

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

**MARIANI FARIAS FIORENZA**

**PERFIL TRANSCRICIONAL DO ENDOMÉTRIO DE FÊMEAS EQUINAS**  
**COM DIFERENTES GRAUS DE FIBROSE**

**PORTO ALEGRE**

**2017**

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

**PERFIL TRANSCRICIONAL DO ENDOMÉTRIO DE FÊMEAS EQUINAS**  
**COM DIFERENTES GRAUS DE FIBROSE**

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

Orientadora: Profa. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin

**PORTO ALEGRE**

**2017**

### CIP - Catalogação na Publicação

Farias Fiorenza, Mariani  
PERFIL TRANSCRICIONAL DO ENDOMÉTRIO DE FÊMEAS  
EQUINAS COM DIFERENTES GRAUS DE FIBROSE / Mariani  
Farias Fiorenza. -- 2017.  
64 f.

Orientadora: Mara Iolanda Batiastella 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, 2017.

1. endometriose. 2. endométrio. 3. éguas. 4.  
expressão gênica. 5. histopatologia. I. Batiastella  
Rubin, Mara Iolanda, orient. II. Título.

**MARIANI FARIAS FIORENZA**

**PERFIL TRANSCRICIONAL DO ENDOMÉTRIO DE FÊMEAS EQUINAS COM  
DIFERENTES GRAUS DE FIBROSE**

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

**Aprovada em 23 de fevereiro de 2017:**

---

**Mara Iolanda Batistella Rubin, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Adriana Pires Neves, Dra. (UNIPAMPA)**

---

**Eduardo Malschitzky, Dr. (ULBRA)**

---

**Ricardo Pozzobon, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2017

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais pelo amor e carinho, por me ensinar que a cada dia podemos recomeçar, pelo incentivo para ser alguém melhor e por me fazer saber que sempre poderei contar com todos.

À minha irmã, pelo amor e incentivo incondicional. Obrigada por ter posto tanta sabedoria, cuidado e imaginação na nossa irmandade, por sempre ser honesta comigo, ser gentil e estar sempre presente quando necessitei.

Aos meus colegas de pós-graduação por terem contribuído no meu aprendizado profissional e pessoal.

Às minhas amigas pela ajuda e compreensão em todos os dias que me fiz ausente, que não percebi de momentos importantes, e que mesmo longe me fizeram companhia, eu agradeço de coração. Amizade é riqueza que transcende a vida.

Aos meus colegas e amigos de graduação, que ajudaram a tornar está jornada mais suave.

À Professora e orientadora Mara Iolanda Batistella Rubin pela oportunidade, pelos ensinamentos, suporte e incentivo durante esses anos.

Aos estagiários do Laboratório de Embriologia Animal (UFSC) pela amizade e colaboração fundamental na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Animal: Equinos pela oportunidade.

## RESUMO

### PERFIL TRANSCRICIONAL DO ENDOMÉTRIO DE FÊMEAS EQUINAS COM DIFERENTES GRAUS DE FIBROSE

Autora: Mariani Farias Fiorenza

Orientadora: Profa. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin

A proposta do experimento baseia-se na análise uterina de éguas distribuídas em três graus de fibrose, conforme estabelecido em 1978 por Kenney (grupo I – endométrio saudável; grupo II, endométrio saudável ou com poucas alterações; grupo III – endométrio com alterações severas). Portanto, o estudo tem por objetivo determinar o perfil da expressão gênica de possíveis genes causadores da fibrose, conhecidos pelo o envolvimento em outros órgãos e espécies, no endométrio de éguas classificadas com diferentes graus de saúde uterina. Uma amostra de tecido endometrial foi colhida por meio de biópsia uterina e seccionada em dois fragmentos para posterior análise. Para os exames laboratoriais, a primeira amostra foi destinada à avaliação histopatológica e a segunda à validação de genes-alvo por reação polimerase em tempo real (qPCR). No exame histopatológico, o grau de fibrose e fase do ciclo estral foram estimados para distribuir as fêmeas nos grupos, além disso, o histórico reprodutivo foi analisado e a partir dos dados do exame histopatológico e histórico foram selecionadas 20 fêmeas para realização do qPCR (grupo I = 11; grupo II = 6; grupo III = 3). A segunda amostra de tecido foi armazenada em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta, sendo posteriormente armazenada em freezer -80°C. Após o processamento das amostras, a quantificação relativa da abundância dos transcritos de *Fator de Transformação do Crescimento-β1* (*TGF-β1*), *Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo* (*CTGF*), *Colágeno tipo I* (*COL-I*), *α actina de músculo liso* (*αSMA*), *Molécula de Adesão Intercelular-1* (*ICAM-1*), e *Cluster de Diferenciação 147* (*CD147*) foi comparada entre os grupos. A expressão de *αSMA* ( $P = 0,78$ ), *COL-I* ( $P = 0,57$ ) e *ICAM-1* ( $P = 0,98$ ) não resultou em diferença entre os grupos; e a de *TGF-β1* e *CTGF* foi maior no grupo I ( $P = 0,04$ ). Nos casos de fibrose severa, a transcrição de mRNA de *CD147* foi maior em comparação com o grupo I ( $P = 0,04$ ). Desta forma, acredita-se que a partir da avaliação de genes expressos do endométrio de éguas com diferentes graus de fibrose pode ser possível identificar genes marcadores que aumentam a precisão da classificação previamente proposta.

Palavras-chave: **Biopsia endometrial, genes marcadores, endometriose.**

## ABSTRACT

### TRANSCRIPTIONAL PROFILE OF EQUINE FEMALE ENDOMETRIUM WITH DIFERENTS GRADES OF FIBROSIS

Autor: Mariani Farias Fiorenza

Advisor: Prof. Dr. Mara Iolanda Batistella Rubin

The purpose of the experiment was to analyze the uterus of mares distributed in three degrees of fibrosis, as established by Kenney in 1978 (group I - healthy endometrium; group II, healthy endometrium or with few alterations; group III - endometrium with severe changes). A sample of endometrial tissue was collected by biopsy which was sectioned into two fragments for further analysis. For the laboratory tests, the first sample was used for histopathological evaluation and the second for the validation of target genes by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). In the histopathological examination, the degree of fibrosis and phase of the estrous cycle were estimated to distribute the females into groups; in addition, the reproductive history was analyzed and from the obtained data of histopathological evaluation and history 20 mares were selected for qPCR (group I = 11; Group II = 6, group III = 3). The second tissue sample was stored in liquid nitrogen immediately after collection and stored in a freezer at -80 ° C. After the samples were processed, the relative abundance quantification of *Transforming Growth Factor- $\beta$ 1* (*TGF- $\beta$ 1*), *Connective Growth Factor* (*CTGF*),  *$\alpha$  Smooth Muscle Actin* ( *$\alpha$ SMA*), *Intercellular Adhesion Molecule-1* (*ICAM-1*), *Type I Collagen* (*COL-1*), and *Differentiation Cluster 147* (*CD147*) was carried out. The expression of  *$\alpha$ SMA* (P = 0.78), *COL-1* (P = 0.57) and *ICAM-1* (P = 0.98) did not resulted in difference between the groups; and *TGF- $\beta$ 1* and *CTGF* were higher in group I (P = 0.04). In severe cases of fibrosis, *CD147* mRNA transcription was higher in comparison to the group I (P = 0.04). Thus, it is believed that from the evaluation of expressed endometrial genes in the mare with different degrees of fibrosis it may be possible to identify marker genes that increase the accuracy of the previously proposed classification.

Keywords: **Endometrial biopsy. Markers genes. Endometrosis**



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte esquemático do endométrio equino. E – Epitélio luminal; SC – Estrato compacto; DG – Ducto glandular; GE – Glândulas endometriais; SS – Estrato esponjoso; A – Arteriolas; L – Linfático; V – Vênulas; PBLP – Porção basal da lâmina própria; LP – Lâmina própria.....	22
Figura 2. Mediadores envolvidos no processo de formação da fibrose. ....	26
Figura 3. Corte histológico contendo endométrio classificado na categoria I, conforme classificação proposta por Kenney, em 1978. ....	30
Figura 4. Corte histológico contendo endométrio classificado na categoria II, conforme classificação proposta por Kenney, em 1978. Presença de fibrose endometrial moderada com formação de ninho glandular associado à dilatação de glândula. Há hiperplasia e hipertrofia do epitélio glandular. ....	30
Figura 5. Corte histológico contendo endométrio classificado na categoria III, conforme classificação proposta por Kenney, em 1978. Presença de fibrose periglandular multifocal acentuada. ....	31
Figura 6. Provável patogênese da endometrose ativa e inativa, destrutiva e não destrutiva. ..	32
Figura 7. Pinça de biopsia modelo Yeoman, com 60 centímetros utilizada para colheita de amostras do endométrio equino.....	34

## CAPÍTULO 1

Figure 1. mRNA expression of <i>CTGF</i> normalized with <i>GAPDH</i> and <i>G3PDH</i> during the establishment of fibrosis (P=0.04). The group I showed higher expression compared with group III. Letters a and b indicates statistical differences between the groups I, II and III.....	54
Figure 2. mRNA expression of <i>TGF-β1</i> normalized with <i>GAPDH</i> and <i>G3PDH</i> between the groups I, II and III (P=0.04). The group I had higher expression compared with group III. Letters a and b indicates statistical differences between the groups I, II and III.....	54
Figure 3. mRNA expression of <i>CD147</i> in equine endometrium during establishment fibrosis, normalized with <i>GAPDH</i> and <i>G3PDH</i> (P = 0.04). Group III showed higher expression compared with group I. Letters a and b indicates differences between the groups I, II and III. ....	55

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Table 1. Primer sequences used for real time PCR .....	53
Table 2. Information of reproductive status and age of the mares which were used in the mRNA transcription analyzes .....	53
Table 3. Means and Standard Deviation ( $M \pm SD$ ) of the genes mRNA transcription in the categories I, II and III. ....	53

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
2.1	FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL .....	21
2.2	ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO ÚTERO EQUINO .....	21
2.2.1	Morfologia do endométrio durante o estro .....	22
2.2.2	Morfologia do endométrio durante o diestro .....	23
2.2.3	Morfologia do endométrio durante o anestro .....	23
2.3	FUNÇÕES UTERINAS .....	23
2.4	ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO ÚTERO .....	24
2.4.1	Fibrose .....	24
2.4.2	Fibrose endometrial .....	27
2.5	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO .....	33
2.5.1	Biopsia endometrial .....	33
2.6	DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	34
2.6.1	PCR em tempo real .....	35
2.7	MARCADORES MOLECULARES .....	36
2.7.1	$\alpha$ Actina de músculo liso .....	36
2.7.2	Cluster de diferenciação 147 .....	37
2.7.3	Colágeno tipo I .....	37
2.7.4	Fator de crescimento do tecido conjuntivo .....	38
2.7.5	Fator de transformação do crescimento $\beta$ 1 .....	38
2.7.6	Molécula de adesão intracelular 1 .....	39
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A saúde do útero, especialmente do endométrio, é um fator determinante para a fertilidade da égua (KENNEY, 1978). Durante a vida reprodutiva, o endométrio é submetido a eventos que podem, sob determinadas circunstâncias, ser considerados agressões, tais como a cópula, o parto, o puerpério e as infecções genitais, os quais gradativamente diminuem a capacidade funcional do endométrio, tendo como consequência a infertilidade (SILVA et al., 1987).

Por muito tempo, os equinos foram considerados animais com baixa fertilidade (VOSS, 1984). Devido a isso, estudos foram conduzidos para melhor compreender as respostas que a égua apresenta frente a agressões durante a vida reprodutiva (CAMOZZATO, 2014). Para determinar qual condição a fêmea apresenta, é preciso basear-se no histórico, exame externo, exame vaginal, palpação e ultrassonografia do trato genital, bem como em exames laboratoriais, incluindo cultura, citologia e biopsia uterina (LEBLANC; CAUSEY, 2009). Entretanto, determinados problemas são evidenciados somente através da biopsia uterina, pois possibilita a caracterização histopatológica do endométrio que está, por sua vez, associada à sua condição funcional, que é uma ferramenta importante no diagnóstico e prognóstico da infertilidade na égua (DOIG et al., 1981).

As alterações histopatológicas do endométrio equino foram descritas primeiramente por Kenney (1978) e incluem processos inflamatórios agudos ou crônicos e alterações crônicas degenerativas como fibrose, dilatação cística e lacunas linfáticas (MASSENO, 2009). Esta classificação é a mais utilizada e posteriormente foi modificada por Kenney e Doig (1986). Segundo os autores, o endométrio da égua pode ser classificado em quatro categorias (I, IIA, IIB e III) de acordo com a presença, distribuição e intensidade das lesões observadas na lâmina própria. Assim, quanto maior o grau de classificação da biopsia, menor é a probabilidade do estabelecimento e manutenção da gestação.

O crescimento e desenvolvimento fetal dependem do ambiente intrauterino, responsável pelo fornecimento nutricional, metabólico e endócrino (ROSSDALE; OUSEY, 2003). Alterações endócrinas, metabólicas e na homeostasia no organismo da égua podem influenciar a circulação uterina e, dessa forma, afetar o conceito (ROSSDALE; OUSEY, 2003). Além disso, a idade e alterações degenerativas, como a fibrose, podem comprometer a formação placentária (BRACHER; MATHIAS; ALLEN, 1996; WILSHER; ALLEN, 2003), resultando no retardo do crescimento intrauterino, cujas consequências são o tamanho reduzido ou

aparência de subnutrição ao nascimento, alterações comportamentais e funcionais (ROSSDALE; OUSEY, 2003).

Em 1995, Schoon et al. descreveram, com base na morfologia de células estromais, a diferenciação ativa ou inativa, que posteriormente foi usada para classificar a endometriose como ativa, inativa, destrutiva ou não destrutiva (SCHOON et al., 1997).

Apesar da eficiência da classificação quanto aos graus de endometriose por meio de biopsia uterina e exame histopatológico, a etiologia e patogenia das alterações endometriais que levam à infertilidade foram pouco exploradas no passado (HOFFMANN et al., 2003). Para auxiliar o diagnóstico é possível utilizar métodos complementares de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), para a identificação e caracterização das vias metabólicas envolvidas e mecanismos moleculares responsáveis pelas alterações. Também é possível desenvolver testes moleculares para o diagnóstico destas alterações, ou mesmo para o estabelecimento de futuras terapias. A análise de transcritos é essencial para conhecer os elementos funcionais do genoma e os constituintes moleculares de células e tecidos (WANG et al., 2009).

A formação da fibrose é resultado de uma inflamação crônica, decorrente da exposição a fatores agressivos, regulada pela matriz extracelular, superfícies de células inflamatórias, hormônios e citocinas profibróticas (ATAMAS, 2002). Embora mais de uma década já tenha transcorrido, os mecanismos que envolvem a etiologia e fisiopatologia da fibrose endometrial ainda são pouco compreendidos.

Portanto, esta proposta tem por objetivo determinar o perfil da expressão gênica de possíveis fatores causadores da fibrose, conhecidos pelo envolvimento em outros órgãos e espécies, no endométrio de éguas classificadas com diferentes graus de saúde uterina, assim como correlacionar esses dados com o histórico reprodutivo e fase do ciclo estral de cada animal. Entre eles estão *α Actina de Músculo liso (αSMA)*, *Cluster de Diferenciação 147 (CD147)*, *Colágeno tipo I (COL-I)*, *Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo (CTGF)*, *Fator de Transformação do Crescimento β1 (TGF-β1)* e *Molécula de Adesão Intercelular 1 (ICAM-1)*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL

A espécie equina é considerada poliéstrica estacional, regulada predominantemente pelo fotoperíodo. Em diferentes graus, as éguas respondem as mudanças na duração do dia e, devido a isso, passam por um período de transição de outono, anestro, período de transição de primavera e período cíclico durante a primavera e verão (GINTHER, 1979).

Durante o período anovulatório, o desenvolvimento folicular é mínimo. O início do período de transição da primavera é caracterizado pelo desenvolvimento de uma a três ondas foliculares anovulatórias, seguido pelo período cíclico que tem como fator importante para o reinício da atividade ovulatória a ocorrência de aumentos pronunciados e repetidos do hormônio luteinizante (LH) circulante (AURICH, 2011).

Durante o período reprodutivo, a duração do ciclo é de cerca de 22 dias com 5 a 7 dias de estro e 14 a 15 dias de diestro. As células gonadotróficas estão localizadas na hipófise e a diferença no padrão de armazenamento de LH e de hormônio folículo estimulante (FSH) dentro destas células é considerada a base para a regulação da secreção de gonadotrofinas ao longo do ciclo reprodutivo. Em geral, as éguas desenvolvem uma a duas ondas foliculares por ciclo, onde o folículo pré-ovulatório atinge tamanho médio de 40 milímetros. Após a ovulação, o nível de progesterona aumenta e atinge concentração máxima no dia oito. Quando não há sinalização do concepto no útero, a luteólise funcional ocorre ao redor do dia 15 e é iniciada pela secreção endometrial de prostaglandina  $2\alpha$  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ). Durante o ciclo estral, o útero, a vagina e o endométrio passam por alterações pronunciadas relacionadas as variações endocrinológicas de estrogênio e progesterona. (AURICH, 2011).

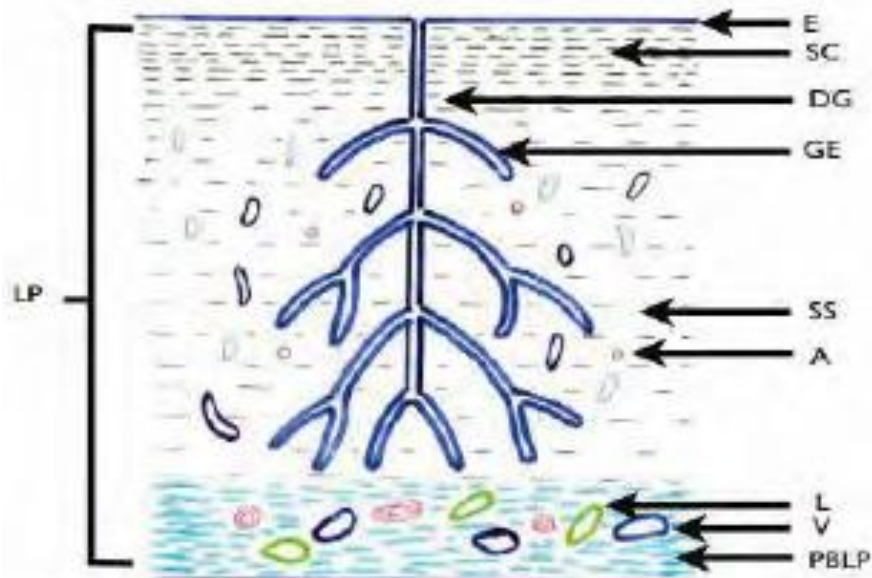
### 2.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO ÚTERO EQUINO

O útero equino é composto por três camadas denominadas de endométrio, miométrio e perimétrio (KENNEY, 1978; SEVERO; MASUDA, 2009; MASSENO, 2012) O epitélio luminal consiste em uma camada simples de células que variam de cúbicas a cilíndricas altas, dependendo da fase do ciclo estral; sendo no estro essa camada pseudoestratificada. Uma membrana basal separa o epitélio luminal da lâmina própria subjacente (VAN CAMP, 1988).

A lâmina própria é dividida em estrato compacto e esponjoso (KENNEY, 1978). O estrato compacto é caracterizado por maior densidade de células estromais e se encontra junto

ao epitélio luminal, apresenta ductos glandulares que se abrem no epitélio luminal, porém não possui glândulas. No estrato esponjoso, encontram-se as glândulas uterinas em meio a um estroma com menor densidade de células. São observadas ainda, nesta porção, artérias, veias e vasos linfáticos (Figura 1). Os ramos das glândulas endometriais se encontram no estrato compacto e seu aspecto histológico muda conforme a fase do ciclo estral. O endométrio forma dobras que possuem uma porção central e é constituída por tecido conjuntivo com vasos sanguíneos e linfáticos. Ele se continua em uma pequena extensão na porção basal da dobra até encontrar o miométrio (SEVERO; MASUDA, 2009).

Figura 1. Corte esquemático do endométrio equino. E – Epitélio luminal; SC – Estrato compacto; DG – Ducto glandular; GE – Glândulas endometriais; SS – Estrato esponjoso; A – Arteríolas; L – Linfático; V – Vênulas; PBLP – Porção basal da lâmina própria; LP – Lâmina própria.



Fonte: Severo; Masuda, 2009.

O miométrio é composto por duas camadas de musculatura lisa, uma interna circular, que está em contato com o conjuntivo da porção basal da lâmina própria e outra externa longitudinal. Entre essas duas camadas há outra rica em vasos chamada de camada vascular. Envolvendo o útero e assentado sobre fina faixa conjuntiva há uma camada de células mesoteliais que forma o perimétrio (SEVERO; MASUDA, 2009).

### 2.2.1 Morfologia do endométrio durante o estro

Durante o início do estro a altura do epitélio luminal é maior, sendo este pseudoestratificado. Em algumas éguas, o epitélio luminal pode mudar para colunar baixo no final do estro. Vacúolos citoplasmáticos são comuns nas células do epitélio luminal, porém podem ser uma alteração patológica, onde os vacúolos localizam-se em torno das células transepiteliais migratórias. É comum também nesta fase, o acúmulo ou marginalização de neutrófilos polimorfonucleares ao redor de capilares no lúmen. Devido ao edema, a densidade das glândulas por unidade de área é menor durante o estro do que em outras fases do ciclo estral. Então, para ser indicativo de estro as alterações edematosas devem vir acompanhadas das outras alterações mencionadas (KENNEY, 1978).

### **2.2.2 Morfologia do endométrio durante o diestro**

Durante os primeiros dias do diestro, o epitélio luminal pode ser colunar alto ou baixo e, ocasionalmente, cúbico. Sete dias após o final do estro, a altura do epitélio tende a aumentar em preparação ao estro subsequente. A densidade da glândula normalmente aumenta por dois motivos. Primeiro, o edema do estroma diminui, e segundo a tortuosidade das glândulas aumenta (KENNEY, 1978).

### **2.2.3 Morfologia do endométrio durante o anestro**

O endométrio entra em um grau de atrofia durante a fase fisiológica do anestro. Quando não é marcado por atividade folicular ou luteínica caracteriza-se por epitélio luminal cuboide com aumento de basofilia do citoplasma, lâmina própria não edematosa, população de glândulas com alta densidade e não tortuosas, com epitélio de baixo colunar a cuboide. Em muitas glândulas uma secreção espessa tende a se acumular na junção entre o ducto e a porção mais alta. Esse material é amorfo, hialino ou granular eosinofílico. Em alguns casos de atrofia, glândulas individuais e esparsas podem conter células epiteliais hipertróficas. Éguas no final do anestro podem apresentar mudanças endometriais conforme os estímulos hormonais começam (KENNEY, 1978).

## **2.3 FUNÇÕES UTERINAS**

O trato reprodutivo feminino tem como função proporcionar ambiente estéril e ótimo à concepção e desenvolvimento do concepto para que a gestação complete o período de forma



fisiológica. A troca de nutrientes, produção de fatores tróficos, componentes imunológicos como moléculas de imunoglobulina e resíduos são outras funções importantes. Isto ocorre através dos locais de fixação placentária que aumentam a área de superfície entre os tecidos materno e fetal (FOSTER, 2012). Além disso, o útero produz PFG<sub>2α</sub> pelo endométrio, transporta, armazena e auxilia na maturação de espermatozoides (BARTOL et al., 1999).

## 2.4 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO ÚTERO

A avaliação do endométrio através do exame histopatológico permite que alterações patológicas sejam detectadas, auxiliando na formação de um diagnóstico e prognóstico adequados de cada animal. Entre as alterações encontradas, pode-se citar inflamação, fibrose, hipertrofia, glândulas císticas, atrofia e hipoplasia não sazonal, hiperplasia glandular, neoplasias, lacunas linfáticas, cistos não glandulares, vasos sanguíneos (KENNEY, 1978).

A fibrose tem sido associada a problemas reprodutivos na égua há várias décadas (REBORDÃO et al., 2014). Além do fato que o grau de fibrose aumenta conforme a idade da fêmea, é notório que a expressão da proteína uteroglobina, responsável pela proteção embrionária e da uterocalina, fonte proteica para o embrião é alterada dentro de um foco fibrótico; também há mudanças na expressão de receptores de estrogênio e progesterona, (HOFFMANN et al., 2009a). E assim como a transcrição de mRNA na síntese e produção de prostaglandina aumentam durante o processo fibrótico (HOFFMANN et al., 2009b), podendo estes fenômenos serem fatores relevantes na queda das taxas de fertilidade.

### 2.4.1 Fibrose

A fibrose é marcada pelo aumento na produção e acúmulo de componentes da matriz extracelular, levando a perda da arquitetura e função do tecido. Em geral, a fibrose é o último passo de um processo contínuo que inicia com lesão e inflamação celular. A progressão da resposta ocorre com influxo de neutrófilos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos, seguida de neovascularização, desenvolvimento de células gigantes de corpo estranho, ativação de fibroblastos e, finalmente, fibrose. As células danificadas liberam mediadores da cascata de coagulação e matriz de fibrina (CHAMBERS, 2008). Assim, as plaquetas interagem com a fibrina e outros componentes da matriz extracelular, formando um coágulo sanguíneo que provoca hemostasia através da degranulação plaquetária, promovendo vasodilatação, produção de metaloproteinasas (MMP) e liberação de citocinas e quimiocinas. O tecido adjacente à lesão

produz prostaglandinas, que aumentam a vasodilatação, a permeabilidade vascular e o extravasamento de leucócitos. Assim, o aumento da permeabilidade local, juntamente com outros sinais, induz a migração leucocitária para o local lesionado (JONES, 2015).

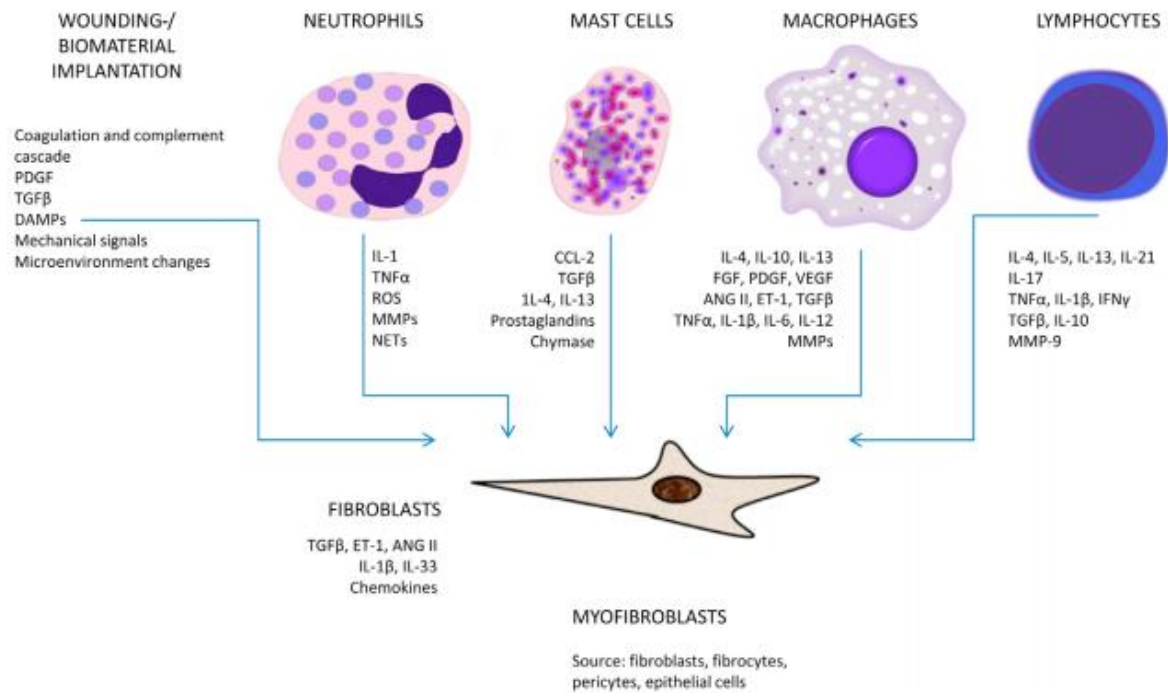
A gravidade da inflamação aguda depende da extensão dos danos, moléculas sinalizadoras, local lesado e extensão da formação provisória da matriz. O extravasamento celular inicial ocorre com os mastócitos e os neutrófilos. Os mastócitos liberam grânulos de histamina que recrutam outros fagócitos, promovendo a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Os neutrófilos por sua vez são mais numerosos que os mastócitos e também fazem sinalização celular e liberação de moléculas quimiotáticas. O tempo de vida destas células é curto, uma vez que a degranulação é seguida por apoptose. Assim, monócitos e macrófagos aparecem gradualmente no local da ferida. Tanto os neutrófilos, como os macrófagos fagocitam os detritos teciduais, células mortas e corpos estranhos. Os macrófagos liberam grande variedade de citocinas e quimiocinas que influenciam a cicatrização subsequente e respostas fibróticas. Além disso, enviam sinais para células iniciarem a formação de novos vasos sanguíneos. Os linfócitos migram para o local lesado e a sua ativação leva à liberação de várias citocinas profibróticas (JONES, 2015).

A abundância de mediadores profibróticos locais estimula a diferenciação de fibroblastos e outras células em miofibroblastos que expressam  $\alpha$  actina do músculo liso. A transição para miofibroblastos é muitas vezes considerada o aspecto crítico da fibrogênese, sendo os miofibroblastos os principais responsáveis pela produção local de proteínas da matriz extracelular (JONES, 2015).

Quando os macrófagos e outros fagócitos não conseguem eliminar o estímulo inicial, como o tecido danificado ou organismo estranho, a ativação de miofibroblastos torna-se contínua e há formação de um tecido fibroso rico em colágeno I. A medida que a produção de matriz extracelular avança, as células imunes sofrem apoptose (REINKE; SORG, 2012), deixando uma cicatriz irreversível que prejudica a função do tecido.

Existem mediadores envolvidos no processo de formação da fibrose que são importantes no controle da complexa comunicação entre células e ambiente lesado (Figura 2).

Figura 2. Mediadores envolvidos no processo de formação da fibrose.



Fonte: Jones, 2015

#### 2.4.1.1 Fatores de iniciação da fibrose

Além da ausência de interleucinas e interferons, moléculas que regulam a progressão do processo fibrótico, as células inflamatórias produzem moléculas sinalizadoras que podem acelerar o desenvolvimento da fibrose. Além disso, Yang et al. (2009) constataram que a lesão, a infecção e as próprias células podem contribuir para o desenvolvimento fibrótico, produzindo padrões moleculares associados a patógenos e padrões moleculares associados a perigo. A hipóxia local também pode induzir o processo e associada à inflamação, causam mudanças na homeostase acelerando a fibrose. Os sinais mecânicos e o pH também podem alterar a progressão fibrótica (LIND et al., 2013).

#### 2.4.1.2 Fatores celulares

Na clínica tem sido dada atenção relativamente menor aos iniciadores da fibrose, uma vez que os sinais da fibrose não aparecem até que tenha progredido significativamente. Por outro lado, mais atenção tem sido dada as etapas finais da fibrose, em particular para a diferenciação de miofibroblastos que são os responsáveis pela deposição de colágeno e contração da ferida. Além dos miofibroblastos, outros tipos de células são conhecidos por

regular o processo, entre eles estão os granulócitos, macrófagos, células dendríticas, células gigantes de corpo estranho, fibrócitos, linfócitos e fibroblastos (JONES, 2015).

#### *2.4.1.3 Fatores moleculares*

Existem inúmeras moléculas sinalizadoras envolvidas na fibrose, inclusive com funções sobrepostas. Muitas destas moléculas regulam a cicatrização de feridas de forma distinta em diferentes fases do processo, tornando difícil avaliar a sua finalidade (JONES, 2015). O TGF- $\beta$ , angiotensina II, fator de crescimento derivado de plaquetas, CTGF, endotelina 1, citocinas Th2, citocinas Th17, citocinas inflamatórias Th1, vias morfogênicas, enzimas de degradação de metaloproteinases e inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP), quimiocinas e fatores epigenéticos estão envolvidos na resposta do processo fibrótico.

#### **2.4.2 Fibrose endometrial**

A avaliação do grau de fibrose endometrial é de suma importância por ser uma alteração permanente e, quando se encontra disseminada torna-se um dos principais fatores limitantes na vida reprodutiva da égua. A idade, inflamação endometrial repetida, reprodução, múltiplas gestações e partos foram considerados ao longo das últimas décadas potenciais fatores etiológicos das alterações degenerativas do endométrio (DOIG et al., 1981; RICKETTS; ALONSO, 1991; HOFFMANN et al., 2009a). Em outros órgãos, a fibrose é uma sequência patológica de vários fatores inflamatórios crônicos, entretanto os mecanismos envolvendo a etiologia e a fisiopatologia da fibrose endometrial são ainda pouco conhecidos (LEHMANN et al., 2011)

O processo fibrótico é uma complicação da inflamação crônica e da exposição ambiental, regulado por fatores incluindo interação com a matriz extracelular, superfície de células inflamatórias, hormônios e uma complexa rede de citocinas profibróticas. A natureza do mecanismo pelo qual as citocinas regulam a fibrose pode ser indireto, através da atração de células inflamatórias, e direto, através da ligação a receptores específicos em fibroblastos e estimulação da proliferação, produção de colágeno e secreção de fatores autócrinos (ATAMAS, 2002).

Dentre as citocinas profibróticas, o CTGF e o TGF- $\beta$  são os marcadores mais característicos, devido a sua capacidade de ativar o colágeno (REBORDÃO et al., 2013a). No tecido endometrial, o TGF- $\beta$  é regulado positivamente em amostras na fase luteal expostas a

CTGF. Adicionalmente, há aumento na transcrição do receptor de TGF- $\beta$ 1 e de colágeno do tipo I e III, o que sugere a ligação da deposição de proteínas de colágeno e a provável relação com a ação fibrogênica do TGF- $\beta$ 1. Em contraste, na fase folicular enquanto o CTGF estimula a produção *in vitro* de TIMP-1 ao longo do tempo, o TGF- $\beta$  não apresenta efeito no tecido (REBORDÃO et al., 2013a; 2014).

Além destes fatores de crescimento, a fibrose pode ser ocasionada por interleucina (IL) tipo 1 e fator de necrose tumoral (TNF). A IL-1 $\beta$  inibe a produção de colágeno, porém aumenta a proliferação de fibroblastos. De modo semelhante, o TNF estimula a quimiotaxia e a proliferação de fibroblastos, e ao mesmo tempo, o TNF- $\alpha$  inibe a produção de colágeno. Fumuso et al. (2003) e Szóstek et al. (2013) estudaram o endométrio de éguas com endometrose e susceptíveis a endometrite e encontraram elevada expressão de mRNA de IL-1 $\beta$  e TNF.

A família de citocinas IL-6 exerce atividades sobre os fibroblastos, e são a principal fonte de citocinas autócrinas. Estimulam a produção de fatores de crescimento para mastócitos por fibroblastos e os mastócitos podem estimular fibroblastos. Em contraste, a IL-4 estimula a proliferação de fibroblastos e colágeno, quimiotaxia e expressão de molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) e IL-6 (ATAMAS, 2002).

Ademais as citocinas, os eicosanoides como a PGE<sub>2</sub> e a PGF<sub>2</sub> $\alpha$  podem proporcionar vias adicionais à fibrogênese (OGA et al, 2009), pois durante o curso da endometrose, a produção de prostaglandina e a transcrição de mRNA de prostaglandina sintase são alteradas (SZÓSTEK et al., 2012; 2013) pela exposição às formações extracelulares de neutrófilos (NET). Na fase lútea alguns componentes de NET elevam a PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (REBORDÃO et al., 2013b) e juntamente com o CTGF diminuem a produção *in vitro* de PGE<sub>2</sub> e aumentam a transcrição de colágeno tipo I (REBORDÃO et al., 2014).

A deposição de colágeno ocorre em geral em torno das glândulas ou em associação com a membrana basal do epitélio luminal. A primeira evidência de depósito de colágeno é a perda de randomização das células estromais do estrato compacto ou do estrato esponjoso, particularmente ao redor das glândulas (KENNEY; DOIG, 1986). A fibrose periglandular pode envolver de forma individual ou numerosa os ramos glandulares, formando ninhos fibróticos. A severidade da fibrose pode ser classificada conforme o grau, frequência e número de camadas periglandulares e número de focos fibróticos (KENNEY; DOIG, 1986). Para classificar a severidade da reação conforme o número de camadas periglandulares, Kenney (1978) descreveu que a reação suave possui uma a três camadas de fibrose periglandular, de quatro a dez camadas a reação é moderada e mais que dez camadas indica um grau severo de fibrose. Em adição, a constatação de que quanto maior a disseminação da fibrose, independente do grau

de severidade, menor a capacidade do útero para levar um potro a termo levou a inclusão desse fator no desenvolvimento de um sistema de classificação das biopsias endometriais (KENNEY, 1978; DOING; MCKNIGHT; MILLER, 1981; KENNEY; DOING, 1986).

Em 1998, Evans et al. demonstraram que houve aumento na densidade de fibrilas de colágeno na área periglandular acompanhada por um número elevado de fibroblastos. Em casos de fibrose periglandular severa, várias camadas de miofibroblastos foram cercadas por colágeno IV, laminina e fibronectina, expressaram  $\alpha$ SMA, tropomiosina e ocasionalmente desmina, o que confirmou a sua diferenciação em miofibroblastos (WATER et al., 2001). A transformação miofibroblástica também pode ser resultado do início da expressão de TGF- $\beta$ 1 estimulado pela ANG II sintetizada localmente (GANJAM; EVANS, 2006).

Em relação às células estromais, nem as mudanças sazonais nem as alterações endócrinas cíclicas parecem ter uma influência significativa na atividade das células fibróticas. A má diferenciação estromal observada em focos fibróticos independe do grau de endometrose. As células com maior grau de fibrose possuem menor expressão de receptores de hormônios esteroides em comparação com as inalteradas. Esta redução indica mudanças avançadas do estroma dentro de um foco fibrótico, o que leva a perda de especialização da estrutura e função celular. Como resultado, as células estromais fibróticas são incapazes de reagir às alterações endócrinas cíclicas e tornam-se independentes dos mecanismos de controle hormonais no útero (HOFFMANN et al., 2009a).

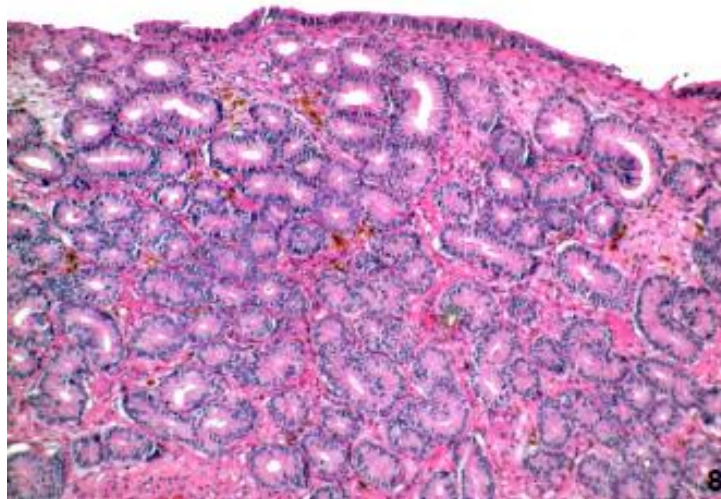
A má diferenciação das células epiteliais glandulares dentro de focos fibróticos também foi caracterizada por distinta variabilidade na expressão dos receptores de hormônios esteroides. Na endometrose ativa há aumento na expressão de receptores de estrogênio e progesterona, em comparação com as glândulas inalteradas, enquanto que o epitélio glandular na endometrose inativa apresenta diminuição na expressão dos receptores acima mencionados (HOFFMANN et al., 2009a). Portanto, se a lâmina própria for lesada parcialmente desencadeia-se o início de alterações das atividades do epitélio glandular, resultando na perda da capacidade de supressão da lâmina sobre a atividade das células epiteliais e a síntese de fatores de crescimento profibróticos (BUCZKOWSKA et al., 2014).

#### *2.4.2.1 Classificações conforme o grau de fibrose*

A histologia endometrial vem sendo usada para avaliar o ciclo estral e a fertilidade da égua há vários anos. Em 1925, Seaborn observou o comportamento de éguas prévio ao abate e descreveu a aparência histológica de cada trato reprodutivo (VAN CAMP, 1988). Durante

muitos anos, pesquisadores usaram os achados histopatológicos associados com as mudanças macroscópicas como guia para chegar a um diagnóstico apropriado. Então, em 1978, Kenney desenvolveu uma classificação das biopsias endometriais com base na história, exame físico, comportamento, aparência histológica das glândulas, vasos sanguíneos e linfáticos endometriais, magnitude das alterações inflamatórias e fibrose (KENNEY, 1978; VAN CAMP, 1988; REBORDÃO et al., 2014). A partir da classificação, o tecido endometrial saudável pode ser classificado na categoria I, enquanto categorias II e III correspondem à inflamação moderada e grave e fibrose, respectivamente (KENNEY, 1978). Na categoria I, o endométrio não apresenta alterações ou apenas discreta infiltração por neutrófilos e mononucleares e fibrose periglandular focal discreta (Figura 3).

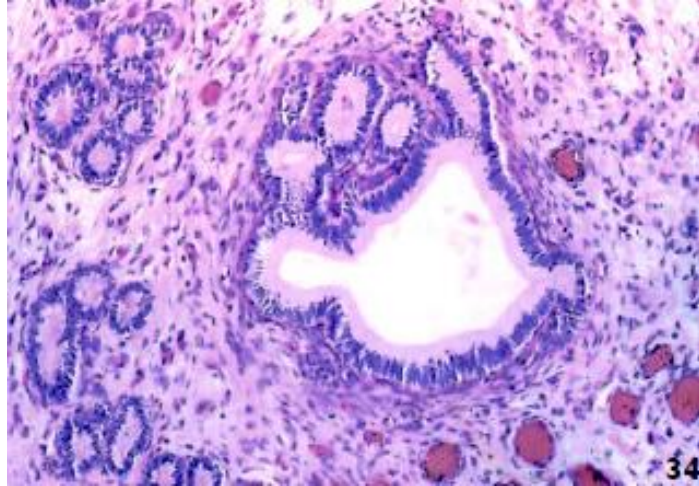
Figura 3. Corte histológico contendo endométrio classificado na categoria I, conforme classificação proposta por Kenney, em 1978.



Fonte: Severo; Masuda, 2009.

A categoria II possui alterações moderadas, como infiltrado mononuclear moderado com ou sem formação de acúmulos linfoides e com a presença de algumas lacunas linfáticas, fibrose focal moderada e atrofia não estacional (Figura 4).

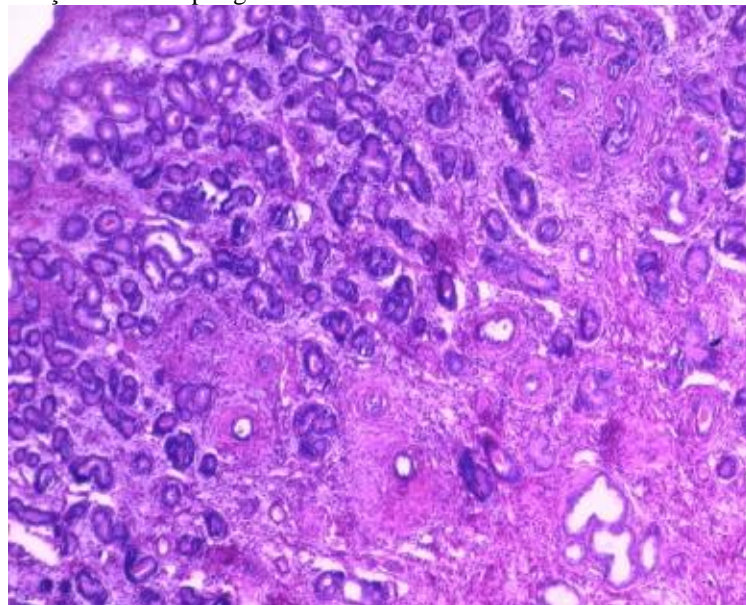
Figura 4. Corte histológico contendo endométrio classificado na categoria II, conforme classificação proposta por Kenney, em 1978. Presença de fibrose endometrial moderada com formação de ninho glandular associado à dilatação de glândula. Há hiperplasia e hipertrofia do epitélio glandular.



Fonte: Severo; Masuda, 2009.

O endométrio da categoria III é aquele com o pior prognóstico, e mostra mudanças severas e irreversíveis no útero (VAN CAMP, 1988), apresenta infiltrado mononuclear difuso acentuado com a formação de acúmulos linfóides, presença de numerosas lacunas linfáticas, fibrose difusa de qualquer intensidade e fibrose acentuada focal com formação de inúmeros ninhos glandulares (Figura 5).

Figura 5. Corte histológico contendo endométrio classificado na categoria III, conforme classificação proposta por Kenney, em 1978. Presença de fibrose periglandular multifocal acentuada.



Fonte: Severo; Masuda, 2009.

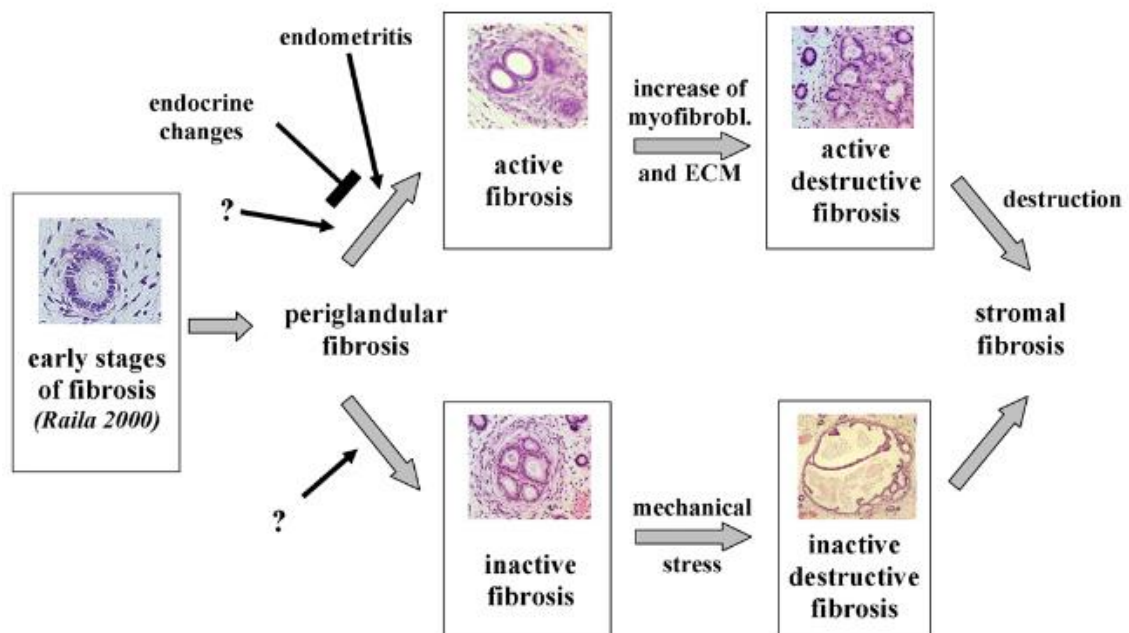
Posteriormente, a categoria II foi dividida em IIA e IIB por Kenney e Doig (1986). Segundo essa classificação, as mudanças inflamatórias para a inclusão na categoria IIA são infiltrações discretas a moderadas difusas no estrato compacto ou focos dispersos e frequentes



no estrato compacto e esponjoso. As alterações fibróticas incluem o envolvimento de ramos glandulares individualmente ou formação de ninhos fibróticos de ramos glandulares de qualquer gravidade. As lacunas linfáticas extensas e palpáveis classificam o endométrio na categoria IIA. Porém, se as lacunas regridem, o endométrio retorna à categoria I. A atrofia parcial do endométrio no final da estação reprodutiva também é classificada em IIA. O endométrio com estes critérios de éguas que apresentaram falhas reprodutivas em dois ou mais anos é colocado na categoria IIB. É importante salientar que as mudanças são aditivas, então se há mais de uma alteração presente, a biopsia é classificada como IIB. Na categoria IIB, as alterações inflamatórias focais e difusas e moderadamente graves são critérios classificatórios. As alterações fibróticas são também mais graves e extensas do que as encontradas na categoria IIA. O envolvimento fibrótico em ramos glandulares individuais nesta categoria é muito difundido e de distribuição uniforme. Se as alterações inflamatórias estiverem presentes em combinação com alterações fibróticas ou linfáticas, o endométrio é classificado na categoria III.

A endometrose, termo proposto por Kenney em 1992 foi classificada, mais recentemente como sendo ativa ou inativa, destrutiva ou não destrutiva (Figura 6) e é uma condição que progride no estroma e entorno das glândulas endometriais. A dissimilaridade entre os estados ativos e inativos se distingue pela morfologia de células estromais envolvidas em focos fibróticos (SCHOON et al., 1992; SCHOON et al., 1997; HOFFMANN et al., 2009a).

Figura 6. Provável patogênese da endometrose ativa e inativa, destrutiva e não destrutiva.



Fonte: Hoffmann et al., 2009.

## 2.5 DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

A biopsia endometrial tem sido um procedimento padrão para avaliação da saúde do útero da égua há várias décadas (RICKETTS; BARRELET, 1997), sendo a maioria das alterações degenerativas típicas da endometrose diagnosticadas apenas através da avaliação histológica de uma biopsia endometrial (KENNEY 1978; KENNEY; DOIG 1986).

### 2.5.1 Biopsia endometrial

A biopsia endometrial é uma técnica relativamente fácil e segura (KENNEY; DOIG, 1986; VAN CAMP, 1988) para avaliar o estado reprodutivo do útero equino (VAN CAMP, 1988).

No decorrer de três décadas Silva (2017) coletou aproximadamente 1.250 amostras uterinas de éguas, das quais cerca de 1% apresentaram alterações severas no endométrio, porém tais éguas possuíam alto valor econômico, tornando a biopsia endometrial uma técnica essencial.

A amostra de tecido obtida através de biopsia deve apresentar, no mínimo, dois milímetros de tamanho para uma análise histopatológica correta. A colheita de amostras do teto e do assoalho de cada corno e corpo uterino seria ideal, porém isto torna-se impraticável devido a assepsia e preparação necessárias para a realização de cada colheita. Além disso, foi demonstrado que uma amostra é representativa do endométrio como um todo (BERGMAN; KENNEY, 1975; BLANCHARD et al., 1987). Entretanto, Fiala et al. (2010) observaram que uma amostra não representa o endométrio inteiro no diagnóstico de mudanças degenerativas. Então, quando detectadas variações em diversas áreas é essencial que uma amostra seja retirada de cada uma delas, além da área uniforme (GROSS; LEBLANC, 1984). Instrumentos apropriados e manuseio do espécime são importantes para minimizar o desenvolvimento de artefatos que possam dificultar a interpretação (KENNEY; DOIG, 1986).

Devido a facilidade de transpassar a cérvix equina, o procedimento pode ser feito durante qualquer estágio do ciclo estral. Durante o diestro é possível determinar a atividade glandular do útero sob a influência da progesterona (KENNEY, 1977). Porém, durante o estro a facilidade de realizar a técnica é maior devido a abertura cervical induzida pela concentração predominante de estrógeno (VAN CAMP, 1988).

Para a realização da biopsia endometrial, a égua deve ser contida como para um exame retal. Durante o manuseio as fezes devem ser removidas do reto e, ao mesmo tempo, o útero

pode ser palpado para identificar possíveis alterações. De forma ordenada, após a limpeza adequada do períneo, a pinça de biopsia estéril (Figura 7) envolta em uma mão enluvada deve ser introduzida na vagina (RICKETTS, 1975).

Figura 7. Pinça de biopsia modelo Yeoman, com 60 centímetros utilizada para colheita de amostras do endométrio equino.



Fonte: arquivo pessoal.

Com a cérvix localizada, o dedo indicador deve ser posicionado na abertura da mesma para orientar a pinça para o interior do lúmen uterino. Após a introdução, de forma gentil, a cérvix deve ser tracionada e a pinça avança pelo útero até que haja resistência; mantendo a pinça em posição, o braço enluvado deve ser retirado da cavidade vaginal e introduzido no reto onde é possível palpar a pinça e posicioná-la de forma a seccionar o tecido. Então, a pinça é aberta e uma fração do endométrio é impelida para dentro das mandíbulas, que seccionam o tecido finalizado a biopsia. Também, para auxiliar na colheita, os autores Merkt e Von Leppel (1970), propuseram uma técnica simples para tracionar a cérvix através do uso da pinça de Albrechtsen, que deve ser introduzida através do espéculo de Polansky modificado, para evitar contaminação do material. Ao retirar a pinça do trato reprodutivo é preciso evitar que o tecido seja contaminado com possíveis sujidades. A amostra é cuidadosamente removida das mandíbulas da pinça com auxílio de uma agulha, e colocada em solução para fixação até o processamento histopatológico. Após a fixação e processamento, o tecido é corado, rotineiramente, com hematoxilina e eosina para leitura das lâminas (RICKETTS, 1975).

## 2.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

O desenvolvimento da biologia molecular proporcionou um dos maiores avanços no domínio das ciências biológicas no final do século passado. A descrição e o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) por Kary Mullis (1983) foram um dos grandes

impulsos em tecnologias moleculares. Grandes avanços ocorreram, na sequência destes impulsos, na investigação científica e no diagnóstico laboratorial, permitindo sequenciar genomas, diagnosticar doenças infecciosas, determinar paternidade, bem como estudar a expressão de genes (VALONES et al., 2009). Uma inovação tecnológica do PCR, denominada PCR em tempo real (qPCR) conquistou espaço por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida em relação ao PCR convencional, a qual apresenta somente resultados qualitativos. De modo geral, o uso de qPCR associado aos critérios morfológicos pode permitir um entendimento mais preciso da patogênese da fibrose endometrial (NOGARE, 2011).

### 2.6.1 PCR em tempo real

A técnica de qPCR é utilizada para muitas finalidades diferentes, particularmente para quantificar ácidos nucleicos e para genotipagem. Desde sua invenção em 1996, o número de pesquisas que utilizam qPCR aumentou quase exponencialmente (WILHELM; PINGOUD, 2003).

A PCR tradicional envolve as etapas de extração do ácido nucleico, amplificação e detecção do produto amplificado. A peculiaridade da qPCR é que o processo de amplificação é monitorado em tempo real usando sondas fluorescentes, liberadas a cada ciclo de amplificação. O sinal gerado pela fluorescência é proporcional a quantidade de produto de PCR gerado a cada ciclo, com isso é possível quantificar os ácidos nucleicos presentes na amostra (HEID et al., 1996).

Existem dois sistemas de quantificação de produto de PCR, os corantes que se ligam a cadeia dupla de DNA e o uso de sondas que são marcadas com corantes. No primeiro sistema, um corante (SYBR Green®) emite fluorescência ao se ligar em cadeias duplas de DNA e a intensidade de fluorescência é proporcional a quantidade de produto de PCR que é gerada. Este sistema é o que possui menor custo, pois, pela sua inespecificidade, o SYBR Green® pode ser utilizado para diversas reações e agentes. A desvantagem é que, ao se ligar de forma inespecífica ao DNA de cadeia dupla, a reação pode gerar um resultado falso-positivo na presença de bandas inespecíficas ou dímeros de *primers*. Essa desvantagem é minimizada pela análise das curvas de dissociação ao final da reação, que são formadas pelas diferenças de temperatura de fusão, conforme a temperatura da reação vai diminuindo. No segundo sistema são utilizadas sondas de oligonucleotídeos marcadas com corantes fluorescentes. Neste sistema, o método mais

utilizado é o Taqman®, no qual adiciona-se uma sonda complementar a um segmento do produto de PCR localizado entre os pares de *primers*. A sonda é marcada por dois corantes fluorescentes, um na região 5' e outro na 3'. Quando os dois corantes estão próximos, ou seja, ligados ao segmento de DNA da amostra, o 3' previne a emissão de fluorescência pelo 5'. No processo de extensão na reação de PCR, a atividade 5' exonuclease da Taq polimerase cliva os nucleotídeos da sonda ligada ao DNA, liberando o 5', permitindo que ele emita fluorescência. A intensidade de fluorescência também é indicativa da quantidade de produto de PCR (HEID et al., 1996; FLORES; CARGNELUTTI, 2012). As vantagens deste sistema é a maior especificidade da reação. Por outro lado, a reação envolvendo sondas é muito mais do que o sistema SYBR Green® (WILHELM; PINGOUD, 2003).

Em qualquer sistema utilizado, o sinal emitido a cada ciclo é captado e quantificado por um software acoplado a um computador. Isso permite o acompanhamento da reação e a visualização do acúmulo dos produtos à medida que são produzidos, isto é, o resultado pode ser obtido antes do final da reação, o que reduz o tempo de execução da técnica (WILHELM; PINGOUD, 2003; FLORES & CARGNELUTTI, 2012).

## 2.7 MARCADORES MOLECULARES

### 2.7.1 $\alpha$ Actina de músculo liso

A actina é uma proteína estrutural globular polimerizada de forma helicoidal para formar um filamento de actina. Estes filamentos desenvolvem o citoesqueleto, uma rede tridimensional dentro de uma célula eucariótica, que fornecem suporte mecânico, determinam a forma e permitem movimentos às células. Nas células musculares desempenham um papel essencial, juntamente com a miosina, na contração muscular, e no citosol, a actina liga-se predominantemente ao ATP. As subunidades individuais são conhecidas como actina globular, enquanto que o polímero filamentososo é conhecido como F-actina (DINUBILE, 1999). As células eucariotas expressam várias isoformas de actina, os mamíferos possuem ao menos seis isoformas, que são divididas em três classes de acordo com seu ponto isoelétrico. As  $\alpha$ -actinas podem ser encontradas no músculo, enquanto que as isoformas  $\beta$  e  $\gamma$  são proeminentes em células não musculares. (DEBIASE et al., 2006). A  $\alpha$  actina de músculo liso é a isoforma que desempenha papel importante na fibrogênese (KAWASAKI et al., 2008), pois correlaciona-se com a ativação de miofibroblastos. A expressão da  $\alpha$  actina de músculo liso é regulada por hormônios, proliferação celular e é alterada em condições patológicas (NAKATANI et al.,

2008). Os miofibroblastos são então capazes de acelerar a cicatrização tecidual através da contração dos bordos da ferida e ao final do processo de cicatrização estas células sofrem apoptose, porém em condições fibróticas este mecanismo falha, levando à persistência dos miofibroblastos e, conseqüentemente, a expansão da matriz extracelular e contração tecidual (DARBY; HEWITSON, 2007). A elevada força contráctil gerada pelos miofibroblastos é benéfica para a remodelação fisiológica do tecido, mas prejudicial para a função dos tecidos quando se torna excessiva.

### **2.7.2 Cluster de diferenciação 147**

O cluster de diferenciação 147 é uma proteína transmembranar de tipo I que pertence à superfamília de imunoglobulinas, identificada originalmente como proteína de superfície tumoral capaz de induzir expressão de metaloproteinases em fibroblastos (BISWAS et al., 1987). Após, determinou-se que era uma glicoproteína transmembranar altamente homóloga com proteínas da superfamília de imunoglobulina (FOSSUM et al., 1991; MIYAUCHI et al., 1991; BISWAS et al., 1995), que foi capaz de induzir a produção de diversas metaloproteinases. Estes resultados levaram a renomeação da proteína para cluster de diferenciação 147 ou indutor de metaloproteinases de matriz extracelular (BISWAS et al., 1995). Embora a expressão elevada de CD147 ocorra em muitos tumores, não está limitada somente a células tumorais (ELLIS et al., 1989). CD147 é uma molécula pleiotrópica crítica no desenvolvimento fetal e de células T tímicas, bem como em muitos processos neurológicos (NARUHASHI et al., 1997). Além disso, é expressa em áreas de remodelação de tecidos, incluindo endométrio, placenta, pele e regiões submetidas a angiogênese; e em células com alta atividade metabólica, tais como linfoblastos, macrófagos e células tumorais. Interage com a caveolina 1, o que reduz sua multimerização e atividade proteica, e sua interação com ciclofilinas promove a quimiotaxia inflamatória de leucócitos e sua expressão na superfície das células. Funcionalmente, sabe-se o CD147 induz o ativador de plasminogênio de tipo uroquinase, fator de crescimento endotelial vascular, hialuronato e metaloproteinases (GABISON et al., 2005; YURCHENKO et al., 2005).

### **2.7.3 Colágeno tipo I**

O colágeno é a proteína mais abundante no organismo de mamíferos e o principal componente dos tecidos conjuntivos. Colágeno tipo I é uma proteína fibrilar que fortalece e serve de sustentação para cartilagens, ossos, tendões, pele e esclera. O gene produz um

componente do colágeno tipo I, designada cadeia pro-alfa 1, que se liga a outra cadeia pro-alfa 1 e uma cadeia pro-alfa 2 para formar uma molécula de pro-colágeno do tipo I. Estas moléculas de pro-colágeno se organizam em fibrilas longas e finas que se reticulam entre si nos espaços em torno das células, estas ligações reticulares resultam na formação de fibras de colágeno tipo I muito resistentes, que tem como função fornecer rigidez e elasticidade as células. O colágeno tipo I já foi associado a desordens como a osteoporose, osteogênese imperfeita e síndrome de Ehlers-Danlos, além de estar presente em diversos processos como o da fibrose (HERNANDEZ et al., 2003; FORLINO; MARINI, 2000; NUYTINCK et al., 2000).

#### **2.7.4 Fator de crescimento do tecido conjuntivo**

O fator de crescimento do tecido conjuntivo é um peptídeo rico em cisteína regulado positivamente durante a fibrogênese, que pode promover a proliferação de fibroblastos, migração, adesão e formação de matriz extracelular, e tem sido implicado na cicatrização de feridas, condrogênese, angiogênese, transdiferenciação e crescimento tumoral. O CTGF possui diversas atividades profibróticas celulares, que incluem o aumento da síntese de colágeno fibrilar e fibronectina, aumentando a secreção de fatores que impedem a degradação da matriz e estimulando a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. As proteínas desta família agem através de integrinas e de proteoglicanos de sulfato de heparina para sinalizar direta e indiretamente a modulação das atividades funcionais de outros ligantes extracelulares, tais como citocinas, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular (LEASK et al., 2009). A expressão elevada de CTGF foi relatada em casos de fibrose pulmonar, hepática e renal. Nas células mesenquimais, o CTGF é responsável pelas atividades profibróticas atribuídas ao TGF- $\beta$  (ALLEN; SPITERI, 2002).

#### **2.7.5 Fator de transformação do crescimento $\beta$ 1**

O fator de transformação do crescimento  $\beta$  foi um dos primeiros fatores profibróticos descritos na literatura sendo, provavelmente, um dos muitos fatores envolvidos na fibrogênese. Este fator, juntamente com ativinas, inibinas, fatores de diferenciação de crescimento e proteínas ósseas morfogenéticas constituem a superfamília de citocinas. Encontra-se em três subtipos, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3, sendo a TGF- $\beta$ 1 importante no controle do crescimento, proliferação, diferenciação, motilidade e apoptose celular (AIHARA et al., 2010). A proteína é encontrada em todo o corpo e desempenha papel no desenvolvimento fetal, formação de vasos

sanguíneos, regulação do tecido muscular, desenvolvimento de tecido adiposo, cicatrização de feridas e possui função no sistema imunológico. TGF $\beta$ -1 é abundante nos tecidos que compõem o esqueleto, onde ajuda a regular o crescimento ósseo e matriz extracelular, além disso, está presente em quantidades elevadas em plaquetas e é produzido tanto por macrófagos como por neutrófilos ativados, os quais estão presentes no início da resposta de reparação. Apresenta-se nos tecidos como uma proteína precursora inativa, quando os tecidos são danificados e precisam ser reparados TGF- $\beta$  é ativado e liberado; este processo envolve diversos fatores, incluindo a plasmina, MMPs e trombospondina 1 (TAYLOR, 2009). Na forma ativa, o fator liga-se aos seus receptores e induz a fosforilação de proteínas intracelulares que sinalizam a transcrição de TGF- $\beta$  no núcleo (Smad) 2 e 3 e proteína morfogenética óssea, que juntas induzem a fosforilação de Smad 1, 5 e 8. Após a ativação, os receptores de Smad formam complexos com Smad 4 e regulam a expressão de genes alvo de TGF- $\beta$ , como fibronectina, colágeno tipo I, inibidor do ativador de plasminogênio 1 e MMP-2 (AIHARA et al., 2010). Normalmente, a liberação de TGF- $\beta$ 1 cessa por mecanismos de resposta quando o processo de cicatrização estiver completo, contudo, se esse mecanismo não for controlado, ocorre acúmulo de matriz extracelular, levando a formação de fibrose tecidual (LAWRENCE, 1995).

### **2.7.6 Molécula de adesão intracelular 1**

A molécula de adesão intracelular 1 é um membro da superfamília de imunoglobulinas, é uma proteína transmembranar que contém um domínio extracelular amino-terminal, um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático carboxi-terminal. (GOTTRAND et al., 2015). A proteína é um tipo de molécula de adesão intercelular presente em baixas concentrações nas membranas de leucócitos e células endoteliais. No endotélio vascular, a ICAM-1 está presente em níveis baixos sob condições normais e a sua expressão é estimulada após ativação das células endoteliais por fator de necrose tumoral  $\alpha$ , interleucina 1, interferon  $\gamma$ , endotoxina e lipossacarídeos (SPRINGER, 1990), além disso, tem importante papel na migração dos leucócitos para os sítios de inflamação, permitindo a forte adesão e a diapedese via interação com seus ligantes (LAWSON et al., 1999). Os ligantes de ICAM-1 são receptores de integrinas do tipo CD11 e CD18 ou CD11b e CD18 encontrados em leucócitos, assim como no fibrinogênio, hialuronato, rinovírus e eritrócitos parasitados por protozoários. Quando ativados, os leucócitos ligam-se às células endoteliais via ICAM-1/integrina e depois transmigram para os tecidos. Também, foi constatado que os níveis de ICAM-1 aparecem



elevados em processos inflamatórios, infecções e em tumores e, em humanos, em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (GEARING; NEWMAN, 1993).

**3   CAPITULO 1**

***mRNA* transcription of fibrosis markers in equine endometrium**

Mariani F. Fiorenza, Janislene M. Trentin, Ricardo O. Schenatto, Kalyne Bertolin, Severo S. Barros, Mara I. B. Rubin

Theriogenology

Fevereiro, 2017

1 mRNA transcription of fibrosis markers in equine endometrium

2  
3 M.F Fiorenza<sup>1\*a</sup>, J.M Trentin<sup>1</sup>, R.O Schenatto<sup>1</sup>, K. Bertolin<sup>2</sup>, S.S Barros<sup>3</sup>, M.I.B Rubin<sup>1</sup>

4  
5 <sup>1</sup> Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal  
6 do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

7 <sup>2</sup> Departamento de Clínica de Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),  
8 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil;

9 <sup>3</sup> Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande  
10 do Sul, Brazil.

11  
12 \* Corresponding author: Laboratório de Embriologia Animal – EMBRYOLAB – Hospital  
13 Veterinário Universitário, Prédio 97, sala 428, Universidade Federal de Santa Maria, Av.  
14 Roraima, 1000 97.105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil; Phone: 55 (55) 3220-  
15 8501; email: marianifiorenza@hotmail.com (M.F. Fiorenza)

16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  

---

<sup>a</sup> Present address: Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal – BIOREP – Hospital Veterinário, prédio 97, sala 409, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil; phone: 55 (55) 3220-8000.

32 **ABSTRACT**

33

34 Evaluation of equine endometrial fibrosis is extremely important because it is a permanent  
35 alteration and contribute for infertility. The aim of the present study was to characterize the  
36 mRNA transcription of the transforming growth factor  $\beta$ 1 (TFG- $\beta$ 1), connective growth factor  
37 (CTGF), type I collagen (COL-I),  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA), intercellular adhesion  
38 molecule 1 (ICAM-1), and cluster of differentiation 147 (CD147) in the equine endometrium  
39 in different degree of fibrosis (group I – healthy endometrium; II – moderated fibrosis; and III  
40 – severe fibrosis). A tissue sample was collected through uterine biopsy and sectioned into two  
41 fragments for histopathological evaluation and validation of target genes by real time PCR  
42 (qPCR). The mares were distributed in group I (n = 11), group II (n = 6) and group III (n = 3).  
43 The means of  $\alpha$ SMA (P = 0.78), COL-I (P = 0.57) and ICAM-1 (P = 0.98) were compared and  
44 had similar results between the groups. The expression of TFG- $\beta$ 1 and CTGF were higher in  
45 group I compared with the group II and III (P = 0.04). In severe fibrosis, CD147 mRNA  
46 transcription was higher compared to the other groups (P = 0.04). In summary, the mRNA  
47 transcription of CD147 may suggest an important role in the fibrosis process, and TGF- $\beta$ 1 and  
48 CTGF expression may play a function in healing process due aggressions in younger mares.

49

50 Key words: mare, endometrosis, expression, *CD147*, *TFG- $\beta$ 1*, *CTGF*.

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

## 66 1. INTRODUCTION

67

68 Degree of endometrial fibrosis evaluation is extremely important because it is a  
69 permanent alteration, and when widespread, becomes one of the main restrictive factors in the  
70 reproductive life of a mare. Female age, repeated endometrial inflammation, multiple gestations  
71 and births were considered as potential etiological factors of endometrial degenerative changes  
72 [1–3]. The equine endometrial fibrosis may contribute to pregnancy miscarriage through  
73 damage of the endometrial surface, delayed placental development, retarded fetal growth rate,  
74 and altered secretion of histotrophs by the endometrium [4,5].

75 However, this problem is evidenced only through uterine biopsy, since this approach  
76 allows the histopathological characterization of the endometrium [1]. The histopathologic  
77 feature is endometrial periglandular fibrosis, lymphocytes, plasma cells and macrophage  
78 infiltration in the endometrium [6]. Through these histological evidence, a classification system  
79 was developed by [7] based on the magnitude of inflammatory changes and periglandular  
80 fibrosis. Healthy endometrium was designated as Category I, while Categories II and III  
81 corresponded to moderate and severe fibrosis, respectively [7].

82 The fibrotic process is a complication of aging, chronic inflammation and  
83 environmental exposure. It is regulated by several factors including interaction with the  
84 extracellular matrix, surface of inflammatory cells, hormones, and a complex network of  
85 profibrotic cytokines [8]. Between the profibrotic cytokines, *CTFG* and *TGF- $\beta$*  are  
86 characteristic markers, due to their capacity to activate collagen [9]. The collagen is synthesized  
87 by stromal cells, and differentiate into myofibroblasts, resulting in periglandular fibrosis [3].

88 Besides these profibrotic cytokines, other cytokines and factors are involved, but the  
89 mechanisms involving the etiology and pathophysiology of endometrial fibrosis are still poorly  
90 understood. Therefore, the hypothesis put forth is that potential markers *Transforming Growth*  
91 *Factor  $\beta$ 1 (TFG- $\beta$ 1)*, *Connective Growth Factor (CTGF)*, *type I collagen (COL-I)*,  *$\alpha$  Smooth*  
92 *Muscle Actin ( $\alpha$ SMA)*, *Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)* and *Cluster of*  
93 *Differentiation 147 (CD147)* can lead to fibrosis in the endometrium, causing fertility problems.  
94 In numerous species, these factors have well known roles in the fibrotic process. The objective  
95 of the present study was to characterize and to compare the mRNA transcription of the three  
96 control genes (*TFG- $\beta$ 1*, *CTGF*, *COL-I*) and three genes known as fibrosis markers in other  
97 organs and species ( *$\alpha$ SMA*, *ICAM-1*, *CD147*) in the equine endometrium during the course of  
98 fibrosis.

99

## 100 1. MATERIAL AND METHODS

101

102 All experimental procedure were approved by the Animal Ethical Committee of the  
103 Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (Protocol nº 5816261015).

104

### 105 *1.1. Animals*

106

107 A total of 50 endometrial biopsies from different breed mares (Crioulo n = 3; Brasileiro  
108 de Hipismo n = 15; Ponei Brasileiro n = 32) ranging from 3 to more than 20 y. o, with known  
109 reproductive history were collected and studied. All samples were taken out of the uterine body  
110 according to as described by [10] and were cut transversely into two slices. The first slice was  
111 fixed in Bouin's solution for histopathological exam. The remaining slice was transferred into  
112 a dnase, rnase, and nuclease free microfuge tube (Kasvi, Canada) to immerge in liquid nitrogen  
113 for mRNA expression analysis. After histopathological examination, twenty biopsies were  
114 chosen due to morphological characteristics of the endometrium, and characteristics of  
115 endometrial differentiation of the estrous cycle as described by [7] for further investigations..  
116 The mares were examined for reproductive soundness, including palpation per rectum,  
117 ultrasonography of the reproductive tract, and speculum examination.

118

### 119 *1.2. Histopathology*

120

121 Endometrial biopsies were fixed in Bouin's solution for 12 hours before several rinses  
122 in 70% ethanol. For the histological procedure, the samples were sent to a pathology laboratory.  
123 After fixation, specimens were dehydrated, and embedded paraffin, sectioned at 4 µm to stained  
124 with hematoxylin and eosin. Biopsy specimens were evaluated according to the pathologist  
125 preference by light microscopy using three different categories of fibrosis [7]. For diagnostic  
126 purposes, the periglandular fibroses or fibrotic glandular nests were distributed into: category  
127 I, normal endometrium or with discrete changes, discrete or moderate neutrophil infiltration,  
128 discrete focal mononuclear infiltration and, no periglandular fibrosis and nets or 1 - 3 layers of  
129 fibrosis; category II, endometria showing more severe changes, moderate mononuclear  
130 infiltration with or without formation of lymphoid accumulations and, presence of some  
131 lymphatic gaps, slight diffuse periglandular fibrosis, with 4 - 6 layers; and category III,  
132 endometrium with severe changes, which significantly interfere in the fertility, diffuse  
133 mononuclear infiltration with presence of lymphoid accumulations and numerous lymphatic

134 gaps, diffuse fibrosis of any intensity and periglandular fibrosis with more than 6 layers. The  
135 mares were distributed into groups according to the category of the biopsy which group I  
136 correspond to grade I, group II to grade II and group III to grade III. Mares classified in group  
137 I that had one to three layers were excluded from the experiment for avoid interference on the  
138 genic expression.

139

### 140 *1.3. RNA extraction, reverse transcription and real-time PCR*

141

142 RNA was extracted using TRIzol® (Invitrogen) according to the manufacturer's  
143 instructions. After spectrophotometric quantification (Thermo Scientific – Waltham USA;  
144 Absorbance 260/280nm ratio), RNA was treated with 0.1U DNase Amplification Grade  
145 (Invitrogen) for 15min at 27°C to digest any contaminating DNA, followed by DNase  
146 inactivation adding 1µl of EDTA at 65°C for 10min. The RNA was converted from 500ng of  
147 total RNA with final volume of 20µl into single-stranded cDNA by adding iScript cDNA  
148 Synthesis kit (BioRad, Hercules, CA) following the manufacturer's instructions.

149 Quantitative polymerase chain reactions (qPCR) were conducted in a CFX384  
150 thermocycler (BioRad) using a final volume of 10ul per well using carboxy-X-rhodamine  
151 (CXR) reference dye, and *Taq* DNA polymerase from GoTaq® qPCR Master Mix (Promega  
152 Corporation), with cDNA (2ul), and equine-specific primers (Table 1). The expression  
153 quantification was made from *CTGF*, *COL-I*, *αSMA*, *CD147*, *TGF-β1* and *ICAM-1*.  
154 Amplification was performed with initial denaturation at 95°C for 5min followed by 40 cycles  
155 of denaturation at 95°C for 15sec and annealing/extension at 60°C for 30sec.

156 To optimize the qPCR assays serial dilutions of cDNA templates were used to generate  
157 a standard curve. Reactions with a coefficient of determination ( $R^2$ ) higher than 0.98, and  
158 efficiency between 85 to 110% were considered. The relative standard curve method was used  
159 to assess the amount of a particular transcript in each sample. The endometrial cells samples  
160 were run in duplicate, and the results are expressed relative to *GAPDH* and *G3PDH*.  
161 *GAPDH/G3PDH* ratio was calculated dividing *GAPDH* mRNA expression by *G3PDH* mRNA  
162 expression. The data were expressed as means and standard deviations ( $M \pm SD$ ) and were tested  
163 using ANOVA. The significance was set at  $P < 0.05$ .

164

## 165 **2. RESULTS**

166

### 167 *2.1. Animals*

168

169 Through the analyses of the estrous cycle stage, reproductive history and endometrial  
 170 category, twenty mares were chosen among the 50, where eleven (55%) were classified in group  
 171 I, six in the group II (30%), and three in group III (15%). All mares categorized in group I were  
 172 in diestrus (n=11); those of group II were in diestrus (n=4) and anestrus (n=2); and those in  
 173 group III were in diestrus (n=2) and anestrus (n=1). The choice of mares at different stages of  
 174 the estrous cycle was due to the low number of females with degree II and III. It was  
 175 demonstrated that mares from category I were younger than categories II and III, as well as had  
 176 lower number of barren years. Mares from category II were older than 17 years old (y.o), except  
 177 one; and all then had two or more barren years. In category III all mares were older than 10 y.o  
 178 and had two or more years open. Information on the mares are summarized in Table 2.

179

180 *2.2. mRNA transcription of selected genes in the equine endometrium depending on*  
 181 *endometrial fibrosis*

182

183 The genes *αSMA*, *COL-1* and *ICAM-1* mRNA transcription was similar between the  
 184 three groups (P=0.78; P=0.57; P=0.98). Even, the expression of *CTGF* and *TGF-β1* were higher  
 185 in endometria without morphological and structural changes (group I) compared to severe cases  
 186 of fibrosis (group III) (P=0.04; Figure 1; Figure 2, respectively). In contrast, mares categorized  
 187 in group III showed higher expression of *CD147* compared to endometria from group I (P=0.04;  
 188 Figure 3). The mRNA transcription means and standard deviation (M±SD) can be visualized in  
 189 table 3.

190

### 191 **3. DISCUSSION**

192

193 In the present study was observed that older mares were categorized into group II and  
 194 III, corroborating with earlier studies [1,2,11–13]. According to [14] the mean age for the mares  
 195 suffering from initial endometrosis (two to three layers of fibrosis) was 15.27 y.o, increasing as  
 196 the degree of fibrosis progresses for 17.07 y.o for intermediate stage and 18.5 y.o for final stage  
 197 of fibrosis. Also, it was reported the expression of six possible fibrotic markers genes in normal  
 198 endometrial tissue compared to fibrotic disorder.

199

200

201

The mRNA expression of *αSMA*, *COL-1* and *ICAM-1* did not differ between the groups. An immunohistochemical study showed that fibroblasts surrounding fibrotic uterine glands had strong immunoreactivity for anti *αSMA* with variable distribution pattern in positive cells.



202  $\alpha$ SMA was also positive around glands that did not appear to be fibrotic by histological  
203 examination, fibrocytes of the stratum compactum, blood vessels and myometrium [13]. Also,  
204 it was demonstrated the COL-I arrangement in fibrotic tissue was like the normal endometrium.  
205 The normal equine endometrium contained COL-I fibers distributed uniformly in the lamina  
206 propria and the arrangement of these fibers were dependent on the stage of the estrous cycle. In  
207 the proliferative phase, COL-I fibers were thick and distributed loosely in the connective tissue.  
208 During the secretory phase, COL-I fibers were tightly packed in all regions of the lamina  
209 propria. However, COL-I did not increase in fibrotic areas in mares that had endometriosis [13],  
210 supporting the present findings. Other work, found that the amount of collagen increased in the  
211 endometrium of mares with endometrial fibrosis [5].

212 In the present study, it was observed both *TGF- $\beta$ 1* and *CTGF* were upregulated in  
213 healthy endometrium; and *CD147* were upregulated in fibrotic tissue. Previous data concerning  
214 the fibrotic process demonstrated an increase in the production and accumulation of  
215 components of the extracellular matrix, leading to a loss of architecture and tissue function [15].  
216 Usually, it is regulated by several factors including interaction with the extracellular matrix,  
217 surface of inflammatory cells, and profibrotic cytokines [8].

218 However, in this study the expression of *TGF- $\beta$ 1* and *CTGF* were higher in healthy  
219 endometria, what may suggest the role of these genes on the healing process. Several groups  
220 support TGF- $\beta$ 1 has an important role in female reproduction and development [16]. Major  
221 functions of TGF- $\beta$  superfamily signaling in the female reproduction included follicular  
222 development ovulation, oocyte competence, decidualization, implantation, embryonic  
223 development, uterine development and pregnancy [16], both maternal and fetal TGF- $\beta$ 1 may  
224 act to maintain pregnancy [17]. The involvement of dysregulated TGF- $\beta$  signaling in  
225 pathological conditions can cause pregnancy loss and fertility problems [16]. Similarly, the  
226 CTGF is widely expressed and has critical roles in embryonic development and the maintenance  
227 of normal cell and connective tissue function. It is also significant for tissue healing, and has  
228 been implicated in common diseases including pulmonary and renal fibrotic process [18].

229 Among the profibrotic cytokines, CTGF and TGF- $\beta$  are the most characteristic markers  
230 in other species and organs, due to their ability to activate collagen [9]. The CTGF potentially  
231 increases fibroblast proliferation, chemotaxis, and extracellular matrix deposition induced by  
232 fibroblasts. In mesenchymal cells, TGF- $\beta$  is primarily responsible for induction of CTGF, and  
233 the prevalent theory is that CTGF is responsible for the pro-fibrotic activities attributed to TGF-  
234  $\beta$  [19]. It is present in the healthy tissue, but also is found in several pathological conditions  
235 including fibrosis [20]. [4] demonstrated in an ELISA assay that equine endometrial tissue

236 concentration of TGF- $\beta$ 1 increased proportionally with the degree of severity of periglandular  
237 fibrosis.

238         Meanwhile, the *CD147* mRNA transcription in equine endometrium increased in the  
239 fibrosis group, demonstrating a new route on the fibrosis formation process. This molecule is  
240 known as extracellular matrix metalloproteinase (MMP) inducer (EMMPRIN). It is a  
241 transmembrane glycoprotein that belongs to immunoglobulin superfamily [21,22], and it was  
242 originally isolated from cancerogenic cells and it stimulated matrix metalloproteinases  
243 production in adjacent normal fibroblasts [22,23]. The CD147 roles can be categorized into  
244 three major areas: cancer, immune system and inflammation [24]. It is thought to contribute to  
245 cell survival, apoptosis, monocarboxylate transporter (MCT) induction, carcinoma metastasis,  
246 and spermatogenesis [25,26]. Relationships with a wide range of binding partners have already  
247 been found, including caveolin, cyclophilin, MCT, and CD147 itself [26,27]. This molecule  
248 can also stimulate mesenchymal cell production of MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, and  
249 MMP-14 [28,29].

250         During the establishment of lung fibrosis, it was shown a high expression levels of  
251 *CD147*, and that it's expression increased along with degree of pulmonary fibrosis.  
252 Furthermore, alveolar macrophages from interstitial and fibrotic lung could produce more  
253 CD147 than from nonfibrotic lung [30]. Throughout fibrogenesis in the liver, *CD147* promoted  
254 the expression, and secretion of vascular endothelial growth factor A (VEGF) via the  
255 phosphoinositide 3 kinase (PI3K)/ protein kinase B (Akt) signaling pathway in hepatocytes,  
256 and upregulated VEGFR2 receptor expression in liver sinusoidal endothelial cells, increasing  
257 their proliferation and migration. Likewise, it has been found that antibodies against CD147  
258 can attenuate the fibrosis progression by inhibiting VEGF A/VEGFR2 mediated angiogenesis  
259 [31]. It may suggest that CD147 has an important role in the fibrosis. These data and from the  
260 present study indicate that in addition to *TGF- $\beta$ 1* and *CTGF* might act as an important  
261 biomarker for healing process, as well as *CD147* may be a fibrosis biomarker. Since the  
262 endometrial fibrosis has an important role on mare fertility, it is required further investigations  
263 on the role of CD147 in endometrial fibrosis and a higher number of mares with severe cases  
264 of endometrosis.

265         In conclusion, this study found that *CD147* is increased in the fibrosis group suggesting  
266 that it may participate in establishment of fibrotic tissue, leading to changes in tissue  
267 architecture, and it can be use as potential target for future therapies to block the evolution of  
268 the fibrotic process. The mRNA transcription of *TGF- $\beta$* , and *CTGF* may suggest their presence  
269 in physiological tissue repairing, that can leading to higher fertility rates in younger mares,

270 however more studies are needed to explain the mechanisms by which these genes are expressed  
271 and regulated.

272

### 273 **Acknowledgements**

274

275 We would like to thank Dr. Glaucia Kommers for her excellent contribution in the  
276 histological interpretation.

277

### 278 **4. REFERENCES**

279

- 280 [1] Doig PA, McKnight JD, Miller RB. The use of endometrial biopsy in the infertile mare.  
281 *Can Vet J = La Rev Vet Can* 1981;22:72–6.
- 282 [2] Ricketts SW, Alonso S. Assessment of the breeding prognosis of mares using paired  
283 endometrial biopsy techniques. *Equine Vet J* 1991;23:185–8. doi:10.1111/j.2042-  
284 3306.1991.tb02751.x.
- 285 [3] Hoffmann C, Ellenberger C, Mattos RC, Aupperle H, Dhein S, Stief B, et al. The equine  
286 endometrosis: New insights into the pathogenesis. *Anim Reprod Sci* 2009;111:261–78.  
287 doi:10.1016/j.anireprosci.2008.03.019.
- 288 [4] Ganjam VK, Evans TJ. Equine endometrial fibrosis correlates with 11 $\beta$ -HSD2, TGF- $\beta$ 1  
289 and ACE activities. *Mol Cell Endocrinol* 2006;248:104–8.  
290 doi:10.1016/j.mce.2005.12.008.
- 291 [5] Evans TJ, Miller MA, Ganjam VK, Niswender KD, Ellersieck MR, Krause WJ, et al.  
292 Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. *Am J Vet Res*  
293 1998;59:1209–14.
- 294 [6] Kenney RM, Ganjam VK. Selected pathological changes of the mare uterus and ovary.  
295 *J Reprod Fertil Suppl* 1975;23:335–9.
- 296 [7] Kenney RM. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by  
297 biopsy, with a note on equine early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc*  
298 1978;172:241–62.
- 299 [8] Atamas SP. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sci* 2002;72:631–43.
- 300 [9] Rebordão MR, Galvão A, Amaral A, Szóstek A, Lukasik K, Piotrowska-Tomala K, et  
301 al. Estrous cycle phases on mare endometrium secretory function and fibrosis markers (   
302 TIMP 1 and TGF-b1 ) after neutrophil extrace traps and cytokines action. 17th Conf.  
303 Eur. Soc. Domest. Anim. Reprod., vol. 48, Bologna: Reproduction in Domestic Animals;

- 304 2013, p. 114.
- 305 [10] Ricketts SW, Sidney S. The Technique and Clinical Application of Endometrial Biopsy  
306 in the Mare. *Equine Vet J* 1975;7:102–8. doi:10.1111/j.2042-3306.1975.tb03243.x.
- 307 [11] Ricketts SW. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the  
308 mare. *J Reprod Fertil Suppl* 1975;1:341–5.
- 309 [12] Troedsson MH, deMoraes MJ, Liu IK. Correlations between histologic endometrial  
310 lesions in mares and clinical response to intrauterine exposure with *Streptococcus*  
311 *zooepidemicus*. *Am J Vet Res* 1993;54:570–2.
- 312 [13] Walter I, Handler J, Reifinger M, Aurich C. Association of endometriosis in horses with  
313 differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix  
314 proteins. *Reproduction* 2001;121:581–6.
- 315 [14] Flores J, Rodríguez A, Sánchez J, Gómez-Cuétara C, Ramiro F. Endometrosis in Mares:  
316 Incidence of Histopathological Alterations. *Reprod Domest Anim* 1995;30:61–5.  
317 doi:10.1111/j.1439-0531.1995.tb00606.x.
- 318 [15] Jones K. Fibrotic Response to Biomaterials and all Associated Sequence of Fibrosis. In:  
319 Badylak S, editor. *Host Response to Biomater. Impact Host Response Biomater. Sel. 1<sup>o</sup>*  
320 *edition, Pittsburgh: Academic Press; 2015, p. 189–237. doi:10.1016/B978-0-12-800196-*  
321 *7.00009-8.*
- 322 [16] Li Q. Transforming growth factor  $\beta$  signaling in uterine development and function. *J*  
323 *Anim Sci Biotechnol* 2014;5:52. doi:10.1186/2049-1891-5-52.
- 324 [17] McLennan IS, Koishi K. Fetal and maternal transforming growth factor-beta 1 may  
325 combine to maintain pregnancy in mice. *Biol Reprod* 2004;70:1614–8.  
326 doi:10.1095/biolreprod.103.026179.
- 327 [18] De Winter P, Leoni P, De Winter P, Leoni P, Abraham D, De Winter P, et al. Connective  
328 tissue growth factor: Structure–function relationships of a mosaic, multifunctional  
329 protein. *Growth Factors* 2008;26:80–91. doi:10.1080/08977190802025602.
- 330 [19] Allen JT, Spiteri MA. Growth factors in idiopathic pulmonary fibrosis: relative roles.  
331 *Respir Res* 2002;3:13.
- 332 [20] Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh H. TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or  
333 TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis:  
334 an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:131–8.  
335 doi:10.1165/ajrcmb.14.2.8630262.
- 336 [21] Ellis SM, Nabeshima K, Biswas C. Monoclonal antibody preparation and purification of  
337 a tumor cell collagenase-stimulatory factor. *Cancer Res* 1989;49:3385–91.

- 338 [22] Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S. EMMPRIN/CD147, an MMP  
339 modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie* 2005;87:361–8.  
340 doi:10.1016/j.biochi.2004.09.023.
- 341 [23] Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, et al. The human  
342 tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of  
343 the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 1995;55:434–9.
- 344 [24] Kosugi T, Maeda K, Sato W, Maruyama S, Kadomatsu K. CD147 (EMMPRIN/Basigin)  
345 in kidney diseases: from an inflammation and immune system viewpoint. *Nephrol Dial  
346 Transplant* 2015;30:1097–103. doi:10.1093/ndt/gfu302.
- 347 [25] Yurchenko V, Constant S, Eisenmesser E, Bukrinsky M. Cyclophilin-CD147  
348 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin Exp Immunol*  
349 2010;160:305–17. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04115.x.
- 350 [26] Kennedy KM, Dewhirst MW. Tumor metabolism of lactate: the influence and  
351 therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Futur Oncol* 2010;6:127–48.  
352 doi:10.2217/fon.09.145.
- 353 [27] Nagaya H, Kosugi T, Maeda-Hori M, Maeda K, Sato Y, Kojima H, et al. CD147/basigin  
354 reflects renal dysfunction in patients with acute kidney injury. *Clin Exp Nephrol*  
355 2014;18:746–54. doi:10.1007/s10157-013-0916-3.
- 356 [28] Lim M, Martinez T, Jablons D, Cameron R, Guo H, Toole B, et al. Tumor-derived  
357 EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase  
358 transcription through MAPK p38. *FEBS Lett* 1998;441:88–92. doi:10.1016/S0014-  
359 5793(98)01474-4.
- 360 [29] Muramatsu T, Miyauchi T. Basigin (CD147): A multifunctional transmembrane protein  
361 involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol  
362 Histopathol* 2003;18:981–7.
- 363 [30] Geng J jie, Zhang K, Chen L na, Miao J lin, Yao M, Ren Y, et al. Enhancement of CD147  
364 on M1 macrophages induces differentiation of Th17 cells in the lung interstitial fibrosis.  
365 *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2014;1842:1770–82.  
366 doi:10.1016/j.bbadis.2014.06.008.
- 367 [31] Yan Z, Qu K, Zhang J, Huang Q, Qu P, Xu X, et al. CD147 promotes liver fibrosis  
368 progression via VEGF-A/VEGFR2 signalling-mediated cross-talk between hepatocytes  
369 and sinusoidal endothelial cells. *Clin Sci (Lond)* 2015;129:699–710.  
370 doi:10.1042/CS20140823.

Table 1. Primer sequences used for real time PCR

Gene	Direction	Sequence (5' – 3')
CTGF	Forward	GACAGCTAGGATGTGTGTTCTC'
CTGF	Reverse	CCACAAGCTGTCCAGTCTAAT
COLI	Forward	CCAAGAAGAAGGCCAAGAAGA
COLI	Reverse	GCCATTGTGCGAGATACAGA
$\alpha$ -SMA	Forward	CGAGCGCAAATACTCTGTCT
$\alpha$ -SMA	Reverse	GCTTCGTCGTACTCCTGTTT
CD147	Forward	TGCTGGCCTGCAAGTCGACC
CD147	Reverse	CGCTGATCTTGTACCAGAACCA
TGF- $\beta$ 1	Forward	CTCTGGACACCAACTACTGTTC
TGF- $\beta$ 1	Reverse	CCAGATCCTTGC GAAAGTCA
ICAM-1	Forward	GACGCCCCCAGAAGCCATCATA
ICAM-1	Reverse	GACCCCCTGCACTTCCTTCTTACTCA
G3PDH	Forward	GGTGGAGCCAAAAGGGTTCAT
G3PDH	Reverse	TTCACGCCCATCACAAACAT
GaPDH	Forward	GGCAAGTTCATGGCACAGT
GaPDH	Reverse	CACAACATATTCAGCACCAGCAT

Table 2. Reproductive status and age of the mares which were used in the mRNA transcription analyzes

Groups	Estrous cycle			Age (years old)				Number of barren years		
	Estrus	Diestrus	Anestrus	3-9	10-16	$\geq 17$	-*	0	1	$\geq 2$
Group I		11		10			1	5	5	1
Group II		4	2	1		5				6
Group III		2	1		1	2				3

-\* no data available.

Table 3. Means and Standard Deviation (M $\pm$ SD) of the genes mRNA transcription in the categories I, II and III.

Groups	M $\pm$ SD genes					
	$\alpha$ SMA	COL-I	CTGF	TGF- $\beta$ 1	ICAM-1	CD147
Group I	2.81 $\pm$ 0,50 (n= 9)	1.45 $\pm$ 0,48 (n= 8)	0.74 $\pm$ 0.42 (n= 7)	1.81 $\pm$ 0.45 (n= 9)	3.08 $\pm$ 1.09 (n= 8)	1.69 $\pm$ 0.19 (n= 8)
Group II	2.80 $\pm$ 1.12 (n= 4)	0.61 $\pm$ 0,60 (n= 4)	0.16 $\pm$ 0.07 (n= 5)	0.68 $\pm$ 0.15 (n= 5)	3.16 $\pm$ 0.97 (n= 4)	2.18 $\pm$ 0.33 (n= 5)
Group III	1.90 $\pm$ 0.68 (n= 2)	1,03 $\pm$ 0,53 (n= 3)	0,04 $\pm$ 0,012 (n= 3)	0.84 $\pm$ 0.16 (n= 3)	2.86 $\pm$ 0.20 (n= 3)	3.20 $\pm$ 0.70 (n= 2)

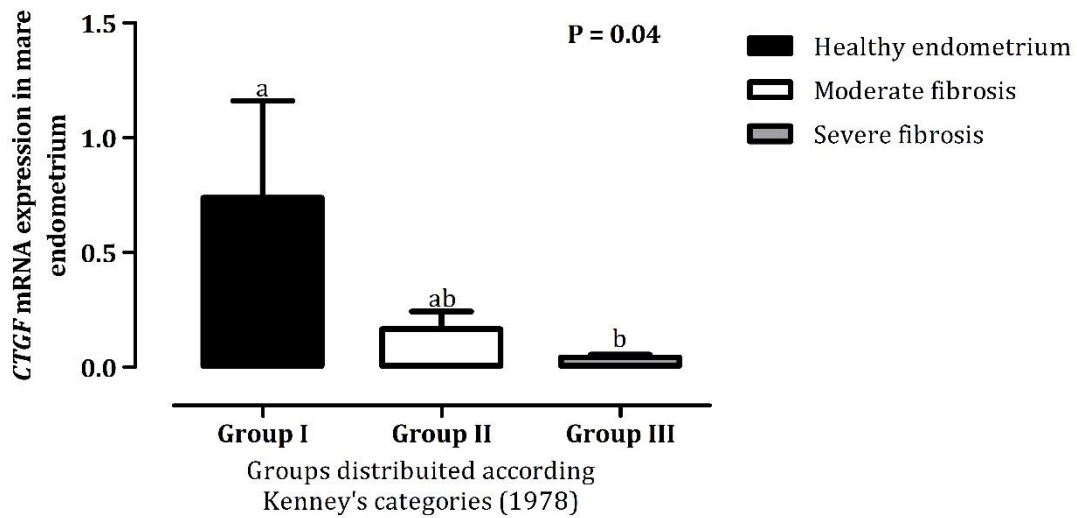


Figure 1. mRNA expression of *CTGF* normalized with *GAPDH* and *G3PDH* during the establishment of fibrosis ( $P=0.04$ ). The group I showed higher expression compared with group III. Letters a and b indicates statistical differences between the groups I, II and III.

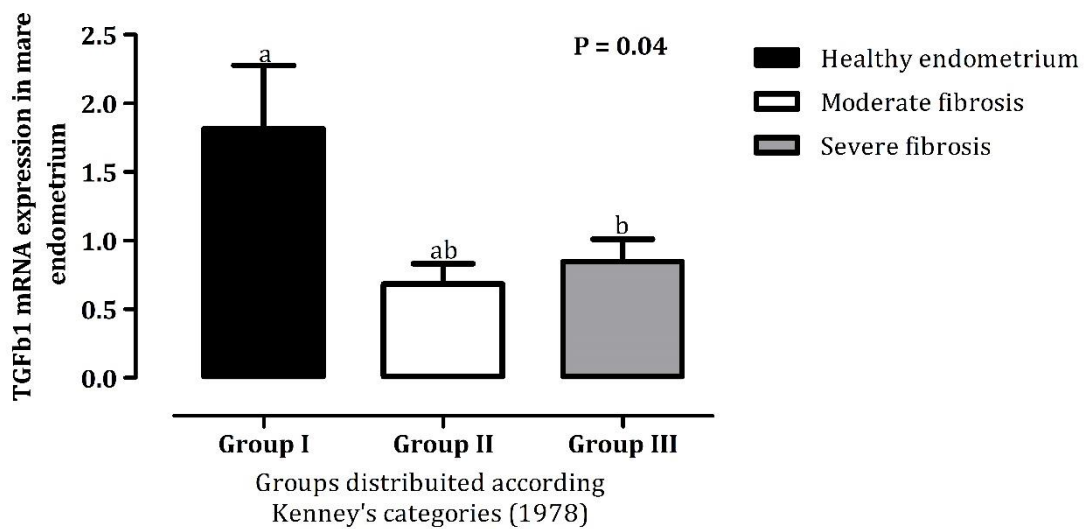


Figure 2. mRNA expression of *TGF-β1* normalized with *GAPDH* and *G3PDH* between the groups I, II and III ( $P=0.04$ ). The group I had higher expression compared with group III. Letters a and b indicates statistical differences between the groups I, II and III.

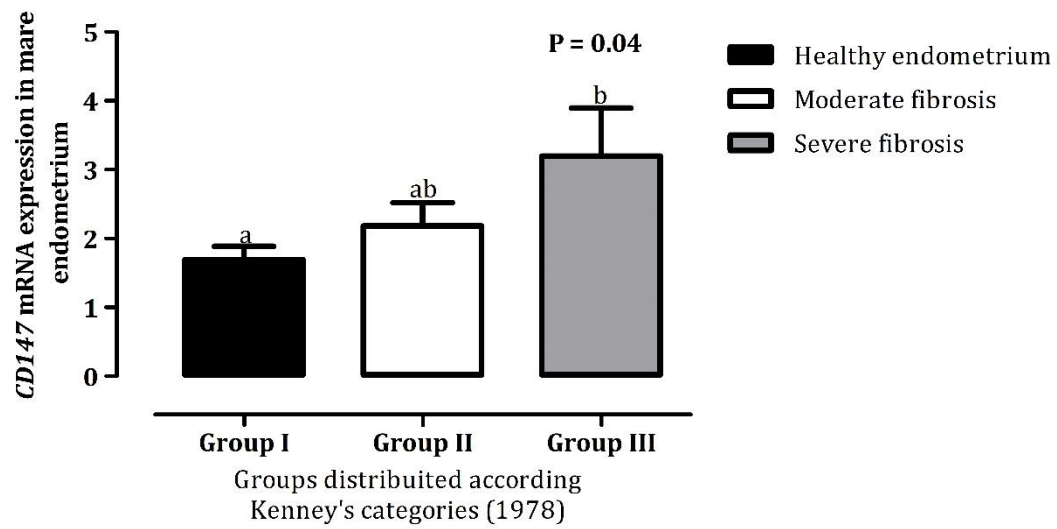


Figure 3. mRNA expression of *CD147* in equine endometrium during establishment fibrosis, normalized with *GAPDH* and *G3PDH* ( $P = 0.04$ ). Group III showed higher expression compared with group I. Letters a and b indicates differences between the groups I, II and III.



## HIGHLIGHTS

Healthy endometria have higher expression of *TGF- $\beta$ 1* and *CTGF* in response in aggression factor, like pregnancy and parturition;

The expression of *CD147* can be used as a marker or target for treatment in severe cases of fibrosis;

Mares with higher degrees of fibrosis have lower prognostic for reproduction.

#### 4 CONCLUSÕES

Dos seis genes testados, somente *CD147* apresentou aumento na expressão na fibrose endometrial severa; *ICAM-1*,  *$\alpha$ SMA* e *COL-1* não apresentaram diferença estatística entre os três grupos; *CTGF* e *TGF- $\beta$ 1* tiveram maior expressão no endométrio saudável, além do mais, éguas mais jovens foram categorizadas no grupo I e II, o que pode explicar a maior expressão de *CTGF* e *TGF- $\beta$ 1* nestes grupos. Assim, considera-se que a expressão positiva de *CD147* na fibrose pode ser um dos fatores que contribuem para o estabelecimento deste processo. Estudos adicionais podem ser realizados para melhor entender os resultados da expressão de *CD147*,  *$\alpha$ SMA*, *COL-1*, *CTGF*, *ICAM-1* e *TGF- $\beta$ 1*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIHARA, K. *et al.* Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 as a Common Target Molecule for Development of Cardiovascular Diseases, Renal Insufficiency and Metabolic Syndrome. **Cardiology Research and Practice**, Londres, v. 2011, p. 1-9, dez. 2010.

ALLEN, J.T.; SPITERI, M. A. Growth factors in idiopathic pulmonary fibrosis: relative roles. **Respiratory Research**, [S.I.], v. 3, n. 1, p. 13-22, nov. 2002.

ATAMAS, S. P. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. **Life Science**, [S.I.], v. 72, p. 631–643, dez. 2002.

BARROS, S. S.; MASUDA, E. K. **Biopsia endometrial na égua**. Diagnóstico e prognóstico. 1. ed., Santa Maria, [s.n.]. 2009.

BARTOL, F. F. *et al.* Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility. **Reproduction and Fertility Supplement**, Teddington, v. 54, p. 287–302, fev. 1999.

BERGMAN, R. V.; KENNEY, R. M. Representativeness of a uterine biopsy in the mare. *In*: Proceedings of American Association of Equine Practitioners, [S.I.], v. 21. p. 355-362, 1975.

BISWAS, C. *et al.* The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 55, p. 434–439, jan. 1995.

BISWAS, C.; NUGENT, M. A. Membrane association of collagenase stimulatory factor(s) from B-16 melanoma cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S.I.], v. 35, p. 247–258, nov. 1987.

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

BUCZKOWSKA, J. *et al.* Endometrosis – significance for horse reproduction, pathogenesis, diagnosis, and proposed therapeutic methods. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, Olsztyn, v. 17, n. 3, p. 547–554, 2014.

BRACHER, V.; MATHIAS, S.; ALLEN, W. R. Influence of chronic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 28, n. 3, p. 180-188, 1996.

CAMOZZATO, G. C. **Resposta inflamatória em éguas após inoculação intrauterina de três diferentes cepas de *Escherichia coli***. 2014. 60 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

CHAMBERS, R. C. Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention? **British Journal of Pharmacology**, Londres, v. 153, p. 367–378, mar. 2008.

DARBY, I. A.; HEWITSON, T. D. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. **International Review of Cytology**, [S.l.], v. 257, p. 143-179, 2007.

DEBIASE, P. J. *et al.* Laminin-311 (Laminin-6) fiber assembly by type I-like alveolar cells. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Thousand Oaks, v. 54, n. 6, p. 665-672, jun. 2006.

DINUBILE, M. J. Erythrocyte membrane fractions contain free barbed filament ends despite sufficient concentrations of retained capper(s) to prevent barbed end growth. **Cytoskeleton**, Hoboken, v. 43, n. 1, p. 10-22, mai. 1999.

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

ELLIS, S. M.; NABESHIMA K.; BISWAS, C. Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 49, p. 3385–3391, jun. 1989.

EVANS, T. J.; MILLER, M. A.; GANJAM, V. K. Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 59, p. 1209-1214, out. 1998.

FIALA, S. M. *et al.* Endometrial fibrotic changes. Is one biopsy enough to diagnose degenerative changes? **Animal Reproduction Science**, [S.l.], v. 121, p. 89–90, jun. 2010.

FLORES, E. F; CARGNELUTTI, J. F. Diagnóstico laboratorial de infecções víricas. *In*: FLORES, Eduardo Furtado (Org.). **Virologia Veterinária**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2012. p. 325-366.

FORLINO, A.; MARINI, J.C. Osteogenesis imperfecta: prospects for molecular therapeutics. **Molecular Genetics and Metabolism**, [S.l.], v. 71, p. 225–32, set. 2000.

FOSSUM, S.; MALLETT, S.; BARCLAY, A. N. The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. **European Journal Immunology**, Weinheim, v. 21, p. 671–679, mar. 1991.

FOSTER R. Female reproductive system and mammary gland. *In*: ZACHARY, James; MCGAVIN, Donald. **Pathologic Basis of veterinary disease**. 5. ed. St. Louis: Elsevier, 2012. p. 1085-1126.

FUMUSO E. *et al.* Endometrial IL-1b, IL-6 and TNF- $\alpha$ , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 96, p. 31-41, nov. 2003.

GABISON, E. E. *et al.* EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. **Biochimie**, [S.I], v. 87, p. 361–368, mar. 2005.

GANJAM, V. K.; EVANS, T. J. Equine endometrial fibrosis correlates with 11 $\beta$ -HSD2, TGF- $\beta$ 1 and ACE activities. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 248, p. 104-108, mar. 2006.

GEARING, A. J. H.; NEWMAN, W. Circulating adhesion molecules in disease. **Immunology Today**, [S.I], v. 14, p. 506-512, out. 1993.

GOTTRAND, G. *et al.* Regulatory T-cell development and function are impaired in mice lacking membrane expression of full length intercellular adhesion molecule-1. **Immunology**, [S.I], v. 146, p. 657-670, set. 2015.

GROSS, T. L.; LEBLANC, M. M. Seasonal variation of histomorphologic features of equine endometrium. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 184, n. 11, p. 1379-1382, jun. 1984.

HEID, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K.J., WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Hinxton, v. 6, p. 986-994, 1996.

HERNANDEZ, D. A. Influence of polymorphisms in VDR and COLIA1 genes on the risk of osteoporotic fractures in aged men. **Kidney International Supplement**, [S.I], v. 63, s. 85, p. 14–18, jun. 2003.

HOFFMANN, C. *et al.* The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. **Animal Reproduction Science**, [S.I], v. 111, p. 261–278, abr. 2009a.

HOFFMANN, C. *et al.* Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: Expression patterns for mares suffering from endometrosis. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 264–274, jan. 2009b.

HOFFMANN, C. *et al.* Morpho-functional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions: preliminary results. **Journal Pferdeheilkunde**, Baden-Baden, v.19, p. 666-669, nov. 2003.

JONES, K. Fibrotic response to biomaterials and all associated sequence of fibrosis. *In*: BADYLAK Stephen (Ed.). **Host Response to Biomaterials: The Impact of Host Response on Biomaterial Selection**. 1. ed. [S.I]: Academics Press, 2015. p. 189-237.

KENNEY, R. M.; DOIG P. A., 1986. Equine endometrial biopsy. *In*: MORROW, David (Ed.). **Current Therapy in Theriogenology**. Philadelphia: Saunders, 1986. p. 723–729.

KENNEY, R.M. Clinical aspects of endometrial biopsy in fertility evaluation of the mare. *In*: Proceedings of American Association of Equine Practitioners, [S.I], p. 105-122, 1977.

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

KENNEY, R.M. The aetiology, diagnosis, and classification of chronic degenerative endometritis. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 125, p. 186, 1992.

LAWRENCE, D. A. Transforming growth factor- beta: An overview. **Kidney International Supplement**, [S.I], v. 49, p. 19-23, 1995.

LAWSON, C. *et al.* Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor- $\kappa$ B-independent mechanism. **Journal of Immunology**, Rockville, v. 162, p. 2990-2996, mar. 1999.

LEASK, A. *et al.* Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? **Journal of Cell Communication and Signaling**, Amsterdam, v. 3, p. 89-94, jan. 2009.

LEHMANN, J. *et al.* Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 76, p. 1326–1336, 2011.

LIND, G.; LINSMEIER, E.; SCHOUENBORG, J. C. The density difference between tissue and neural probes is a key factor for glial scarring. **Scientific Reports**, Londres, v. 3, p. 1-7, out. 2013.

MASSENO, A. P. B. **Avaliação da fibrose endometrial e dos miofibroblastos nas endometroses ativa e inativa das éguas.** 2012. 95 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

MASSENO, A. P. B. **Caracterização imunoistoquímica dos miofibroblastos endometriais e da expressão de MMP-2 nas endometrites crônicas das éguas.** 2009. 95 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

MERKT, H., VON LEPPPEL, J.F. Die Entnahme von Proben für die bakteriologische Untersuchung des Genitalsekretes der Stute, ihre Beurteilung sowie Behandlungshinweise. **Deutsch Tierärztliche Wochenschrift**, Alfeld, v. 77, p. 489–528, 1970.

MIYAUCHI, T.; MASUZAWA, Y.; MURAMATSU, T. The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen. **The Journal of Biochemistry**, Tóquio, v. 110, p. 770–774, nov. 1991.

MULLIS, K. Polymerase Chain Reaction. 1983. Disponível em: <<http://www.karymullis.com/pcr.shtml>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

NAKATANI, T. *et al.* Effects of decorin on the expression of alpha-smooth muscle actin in a human myofibroblast cell line. **Molecular and Cellular Biochemistry**, New York, v. 308, n. 1, p. 201-207, jan. 2008.

NARUHASHI, K. *et al.* Abnormalities of sensory and memory functions in mice lacking Bsg gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 236, p. 733–737, ago. 1997.

NOGARE A.L. **Correlações moleculares da fibrose intersticial e atrofia tubular de aloenxertos renais humanos**. 2011. 84 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011

NUYTINCK, L. *et al.* Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen. **American Journal of Human Genetics**, [S.I.], v. 66, n. 4, p. 1398–1402, abr. 2000.

OGA, T. *et al.* Prostaglandin F(2alpha) receptor signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of transforming growth factor-beta. **Nature medicine**, Londres, v. 15, p. 1426–1430, 2009.

REBORDÃO, M. R. *et al.* Estrous cycle phases on mare endometrium secretory function and fibrosis markers (TIMP 1 and TGFb1) after neutrophil extracellular traps and cytokines action. *In*: Conference of European Society for Domestic Animal Reproduction, Bologna. **Resumos**. Bologna: Reproduction in Domestic Animals, p. 114, 2013a.

REBORDÃO, M. R. *et al.* Neutrophil extracellular traps and cytokines on mare endometrium prostaglandins and fibrosis markers TIMP and TGFβ1. *In*: Joint German-Polish Conference on Reproductive Medicine, 2., Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction, 46., Gdansk. **Resumos**, p. 54, 2013b.

REBORDÃO, M. R. *et al.* What is new on the physiopathology of endometrosis in the mare? **Journal Pferdeheilkunde**, Baden-Baden, v.30, p. 15-18, fev. 2014.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, Basel, v. 49, p. 35-43, ago. 2012.

RICKETTS, S. W. The technique and clinical application of endometrial biopsy in the mare. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 7, p. 102-108, abr. 1975.

RICKETTS, S. W.; ALONSO, S. Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 23, p. 185-188, mai. 1991.

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

- ROSSDALE, P. D.; OUSEY, J. C. Fetal programming for athletic performance in the horse: potential effects of IUGR. **Equine Veterinart Education**, Newmarket v.15, p. 24-37, 2003.
- SCHOON, H. A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Die Endometriumbiopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. **Journal Pferdeheilkunde**, Baden-Baden, v. 13, p. 453-464, out. 1997.
- SCHOON, H. A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Zur Pathogenese und Prognose der Endometrose der Stute. **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft**, Bad Nauheim, v. 21, p. 273-282, 1995.
- SEABORN, E. The oestrus cycle in the mare and some associated phenomena. **The Anatomical Record**, Salt Lake City, v. 30, p. 277-287, fev. 1925.
- SILVA, C. A. M. Análise retrospectiva de biopsias endometriais de éguas coletadas durante três décadas. Santa Maria, 2017. Dados não publicados.
- SILVA, C. A. M.; BARROS, S. S.; ESQUERRE, R. A. A biopsia endometrial na avaliação da fertilidade da égua. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 7, p. 131-133, 1987.
- SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, Londres, v. 346, p. 425-434, ago. 1990.
- SZÓSTEK, A. Z. *et al.* Impairment of the interleukin system in equine endometrium in the course of endometrosis. **Biology of Reproduction**, Washington, v. 89, p. 1-13, out. 2013.
- SZÓSTEK, A. Z. *et al.* mRNA transcription of prostaglandin synthases and their products in the equine endometrium in the course of fibrosis. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 78, p. 768-776, set. 2012.
- TAYLOR, A. W. Review of the activation of TGF- $\beta$  in immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, [S.I.], v. 85, n. 1, p. 29-33, ago. 2009.
- VALONES, M. A. A. *et al.* Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A Review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 1-11, 2009.
- VAN CAMP, S.D. Endometrial biopsy of the mare: A review and update. **The Veterinary Clinics of North America**, Philadelphia, v. 4, p. 229-245, ago. 1988.
- VOSS, J. L. Intrauterine infection in mares. *In*: Proceedings of the Symposium on Mare Infertility. Western States Veterinary Conference, Las Vegas, p. 5-7, 1984.
- WALTER, I. *et al.* Association of endometrosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins, **Reproduction**, Cambridge, v. 121, p. 581-586, mai. 2001.



WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Review**, Londres, v. 10, p. 57-63, jan. 2009.

WILHELM, J., PINGOUD, A. Real-Time Polymerase Chain Reaction. **ChemBioChem**, Weinheim, v.4, p. 1120-1128, 2003

WILSHER, S.; ALLEN, W. R. The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 35, n. 5, p. 476-483, jul. 2003

YANG, D.; JONES, K.S. Effect of alginate on innate immune activation of macrophages. **Journal of Biomedical Materials Research**, Cleveland, v. 90, p. 411-418, ago. 2009.

YURCHENKO, V. et al. Regulation of CD147 cell surface expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 280, p. 17013–17019, 2005.