

## Expressão de MMP-2 e MMP-9 no endométrio de éguas saudáveis e portadoras de endometrite crônica

[Expression of MMP-2 and MMP-9 in health endometrium and in chronic endometritis of mares]

C.D. Porto<sup>1</sup>, L.C. Nunes<sup>2,3</sup>, A.P.B. Masseno<sup>4</sup>, J.L. Sequeira<sup>4\*</sup>, D.E. Oliveira<sup>5</sup>, M.A. Alvarenga<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Faculdade Integrado – Campo Mourão, PR

<sup>2</sup>Aluna de pós-graduação - FMVZ-UNESP – Botucatu, SP

<sup>3</sup>Centro de Ciências Agrárias - UFES – Alegre, ES

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP – Botucatu, SP

<sup>5</sup>Faculdade de Medicina - UNESP – Botucatu, SP

### RESUMO

Avaliaram-se, por método imunoistoquímico, a expressão e distribuição das metaloproteínas (MMP) 2 e 9 em amostras de endométrio hígido e de éguas portadoras de endometrite crônica. Foram utilizadas 60 biópsias endometriais. A MMP-2 foi observada na parede vascular, nas células estromais e no epitélio glandular, e a imunorreatividade mais intensa foi obtida nas células do epitélio glandular nas endometrites da categoria III e na parede vascular nos endométrios da categoria I. A marcação imunoistoquímica para MMP-9 mostrou-se difusa pelo endométrio e foi observada no epitélio luminal e glandular, na região da parede vascular, nas células estromais, endoteliais e do infiltrado inflamatório. Houve diminuição da marcação imunoistoquímica na região da parede vascular conforme aumentou o grau das lesões endometriais concomitante à diminuição da intensidade da reação. Não houve relação na expressão imunoistoquímica das metaloproteínas estudadas com o tipo de endometrite.

Palavras-chave: equino, endométrio, inflamação, fibrose, metaloproteínase

### ABSTRACT

*The expression and distribution of matrix metalloproteinases (MMP) 2 and 9 were evaluated in health endometrium and in chronic endometrites of mares by means of immunohistochemistry method. Sixty endometrial biopsies were utilized. Expression of MMP-2 was observed in vascular wall, stromal cells, and glandular epithelium. More intense immune reaction was seen in glandular epithelial cells in category III endometritis and in vascular wall in category I endometrium. MMP-9 immune reaction was diffuse and was seen in luminal and glandular epithelium; vascular wall region; and stromal, endotelial, and inflammatory cells. There was a decreased of the immunohistochemical marking in vascular wall region as increased the degree of endometrial injury, as well as reducing the intensity of reaction in this compartment. There was no relation in immunohistochemistry expression of metalloproteinases with the type of endometritis.*

Keywords: equine, endometrium, inflammation, fibrosis, metalloproteinases

### INTRODUÇÃO

A infertilidade nas éguas ainda é causa de grande perda econômica na criação de equinos por inviabilizar a produção de um potro por égua a cada ano. Dos últimos 50 anos até hoje, a endometrite é considerada uma das principais causas de infertilidade nas éguas, além de ser um dos maiores problemas na clínica dos equinos. A investigação

histopatológica do endométrio tem demonstrado importância diagnóstica e prognóstica, tornando a biópsia o método mais preciso para a avaliação da situação morfofuncional do endométrio (Doig et al., 1981).

Fibrose é um dos principais elementos da reação endometrial e critério fundamental na avaliação do comprometimento do útero equino. Na fibrose

Recebido em 20 de outubro de 2009

Aceito em 28 de dezembro de 2010

\*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: sequeira@fmvz.unesp.br

periglandular do endométrio, as células estromais secretam componentes da matriz extracelular e fibronectina, contribuindo para o acúmulo da matriz nesta região (Hoffmann et al., 2009). As alterações na matriz extracelular resultam do desequilíbrio entre degradação e síntese dos componentes da matriz, e as metaloproteinases (MMPs) são as proteínas mais importantes envolvidas na modificação dessa matriz. As MMPs estão envolvidas em vários processos fisiológicos de remodelamento tecidual, mas em geral estão associadas a condições patológicas (Arthur, 2000).

No endométrio das éguas, Walter et al. (2005) verificaram a expressão de MMP-2 na endometrose. Esses autores relataram que essa enzima está associada a glândulas dilatadas e fibróticas e sugeriram que sua presença está relacionada às alterações da homeostasia da matriz extracelular nas regiões fibróticas.

A patogênese da fibrose endometrial equina ainda permanece obscura. Investigações a respeito da participação das metaloproteinases neste tipo de processo ainda são escassas, principalmente no que tange aos sítios onde essas proteínas podem ser observadas. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença das enzimas MMP-2 e MMP-9 no endométrio das éguas que apresentam diferentes graus de lesão inflamatória e fibrose periglandular, bem como sua apresentação morfológica, de acordo com o predomínio de infiltrado inflamatório ou alterações degenerativas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, sendo aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (protocolo 02/2007). As biópsias uterinas foram obtidas de 60 éguas em diestro provenientes da rotina do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu. Todas as amostras foram fixadas em Bouin e incluídas em parafina. Cortes com três micrômetros de espessura foram obtidos e corados pelos métodos da hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson.

Foram empregadas as classificações histopatológicas descritas por Kenney e Doig (1986) e Ricketts e Alonso (1991) para as endometrites crônicas. A primeira foi utilizada para a associação do grau de lesão endometrial com a expressão das enzimas MMP-2 e MMP-9, e a segunda, para a associação com apresentação morfológica da doença endometrial, classificando-as como endometrites crônicas infiltrativas ou endometroses.

Para realização da técnica imunoistoquímica, os cortes histológicos foram posicionados sobre lâminas silanizadas. Conforme indicação dos fabricantes dos anticorpos primários, cortes de placenta humana foram empregados como controle positivo durante a padronização da técnica. O procedimento para a técnica imunoistoquímica está relacionado na Tab. 1.

Tabela 1. Métodos e reagentes empregados na técnica imunoistoquímica

| Anticorpo primário                           | Diluição/incubação       | Bloqueio da peroxidase endógena             | Recuperação antigênica                       | Sistema de amplificação               |
|--|--------------------------|---|--|---------------------------------------|
| MMP-2 (clone 42-5D11, RDI)                   | 1:200<br>18 horas<br>4°C | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% + metanol  | Ácido cítrico<br>10 mM pH 6,0<br>Micro-ondas | VECTASTAIN<br>Elite ABC Kit<br>Vector |
| MMP-9 (policlonal, Santa Cruz Biotechnology) | 1:100<br>18 horas<br>4°C | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% + metanol | Ácido cítrico<br>10 mM pH 6,0<br>Micro-ondas | VECTASTAIN<br>Elite ABC Kit<br>Vector |

A avaliação descritiva para a imunorreatividade foi realizada considerando-se os tipos celulares positivos – epitélio luminal, epitélio glandular, célula estromal, célula endotelial, células inflamatórias e parede vascular. A frequência e a intensidade da marcação foram avaliadas como discreta, moderada ou acentuada.

## RESULTADOS

Quando foi empregada a classificação de Kenney e Doig (1986), 13 éguas foram incluídas na categoria I (23,3%), 17 na categoria IIA (26,7%), 15 na categoria IIB (25%) e 15 na categoria III (25%). Ao ser aplicada a classificação de

Ricketts e Alonso (1991), 13 biópsias foram consideradas sem alterações histopatológicas dignas de nota e corresponderam à categoria I da classificação anterior, 35 casos foram classificados como endometrite crônica infiltrativa e 12 foram classificados como endometrose.

A marcação imunoistoquímica para MMP-2 (Fig.1) foi observada nas células estromais do estrato compacto, sobretudo nas biópsias de endométrio saudável. Essas células também mostraram reatividade ao redor das glândulas fibróticas e/ou dilatadas, nas quais o epitélio também mostrou intensa reação positiva para esse anticorpo. No entanto, a marcação positiva nas células do epitélio glandular não foi limitada às glândulas com esse tipo de alteração fibrótica. A região da parede vascular, excluindo-se o endotélio, mostrou intensa marcação para MMP-2, principalmente na região mais profunda do estrato esponjoso.

Nos endométrios saudáveis, a região da parede vascular e as células estromais foram as estruturas que mostraram marcação em maior número de biópsias, seguidas pelo epitélio glandular. Entretanto, foram as células estromais que apresentaram maior frequência de células positivas. Nas glândulas endometriais, a reação ocorreu de forma esparsa e discreta. Neste grupo, a menor quantidade de células positivas foi observada no epitélio luminal.

Nas amostras incluídas na categoria IIA, as estruturas que demonstraram marcação em maior número de amostras foram as células estromais, mas com frequência discreta. As células do epitélio luminal e do epitélio glandular apresentaram imunorreatividade expressiva para MMP-2.

Na categoria IIB, entre as estruturas analisadas, a marcação positiva para MMP-2 foi mais frequente no epitélio glandular, parede vascular e células estromais. O grau de expressão variou de discreto a acentuado.

Na categoria III, o epitélio glandular e a parede vascular foram as estruturas que demonstraram imunorreatividade para MMP-2 em maior número de amostras, seguidos pelas células estromais. Quanto à intensidade da marcação, comparando-se as diferentes categorias de endométrio, o epitélio glandular mostrou aumento da intensidade da expressão de MMP-2 conforme aumentou o grau de lesão. A parede vascular mostrou reação moderada na categoria I, negativa na maior parte das amostras da categoria IIA, e imunorreatividade discreta nas categorias IIB e III. Entre as células estromais, as categorias I, IIB e III apresentaram reação de intensidade moderada, e na categoria IIA, a intensidade caracterizou-se por ser discreta.

Quanto à intensidade da imunorreatividade, na Tab. 2 apresenta-se a intensidade da imunomarcação para MMP-2 no endométrio equino, quando classificado de acordo com Kenney e Doig (1986).

As endometrites crônicas infiltrativas mostraram imunorreatividade positiva para metaloproteinase-2 em 94,12% das amostras. Neste grupo, o epitélio glandular foi a estrutura que marcou positivamente na maior parte das amostras, seguido pela parede vascular, células estromais e epitélio luminal. Foi também o epitélio glandular o elemento expressado com maior frequência nas amostras, seguido pelas células estromais.

Tabela 2. Intensidade da marcação imunoistoquímica de metaloproteinase-2 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias em equinos<sup>1</sup>

| Estrutura           | Categoria I                        | Categoria IIA | Categoria IIB                      | Categoria III                      |
|---------------------|------------------------------------|---------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Epitélio luminal    | Discreta (raras células positivas) | Acentuada     | Discreta (raras células positivas) | Discreta (raras células positivas) |
| Epitélio glandular  | Discreta                           | Moderada      | Moderada                           | Acentuada                          |
| Célula endotelial   | Ausente                            | Ausente       | Ausente                            | Ausente                            |
| Parede vascular     | Moderada                           |               | Discreta                           | Discreta                           |
| Célula inflamatória | Ausente                            | Ausente       | Ausente                            | Ausente                            |
| Célula estromal     | Moderada                           | Discreta      | Moderada                           | Moderada                           |

<sup>1</sup>Classificação de acordo com Kenney e Doig (1986).

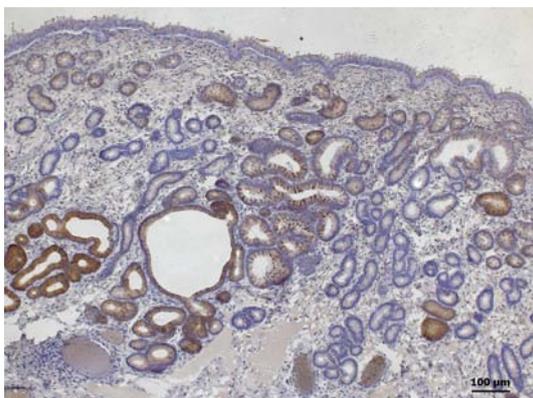


Figura 1. Endométrio equino – categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunoistoquímica para metaloproteinase-2. Imunorreatividade intensa e frequente nas células epiteliais glandulares dilatadas, associadas à fibrose glandular. Presença de marcação heterogênea em algumas glândulas.

Nas endometroses, 91,7% das amostras foram imunorreativas para MMP-2. A frequência de amostras com marcação positiva para este anticorpo foi expressivamente maior nas células estromais, seguidas pela parede vascular, epitélio glandular e epitélio luminal. Foram as células estromais que também demonstraram positividade com maior frequência, mas esta foi variável entre as amostras. A frequência da positividade nas células estromais foi sucedida pela do epitélio glandular, da parede vascular e finalmente pelo epitélio luminal.

Quanto à intensidade da imunorreatividade para MMP-2, na Tab. 3 encontra-se a intensidade da imunomarcção no endométrio equino classificado de acordo com Ricketts e Alonso (1991).

Tabela 3. Intensidade da marcação imunoistoquímica de metaloproteinase-2 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias em equinos<sup>1</sup>

| Estrutura           | Endométrio hígido | Endometrite crônica infiltrativa | Endometrose |
|---------------------|-------------------|----------------------------------|-------------|
| Epitélio luminal    | Ausente)          | Ausente                          | Discreta    |
| Epitélio glandular  | Discreta          | Moderada                         | Discreta    |
| Célula endotelial   | Ausente           | Ausente                          | Ausente     |
| Parede vascular     | Moderada          | Discreta                         | Discreta    |
| Célula inflamatória | Ausente           | Ausente                          | Ausente     |
| Célula estromal     | Moderada          | Discreta                         | Moderada    |

<sup>1</sup>Classificação de acordo com Ricketts e Alonso (1991).

A expressão de MMP-9 (Fig. 2) foi constatada em todas as amostras de endométrio equino. A marcação imunoistoquímica para este anticorpo foi difusa por todo o endométrio.

Nos endométrios saudáveis, foi observada marcação positiva para MMP-9 no epitélio glandular e nas células estromais em todas as amostras estudadas. Células inflamatórias mononucleares e epitélio glandular expressaram MMP-9 em 92,3% dos casos. A região da parede vascular foi positiva em 84,6%, e o epitélio luminal em 76,9% dos casos. Quanto à frequência da imunomarcção em cada amostra, as células que marcaram positivamente com maior frequência foram as do epitélio glandular, seguidas pelas estromais, inflamatórias e endoteliais. As células do epitélio luminal mostraram frequência variável. Quanto à intensidade da reação imunoistoquímica para MMP-9, as células endoteliais, inflamatórias e estromais apresentaram grau maior, mostrando-se acentuado, enquanto o epitélio glandular e a parede vascular mostraram intensidade moderada.

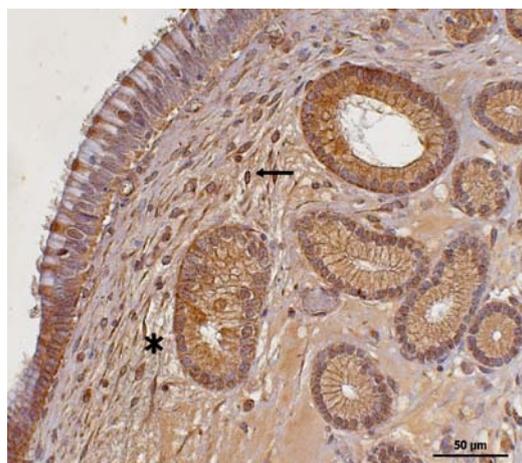


Figura 2. Endométrio equino – categoria III. Endometrite crônica infiltrativa. Marcação imunoistoquímica para metaloproteinase-9. Imunorreatividade difusa. Reação de intensidade acentuada no epitélio glandular, célula inflamatória (seta) e células estromais superficiais (asterisco). Epitélio luminal com positividade segmentar.

Na categoria IIA, células do epitélio glandular, do endotélio, da parede vascular e do estroma mostraram imunorreatividade para MMP-9 em todas as amostras estudadas. Marcação positiva no epitélio luminal e células inflamatórias foram observadas em 93,8% dos casos. Os elementos marcados com maior frequência nas biópsias foram o epitélio glandular e as células inflamatórias, seguidos pelas células endoteliais.

Na categoria IIB, o epitélio glandular, as células endoteliais e as estromais foram positivos em todas as amostras estudadas. As células inflamatórias e o epitélio luminal mostraram imunorreatividade em 86,7% dos casos, enquanto a região da parede vascular demonstrou reação positiva em 60% dos animais. As estruturas positivas observadas com maior frequência nesta categoria foram as células do epitélio glandular.

Na categoria III, epitélio glandular, células endoteliais e estromais positivas para MMP-9 foram observados em todas as amostras. Epitélio luminal, células inflamatórias e parede vascular mostraram imunorreatividade em 93,3%, 80,0% e 73,3% dos casos, respectivamente. As estruturas que expressaram essa enzima mais

frequentemente foram as células endoteliais, seguidas pelo epitélio luminal.

Quando comparadas às frequências dos diferentes elementos marcados para MMP-9 entre as categorias de endométrio, nas células do epitélio glandular e do endotélio vascular e nas do infiltrado inflamatório, não houve modificações evidentes. No epitélio luminal e na região da parede vascular, houve diminuição do número de células que demonstraram positividade conforme aumentou o grau de lesão. Já nas células estromais, houve diminuição discreta na quantidade de células positivas entre os endométrios saudáveis e aqueles com lesões discretas e intermediárias, enquanto as amostras da categoria III apresentaram maior quantidade de células que expressaram a enzima, mas ainda em menor número do que os da categoria I.

Quanto à intensidade da reação imunoistoquímica para a enzima MMP-9, ao se comparar cada estrutura nas diversas categorias, na Tab. 4, apresenta-se a intensidade da imunomarcção para esta enzima no endométrio equino, quando classificado de acordo com Kenney e Doig (1986).

Tabela 4. Intensidade da marcação imunoistoquímica de metaloproteinase-9 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias de equinos<sup>1</sup>

| Estrutura           | Categoria I | Categoria IIA | Categoria IIB | Categoria III |
|---------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| Epitélio luminal    | Acentuada   | Acentuada     | Acentuada     | Acentuada     |
| Epitélio glandular  | Moderada    | Moderada      | Moderada      | Acentuada     |
| Célula endotelial   | Acentuada   | Acentuada     | Acentuada     | Acentuada     |
| Parede vascular     | Moderada    | Acentuada     | Discreta      | Moderada      |
| Célula inflamatória | Acentuada   | Acentuada     | Acentuada     | Moderada      |
| Célula estromal     | Acentuada   | Acentuada     | Moderada      | Acentuada     |

<sup>1</sup>Classificação de acordo com Kenney e Doig (1986).

Nas endometrites crônicas infiltrativas, todas as amostras apresentaram imunorreatividade para MMP-9 em todas as estruturas estudadas, com exceção da parede vascular, que expressou esta enzima em 78,8% dos casos. O epitélio glandular foi a estrutura que apresentou maior frequência de células positivas, seguido das células endoteliais.

Nas endometroses, houve imunorreatividade para MMP-9 em todas as amostras no epitélio luminal, epitélio glandular, células endoteliais e células estromais. O epitélio glandular apresentou maior frequência de células positivas,

seguido pelas células endoteliais, células do infiltrado inflamatório e células estromais.

Quando comparados os diferentes elementos estudados entre os endométrios hígidos, com endometrite crônica infiltrativa e endometrose, não foram evidenciadas modificações na frequência de células positivas no epitélio luminal e nas células endoteliais. Embora no epitélio glandular houvesse predominância da expressão de MMP-9 em quantidade acentuada nos três grupos, notou-se que houve menor número de amostras que apresentavam essa característica nos grupos acometidos por alterações de ordem inflamatória ou

degenerativa, fato também observado nas células estromais. O epitélio glandular do grupo hígido expressou a enzima de forma acentuada em 92,3% das amostras; o que ocorreu em 81% das endometrites crônicas infiltrativas e em 75% das endometroses. Já nas células estromais, não houve diferença entre os grupos com lesões inflamatórias ou degenerativas, mas o número de células que expressaram MMP-9 nos dois grupos

foi discretamente menor do que no grupo hígido. Considerando-se a parede vascular, as endometroses demonstraram menor frequência da marcação para MMP-9 do que os endométrios hígidos e nos que prevaleceram as alterações inflamatórias. Na Tab. 5, apresenta-se a intensidade da imunomarcação para MMP-9 no endométrio equino, quando classificado de acordo com Ricketts e Alonso (1991).

Tabela 5. Intensidade da marcação imunohistoquímica de metaloproteinase-9 nas diferentes estruturas do endométrio de biópsias em equinos<sup>1</sup>

| Estrutura           | Endométrio hígido | Endometrite crônica infiltrativa | Endometrose |
|---------------------|-------------------|----------------------------------|-------------|
| Epitélio luminal    | Acentuada         | Acentuada                        | Acentuada   |
| Epitélio glandular  | Moderada          | Moderada                         | Moderada    |
| Célula endotelial   | Acentuada         | Acentuada                        | Acentuada   |
| Parede vascular     | Moderada          | Moderada                         | Moderada    |
| Célula inflamatória | Acentuada         | Acentuada                        | Acentuada   |
| Célula estromal     | Acentuada         | Acentuada                        | Acentuada   |

<sup>1</sup>Classificação de acordo com Ricketts e Alonso (1991).

## DISCUSSÃO

Nas biópsias endometriais, pode-se verificar uma tendência na diminuição do número de amostras expressando MMP-2 nos endométrios com alterações histopatológicas, estando entre as endometroses o menor percentual de biópsias que expressam esta enzima. Quanto à intensidade da reação imunohistoquímica, verificou-se que também houve tendência na diminuição da positividade nas estruturas pesquisadas em relação aos endométrios saudáveis, exceto no epitélio glandular, que apresentou aumento da marcação positiva nos casos de endometrite, sendo maior na categoria III. Pode-se considerar que o aumento da MMP-2 no epitélio glandular esteja relacionado à diminuição da enzima nos demais compartimentos estudados, mecanismo associado à tentativa de o tecido manter os níveis de expressão estáveis. Talvez, esses dados possam estar relacionados ao prognóstico do endométrio, principalmente quando considerado o tipo de enfermidade presente, ou seja, naqueles casos em que há predomínio da reação fibrótica; havendo menor quantidade de MMP-2, entende-se que a atividade colagenolítica estaria ocorrendo em menor escala, com esta enzima.

O aumento na expressão da MMP-2 pelas células epiteliais foi observado anteriormente (Porto, 2006), quando foi sugerido que esse fenômeno poderia estar relacionado à modificação da

secreção glandular no endométrio das éguas. Ainda, o presente estudo demonstrou que células estromais periglandulares positivas para MMP-2 foram observadas, sobretudo nas glândulas dilatadas e fibróticas, corroborando os resultados de Walter et al. (2005). Sabe-se que uma das fontes da metaloproteinase 2 é o miofibroblasto, que, na fibrose hepática, sintetiza essa gelatinase na presença de colágeno do tipo I (Arthur, 2000). Os miofibroblastos presentes nas endometroses das éguas podem estar relacionados com a estimulação da produção da matriz extracelular e sua degradação, já que são aptos a produzir citocinas (Walter et al., 2001).

A região da parede vascular mostrou intensa marcação para MMP-2, mas foi ausente nas células endoteliais. Porto (2006) citou que a MMP-2 tem papel preponderante na angiogênese e que essa marcação pode estar relacionada à presença dos pericitos, fonte de vários mediadores químicos.

O aumento da atividade da MMP-2 já foi associado com a fibrose intersticial durante o remodelamento cardíaco. Entretanto, estudos já observaram que o aumento da atividade da MMP-2 foi acompanhado pelo aumento da fibrose cardíaca, o qual se deve provavelmente à proteólise direta dos componentes da matriz do miocárdio, facilitando assim, uma resposta pró-fibrótica (Matsusaka et al., 2006).

Os resultados da análise da expressão imunohistoquímica da MMP-9 demonstraram que todas as amostras foram positivas para esta gelatinase. Em todos os grupos, independentemente da classificação empregada, houve positividade nas células endoteliais e estromais, sempre em grande proporção.

Nas doenças inflamatórias intestinais do homem, já foi verificado o aumento da expressão de metaloproteinases, entre elas a 2 e a 9, embora a MMP-9 também tenha sido identificada na mucosa intestinal não inflamada. Esse efeito deve-se à atividade leucocitária, sobretudo pela ação da mieloperoxidase liberada por essas células (Meijer et al., 2007).

Sabe-se que a MMP-9 está relacionada ao remodelamento vascular, e esse fenômeno está ligado ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). A MMP-9 promove a mobilização do VEGF da matriz extracelular, tornando-o apto a ligar-se ao seu receptor (Page-McCaw et al., 2007). Entretanto, o presente estudo revelou que houve redução da positividade na região da parede vascular para MMP-9 nas endometrites mais graves, o que pode estar correlacionado ao prognóstico menos favorável. Talvez isso não tenha sido evidenciado nas endometroses porque as amostras foram classificadas segundo as alterações predominantes, ou seja, ainda que houvesse infiltrado inflamatório mononuclear proeminente dentre as amostras do grupo das endometrites crônicas infiltrativas, este poderia estar associado à fibrose periglandular em diferentes graus. Essa diminuição na positividade da parede vascular poderia ter relação com o comprometimento da angiogênese, o que levaria ao maior acúmulo de tecido fibroso, menos sensível à diminuição da vascularização. Talvez, o aumento da expressão de MMP-2 na região da parede vascular seja um mecanismo compensatório à diminuição da MMP-9, já que ambas as enzimas pertencem ao mesmo grupo de metaloproteinases. Para confirmação desta hipótese, são necessários estudos que verifiquem a concentração das enzimas ativas neste tipo de alteração endometrial. Isto poderia estar relacionado com o que observou Nunes (2006), ao verificar que, nas endometrites crônicas mais graves, há maior grau de fibroelastose.

Neste trabalho não pode ser atribuída uma função específica à MMP-9 nas células epiteliais e inflamatórias, pois foi amplamente expressa em todos os tipos de endométrio equino pesquisados. Já entre as células inflamatórias, há relatos de que macrófagos e células T são responsáveis pela produção de MMP-9 nos processos inflamatórios. Abraham et al. (2005) citaram que a atividade migratória das células T helper é dependente da atividade de metaloproteinases, sobretudo de MMP-2 e MMP-9, por essas enzimas serem capazes de clivar os componentes da membrana basal vascular. Nguyen et al. (2005) relataram que a infiltração e a diferenciação dos monócitos nos tecidos lesionados são dependentes de MMP-9. Esse dado pode explicar o resultado obtido por Nunes (2003), que não verificou aumento significativo do número de macrófagos nas endometrites. Entretanto, nos endométrios das éguas, somente a MMP-9, e não a MMP-2, demonstrou imunorreatividade nas células inflamatórias, e talvez possa estar correlacionada a esse tipo de função. Ainda assim, nas endometroses, observou-se que houve diminuição da intensidade da imunorreatividade para MMP-9. Talvez nas endometroses, em que as células inflamatórias expressam menos MMP-9, haja o comprometimento da atividade migratória dos linfócitos e monócitos, e por isso eles não infiltram o tecido lesionado.

Outros fatores podem estar associados à liberação de MMP-9. Logo, estudos que buscam investigar a presença de outros mediadores químicos nas endometrites crônicas das éguas podem colaborar para a compreensão dos dados obtidos neste trabalho, já que a expressão e a localização da MMP-9 foram definidas. Neste sentido, Ra e Parks (2007) mencionaram que a compartimentalização – onde e como a MMP é liberada e mantida no ambiente pericelular – é importante, regulando a especificidade da proteólise e a afinidade da interação com o substrato.

Frente aos dados encontrados na literatura, pode-se concluir que a MMP-2 tem sua função voltada principalmente para os processos fibrogênicos, e a MMP-9 relaciona-se sobretudo com as reações inflamatórias. Neste trabalho, talvez a relação da MMP-9 mais evidente nos processos inflamatórios tenha sido demonstrada pela imunomarcção positiva nas células

inflamatórias, o que não foi verificado para a MMP-2, enquanto a relação mais estreita da MMP-2 com o processo fibrótico no útero das éguas talvez possa ser sugerida pelo aumento da expressão dessa enzima nas glândulas endometriais.

A desestabilização tecidual pela atividade proteolítica pode levar à liberação de fatores de crescimento ancorados à matriz extracelular e presentes na superfície celular, com a formação de novas moléculas bioativas. Talvez, considerando-se este aspecto, seja interessante a identificação da atividade enzimática das metaloproteínas além da inter-relação com outros mediadores químicos, já que este estudo demonstrou a presença e a localização das metaloproteínas 2 e 9, buscando sua relação com os diferentes processos nos diversos graus de lesão presentes no endométrio equino.

O conhecimento das inter-relações que ocorrem entre as células, a matriz extracelular e seus sinalizadores fornecem subsídios para que se possa interferir de forma precisa no processo fibrótico do endométrio das éguas, o que poderá interromper a evolução ou mesmo reverter os fenômenos que comprometem a função uterina.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, M.; SHAPIRO, S.; KARNI, A. et al. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. *J. Neuroimmunol.*, v.163, p.157-164, 2005.
- ARTHUR, M.J.P. MMPs and TIMPs in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v.279, G245-G249, 2000.
- DOIG, P.A.; McKNIGHT, J.D.; MILLER, R.B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Can. Vet. J.*, v.22, p. 72-76, 1981.
- HOFFMAN, C.; ELLENBERGER, C.; MATTOS, R.C. et al. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Anim. Reprod. Sci.*, v.111, p.261-278, 2009.
- KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D.A. (Ed.). *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: W B Saunders, 1986. p.723-729.
- MATSUSAKA, H.; IDE, T.; MATSUSHIMA, S. et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure overload. *Hypertension*, v.47, p.711-717, 2006.
- MEIJER, M.J.W.; MIEREMET-OOMS, M.A.C.; VAN DER ZON, A.M. et al. Increased mucosal matrix metalloproteinase-1, -2, -3, and -9 activity in patients with inflammatory bowel disease and the relation with Crohn's disease phenotype. *Dig. Liver Dis.*, v.39, p.733-739, 2007.
- NGUYEN, J.; KNAPNOUGEL, P.; LESAVRE, P. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 by interferons and TGF- $\beta$ 1 through distinct signalings accounts for reduced monocyte invasiveness. *FEBS Lett.*, v.579, p.5487-5493, 2005.
- NUNES, L.C. *Avaliação histopatológica, histoquímica, imunoistoquímica e morfométrica das endometrites crônicas em éguas*. 2003. 108f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- NUNES, L.C. *Expressão de metaloproteínas, TIMP-1 e da esclerose vascular nas endometrites crônicas das éguas*. 2006. 84f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- PAGE-McCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v.8, p.221-233, 2007.
- PORTO, C.D. *Caracterização histoquímica do colágeno e expressão de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 nas endometrites crônicas das éguas*. 2006. 102f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- RA, H.-J., PARKS, W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol.*, v.26, p.587-596, 2007.
- RICKETTS, S.W.; ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Vet. J.*, v.23, p.189-192, 1991.
- WALTER, I.; HANDLER, J.; MILLER, I. et al. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue transglutaminase (TG 2) are expressed in periglandular fibrosis in horse mares with endometrosis. *Histol. Histopathol.*, v.20, p.1105-1113, 2005.
- WALTER, I.; HANDLER, J.; REIFINGER, M. et al. Association of endometrosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction*, v.121, p.581-586, 2001.