

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO**

**LIO MOREIRA**

**ADENOMIOSE UTERINA EM VACAS: IMUNOISTOQUÍMICA PARA  
RECEPTORES-  $\alpha$  DE ESTRÓGENO E RECEPTORES DE  
PROGESTERONA, METALOPROTEINASE DA MATRIZ-2 E INIBIDOR  
TECIDUAL DE METALOPROTEINASE-2**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ**

**2009**

**LIO MOREIRA**

**ADENOMIOSE UTERINA EM VACAS: IMUNOISTOQUÍMICA PARA  
RECEPTORES- $\alpha$  DE ESTRÓGENO E RECEPTORES DE  
PROGESTERONA, METALOPROTEINASE DA MATRIZ-2 E INIBIDOR  
TECIDUAL DE METALOPROTEINASE-2**

**Tese apresentada ao Centro de  
Ciências e Tecnologias  
Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense  
Darcy Ribeiro, como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
Doutor em Ciência Animal, na  
área de Sanidade Animal, subárea  
Patologia Animal.**

**Orientador: Prof. Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho**

**Co-orientador: Prof<sup>a</sup> Maria Clara Caldas Bussiere**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
2009**

**LIO MOREIRA**

**ADENOMIOSE UTERINA EM VACAS: IMUNOISTOQUÍMICA PARA  
RECEPTORES- $\alpha$  DE ESTRÓGENO E RECEPTORES DE PROGESTERONA,  
METALOPROTEINASE DA MATRIZ-2 E INIBIDOR TECIDUAL DE  
METALOPROTEINASE-2.**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de Sanidade Animal, subárea Patologia Animal.

Aprovada em: 26 de janeiro de 2009

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Marcelo Rezende Luz (Doutor, Reprodução Animal) - UFES**

---

**Prof<sup>a</sup>. María Luisa López Alvarez (Doutora, Biologia da Reprodução) - UENF**

---

**Prof<sup>a</sup>. Maria Clara Caldas Bussiere (Doutora, Fisiologia) - UENF  
(Co-orientadora)**

---

**Prof. Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho (Doutor, Patologia Animal) - UENF  
(orientador)**

**Às minhas muito queridas,  
Iara e Luiza, razão do meu viver**

**Ao Eulógio,  
Eterno Mestre, representação sublime da  
amizade e do professor**

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e mentores espirituais;

Às queridas Iara e Luiza estimuladoras do meu viver;

Ao amigo Eulógio, pessoa essencial não só em minha formação profissional, como moral;

À amiga Maria Clara, grande pensadora e incentivadora do meu senso crítico;

A todos os professores que participaram da minha formação, sem eles não chegaria nesta etapa;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, FAPERJ, CAPES e CNPq, pela confiança depositada em minhas idéias;

Aos técnicos do Setor de Morfologia e Anatomia Patológica pelo apoio incondicional;

Aos amigos e familiares, sempre preenchendo de alegrias a minha vida, nos bons e maus momentos.

**“Os elogios são incentivos dos amigos para que eu venha a ser o que ainda não sou...”.**  
**(Francisco Cândido Xavier)**

## RESUMO

Avaliou-se em úteros de vacas normais e com adenomiose a expressão de receptores- $\alpha$  de estrógeno (RE- $\alpha$ ), receptores de progesterona (RP), metaloproteinases da matriz-2 (MMP-2) e inibidores teciduais de metaloproteinases-2 (TIMP-2). Amostras uterinas foram colhidas do terço-médio de um dos cornos uterinos e divididas de acordo com as fases folicular e lútea (inicial e média) e grau de adenomiose (superficial e profunda). Seções teciduais (4 $\mu$ m) foram incubadas com anticorpo primário anti-RE- $\alpha$  e anti-RP (n=62); anti-MMP-2 e anti-TIMP-2 (n=58), que foram evidenciados pelo método biotina-estreptoavidina-peroxidase-DAB. As intensidades de imunomarcação foram avaliadas no epitélio luminal, glândulas, estroma e capilares endometriais, miométrio, endométrio infiltrado no miométrio (glândulas e estroma), vasos miometriais (túnica média e endotélio) e limite endometriometrial, por microscopia óptica de luz branca. Na fase folicular os RE $\alpha$  foram mais intensamente expressos nas seções uterinas com adenomiose superficial e profunda, e o mesmo ocorreu com os RP, em menor intensidade. Na fase lútea inicial, os RE $\alpha$  foram menos intensamente expressos, no entanto os RP revelaram ser mais intensamente expressos em seções normais, contudo no estroma profundo não havia imunomarcação. Essa diferença se pronunciou na fase lútea média, que mostrou um perfil mais diferenciado, com pico de expressão para RE- $\alpha$  em algumas estruturas teciduais, mas notadamente nas glândulas e estroma endometriais (p<0,05). A expressão de MMP-2 na fase folicular foi mais elevada nas amostras com adenomiose profunda, quando comparada com as seções normais e com adenomiose superficial, exibindo médias de reatividade elevadas no epitélio superficial, vasos miometriais, miométrio adjacente ao foco adenomiótico e limite endometriometrial (P<0,05). Além disso, a expressão de MMP-2 foi maior do que a de TIMP-2 em quase todas as estruturas uterinas, nos casos de adenomiose profunda (exceto nos vasos endometriais e miometriais e limite endometriometrial, P>0,05). O inverso foi encontrado nas seções uterinas normais e com adenomiose superficial, onde a expressão de TIMP-2 excedeu a de MMP-2, na fase folicular. O modo de expressão de MMP-2 e TIMP-2 na fase lútea inicial não seguiu o mesmo padrão da fase folicular, ao contrário, a reatividade de imunomarcação foi mais elevada para

TIMP-2 na maioria das estruturas, enquanto que na fase lútea média, a expressão de MMP-2 voltou a se elevar e as de TIMP-2 continuaram elevadas, principalmente nos espécimes com adenomiose. Concluiu-se que úteros de vacas acometidos por adenomiose exibem uma expressão diferenciada de RE- $\alpha$ , RP, MMP-2 e TIMP-2, e estes podem ser usados como biomarcadores, refletindo de um endométrio disfuncional.

Palavras-chave: adenomiose, imunoistoquímica, úteros, vacas



## ABSTRACT

The present report cell type- and location-specific distribution patterns of estrogen receptor alpha (ER- $\alpha$ ), progesterone receptor (PR), matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases-2 (TIMP-2) were examined in the normal bovine uteri and with adenomyosis by immunohistochemistry. The uterine samples of cows were taken from the medial third from one of the uterine horns, and grouped according to the phase of the estrous cycle (follicular and initial and middle luteal) and degree of adenomyosis (superficial and deep). Tissue sections (4 $\mu$ m) were incubated with first monoclonal antibody for ER- $\alpha$  and PR (n=62), and for MMP-2 and TIMP-2 (n=58). Staining intensities were evaluated in the luminal epithelium, endometrial stroma, endometrial capillaries and glands, endometrial tissue infiltrated in the myometrium (stroma and glands), endometrial-myometrial border, myometrium, myometrial vessels (Middle tunic and endothelium) by light microscopy. In follicular phase, the expression of ER $\alpha$  was higher than PR, in the tissue sections with superficial and deep adenomyosis. The initial and middle luteal phases, the reactivity was higher to ER- $\alpha$  than PR in the sections with adenomyosis, mainly in the endometrial stroma and glands cells (p<0,05). The expression of MMP-2, in follicular phase, was higher in samples with deep adenomyosis in comparison with normal and superficial adenomyosis tissue sections, showing increase reactivated average in superficial endometrium, myometrial vessels, myometrium adjacent to adenomyotic focus and endometrial-myometrial border (P<0,05). Beyond, in the deep adenomyosis samples, the expression of MMP-2 was higher than TIMP-2 in almost whole uterine structures analyzed (with exception in the endometrial and myometrial vessels and endometrial-myometrial border). The inverse occurred in normal and adenomyosis superficial specimens, and in follicular phase, the TIMP-2 expression was higher than MMP-2. The pattern of MMP-2 and TIMP-2 expression in luteal phase did not follow the same pattern of follicular phase, on the other hand, the immunostaining reactive, in almost whole tissue structures, was high to TIMP-2, while in middle luteal phase, the expression of MMP-2 came to increase, and the TIMP-2 expression continued high, mainly in tissue sections with deep adenomyosis. The report showed that RE- $\alpha$ , PR, MMP-2 and TIPM-2 were discoordinate in uteri with adenomyosis, and could be reflecting in disorders of the window implantation.

Beyond, the adenomyosis in cows can be considered an estrogen-dependent disease, like in women. The profiles of MMP-2 and TIMP-2 expression are increased in deep adenomyosis, and a differential pattern of expression of these molecules was observed in cow's uteri with superficial and deep adenomyosis.

Keywords: adenomyosis, immunohistochemistry, uterus, cow

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>ARTIGO I</b> .....	53
<b>Figura 1.</b> Útero de vaca. Adenomiose .....	57
<b>Figura 2.</b> Porcentagem de ocorrência de adenomiose de acordo com a fase do ciclo estral de fêmeas bovinas abatidas em matadouros .....	59
<b>ARTIGO II</b> .....	65
<b>Figura 1.</b> Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunohistoquímica para receptores $\alpha$ de estrógeno e receptores de progesterona em úteros bovinos normais e com adenomiose do tipo superficial e profunda na fase folicular .....	77
<b>Figura 2.</b> Prancha. Fotomicrografia (COOLPIX 995-Nikon) de seções uterinas de vacas/imunohistoquímica .....	79
<b>ARTIGO III</b> .....	81
<b>Figura 1.</b> Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunohistoquímica para Metaloproteinase da matriz 2 e Inibidor de metaloproteinase 2 em úteros bovinos normais e com adenomiose do tipo superficial e profunda nas fases Folicular (A) e lúteas Inicial (B) e média (C) .....	96
<b>Figura 2.</b> Prancha. Vaca/útero/imunohistoquímica-DAB/contracoloração Hematoxilina.....	98
<b>ANEXO</b> .....	103
<b>Figura 1.</b> Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunohistoquímica para receptores $\alpha$ de estrógeno e receptores de progesterona em úteros bovinos normais e com adenomiose do tipo superficial e profunda na fase folicular .....	107
<b>Figura 2.</b> Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunohistoquímica para receptores $\alpha$ de estrógeno e receptores de progesterona em úteros bovinos normais e com adenomiose do tipo superficial e profunda na fase lútea inicial.....	108

<b>Figura 3.</b> Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunoistoquímica para receptores $\alpha$ de estrógeno e receptores de progesterona em úteros bovinos normais e com adenomiose do tipo superficial e profunda na fase lútea média.....	109
<b>Figura 4.</b> Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunoistoquímica para Metaloproteinase da matriz 2 e Inibidor de metaloproteinase 2 em úteros bovinos normais e com adenomiose do tipo superficial e profunda na fase Folicular.....	113
<b>Figura 5.</b> Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunoistoquímica para Metaloproteinase da matriz 2 e Inibidor de metaloproteinase 2 em úteros bovinos normais e com adenomiose do tipo superficial e profunda na fase lútea inicial.....	114
<b>Figura 6.</b> Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunoistoquímica para Metaloproteinase da matriz 2 e Inibidor de metaloproteinase 2 em úteros bovinos normais e com adenomiose do tipo superficial e profunda na fase lútea média.....	115

## LISTA DE TABELAS

<b>ARTIGO I</b> .....	53
<b>Tabela 1.</b> Freqüência de adenomiose segundo o ciclo estral em fêmeas bovinas abatidas em matadouros.....	58
<b>ARTIGO II</b> .....	65
<b>Tabela 1.</b> Distribuição imunoistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcacão para RE- $\alpha$ e RP em úteros bovinos normais e com adenomiose superficial e profunda nas fases do ciclo estral .....	78
<b>ARTIGO III</b> .....	81
<b>Tabela 1.</b> Distribuição imunoistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcacão para MMP-2 e TIMP-2 em úteros bovinos normais e com adenomiose superficial e profunda na fase folicular e lútea do ciclo estral .....	97
<b>ANEXO</b> .....	103
<b>Tabela 1.</b> Distribuição imunoistoquímica das intensidades de imunomarcacão para RE- $\alpha$ e RP em úteros bovinos normais durante as fases do ciclo estral.....	104
<b>Tabela 2.</b> Distribuição imunoistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcacão para RE- $\alpha$ e RP em úteros bovinos com adenomiose superficial durante as fases do ciclo estral.....	105
<b>Tabela 3.</b> Distribuição imunoistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcacão para RE- $\alpha$ e RP em úteros bovinos com adenomiose profunda durante as fases do ciclo estral .....	110
<b>Tabela 4.</b> Distribuição imunoistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcacão para MMP-2 e TIMP-2 em úteros bovinos normais na fase folicular e lútea do ciclo estral .....	111
<b>Tabela 5.</b> Distribuição imunoistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcacão para MMP-2 e TIMP-2 em úteros bovinos com adenomiose do tipo superficial na fase folicular e lútea do ciclo estral.....	112

<b>Tabela 6.</b> Distribuição imunoistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcção para MMP-2 e TIMP-2 em úteros bovinos com adenomiose do tipo profunda na fase folicular e lútea do ciclo estral.....	110
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS

**bFGF** – fator básico de crescimento fibroblástico (do inglês, *Basic fibroblast growth factor*)

**Ca<sup>2+</sup>** - íon cálcio

**DNA** - ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)

**17β-HSD** - 17 beta hidrox-esteroide-desidrogenase

**E<sub>1</sub>** - estroma

**E<sub>2</sub>** - estradiol

**EGF** - fator de crescimento epidérmico (do inglês, *Epidermal growth factor*)

**EGFR** - Receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês, *Epidermal growth factor receptor*)

**ERK** - sinal extracelular regulado por quinases (do inglês, *Extracellular signal-regulated kinase*)

**Hsp** - proteínas de choque térmico (do inglês, *Heat shock protein*)

**IGF** - fator de crescimento semelhante à insulina (do inglês, *Insulin-like growth factor*)

**IL-1** - interleucina I

**INF** - interferon

**MAPK** - proteína quinase ativadora de mitose (do inglês, *Mitogen activated protein kinase*)

**MEC** - Matriz extracelular

**MMP-2** - Metaloproteinase da matriz tipo 2 (do inglês *Matrix metalloproteinases*)

**MT1-MMP** - do inglês *Membrane Type matrix metalloproteinase*

**RE-α** - Receptor alfa de estrógeno

**RNA** - ácido ribonucléico (do inglês, *ribonucleic acid*)

**RNA<sub>m</sub>** - ácido ribonucléico mensageiro (do inglês, *ribonucleic acid Messenger*).

**RP**- Receptor de progesterona

**TGF** - fator de crescimento transformador (do inglês, *Transforming growth factor*)

**TIMP-2** - Inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 2 (do inglês *Inhibitor of metalloproteinase*)

**TNF** - fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumoral necrosis factor*)

**StAR**- *steroidogenic acute regulatory protein*)

**VEGF** - fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês, *Vascular endothelial growth factor*)

**Zn<sup>2+</sup>** - íon zinco

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	18
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
3.1. Adenomiose.....	19
3.1.1. Achados clínicos e ocorrência .....	19
3.1.2. Achados histopatológicos .....	20
3.2. Fisiopatologia da adenomiose .....	22
3.2.1. Estrógenos e progestágenos .....	22
3.2.2. Vias biossintéticas dos esteróides sexuais .....	23
3.2.3. Receptores esteróides.....	24
3.2.4. Distribuição, expressão e mecanismo de ação dos receptores de estrógeno e progesterona no útero .....	25
3.2.5. Receptor de estrógeno (RE).....	26
3.2.6. Receptor de progesterona (RP).....	27
3.2.7. Efeitos biológicos dos esteróides reprodutivos no útero.....	28
3.2.8. Distribuição dos receptores estrógeno e progesterona no endométrio de ruminantes.....	31
3.2.9. Esteroidogênese na adenomiose .....	32
3.2.10. Fisiopatologia do tecido endometrial distópico .....	33
3.3. Matriz Extracelular .....	35
3.4. Metaloproteinases da matriz (MMPs) e inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs).....	37
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	43
<b>ARTIGO I</b> .....	52
<b>ARTIGO II</b> .....	64
<b>ARTIGO III</b> .....	80
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	99
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	102
<b>ANEXO</b> .....	103



## 1. INTRODUÇÃO

Adenomiose é o termo usado para designar uma enfermidade uterina, representada pela localização distópica de glândulas e estroma endometriais por entre os feixes musculares do miométrio, e sua ocorrência é considerada incomum nos animais domésticos (JUBB e KENNEDY, 1987; McENTEE, 1990).

Esta distrofia é classificada como um distúrbio do crescimento celular benigno e estrógeno-dependente, de etiologia desconhecida, mas que reside em uma natureza complexa e multifatorial, que resulta em falha reprodutiva em mulheres (PARROT *et al.*, 2001; DEVLIEGER, *et al.*, 2003) e animais (MORI *et al.*, 2000; INAGAKI *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2008).

A adenomiose uterina tem sido diagnosticada em mulheres (LEVGUR *et al.*, 2000; PARROT *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002; DEVLIEGER *et al.*, 2003), primatas (BASKIN, 2001), felinos (JUBB E KENNEDY, 1987; MUNSON *et al.*, 2002), cadelas (JUBB e KENNEDY, 1987; McENTEE, 1990; NASCIMENTO e SANTOS, 1997; STOCKLIN *et al.*, 2001), camundongas (MORI *et al.*, 1981; HART, 1990); coelhas (JUBB e KENNEDY, 1987; HART, 1990), búfalas (GHORA *et al.*, 1997) e vacas (JUBB e KENNEDY, 1987; NASCIMENTO e SANTOS, 1997; MOURA, 2003; MOREIRA *et al.*, 2006).

De acordo com a literatura, é um achado ocasional em vacas, como parte de um desarranjo local na aplasia segmentar, ou pela má-formação de uma das extremidades dos cornos uterinos (JUBB e KENNEDY, 1987), e também registrada em cadelas associada à hiperplasia endometrial cística (McENTEE, 1990; JONES *et al.*, 1997).

A adenomiose uterina foi um achado freqüente em vacas vazias descartadas em matadouros no Norte do Estado do Rio de Janeiro e tem sido apontada como uma das causas de falha reprodutiva (MOREIRA *et al.*, 2007 e 2008).

Estudos sugerem que a lesão ocorra inicialmente por uma ação descompensada entre as metaloproteinases da matriz (colagenases) e seus inibidores específicos, desestruturando a matriz extracelular que separa as camadas uterinas, propiciando a invasão de tecido endometrial. As colagenases de ação uterina são controladas pelos hormônios reprodutivos, citocinas e fatores de

crescimento localmente produzidos, conforme o estágio reprodutivo. Assim qualquer descontrole em alguma dessas vias poderá ser desencadeador da adenomiose.

Atribui-se a esta enfermidade interferência na sobrevivência espermática, embrionária e na implantação do embrião, em função das alterações vasculares (LEVGUR *et al.*, 2000; MORI *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2002), elevação de radicais livres, entre eles o óxido nítrico (estresse oxidativo) (OTA *et al.*, 1998 – 2002; MOREIRA *et al.*, 2008) e degradação excessiva da matriz extracelular (MORI *et al.*, 2000; MATSUDA *et al.*, 2001), levando a modificações no microambiente uterino, culminando com subfertilidade e infertilidade em humanos e animais (MORI *et al.*, 2000; BERGHOLT *et al.*, 2001; CHUNG *et al.*, 2002; CUSTIS *et al.*, 2002; INAGAKI *et al.*, 2003).

A escassez de registros desta distrofia nas fêmeas domésticas de interesse agropecuário pode ser explicada por ser uma lesão da túnica miometrial que, classicamente, não compõe as amostras para biópsia endometrial (de uso relativamente comum na patologia reprodutiva de vacas e éguas) e, ainda por se tratar de uma víscera sem valor comercial e são descartadas nos matadouros, sem uma investigação mais profunda (MOREIRA *et al.*, 2006 e 2007).

A adenomiose é muito estudada em mulheres e sabidamente uma das maiores causas de problemas reprodutivos nesta espécie, culminando com a fertilidade diminuída e esterilidade. Os distúrbios hormonais em mulheres são apontados como as principais causas da adenomiose (LEVGUR *et al.*, 2000; PARROT *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002; DEVLIEGER *et al.*, 2003). O estudo comparativo da adenomiose em úteros bovinos com o de mulheres é, pelo menos, o início da investigação desta desordem em vacas.

A morfologia e graus de apresentação desta distrofia em úteros de vacas (MOREIRA *et al.*, 2006 e 2007) são semelhantes em outras espécies, como camundongas (MORI *et al.*, 1981), coelhas (HART, 1990), mulheres (PARROT *et al.*, 2001), cadelas (SANTOS *et al.*, 2008) e primatas (JACKSON *et al.*, 2007).

Esta investigação teve o intuito de caracterizar a expressão de receptores- $\alpha$  de estrógeno e receptores de progesterona, bem como as enzimas metaloproteinase da matriz-2 e inibidor tecidual de metaloproteinase-2, a fim de estabelecer um perfil de expressão dessas moléculas em úteros de vacas com adenomiose.

## 2. OBJETIVOS

### 2.2. Objetivos Gerais

Registrar a ocorrência da adenomiose e investigar suas possíveis causas e mecanismos de formação em útero de vacas, descartados em matadouros frigoríficos.

### 2.2. Objetivos Específicos

Relacionar os graus de adenomiose uterina (superficial e profunda), com as fases do ciclo estral (folicular e lútea inicial e média) em vacas abatidas na região Norte Fluminense quanto à expressão imunohistoquímica de:

1. Receptores- $\alpha$  de estrógeno (RE- $\alpha$ )
2. Receptores de Progesterona (RP)
3. Metaloproteinase da Matriz - 2 (MMP-2)
4. Inibidor tecidual de metaloproteinase - 2 (TIMP-2)

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Adenomiiose

##### 3.1.1. Achados clínicos e ocorrência

Adenomiiose uterina é uma distrofia caracterizada pela localização de tecido endometrial por entre os feixes musculares do miométrio (JUBB e KENNEDY, 1987; McENTEE, 1990; NASCIMENTO e SANTOS; 1997 e JONES *et al.*, 1997).

Adenomiiose é um distúrbio do crescimento celular benigno e considerado relativamente incomum em fêmeas domésticas (JUBB e KENNEDY, 1987; McENTEE, 1990; NASCIMENTO e SANTOS; 1997; JONES *et al.*, 1997). De acordo com a literatura clássica, é um achado ocasional em vacas com aplasia segmentar ou por má-formação de uma das extremidades dos cornos uterinos (JUBB e KENNEDY, 1987), e também encontrada em cadelas que apresentam hiperplasia endometrial cística (McENTEE, 1990; JONES *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2008).

Mulheres apresentam sintomatologia como dores abdominais, dismenorréia e menorragia (LEVGUR *et al.*, 2000 e PARROT *et al.*, 2001 e WANG *et al.*, 2002).

De acordo com LEVGUR *et al.* (2000), a dismenorréia está associada com o número de focos adenomióticos, no entanto a menorragia não exibiu correlação com a quantidade de focos e com a dismenorréia. Ao passo que, quando as mulheres apresentaram ambos os distúrbios, estes mostraram associação com a profundidade do foco. Ainda, estes autores relataram que a adenomiiose foi um achado mais freqüente em mulheres mais velhas e com mais de dois partos.

ABDO (1987) descreveu a ocorrência de 4,2% (n=168) de adenomiiose em vacas vazias provenientes do estado do Mato Grosso do Sul, MONTEIRO *et al.* (2003) observaram 26,7% (n=60) em vacas/novilhas abatidas em Birigui-SP, MOURA (2003) encontrou 25% (n=12) de adenomiiose em vacas descartadas de programas de transferência de embriões em Bragança Paulista-SP, enquanto MOREIRA (2005) relatou 78,7% (n=61) de adenomiiose em vacas/novilhas azebuadas abatidas no norte do estado do Rio de Janeiro.

MONTEIRO *et al.* (2003) e MOREIRA *et al.* (2007) observaram um aumento do volume uterino em vacas com adenomiiose, característica também encontrada em

mulheres acometidas pela mesma desordem (MORI *et al.*, 1981; BERGHOLT *et al.*, 2001 e PARROT *et al.*, 2001).

O mecanismo de formação da adenomiose e sua relação com a infertilidade ainda não está bem esclarecido, porém, é comprovado que as mulheres portadoras são acometidas por abortamento e esterilidade (OTA *et al.*, 1998a e b, 1999, 2000, 2001 e 2002 LEVGUR *et al.*, 2000; PARROT *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002).

Estudiosos da adenomiose incriminam que a desestruturação do limite entre o endométrio e o miométrio (limite endometriometrial) e a modificação do ambiente intra-uterino, comprometem a implantação do embrião, culminando com sua perda precoce (MORI *et al.*, 2000; BERGHOLT *et al.*, 2001; CHUNG *et al.*, 2002; CUSTIS *et al.*, 2002; INAGAKI *et al.*, 2003).

### **3.1.2. Achados histopatológicos**

ROKITANSKY (1960) citado por DEVLIEGER *et al.* (2003) foi quem primeiro descreveu, em úteros de mulheres, as características da adenomiose. Consistia em uma área pobremente circunscrita de músculo liso, glândulas e estroma endometrial que invadiam as camadas miometriais. O grau de invasão era variável, podendo envolver toda parede uterina até a serosa.

MORI *et al.* (1981) encontraram as seguintes características na adenomiose experimental em camundongas: (1) corno uterino dilatado e hiperplasia cística das glândulas distópicas; (2) o epitélio luminal e das unidades glandulares, consistia de uma camada simples de células colunares e cúbicas (características normais); (3) na adenomiose avançada, existiam nódulos subserosos, envolvidos por estroma e músculo liso, e o epitélio glandular era idêntico ao luminal; (4) ou ainda, os nódulos subserosos quando altamente císticos, eram envoltos somente por músculo liso.

A histopatologia em úteros de vacas com adenomiose revelou agrupamentos de glândulas endometriais, insinuados em variados graus, por entre as fibras do miométrio; acentuada proliferação de colágeno, provavelmente proveniente do endométrio (estroma endometrial) acompanhando as glândulas infiltradas (MOREIRA, *et al.*, 2006 e 2007).

A maioria dos patologistas não consegue diagnosticar a extensão da invasão glandular, mesmo porque deveriam ser confeccionados cortes teciduais seriados de toda extensão uterina, o que é impraticável. No entanto, é sugerido que

seja classificada a invasão quando esta for além de 2,5 mm através do limite que separa o miométrio do endométrio (limite endo-miometrial), ao passo que a adenomiose sub-basal pode ser definida como uma invasão mínima pela membrana basal, não se estendendo mais que 2,0 mm (LEVGUR *et al.*, 2000; PARROT *et al.*, 2001; DEVLIEGER *et al.*, 2003).

LEVGUR *et al.* (2000) ao classificarem a adenomiose em mulheres, também levaram em consideração, o número de focos adenomióticos por lâmina examinada e a profundidade destes no miométrio, que foi expresso em porcentagem, medida pela distância do limite endo-miometrial até o foco mais profundo, sendo classificada em profunda (80%), intermediária (40-80%) e superficial (menos de 40%), a fim de expressar a gravidade da enfermidade.

MOREIRA (2005) ao estudar adenomiose em úteros de vacas, propôs um escore, o qual obedecia à posição e ao número de focos glandulares infiltrados no miométrio, criando então seis variações de adenomiose: Discreta (superficial e profunda); Moderada (superficial e profunda); e Acentuada (superficial e profunda). Sendo que, era classificada como superficial, quando a insinuação glandular não ia além do miométrio superficial, em uma profundidade correspondente ao diâmetro de uma até o de três unidades glandulares; em profunda, quando a insinuação glandular ultrapassava o miométrio superficial, em uma profundidade correspondente ao diâmetro de mais de três unidades glandulares; em discreta, quando até duas unidades glandulares se mostravam insinuadas em um campo microscópico com objetiva de 20x; em moderada, quando de três a cinco unidades glandulares estavam insinuadas em um campo microscópico com objetiva de 20x e em acentuada, quando mais de cinco unidades glandulares estavam insinuadas em um campo microscópico com objetiva de 20x.

Ainda, MOREIRA *et al.* (2007) observaram que a fase do ciclo estral influenciou no grau de infiltração das unidades glandulares. A fase lútea média exibiu maior porcentagem e profundidade de infiltração de tecido endometrial no miométrio, enquanto que a menor porcentagem foi encontrada em úteros de animais em anestro.

Hiperplasia e hipertrofia da musculatura uterina adjacente ao foco adenomiótico é freqüentemente observado, resultando em um aumento do tamanho uterino (MORI *et al.*, 1981; BERGHOLT *et al.*, 2001 e PARROT *et al.*, 2001),

característica também observada por MONTEIRO *et al.* (2003) e MOREIRA *et al.* (2007).

Muitos critérios de classificação têm sido propostos e várias características são avaliadas a fim de correlacionar a gravidade da doença com o aparecimento dos sintomas, levando-se em consideração a profundidade e o número de unidades glandulares infiltradas e espessura do miométrio. Assim, um grande número de propostas classificatórias tem sido postulado, mas nenhuma tem sido aceita universalmente (LEVGUR *et al.*, 2000; PARROT *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002; DEVLIEGER *et al.*, 2003; MOREIRA, 2005).

### **3.2. Fisiopatologia da adenomiose**

#### **3.2.1. Estrógenos e progestágenos**

Fisiologicamente, a estrona e  $17\beta$ -estradiol, são os mais importantes estrógenos sintetizados pelos folículos ovarianos (SCHAMS e BERISHA, 2002; HAFEZ *et al.*, 2004). A estrona foi o primeiro estrógeno isolado e identificado, contudo, o  $17\beta$ -estradiol é aproximadamente 10 vezes mais potente que a estrona na maioria dos ensaios biológicos, sendo considerado o esteróide mais ativo produzido pelos ovários. Muitos derivados hidroxilados desses esteróides de 18 carbonos possuem um domínio aromático no anel A e têm sido identificados no fluído folicular e tecidos de todos os mamíferos. Esses incluem 2-hidroxiestrona; 2-hidroxiestradiol, e derivados metilados, bem como os derivados da estrona e  $17\beta$ -estradiol, 4-OH, 6-OH e 16-OH (BROW, 1999).

A pregnenolona é a progestina mais importante produzida pelos ovários, pois a sua posição na rota metabólica exerce papel chave como precursora de todos os esteróides. No entanto, o produto de 21 carbonos mais abundante nos ovários é a progesterona, produzida pelos seus folículos em todos os estágios de desenvolvimento e como produto final secretado pelo corpo lúteo (BROW, 1999; SCHAMS E BERISHA, 2002; HAFEZ *et al.*, 2004).

Outros esteróides contendo 21 carbonos são originados de ovários incluindo a 17-OH-progesterona (um precursor imediato de andrógenos que é aromatizado no

ovário), a  $20\alpha$ -dihidroprogesterona, o  $20\beta$ -epimer e a  $17\alpha$ ,  $20\alpha$  e  $17\alpha$  e  $20\beta$ -pregananediona (BROW, 1999).

### 3.2.2. Vias biossintéticas dos esteróides sexuais

Os hormônios esteróides são sintetizados em vários tecidos endócrinos, mais notavelmente, nas gônadas, (BROW, 1999; HAFEZ *et al.*, 2004). A biossíntese dos esteróides é completada pela ação de duas famílias de enzimas. A primeira é a das hidroxilases, codificadas por genes pertencentes à superfamília da citocromo P450. A segunda família é das dehidrogenases, que pertence a um ou dois grupos distintos, a família das dehidrogenases/redutases de cadeia alcoólica ou a superfamília das Aldo-ceto redutases. As enzimas P450 e as dehidrogenases são necessárias para que a esteroidogênese ocorra nas gônadas (BROW, 1999).

A conversão de colesterol em hormônios esteróides é influenciada pela expressão da enzima *Cytochrome P450 side chain cleavage* (P450scc) e pelo padrão de transferência do colesterol para esta. A P450scc está localizada nas gônadas (Brow, 1999), e catalisa a formação de pregnenolona a partir do colesterol dentro da mitocôndria e o transporte do colesterol para o interior da membrana mitocondrial, é realizado pela *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR), desempenhando papel limitante na síntese de esteróides (STOCCO, 2001).

A esteroidogênese pode ser acentuada em dois estágios: nas fases aguda ou tardia. A fase aguda ocorre dentro de minutos, pela estimulação de hormônios trópicos e não aparenta estar envolvida na transcrição do gene e sim pelo aumento no transporte de colesterol para o interior da mitocôndria pela StAR (BROW, 1999; STOCCO, 2001).

O acentuado transporte de colesterol em resposta a hormônios trópicos, aparentemente, se dá por efeitos transcricionais na proteína StAR e modificações pós-transcricionais dos receptores periféricos benzodiazepínicos (PBR), levando ao aumento da afinidade de ligação do colesterol, este é um fator limitante da esteroidogênese (STOCCO, 2001).

Em contrapartida, na fase tardia (dias ou horas), a regulação da esteroidogênese é mediada por fatores trópicos, como o hormônio luteinizante (LH) nas gônadas e o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) nas adrenais, diretamente



pela ação do AMPc na transcrição da P450<sub>scc</sub>, ferredoxina e no sistema de transporte do colesterol (StAR) (BROW, 1999; STOCCO, 2001).

A citocromo P450 apresenta função mista, a oxidase requer NADPH e oxigênio e a redutase atua como doadora de elétrons. As duas reações ocorrem em um determinado padrão na qual a 17 $\alpha$ -hidroxi intermediária provavelmente permanece ligada ao complexo enzimático, com subsequente remoção dos lados da cadeia pela atividade da liase. Essa etapa enzimática é submetida à regulação hormonal por *feedback* e esse é um dos pontos chave para o controle fisiológico da secreção de esteróides (BROW, 1999).

A enzima microsomal 17 $\beta$ -hidrox-esteroide-desidrogenase (17 $\beta$ -HSD) catalisa a interconversão do estrógeno estrona em 17 $\beta$ -estradiol, em tecidos ovarianos, uterinos e placentários, sendo responsável pela etapa final da produção de andrógenos e estrógenos, ela catalisa a interconversão do 17-cetoesteróide em seu correspondente 17 $\beta$  hidroxisteróide [androstenediona $\leftrightarrow$  testosterona $\leftrightarrow$  ou estrona $\leftrightarrow$  estradiol 17 $\beta$ ] (BROW, 1999).

Quatro isozimas da 17 $\beta$ -HSD foram identificadas em humanos:

- Tipo 1: é a forma solúvel, na placenta, no ovário e útero e converte estrona em 17 $\beta$ -estradiol usando NADPH como co-fator;
- Tipo 2: é a forma microsomal na placenta, endométrio e fígado, e utiliza o NAD como co-fator para oxidar testosterona e 17 $\beta$ -estradiol em androstenediona e estrona, respectivamente;
- Tipo 3: encontrada em microsomos testiculares e reduz androstenediona em testosterona usando NADPH como co-fator;
- Tipo 4: similar a isoforma da tipo2 em atividade.

### 3.2.3. Receptores esteróides

Os receptores de hormônios esteróides são proteínas receptoras intracelulares responsáveis na tradução de sinais para os hormônios esteróides, e fazem parte de uma família denominada receptores nucleares que, na verdade, são considerados molecularmente, fatores de transcrição. Os receptores podem estar no citoplasma da célula, e então se moverem para o núcleo após a ativação, ou podem permanecer no núcleo esperando a ativação. Na verdade, os receptores de localização nuclear possuem proteínas de endereçamento nuclear, que podem estar mascaradas por

proteínas de choque térmico (Hsp), que os marcam para permanecerem no citoplasma e torná-los inativos (MANGELSDORF *et al.*, 1995; COUSIN *et al.*, 2006; GRIEKSPoor *et al.*, 2007).

### **3.2.4. Distribuição, expressão e mecanismo de ação dos receptores de estrógeno e progesterona no útero**

Os esteróides são moléculas lipofílicas, portanto penetram na maioria das células por difusão, entretanto, em alguns casos um mecanismo ativo pode estar envolvido. Os receptores são específicos para uma classe de esteróides conhecidos, assim as células podem conter receptores para andrógenos, estrógenos e/ou progestinas (BROW, 1999; SCHAMS e BERISHA, 2002; HAFEZ *et al.*, 2004; COUSIN *et al.*, 2006).

Os tecidos que respondem aos hormônios esteróides contêm receptores, e a resposta biológica dentro deles está correlacionada com o número total de receptores e seus níveis de ocupação por diferentes concentrações de esteróides (BROW, 1999; COUSIN *et al.*, 2006).

Os receptores são sintetizados no citoplasma e imediatamente formam complexos macromoleculares com outras proteínas, em sua maioria as da família de proteínas Hsp. A ligação do esteróide ao seu receptor formará um complexo ativo induzido por uma mudança conformacional na estrutura do receptor e a dissociação das proteínas Hsp pelo complexo macromolecular (BROW, 1999; SCHAMS e BERISHA, 2002; HAFEZ *et al.*, 2004; COUSIN *et al.*, 2006).

Os receptores esteróides também são fosfoproteínas e o nível global de receptores fosforilados aumenta, seguido da ligação do hormônio. O complexo receptor-hormônio esteróide se torna altamente fosforilado e aumenta sua avidéz para se ligar ao DNA cromossômico (BROW, 1999; COUSIN *et al.*, 2006)

No compartimento nuclear, os complexos ativados de receptor-hormônio esteróide se ligam as seqüências regulatórias de dímeros de DNA, chamadas de elementos específicos de resposta esteróide, nas cinco regiões de genoma alvo desses hormônios esteróides. Os complexos ativados se juntam a outras proteínas nucleares com a função de co-ativar ou co-reprimir a transcrição que pode modificar a estrutura da cromatina e/ou interagir com complexos de iniciação transcricional compostos de vários fatores de transcrição e RNA polimerase tipo 2. A transcrição

de genes específicos poderá atuar ativando ou reprimindo para regular o nível de RNAm e sua subsequente tradução em proteínas. O resultado da ação do hormônio esteróide é a presença ou não de uma nova síntese de proteínas específicas que alteram a função celular, mais notavelmente, de crescimento e/ou diferenciação (BROW, 1999; SCHAMS e BERISHA, 2002; HAFEZ *et al.*, 2004; COUSIN *et al.*, 2006).

### 3.2.5. Receptores de estrógenos (RE)

Existem duas formas diferentes do receptor de estrógeno, normalmente referidos como  $\alpha$  e  $\beta$ . Cada forma é codificada por um gene diferente, o ESR1 e ESR2, respectivamente. O receptor de estrógeno ativado via hormônio forma dímeros e, ambas as formas são expressas em vários tipos celulares. Os receptores podem formar homodímeros  $\alpha\alpha$  e  $\beta\beta$  ou heterodímeros  $\alpha\beta$  (SCHAMS e BERISHA, 2002; COUSIN *et al.*, 2006).

A afinidade de ligação do  $17\beta$ -estradiol é quatro vezes mais forte para RE- $\alpha$  do que para RE- $\beta$ . A presença de dois diferentes REs expande a diversidade de respostas potenciais a componentes estrogênicos e antiestrogênicos, levando a possibilidade de que homodímeros e/ou heterodímeros de RE poderiam se ligar a elementos responsivos a estrógenos e provocar a regulação da expressão gênica via estrógeno (BROW, 1999; COUSIN *et al.*, 2006).

Os homodímeros e heterodímeros  $\alpha$  são fortes ativadores da atividade transcricional, enquanto homodímeros  $\beta$  não o são (COUSIN *et al.*, 2006).

Adicionalmente, alguns REs podem estar associados a membranas celulares ligados a cavcolina-1 e formam complexos com proteína G, receptor de tirosina quinase (EGFR e IGF-I), podendo levar ao aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  e óxido nítrico. Através dos receptores de tirosina quinase sinais são enviados para o núcleo através da proteína quinase mitogênica ativada (MAPK/ERK) e 3-fosfatoinositol quinase (P13K/AKT) glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3beta) (COUSIN *et al.*, 2006; GRIEKSPoor *et al.*, 2007).

### 3.2.6. Receptor de progesterona (RP)

Existem dois promotores distintos no gene que codifica o receptor de progesterona (RP), o qual se traduz em duas maiores isoformas dos RP, o RP-B (114kDa) e RP-A (94kDa). Ambas isoformas do RP são expressas relativamente de forma igualitária nos tecidos, embora diferenças em sua razão tenham sido observadas (BROW, 1999; CHABBERT-BUFFET *et al.*, 2005; COUSIN *et al.*, 2006; BULUN *et al.*, 2006). Uma terceira isoforma, denominada de RP-C, foi descoberta em humanos, e incrementam a ação das demais isoformas, apesar de não possuir o domínio A/B (COUSIN *et al.*, 2006; BUKULMEX *et al.*, 2007).

RP-A ou o RP-B podem aumentar como resultado da tradução de sítios alternativos do mesmo RNAm ou por transcrição de promotores alternativos do mesmo gene (CHABBERT-BUFFET *et al.*, 2005; BULUN *et al.*, 2006; COUSIN *et al.*, 2006).

Dois domínios específicos inibitórios foram identificados no RP-A, os quais conferem funções repressoras para o RP-B e RE- $\alpha$ . Embora nesses domínios inibitórios estejam contidas as duas isoformas dos RP, suas ações são mantidas apenas no contexto do RP-A, propondo uma habilidade do RP-A em reprimir o RP-B transcricionalmente, ocorrendo por consequência da heterodimerização do RP-B/A. O RP-A também inibe transcricionalmente o RE- $\alpha$  sem a ocorrência da heterodimerização. Portanto, a razão entre os dímeros governa a resposta hormonal (COUSIN *et al.*, 2006).

Os RP-A são necessários e suficientes para elucidar respostas progesterona-dependente necessárias para fertilidade feminina, enquanto que a isoforma B é requerida para resposta normal da glândula mamária (BULUN *et al.*, 2006).

A expressão dos RP é descrita em tecidos que respondem a concentração de progesterona plasmática, como útero (endométrio e miométrio), ovários (células luteinizadas da granulosa e corpo lúteo), células da granulosa pré-ovulatórias, células epiteliais da glândula mamária, endotélio vascular e osteoblastos (BROW, 1999; SCHAMS e BERISHA, 2002; HAFEZ *et al.*, 2004).

### 3.2.7. Efeitos biológicos dos esteróides reprodutivos no útero

#### a) Progesterona

Após a ruptura do folículo e liberação do oócito, as células da teca e granulosa se diferenciam e formam o corpo lúteo, através da ação do LH, que é responsável pela secreção de progesterona e de estrógeno na fase tardia do ciclo (BROW, 1999; SCHAMS e BERISHA, 2002; HAFEZ *et al.*, 2004).

A progesterona exerce um papel fisiológico importante no útero e ovário pela liberação de oócitos maduros, por propiciar a implantação do embrião e manutenção da gestação, pelo crescimento uterino, desenvolvimento e preparação da glândula mamária para secreção de leite e por atuar no cérebro desencadeando o comportamento sexual (BROW, 1999; SCHAMS e BERISHA, 2002).

No endométrio, a progesterona induz a diferenciação das células do estroma e epiteliais, pelas mudanças pseudodecíduais e secretoras, redução da mitose e proliferação celular. Assim, a progesterona é vista como um hormônio da diferenciação e limitante do crescimento no endométrio (BULUN *et al.*, 2006; COUSIN *et al.*, 2006).

Fatores derivados de células do estroma em resposta a progesterona acabam por inibir os efeitos dos estrógenos, pela inibição de seus receptores (BULUN *et al.*, 2006; COUSIN *et al.*, 2006).

A progesterona estimula a expressão da 17- $\beta$ HSD tipo 2, que converte estradiol (E2) em estrona (E1) e testosterona em androstenediona, nas células epiteliais do endométrio, e elevados níveis dessa enzima são expressos na fase lútea. Esse evento tem sido apontado como um mecanismo protetor contra os efeitos de crescimento uterino mediado pelo estrógeno (BULUN *et al.*, 2006).

Estudos têm apontado que a estimulação da expressão epitelial da 17- $\beta$  HSD-2 epitelial, se dá através do complexo RP-progesterona em células no estroma, que secretam fatores de crescimento, citocinas ou ligantes para receptores nucleares que induzem o promotor dessa enzima nas células do estroma e epiteliais (BULUN *et al.*, 2006; JACKSON *et al.*, 2007).

A ausência de estradiol aumenta os RPs no epitélio luminal, que pode ser reduzida pelo tratamento com estradiol, ou seja, o estradiol diminui os RPs no

epitélio via RE- $\alpha$  no estroma e leva o aumento da expressão de RP em células do estroma em camundongas. O RP-A é primariamente responsável em modular negativamente a resposta ao estradiol, por via parácrina, e requer um RP-A expresso nas células do estroma (COUSIN *et al.*, 2006).

O aumento pós-ovulatório da progesterona circulante causa decidualização do endométrio, envolvendo massiva proliferação e diferenciação do seu estroma, com aumento da permeabilidade vascular e edema. A progesterona inibe a expressão de quimiocinas dos neutrófilos e linfócitos infiltrados e diminui a prostaglandina E no tecido decíduo e coriônico durante o início da prenhez. Esses eventos são críticos para a diminuição da resposta inflamatória, que permite a implantação embrionária (COUSIN *et al.*, 2006).

## **b) Estrógenos**

O ovário é o maior sítio de síntese e secreção de estrógeno e progesterona, e ainda promove elevação nas flutuações cíclicas na concentração desse hormônio na circulação. Os folículos primários desempenham um duplo papel na secreção dos dois hormônios e também são responsáveis pela liberação do óvulo durante o ciclo estral normal. Antes da ovulação, as células da granulosa no folículo sintetizam e secretam estrógenos (HART, 1990; BROW, 1999; SCHAMS e BERISHA, 2002; HAFEZ *et al.*, 2004).

Os estrógenos são responsáveis pelo aparecimento das características sexuais secundárias, inibição do eixo hipotálamo-hipofisário por *feedback*, estimulação da oogênese, regulação do endométrio e da homeostase cardiovascular (HART, 1990; SCHAMS e BERISHA, 2002; HAFEZ *et al.*, 2004).

## **c) Resposta uterina bifásica ao estradiol**

A proliferação e diferenciação epitelial uterina é primariamente mediada pelos RE- $\alpha$ . O estradiol eleva a expressão de RE- $\alpha$ , enquanto a progesterona sozinha ou em associação com estrógenos suscitam a diminuição nos RE- $\alpha$  (COUSIN *et al.*, 2006).

Os estrógenos estimulam um complexo processo de proliferação e diferenciação epitelial no útero levando a formação de um endométrio secretor com multicamadas. Este evento é necessário para o estabelecimento e manutenção da prenhez (COUSIN *et al.*, 2006; BUKULMEZ *et al.*, 2007; DASSEN *et al.*, 2007; JACKSON *et al.*, 2007).

Mudanças estimuladas pelos estrógenos em úteros de roedores, inicialmente incluem aumento da ocupação de REs nucleares, da permeabilidade vascular, hiperemia, liberação de prostaglandina, aumento do metabolismo da glicose, da expressão genética, síntese de lipídeos e proteínas, aumento da expressão e atividade da glicose 6 fosfato desidrogenase e,, mais tardiamente, incluem aumento da síntese de RNA e DNA, proliferação epitelial e diferenciação para um fenótipo colunar (fase secretora), aumento do tamanho uterino e expressão genética. Assim, uma total carência de resposta aos estrógenos em camundongas *knock-out* para RE- $\alpha$ , é uma forte evidência de que este é requerido para mediar uma resposta plena aos estrógenos. Em contraste, camundongas *knock-out* para RE- $\beta$  apresentam uma resposta exagerada ao tratamento com estrógenos, sugerindo que este receptor atua como um modulador negativo da ação dos estrógenos no útero (COUSIN *et al.*, 2006; DASSEN *et al.*, 2007).

O estradiol leva a proliferação do epitélio uterino, mas requer um RE- $\alpha$  funcional nas células do estroma, mas não no epitélio, indicando que a ação do estradiol/ RE- $\alpha$  no estroma, induz a secreção de fatores parácrinos que então atuam no epitélio e estimulam as mudanças. E, a diferenciação do epitélio uterino pelos produtos secretados, também requer um RE- $\alpha$  funcional no epitélio, pois esses fatores parácrinos atuam diretamente sobre os RE- $\alpha$  epiteliais (revisado por Cousin *et al.*, 2006). A progesterona atua através de RP em células do estroma inibindo a resposta proliferativa do epitélio ao estradiol, enquanto induz a proliferação no estroma via RE (CHABBERT-BUFFET *et al.*, 2005; BULUN *et al.*, 2006; COUSIN *et al.*, 2006).

Os estrógenos estimulam a expressão de RP em células do estroma e miométrio e diminuem os RP nas células epiteliais em camundongas (COUSIN *et al.*, 2006).

Fatores de crescimento são hábeis em mimetizar os efeitos proliferativos do estradiol em úteros de ratas, como EGF, IGF, via RE- $\alpha$  no estroma, e talvez sejam

alguns dos fatores parácrinos (CHABBERT-BUFFET *et al.*, 2005; COUSIN *et al.*, 2006).

### **3.2.8. Distribuição dos receptores de estrógeno e progesterona no endométrio de ruminantes**

Estudo realizado por KIMMINS e MACLAREN (2001) em vacas sugere que a distribuição de receptores esteróides nos tecidos é regulada durante o ciclo estral e no início da gestação por uma conduta celular específica, que não pode ser inteiramente atribuída à regulação pelos próprios esteróides sexuais. Fatores parácrinos produzidos pela população celular local ou originados pelo embrião podem modular a transcrição da expressão do gene para os receptores de estrógeno e de progesterona.

Foi observado que elevada concentração de estrógeno folicular (ou estradiol exógeno nos animais ovariectomizados) coincidiu com altos níveis de receptores de estrógeno e de progesterona. A expressão desses receptores foi baixa durante o diestro, no início da prenhez e nos animais ovariectomizados, sugerindo que a progesterona bloquearia a transcrição e/ou a translação dos receptores. Entretanto, REs e RPs foram detectados nos animais ovariectomizados, sugerindo que o estrógeno seria o regulador dominante na transcrição desses receptores em bovinos. Por outro lado, vacas ovariectomizadas apresentaram elevada concentração de RE e PR, sugerindo que na ausência dos estrógenos e progestágenos a expressão desses receptores é constitutiva (ROBINSON *et al.*, 2001).

Muitos efeitos adversos tem sido associados ao o uso clínico de estrógenos, incluindo desordens do crescimento celular, cardiovasculares e hepáticas em humanos e animais domésticos. Todos os estrógenos administrados cronicamente em altas doses são tóxicos e seus efeitos tendem a ser qualitativamente similares em todas as espécies. Os estrógenos estimulam células uterinas a aumentarem em número e tamanho (hiperplasia e hipertrofia, respectivamente). Levam a hiperplasia epitelial acompanhada por hiperplasia glandular, hipertrofia miometrial e edema do estroma. A estimulação crônica induz metaplasia escamosa, hiperplasia cística, piometra, salpingite e adenomiose uterina (HART, 1990).



Nos estudos realizados por KIMMINS e MACLAREN (2001) e ROBINSON *et al.* (2001), em vacas, os RNAm para RE e o RP foram primariamente expressos no estroma sub-epitelial e glândulas superficiais e diminuíram a concentração no epitélio luminal durante o ciclo, exibindo pico no dia 16 do ciclo estral.

A concentração de RE- $\alpha$  e RP e de seus RNAm foram altas no estro e baixas na fase lútea em vacas, suportando a idéia de que o estradiol tem efeito estimulatório na expressão desses receptores, enquanto a progesterona é inibitória, de forma dose dependente (ROBINSON *et al.*, 2001), como proposto em mulheres, primatas e camundongas (COUSIN *et al.*, 2006; JACKSON *et al.*, 2007).

### **3.2.9. Esteroidogênese na adenomiose**

A adenomiose e a endometriose são desordens do crescimento consideradas benignas e caracterizadas pela localização distópica de tecido endometrial. Quando glândulas e estroma endometriais situam-se no miométrio, a desordem é denominada de adenomiose (PARROT *et al.*, 2001) e, quando fora da cavidade uterina, como, superfície ovariana, peritônio, alças intestinais, cérvix e bexiga são denominadas endometriose (OLIVE e SCHUWARTZ, 1993). As lesões de endometriose e adenomiose são similares morfológicamente, exceto pela localização e mecanismo de migração.

Pesquisadores traçam um paralelo entre as duas enfermidades a respeito das propriedades de crescimento, manutenção, responsividade aos hormônios esteróides sexuais bem como a expressão de seus receptores e propriedades de aderência e comportamento em diferentes meios de cultura (KITAWAKI *et al.*, 2003; DASSEN *et al.*, 2007).

A hiperplasia endometrial cística (HEC), mediada por estrógeno ou progesterona, pode fazer-se acompanhar por um crescimento de glândulas basilares e estroma endometrial adjacente ao miométrio, ao longo dos feixes musculares, podendo mesmo estender-se até a superfície serosa (JUBB e KENNEDY, 1987). Sabe-se que em cadelas com HEC, a progesterona tem sua ação em um endométrio inicialmente estimulado pelos estrógenos (expressão de receptores) (JUBB e KENNEDY 1987; JONES *et al.*, 1997).

O implante de adenoipófise na cavidade uterina (corno direito) induziu alta incidência de adenomiose em camundongas inteiras, associada com elevada concentração de prolactina plasmática. Ainda, o implante não teve nenhum efeito nas fêmeas ovariectomizadas e, a suplementação contínua com estrona e progesterona resultaram na aparição de adenomiose em camundongas ovariectomizadas implantadas. No entanto, o tratamento somente com estrona ou o tratamento somente com progesterona, não foi capaz de induzir adenomiose nas ovariectomizadas com ou sem implante (MORI *et al.*, 1981). Estes dados comprovam o sinergismo dos estrógenos e progestágenos ovarianos.

A fim de avaliar os efeitos do mifepristone (RU486), uma droga antiprogestina, ZHOU *et al.* (2000) submeteram camundongas com adenomiose experimental (implante de adenoipófise intra-uterino, MORI *et al.*, 1981) a tratamento com o RU486 oral (20mg/kg) e observaram uma diminuição significativa da enfermidade nos animais tratados e diminuição da prolactina plasmática. Além disso, demonstraram intensa imunomarcção dos receptores de progesterona no epitélio luminal e glandular, de células no estroma endometrial e ao longo dos vasos sanguíneos, dos grupos não tratados com o fármaco.

### **3.2.10 Fisiopatologia do tecido endometrial distópico**

Os perfis de expressão genética do endométrio de mulheres com e sem endometriose mostraram que um grande número de genes alvo da progesterona estão desregulados (BULUN *et al.*, 2006), incluindo genes envolvidos na implantação embrionária, disfunção imune, embriotoxicidade e resposta a apoptose (BULUN *et al.*, 2006 e JACKSON *et al.*, 2007). Esses achados são sugestivos de que o endométrio de mulheres com endometriose reflete a enfermidade encontrada em tecidos distópicos, levando a um ambiente inóspito para implantação.

A inativação do estradiol não ocorre nos tecidos distópicos, devido à deficiência na expressão e atividade da 17 $\beta$ HSD-2, que é normalmente expressa no endométrio normal em resposta a progesterona. A carência da 17 $\beta$ HSD-2 nas células epiteliais é sugestiva da resistência seletiva a certas ações da progesterona (KITAWAKI *et al.*, 2003; CHABBERT-BUFFET *et al.*, 2005; BULUN *et al.*, 2006; LESSEY *et al.*, 2006; DASSEN *et al.*, 2007).

Uma aberrante expressão da aromatase em células do estroma, de endométrio distópico, permite a conversão de androstenediona em estriol neste tecido, enquanto que no endométrio normal a aromatase é ausente (CHABBERT-BUFFET *et al.*, 2005; BULUN *et al.*, 2006, LESSEY *et al.*, 2006; DASSEN *et al.*, 2007).

A expressão da aromatase em tecidos adenomióticos foi similar à encontrada em mulheres com endometriose e no endométrio eutópico de pacientes com adenomiose e endometriose e (KITAWAKI *et al.*, 1997), mostrando um perfil endometrial diferenciado no metabolismo dos estrógenos.

BULUN *et al.* (2006) demonstraram transcritos da 17 $\beta$ HSD-1, que catalisa o produto da aromatase (estriol) em estradiol, contribuindo para a elevação da concentração local de estradiol, ainda amplificada pela ausência da 17 $\beta$ HSD-2. Mostraram ausência do RP-B e níveis baixos de RP-A, ajudando na elevação do estradiol.

JACKSON *et al.* (2007) sugeriram que a redução de RP-A no epitélio glandular pode ser devido à deficiência de regulação pelos RE- $\alpha$  e  $\beta$  nas células do estroma, que alteram a sinalização parácrina entre os dois tipos celulares. O *cross-talk* entre células endometriais no estroma e as células do epitélio glandular é alterado ou ausente na endometriose, criando um ambiente inadequado para implantação embrionária.

Esta aberrante comunicação parácrina entre as células do estroma e epiteliais foi estudada por OSTEEN *et al.* (2005), onde demonstraram que a desregulação da comunicação estroma-epitélio em mulheres com endometriose resulta de uma resistência da progesterona e subsequente inabilidade em regular a atividade das MMPs, existindo uma dominância das células epiteliais, aumentando a liberação de interleucinas, fator de necrose tumoral, e outros fatores que deveriam ser inibidos pela ação da progesterona.

Ainda, JACKSON *et al.* (2007) também mostraram que células endometrióticas isoladas dos primatas com a afecção não responderam ao estímulo hormonal comparado com animais controle. Embora, não tenha existido diferença para RPs pela técnica de imunistoquímica, a responsividade a progesterona de

células do estroma de tecidos distópicos, parece estar alterada no momento da receptividade do embrião (na implantação).

Os RPs são regulados pelo gene RE-estradiol, e a redução de RE em células do estroma de indivíduos com endometriose altera a regulação do RP e genes regulados pelo RP (CHABBERT-BUFFET *et al.*, 2005; BULUN *et al.*, 2006; LEESEY *et al.*, 2006; DASSEN *et al.*, 2007; JACKSON *et al.*, 2007).

Tem sido proposto que a endometriose altera a distribuição de receptores esteróides especialmente o RE- $\alpha$ , nas células do estroma endometrial (eutópico e ectópico) e cria uma comunicação aberrante entre as células do estroma e epiteliais, criando um endométrio resistente à estimulação da progesterona (CHABBERT-BUFFET *et al.*, 2005; BULUN *et al.*, 2006).

Estudo conduzido por MOREIRA *et al.* (2007), em úteros bovinos com adenomiose revelou que os maiores graus de infiltração uterina se deram na fase lútea média, sugerindo que o perfil hormonal influencia no grau de apresentação da lesão.

Estudos realizados por TRANGUCH *et al.* (2005) revelaram que a chaperona FKBP52 foi crítica para implantação embrionária em camundongas, sendo primordial para a atividade da progesterona durante os eventos da implantação, e que a ausência de FKBP52 resultou em defeitos na implantação e subsequente falha na prenhez. No entanto, eles sugeriram que o FKBP52 media sua função via RP-A durante a implantação, e a ausência ou diminuição destes receptores culminava em função diminuída da progesterona, levando o útero a uma resposta estrogênica exagerada. No modelo da endometriose em primatas proposto por Jackson *et al.*, (2006), ambos RP e FKBP52, aos 6 meses da lesão, estavam diminuídos e associados ao aumento da expressão de genes regulados pelo estradiol, Fos e indutores de MMPs.

### **3.3. Matriz Extracelular**

A matriz extracelular (MEC) é uma rede complexa formada de macromoléculas, que propicia sustentação e compartimentalização dos tecidos, modulando diretamente a forma e funções celulares (SLAUSON, 2002).

As duas principais classes de macromoléculas que compõem a matriz são: (1) as proteínas fibrosas, que incluem o colágeno, que forma as fibras colágenas e reticulares, e a elastina, que formam as fibras elásticas; (2) proteínas não fibrosas, de aderência (laminina e fibronectina), que aderem as células a MEC, e proteínas organizadoras, que também desempenham função de aderência, como a tenascina, entactina e ondulina; (3) os glicosaminoglicanos (GAGs), que são co-valentes e ligados a um esqueleto protéico, formando os proteoglicanos, altamente hidratados, onde as proteínas fibrosas da matriz estão embebidas (SLAUSON, 2002; PEREIRA, 2004).

A MEC é importante para as interações entre células, fornecendo meios para se aderirem e proliferarem, além de influenciarem nos processos de sinalização intracelular. A sua disposição influencia na organização do citoesqueleto e vice-versa, interferindo mecanicamente nos processos de expansão celular (SLAUSON, 2002).

As células de tecido conjuntivo são completamente envoltas pela MEC, enquanto que outros tipos, como as epiteliais, endoteliais e musculares são separadas por uma lâmina especializada da MEC, conhecida como membrana basal (lâmina basal) (SICKLER *et al.*, 1993; SLAUSON, 2002).

A membrana basal é sintetizada pelas células que descansam sobre ela, e possuem uma composição bioquímica diferenciada. Além do colágeno tipo IV, a membrana basal também contém proteoglicanos, fibronectina, ácido hialurônico e laminina, o seu maior componente (SICKLER *et al.* 1993; SLAUSON, 2002).

No útero não existe uma barreira distinta, como uma membrana basal, que separe o endométrio e o miométrio, no entanto, existe uma fina camada de MEC e músculo liso, denominada borda endométrio-miometrial, que mantém as camadas uterinas compartimentalizadas (MATSUDA *et al.*, 2001).

Muitos tipos de colágeno (o maior componente da MEC) são expressos na musculatura uterina. O colágeno tipo III foi localizado em volta dos feixes de fibras de músculo liso, e em volta das fibras musculares do miométrio de ratas (NISHINAKA e FUKUDA, 1991).

Os colágenos são as moléculas mais abundantes na MEC, depois de secretadas para o espaço extracelular, são agrupadas em polímeros denominados fibrilas, que agrupadas são chamadas de fibras de colágeno, que podem ser visualizadas ao microscópio óptico (SLAUSON, 2002).

YAMADA *et al.* (2002) observaram a presença de colágenos tipo I e IV, laminina e fibronectina no endométrio de vacas durante o ciclo estral e nos primeiros 30 dias de gestação. Os perfis para os constituintes da MEC foram uniformes durante o ciclo estral e na primeira semana de gestação. No entanto, estavam diminuídos na segunda e terceira semanas de gestação, então recuperando, na quarta semana, o perfil inicialmente observado. Esses dados sugerem que a remodelação endometrial é essencial para manutenção dos tecidos endometriais e estabelecimento da prenhez.

#### **3.4. Metaloproteinases da matriz (MMPs) e inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs)**

Cerca de 200 metaloproteinases têm sido descritas, subdivididas com base em sua conformação tridimensional e sua composição, em 40 diferentes tipos de famílias, no entanto, as de maior interesse na cavidade uterina, são as metaloproteinases-10 ou colagenases intersticiais ou metaloproteinases da matriz - MMPs (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; CURRY e OSTEEN, 2003).

A família das MMPs agrupa por volta de 25 enzimas proteolíticas, distribuídas em 4 classes: as colagenases; gelatinases, estromolisinas (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; BOCHSLER e SLAUSON, 2002; CURRY e OSTEEN, 2003) e “*membrane type enzymes*” (MT-MMPs) (CURRY e OSTEEN, 2003). As MMPs são enzimas dependentes de  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  para a sua plena atividade, sendo especializadas em degradar os componentes da MEC (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; BOCHSLER e SLAUSON, 2002; CURRY e OSTEEN, 2003).

As colagenases (MMP-1, -8 e -13), clivam os colágenos fibrilares (tipo I, II, V e XI), bem como os não-fibrilares (tipos IX, XII e XIV). A clivagem das moléculas de colágeno de tripla hélice pelas MMPs, muda sua estabilidade e solubilidade, resultando na desnaturação em moléculas de gelatina, que são susceptíveis a proteinases teciduais, incluindo as gelatinases e estromolisinas (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; BOCHSLER e SLAUSON, 2002; CURRY e OSTEEN, 2003).

As gelatinases (MMP-2 e -9) contêm uma seqüência semelhante à fibronectina dentro do seu domínio catalítico, o que se traduz em uma potente habilidade de se ligar e clivar a gelatina. As estromolisinas (MMP-3, -7, -10 e -11), clivam a fibronectina, proteoglicanos e regiões não helicoidais do colágeno tipo IV. A

principal função da MT-MMP é a ativação da MMP-2 (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; CURRY e OSTEEN, 2003).

Além de sua ação proteolítica, as MMPs, especialmente as estromolisinas, exibem atividade em direção a outras MMPs, fatores de crescimento e citocinas, podendo incluir esta classe como moduladoras do crescimento celular, inclusive nos processos patológicos (CURRY e OSTEEN, 2003).

Os macrófagos, bem como os neutrófilos contêm collagenases (MMP-1), gelatinases (MMP-2) e muitas estromolisinas (MMP-3, -10 e -11), matrilisinas (MMP-7) e outros tipos de elastases (metaloelastase, a MMP-12). Todas as MMPs são secretadas de leucócitos, algumas células epiteliais, endoteliócitos e fibroblastos, como proenzimas (zimogênios) e requerem ativação extracelular via outras proteinases, incluindo as MMPs, serina proteinases (CURRY e OSTEEN, 2003), ativador do plasminogênio/plasmina (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; CURRY e OSTEEN, 2003), catepsina G ou proteinases bacterianas (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993), cisteína proteinases, bem como agentes não proteolíticos como radicais livres (oxigênio- e sulfídrico-reativos) e agentes desnaturantes (CURRY e OSTEEN, 2003), a fim de engatilhar sua atividade (a ativação envolve a interrupção da interação entre um resíduo de cisteína e o zinco, o que caracteriza a inatividade da enzima). Tais enzimas são importantes durante o processo inflamatório e de reparo devido à degradação e subsequente remodelação tecidual (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; CURRY e OSTEEN, 2003).

A atividade proteolítica das MMPs é inibida pelas TIMPs, que são secretadas pelos próprios leucócitos e por outras células que compõem o parênquima e estroma teciduais (TSUBOI *et al.*, 1990; BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; HULBOY *et al.*, 1997; BOCHSLER e SLAUSON, 2002; CURRY e OSTEEN, 2003). Portanto, a quebra no balanço da atividade destas enzimas poderá desencadear processos de invasão tumoral, angiogênese, metástase e também o desenvolvimento de doenças caracterizadas pela degradação excessiva ou deficiente da MEC, como aneurismas (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; BOCHSLER e SLAUSON, 2002), endometriose (SAITO *et al.*, 1995) e adenomiose (MORI *et al.*, 2000; MATSUDA *et al.*, 2001).

A expressão exacerbada de cada uma das classes de MMPs está associada com transformação maligna, ambas *in vitro* e *in vivo*. Estudos de hibridização *in situ* têm demonstrado que a expressão de MMP não está somente

limitada a células tumorais (neoplásicas), mas também a células do estroma, nas proximidades dos distúrbios teciduais, como fibroblastos, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais (RODGERS *et al.*, 1994; BOCHSLER e SLAUSON, 2002).

O mecanismo pelo qual as MMPs desencadeiam a invasão celular ou metástase, provavelmente se dê, por um efeito direto da degradação da membrana basal e componentes da MEC. No entanto, existe forte evidência de que uma vez displásicas, as células tenham acesso ao estroma adjacente e as MMPs promovam seu crescimento pela indução da secreção de fatores de crescimento latentes, como fator básico de crescimento fibroblástico (bFGF), fator de crescimento vascular endotelial (vEGF), entre outros, ainda não identificados, que são liberados das membranas basais degradadas, ou seja, as MMPs promovem o suporte para a invasão celular (RODGERS *et al.*, 1994; BOCHSLER e SLAUSON, 2002).

O trato reprodutivo feminino pode ser observado como um sistema orgânico dinâmico, estando associados tecidos especializados que funcionam harmoniosamente como resultado de uma comunicação direta e seqüencial dos esteróides ovarianos. O endométrio é um tecido composto de elementos glandulares (epitelial) e do estroma (mesenquimal), que desempenham sua função independente dos componentes musculares do útero. A natureza sensitiva do endométrio aos esteróides reprodutivos cria um complexo de mudanças fisiológicas necessárias ao conceito. Sem o suporte esteróide, o endométrio exibe pouca mudança morfológica e falha em expressar os componentes bioquímicos de diferenciação necessários para o estabelecimento e a manutenção da prenhez. Uma comunicação precisa e ordenada das vias bioquímicas envolvendo a ação dos hormônios reprodutivos, bem como fatores de crescimento e citocinas localmente produzidos, são necessários para controlar o crescimento e a diferenciação do endométrio. Cada um desses agentes pode afetar o modo de expressão, bem como a atividade das MMPs e TIMPs durante o ciclo estral (RODGERS *et al.*, 1994; HIRATA *et al.*, 2002). Estudos em animais tem mostrado que uma considerável perda de colágeno está associada com mudanças no tamanho uterino durante o ciclo estral em ratas (VAN VEEN e PEEREBOOM, 1987). Contudo, roedores e espécies domésticas exibem menores perdas uterinas, quando comparadas com espécies que menstruam (CURRY e OSTEEN, 2003).

GAETJE *et al.* (1995) demonstraram *in vitro*, que células humanas endometrióticas têm potencial invasivo, indicando similaridade com as linhas



metastáticas celulares. SCHINDI *et al.* (2001) demonstraram um aumento significativo na densidade da microvasculatura em pacientes com adenomiose, quando comparados com o grupo controle, indicando que tecidos adenomióticos possuem atividade angiogênica, que é mediada pelas MMPs.

MORI *et al.* (2000) investigaram a influência de um inibidor de MMPs, o ONO-4817, sobre o desenvolvimento e a regressão da adenomiose experimental. As camundongas tratadas com doses de 0,3% a 1,0% de ONO-4817 mostraram diminuição significativa da adenomiose, e o grau da progressão da lesão foi menor em todos os úteros expostos ao fármaco. A invasividade de células endometriais obtidas de úteros adenomióticos também foi comprovada em culturas das células em matrigel, onde os principais constituintes eram o colágeno tipo IV e a laminina. Neste meio, as células endometriais adenomióticas diminuíram seu potencial invasivo quando tratadas com o ONO-4817.

Em estudo utilizando hibridização *in situ* em camundongas com adenomiose induzida, constatou-se que os níveis de RNAm para as MMP-2 e MMP-9 estavam aumentados quando comparados com os do grupo livre da enfermidade, e que a atividade dessas gelatinases em tecidos uterinos se tornava elevada com a progressão da doença (MATSUDA *et al.*, 2001).

A cascata do sistema ativador de plasminogênio urokinase (uPA)/receptor/plasminogênio tem sido apontada como uma das principais ativadoras das pró-MMPs na superfície celular. Assim, a ativação do sistema de MMPs pode ser regulado pelo balanço entre serina proteinases, como a uPA e seus inibidores. No entanto, a MMP-2 é resistente a ativação por serina proteinases, e são ativadas por mecanismos que envolvem as MT-MMPs e TIMP-2 (CURRY e OSTEEEN, 2003).

A ativação da MMP-2 ocorre pela habilidade de ligação do domínio C-terminal da TIMP-2 a pro-MMP-2 e formar um complexo, que pode ser reconhecido e se ligar ao domínio extracelular da MT-MMP. O complexo pro-MMP-2/TIMP-2/MT-MMP pode ser ativado por uma MT-MMP adjacente ou não, liberando a forma ativa da MMP-2 (HULBOY *et al.*, 1997; CURRY e OSTTEN, 2001 e 2003).

CHUNG *et al.* (2002) demonstraram que a expressão exacerbada de MT1-MMP está associada com o aumento da expressão e ativação da MMP-2 em endométrio distópico de mulheres com endometriose, quando comparado com o grupo livre da distrofia, sugerindo que a expressão de MT1-MMP e MMP-2 está

modificada em mulheres que sofrem de endometriose. Ainda, mulheres com endometriose expressam baixos níveis de TIMP-2, culminado com alta atividade proteolítica da MMP que favorece a invasão de células endometrióticas.

MATSUDA *et al.* (2001) relataram que a MEC de camundongas, contém os colágenos tipo I, II, e V na musculatura uterina, e estes geralmente protegem contra a invasão de células endometriais. As células adenomióticas invadem as camadas musculares pelas regiões ricas em componentes da membrana basal, sugerindo que estas migram para o miométrio ao longo dos vasos sanguíneos dilatados, através da membrana basal, entre os componentes epitelial e estromal do endométrio, ou seja, o desenvolvimento da adenomiose pode estar associado com a degradação da MEC e membrana basal das glândulas e vasos sanguíneos e/ou da camada muscular.

HASHIZUME *et al.* (2003) observaram o comportamento da MMP-2 e 9 em culturas de células endometriais de bovinos, suplementada com progesterona (P4), IGF, TNF e IFN $\tau$ . Esses autores encontraram um aumento significativo de MMP-2 em culturas suplementadas com altas doses de P4 (>30nM), IGF-I, TNF $\alpha$  e  $\beta$ ; e uma diminuição quando suplementadas com baixas doses de P4 (3nM), IGF-II e IFN $\tau$ . Já o perfil da MMP-9 foi diferenciado, apresentando aumento significativo quando as culturas foram suplementadas com TNF $\alpha$  e  $\beta$ , e o restante das citocinas e a P4 não surtiu efeito sobre sua produção.

Em estudo utilizando amostras de lavagens uterinas de mulheres com leiomioma, pólipos endometriais e adenomiose foram encontrados altos níveis de MMP-2 e 9, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  e TGF- $\beta$ , quando comparados com os níveis encontrados no grupo controle (úteros normais) (INAGAKI *et al.*, 2003). Sabe-se que as MMP- 2 e -9 participam no processo de implantação embrionária em humanos (CURRY e OSTEEEN, 2003) e bovinos (WALTER e BOOS, 2001; HIRATA *et al.*, 2002 e 2003; HASHIZUME *et al.*, 2003).

Entre as várias espécies de mamíferos, a expressão seletiva, a ativação e a inibição de membros do sistema de MMPs são necessárias para a reestruturação uterina, enquanto que a manutenção da estabilidade tecidual, durante o período estrogênico (crescimento), é fundamental para o estabelecimento da prenhez e, ainda, para a remodelação no pré e pós-parto (CURRY e OSTEEEN, 2003). Qualquer alteração em um desses eventos poderá desencadear problemas reprodutivos, incluindo a adenomiose.

Embora mudanças estruturais ocorram nos tecidos uterinos durante o ciclo estral ou prenhez, o limite entre o endométrio e o miométrio é sempre mantido em um estado constante. A invasão de tecidos endometriais por entre as fibras musculares é bloqueada por uma delgada camada de fibras musculares lisas e pela membrana basal (componente da MEC). O processo de migração celular ou invasão está associado com a degradação e reconstituição dos componentes da matriz (MORI *et al.*, 2000; MATSUDA *et al.*, 2001; CUSTIS *et al.*, 2002).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDO, M.A.G. (1987) *Alterações morfológicas em ovários e útero de vacas azebuadas não gestantes*. Tese (Mestrado em Reprodução Animal) - Belo Horizonte, MG, Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, 70p.
- BASKIN, G.B Endometrial hyperplasia, polyps and adenomyosis associated with unopposed oestrogen in Rhesus monkeys. *Vet. Pathol.*, v.39, p.572-575, 2002.
- BERGHOLT, T., ERIKSEN, L. *et al.* Prevalence and risk factors of adenomyosis at hysterectomy. *Hum. Reprod.*,v.16, p. 2418-2421, 2001.
- BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W.G. *et al.* Matrix metelaloproteinases: a review. *Crit. Rev. Biol. Med.*, v.4, p.197-250,1993.
- BOCHSLER, P.N.; SLAUSON, D.O. Inflammation and repairs of tissue. *In: Slauson, D.O. and Cooper, B.J. Mechanisms of disease. A textbook of comparative general pathology*. 3.ed. New York: Mosby, p.170-171, 2002.
- BROW, T.R. Steroid Hormones, overiew. *In\_\_Encyclopedia of Reproduction*. 4. ed. San Diego: Academic press, p.634 – 661, 1999.
- BUKULMEZ, O.; HARDY, D.B.; CARR, B.R. *et al.* Inflammatory status influences aromatase and steroid receptor expression in endometriosis. *Endocrinol.* v.29, p.53-67, 2007.
- BULUN, S.E.; CHENG, Y.; IMIR, G. *et al.* Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol. Cell. Endocrionol.* v. 258, 94-103, 2006.
- CHABBERT-BUFFET, N.; MEDURI, G. *et al.* Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanism of action and clinical applications. *Hum. Reproduc. Up.* v.11, n.3, p. 293-307, 2005.

- COUSIN, F.J.; HEWITT, S.C.; KORACH, K.S. Steroid receptors in the ovary and uterus. *In Physiology of reproduction*. Elsevier. 3ed.p.593-657, 2006.
- CHUNG, H.W.; LEE, J.Y. *et al.* Matrix metalloproteinases-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. *Fertil. Steril.*, v.8, p.787-795, 2002.
- COOPER, B.J. Disease at the cellular level. *In Slauson, D.O. and Cooper, B.J. Mechanisms of disease. A textbook of comparative general pathology*. 3.ed. New York: Mosby, p.27-38, 2002.
- CURRY, T.; OSTEEN, K. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endoc. Rev.*, v.24, p. 428-465, 2003.
- CUSTIS, K.M.; HILLIS, S.; MARCHBANKS, P. Disruption of the endometrial-myometrial border during pregnancy as a risk factor for adenomyosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 55, p. 543-554, 2002.
- DASSEN, H. PUNYADEERA, C.; KAMPS, R. *et al.* Estrogen metabolizing enzymes in endometrium and endometriosis. *Hum. Reproduct.* v.22, n.12, p.3148-3158, 2007.
- DEVLIEGER, R.; D'HOOOGHE, T. and TIMMERMAN, D. Uterine adenomyosis in the infertility clinic. *Hum. Reprod. Up.*, v.9, p.139-147, 2003.
- GAETJE, R.; KOTZIAN, S.; HERRMANN, G. Invasiveness of endometriotic cells in vitro. *Lancet.*, v.346, p.1463-1474, 1995.
- GHORA, T.K.; KUMAR, R. and PALIWAL, O.P. Etiology of uterine affections in buffaloes. *Ind. J. Vet. Pathol.*, v.21, p.24-26, 1997.

- GRIEKSPoor, A.; ZWART, W.; NEEFJES, J.; MICHALIDES, R. Visualizing the action of steroid receptors in living cells. *J. Nuclear Receptor Signaling Atlas*. v.5, p.15-25, 2007.
- HAFEZ, E.S.E., JAINUDEEN, M.R., ROSNINA, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: HAFEZ, E.S.E. e HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7ed. Barueri-SP: Manole, p.33-53, 2004.
- HART, J.E. Endocrine pathology of estrogens species differences. *Pharmacol. Ther.*,v. 47, p. 203-218, 1990.
- HASHIZUME, K; TAKAHASHI, T; SHIMIZU, M. Matrix-metalloproteinases-2 e -9 production in bovine endometrial cell culture. *J. Reproduct. Develop.*, v.49, p.45-53, 2003.
- HIRATA, M.; SATO, T.; TSUMAGARI, M. Differential regulation of the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by cytokines and growth factors in bovine endometrial stromal cells and trophoblast cell line bt-1 in vitro. *Biol. Reprod.*, v.68, p.1276-1281, 2002.
- HIRATA, M.; SATO, T.; TSUMAGARI, M. Discoordinate regulation of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in bovine endometrial stromal cells on type-I collagen gel. *Biol. Pharm. Bull.*, v.26, p.1013-1027, 2003.
- HULBOY, D.L.; RUDOLPH, L.A.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol. Hum. Reprod.*, v.3, p.27-45,1997.
- INAGAKI, N.; UNG, L.; OTANI, T.; WILKINSON, D. Uterine cavity metalloproteinase and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. *Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.*, v.4, p.27-35, 2003.
- JACKSON, K.S.; BRUDNEY, A.; HASTINGS, J.M. *et al.* The altered distribution of the steroid hormone receptors and the chaperone immunophilin FKBP52 in a

baboon model of endometriosis is associated with progesterone resistance during the window of the uterine receptivity. *Reproduct. Scienc.* v.14, n.2, p.137-150, 2007.

JONES, T. C.; HUNT, D.R. and KING, N.W. System Genital *In\_\_ Patologia Veterinária.* 6. ed. São Paulo: Manole, p.1169, 1997.

JUBB, K.V. and KENNEDY, P.C. The Female Genital System *In\_\_ Pathology of Domestic Animals.* 4. ed. Saint Louis: Academic Press, p.377, 1987.

KIMMINS, S. and MACLAREN, L.A. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placent.*, v.22, p. 742-748, 2001.

KITAWAKI, J.; KADO, N.; ISHIHARA, H. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *Ster. Bioch. Mol. Biol.*,v. 83, p.149-155, 2003.

KITAWAKI, J.; NOGUEHI, T.; AMATSU, K. *et al.* Expression of aromatase cytochrome P450 protein and RNA in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol. Reproduct.* V.57, p. 514-519, 1997.

LEVGUR, M.; ABADL, M.A.; TUCKER, A. Adenomyosis: Symptoms, Histology and Pregnancy terminations. *Obstet. Gynecol.*, v.95, p.1054-1060, 2000.

LESSEY, B.A.; PALOMINO, W.A.; APPARAO, K.B.C. *et al.* Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and defects in uterine receptivity in women. *Reproduc. Biol. Endocrinol.* v.4, p.60-70, 2006.

MANGELSDORF, D.J.; THUMMEL, C.; BEATO, M. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* v. 83, 835-839, 1995.

MATSUDA, M.; SASABE, H.; ADACHI, Y. Increased invasion activity of endometrial stromal cells and elevated expression of matrix metalloproteinase messenger RNA

in the uterine tissues of mice experimentally induced adenomyosis. *Gen. Obstet. Gynecol.*, v.185, p.1374-1380, 2001.

McENTEE, K. The uterus: atrophic, metaplastic and proliferative lesions *In\_ Reproductive Pathology of Domestic Mammals*. 1.ed. San Diego: Academic Press, p.171, 1990.

MOREIRA, L. (2005) *Adenomiose em úteros bovinos: Histopatologia, concentração de nitrito e imunoistoquímica para receptores de estrógeno*. Tese (Mestrado em Produção Animal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 57p.

MOREIRA, L.; SILVEIRA, L.S.; LEMOS, L.S. *et al.* Histopatologia da adenomiose em vacas abatidas no Norte Fluminense. *Cien. Anim.Bras.*, v.7, p.85-91, 2006.

MOREIRA, L.; CARVALHO, E.C.Q.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C. Aspectos histopatológicos em úteros bovinos nas diferentes fases do ciclo estral. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.5, p.1097-1102, 2007.

MOREIRA, L.; CARVALHO, E.Q.C.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C. Concentração de nitrito endometrial e a ocorrência de patologias uterinas. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, v. 45, p. 206-210, 2008.

MORI, T; KURATA, Y; TABATA, Y. Priming effects of novel nonsteroidal progesterone receptor modulators CP8816 and CP8863 on the development of adenomyosis in the mouse uterus. *Life Sci.*, v.71, p.527-535, 2002.

MORI, T.; NAGASAWA, H.; TAKAHASHI, S. The induction of adenomyosis in mice by intrauterine pituitary isografts. *Life Sci.*, v.29, p.1277-1282, 1981.

MORI, T.; YAMASAKI, S.; MASUI, F.; MATSUDA, M. Suppression of the the development of experimentally induced uterine adenomyosis by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817, in mice. *Exp. Biol. Med.*, v.5, p.429-433 2000.



- MONTEIRO, C.M.R.; FARIAS, E.C.; PERRI, S.H.V.; SOUZA, W.M. Estudo das características histológicas do útero e tubas uterinas de vacas e novilhas Nelore (*Bos primigenius indicus*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 40: 5-19.
- MOURA, M.A. (2003) *Biópsia Endometrial em vacas repetidoras de cio provenientes de programas de transferência de embriões*. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Reprodução Animal) – Niterói-RJ, Universidade Federal Fluminense – UFF, 56p.
- MUNSON, L.; GARDNER, I.A.; MASON, R.J. Endometrial hyperplasia and mineralization in zoo felids treated with melengestrol acetate contraceptives. *Vet. Pathol.*, v.39, p. 419-427, 2002.
- NASCIMENTO, E.F. e SANTOS, R.L. *Patologias do útero In\_\_Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos*.1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.57-8,1997.
- NISHINAKA, K. and FUKUDA, Y. Changes in extracellular matrix materials in the uterine myometrium of rats during pregnant and post-parturition. *Acta. Pathol.*, v. 41, p.122-132, 1991.
- OLIVER, D.L.; SCHWARTZ, L.B. Endometriosis. *N. Engl. J. Méd.* v.328, p.1759-1769, 1993.
- OSTEEN, KG; BRUNNER-TRAN, K.L.; EISENBERT, E. Reduced progesterone action during endometrial maturation: a potential risk factor for the development of endometriosis. *Fertil Steril.* v.83, p.529-537, 2005.
- OTA, H.; IGARASHI, S; HATAZAWA, J. Immunohistochemical assessment of superóxido dismutase expression in endometriosis and adenomyosis. *Fertil. Steril.*, v.72, p.155-161, 1999.

- OTA, H.; IGARASHI, S.; KATO, N. Aberrant expression of glutathione peroxidase in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertil. Steril.*, v.74, p.177-182, 2000.
- OTA, H.; IGARASHI, S.; SATO, N. Involvement of catalase in the endometrium of patients with endometriosis and adenomyosis. *Fertil. Steril.*, v.78, p.123-131, 2002.
- OTA, H.; IGARASHI, S.; TANAKA, T. Endothelial nitric oxide synthase in the endometrium during the menstrual cycle in patients with endometriosis and adenomyosis. *Fertil. Steril.*, v. 69, p.165-172,1998a.
- OTA, H.; IGARASHI, S.; TANAKA, T. Xanthine Oxidase in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertil. Steril.*, v.75, p.147-56, 2001.
- PARROT, E.; BUTTERWORTH, M. *et al.* Adenomyosis-A Result of Disordered Stromal Differentiation. *Am. J. Path.*, v.159, p.103-119, 2001.
- PEREIRA, F.E.L. Degenerações. Morte Celular. Alterações do interstício. In FILHO, G.B. *Bogliolo Patologia Geral*. 3ed. Guanabara Koogan, p.44-82, 2004.
- PRIEDKALNS, J. Female reproductive system. In: DELLMANN, H-D. *Textbook of veterinary histology*. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.233-242, 1993.
- ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; LAMMING, G.E. WATHES, D.C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy. *Reproduc.*, v.122, p. 965-979, 2001.
- RODGERS, W.H.; MATRISIAN, L.M.; GIUDICE, L.C. Patterns of matrix metalloproteinases expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *Am. Soc. Clin. Inv.*, v.94, p. 946-953, 1994.

- SAITO, T.; MIZOMOTO, H.; KUROKI, K. Expression of MMP3 and TIMP1 in endometrioses and the influence of danazol. *Acta. Obst. Gynecol.*, v.47, p.495-506, 1995.
- SANTOS, I.B.; MIRANDA, L.H.M. *et al.* Adenomiose focal e difusa em cadelas. *Rev. Cien. Vida*, v.28, p.79-83, 2008.
- SCHAMS, D. e BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domes. Anim.Endocrinol.*, v.23, p. 53-65, 2002.
- SCHINDI, M.; BINER, P.; OBERMAIR, A. Increased microvessel density in adenomyosis uteri. *Fertil. Steril.*, v.74, p. 131-135, 2001.
- SICKLER, D.C.; DELLMANN, H.D. E BROWN, E. Connective and supportive tissues. *In: DELLMANN, H.D. Text book veterinary histology.* 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.29-32, 1993.
- SLAUSON, D.O. Disturbances of blood flow and circulation. *In* Slauson, D.O. and Cooper, B.J. *Mechanisms of disease. A textbook of comparative general pathology.*3.ed. New York: Mosby, p.125-126, 2002.
- STOCKLIN, G.N.; GUSCETTI, F.; REICHLER, I.M. Identification of focal adenomyosis as a uterine lesion in two dogs. *J. Small. Anim. Pract.*, 42:413-416.
- STOCO, D.M. sTAR protein and regulation of steroid hormone. *Ann. Rev. Physiol.* v. 63, p.193-213, 2001.
- TSUBOI, R.; SATO, Y.; RIFIKIN, D.B. Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. *J. Cell. Biol.*, v.110, p. 511-527, 1990.
- TRANGUCH, S.; CHEUNG-FLYNN, J.; DAIKOKU, T *et al.* Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation. *Proc. Nat. Acad Sci. USA.* v.102, p.14326-14331, 2005..

- VAN VEEN, H.A. and PEEREBOOM, J.H.J.C. The influence of the estrous cycle on the volume density and appearance of collagen containing vacuoles in fibroblasts of the rat uterus. *Virch. Arch. Pathol. Anat. Histopathol.*, v.53, p.23-31,1987.
- WALTER, I. and BOOS, A. Matrix metalloproteinases (MMP-2 e MMP-9) and tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in the placenta and interplacental uterine wall in normal cows and cattle with retention of fetal membranes. *Placen.*, v. 22, p.473-483, 2001.
- WANG, P-H.; YANG, T-S.; LEE, W-L. Treatment of infertile women with adenomyosis with a conservative microsurgical technique and a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil. Steril.*, v.73, p.1061-1672, 2002.
- YAMADA, O.; TODOROKI, J-C; TAKAHASHI, T.; HASHIZUME, K. The dynamic expression of extracellular matrix in the bovine endometrium at implantation. *Theriogenol.*, v. 64, p.207-214, 2002.
- ZHOU, Y-F.; MATSUDA, M.; MORI, T. Effects of mifepristone (RU486) treatment on the development of uterine adenomyosis induced by pituitary grafting mice. *Life Sci.*, v.67, p. 2713-2720, 2000.

**ARTIGO I**

Aspectos histopatológicos da adenomiose em úteros bovinos nas diferentes  
fases do ciclo estral

*[Histopathological aspects of adenomyosis in bovine uteri in different phases of the estrous cycle]*

L. *Moreira*<sup>1</sup>, E.C.Q. *Carvalho*<sup>1</sup>, M.C. *Caldas-Bussiere*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Setor de Morfologia e Anatomia Patológica – LSA/CCTA/UENF;

<sup>2</sup>Setor de Reprodução Animal – LMGA/CCTA/UENF,

Av. Alberto Lamego, 2000

28013-602 - Campos dos Goytacazes, RJ

## RESUMO

Relacionaram-se as características da adenomiose com as fases do ciclo estral em 61 peças de úteros de bovinos colhidas em matadouros. A adenomiose foi classificada em superficial e profunda. A fase do ciclo estral foi estimada pela morfologia, coloração e vascularização do corpo lúteo e presença ou não de folículos ovarianos maiores que 8mm. Os animais que estavam em anestro (n=11) apresentaram a menor ocorrência de adenomiose (8,2%), e os que estavam na fase lútea média (n=21), a maior (31,0%). Nas fases lútea inicial (n=13) e folicular (n=16) as ocorrências foram semelhantes, 18,0 e 22,9%, respectivamente. A maior porcentagem de adenomiose profunda ocorreu nas fases lútea inicial e média, 45,0 e 47,4%, respectivamente, e durante o anestro e a fase folicular foram de 20,0 e 14,3%, respectivamente. Os resultados sugerem que a fase do ciclo estral influencia na ocorrência de adenomiose e no grau de infiltração miometrial das glândulas endometriais.

Palavras-chave: bovino, adenomiose, ciclo estral, histopatologia

**ABSTRACT**

The correlation of the adenomyosis characteristics with the phases of the estrus cycle in 61 cows bovine's uteruses collected in slaughterhouses was studied. The adenomyoses were classified as superficial and deep. The morphology, staining and vascularization of the corpus luteum and the presence or not of larger ovarian follicles than 8mm helped estimate to estrus cycle. The cows in anestrus (n=11) showed least occurrence of adenomyosis (8,2%) and the animals in the medium luteal phase (n=21) was the largest (31,0%). In the initial luteal phase (n=13) and the follicular phase (n=16) the occurrences of adenomyosis were similar 18.0 and 22.9%, respectively. The largest percentage of deep adenomyosis was found in the initial and in the medium luteal phases 45.0 and 47.4%, respectively, and during the anestrus and the follicular phase were 20.0 and 14.3%, respectively. The data suggest that the cycle phase influences in adenomyosis occurrence and in the degree of miometrial infiltration of the endometrial glands.

Keywords: bovine, adenomyosis, estrous cycle, histopathology.

**INTRODUÇÃO**

A adenomiose uterina é caracterizada pela localização distópica de glândulas e estroma endometrial por entre os feixes musculares do miométrio (Jubb e Kennedy, 1987; Moreira et al., 2006), sendo considerada um crescimento celular benigno e relativamente incomum em fêmeas domésticas. De acordo com a literatura, a adenomiose é um achado ocasional em vacas, como parte de um desarranjo local na aplasia segmentar, ou pela má-formação de uma das extremidades dos cornos uterinos (Jubb e Kennedy, 1987).

Estudos sugerem que essa enfermidade seja causada, primariamente, pela desestruturação da borda endométrio-miometrial, que consiste em uma matriz extracelular (MEC) especializada que separa as camadas uterinas, mantendo-as compartimentalizadas. Sua integridade é mantida pela ação conjunta das colagenases e seus inibidores, por sua vez, são modulados pelos hormônios reprodutivos, citocinas e fatores de crescimento localmente produzidos em humanos e animais (Matsuda et al., 2001; Curry e Osteen, 2003). Assim, alterações no perfil

hormonal, estrógenos, progestágenos e prolactina, poderão culminar com uma invasão da camada muscular pelos componentes endometriais - células do estroma e glândulas endometriais (Levgur et al., 2000; Mori et al., 2000).

Atribui-se a essa enfermidade interferência na sobrevivência espermática e embrionária, e na implantação do embrião, em função de alterações vasculares (Levgur et al., 2000), de estresse oxidativo (Ota et al., 1998) e de degradação excessiva da MEC (Mori et al., 2000), levando a modificações no microambiente uterino, culminando com subfertilidade e infertilidade em mulheres e animais de laboratório (Mori et al., 2000; Inagaki et al., 2003).

Diante da escassez de informação e diagnóstico da adenomiose em fêmeas bovinas, este trabalho teve os objetivos de identificar e classificar a adenomiose de fêmeas bovinas não prenhes e relacioná-la com a fase do ciclo estral.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram colhidas 61 genitálias e gônadas, individualmente protocoladas, de fêmeas bovinas azebuadas, não-prenhes, em idade reprodutiva, abatidas em matadouros frigoríficos estaduais, do município de Campos dos Goytacazes, RJ, entre março de 2003 e dezembro de 2004.

A fase do ciclo estral foi estimada no momento da colheita por meio das características morfológicas do corpo lúteo, de acordo com Pavlock et al. (1992). As peças eram armazenadas em recipientes térmicos refrigerados e remetidas ao laboratório. Uma amostra de 5cm de comprimento e 3cm de largura, retirada do terço medial de um dos cornos uterinos e aberta com a superfície serosa voltada para um papel filtro, para evitar o seu dobramento, era fixada em formalina neutra tamponada a 10% e, após um período mínimo de 48 horas, era processada por inclusão em parafina, cortada a 5 $\mu$  e corada pelos métodos hematoxilina e eosina, tricromático de Gomori e Van-Gieson.

Para auxiliar a determinação da intensidade de penetração de tecido endometrial por entre as fibras miometriais, era utilizado o método classificatório recomendado por Moreira et al. (2006), que obedeceu ao grau de infiltração do foco glandular no miométrio em: a) superficial



- quando a insinuação glandular não ia além do miométrio superficial, na profundidade correspondente ao diâmetro de uma a três unidades glandulares, e b) profunda - quando a insinuação glandular ultrapassava o miométrio superficial, na profundidade correspondente ao diâmetro de mais de três unidades glandulares.

Para a análise da ocorrência, classificação da adenomiose e a fase do ciclo estral foi utilizado o teste do qui-quadrado diferenciado (Kruskal Wallis) com  $\alpha$  de 0,05, pelo procedimento *FREQ/CHISQ* do SAS.

## **RESULTADOS**

Oito peças uterinas exibiram projeções nodulares na superfície serosa (Fig.1A), que ao corte longitudinal revelaram espessamento da parede do útero (Fig.1B), que estava acometido por adenomiose profunda, confirmada pela histopatologia (Fig.1C).

Pela coloração de Van-Gilson, evidenciou-se acentuada proliferação de colágeno, provavelmente proveniente do endométrio (estroma endometrial), acompanhando as glândulas infiltradas no miométrio (Fig. 1A, E e F).

Foram diagnosticados 49 (80,3%) casos de adenomiose. A maior frequência ocorreu na fase lútea média (Tab. 1) e não se observou diferença acentuada na frequência de adenomiose entre as fases folicular e lute inicial. Outras relações entre o número de animais estudados, a fase do ciclo estral e a ocorrência de adenomiose, e entre a fase do ciclo estral e o tipo de adenomiose (superficial ou profunda) são apresentadas ou podem ser calculadas a partir dos resultados encontrados na Tab. 1 e na Fig. 2.

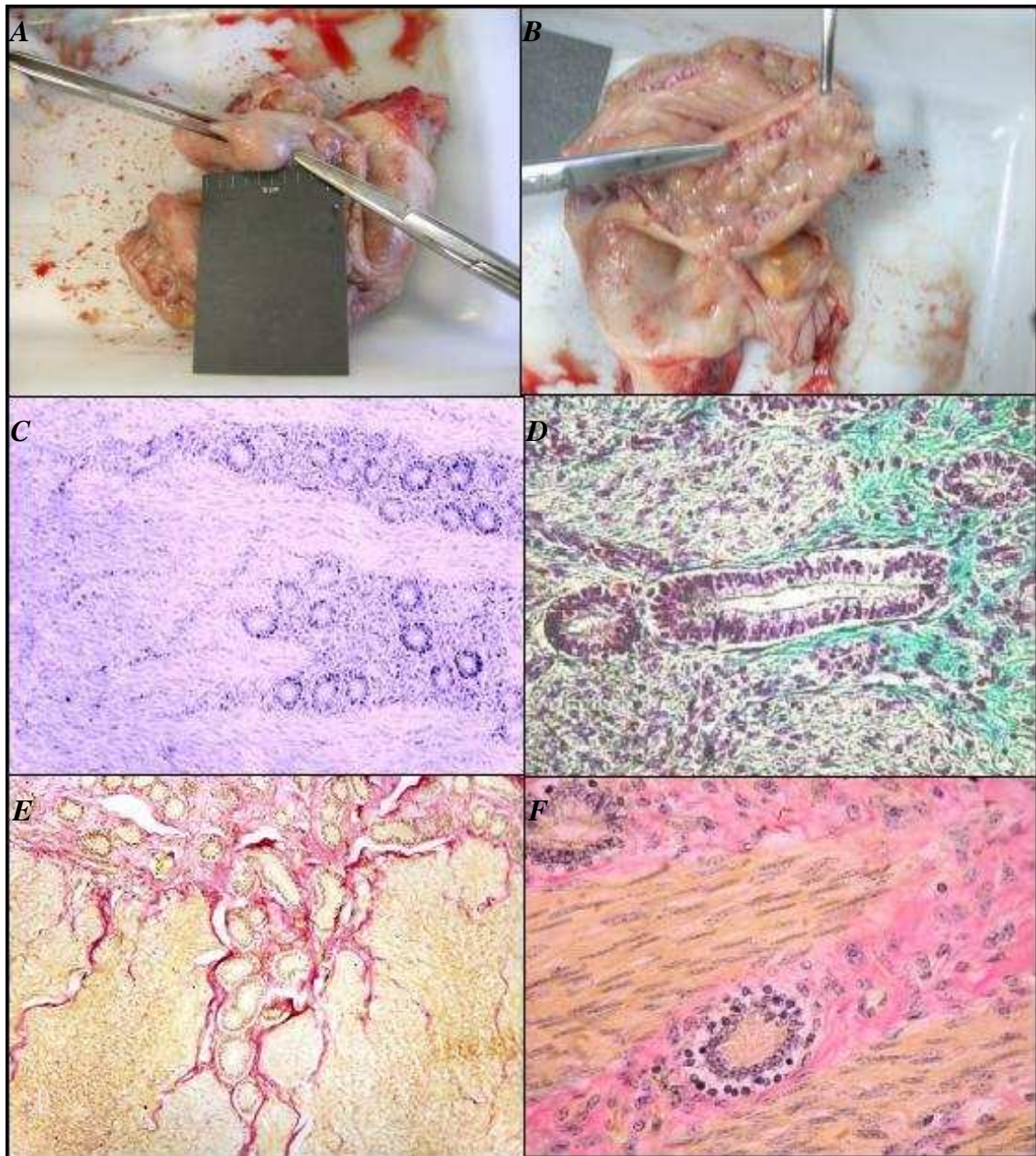


Figura 1. Útero de vaca. Adenomiose. A) Nódulo uterino, projetado contra o perimétrio. B) Corte longitudinal do corno uterino, mostrando espessamento da parede. C) Glândulas e estroma endometriais imersas no miométrio profundo; Obj.10x; HE. D) Colágeno (verde) acompanhando as unidades glandulares imersas em miométrio superficial; Obj. 40x; Tricromático de Gomori. E e F) Glândulas endometriais imersas em miométrio; Obj. 10x e 40x, respectivamente, Van-Gieson; note as fibras colágenas coradas em vermelho e fibras musculares em amarelo.

Tabela 1. Frequência de adenomiose segundo o ciclo estral em fêmeas bovinas abatidas em matadouros

Fase do ciclo estral	Com adenomiose (%)		Sem adenomiose (%)
	Superficial	Profunda	
Anestro	36,4 (4/11)	9,1 (1/11)	54,6 (6/11)
Folicular	75,0 (12/16)	12,5 (2/16)	12,5 (2/16)
Lútea inicial	46,2 (6/13)	38,5 (5/13)	15,4 (2/13)
Lútea média	47,6 (10/21)	42,9 (9/21)	9,4 (2/21)

## DISCUSSÃO

Na pecuária de corte, fêmeas que apresentam baixa eficiência reprodutiva geralmente são descartadas sem que se tenha uma análise mais detalhada do seu histórico reprodutivo. Isso pode estar associado a muitos fatores, como o não diagnóstico de alguma afecção reprodutiva, infecções associadas ao trato reprodutivo, má qualidade do sêmen e falhas de manejo, em geral, que resultam na eliminação de indivíduos de alto potencial genético. O resultado de 80,3% de adenomiose em úteros bovinos é uma evidência de que se deve dar maior importância a essa enfermidade que, apesar da dificuldade de diagnóstico, poderia ser apontada como um dos motivos de descarte de animais em idade reprodutiva.

A adenomiose severa resulta em um aumento de volume do útero, atribuído à hipertrofia e hiperplasia da musculatura uterina adjacente ao foco adenomiótico em camundongas (Mori et al., 1981) e mulheres (Parrot et al., 2001). O aumento do volume uterino encontrado neste estudo (Fig.1A e B) pode ser explicado pelo distúrbio do crescimento da musculatura lisa em úteros acometidos por adenomiose, aspecto já relatado pelos autores citados, no entanto, nenhuma análise morfométrica foi realizada nesta investigação.

Segundo Matsuda et al. (2001) e Custis et al. (2002), a migração de tecido endometrial dá-se ao longo do trajeto dos vasos sanguíneos, com comprometimento da MEC da borda endométrio-miometrial e da membrana basal dos vasos e das glândulas endometriais que participam do processo, explicando a desorganização e a invasão do colágeno endometrial no miométrio observados neste experimento (Fig.1E). Segundo Curry e Osteen (2003), as colagenases dão suporte à invasão do miométrio devido à degradação direta da MEC e pela

indução de fatores de crescimento liberados pelas membranas basais degradadas por essas proteinases, que estão elevadas nessa enfermidade em camundongas (Mori et al., 2000) e humanos (Inagaki et al., 2003).

A administração crônica de estrógenos induz adenomiose uterina em humanos e animais (Hart, 1990). O tecido acometido por essa desordem do crescimento celular sintetiza estrógenos e seus receptores, portanto é classificada como estrógeno-dependente (Kitawaki et al., 2003). No entanto, para que ocorra o desenvolvimento da doença, é necessário que haja o sincronismo entre estrógenos e progesterona, ou seja, que exista sensibilização do endométrio por esses esteróides (Mori et al., 1981).

A menor frequência de adenomiose das vacas em anestro, provavelmente, ocorreu em razão da baixa concentração de estrógenos e progesterona. À medida que a concentração desses esteróides se elevou, a ocorrência da desordem aumentou, seguindo um padrão cíclico mostrado pela regressão linear (Fig. 2).

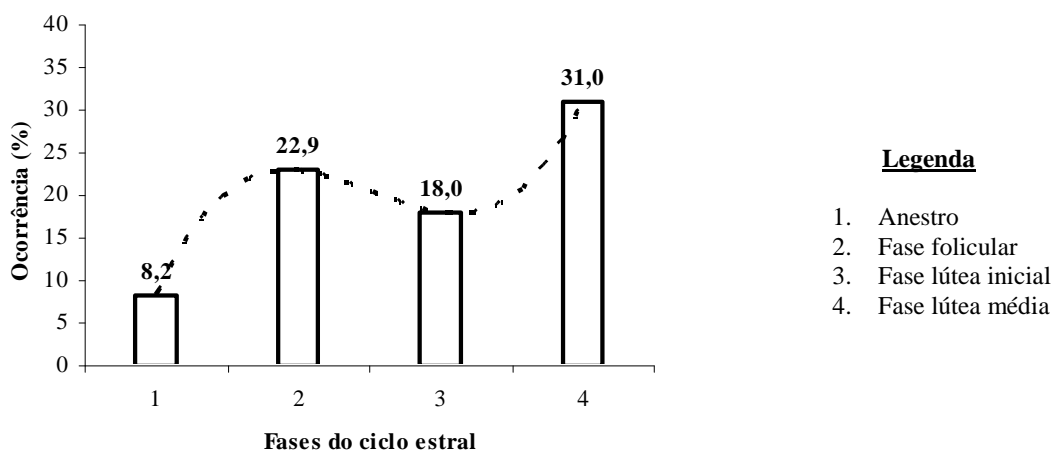


Figura 2. Porcentagem de ocorrência de adenomiose de acordo com a fase do ciclo estral de fêmeas bovinas abatidas em matadouros.

A fase folicular, que apresentou a maior ocorrência de adenomiose superficial (75,0%), onde o grau de infiltração não ultrapassou o miométrio superficial, permitiu sugerir que esse estágio do ciclo estral seja um ponto de retorno (proliferação), isto é, que há regressão da lesão em alguns animais quando o estímulo estrogênico cessa, principalmente das glândulas basilares.

A fase lútea, que exibiu a maior ocorrência de adenomiose (49,0%), mais elevada na fase lútea média (31,0%), sugere que há alguma influência da progesterona na progressão da doença.

De acordo com Mori et al. (1981), é necessária a administração de estrógeno e progesterona conjuntamente para indução de adenomiose em camundongas ovariectomizadas. Assim, propõe-se classificar a adenomiose como enfermidade esteróide-dependente. No entanto, essa desordem tem os estrógenos como fator desencadeador, proliferando em uma fase estrógeno-dependente e, provavelmente, seja mantida e amplificada na fase lútea, em que a progesterona é o principal hormônio secretado pelos ovários. Os resultados encontrados neste estudo confirmam os já observados em mulheres e camundongas. Ainda, a utilização de antiprogestinas foi capaz de promover a regressão da enfermidade em mulheres e animais, reforçando o papel fundamental da progesterona na manutenção da adenomiose (Singtripop et al., 1992; Mori et al., 2002; Wang et al., 2002).

Portanto, é importante que a fase do ciclo estral seja levada em consideração no momento da colheita de amostra uterina para diagnóstico da adenomiose em vacas, sendo o anestro o momento ideal para o diagnóstico, pois as concentrações dos esteróides ovarianos estão em níveis basais, não interferindo na apresentação da moléstia.

De acordo com a literatura consultada, a adenomiose é um achado ocasional em vacas como desordem congênita (Jubb e Kennedy, 1987) e, também, é encontrada em cadelas junto à hiperplasia endometrial cística (McEntee, 1990). A adenomiose uterina foi observada em novilhas/vacas abatidas em matadouros por Monteiro et al. (2003), que observaram ocorrência de 26,7% (16/60) em Birigupi-SP, e por Moreira et al. (2006), 70,4% (19/27). As porcentagens são conflitantes incluindo a deste estudo, contudo não se trata de um achado congênito e tão incomum em vacas, como relatado pela literatura.

A escassez de registros dessa distrofia nas fêmeas domésticas de interesse agropecuário talvez se justifique por ser uma lesão da túnica miometrial que, classicamente, não compõe as amostras para biopsia endometrial. Por se tratar de víscera sem nenhum valor comercial, existe pouco interesse pelas peças (genitálias femininas), que são descartadas nos matadouros.

A presente investigação da adenomiose uterina em vacas mostrou grande similaridade com a adenomiose em úteros de mulheres, o que permite sugerir mecanismos de formação semelhantes. Além disso, este estudo suporta a idéia de que a prolongada estimulação hormonal de glândulas basais no início do processo de formação desse distúrbio permite a proliferação e invasão miometrial.

Conclui-se que o número de casos de adenomiose foi elevado em vacas abatidas na Região Norte Fluminense e que a fase do ciclo estral, no momento da colheita uterina, influencia no grau de infiltração de tecido endometrial, ao mostrar um padrão de apresentação de acordo com a fase do ciclo estral (*status* hormonal) e exibir maior ocorrência na fase lútea.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Prof<sup>a</sup> Celia Raquel Quirino pela realização da análise estatística, aos técnicos do SMAP e LMGA, aos Matadouros Estaduais de Campos dos Goytacazes, RJ, e a UENF-FAPERJ pelo financiamento desta investigação.

### ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

CURRY, T.; OSTEEEN, K. The matrix metaloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr. Rev.*, v.24, p.428-465, 2003.

CUSTIS, K.M.; HILLIS, S.; MARCHBANKS, P. Disruption of the endometrial-myometrial border during pregnancy as a risk factor for adenomyosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.55, p.543-554, 2002

HART, J.E. Endocrine pathology of estrogens species differences. *Pharmacol. Ther.*, v.47, p.203-218, 1990.

INAGAKI, N.; UNG, L.; OTANI, T. et al. Uterine cavity metalloproteinase and citokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. *Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.*, v.4, p.1-7, 2003.

- JUBB, K.V.; KENNEDY, P.C. The Female Genital System. In: *Pathology of domestic animals*. 4. ed. Saint Louis: Academic, 1987. cap.4, p.377
- KITAWAKI, J.; KADO, N.; ISHIHARA, H. Endometriosis: The pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v.83, p.149-155, 2003.
- LEVGUR, M.; ABADL, M.A.; TUCKER, A. Adenomyosis: symptoms, histology and pregnancy terminations. *Obstet. Gynecol.*, v.95, p.688-691, 2000.
- MATSUDA, M.; SASABE, H.; ADACHI, Y. Increased invasion activity of endometrial stromal cells and elevated expression of matrix metalloproteinase messenger RNA in the uterine tissues of mice experimentally induced adenomyosis. *Gen. Obstet. Gynecol.*, v.185, p.1374-1380, 2001.
- McENTEE, K. The uterus: atrophic, metaplastic and proliferative lesions. In: McENTEE, K. (Ed.). *Reproductive pathology of domestic mammals*. San Diego:Academic, 1990. cap.11, p.167-190.
- MONTEIRO, C.M.R.; FARIAS, E.C.; PERRI, S.H.V. et al. Estudo das características histológicas do útero e tubas uterinas de vacas e novilhas Nelore (*Bos primigenius indicus*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.40, p.5-19, 2003 .
- MOREIRA, L.; SILVEIRA, L.S.; LEMOS, L.S. et al. Histopatologia da adenomiose em vacas abatidas no Norte Fluminense. *Cien. Anim. Bras.*, v.7, p.85-91, 2006.
- MORI, T.; KURATA, Y.; TABATA, Y. Priming effects of novel nonsteroidal progesterone receptor modulators CP8816 and CP8863 on the development of adenomyosis in the mouse uterus. *Life Sci.*, v.71, p.527-535, 2002.
- MORI, T.; NAGASAWA, H.; TAKAHASHI, S. The induction of adenomyosis in mice by intrauterine pituitary isografts. *Life Sci.*, v.29, p.1277-1282, 1981.
- MORI, T.; YAMASAKI, S.; MASUI, F. et al. Suppression of the the development of experimentally induced uterine adenomyosis by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817, in mice. *Exp. Biol. Med.*, v.5, p.429-433, 2000.
- OTA, H.; IGARASHI, S.; TANAKA, T. Endothelial nitric oxide synthase in the endometrium during the menstrual cycle in patients with endometriosis and adenomyosis. *Fertil. Steril.*, v.69, p.165-172, 1998

PARROT, E.; BUTTERWORTH, M.; GREEN, A. et al. Adenomyosis - A result of disordered stromal differentiation. *Am. J. Pathol.*, v.159, p.623-630, 2001.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, A. et al. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, v.31, p.63-67, 1992.

SINGTRIPPO, T.; MORI, T.; SAKAMOTO, S. et al. Suppression of the development of uterine adenomyosis by danazol treatment in mice. *Life Sci.*, v.51, p.1119-1125, 1992.

WANG, P-H.; YANG, T-S.; LEE, W-L. et al. Treatment of infertile women with adenomyosis with a conservative microsurgical technique and a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil. Steril.*, v. 73, p.1061-1072, 2002.



**ARTIGO II**

## **Expressão desordenada de receptores- $\alpha$ de estrógeno e receptores de progesterona em úteros de vacas com adenomiose**

*Discoordinated expression of estrogen receptor- $\alpha$  and progesterone receptor in bovine uterus with adenomyosis.*

Lio Moreira; Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho; Maria Clara Caldas Bussiere  
Universidade Estadual do Norte Fluminense/HVET- Av. Alberto Lamego, 2000, Pq.  
Califórnia, 28013-202, Campos dos Goytacazes, RJ.

### **Resumo**

Nesta investigação o perfil imunistoquímico dos receptores- $\alpha$  de estrógeno (RE- $\alpha$ ) e de receptores de progesterona (RP) foi avaliado em úteros bovinos normais e com adenomiose. Amostras uterinas de 62 vacas, em idade reprodutiva, foram colhidas em matadouros e divididas de acordo com a fase folicular ou lútea (inicial ou média) e grau de adenomiose (superficial ou profunda). Seções teciduais (4 $\mu$ m) foram incubadas com anticorpo primário anti-RE- $\alpha$  e anti-RP *overnight* a 4°C e evidenciados pelo método biotina-estreptoavidina-peroxidase-DAB. Na fase folicular, a expressão dos RE $\alpha$  e RP foi mais elevada em seções uterinas com adenomiose profunda, quando comparada com os demais espécimes. A expressão de RP foi maior em seções uterinas normais na fase lútea inicial, principalmente nas estruturas epiteliais (P<0,05) enquanto que, na fase lútea média, houve expressão de RE- $\alpha$  (P<0,05) e ausência de RP nas glândulas e estroma endometriais. Os resultados mostraram que a expressão dos RE- $\alpha$  e RP estão desregulados em úteros com adenomiose e podem ser usados como biomarcadores de endométrio disfuncional.

Palavras-chave: adenomiose; receptores esteróides; vacas; úteros.

## Abstract

The present report cell type- and location-specific distribution patterns of estrogen receptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) and progesterone receptor (PR) were examined in the normal and with adenomyosis bovine's uteri during follicular and luteal phases of estrous cycle by immunohistochemistry. The uterine samples of 62 cows, in reproductive age, were taken from the medial third from one of the uterine horns, at the local slaughterhouse and divided according to the phase of the estrous cycle (follicular or middle or luteal) and degree of adenomyosis (superficial or deep). In follicular phase, the ER- $\alpha$  and RP expression was higher in uterine sections with deep adenomyosis, in comparison with other specimens. The PR expression was higher in normal uterine sections, in initial luteal phase, mainly in epithelial structures ( $P < 0,05$ ), while in the middle luteal phase, there was RE- $\alpha$  expression and the RP were not detected in endometrial glands and stroma. The data suggest that RE- $\alpha$  and PR expression were discoordinate in adenomyosis of cows and it could be used like biomarkers of endometrium dysfunctional.

Keywords: adenomyosis, steroid receptor, uteri, cows.

## Introdução

A adenomiose uterina é descrita como a localização de tecido endometrial entre os feixes miometriais (DEVLIEGER, *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2006). Em mulheres, é considerado um distúrbio do crescimento celular benigno e estrógeno-dependente (KITAWAKI *et al.*, 2003). Sua etiologia é desconhecida, mas reside em uma natureza complexa e multifatorial, que resulta em falha reprodutiva em mulheres (DEVLIEGER, *et al.*, 2003); roedores (MORI *et al.*, 2000; INAGAKI *et al.*, 2003) e bovinos (FERREIRA *et al.*, 2008).

A literatura descreve que a ocorrência de adenomiose é um evento secundário a uma disfunção prévia no endométrio eutópico, levando a uma incapacidade endometrial de responder às vias de sinalização moduladas pela progesterona, e responder exageradamente às vias estimuladas pelos estrógenos (BULUN *et al.*, 2006; DASSEN *et al.*, 2007).

No trato reprodutivo feminino saudável estão associados tecidos especializados, cuja funcionalidade depende da sinalização direta e seqüencial dos esteróides sexuais durante o ciclo estral. A natureza responsiva do endométrio aos esteróides cria um complexo de mudanças fisiológicas necessárias ao desenvolvimento do embrião. Uma comunicação precisa e ordenada das vias bioquímicas envolvendo a ação dos hormônios esteróides sexuais, bem como fatores de crescimento e citocinas localmente produzidos são imprescindíveis para controlar o crescimento e a diferenciação do endométrio (CHABBERT-BUFFET *et al.*, 2004; LESSEY *et al.*, 2006).

Os distúrbios da receptividade uterina ao embrião podem representar uma via comum em muitos indivíduos com desordens do tipo estrógeno-dependente. A ocorrência de receptores- $\alpha$  de estrógeno (RE- $\alpha$ ) no endométrio durante a fase lútea média pode ser considerada como um biomarcador de um endométrio com enfermidade estrógeno-dependente (LESSEY *et al.*, 2006).

O mecanismo de formação da adenomiose ainda não está completamente esclarecido, contudo em vacas, sabe-se que sua forma de apresentação está relacionada com as fases do ciclo estral (MOREIRA *et al.*, 2007). Tem sido proposto que sua origem possa residir na alteração de qualquer um dos intrincados sistemas de regulação uterina (JACKSON *et al.*, 2007). Diante do exposto, propôs-se avaliar a expressão de RE- $\alpha$  e de receptores de progesterona (RP) em úteros de vacas com adenomiose nas fases folicular e lútea do ciclo estral.

## **Material e métodos**

### **Amostras**

Os 62 espécimes selecionados provieram do terço-médio de um dos cornos uterinos, de vacas não prenhes em idade reprodutiva abatidas em matadouros locais. A colheita e o preparo das amostras, e a avaliação do ciclo estral e dos graus de adenomiose uterina foram realizados segundo a metodologia proposta por MOREIRA *et al.* (2007).

As amostras foram divididas em: Grupo I - composta por seções uterinas normais na fase folicular (n=12) e na fase lútea inicial (n=2) e média (n=2). Grupo

II – seções uterinas com adenomiose superficial na fase folicular (n=15), na lútea inicial (n=7) e média (n=2). Grupo III – seções uterinas com adenomiose profunda na fase folicular (n=8), na lútea inicial (n=7) e média (n=7) (Tab.1, 2 e 3).

### **Imunoistoquímica**

Seções em parafina de 4µm foram obtidas das amostras uterinas selecionadas e colhidas em lâminas histológicas silanizadas (Silano, Sigma-Aldrich, MO, USA) submetidas à desparafinização em 5 banhos em xilol (10 min) e reidratação em 5 banhos de alcoóis graduados (5 min) e 3 banhos em água deionizada (5 min). A seguir, os espécimes foram tratados com solução aquosa de peróxido de hidrogênio 30V (Vetec, RJ, Brasil) a 30% por 30 min para bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente, eram colocados em banho-maria a 98°C em tampão citrato (Vetec, RJ, Brasil), por 30 min para recuperação antigênica e mantidos em temperatura ambiente por 20 min. Subseqüentemente, as lâminas eram cuidadosamente enxutas com papel toalha, os cortes envolvidos circularmente com Dako pen® (Dako, CA, USA), e os espécimes incubados por 1 h com solução para bloqueio de ligações inespecíficas [Trisma-NaCl (Vetec, RJ, Brasil) com 1% de soroalbumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA – Sigma-Aldrich, MO, USA)] e 1% de leite em pó desnatado (Molico™ - Nestlé, SP, Brasil). Depois de descartada a solução de bloqueio, as seções foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-RE-α (Fk Biotec, RS, Brasil, clone AER-311/314) e anti-RP (Dako, CA, USA, clone PgR-636) diluídos 1:100 em água ultrapura e incubados *overnight* a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, as lâminas eram lavadas com solução salina de Trisma com tween 20-TBS (Vetec, RJ, Brasil) por cinco min e tratadas com o *Kit* LSAB-HRP<sup>+</sup> (Dako, CA, USA), lavadas por 5 min. com TBS e reveladas com *Kit* cromógeno DAB (Dako, CA, USA); contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratadas em banhos de alcoóis (1min) e montadas com Permount® (Sigma-aldrich, MO, USA).

### **Análise dos dados**

As intensidades de imunomarcção foram avaliadas em microscópio óptico de luz branca (Olympus BX41, MI, USA) no epitélio luminal, estroma endometrial superficial e profundo (compacto e esponjoso), capilares endometriais, glândulas

superficiais e profundas, tecido endometrial infiltrado (estroma endometrial e glândulas) no miométrio; borda endométrio-miometrial, miométrio e vasos miometriais (médica e endotélio), em 3 campos microscópicos escolhidos pela intensidade da reatividade, obedecendo ao seguinte escore: (0) para negativo; (+) para fracamente positivo; (++) para positivo e (+++) para fortemente positivo (WALTER e BOOS, 2001).

As médias, de intensidade de cada estrutura foram analisadas pelo teste Kruskal Wallis e comparação entre duas médias pelo teste de Mann-Whitney ( $\alpha = 5\%$ ).

## **Resultados**

### **Fase folicular**

Todas as seções uterinas exibiram maior intensidade de reatividade para RE- $\alpha$  do que para RP, mas somente as fibras endometriais apresentaram diferenças significativas, com uma maior expressão em seções com adenomiose profunda, apesar da baixa intensidade de reatividade observada, quando comparadas com as demais estruturas teciduais avaliadas (fig.1A e tab.1).

Os RE $\alpha$  e RP apresentaram maiores médias de intensidade de reatividade nas seções com adenomiose profunda, exceto para RE- $\alpha$  nas glândulas endometriais profundas e infiltradas no miométrio, e para os RP nas glândulas endometriais profundas e estroma profundo.

A expressão de RP nas seções com adenomiose profunda foi maior no epitélio superficial, estroma do endométrio superficial e vasos endometriais ( $P < 0,05$ ), mas nunca excediam a expressão de RE- $\alpha$ , exceto no estroma do endométrio superficial, na adenomiose profunda (fig.1A).

### **Fase lútea Inicial**

A expressão dos RPs foram maiores nas estruturas epiteliais, miométrio e limite endometriais, das seções uterinas normais, e apresentaram pico de expressão (+++), quando comparada com as seções com adenomiose superficial e profunda ( $P < 0,05$ ), e foram mais elevadas que a expressão de RE- $\alpha$ , a não ser no estroma do endométrio superficial (fig.1B e 2A).

No miométrio das seções com adenomiose superficial, ocorreu marcação para ambos os receptores, contudo somente os RE- $\alpha$  mostraram diferenças, exibindo maiores médias as seções teciduais normais ( $P < 0,05$ ).

No limite endometriometrial, só houve reatividade para os RE- $\alpha$  nos espécimes com adenomiose superficial ( $P < 0,05$ ), enquanto que elevada reatividade foi observada para os RP, principalmente em seções uterinas normais ( $P < 0,05$ ).

### **Fase lútea média**

A expressão dos RE- $\alpha$  e RP foram maiores no epitélio superficial e nas glândulas endometriais superficiais, das seções com adenomiose superficial e profunda (fig.1C). A intensidade de reatividade para os RE- $\alpha$  foi elevada nas células epiteliais das glândulas endometriais superficiais ( $P < 0,05$ ) e profundas ( $P > 0,05$ ), nos úteros com adenomiose superficial e profunda (fig.2B), quando comparadas com úteros normais.

Todas as seções uterinas exibiram elevada intensidade de reatividade para RP, o que não ocorreu nas glândulas profundas, onde as seções uterinas normais exibiram baixa reatividade, contrastando com a elevada reatividade observada nos úteros com a referida distrofia (fig.1C), contudo as médias não apresentaram diferenças.

O estroma do endométrio superficial das seções normais, os RE- $\alpha$  e RP foram indetectáveis, e nas seções com adenomiose superficial, somente houve expressão para os RP ( $P < 0,05$ ), enquanto que, naqueles com adenomiose profunda, somente ocorreu expressão dos RE- $\alpha$  (fig.C/D), apesar de não ter havido diferença significativa (tab.1).

### **Discussão**

As fases do ciclo estral estudadas, os RE- $\alpha$  revelaram ser mais intensamente expressos em úteros com adenomiose superficial e profunda, apresentando-se mais elevados nas fases folicular e lútea média. Em seções uterinas normais, na fase folicular, ocorreu elevada média de intensidade de reatividade para RE- $\alpha$ , seguidas pela adenomiose superficial e profunda,

enquanto que na fase lútea média, estas foram similares em seções uterinas com adenomiose superficial e profunda.

Conforme KIMMINS e MCLAREM (2001) e ROBINSON *et al.* (2001), durante o ciclo estral em bovinos, a expressão dos receptores esteróides é mais intensamente detectada ao longo da fase folicular do que no diestro. Estes autores sugerem que os estrógenos possuem efeitos estimulatórios sobre o trato reprodutivo de bovinos, como nas mulheres (LESSEY *et al.*, 2006; DASSEN *et al.*, 2007).

Os estrógenos sinalizam para que ocorra a síntese e expressão de RE- $\alpha$  e RP, que alcançam pico no final da fase folicular, e declinam com o decorrer da fase lútea. Estas constatações remetem aos encontrados nas seções uterinas sem adenomiose observadas neste estudo, e diferem daquelas com a desordem em investigada. A fase lútea média, os úteros enfermos exibiram elevada expressão de RE- $\alpha$ , notadamente nas estruturas epiteliais, suportando uma idéia de que existe persistência da estimulação estrogênica nas seções com adenomiose.

Em estudo conduzido em mulheres, os estrógenos estimulam sozinhos a síntese e a expressão dos RE- $\alpha$  e RP, e aumentam a expressão dos genes necessários para divisão celular e crescimento tecidual. Com a ovulação e o início da fase lútea, a progesterona diminui a divisão celular e induz a mudanças secretoras. Na fase lútea média, os RE- $\alpha$  desaparecem completamente, para que a progesterona atue sozinha, especialmente em células alvo no estroma (BULUN *et al.*, 2006; LESSEY *et al.*, 2006).

Desordens endometriais estrógeno-dependente alteram a distribuição de receptores esteróides, especialmente os RE- $\alpha$ , nas células do estroma endometrial eutópico e ectópico, e cria uma comunicação aberrante entre as células do estroma e as epiteliais, tornando o endométrio resistente à ação da progesterona e susceptível à ação estrogênica exagerada, tornando-o incapaz de expressar as moléculas necessárias à implantação e manutenção do embrião (CHABBERT-BUFFET, 2005; BULUN *et al.*, 2006; LESSEY *et al.*, 2006).

Em estudos anteriores (MOREIRA *et al.*, 2007), pode-se observar que durante a fase lútea, a incidência de adenomiose, bem como o grau de infiltração do tecido endometrial no miométrio foram mais elevados, sugerindo influência do



perfil progesterônico no grau de insinuação do tecido endometrial no miométrio, sugerindo que exista uma intensificação da adenomiose durante a fase lútea, e uma possível regressão durante a fase folicular.

Na fase lútea média o endométrio das vacas com adenomiose exibiu um fenótipo estrogênico, principalmente devido à expressão dos RE- $\alpha$  no parênquima e estroma endometriais, associados à expressão diminuída de RP no estroma endometrial e glândulas profundas, principalmente, nos espécimes com a desordem do tipo profunda.

O perfil de expressão dos receptores esteróides, aqui observados, nas estruturas endometriais em úteros com adenomiose, foi diferenciado com relação aos úteros normais. A presença de RE- $\alpha$  e ausência de RP no estroma do endométrio superficial, associada à elevada expressão de RE- $\alpha$  nas glândulas endometriais superficiais e profundas nos úteros com adenomiose profunda, na fase lútea média, sugerem distúrbio estrógeno-dependente como proposto por LESSEY *et al.* (2006).

A elevada expressão dos receptores esteróides na adenomiose superficial, durante a fase lútea inicial e média, mais notadamente os RP, denota um discreto descontrole no início do estabelecimento dessa distrofia, com elevada expressão de ambos os receptores.

A expressão de RE- $\alpha$  e ausência de RP nas glândulas e estroma endometriais sugerem ocorrência de adenomiose, sendo um parâmetro que deve ser levado em consideração nas biópsias endometriais. Esses achados são sugestivos de um endométrio com distúrbio estrógeno-dependente, que pode falhar em expressar as moléculas necessárias à implantação do embrião, culminando em falha reprodutiva (BULUN *et al.*, 2006; DASSEN *et al.*, 2007).

Quanto ao tecido endometrial infiltrado no miométrio (foco adenomiótico), este também mostrou um perfil estrogênico, pois as glândulas endometriais exibiram expressão de RE- $\alpha$  durante a fase lútea inicial e média, resultado também relatado por KITAWAKI *et al.* (2003), que afirmam que os focos adenomióticos em mulheres também expressam RE- $\alpha$  durante a fase lútea.

A elevada expressão dos receptores esteróides, observadas na presente investigação, na fase lútea média quando comparada com a fase lútea inicial, mas notadamente nas estruturas endometriais profundas e limite endometriais,

complementam os resultados anteriores (MOREIRA *et al.*, 2007), em que a porcentagem de ocorrência de adenomiose profunda foi mais elevada na fase lútea média. Ao se comparar os dados do presente experimento com os prévios, permite-se pensar que o endométrio de vacas acometido por adenomiose está responsivo à baixa concentração de estradiol, característico da fase lútea.

A ocorrência de adenomiose, em mulheres, é um evento secundário que confirma e reflete a existência de uma disfunção prévia no endométrio eutópico, traduzida em uma capacidade de não responder às vias de sinalização da progesterona (BULUN *et al.*, 2006; LESSEY *et al.*, 2006) e subsequente inabilidade em regular a atividade proteolítica das metaloproteinases da matriz (OSTEEN *et al.*, 2005). Como resultado existe uma dominância estrogênica das células epiteliais e conseqüente aumento na liberação de citocinas e fatores de crescimento, ativação do sistema de metaloproteinases da matriz, que culminam com a quebra do limite endometriometrial, que permite a migração de tecido endometriometrial.

Os RE- $\alpha$  exibiram maiores médias de intensidade do que os RP em quase todas as estruturas teciduais analisadas, com exceção do limite endometriometrial. A distribuição dos receptores esteróides nos tecidos é regulada durante o ciclo estral por uma conduta celular específica, que não pode ser inteiramente atribuída à regulação pelos próprios hormônios esteróides sexuais. Fatores parácrinos e autócrinos produzidos pela população celular local podem mudar a transcrição da expressão dos genes para os receptores esteróides (CHABBERT-BUFFET, 2005). O limite endometriometrial é composto por matriz extracelular e fibras miometriais diferenciadas, que mantêm essas túnicas separadas (MORI *et al.*, 2000; MATSUDA *et al.*, 2001), e talvez a elevada expressão de RP no limite endometriometrial aqui observadas, seja necessária para manutenção da arquitetura uterina nesse segmento, pelos seus efeitos inibitórios e anti-proliferativos regidos pela progesterona via seu receptor.

RICHARDS e TILTMAN (1995) demonstraram em 20 espécimes uterinos de mulheres histerectomizadas, obtidos na fase folicular, que o miométrio subendometriometrial (limite endometriometrial) expressa maiores concentrações de RE- $\alpha$ , mensurados por imunocitoquímica. Esses dados diferem dos encontrados no presente estudo, mas postulam uma expressão diferenciada nesta zona uterina.

Os resultados do presente estudo revelaram que os RE- $\alpha$  e RP estão desregulados em úteros de vacas com adenomiose, e estes podem ser usados como biomarcadores endometriais, que podem refletir um endométrio com distúrbio estrógeno-dependente e possivelmente acometido por adenomiose.

Os dados induzem a crer que a adenomiose em vacas pode ser considerada um distúrbio estrógeno-dependente, e que os RE- $\alpha$  e RP podem ser usados como indicadores de um endométrio disfuncional.

Os resultados mostraram que os RE- $\alpha$  e RP estão desregulados em úteros de vacas com adenomiose, mostrando uma anormalidade nas vias de sinalização dos receptores esteróides no endométrio, mais notadamente na adenomiose do tipo profunda.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem aos técnicos do Setor de Morfologia e Anatomia Patológica da UENF, aos Matadouros Estaduais de Campos dos Goytacazes-RJ, e a UENF, FAPERJ, CAPES e CNPq pelo financiamento desta investigação.

### **Referências Bibliográficas**

BULUN, S.E. *et al.* Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 258, p.94-103, 2006.

CHABBERT-BUFFET, N. *et al.* Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanism of action and clinical applications. **Hum. Reproduc. Up.** v.11, p. 293-307, 2005.

DASSEN, H. *et al.* Estrogen metabolizing enzymes in endometrium and endometriosis. **Hum. Reproduct.**, v.22, p.3148-3158, 2007.

DEVLIEGER, R. *et al.* Uterine adenomyosis in the infertility clinic. **Hum. Reprod. Up.**, v.9, p.139-147, 2003.

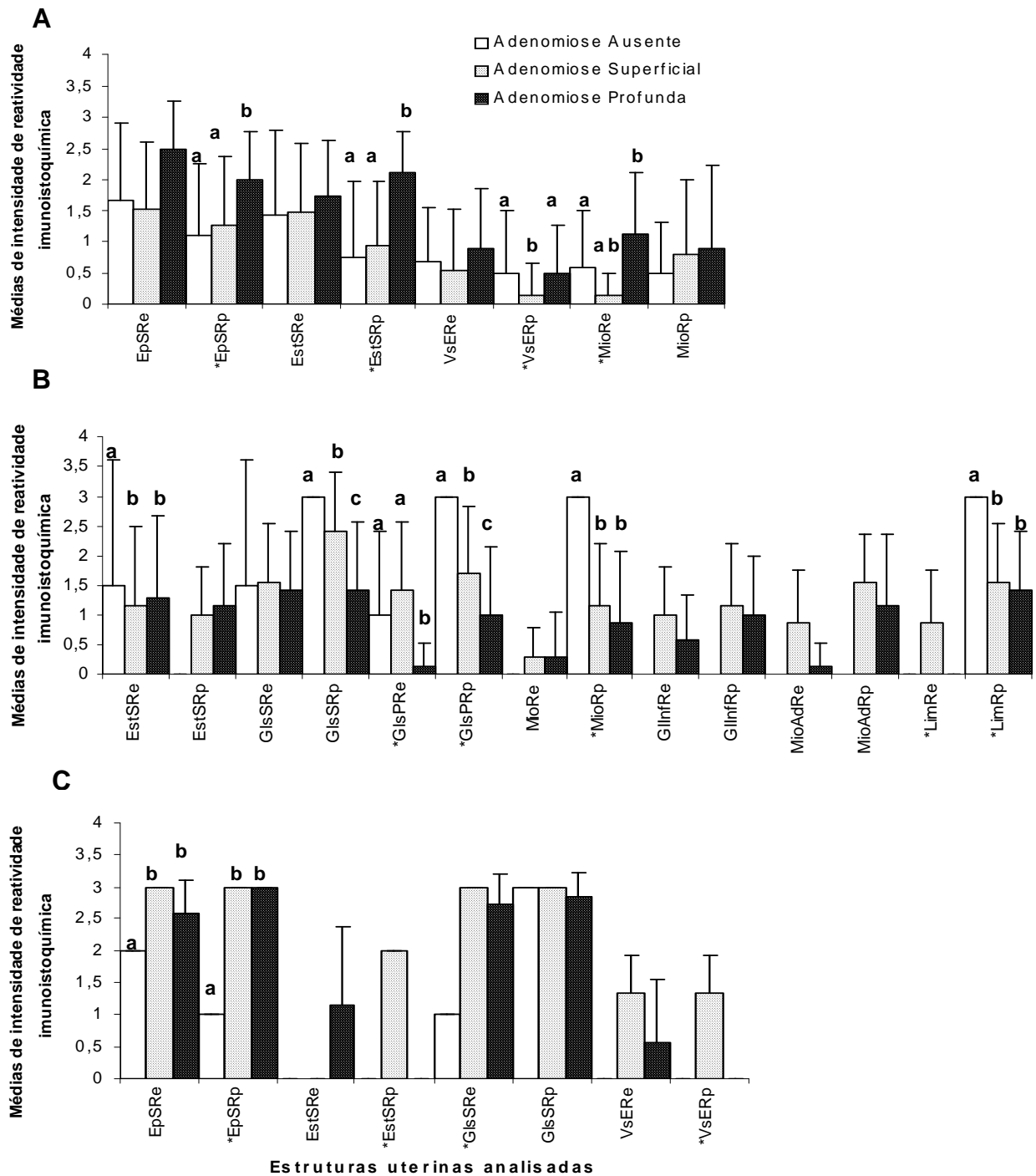
- FERREIRA, R. *et al.* Relationship between clinical and *postmortem* evaluation in repeat breeder beef cows. **Cien. Rural** , v.48, p.1056-1060, 2008.
- INAGAKI, N. *et al.* Uterine cavity metalloproteinase and citokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. **Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.4, p.5-14, 2003.
- JACKSON, K.S. *et al.* The altered distribution of the steroid hormone receptors and the chaperone immunophilin FKBP52 in a baboon model of endometriosis is associated with progesterone resistance during the window of the uterine receptivity. **Reproduct. Scienc.** v.14, n.2, p.137-150, 2007.
- KITAWAKI, J. *et al.* Endometriosis: The pathophysiology as an estrogen-dependent disease. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 83, p.149-155, 2003.
- KIMMINS, S. e MACLAREN, L.A. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. **Placent.**, v.22, p. 742-748, 2001.
- LESSEY, B.A. *et al.* Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and defects in uterine receptivity in women. **Reproduc. Biol. Endocrinol.**, v.4, p.60-70, 2006.
- MATSUDA, M. *et al.* Increased invasion activity of endometrial stromal cells and elevated expression of matrix metalloproteinase messenger RNA in the uterine tissues of mice experimentally induced adenomyosis. **Gen. Obstet. Gynecol.**, v.185, p.1374-1380, 2001.
- MOREIRA, L. *et al.* Histopatologia da adenomiose em vacas abatidas no norte fluminense. **Ciência Ani Brás.**, v. 7, p.85-91, 2006.
- MOREIRA, L. *et al.* Aspectos histopatológicos em úteros bovinos nas diferentes fases do ciclo estral. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, p.1097-1102, 2007.

MORI, T. *et al.* Suppression of the the development of experimentally induced uterine adenomyosis by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817, in mice. **Exp. Biol. Med.**, v.5, p.429-433, 2000.

OSTEEN, K.G. *et al.* Reduced progesterone action during endometrial maturation: a potential risk factor for the development of endometriosis. **Fertil Steril.** v.83, p.529-537, 2005.

RICHARDS, P.A. e TILTMAN, A.J. Anatomical variation of the estrogen-receptor in normal myometrium. **Virchows. Arch. ,Abt.A. Pathol.Anat.**, v.427, p.303-307, 1995.

ROBINSON, R.S. *et al.* Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy. **Reproduc.**, v. 122, p. 965-79, 2001.



**Figura 1.** Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunoistoquímica para receptores  $\alpha$  de estrógeno (Re) e receptores de progesterona (Rp) em úteros bovinos normais e com adenomiiose do tipo superficial e profunda na fase folicular (A) e lútea inicial (B) e média (C). \* $P < 0,05$  pelo teste KruskalWallis. Letras diferentes em cima das barras representam médias diferentes entre si pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). Legenda: Ep – epitélio; EstS- estroma do endométrio superficial; GlS- glândulas endometriais superficiais; GlSP- glândulas endometriais profundas; VsE – vasos endometriais; Mio – fibras miometriais; GlInf – glândulas endometriais infiltradas no miométrio; MioAd – miométrio adjacente ao foco adenomiótico; Lim – limite endometriometrial.

**Tabela 1.** Distribuição imunistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcção para RE- $\alpha$  e RP em úteros bovinos normais e com adenomiose superficial e profunda nas fases do ciclo estral.

Estruturas Teciduais	Úteros normais		Úteros adenomiose superficial		Úteros com adenomiose profunda	
	Fase Folicular					
	RE- $\alpha$	RP	RE- $\alpha$	RP	RE- $\alpha$	RP
<b>Epitélio superficial</b>	+++ (4)/++ (3)/+(2)/0 (3)	+++ (2)/++ (2)/+(3)/0 (5)	+++ (4)/++ (2)/+(7)/0 (2)	+++ (3)/++ (2)/+(6)/0 (4)	+++ (5)/++ (2)/+(1)	+++ (4)/++ (2)/+(2)
<b>Estroma endometrial Superficial</b>	+++ (4)/++ (1)/+(1)/0 (6)	+++ (3)/++ (1)/0 (8)	+++ (3)/++ (5)/+(3)/0 (4)	+++ (2)/++ (1)/+(6)/0 (6)	+++ (1)/++ (5)/+(1)/0 (1)	+++ (2)/++ (5)/+(1)
<b>Vasos endometriais</b>	++ (3)/+(2)/0 (7)	+++ (1)/++ (1)/+(1)/0 (9)	+++ (1)/++ (2)/+(1)/0 (11)	+(1)/0 (14)	+++ (5)/++ (2)/+(1)	+++ (4)/++ (2)/+(2)
<b>Miométrio</b>	++ (3)/+(1)/0 (8)	++ (1)/+(3)/0 (8)	+(2)/0 (13)	+++ (2)/++ (3)/0 (10)	++ (4)/+(1)/0 (3)	+++ (2)/+(1)/0 (5)
<b>Fase lútea inicial</b>						
<b>Estroma endometrial Superficial</b>	+++/0	0	+++ (2)/+(2)/0 (3)	++ (2)/+(3)/0 (2)	+++ (2)/++ (1)/+(1)/0 (3)	+++ (1)/++ (1)/+(3)/0 (2)
<b>Glândulas endometriais superficiais</b>	+++/0	+++	+++ (1)/++ (3)/+(2)/0 (1)	+++ (5)/+(2)	+++ (1)/++ (2)/+(3)/0 (1)	+++ (1)/++ (3)/+(1)/0 (2)
<b>Glândulas endometriais Profundas</b>	++/0	+++	+++ (1)/++ (3)/+(1)/0 (2)	+++ (2)/++ (2)/+(2)/0 (1)	+(1)/0 (6)	+++ (1)/++ (1)/+(2)/0 (3)
<b>Miométrio</b>	+++	0	+(2)/0 (5)	+++ (1)/++ (1)/+(3)/0 (2)	++ (1)/0 (6)	+++ (1)/++ (1)/+(1)/0 (4)
<b>Glândulas infiltradas no Miométrio</b>	-	-	++ (2)/+(3)/0 (2)	+++ (1)/++ (1)/+(3)/0 (2)	++ (2)/+(1)/0 (4)	++ (3)/+(1)/0 (3)
<b>Miométrio adjacente ao foco adenomiótico</b>	-	-	++ (2)/+(2)/0 (3)	+++ (1)/++ (2)/+(4)	+(1)/0 (6)	+++ (1)/++ (2)/+(1)/0 (3)
<b>Limite endometriometrial</b>	-	-	++ (2)/+(2)/0 (3)	+++ (1)/++ (3)/+(2)/0 (1)	0 (7)	+++ (1)/++ (2)/+(3)/0 (1)
<b>Fase lútea média</b>						
<b>Epitélio superficial</b>	++	+	+++	+++	+++ (4)/++ (3)	+++ (7)
<b>Estroma endometrial Superficial</b>	+	0	0	++	+++ (1)/++ (2)/+(3)/0 (1)	0 (7)
<b>Glândulas endometriais superficiais</b>	+	+++	+++	+++	+++ (5)/++ (2)	+++ (6)/++ (1)
<b>Vasos endometriais</b>	0	0	++/+	++/+	++ (2)/0 (5)	0 (7)

Score para as intensidades de imunomarcção: 0 negativo; + fraco positivo; ++ positivo; +++ forte positivo; RE- $\alpha$  – receptor- $\alpha$  de estrógeno e RP – Receptor de progesterona.

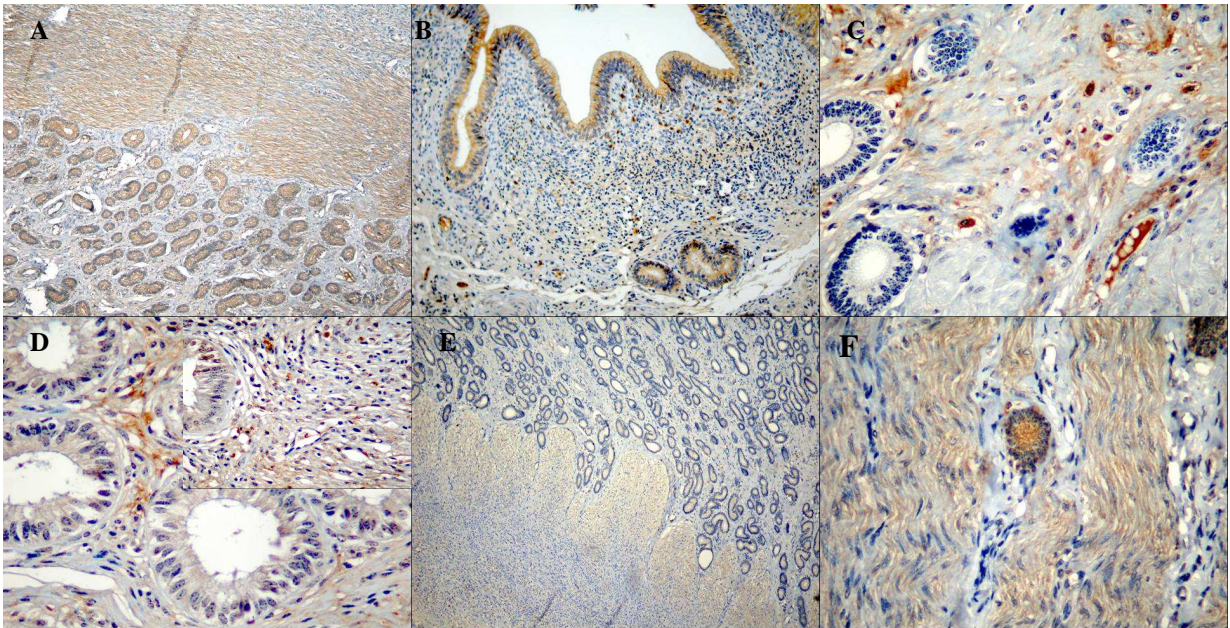


Figura 2. Prancha. Fotomicrografia (COOLPIX 995-Nikon, Tóquio, Japão) de seções uterinas de vacas/imunoistoquímica. (A) fase lútea inicial, útero normal, imunomarcção nuclear e citoplasmática fortemente positiva para RP glândulas profundas e limite endometriometrial e ausência de marcação no estroma endometriometrial, obj10x. (B-F) fase lútea média. (B) adenomiose profunda, note a imunomarcção fortemente positiva para RE- $\alpha$  no epitélio superficial e glândulas endometriometriais superficiais, obj. 20X. (C) adenomiose profunda, imunomarcção nuclear e citoplasmática fortemente positiva para RE- $\alpha$  no estroma e ausência nas glândulas do endométrio profundo, obj.20x. (D) adenomiose profunda, imunomarcção nuclear e citoplasmática fortemente positiva pra RE- $\alpha$  no estroma do endométrio superficial e fraca a moderadamente positiva nas glândulas do endométrio superficial, objs. 10 e 20x. (E) adenomiose superficial, imunomarcção citoplasmática positiva para RP no limite endometriometrial, fracamente positiva nas glândulas do endométrio profundo e infiltradas no miométrio e ausência no estroma endometriometrial profundo e infiltrado, obj.4x. (F) adenomiose profunda, imunomarcção citoplasmática fortemente positiva para RP nas fibras miometriais adjacente ao foco adenomiótico, citoplasmática e nuclear na glândula infiltrada e ausente no estroma infiltrado, obj.20x.



**ARTIGO III**

**Expressão diferenciada de metaloproteinase da matriz-2 e inibidor tecidual de metaloproteinase-2 em úteros de vacas com adenomiose**

*Differential expression of Matrix Metalloproteinase-2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 in uteri of cows with adenomyosis*

**Lio Moreira, Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, Maria Clara Caldas Bussiere**

Universidade Estadual do Norte Fluminense, Hospital Veterinário - Av. Alberto Lamego, 2000, Pq. Califórnia, 28013-202, Campos dos Goytacazes, RJ.

**Resumo**

Amostras uterinas de 58 vacas, em idade reprodutiva, foram coletadas do terço-médio de um dos cornos uterinos, agrupadas de acordo com a fase do ciclo estral (folicular ou lútea inicial ou média) e graus de adenomiose (superficial ou profunda). Seções teciduais (4 $\mu$ m) foram incubadas com anticorpo monoclonal para MMP-2 e TIMP-2 *overnight* a 4°C. As intensidades de imunomarcacão foram avaliadas no epitélio luminal, glândulas e estroma endometriais, capilares endometriais, miométrio, tecido endometrial infiltrado no miométrio (glândulas e estroma), vasos miometriais (túnica média e endotélio) e limite endometriais. Na fase folicular, a expressão de MMP-2 foi mais elevada nas amostras com adenomiose profunda, nos vasos miometriais, miométrio adjacente ao foco adenomiótico e limite endometriais ( $P < 0,05$ ), e excederam a expressão de TIMP-2 em quase todas as estruturas uterinas analisadas, nos casos de adenomiose profunda (exceto nos vasos endometriais e miometriais e limite endometriais,  $P > 0,05$ ). O inverso foi registrado nas seções uterinas normais e com adenomiose superficial, onde a expressão de TIMP-2 excedeu a de MMP-2, na fase folicular. O padrão de expressão para MMP-2 e TIMP-2 na fase lútea inicial não seguiu o mesmo da fase folicular, ao contrário, a reatividade de imunomarcacão foi mais elevada para TIMP-2 na maioria das estruturas analisadas, enquanto que na fase lútea média, a expressão de MMP-2 tornou a se elevar e as de TIMP-2 permaneceram elevadas, principalmente nos espécimes com adenomiose superficial e profunda. Os dados indicam que a expressão dessas enzimas está aumentada em úteros com adenomiose superficial e profunda. Concluiu-se que úteros de vacas com adenomiose exibem um perfil diferenciado na expressão de MMP-2 e TIMP-2 principalmente na fase folicular.

Palavras-chave: adenomiose, MMP-2, TIMP-2, útero, vaca

**Abstract**

The uterine samples of 58 cows, in reproductive age, were taken from the medial third from one of the uterine horns and grouped according to the estrous cycle phase (follicular or Initial or middle luteal) and degree of adenomyosis (superficial or deep). Serial tissue sections (4 $\mu$ m) were incubated with first monoclonal antibody for MMP-2 and TIMP-2 overnight at 4°C. Staining intensities were evaluated in the luminal epithelium, endometrial stroma capillaries and glands and endometrial tissue infiltrated in the myometrium (stroma and glands), endometrial-myometrial border, myometrium, myometrial vessels (middle tunic and endothelium). In follicular phase, the expression of MMP-2 was higher in samples with deep adenomyosis, showing differential reactivated average in superficial endometrium, myometrial vessels, myometrium adjacent to adenomyotic focus and endometrial-myometrial border ( $P < 0,05$ ). Beyond, in specimens with deep adenomyosis, the expression of MMP-2 was higher than TIMP-2 in almost all the uterine structures analyzed (with exception in the endometrial and myometrial vessels and endometrial-myometrial border). The inverse occurred in the specimens with normal and adenomyosis superficial, in follicular phase, where TIMP-2 expression was higher than MMP-2. The pattern of MMP-2 and TIMP-2 expression in luteal phase did not follow the same pattern of follicular phase, on the contrary, the immunostaining reactive, in whole almost tissue structures, was high to TIMP-2, while in middle luteal phase, the expression of MMP-2 came to increased, and the TIMP-2 expression continued high, mainly in tissue sections with deep adenomyosis. The data suggest that expression of these enzymes are controlled by ovary steroids (estrogens and progesterone) and increased in deep adenomyosis. In conclusion, a differential pattern of MMP-2 and TIMP-2 was observed in cow's uteri with adenomyosis, mainly in follicular phase.

Keywords: adenomyosis, MMP-2, TIMP-2, uterus, cow

## Introdução

Adenomiose uterina é um distúrbio do crescimento celular benigno, caracterizado pela localização distópica de tecido endometrial entre os feixes musculares do miométrio (LEVGUR *et al.*, 2000; PARROT *et al.*, 2001). A ocorrência de distúrbios reprodutivos em mulheres (INAGAKI *et al.*, 2003) e animais (MORI *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2008) tem sido associada à adenomiose.

Estudos sugerem que essa desordem seja causada primariamente pela desestruturação do limite endometriometrial, que consiste em uma matriz extracelular (MEC) especializada que separa essas túnicas uterinas. A manutenção da arquitetura tecidual uterina é mantida pela ação conjunta entre as metaloproteinases da matriz (MMPs) e inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (MORI *et al.*, 2000; MATSUDA *et al.*, 2001;HIRATA *et al.*, 2002).

As MMPs são enzimas dependentes de  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  para sua plena atividade, e são responsáveis em degradar componentes da matriz extracelular, como colágenos, laminina e fibronectina. A atividade proteolítica das MMPs é inibida pelas TIMPs, onde ambas são controladas pelos esteróides ovarianos cíclicos, citocinas e fatores de crescimento localmente produzidos. A quebra no balanço da atividade destas enzimas pode estar desencadeada nos processos de invasão tumoral, angiogênese e metástase, e no desenvolvimento de doenças caracterizadas pela degradação excessiva ou deficiente da MEC, como aneurismas (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; BOCHSLER e SALUSON, 2002), endometriose (SAITO *et al.*, 1995) e adenomiose (MORI *et al.*, 2000; MATSUDA *et al.*, 2001).

O colágeno tipo IV está presente na membrana basal dos vasos sanguíneos, glândulas endometriais e epitélio luminal de bovinos (YAMADA *et al.*, 2002), e pode ser degradado pelas MMP-2 e MMP-9, que estão aumentadas em úteros de camundongos (MORI *et al.*, 2000) e mulheres com adenomiose (INAGAKI *et al.*, 2003). Os colágenos tipo I, III, e V na musculatura geralmente protegem contra a invasão de tecido endometrial (MORI *et al.*, 2000; MATSUDA *et al.*, 2001), e o tecido adenomiótico invade as camadas musculares pelas ramificações dos vasos sanguíneos emergentes dos vasos miometriais, pela degradação direta da membrana basal desses vasos, contudo, a membrana basal do parênquima endometrial é mantida. Essa migração é possibilitada primariamente pela ação

proteolítica das MMPs sobre os componentes da MEC da membrana basal (MORI *et al.*, 2000; MATSUDA *et al.*, 2001).

O intuito desta investigação foi caracterizar a expressão e localização de MMP-2 e TIMP-2, no estroma e parênquima endometrial e miometrial de úteros de vacas normais e acometidos por adenomiose, na fase folicular e lútea (inicial e média) do ciclo estral.

## **Material e métodos**

### **Amostras**

Os 58 espécimes selecionados provieram do terço-médio de um dos cornos uterinos, de vacas não prenhes, em idade reprodutiva, abatidas em matadouros. A colheita e o preparo das amostras, e a avaliação do ciclo estral e dos graus de adenomiose uterina foram realizados segundo a metodologia utilizada por MOREIRA *et al.* (2007).

As amostras foram distribuídas em: grupo I – composta por seções uterinas normais na fase folicular (n=12), fase lútea inicial (n=3) e lútea média (n=2); grupo II – composta por seções uterinas com adenomiose superficial na fase folicular (n=13), fase lútea inicial (n=6) e lútea média (n=3); grupo III – composta por seções uterinas com adenomiose profunda na fase folicular (n=7), fase lútea inicial (n=6) e lútea média (n=6).

### **Imunoistoquímica**

Seções em parafina de 4µm foram obtidas das amostras uterinas selecionadas e colhidas em lâminas histológicas silanizadas (Silano, Sigma-Aldrich, MO, USA) submetidas à desparafinização em 5 banhos em xilol (10 min) e reidratadação em 3 banhos em álcool absoluto e 2 em álcool 90% (5 min) e 3 banhos em água deionizada (5 min). A seguir, os espécimes eram tratados com solução aquosa de peróxido de hidrogênio 30V (Vetec, RJ, Brasil) a 30% por 30 min para bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente, eram colocados em banho-maria a 98°C em tampão citrato (Vetec, RJ, Brasil), por 30 min para recuperação antigênica, e mantidos em temperatura ambiente por 20 min. Subseqüentemente, as lâminas eram cuidadosamente enxutas com papel toalha, os cortes envolvidos circularmente com Dako pen® (Dako, CA, USA), e os espécimes incubados por 1 h

com solução para bloqueio de ligações inespecíficas [Trisma-NaCl (Vetec, RJ, Brasil) com 1% de soroalbumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA – Sigma-Aldrich, MO, USA)] e 1% de leite em pó desnatado (Molico™ - Nestlé, SP, Brasil). Depois de descartada a solução de bloqueio, as seções eram incubadas com anticorpo monoclonal anti-MMP-2 (Calbiochem, Tóquio, Japão, clone Ab-4) e anti-TIMP-2 (Neomarkers, CA, USA, clone Ab-5) diluídos 1:100 em água ultrapura e incubados *overnight* a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, as lâminas eram lavadas (5 min) com solução salina de Trisma com Tween20 -TBS (Vetec, RJ, Brasil) e tratadas (30 min) com o *Kit* LSAB-HRP<sup>+</sup> (Dako, CA, USA), lavadas (5 min) com TBS e reveladas com *Kit* cromógeno DAB (Dako, CA, USA); contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratadas em banhos de alcoóis (1min) e montadas com Permount® (Sigma-Aldrich, MO, USA).

### **Análise dos dados**

As intensidades de imunomarcação foram avaliadas em microscópio óptico de luz branca (Olympus BX41, MI, USA) no epitélio luminal, estroma endometrial superficial e profundo, capilares endometriais, glândulas superficiais e profundas, tecido endometrial (estroma endometrial e glândulas) infiltrados no miométrio, limite endometriometrial, miométrio e vasos miometriais (médica e endotélio), em 3 campos microscópicos escolhidos pela intensidade da reatividade (imunomarcação), obedecendo ao seguinte escore: (0) para negativo; (+) para fracamente positivo; (++) para positivo e (+++) para fortemente positivo, de acordo com WALTER e BOOS (2001).

As médias, de intensidade de cada estrutura foram analisadas pelo teste Kruskal-Wallis e para comparação entre duas médias pelo teste de Mann-Whitney ( $\alpha = 5\%$ ).

## **Resultados**

### **Fase folicular**

As seções uterinas com adenomiose profunda apresentaram as maiores médias de intensidade de reatividade para MMP-2 em quase todas as estruturas teciduais analisadas, seguidos daquelas com adenomiose superficial e sem adenomiose (fig.1A). Nos vasos endometriais e estroma endometrial infiltrado no

miométrio, uma maior média de reatividade para MMP-2 foi observada em seções uterinas com adenomiose superficial (fig.1A). O epitélio superficial (pico de expressão), vasos miometriais, miométrio adjacente ao foco adenomiótico e limite endometriometrial mostraram diferenças entre médias ( $P < 0,05$ ), exibindo maior intensidade de imunomarcção para MMP-2 em úteros com adenomiose profunda (fig.1A; 2A/B).

As maiores médias de intensidade de reatividade para TIMP-2, nos úteros com adenomiose superficial, foram percebidas no epitélio superficial, estroma do endométrio superficial, glândulas profundas e glândulas infiltradas no miométrio, enquanto naqueles com adenomiose profunda, os vasos endometriais e miometriais exibiram as maiores médias, mas baixa intensidade de reatividade em todas as seções uterinas ( $P > 0,05$ ) (fig1A). Os úteros normais exibiram elevada expressão de TIMP-2 nas glândulas endometriais superficiais, estroma endometrial profundo e miométrio, contudo, as médias de reatividade não mostraram diferenças entre si em todas as estruturas das seções teciduais analisadas.

Os úteros normais e com adenomiose superficial mostraram uma tendência a exibir maiores médias de intensidade de reatividade para TIMP-2 do que para MMP-2, exceto nos vasos endometriais e estroma endometrial infiltrado no miométrio (nas seções com adenomiose superficial), embora a intensidade de reatividade tenha sido baixa para ambas as enzimas. O epitélio superficial, glândulas endometriais superficiais e limite endometriometrial apresentaram diferenças entre médias de intensidade de reatividade entre MMP-2 e TIMP-2 em seções uterinas normais ( $P < 0,05$ ); e nas glândulas endometriais superficiais, profundas e infiltradas no miométrio ( $P < 0,05$ ) dos úteros com adenomiose superficial (Tab.1).

O inverso foi observado nos úteros com adenomiose profunda, onde maiores médias de intensidade de reatividade foram observadas para MMP-2 do que para TIMP-2 ( $P < 0,05$ ) (Tab.1), com exceção dos vasos endometriais e miometriais, e limite endometriometrial.

### **Fase lútea inicial**

As médias de intensidade de reatividade para MMP-2 nas seções uterinas sem adenomiose foram mais elevadas no epitélio superficial ( $P < 0,05$ ), glândulas endometriais superficiais ( $P < 0,05$ ), profundas ( $P < 0,05$ ) e infiltradas no miométrio ( $P < 0,05$ ) e no citoplasma das fibras miometriais. Enquanto que, nos espécimes com

adenomiose profunda, as médias foram mais elevadas no estroma endometrial profundo e no infiltrado no miométrio, nos vasos miometriais, no miométrio (inclusive naquele adjacente ao foco adenomiótico) e limite endométrio-miometrial. O estroma endometrial superficial e vasos endometriais mostraram as maiores médias para MMP-2 em seções teciduais com adenomiose superficial (fig.1B).

As médias de TIMP-2 foram mais elevadas nas estruturas teciduais com adenomiose profunda, a não ser no epitélio superficial, onde a adenomiose superficial apresentou a maior média de reatividade para TIMP-2, e médias iguais nas glândulas endometriais infiltradas no miométrio. Sendo que, os vasos endometriais e miométrio adjacente ao foco adenomiótico, exibiram diferenças entre médias na expressão de TIMP-2 (Fig.1B).

Uma maior expressão de MMP-2 com relação à TIMP-2 foi observada nas glândulas infiltradas no miométrio ( $P < 0,05$ ) em espécimes com adenomiose superficial e uma maior expressão de TIMP-2 em relação à MMP-2 nas glândulas endometriais profundas ( $P < 0,05$ ) nas seções com adenomiose profunda (Tab.1).

### **Fase lútea média**

A adenomiose profunda apresentou maior média de intensidade de reatividade para MMP-2, à exceção do estroma profundo e vasos endometriais, mas foram no epitélio superficial e glândulas endometriais superficiais que se observaram maiores médias de intensidade de reatividade ( $P < 0,05$ ) (Fig.1C). Ao passo que, a expressão de TIMP-2 foi maior no epitélio superficial, glândulas endometriais profundas e infiltradas no miométrio, fibras miometriais, miométrio adjacente ao foco adenomiótico e limite endomiometrial. Nas demais estruturas a expressão de TIMP-2 foi maior nas seções uterinas com adenomiose superficial, mas sem diferença estatística.

Diferenças na expressão entre MMP-2 e TIMP-2 foram percebidas no miométrio, vasos miometriais e estroma endometrial infiltrado no miométrio, que podem ser mais bem visualizadas na tabela 1.

### **Padrão de imunomarcação**

Todas as seções uterinas apresentaram reatividade para MMP-2 e TIMP-2. A imunomarcação variou de fraco a forte positivo entre as estruturas teciduais de uma mesma lâmina. O padrão de imunomarcação foi citoplasmático, finamente granular



e, muitas vezes, exibindo projeções apicais das células epiteliais luminais e glandulares (Fig.2).

## **Discussão**

A adenomiose uterina é uma lesão benigna que ocorre espontaneamente em humanos e animais. Em mulheres, a adenomiose é uma desordem séria, devido a hemorragias intensas, dor, cólicas e esterilidade (LEVGUR *et al.*, 2000; PARROT *et al.*, 2001), e pouco tem sido demonstrada em animais domésticos.

O mecanismo de formação da adenomiose ainda é pouco entendido, contudo estudos têm indicado que esta distrofia é primariamente causada pela degradação e reconstituição anormal de elementos uterinos adjacentes ao limite entre o endométrio e miométrio (limite endometriometrial), devido à ação descompensada das MMPs e TIMPs, permitindo a invasão de tecido endometrial no miométrio (MORI *et al.*, 2000; MATSUDA *et al.*, 2001; HIRATA *et al.*, 2002).

O presente estudo demonstrou que na fase folicular existe um perfil elevado de expressão de MMP-2 e TIMP-2, quando comparados com a fase lútea inicial e média, principalmente, nos úteros com adenomiose profunda.

Na fase folicular, a expressão de MMP-2 foi mais elevada nas amostras com adenomiose profunda quando comparada com as seções teciduais normais e com adenomiose superficial, exibindo médias de reatividade elevadas no epitélio superficial, vasos miometriais, miométrio adjacente ao foco adenomiótico e limite endometriometrial ( $P < 0,05$ ). Além disso, a expressão de MMP-2 foi maior do que a de TIMP-2 em quase todas as estruturas uterinas analisadas neste estudo, nos casos de adenomiose profunda (exceto nos vasos endometriais e miometriais e limite endometriometrial). O inverso foi encontrado nas seções uterinas normais e com adenomiose superficial, onde a expressão de TIMP-2 excedeu à de MMP-2, na fase folicular (Fig.1A), provavelmente, atuando como inibidor na prevenção da infiltração de tecido endometrial e manutenção da arquitetura uterina normal.

Esses dados indicam que a expressão de MMP-2 está aumentada em úteros com adenomiose profunda durante a fase folicular e estão se sobrepondo aos efeitos inibitórios da TIMP-2, já que seus níveis estavam diminuídos, sugerindo uma maior atividade proteolítica da MMP-2, incrementada pelos baixos níveis de TIMP-2.

O modo de expressão de MMP-2 e TIMP-2 na fase lútea inicial não seguiram o mesmo padrão da fase folicular, ao contrário, a reatividade de imunomarcacão foi mais elevada para TIMP-2 na maioria das estruturas analisadas (Fig.1B). Entretanto, uma menor expressão de MMP-2 com relação à TIMP-2 talvez seja explicada por um efeito de exaustão enzimática, pois a expressão de MMP-2 voltou a se elevar na fase lútea média e os de TIMP-2 continuaram elevados, principalmente, nos espécimes com adenomiose superficial e profunda (Fig. 1C).

Na fase lútea média, existe elevada expressão de ambas as enzimas nas estruturas uterinas analisadas. Este fato induz a crer que a progesterona influencia a expressão dessas enzimas, e complementa os achados de HASHIZUME *et al.* (2001), que demonstraram que culturas de células endometriais de bovinos suplementadas com alta concentração de progesterona (>30ng), incrementa a produção de MMP-2 e, com baixa concentração (<2ng), suprime a produção. Estes autores relataram ainda, que o estradiol estimulou a produção de MMP-2, mas não de forma significativa, sugerindo ser esta uma enzima de expressão constitutiva.

A MMP-2 é ativada em duas etapas. Primeiro, o precursor latente da MMP-2 é clivado pela MT1-MMP e produz um intermediário da MMP-2. A MT1-MMP é uma proteína transmembrana, e o aumento da expressão de MT1-MMP ativa a MMP-2 na superfície da célula, processo requerido para a invasão celular, enquanto que, a TIMP-2 desempenha um papel dual no controle da ativação da MMP-2. Um complexo de TIMP-2 e MT1-MMP é necessário para ativação da pró-MMP-2, em adição, a TIMP-2 sozinha forma complexos estáveis com o sítio ativo da MMP-2, e atua como inibidor específico da MMP-2 (CHUNG *et al.*, 2002; CURRY e OSTEEN, 2003). Portanto, a ativação da MMP-2 depende de um delicado balanço entre a pró-MMP-2, TIMP-2 e MT1-MMP. Por exemplo, na ausência de TIMP-2, a pro-MMP-2 não consegue se ligar na MT1-MMP, não sendo ativada, permanecendo em estado latente, enquanto o excesso de TIMP-2, a pro-MMP-2 não se liga a MT1-MMP, por inibição direta da MMP-2 pela TIMP-2 (CURRY e OSTEEN, 2003). Essa evidência explica a expressão algumas vezes antagônica da TIMP-2 em relação à MMP-2 detectadas no presente estudo.

O fato da MMP-2 ser ativada na membrana plasmática das células pela MT1-MMP e TIMP-2 explica o achado da imunomarcacão ser citoplasmática e apical em alguns casos, para ambas as enzimas (Fig.2F).

A degradação de MEC pelas MMPs é contrabalançada pelas TIMPs, que formam um complexo 1:1 com as MMPs. Assim, um balanço na razão de MMP:TIMP pode ser importante regulador na remodelação da MEC uterina. Níveis aumentados de TIMP-2 sugerem inibição da atividade da MMP-2, enquanto que a expressão de TIMP-2 menor que a de MMP-2, indica a ativação da pro-MMP-2 (CURRY e OSTEEN, 2000).

Esses resultados aduzem a influência dos hormônios esteróides ovarianos cíclicos, onde os estrógenos incrementam a atividade proteolítica da MMP-2 e a progesterona eleva a atividade da TIMP-2, durante a fase lútea inicial, e acaba por modular a atividade entre MMP-2 e TIMP-2 durante a fase lútea média.

Em estudos anteriores (MOREIRA *et al.*, 2007), pôde-se observar que durante a fase lútea, a incidência de adenomiose, bem como o grau de infiltração do foco adenomiótico foram mais elevados, sugerindo influência do perfil progesterônico na profundidade do foco. Esse fato leva a crer que existe uma intensificação da adenomiose durante a fase lútea, e uma possível regressão durante a fase folicular.

A ocorrência de adenomiose é um evento secundário, confirmando e refletindo a existência de uma disfunção prévia no endométrio eutópico, traduzida em uma capacidade de não responder às vias de sinalização da progesterona (LESSEY *et al.*, 2006) e subsequente inabilidade em regular a atividade proteolítica das metaloproteinases da matriz. Como resultado, existe uma dominância estrogênica das células epiteliais e conseqüente aumento na liberação de citocinas e fatores de crescimento, ativação do sistema de metaloproteinases da matriz, que culmina com a quebra da homeostase uterina, o que permite a migração de tecido endometrial (OSTEEN *et al.*, 2005).

Resultados preliminares (dados não publicados) revelaram que os receptores- $\alpha$  de estrógeno e de progesterona estão expressos de forma desordenada em úteros de vacas com adenomiose e refletem um endométrio com distúrbio estrógeno-dependente. Conforme tem sido proposto pela literatura, o endométrio de indivíduos com enfermidade estrógeno-dependente exibe uma falha em responder aos efeitos da progesterona, devido à diminuída concentração de seus receptores (BULUN *et al.*, 2006; LESSEY *et al.*, 2006; JACKSON *et al.*, 2007). Essas informações explicam em parte, o modo de expressão diferenciado de MMP-2 e TIMP-2 em úteros de vacas com adenomiose superficial e profunda observados na presente investigação,

e sugerem que o tecido uterino acometido por adenomiose não responde adequadamente aos esteróides cíclicos ovarianos.

O padrão de imunomarcção deste estudo foi similar aos de WALTER e BOOS (2001), a não ser pela expressão de MMP-2 no epitélio luminal, principalmente naqueles com adenomiose profunda (pico em todas as amostras,  $P < 0,05$ ) (Fig.1).

Apesar de não apresentar diferença significativa, o estroma endometrial profundo mostrou elevada reatividade nas seções uterinas na fase lútea (inicial e média), e uma maior expressão na adenomiose superficial de MMP-2. Esses dados permitem supor que durante o início do processo de formação da adenomiose, haja um aumento da atividade da MMP-2 nesta região uterina, ocasionando a desestruturação do limite endometriometrial e conseqüente migração de tecido endometrial por entre as fibras miometriais.

A expressão elevada de MMP-2 nas estruturas mesenquimais (vasos miometriais e endometriais, fibras miometriais, limite endometriometrial e estroma endometrial infiltrado no miométrio) visualizados neste estudo, complementam os achados de MORI *et al* (2000) e MATSUDA *et al* (2001), onde o processo de migração se dá ao longo das ramificações dos vasos sanguíneos emergentes do miométrio, pela provável quebra do colágeno tipo IV promovido pela MMP-2, que está aumentada nos úteros de vacas com adenomiose.

Os dados sugerem que a expressão dessas enzimas, em úteros de vacas com adenomiose, é diferente quando comparadas com os úteros normais, e compartilham estreita semelhança com aqueles encontrados em mulheres e camundongas. Além disso, as MMPs e TIMPs estão envolvidas diretamente na receptividade endometrial e implantação embrionária em bovinos (WALTER e BOSS, 2001; HIRATA *et al.*, 2002 e 2003; HASHIZUME *et al.*, 2003) e o desequilíbrio na expressão dessas enzimas parece estar associado à adenomiose em vacas e pode acarretar falha reprodutiva nesta espécie.

## **Conclusões**

Na fase folicular existe maior variação na expressão de MMP-2 e TIMP-2 do que na fase lútea.

A expressão de MMP-2, na fase folicular, é maior que a de TIMP-2 nas seções uterinas com adenomiose profunda.

A expressão de MMP-2 é maior em úteros de vacas acometidos por adenomiose profunda.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem aos técnicos do Setor de Morfologia e Anatomia Patológica da UENF, aos Matadouros Estaduais de Campos dos Goytacazes-RJ, e a UENF, FAPERJ, CAPES e CNPq pelo financiamento desta investigação.

### **Referencias bibliográficas**

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W.G. *et al.* Matrix metelaloproteinases: a review. *Crit. Rev. Biol. Med.*, v.4, p.197-250, 1993.

BOCHSLER, P.N. and SLAUSON, D.O Inflammation and repairs of tissue. *In: Slauson, D.O. and Cooper, B.J. Mechanisms of disease. A textbook of comparative general pathology.* 3.ed. New York: Mosby, p.170-171, 2002.

BULUN, S.E.; CHENG, Y.; IMIR, G. *et al.* Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol. Cell. Endocrinol.* v. 258, p. 94-103, 2006.

CURRY, T and OSTEEN, K. The matrix metaloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endoc. Rev.*, v. 24, p.428-465, 2003.

CHUNG, H.W.; LEE, I.Y.; MOON, H-S. *et al.* Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. *Fertil. Steril.*, v.8, p.787-795, 2002.

- HASHIZUME, K.; TAKAHASHI, T.; SHIMIZU, M. Matrix-metalloproteinases-2 e -9 production in bovine endometrial cell culture. *J. Reproduct. Develop.*, v.49, p.45-53, 2003.
- HIRATA, M.; SATO, T.; TSUMAGARI, M. Differential regulation of the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by cytokines and growth factors in bovine endometrial stromal cells and trophoblast cell line bt-1 in vitro. *Biol. Reprod.*, v.68, p.1276-1281, 2002.
- HIRATA, M.; SATO, T.; TSUMAGARI, M. Discoordinate regulation of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in bovine endometrial stromal cells on type-I collagen gel. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 26, p.1013-1027, 2003.
- INAGAKI, N.; UNG, L.; OTANI, T.; WILKINSON, D. Uterine cavity metalloproteinase and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. *Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.*, v.4, p.13-25, 2003.
- JACKSON, K.S.; BRUDNEY, A.; HASTINGS, J.M. *et al.* The altered distribution of the steroid hormone receptors and the chaperone immunophilin FKBP52 in a baboon model of endometriosis is associated with progesterone resistance during the window of the uterine receptivity. *Reproduct. Scienc.* v.14, p.137-150, 2007.
- LESSEY, B.A.; PALOMINO, W.A.; APPARAO, K.B.C. *et al.* Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and defects in uterine receptivity in women. *Reproduc. Biol. Endocrinol.* v.4, p.60-70, 2006.
- LEVGUR, M.; ABADL, M.A.; TUCKER, A. Adenomyosis: Symptoms, Histology and Pregnancy terminations. *Obstet. Gynecol.*, v.95, p.1054-1060, 2000.
- MATSUDA, M.; SASABE, H.; ADACHI, Y. Increased invasion activity of endometrial stromal cells and elevated expression of matrix metalloproteinase messenger RNA

in the uterine tissues of mice experimentally induced adenomyosis. *Gen. Obstet. Gynecol.*, v.185, p.1374-1380, 2001.

MOREIRA, L.; CARVALHO, E.C.Q.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C. Aspectos histopatológicos em úteros bovinos nas diferentes fases do ciclo estral. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.1097-1102, 2007.

MOREIRA, L.; CARVALHO, E.Q.C.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C. Concentração de nitrito endometrial e a ocorrência de patologias uterinas. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, v. 45, p. 206-210, 2008.

MORI, T.; YAMASAKI, S.; MASUI, F.; MATSUDA, M. Suppression of the the development of experimentally induced uterine adenomyosis by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817, in mice. *Exp. Biol. Med.*, v. 5, p.429-433, 2000.

OSTEEN, KG; BRUNNER-TRAN, K.L.; EISENBERT, E. Reduced progesterone action during endometrial maturation: a potential risk factor for the development of endometriosis. *Fertil Steril.* v.83, p.529-537, 2005.

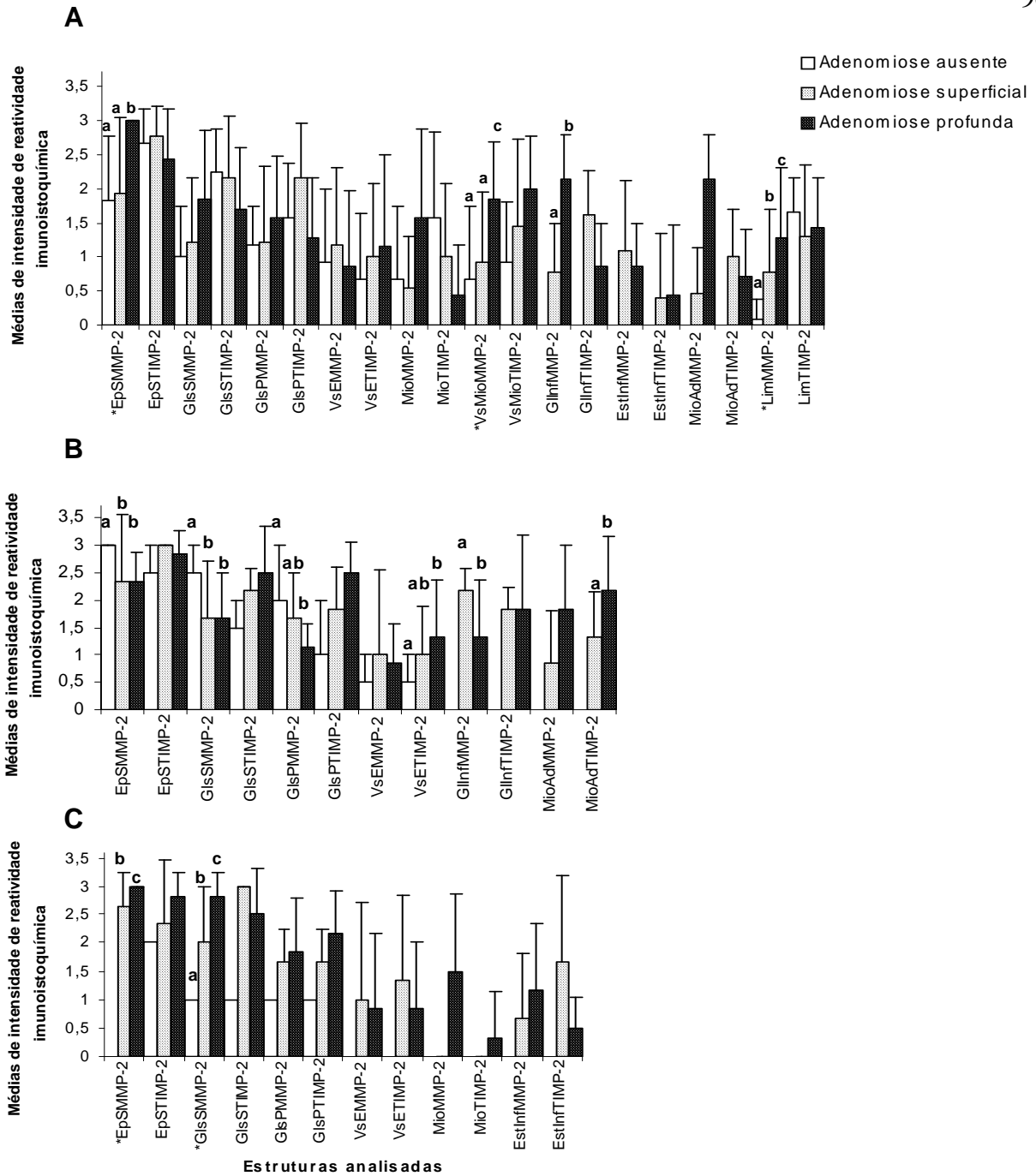
PARROT, E.; BUTTERWORTH, M.; GREEN, A. *et al.* Adenomyosis - A result of disordered stromal differentiation. *Am. J. Path.*, v.159, p.623-630, 2001.

SAITO, T.; MIZOMOTO, H.; KUROKI, K. Expression of MMP3 and TIMP1 in endometrioses and the influence of danazol. *Acta. Obst. Gynecol.*,v.47, p.495-506, 1995.

WALTER, I. and BOOS, A. Matrix metalloproteinases (MMP-2 e MMP-9) and tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in the placenta and interplacental uterine wall in normal cows and cattle with retention of fetal membranes. *Placen.*, v.22, p.473-83, 2001.

YAMADA, O.; TODOROKI, J-C; TAKAHASHI, T.; HASHIZUME, K. The dynamic expression of extracellular matrix in the bovine endometrium at implantation. *Theriogenol.*, v.64, p.207-214, 2002.



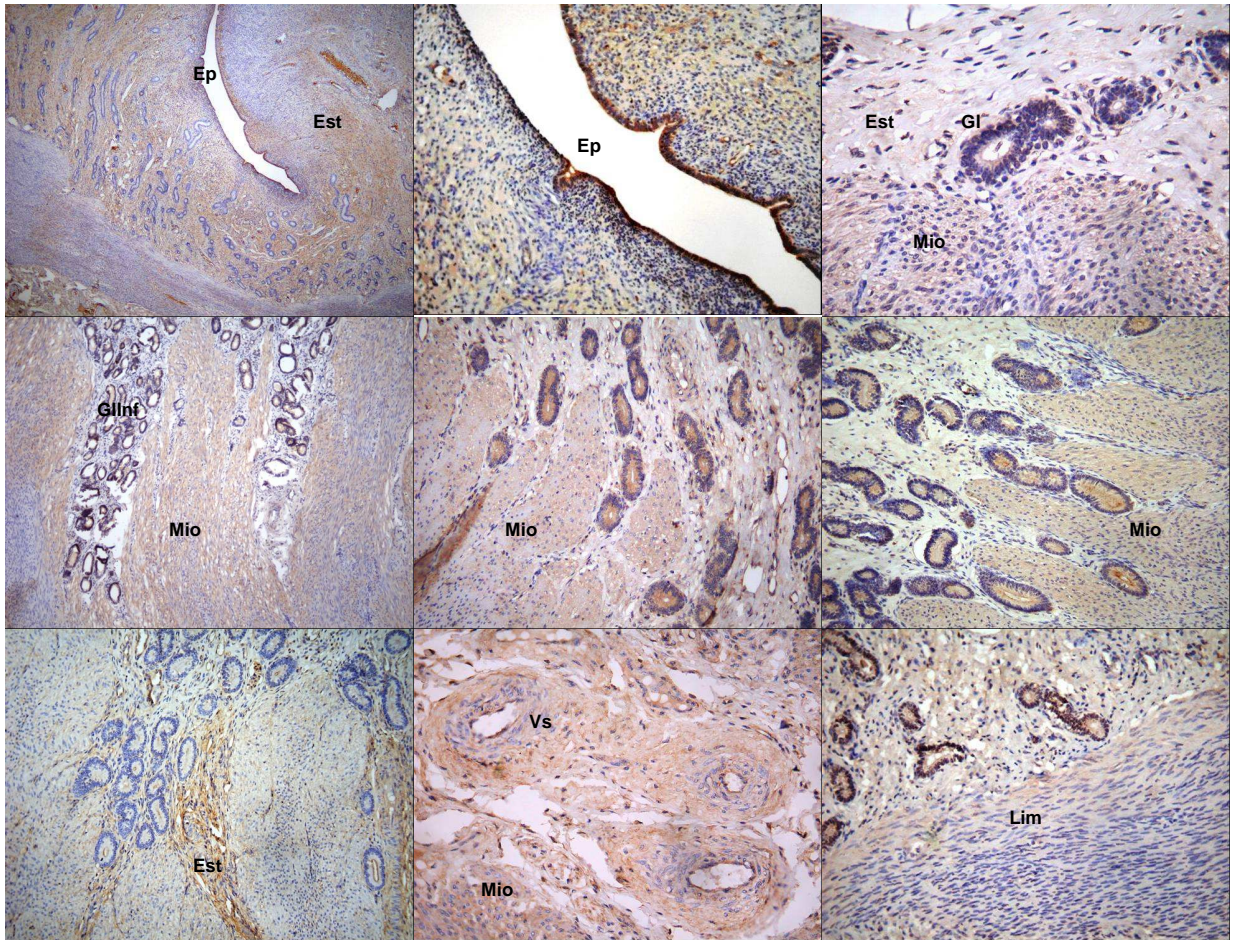


**Figura 1.** Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunoistoquímica para Metaloproteínase da matriz 2 e Inibidor de metaloproteínase 2 em úteros bovinos normais e com adenomyose do tipo superficial e profunda na fases Follicular (A) e lútea Inicial (B) e média (C). \* $P < 0,05$  pelo teste KruskalWallis. Letras diferentes em cima das barras de erro representam médias diferentes entre si pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). Legenda: EpS – epitélio superficial; EstS- estroma do epitélio superficial; GlSs – glândulas endometriais superficiais; GlSp- glândulas endometriais profundas; EstP – estroma profundo; VsE – vasos endometriais; Mio – fibras miometriais; VsMio- vasos miometriais; GlInf – glândulas endometriais infiltradas no miométrio; EstInf – Estroma endometrial infiltrado no miométrio; MioAd – miométrio adjacente ao foco adenomiótico; Lim – Limite endometriais. MMP-2 – Metaloproteínase da matriz 2 e TIMP-2 – Inibidor de metaloproteínase 2.

**Tabela 1.** Distribuição imunoistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcção para MMP-2 e TIMP-2 em úteros bovinos normais e com adenomiose superficial e profunda na fase folicular e lútea do ciclo estral.

Estruturas Teciduais	Úteros com adenomiose profunda					
	Fase folicular		Fase lútea			
	MMP-2	TIMP-2	Inicial		Média	
	MMP-2	TIMP-2	MMP-2	TIMP-2	MMP-2	TIMP-2
Epitélio superficial	+++ (7) <b>A</b>	+++ (4)/++ (2)/+ (1) <b>B</b>	NA	NA	NA	NA
Glândulas endometriais Profundas	NA	NA	++ (1)/+ (5) <b>A</b>	+++ (3)/++ (3) <b>B</b>	NA	NA
Vasos endometriais	+++ (2)/++ (3)/+ (1)/0 (1) <b>A</b>	++ (3)/+ (2)/0 (2) <b>B</b>	NA	NA	+++ (4)/++ (1)/0 (1) <b>A</b>	+++ (2)/++ (1)/0 (3) <b>B</b>
Miométrio	+++ (3)/+ (2)/0 (2) <b>A</b>	++ (1)/+ (1)/0 (5) <b>B</b>	NA	NA	+++ (2)/++ (1)/+ (1)/0 (2) <b>A</b>	++ (1)/0 (5) <b>B</b>
Glândulas endometriais infiltradas no miométrio	+++ (2)/++ (4)/+ (1) <b>A</b>	++ (1)/+ (4)/0 (2) <b>B</b>	NA	NA	NA	NA
Estroma endometrial infiltrado no miométrio	++ (1)/+ (4)/0 (2) <b>A</b>	+ (1)/0 (6) <b>B</b>	NA	NA	+++ (1)/++ (1)/+ (2)/0 (2) <b>A</b>	+ (3)/0 (3) <b>B</b>
Miométrio adjacente ao foco adenomiótico	+++ (2)/++ (4)/+ (1) <b>A</b>	++ (1)/+ (3)/0 (3) <b>B</b>	NA	NA	NR	NA
Úteros com adenomiose superficial						
Glândulas endometriais superficiais	+++ (1)/++ (4)/+ (5)/0 (3) <b>A</b>	+++ (5)/++ (6)/+ (1)/0 (0) <b>B</b>	NA	NA	NA	NA
Glândulas endometriais Profundas	+++ (2)/++ (3)/+ (4)/0 (4) <b>A</b>	+++ (5)/++ (5)/+ (3) <b>B</b>	NA	NA	+++ (2)/++ (1) <b>A</b>	+++ (2)/++ (1) <b>B</b>
Glândulas endometriais infiltradas no miométrio	++ (2)/+ (6)/0 (5) <b>A</b>	+++ (1)/++ (6)/+ (6) <b>B</b>	+++ (1)/++ (5) <b>A</b>	+++ (5)/+ (1) <b>B</b>	NA	NA
Úteros Normais						
Epitélio superficial	+++ (4)/++ (2)/+ (6) <b>A</b>	+++ (8)/++ (4) <b>B</b>	NA	NA	NA	NA
Glândulas endometriais superficiais	++ (3)/+ (6)/0 (3) <b>A</b>	+++ (4)/++ (7)/+ (1) <b>B</b>	NA	NA	NA	NA
Limite endometriometrial	0 (12) <b>A</b>	++ (8)/+ (4) <b>B</b>	NA	NA	NA	NA

Escore para as intensidades de imunomarcção: 0 negativo; + fraco positivo; ++ positivo; +++ forte positivo; MMP-2 – Metaloproteinase da matriz 2 e TIMP-2 – Inibidor de metaloproteinase 2; NA- dados não apresentados . Letras maiúsculas nas linhas representam valores diferentes entres si pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05).



A	B	C
D	E	F

Figura 2. Prancha. Vaca/útero/imunoistoquímica-DAB/ contracoloração Hematoxilina. A-E) fase folicular; F-H) Fase lútea inicial. A – seção uterina normal, imunomarcção para MMP-2 no estroma endometrial (++) e epitélio superficial (+++) e ausência nas glândulas endometriais, limite endometriometrial e miométrio, obj.4x; B – Adeniose superficial, imunomarcção para MMP-2 no epitélio superficial (+++) e estroma endometrial superficial (+), obj.20x; C – adeniose superficial, imunomarcção para TIMP-2 nas glândulas endometriais (+) e estroma profundo (+) e fibras musculares do limite endometriometrial (++) , obj.40x; D – Adeniose profunda, imunomarcção para MMP-2 nas glândulas endometriais profundas e infiltradas (+++), miométrio adjacente ao foco adenomiótico (++) , obj. 10x; E – adeniose profunda, imunomarcção para TIMP-2 nas glândulas endometriais profundas e infiltradas no miométrio (+++), vaso endometrial (++) e nas fibras miometriais adjacente ao foco adenomiótico (++) , obj.20x;. F- adeniose superficial, imunomarcção para MMP-2 nas glândulas endometriais profundas e infiltradas no miométrio (+++), e nas fibras miometriais adjacente ao foco adenomiótico (++) , obj.20x. G- adeniose profunda, imunomarcção para MMP-2 no estroma profundo e infiltrado no miométrio (+++), nos vasos endometriais (+) e nas glândulas endometriais profundas e infiltradas no miométrio (+++), perceber a imunomarcção apical nas glândulas endometriais, obj. 20x; H – Adeniose profunda, imunomarcção para MMP-2 na camada média e endotélio dos vasos endometriais (++) e miométrio (++) , obj.40x; I – fase lútea média, adeniose profunda, imunomarcção para TIMP-2, no estroma (++) e glândulas profundas (+++) e limite endometriometrial (++) em local sem intrusão de tecido endometrial, obj.20x. Ep – epitélio superficial; Est – estroma endometrial; Vs – vasos; Gl – glândulas endometriais; Mio- miométrio; Glinf – glândulas endometriais infiltradas no miométrio; Lim – limite endometriometrial.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo revelou que os RE- $\alpha$  e os RP estão desregulados em úteros de vacas com adenomiose superficial e profunda. Na fase lútea média a expressão dos RE- $\alpha$  e RP foi elevada, notadamente, nas estruturas endometriais profundas e limite endometriometrial. Estes resultados são consoantes com os registrados anteriormente (MOREIRA *et al.*, 2007), quando a maior porcentagem de adenomiose profunda ocorreu na fase lútea média. Estes dados sugerem um agravamento da adenomiose durante a fase lútea, e uma possível regressão na fase folicular. Talvez, ocorra uma plasticidade no grau de infiltração de tecido endometrial que, no mínimo, deve ser considerado anormal.

A expressão dos receptores aqui investigados poderá ser uma ferramenta diagnóstica (biomarcadora) endometrial, a sugerir um distúrbio na sinalização dos hormônios esteróides sexuais e, provavelmente, o acometimento uterino por adenomiose.

O limite endometriometrial é constituído por uma matriz extracelular especializada originária das túnicas endometrial e miometrial.. No útero normal, a insinuação endometrial é bloqueada pelo miométrio e sua matriz extracelular e pelas membranas basais dos vasos sanguíneos e das glândulas endometriais (MATSUDA *et al.*, 2001).

A regulação dos eventos para manutenção da estrutura e elementos da matriz extracelular (degradação e reconstituição) é controlada primariamente por uma classe de enzimas proteolíticas, denominadas metaloproteinases da matriz (MMP) e por seus inibidores específicos, os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP). A expressão e a atividade dessas proteases estão sob o controle de fatores fisiológicos inerentes ao ciclo estral (CURRY e OSTEEEN, 2003).

Assim, quaisquer distúrbios que desregulem o ciclo estral, como eventos inflamatórios ou degenerativos, poderão desbalancear a atividade dessas proteases, dando início a desordens como a degradação excessiva ou deficiente da matriz extracelular uterina, desestruturando a arquitetura tecidual e/ou dando suporte ao crescimento celular desordenado (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; BOCHSLER e SLAUSON, 2002).

O estudo aqui conduzido revelou que os perfis imunistoquímicos para MMP-2 e TIMP-2 em úteros de vacas com adenomiose nas fases folicular e lútea estavam alterados nas seções com adenomiose profunda. Esses resultados sugerem que a expressão dessas enzimas compartilha estreita semelhança com aqueles evidenciados em mulheres e camundongas com adenomiose. Esses dados sustentam a teoria de que a migração endometrial ocorre pelas ramificações dos vasos sanguíneos emergentes do miométrio, pela degradação direta da membrana basal desses vasos (MORI *et al.*, 2000, MATSUDA *et al.*, 2001). Além disso, as MMPs e TIMPs estão envolvidas diretamente na receptividade endometrial e implantação embrionária em bovinos (WALTER e BOOS, 2001; HIRATA *et al.*, 2002;) e o desequilíbrio na expressão e atividade dessas enzimas, que parece estar associado à adenomiose, poderia acarretar falha reprodutiva.

Portanto, desordens reprodutivas caracterizadas pela desregulação hormonal, como cistos ovarianos e tumores de células da granulosa, a administração exógena de esteróides (sincronização de cio e superovulação), além de processos degenerativos, inflamatórios agudos e crônicos, bem como suas seqüelas (fibrose endometrial e peri-glandular), a hiperplasia endometrial cística e a retenção de placenta, possam desencadear a ação descompensada de qualquer uma das classes de MMPs/TIMPs e permitir a migração do endométrio por entre os feixes do miométrio. Mesmo porque, grande parte desses processos patológicos tem como mecanismo de formação primário, um desequilíbrio entre a ação das MMPs/TIMPs e RE- $\alpha$ /RP.

Os hormônios esteróides sexuais, gonadotróficos e prostaglandinas têm sido largamente utilizados em bovinos, como biotécnicas reprodutivas, de manipulação da fisiologia reprodutiva, objetivando a maximização da produção animal.

Sabe-se que a administração crônica de estrógenos é capaz de induzir adenomiose uterina em várias espécies animais (HART, 1990), e a enfermidade estrógeno-dependente, como os pólipos endometriais, leiomioma e leiomiossarcoma, carcinomas endometriais e endometriose (KITAWAKI, 2006; KITAWAKI *et al.*, 2003), possuem como mecanismo fisiopatológico comum, a persistência de um fenótipo estrogênico e resistente à ação da progesterona (BULUN *et al.*, 2006).

Portanto, é importante ressaltar a necessidade de uma investigação profunda sobre os efeitos da administração exógena dos hormônios sexuais sobre o trato reprodutivo de vacas, pois os resultados encontrados no presente experimento têm

conduzido a suspeita de que estes estejam contribuindo para ocorrência de falha reprodutiva nesta espécie, incluindo a adenomiose, e acaba gerando descarte de matrizes sem uma averiguação mais conclusiva.

## CONCLUSÕES

Seções uterinas com adenomiose profunda exibiram maior expressão de RE- $\alpha$  e de RP.

Os RE- $\alpha$  foram expressos em seções uterinas com adenomiose (superficial e profunda) na fase lútea inicial e média.

Na fase lútea média, os RE- $\alpha$  foram detectados no estroma do endométrio superficial, em úteros com adenomiose profunda.

Os RE- $\alpha$  e RP estão desregulados em úteros com adenomiose.

A fase folicular apresentou maior variação na expressão de MMP-2 e TIMP-2 do que a fase lútea.

A expressão de MMP-2, na fase folicular, foi maior que de TIMP-2 somente em seções uterinas com adenomiose profunda.

A expressão de MMP-2 foi maior em úteros de vacas acometidos por adenomiose profunda.

**ANEXO**



**Tabela 1.** Distribuição imunoistoquímica das intensidades de imunomarcção para RE- $\alpha$  e RP em úteros bovinos normais durante as fases do ciclo estral.

Estruturas Teciduais	Fase folicular (n=12)		Fase lútea			
			inicial (n=2)		média (n=2)	
	RE- $\alpha$	RP	RE- $\alpha$	RP	RE- $\alpha$	RP
Epitélio superficial	+++ (4)/++ (3)/+ (2)/0 (3)	+++ (2)/++ (2)/+ (3)/0 (5)	+++/0	+++/++	++	+
Estroma endometrial						
Superficial	+++ (4)/++ (1)/+ (1)/0 (6)	+++ (3)/++ (1)/0 (8)	+++/0	0	+	0
Glândulas endometriais						
superficiais	+++ (4)/++ (4)/+ (3)/0 (1)	+++ (3)/++ (4)/+ (1)/0 (4)	+++/0	+++	+	+++
Vasos endometriais						
	++ (3)/+ (2)/0 (7)	+++ (1)/++ (1)/+ (1)/0 (9)	+/0	0	0	0
Glândulas endometriais						
Profundas	+++ (3)/++ (3)/+ (4)/0 (2)	+++ (2)/++ (4)/+ (3)/0 (3)	++/0	+++	+	+++
Estroma endometrial						
Profundo	+++ (2)/++ (3)/+ (2)/0 (5)	+++ (3)/++ (1)/+ (1)/0 (7)	0	0	0	0
Miométrio	++ (3)/+ (1)/0 (8)	++ (1)/+ (3)/0 (8)	+++	0	0	0
Vasos miometriais						
	+++ (2)/+ (2)/0 (8)	+++ (1)/++ (1)/0 (10)	0	0	0	0
Limite						
endometriais	++ (2)/0 (10)	++ (3)/0 (9)	0	+++	0	0

Escore para as intensidades de imunomarcção: 0 negativo; + fraco positivo; ++ positivo; +++ forte positivo; RE $\alpha$  receptor alfa de estrógeno; RP receptor de progesterona.

**Tabela 2.** Distribuição imunoistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcção para RE- $\alpha$  e RP em úteros bovinos com adeniose superficial durante as fases do ciclo estral.

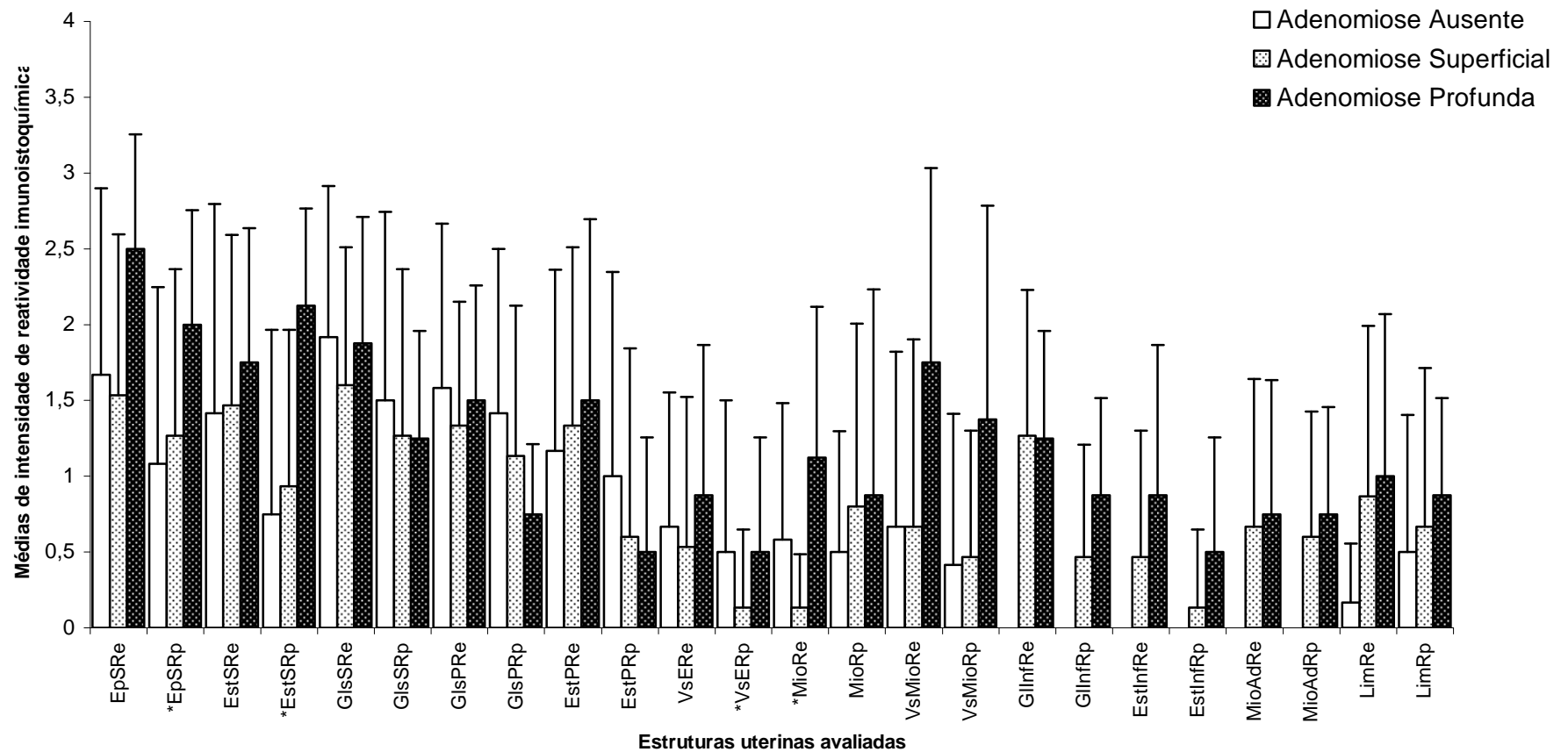
Estruturas Teciduais	Fase folicular (n= 15)		Fase lútea			
	RE- $\alpha$	RP	inicial (n=7)		média (n=2)	
			RE- $\alpha$	RP	RE- $\alpha$	RP
Epitélio superficial	+++ (4)/++ (2)/+ (7)/0 (2)	+++ (3)/++ (2)/+ (6)/0 (4)	+++ (2)/+ (2)/0 (3)	+++ (5)/+ (1)	+++	+++
Estroma endometrial Superficial	+++ (3)/++ (5)/+ (3)/0 (4)	+++ (2)/++ (1)/+ (6)/0 (6)	+++ (2)/+ (2)/0 (3)	++ (2)/+ (3)/0 (2)	0	++
Glândulas endometriais superficiais	+++ (3)/++ (4)/+ (7)/0 (1)	+++ (3)/++ (2)/+ (6)/0 (4)	+++ (1)/++ (3)/+ (2)/0 (1)	+++ (5)/+ (2)	+++	+++
Vasos endometriais	+++ (1)/++ (2)/+ (1)/0 (11)	+ (1)/0 (14)	+++ (1)/++ (1)/+ (1)/0 (4)	++ (2)/+ (1)/0 (4)	++/+	++/+
Glândulas endometriais Profundas	+++ (1)/++ (5)/+ (7)/0 (2)	+++ (2)/++ (2)/+ (7)/0 (4)	+++ (1)/++ (3)/+ (1)/0 (2)	+++ (2)/++ (2)/+ (2)/0 (1)	++	+++/0
Estroma endometrial Profundo	+++ (4)/++ (1)/+ (6)/0 (4)	+++ (3)/0 (12)	++ (1)/+ (4)/0 (2)	+++ (1)/++ (1)/+ (2)/0 (3)	+++/0	+++/+
Miométrio	+ (2)/0 (13)	+++ (2)/++ (3)/0 (10)	+ (2)/0 (5)	+++ (1)/++ (1)/+ (3)/0 (2)	++/0	++/0
Vasos miometriais	+++ (3)/+ (1)/0 (11)	++ (3)/+ (1)/0 (11)	++ (1)/+ (1)/0 (5)	+++ (1)/+ (1)/0 (5)	++/0	++
Glândulas infiltradas no Miométrio	+++ (3)/++ (4)/+ (4)/0 (4)	++ (2)/+ (3)/0 (10)	++ (2)/+ (3)/0 (2)	+++ (1)/++ (1)/+ (3)/0 (2)	++/+	+++/>++
Estroma endometrial infiltrado no miométrio	++ (3)/+ (1)/0 (11)	++ (1)/0 (14)	+ (3)/0 (4)	+ (2)/0 (5)	+/0	++/0
Miométrio adjacente ao foco adenomiotico	+++ (1)/++ (2)/+ (3)/0 (9)	++ (3)/+ (3)/0 (9)	++ (2)/+ (2)/0 (3)	+++ (1)/++ (2)/+ (4)	++/0	+++/>+
Limite endometriometrial	+++ (2)/++ (2)/+ (3)/0 (8)	+++ (2)/++ (2)/+ (1)/0 (10)	++ (2)/+ (2)/0 (3)	+++ (1)/++ (3)/+ (2)/0 (1)	++/0	+++/>+

Legenda: Escore para as intensidades de imunomarcção: 0 negativo; + fraco positivo; ++ positivo; +++ forte positivo; RE $\alpha$  receptor alfa de estrógeno; RP receptor de progesterona.

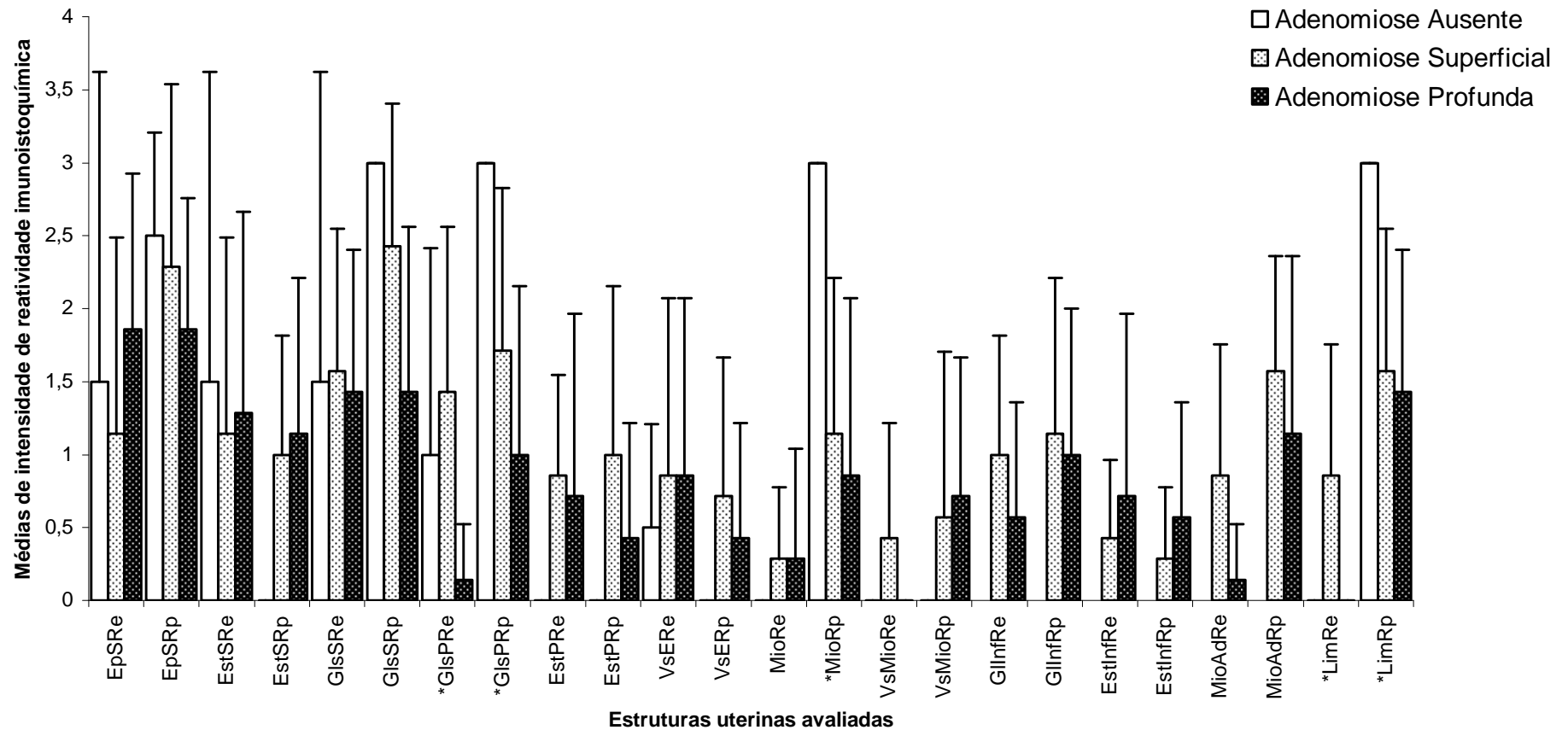
**Tabela 3.** Distribuição imunoistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcção para RE- $\alpha$  e RP em úteros bovinos com adeniose profunda durante as fases do ciclo estral.

Estruturas Teciduais	Fase folicular (n= 8)		Fase lútea			
			inicial (n=7)		média (n=7)	
	RE- $\alpha$	RP	RE- $\alpha$	RP	RE $\alpha$	RP
Epitélio superficial	+++ (5)/++ (2)/+(1)	+++ (4)/++ (2)/+(2)	+++ (2)/+++ (3)/+(1)/0 (1)	+++ (2)/+++ (2)/+(3)	+++ (4)/+++ (3)	+++ (7)
Estroma endometrial Superficial	+++ (1)/+++ (5)/+(1)/0 (1)	+++ (2)/+++ (5)/+(1)	+++ (2)/+++ (1)/+(1)/0 (3)	+++ (1)/+++ (1)/+(3)/0 (2)	+++ (1)/+++ (2)/+(3)/0 (1)	0 (7)
Glândulas endometriais superficiais	+++ (2)/+++ (3)/+(3)	++ (3)/+(4)/0 (1)	+++ (1)/+++ (2)/+(3)/0 (1)	+++ (1)/+++ (3)/+(1)/0 (2)	+++ (5)/+++ (2)	+++ (6)/+++ (1)
Vasos endometriais	+++ (5)/+++ (2)/+(1)	+++ (4)/+++ (2)/+(2)	+++ (1)/+++ (1)/+(1)/0 (4)	++ (1)/+(1)/0 (5)	++ (2)/0 (5)	0 (7)
Glândulas endometriais Profundas	+++ (3)/+++ (2)/+(2)/0 (1)	+(6)/0 (2)	+(1)/0 (6)	+++ (1)/+++ (1)/+(2)/0 (3)	+++ (5)/+++ (1)/+(1)	+++ (3)/+++ (2)/+(2)
Estroma endometrial Profundo	++ (1)/+(4)/0 (3)	++ (1)/+++ (2)/0 (5)	++ (1)/+(1)/0 (5)	++ (1)/+(1)/0 (5)	++ (2)/0 (5)	++ (1)/0 (6)
Miométrio	++ (4)/+(1)/0 (3)	+++ (2)/+(1)/0 (5)	++ (1)/0 (6)	+++ (1)/+++ (1)/+(1)/0 (4)	++ (2)/+(1)/0 (4)	++ (1)/0 (6)
Vasos miometriais	+++ (3)/+++ (2)/+(1)/0 (2)	+++ (3)/+(2)/0 (3)	0 (7)	++ (2)/+(1)/0 (4)	+(2)/0 (5)	+++ (1)/+(2)/0 (4)
Glândulas infiltradas no Miométrio	++ (3)/+(4)/0 (1)	++ (1)/+(5)/0 (2)	++ (2)/+(1)/0 (4)	++ (3)/+(1)/0 (3)	+++ (4)/+++ (2)/+(1)	+++ (2)/+(4)/0 (1)
Estroma endometrial infiltrado no miométrio	++ (3)/+(1)/0 (4)	++ (1)/+(2)/0 (5)	+++ (1)/+++ (1)/0 (5)	++ (1)/+(2)/0 (4)	++ (2)/0 (5)	++ (1)/0 (6)
Miométrio adjacente ao foco adenomiótico	++ (2)/+(2)/0 (4)	++ (1)/+(4)/0 (3)	+(1)/0 (6)	+++ (1)/+++ (2)/+(1)/0 (3)	++ (4)/0 (3)	+++ (1)/+(1)/0 (5)
Limite endometriometrial	++ (4)/0 (4)	++ (1)/+(5)/0 (2)	0 (7)	+++ (1)/+++ (2)/+(3)/0 (1)	+++ (6)/0 (1)	+++ (1)/+++ (4)/0 (2)

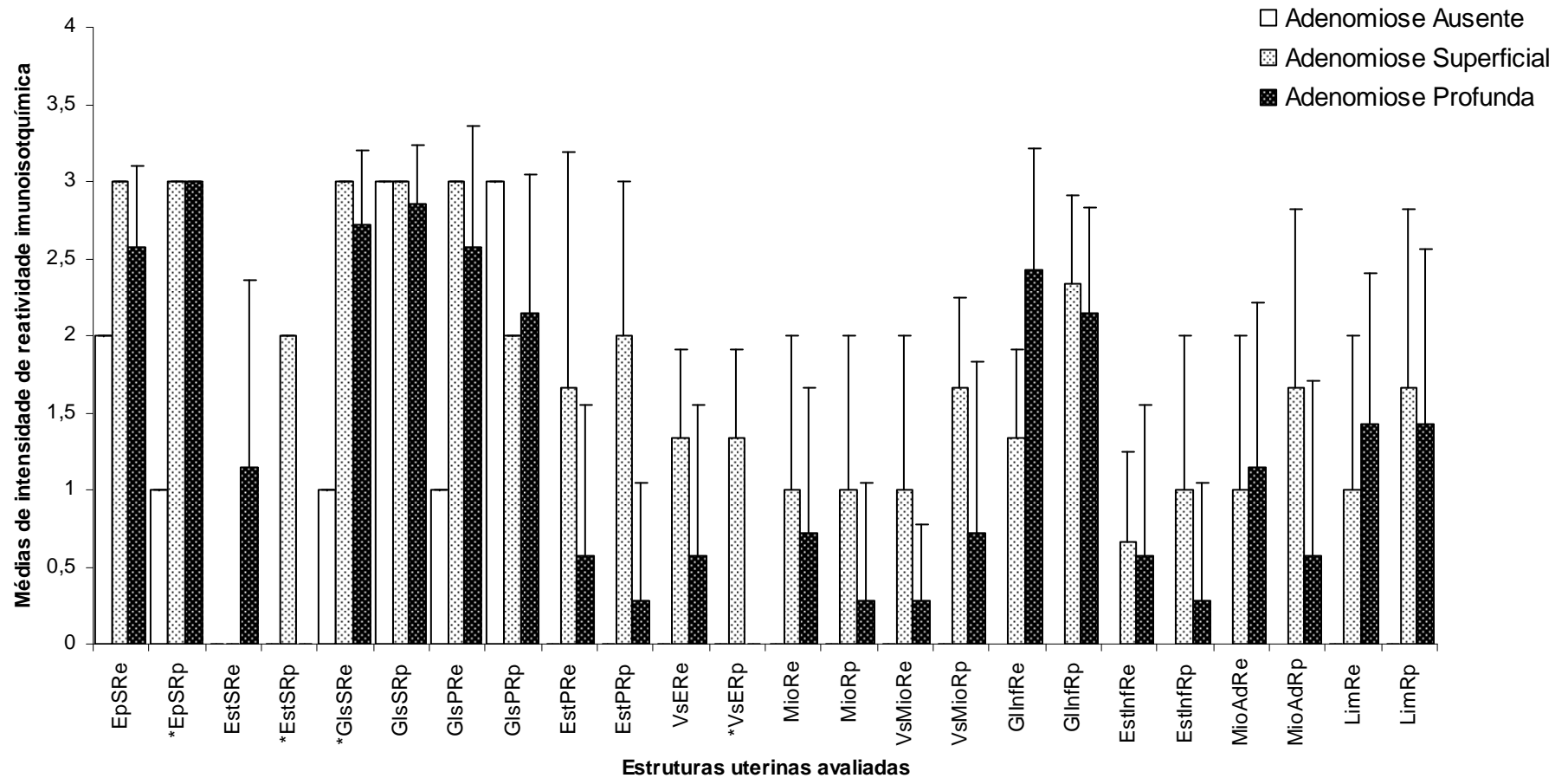
Legenda: Escore para as intensidades de imunomarcção: 0 negativo; + fraco positivo; ++ positivo; +++ forte positivo; RE $\alpha$  receptor alfa de estrógeno; RP receptor de progesterona.



**Figura 1.** Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunohistoquímica para receptores  $\alpha$  de estrógeno e receptores de progesterona em úteros bovinos normais e com adenomyose do tipo superficial e profunda na fase folicular. \* $P < 0,05$  pelo teste KruskalWallis. Legenda: Ep – epitélio superficial; EstS- estroma do epitélio superficial; GlsS – glândulas endometriais superficiais; GlsP- glândulas endometriais profundas; EstP – estroma profundo; VsE – vasos endometriais; Mio – fibras miometriais; VsMio- vasos miometriais; Glnf – glândulas endometriais infiltradas no miométrio; Estlnf – Estroma endometrial infiltrado no miométrio; MioAd – miométrio adjacente ao foco adenomiótico; Lim – limite endometriometrial. Re – receptores- $\alpha$  de estrógeno e Rp- receptores de progesterona.



**Figura 2.** Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunohistoquímica para receptores  $\alpha$  de estrógeno e receptores de progesterona em úteros bovinos normais e com adenomiose do tipo superficial e profunda na fase lútea inicial. \* $P < 0,05$  pelo teste KruskalWallis. Legenda: Ep – epitélio superficial; EstS- estroma do epitélio superficial; GlsS – glândulas endometriais superficiais; GlsP- glândulas endometriais profundas; EstP – estroma profundo; VsE – vasos endometriais; Mio – fibras miometriais; VsMio- vasos miometriais; Glnf – glândulas endometriais infiltradas no miométrio; Estlnf – Estroma endometrial infiltrado no miométrio; MioAd – miométrio adjacente ao foco adenomiótico; Lim – limite endometriometrial. Re – receptores- $\alpha$  de estrógeno e Rp- receptores de progesterona.



**Figura 3.** Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunohistoquímica para receptores  $\alpha$  de estrógeno e receptores de progesterona em úteros bovinos normais e com adenomiose do tipo superficial e profunda na fase lútea média. \* $P < 0,05$  pelo teste KruskalWallis. Legenda: Ep – epitélio superficial; EstS- estroma do epitélio superficial; GlsS – glândulas endometriais superficiais; GlsP- glândulas endometriais profundas; EstP – estroma profundo; VsE – vasos endometriais; Mio – fibras miometriais; VsMio- vasos miometriais; Glnf – glândulas endometriais infiltradas no miométrio; Estlnf – Estroma endometrial infiltrado no miométrio; MioAd – miométrio adjacente ao foco adenomiótico; Lim – limite endometriais. Re – receptores- $\alpha$  de estrógeno e Rp- receptores de progesterona.

**Tabela 4.** Distribuição imunoistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcção para MMP-2 e TIMP-2 em úteros bovinos normais na fase folicular e lútea do ciclo estral.

Estruturas Teciduais	Fase folicular (n=12)		Fase lútea			
			Inicial (n=3)		Média (n=2)	
	MMP-2	TIMP-2	MMP-2	TIMP-2	MMP-2	TIMP-2
Epitélio superficial	+++ (4)/++ (2)/+ (6) <b>A</b>	+++ (8)/++ (4) <b>B</b>	+++ (3)	+++ (1)/++ (2)	0	++
Estroma endometrial						
Superficial	+++ (2)/++ (2)/+ (1)/0 (7)	+++ (2)/++ (1)/+ (4)/0 (5)	+ (3)	++ (1)/+ (2)	0	0
Glândulas endometriais						
superficiais	++ (3)/+ (6)/0 (3) <b>A</b>	+++ (4)/++ (7)/+ (1) <b>B</b>	+++ (2)/++ (1)	++ (1)/+ (2)	+	+
Glândulas endometriais						
Profundas	++ (3)/+ (2)/0 (7)	+++ (1)/++ (1)/+ (1)/0 (9)	+++ (1)/++ (1)/+ (1)	++ (1)/+ (1)/0 (1)	+	+
Vasos endometriais	+++ (1)/++ (5)/0 (6)	+++ (2)/++ (6)/+ (1)/0 (3)	++ (1)/+ (1)/0 (1)	+ (2)/0 (1)	0	0
Estroma endometrial						
Profundo	+++ (2)/+ (5)/0 (5)	+++ (1)/++ (1)/+ (3)/0 (7)	+ (2)/0 (1)	+ (2)/0 (1)	0	0
Miométrio	+++ (1)/++ (2)/+ (1)/0 (8)	+++ (3)/++ (5)/0 (4)	+++ (1)/+ (1)/0 (1)	+ (2)/0 (1)	0	0
Vasos miometriais	+++ (1)/++ (2)/+ (1)/0 (8)	++ (4)/+ (3)/0 (5)	+++ (1)/+ (1)/0 (1)	++ (1)/+ (2)	0	0
Limite endometriometrial	0 (12) <b>A</b>	++ (8)/+ (4) <b>B</b>	+ (3)	+ (3)	0	0

Escore para as intensidades de imunomarcção: 0 negativo; + fraco positivo; ++ positivo; +++ forte positivo; MMP-2 – Metaloproteinase da matriz 2 e TIMP-2 – Inibidor de metaloproteinase 2. Letras maiúsculas nas linhas representam valores diferentes entres si pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5.** Distribuição imunoistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcção para MMP-2 e TIMP-2 em úteros bovinos com adenomiose do tipo superficial na fase folicular e lútea do ciclo estral.

Estruturas Teciduais	Fase folicular (n=13)		Fase lútea			
			Inicial (n=6)		Média (n=3)	
	MMP-2	TIMP-2	MMP-2	TIMP-2	MMP-2	TIMP-2
Epitélio superficial	+++ (5)/++ (4)/+ (2)/0 (2)	+++ (10)/++ (3)	+++ (4)/++ (1)/0 (1)	+++ (6)	+++ (2)/++ (1)	+++ (2)/+ (1)
Estroma endometrial Superficial	+++ (5)/++ (2)/+ (2)/0 (4)	+++ (6)/++ (2)/+ (3)/0 (2)	+++ (2)/++ (1)/+ (1)/0 (2)	+++ (3)/+ (1)/0 (2)	+++ (1)/0 (2)	+++ /++ /0
Glândulas endometriais superficiais	+++ (1)/++ (4)/+ (5)/0 (3) <b>A</b>	+++ (5)/++ (6)/+ (1)/0 (0) <b>B</b>	+++ (1)/++ (3)/+ (1)/0 (1)	+++ (1)/0 (5)	+++ /++ /+	+++
Glândulas endometriais Profundas	+++ (2)/++ (3)/+ (4)/0 (4) <b>A</b>	+++ (5)/+++ (5)/+ (3) <b>B</b>	+++ (1)/++ (2)/+ (3)	+++ (1)/++ (3)/+ (2)	+++ (2)/++ (1) <b>A</b>	+++ (2)/++ (1) <b>B</b>
Vasos endometriais	+++ (2)/++ (2)/0 (9)	+++ (1)/++ (4)/+ (2)/0 (6)	+++ (3)/++ (1)/0 (2)	+++ (1)/++ (2)/+ (1)/0 (2)	+++ (2)/++ (1)	+++ (2)/++ (1)
Estroma endometrial Profundo	+++ (2)/++ (3)/+ (3)/0 (5)	+++ (2)/++ (1)/+ (5)/0 (5)	++ (2)/+ (2)/0 (2)	+++ (1)/+ (3)/0 (2)	+++ (1)/0 (2)	+++ /++ /0
Miométrio	++ (2)/+ (3)/0 (8)	+++ (1)/++ (4)/+ (2)/0 (6)	++ (1)/+ (1)/0 (4)	++ (1)/+ (1)/0 (4)	0	0
Vasos miometriais	+++ (1)/++ (3)/+ (3)/0 (6)	+++ (4)/++ (2)/+ (3)/0 (4)	++ (3)/+ (1)/0 (2)	++ (3)/+ (2)/0 (1)	+++ /++ /0	+++ (2)/++ (1)
Glândulas endometriais infiltradas no miométrio	++ (2)/+ (6)/0 (5) <b>A</b>	+++ (1)/+++ (6)/+ (6) <b>B</b>	+++ (1)/++ (5) <b>A</b>	+++ (5)+ (1) <b>B</b>	++ (2)/+ (1)	+++ (1)/++ (2)
Estroma endometrial infiltrado no miométrio	+++ (1)/++ (4)/+ (3)/0 (5)	+++ (1)/++ (1)/0 (11)	++ (1)/+ (1)/0 (4)	++ (2)/+ (1)/0 (3)	++ (1)/0 (2)	+++ /++ /0
Miométrio adjacente ao foco adenoiótico	++ (1)/+ (4)/0 (8)	++ (3)/+ (7)/0 (3)	++ (2)/+ (1)/0 (3)	++ (3)/+ (2)/0 (1)	++ (1)/0 (2)	++ (1)/0 (2)
Limite endometriometrial	++ (4)/+ (2)/0 (7)	+++ (2)/++ (3)/+ (5)/0 (3)	+++ (1)/++ (2)/0 (3)	+++ (2)/++ (1)/+ (2)/0 (1)	++ (2)/0 (1)	++ /+ /0

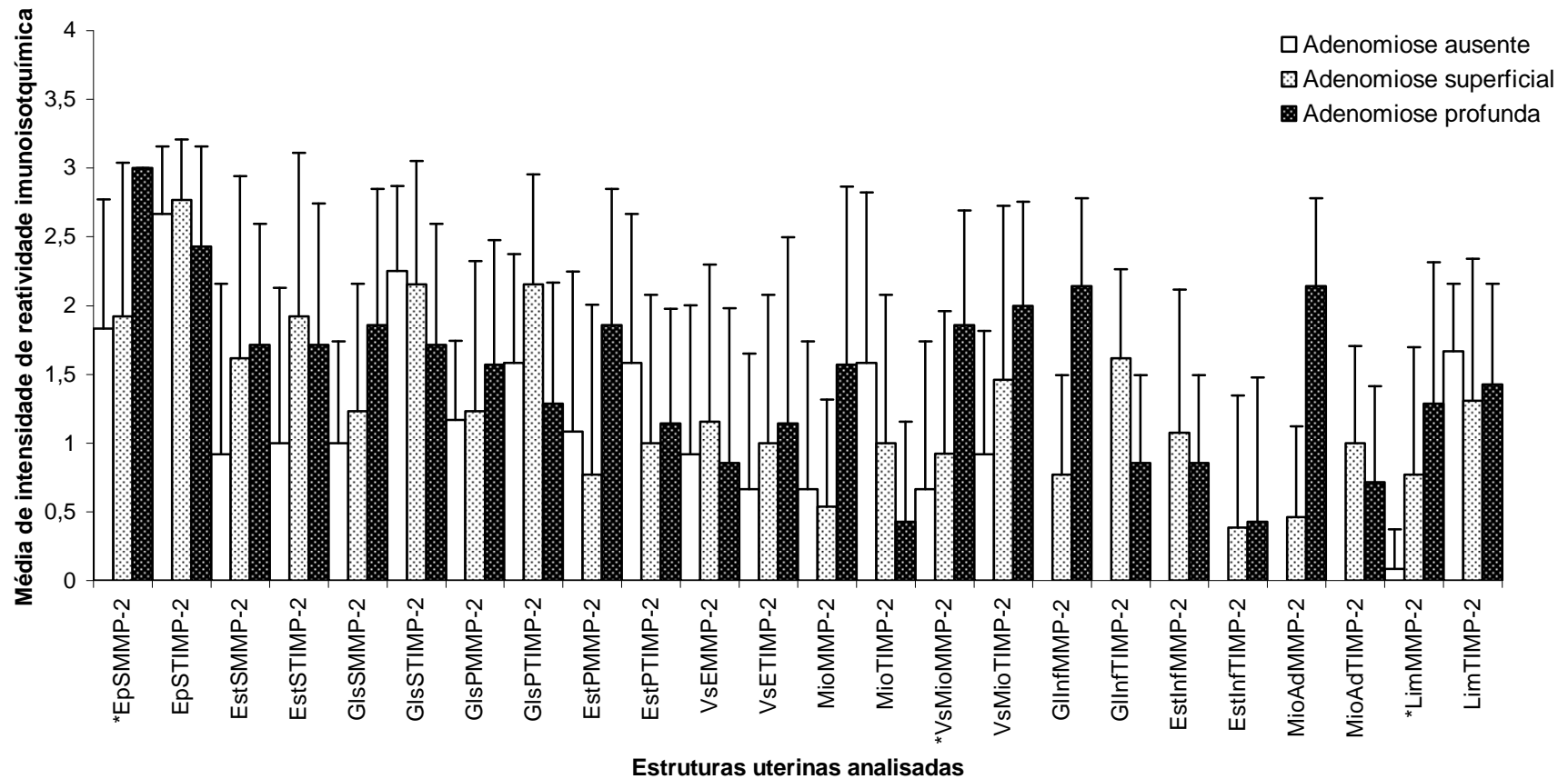
Escore para as intensidades de imunomarcção: 0 negativo; + fraco positivo; ++ positivo; +++ forte positivo; MMP-2 – Metaloproteínase da matriz 2 e TIMP-2 – Inibidor de metaloproteínase 2. Letras maiúsculas nas linhas representam valores diferentes entre si pelo teste de Mann-Whitney ( $\alpha=5\%$ ).



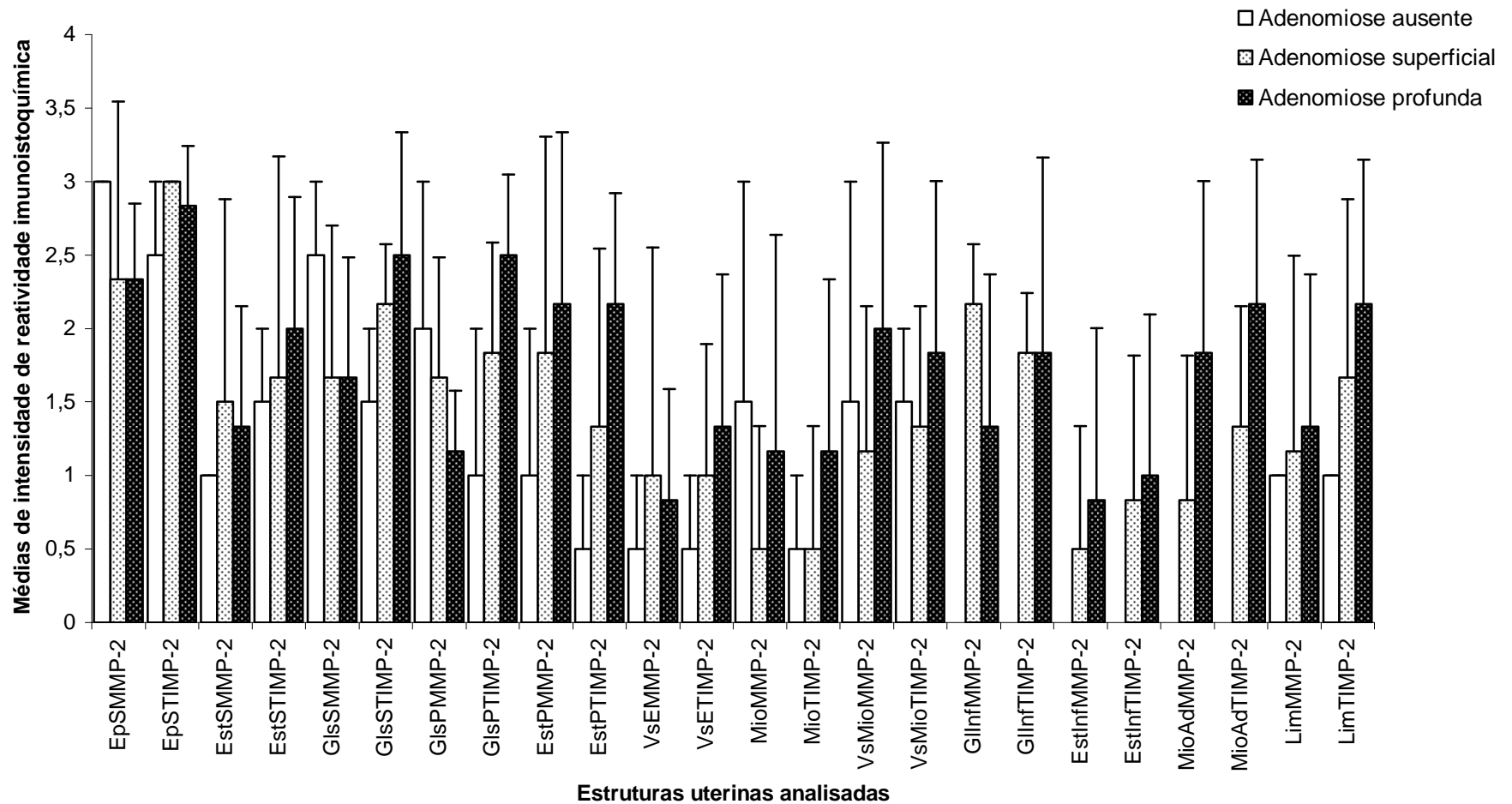
**Tabela 6.** Distribuição imunoistoquímica das intensidades de reatividade de imunomarcção para MMP-2 e TIMP-2 em úteros bovinos com adenomiose do tipo profunda na fase folicular e lútea do ciclo estral.

Estruturas Teciduais	Fase folicular n=7		Fase lútea			
	MMP-2	TIMP-2	Inicial n=6		Média n=6	
			MMP-2	TIMP-2	MMP-2	TIMP-2
Epitélio superficial	+++ (7) <b>A</b>	+++ (4)/++ (2)/+ (1) <b>B</b>	+++ (2)/++ (4)	+++ (5)/++ (1)	+++ (6)	+++ (5)/++ (1)
Estroma endometrial Superficial	+++ (1)/++ (4)/+ (1)/0 (1)	+++ (2)/++ (2)/+ (2)/0 (1)	++ (3)/+ (2)/0 (1)	+++ (2)/++ (2)/+ (2)	+++ (3)/++ (1)/+ (1)/0 (1)	+++ (3)/++ (1)/+ (1)/0 (1)
Glândulas endometriais superficiais	+++ (2)/++ (3)/+ (1)/0 (1)	+++ (1)/++ (4)/+ (1)/0 (0)	+++ (1)/++ (2)/+ (3)	+++ (4)/++ (1)/+ (1)	+++ (5)/++ (1)	+++ (4)/++ (1)/+ (1)
Glândulas endometriais Profundas	+++ (1)/++ (3)/+ (2)/0 (1)	+++ (1)/++ (1)/+ (4)/0 (1)	++ (1)/+ (5) <b>A</b>	+++ (3)/++ (3) <b>B</b>	+++ (1)/++ (4)/0 (1)	+++ (2)/++ (3)/+ (1)
Vasos endometriais	+++ (2)/+++ (3)/+ (1)/0 (1) <b>A</b>	++ (3)/+ (2)/0 (2) <b>B</b>	+++ (3)/++ (2)/0 (1)	+++ (2)/++ (3)/+ (1)	+++ (4)/++ (1)/0 (1) <b>A</b>	+++ (2)/++ (1)/0 (3) <b>B</b>
Estroma endometrial Profundo	+++ (1)/++ (1)/+ (1)/0 (4)	+++ (2)/++ (1)/0 (4)	++ (1)/+ (3)/0 (2)	+++ (1)/++ (1)/+ (3)/0 (1)	+++ (1)/++ (1)/0 (4)	+++ (1)/+ (2)/0 (3)
Miométrio	+++ (3)/+ (2)/0 (2) <b>A</b>	++ (1)/+ (1)/0 (5) <b>B</b>	+++ (2)/+ (1)/0 (3)	+++ (1)/++ (1)/+ (2)/0 (2)	+++ (2)/++ (1)/+ (1)/0 (2) <b>A</b>	++ (1)/0 (5) <b>B</b>
Vasos miometriais	+++ (2)/++ (2)/+ (3)	+++ (2)/++ (3)/+ (2)	+++ (3)/++ (1)/+ (1)/0 (1)	+++ (2)/++ (2)/+ (1)/0 (1)	+++ (3)/++ (2)/+ (1)	+++ (2)/++ (1)/+ (3)
Glândulas endometriais infiltradas no miométrio	+++ (2)/++ (4)/+ (1) <b>A</b>	++ (1)/+ (4)/0 (2) <b>B</b>	+++ (1)/++ (1)/+ (3)/0 (1)	+++ (3)/+ (2)/0 (1)	+++ (2)/++ (4)	+++ (2)/++ (3)/0 (1)
Estroma endometrial infiltrado no miométrio	++ (1)/+ (4)/0 (2) <b>A</b>	+ (1)/0 (6) <b>B</b>	+++ (1)/+ (2)/0 (3)	++ (3)/0 (3)	+++ (1)/++ (1)/+ (2)/0 (2) <b>A</b>	+ (3)/0 (3) <b>B</b>
Miométrio adjacente ao foco adenomiótico	+++ (2)/++ (4)/+ (1) <b>A</b>	++ (1)/+ (3)/0 (3) <b>B</b>	+++ (2)/++ (2)/+ (1)/0 (1)	+++ (3)/++ (1)/+ (2)	+++ (4)/++ (1)/+ (1)	+++ (3)/+ (2)/0 (1)
Limite endometriais	+++ (1)/++ (2)/+ (2)/0 (2)	++ (4)/+ (2)/0 (1)	+++ (1)/++ (1)/+ (3)/0 (1)	+++ (3)/++ (1)/+ (2)	+++ (2)/++ (2)/+ (2)	+++ (1)/++ (3)/+ (2)

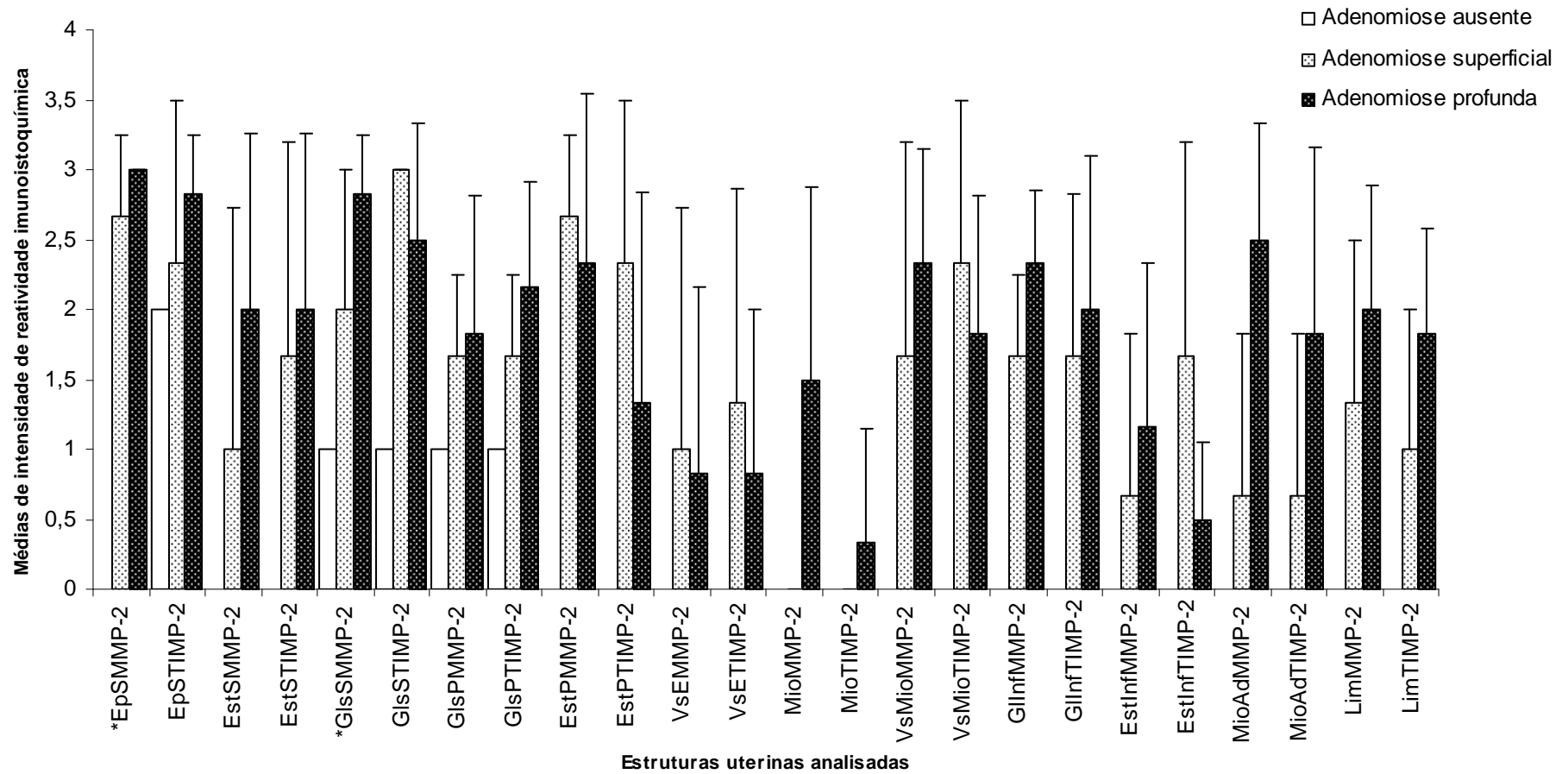
Escore para as intensidades de imunomarcção: 0 negativo; + fraco positivo; ++ positivo; +++ forte positivo; MMP-2 – Metaloproteinase da matriz 2 e TIMP-2 – Inibidor de metaloproteinase 2. Letras maiúsculas nas linhas representam valores diferentes entres si pelo teste de Mann-Whitney ( $\alpha=5\%$ ).



**Figura 4.** Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunoistoquímica para Metaloproteínase da matriz 2 e Inibidor de metaloproteínase 2 em úteros bovinos normais e com adenomyose do tipo superficial e profunda na fase Folicular. \* $P < 0,05$  pelo teste KruskalWallis. Legenda: EpS – epitélio superficial; EstS- estroma do epitélio superficial; GlsS – glândulas endometriais superficiais; GlsP- glândulas endometriais profundas; EstP – estroma profundo; VsE – vasos endometriais; Mio – fibras miometriais; VsMio- vasos miometriais; Glnf – glândulas endometriais infiltradas no miométrio; Estlnf – Estroma endometrial infiltrado no miométrio; MioAd – miométrio adjacente ao foco adenomiótico; Lim – Limite endometriais. MMP-2 – Metaloproteínase da matriz 2 e TIMP-2 – Inibidor de metaloproteínase 2.



**Figura 5.** Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunoistoquímica para Metaloproteínase da matriz 2 e Inibidor de metaloproteínase 2 em úteros bovinos normais e com adenmiose do tipo superficial e profunda na fase lútea inicial. Legenda: EpS – epitélio superficial; EstS- estroma do epitélio superficial; GlsS – glândulas endometriais superficiais; GlsP- glândulas endometriais profundas; EstP – estroma profundo; VsE – vasos endometriais; Mio – fibras miometriais; VsMio- vasos miometriais; Glnf – glândulas endometriais infiltradas no miométrio; Estlnf – Estroma endometrial infiltrado no miométrio; MioAd – miométrio adjacente ao foco adenomiótico; Lim – Limite endometriais. MMP-2 – Metaloproteínase da matriz 2 e TIMP-2 – Inibidor de metaloproteínase 2.



**Figura 6.** Esquematização gráfica das médias de intensidade de reatividade imunohistoquímica para Metaloproteinase da matriz 2 e Inibidor de metaloproteinase 2 em úteros bovinos normais e com adeniose do tipo superficial e profunda na fase lútea média. \* $P < 0,05$  pelo teste KruskalWallis. Legenda: EpS – epitélio superficial; EstS- estroma do epitélio superficial; GlsS – glândulas endometriais superficiais; GlsP- glândulas endometriais profundas; EstP – estroma profundo; VsE – vasos endometriais; Mio – fibras miometriais; VsMio- vasos miometriais; Glnf – glândulas endometriais infiltradas no miométrio; Estlnf – Estroma endometrial infiltrado no miométrio; MioAd – miométrio adjacente ao foco adenomiótico; Lim – Limite endometrial. MMP-2 – Metaloproteinase da matriz 2 e TIMP-2 – Inibidor de metaloproteinase 2.