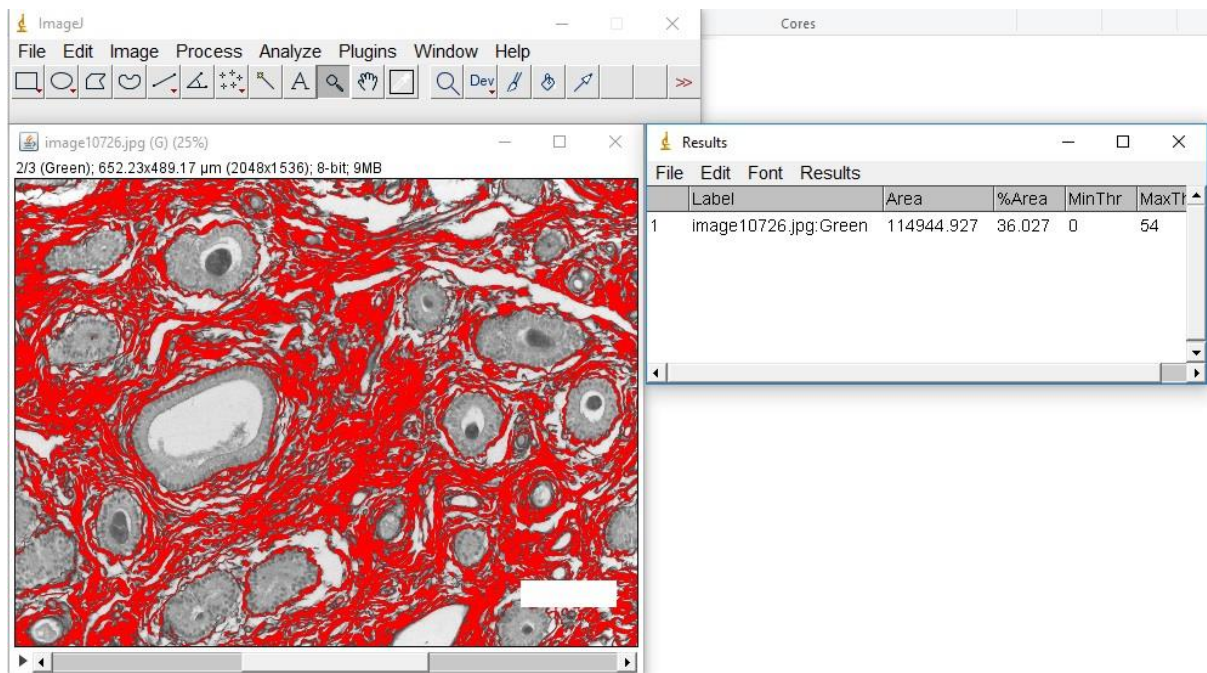


IMAGEM 20



APÊNDICE B – Artigo publicado na revista: Journal of Equine Veterinary Science.

Journal of Equine Veterinary Science 66 (2018) 143



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Equine Veterinary Science

journal homepage: www.j-evs.com



Gene Expression of MMP-1, MMP-2 and TNF- α in the Endometrium of Mares With Different Degrees of Fibrosis

L.A.M. Centeno^{*a,b}, H.B.A. Bastos^a, V.L.C. Bueno^a, J.M. Trentin^{a,b}, M.F. Fiorenza^b, S. Fiala-Rechsteiner^{a,c}, N.A. Kretzmann^a, R.C. Mattos^a, M.I.B. Rubin^b

^aREPROLAB - Faculty of Veterinary, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil

^bEMBRYOLAB - Veterinary Medicine Course, UFSM, Santa Maria-RS, Brazil

^cHISTOREP - Institute of Biology, UFPEL, Pelotas-RS, Brazil



1. Introduction

The endometrial health is a determinant factor for mare fertility. However, equine endometrosis is characterized by glandular alterations and periglandular fibrosis in the endometrial stroma leading to uterine physiology malfunction [1]. Tissue fibrogenesis occurs when there is a disaccord between degradation and synthesis of components of the extracellular matrix, mediated by specific proteinases [2]. In mammals the selective expression, activation or inhibition of specific groups of Matrix Metalloproteinases (MMPs) modulates the process of uterine remodeling during various phases of the estrous cycle, peripartum and postpartum periods [3].

The pathogenesis of uterine fibrosis has not yet been fully elucidated, but is related to the age of the mares [4]. Higher degrees of endometrosis cause changes in the pattern of endometrial cellular interaction that decreases the ability to carry the pregnancy to term [1]. Cell signaling is mediated by cytokines, such as TNF- α , which have the ability to regulate fibroblasts and to produce MMPs [5].

The study of MMPs and TNF- α may elucidate important points of the development of endometrial fibrosis; contributing to the classification methods of the fibrotic process and find a new marker of endometrial fibrosis. This study aimed to quantify the gene expression of matrix metalloproteinases 1 and 2 (MMP-1; MMP-2) and Tumor Necrosis Factor (TNF- α) in the endometrium of mares with different degrees of fibrosis.

2. Materials and Methods

Cyclic mares ($n = 26$) were selected for the study and were examined for reproductive soundness. Endometrial biopsy was performed in mares in diestrous (D5 - D10). Immediately after biopsy, the endometrial sample was split into two aliquots. One fragment was fixed in 7% formalin and destined for histopathological evaluation. The other fragment was stabilized and stored in a centrifuge microtube free of DNase, RNase and nuclease (Kasvi, Canada) in RNeasy lysis buffer (Invitrogen™) for storage at -80°C for real-time PCR (qPCR) analysis.

Histopathological samples were processed as routine laboratory procedures, stained with hematoxylin-eosin technique, analyzed under light microscopy to evaluate frequency and distribution of periglandular fibrosis. Samples of all mares were classified according to the degree of uterine fibrosis described by Kenney [6]: Grade I ($n = 10$), Grade II ($n = 10$) and Grade III ($n = 6$).

The extraction of mRNA from the samples was performed with TRIzol[®] Reagent (Invitrogen™) as per manufacturer's instructions. After transcription of mRNA into cDNA (SuperScript III[®], Invitrogen™) the samples were subjected to 40 cycles at 95°C for 15 seconds in qPCR system StepOnePlus™ (Applied Biosystems) with annealing temperature at 60°C for 30 seconds and elongation at 60°C for 30 seconds. A housekeeping gene Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used for the endogenous control of the sample. Quantification of the target genes were obtained using primers specific for MMP-1, MMP-2 and TNF- α . The comparative threshold cycle (CT) ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) method was used for calculating relative mRNA expression.

The dependent (MMP-1, MM-2 and TNF- α) and independent (degree of fibrosis) variables were analyzed with Statistix 8 software. The difference between the medians was determined by the Wilcoxon Rank test and considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

MMP-1 presented a downtrend in mRNA expression (Fig. 1A) in endometrial samples classified as Grade I in relation to the Grade III ($P = 0.095$) and higher expression in Grade II in relation to Grade III ($P = 0.023$). The MMP-2 presented higher expression in Grade III in relation to Grade I ($P = 0.026$) and II ($P = 0.014$) (Fig. 1B). The gene expression of endometrial TNF- α was similar between groups of mares.

4. Discussion

The expression of MMP by myofibroblasts was reported in several fibrotic processes in horses [7]. The pattern of synthesis and regulation of extracellular matrix components changes according to the process' severity. MMP-1 is a collagenase related to

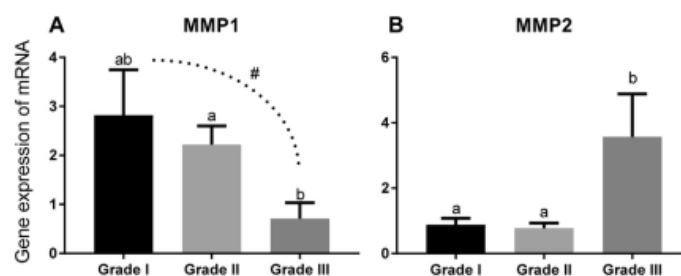


Fig. 1. Gene expression (\pm S.E.D.) of MMP1 and MMP2 mRNA in the endometrium of mares with different grades of fibrosis. ^{a,b}Different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

the physiological tissue remodeling of the endometrium [3]. This is supported by the findings of the present study, since there was a greater gene expression of MMP-1 in the endometrium of mares classified as Grade I and II in relation to Grade III. The reduction of expression of this collagenase by Grade III endometrium suggests that there is impairment in the remodeling of the extracellular matrix at different phases of estrous cycle, leading to an increase in the degree of fibrosis. In this study, MMP-2 presented higher gene expression in Grade III compared to the other groups, confirming the findings of Han [2], in which rats with hepatic fibrosis presented higher expression of MMP-2. Increased MMP-2 has also been observed in the endometrium of mares with endometriosis [7].

The complex interaction between cells, cytokines and proteases will result in a greater or lesser tissue restructuring. Although the result of TNF- α analysis revealed that there was no difference in expression between the grades of mares, these results appear to be important in the cellular signaling process to manage the process of endometrial differentiation. TNF- α has been previously reported as an important marker for acute phase response in several tissues and has the ability to modulate the secretion of MMP-1 [8].

In conclusion, MMP-1 had greater expression in groups of mares whose endometrium were classified as I and II in relation to Grade III and its expression may be involved in the maintenance of endometrial health. In contrast, MMP-2 was greater expressed in the Grade III mares, which may be related to endometrial fibrogenesis and could be a marker of endometrial fibrosis. Both MMPs had inverse expression values, suggesting opposite actions in the cascade of endometrial fibrosis formation. The gene expression of TNF- α was similar among the studied grades, suggesting an important action in signaling the endometrial physiology of mares.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

We thank the Department of Veterinary Pathology of UFRGS for the immeasurable support in the preparation of the samples of this research.

References

- [1] Hoffmann C, Ellenberger C, Mattos RC, Aupperle H, Dhein S, Stief B, et al. The equine endometriosis: New insights into the pathogenesis. *Anim Reprod Sci* 2009;111:261–78.
- [2] Han YP. Matrix metalloproteinases the pros and cons, in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:88–91.
- [3] Curry JR, Thomas E, Kevin GO. The matrix metalloproteinase system: Changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrine reviews* 2003;24:428–65.
- [4] Ricketts SW, Alonso S. Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. *Equine Vet J* 1991;23:185–8.
- [5] Kuroki M, Noguchi Y, Shimono M, Tomono K, Tashiro T, Obata Y, et al. Repression of bleomycin-induced pneumopathy by TNF. *J Immunol* 2003;170:567–74.
- [6] Kenney RM. "Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death". *J Am Vet Med Assoc* 1978;172:241–62.
- [7] Walter I, Handler J, Reiffinger M, Aurich C. Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction* 2001;121:581–6.
- [8] Rawdanowicz TJ, Hampton AL, Nagase H, Woolley DE, Salamonsen LA. Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: Identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:530–6.

APÊNDICE C – Resumo apresentado no XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal.



Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 23, 2019, Gramado, RS. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2019.

Expressão de marcadores de fibrose endometrial em éguas

Expression of endometrial fibrosis markers in mares

**Luiz Augusto Machado Centeno^{1,2,*}, Henrique Boll de Araujo Bastos^{1,2}, Verônica LaCruz Bueno^{1,2},
Janislene Mach Trentin¹, Mariani Farias Fiorenza¹, Sandra Mara Fiala Rechsteiner^{1,3},
Nélson Alexandre Kretzmann Filho¹, Rodrigo Costa Mattos^{1,2}, Mara Iolanda Batistella Rubin¹**

¹Programa de Pós Graduação em Medicina Animal: Equinos, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; ²REPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; ³HISTOREP - Instituto de Biologia, UFPEL, Pelotas, RS, Brasil.

*E-mail: luizmachadocenteno@gmail.com

A remodelação tecidual no endométrio de éguas é um processo característico durante a patogênese da endometrose, que pode interferir na fertilidade. A reestruturação das fibras de colágeno periglandular, perivascular e no estroma do endométrio compromete a fisiologia uterina por terem a capacidade de alterar a arquitetura e a funcionalidade endometrial. O processo de fibrinogênese e fibrólise em diferentes espécies inicia-se pela mudança no perfil dos componentes da matriz extracelular, modulada por proteinases. A inter-relação entre as Metaloproteinases de Matriz e seus inibidores específicos desempenha um papel importante nesse processo de remodelação uterina. Logo, este estudo teve por objetivo avaliar a relação entre a expressão de mRNA de Metaloproteinases de Matriz 2 (MMP-2) e seu inibidor tecidual (TIMP-2) em biópsias uterinas de éguas com diferentes graus de fibrose. Duas amostras uterinas foram obtidas através de biópsia de éguas cíclicas (n=30) entre o dia 5 e dia 10 pós-ovulação. Um fragmento foi processado e destinado à avaliação histopatológica através da coloração H&E. O outro fragmento foi armazenado em RNAlater® (Invitrogen™) para análise em PCR em tempo real. Na avaliação histopatológica, as amostras foram classificadas e agrupadas conforme frequência e distribuição das alterações relacionadas à fibrose no endométrio em Grau I (n = 10), Grau II (n = 10) e Grau III (n = 10). Para realizar a avaliação quantitativa da expressão gênica das amostras, foi efetuada a extração de mRNA com TRIzol® Reagent (Invitrogen™). Em seguida, a transcrição em cDNA foi obtida através do Kit SuperScript III® (Invitrogen™). O grau de pureza, das amostras submetidas ao qPCR, foi determinada pela avaliação no espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare). Na qual, amostras de cDNA com relação A260/A280 de 1.8 – 2.0 foram consideradas com alto grau de pureza. Posteriormente, as amostras foram submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15 segundos no sistema StepOnePlus™ (Applied Biosystems) com temperatura de anelamento de 60°C por 30 segundos e alongamento a 60°C por 30 segundos. O cálculo comparativo da expressão relativa de mRNA das amostras foi realizada com “cycle threshold” (CT) dos genes alvo através da fórmula ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Os genes constitutivos GAPDH e β -actina foram usados para realizar a normalização dos dados. A diferença entre as medianas foi determinada pelo teste de Wilcoxon Rank e considerada significativa quando $P < 0.05$. Nas amostras uterinas avaliadas foi encontrada maior expressão de MMP-2 nas éguas Grau III comparado a éguas Grau I ($P = 0.009$). Assim como, nas de Grau III em relação a Grau II ($P = 0.007$). A TIMP-2 apresentou menor expressão de mRNA no Grau III confrontado as fêmeas Grau I ($P = 0.008$). Da mesma maneira que o Grau III em relação ao Grau II ($P = 0.019$). Esse mecanismo de *feedback* negativo entre a expressão de MMP-2 e TIMP-2 nas éguas com severo grau de fibrose, indica que o desequilíbrio entre a expressão dessas proteinases determina a complexa reorganização da matriz extracelular. Logo, a expressão de MMP2 e da TIMP2 no endométrio pode representar importantes marcadores no prognóstico de éguas com endometrose.

Palavras-chave: endometrose, MMP-2, TIMP-2, qPCR, equino.

Keywords: endometrosis, MMP-2, TIMP-2, qPCR, equine.