



**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

A POTENCIAL FUNÇÃO DO NODAL NA ENDOMETROSE DA ÉGUA

SOFIA FAES MORAZZO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira

Dias

Doutor António José de Freitas Duarte

ORIENTADOR

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira

Dias

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Rosa Rebordão Simões

Crisóstomo

2017

LISBOA

---





**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

A POTENCIAL FUNÇÃO DO NODAL NA ENDOMETROSE DA ÉGUA

SOFIA FAES MORAZZO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINARIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira

Dias

Doutor António José de Freitas Duarte

ORIENTADOR

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira

Dias

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Rosa Rebordão Simões

Crisóstomo

2017

LISBOA

---

“You cannot teach a man anything; you can only help him discover it in himself.”

Galileo Galilei (1564 - 1642)

"I am enough of the artist to draw freely upon my imagination. Imagination is more important than knowledge. Knowledge is limited. Imagination encircles the world."

Albert Einstein (1879 - 1955)



## **Agradecimentos**

Um trabalho de investigação nunca se faz sozinho e com o completar desta dissertação, começo por agradecer à minha orientadora, a Dr.<sup>a</sup> Graça Ferreira-Dias por ter confiado este projecto em mim, e ter-me apoiado em toda a sua duração, servindo como apoio, mentora, amiga e companheira.

Agradeço à minha família, em particular, aos meus pais e à minha irmã, pois só com o seu apoio, amizade e confiança em mim é que consegui iniciar e, finalmente, completar este curso.

Agradeço à Dra. Maria Rosa Rebordão, minha co-orientadora, cuja ajuda foi também essencial, tanto no laboratório, como na interpretação dos dados e no esclarecimento das minhas dúvidas.

Agradeço ao professor Dr. Dariusz Skarzynski pela sua hospitalidade, tanto no laboratório como na sua vida pessoal, tendo me acolhido e dado a conhecer o seu país e cultura.

Agradeço à equipa, no Instituto de Reprodução Animal, Polish Academy of Science (PAS), em particular ao Marek Adamowski, à Katherine Thomas, à Annia Szóstek, e ao António Galvão por me terem ajudado no meu trabalho e terem partilhado comigo materiais e dicas.

Agradeço à Ana Amaral, que tem sido a minha companheira desde o início, acompanhando-me diariamente, esclarecendo práticas laboratoriais, acalmando me nos momentos de stress e ajudando a resolver problemas no laboratório. Sem dúvida que a sua ajuda e amizade foram indispensáveis para o sucesso desta experiência, tanto a nível pessoal como a nível profissional.

Agradeço ao Miguel, por me ter sempre apoiado, dando-me confiança nos momentos de hesitações, e ajudando-me a debater ideias e novas perspectivas sobre este projecto.

Agradeço a todos os meus amigos, o apoio é sem dúvida das coisas mais importantes, pois com a dimensão de certas tarefas, com o cansaço, e com a pressão, é fácil uma pessoa duvidar de si própria, e todas as pessoas que me ajudam, que me ouvem e que me inspiram merecem o meu profundo agradecimento.

Agradeço também às estagiárias Edyta Waleska e a Monika Zakrzewska, pela sua ajuda nos meses de Verão, e pela sua atitude responsável e compreensiva, pois tornaram a experiência mais desafiante, e mais satisfatória e produtiva.

Por fim, agradeço à Dra. Ana Duarte, ao Pedro Pinto Bravo, à Dra. Paula, e aos colegas de laboratório do CIISA, do Departamento de Doenças Infecciosas e outros com que me cruzei, pela sua ajuda e compreensão durante a minha estadia.



## A POTENCIAL FUNÇÃO DO NODAL NA ENDOMETROSE DA ÉGUA

### Resumo

Alguns membros da superfamília do TGF $\beta$ , tais como o Nodal e o TGF $\beta$ 1, têm um papel importante na reprodução da égua, sendo que a sua disfunção pode contribuir para patologias uterinas. A endometrose é uma doença degenerativa em que o endométrio normal vai sendo substituído por tecido fibrótico. O objectivo deste estudo consistiu em avaliar: (i) como o Nodal pode influenciar o nível de mRNA dos recetores da PGE<sub>2</sub> (*EP2*; *EP4*), do TGF $\beta$ 1 (*ALK5*; *TGFR2*), e os próprios (*ALK4*; *ALK7*), e ainda, a secreção de prostaglandinas (PGs; PGE<sub>2</sub>; PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) no endométrio equino; e (ii) como a fase do ciclo éstrico e grau de endometrose pode influenciar estas vias. Endométrios da fase folicular (FF; n=6) e da fase lútea (FL; n=6) foram classificados de acordo com o sistema de Kenney e Doig em categorias I e IIA (n=7), ou IIB e III (n=5). Os explantes foram incubados (24h; 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) com TNF $\alpha$ , ocitocina ou Nodal (0.1;1;10 ng/mL). A expressão de mRNA foi avaliada por qRT-PCR e a medição de prostaglandinas por ELISA. Em endométrios de categoria I/IIA, o Nodal inibiu a expressão génica de *EP2*, *EP4* e *ALK4* e estimulou a de *TGFR2*, em ambas as fases do ciclo éstrico; e estimulou também os níveis de mRNA de *ALK5* e *ALK7*, apenas na FL. Em endométrios de categoria IIB/III, o Nodal estimulou os níveis de mRNA de *EP2*, *EP4* e *ALK5*, na FF, e de *ALK4* e *ALK7*, na FL, embora tenha inibido *TGFR2* e *ALK4*, na FF, e *EP2*, *EP4*, *ALK5* e *TGFR2* na FL. O Nodal na concentração testada mais baixa (0.1ng/mL) estimulou a produção de PGE<sub>2</sub> na FF e FL, enquanto que numa concentração superior a inibiu na FF (1ng/mL). A produção de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  foi estimulada na FL com Nodal (0.1 e 10ng/mL). Concluindo, o Nodal parece estar envolvido na endometrose da égua, por afetar negativamente a sinalização da PGE<sub>2</sub> anti-fibrótica e positivamente a da citocina pró-fibrótica TGF $\beta$ 1 e a produção de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> .

**Palavras-chave:** endométrio, endometrose, fibrose, égua, Nodal, TGF $\beta$ 1, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , *EP2*, *EP4*, *ALK5*, *TGFR2*, *ALK4*, *ALK7*, expressão génica





## THE POTENCIAL ROLE OF NODAL IN MAR ENDOMETROSIS

### **Abstract**

Members of TGF $\beta$  superfamily, as Nodal and TGF $\beta$ 1, have an important role in mare's reproduction, and as such, their dysfunction may contribute for uterine pathologies. Endometriosis is a degenerative process with a switch of normal endometrium to fibrotic tissue. The aim of the study was to assess: (i) how Nodal may influence the receptors of PGE<sub>2</sub> (*EP2*; *EP4*), TGF $\beta$ 1 (*ALK5*; *TGFR11*), and its own (*ALK4*; *ALK7*) mRNA level and prostaglandin (PG) secretion in equine endometrium; and (ii) estrous cycle and endometriosis influence on these vias. Endometria from follicular (FP; n=6) and mid luteal phases (MLP; n=6) were classified in Kenney and Doig's categories (cat) I and IIA (n=7), or IIB and III (n=5). Endometrium explants were incubated (24h; 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) with TNF, oxytocin or Nodal (0.1, 1; 10ng/mL). The mRNA expression was assessed by qRT-PCR and ELISA was used for PG measurement. In cat I/IIA endometria, Nodal down-regulated *EP2*, *EP4* and *ALK4* mRNA expression and up-regulated *TGFR11* in both FP and MLP; and *ALK5* and *ALK7* only in MLP. In cat IIB/III, Nodal up-regulated mRNA levels of *EP2*, *EP4* and *ALK5* in FP, and *ALK4* and *ALK7* in MLP, whereas it inhibited *TGFR11* and *ALK4* in FP, and *EP2*, *EP4*, *ALK5* and *TGFR11* in MLP. Nodal (0.1ng/mL) stimulated PGE<sub>2</sub> production in both FF and FL, while at a higher concentration (1ng/mL) it decreased PGE<sub>2</sub> in FP. The production of PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  increased in MLP with Nodal stimulation (at 0.1 and 10ng/mL). In conclusion, Nodal may be involved in endometriosis in the mare, by impairment of anti-fibrotic PGE<sub>2</sub> and pro-fibrotic TGF $\beta$ 1 signaling pathways and increasing PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  production.

**Keywords:** endometrium, endometriosis, fibrosis, mare, Nodal, TGF $\beta$ 1, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , *EP2*, , *EP4*, *ALK5*, *TGFR11*, *ALK4*, *ALK7*, gene expression



# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	iii
Abstract .....	v
Lista de Figuras .....	xi
Lista de Tabelas .....	xiii
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	xv
Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio .....	1
1. Revisão Bibliográfica .....	2
1.1. A endometrose: a sua importância e a sua caracterização .....	2
1.1.1. Caracterização da endometrose .....	3
1.2. Mecanismos da Endometrose.....	7
1.2.1. A inflamação e a resposta Th2, como mediadores da fibrose.....	8
1.2.2. Regulação da ECM.....	10
1.2.3. O CTGF.....	11
1.3. A superfamília do TGF $\beta$ e a sua sinalização.....	12
1.3.1. Via de sinalização comum.....	12
1.3.2. Regulação do sinal extracelular e a nível da membrana celular .....	12
1.3.3. Proteínas moduladoras da sinalização.....	13
1.3.4. Regulação do sinal intracelular.....	14
1.3.5. Internalização dos recetores da superfamília TGF $\beta$ .....	15
1.4. A sinalização do Nodal versus a da Activina .....	15
1.4.1. O Nodal, como morfogénio, e os seus inibidores .....	16
1.5. As proteínas EGF-CFC na sinalização dos membros do TGF $\beta$ , em particular, do Nodal	17
1.5.1. O Cripto, o Nodal e a Activina .....	18
1.6. Breve descrição das funções do Nodal, do TGF $\beta$ 1 e da Activina em tecidos adultos, em particular, em órgãos reprodutores.....	18
1.7. As Prostaglandinas PGE <sub>2</sub> e PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> .....	19

1.7.1.	Produção e Regulação .....	20
1.7.2.	A expressão das sintases PTGS2, PGES e PGFS e da PGE <sub>2</sub> e PGF <sub>2α</sub> no endométrio equino durante o ciclo éstrico .....	21
1.7.3.	Sinalização das PGs .....	22
1.7.4.	Interações PGE <sub>2</sub> -TGFβ1 .....	23
2.	Objetivos.....	24
3.	Materiais e Métodos .....	25
3.1	Animais.....	25
3.2.	Cultura de tecidos endometriais .....	25
3.3.	Extracção e Medição de RNA.....	26
3.4.	Avaliação da expressão génica por qRT-PCR .....	27
3.4.1.	Síntese de cDNA.....	27
3.4.2.	Avaliação da expressão por PCR em tempo real .....	27
3.5.	Quantificação da concentração de prostaglandinas por ELISA .....	28
3.6.	Análise estatística dos dados .....	28
3.7.	Avaliação histológica - Classificação das amostras endometriais .....	29
4.	Resultados.....	30
4.1.	Recetores do TGFβ1: ALK5 e TGFRII .....	31
4.1.1.	A variação na expressão génica dos recetores ALK5 e TGFRII, no endométrio equino, de acordo com a fase do ciclo e com a evolução da fibrose .....	31
4.1.2.	Efeito dos tratamentos com Nodal, TNFα e ocitocina, no endométrio equino, sobre a expressão de mRNA dos recetores .....	33
4.1.3.	Comparação entre os efeitos do Nodal, nas diferentes concentrações. ....	35
4.1.4.	Determinação e Comparação do rácio mRNA ALK5:TGFRII .....	37
4.2.	Recetores do Nodal: ALK4 e ALK7.....	39
4.2.1.	A variação na expressão génica dos recetores ALK4 e ALK7, no endométrio equino, de acordo com a fase do ciclo e com a evolução da fibrose .....	39
4.2.2.	Efeito dos tratamentos com Nodal, TNFα e ocitocina, no endométrio equino, sobre a expressão de mRNA dos recetores. ....	41
4.2.3.	Comparação entre os efeitos do Nodal, nas diferentes concentrações. ....	42

4.3.	Prostaglandinas: recetores da PGE <sub>2</sub> e medição da PGE <sub>2</sub> e da PGF <sub>2α</sub> .....	44
4.3.1.	A variação na expressão génica dos recetores EP2 e EP4, no endométrio equino, de acordo com a fase do ciclo e com a evolução da fibrose .....	44
4.3.2.	Efeito dos tratamentos com Nodal, TNF $\alpha$ e ocitocina, no endométrio equino, sobre a expressão de mRNA dos recetores. ....	46
4.3.3.	Comparação entre os efeitos do Nodal, nas diferentes concentrações. ....	47
4.3.4.	Medição das Prostaglandinas E <sub>2</sub> e F <sub>2α</sub> .....	49
5.	Discussão.....	51
5.1.	Expressão dos recetores TGFRII e ALK5 no endométrio equino .....	51
5.1.1.	Expressão dos recetores no decurso da endometrose e como são expressos noutros modelos de doenças fibróticas .....	51
5.1.2.	Alteração do rácio de mRNA ALK5:TGFRII pelo Nodal e a sua relação com a progressão da fibrose.....	52
5.2.	Expressão dos recetores ALK4 e ALK7 no endométrio equino.....	55
5.2.1.	O recetor ALK7 na endometrose da égua e noutras doenças fibróticas .....	55
5.3.	Produção de PGs no endométrio equino, sob a influência do Nodal.....	60
5.4.	Expressão dos recetores EP2 e EP4 no endométrio equino .....	61
5.5.	Relação da PGE <sub>2</sub> e dos recetores EP2 e EP4, na endometrose e noutros modelos fibróticos.....	61
6.	Conclusões.....	63
7.	Bibliografia.....	64
	Anexo 1 .....	76



## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> Comparação da expressão de mRNA de TGFRII e ALK5, no endométrio equino, no grupo de controlo, entre fases do ciclo diferentes, e em endométrios de diferentes categorias de Kenney. ....	31
<b>Figura 2.</b> Comparação da expressão de mRNA de TGFRII com a expressão de mRNA de ALK5, no endométrio equino, não tratado, durante as diferentes fases do ciclo éstrico, considerando a classificação de Kenney. ....	32
<b>Figura 3.</b> Quantificação relativa da expressão de mRNA de TGFRII e ALK5, em endométrio equino, durante as diferentes fases do ciclo éstrico, considerando a classificação de Kenney....	34
<b>Figura 4.</b> Comparação da expressão de mRNA de TGFRII, no endométrio equino, sob o efeito de diferentes concentrações de Nodal, considerando a classificação de Kenney dos endométrios, e a fase do ciclo éstrico. ....	35
<b>Figura 5.</b> Comparação da expressão de mRNA de ALK5, no endométrio equino, sob o efeito de diferentes concentrações de Nodal, considerando a classificação de Kenney dos endométrios, e a fase do ciclo éstrico.....	36
<b>Figura 6.</b> Representação do rácio mRNA ALK5:TGFRII, no endométrio equino, considerando a classificação de Kenney e a fase do ciclo éstrico.....	37
<b>Figura 7.</b> Comparação da expressão de mRNA de ALK4 e ALK7, no endométrio equino, no grupo de controlo, entre fases do ciclo diferentes, considerando a classificação de Kenney dos endométrios. ....	40
<b>Figura 8.</b> Comparação da expressão de mRNA de ALK4 com a expressão de mRNA de ALK7, no endométrio equino, não tratado, durante as diferentes fases do ciclo éstrico, independentemente da classificação de Kenney.....	40
<b>Figura 9.</b> Quantificação relativa da expressão de mRNA de ALK4 e ALK7, em endométrio equino, durante as diferentes fases do ciclo éstrico, considerando a classificação de Kenney....	41
<b>Figura 10.</b> Comparação da expressão de mRNA de ALK4, no endométrio equino, sob o efeito de diferentes concentrações de Nodal, considerando a classificação de Kenney dos endométrios, e a fase do ciclo éstrico.....	42
<b>Figura 11.</b> Comparação da expressão de mRNA de ALK7, no endométrio equino, sob o efeito de diferentes concentrações de Nodal, considerando apenas a fase do ciclo éstrico. ....	43
<b>Figura 12.</b> Comparação da expressão de mRNA de EP2 e EP4, no endométrio equino, no grupo de controlo, entre fases do ciclo diferentes, considerando a classificação de Kenney. ....	45



<b>Figura 13.</b> Comparação da expressão de mRNA de EP2 com a expressão de mRNA de EP4, no endométrio equino, não tratado, durante as diferentes fases do ciclo éstrico, independentemente da classificação de Kenney.....	45
<b>Figura 14.</b> Quantificação relativa da expressão de mRNA de EP2 e EP4, em endométrio equino, durante as diferentes fases do ciclo éstrico, considerando a classificação de Kenney. ....	46
<b>Figura 15.</b> Comparação da expressão de mRNA de EP2, no endométrio equino, sob o efeito de diferentes concentrações de Nodal, considerando a classificação de Kenney dos endométrios, e a fase do ciclo éstrico.....	48
<b>Figura 16.</b> Comparação da expressão de mRNA de EP4, no endométrio equino, sob o efeito de diferentes concentrações de Nodal, considerando a classificação de Kenney dos endométrios, e a fase do ciclo éstrico.....	48
<b>Figura 17.</b> Medição da produção de PGE <sub>2</sub> e PGF <sub>2α</sub> pelo endométrio equino nas diferentes fases do ciclo éstrico.....	49

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Sistema de Categorização de Kenney (Kenney 1978) .....	3
<b>Tabela 2.</b> Sistema de categorização de Kenney e Doig, de 1986 (Adaptado de Snider et al., 2011) .....	4
<b>Tabela 3.</b> Resumo dos diferentes tipos de caracterização da endometrose.....	5
<b>Tabela 4.</b> Resultados imunohistoquímicos sobre a expressão de ESR e PGR em foci fibróticos comparados com áreas inalteradas (Adaptado de Hoffmann et al., 2009a e Lehmann et al., 2011) .....	6
<b>Tabela 5.</b> Alterações imunohistoquímicas da expressão de proteínas do histotrofo em foci fibróticos, de acordo com o tipo de endometrose, e comparativamente a tecido inalterado (Adaptado de Hoffmann et al., 2009b e Lehmann et al., 2011).....	7
<b>Tabela 6.</b> Sequência específica de primers usados para os gene-alvo, para real-time PCR quantitativo.....	28
<b>Tabela 7.</b> Distribuição do número de amostras, representando o n final de cada análise estatística. .....	29
<b>Tabela 8.</b> Distribuição das éguas por grupos estatísticos, de acordo com fase do ciclo e categoria de Kenney&Doig. ....	29



## Lista de Abreviaturas e Siglas

$\alpha$ -SMA	alpha-Smooth Muscle Actin
AA	Ácido Araquidónico
ActRIIA,B	Recetor tipo II da activina A, B
Akt, PKB	Protein Kinase B
ALK	Activin-Like Kinase
BAMBI	BMP and Activine receptor Membrane-Bound Inhibitor
BMP	Bone morphogenic protein
CAL	Calbidina
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
Cer1, Cer2	Cerberus 1 e 2
CFC	Cripto -FRL1-Cryptic
CL	Corpo Lúteo
CCN	CYR61/CTGF/NOV
CCN2	membro 2 da família CCN
COL1A1	Colagénio tipo I alfa 1
cPLA2	Cytosolic Phospholipases A2
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
dATP	desoxiAdenosina Trifosfatada
dCTP	desoxiCitidina Trifosfatada
dGTP	desoxiGuanosina Trifosfatada
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dTTP	desoxiTimidina Trifosfatada
E <sub>2</sub>	Estradiol
eCG	Equine Chorionic Gonadotropin
ECM	Extracellular Matrix
EGF	Epithelial Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial–Mesenchymal Transition
EP	E-prostanoid receptor (recetor da PGE <sub>2</sub> )
ERK 1/2	Extracellular signal–Regulated Kinases 1/2
ESR	Recetor de Estradiol
FF	Fase Folicular

FL	Fase Lútea
FP	F-prostanoid receptor (recetor da PGF <sub>2α</sub> )
FSH	Follicle Stimulating Hormone
Fw	Forward primer
GDF	Growth Differentiation Factor
GLY	Glicogénio
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
GS box	Domínio justamembranário rico em glicina-serina
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor-1
IFN-γ	Interferão-gama
IGFBP-3	Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 3
IL	Interleucina
ILK	Integrin-Like Kinase
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IP3	Inositol Phosphate 3
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LAP	Latency Associated Peptide
LPS	Lipopolissacarídeo
M	mol
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MIS	Mullerian Inhibitory Substance
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MRPL32	Proteína ribosomal L32
MS	Mucopolissacáridos
MT1- MMP-1	Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase 1
NET	Neutrophil extracellular traps
NO	Nitric Oxide
OXT	Ocitocina
PI3k	Phosphoinositide 3-kinase
P <sub>4</sub>	Progesterona
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PBS	Solução de tampão fosfato salino
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGES	PGE <sub>2</sub> sintase

PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
PGFM	13,14-dihydro-15-keto-PGF <sub>2α</sub>
PGFS	PGF <sub>2α</sub> sintase
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGR	Recetor de progesterona
PGs	Prostaglandinas
PGTs	Transportadores de prostaglandinas
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMNs	Polimorfonucleares, neutrófilos
PPM1a	Protein serine/threonine phosphatase 1A
pSmad	Smad fosforilado
PTGS1 e 2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1,2
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
Rv	Reverse primer
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
Smad	Amálgama ou fusão do nome do gene <i>Sma</i> de <i>Caenorhabditis elegans</i> com o nome do gene <i>Mad</i> da proteína mothers against decapentaplegic de <i>Drosophila</i>
Smurf 1/2	SMad Ubiquination Regulatory Factors 1 e 2
TGFβ1, 2, 3	Tranforming Growth Factor beta1, 2, 3
<i>TGFRII</i>	Recetor tipo II do TGFβ
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF, TNFα	Tumor Necrosis Factor-alpha
TβRIIΔk	Recetor do tipo II do TGFβ domínio citoplasmático negativo
UCA	Uterocalina
UF	Uteroferrina
UGL	Uteroglobina
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Xiap	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein



## **Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio**

O estágio curricular foi realizado no laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfologia e Função, FMV-UL, o qual foi iniciado a 1 de Fevereiro de 2016 e foi completado a 15 de Setembro de 2016. Durante esse período parte do trabalho foi desenvolvido no laboratório do Prof. Dariusz Skarzynski, no Instituto de Reprodução Animal, Polish Academy of Science (PAS), Olsztyn, Polónia, de 14 de Junho de 2016 a 13 de Julho de 2016.

O presente trabalho insere-se no projeto, “PTDC/CVT-REP/4202/2014” que tem como objetivo elucidar alguns mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela endometrose na égua. Esses estudos têm sido desenvolvidos no Departamento de Morfologia e Função da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, sob a égide do Centro de Investigação Interdisciplinar de Sanidade Animal (CIISA), e na PAS, Olsztyn, Polónia. Neste sentido, todas as actividades desempenhadas foram as necessárias para a realização deste projecto, mas também colaborou noutros projectos do departamento e na manutenção geral do laboratório. As actividades desempenhadas incluíram desde a preparação dos reagentes e do restante material necessário para a incubação dos explantes endometriais; à avaliação e selecção de úteros e processamento dos mesmos para obtenção de amostras; até à realização de técnicas de biologia molecular. Procedeu à extracção de RNA, à síntese de cDNA e quantificação com qRT-PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction), extracção e medição de proteína e realização de Western Blots. Também foi realizada a obtenção de meio de cultura condicionado pelos explantes endometriais submetidos aos diversos tratamentos *in vitro* e medição da concentração de prostaglandinas por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Por fim, colaborou na equipa voluntária de apoio à conferência 21<sup>st</sup> Annual meeting of European Association of Domestic Animal Reproduction (ESDAR), realizada de 27 a 29 de Outubro de 2016 em Lisboa. Durante dois meses, entre meados de Julho e meados de Setembro, acompanhou e deu formação a duas estagiárias, a Edyta Waleska e a Monika Zakrzewska, do laboratório do Instituto de Reprodução Animal, Polish Academy of Science (PAS), que se deslocaram à FMV/UL, para aprenderem o processo de extracção de RNA, síntese de cDNA e quantificação por QRT-PCR. O trabalho resultante foi seleccionado para apresentação no 21<sup>st</sup> Annual meeting of ESDAR, Berna, Suíça de 24-26 Agosto de 2017.



## 1. Revisão Bibliográfica

### 1.1. A endometrose: a sua importância e a sua caracterização

A endometrose, assim denominada por Kenney, refere-se à endometrite crónica e degenerativa (Snider *et al.*, 2011), a qual tem sido das principais causas de infertilidade na égua, e por esse motivo, o foco de estudo ao longo do tempo (Kenney, 1978; Schoon & Schoon 2003, Snider *et al.*, 2011; Aresu *et al.*, 2012). É tipicamente caracterizada por fibrose activa/inactiva, periglandular e/ou do estroma, originando ninhos fibróticos acompanhados de alterações glandulares, embora possam existir glândulas adjacentes inalteradas (Hoffmann *et al.*, 2009a). Estas alterações do endométrio vão traduzir-se em disfunções da capacidade reprodutiva da égua e correlacionar-se fortemente com a sua taxa de fertilidade (Kenney, 1978; Schoon & Schoon, 2003). No curso da endometrose, a progressão da fibrose acompanha-se, entre outros aspectos (Walter *et al.*, 2001a, 2001b; Hoffmann *et al.*, 2009a), de alterações da expressão protéica dos recetores esteróides (Aupperle *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2009a, Lehmann *et al.*, 2011), e de alterações na produção de histotrofo (Hoffmann *et al.*, 2009b; Lehmann *et al.*, 2011) e na produção de prostaglandinas (PGs) (Szóstek *et al.*, 2012).

Devido à importância da saúde uterina para o bem-estar animal e, principalmente, para a sua capacidade reprodutiva, dedicámo-nos a estudar um mecanismo pró-fibrótico potencial, pela acção do Nodal, no endométrio equino. Trabalhos realizados no nosso laboratório demonstraram a presença do Nodal e dos seus receptores *ALK4* e *ALK7*, no endométrio equino, com maior imunomarcagem do receptor *ALK7* em zonas próximas a ninhos fibróticos (Volpi, 2013). Considerando a proximidade da via de sinalização do Nodal com a do TGF $\beta$ 1, e o seu papel na tumorigénese e na inflamação, poderá haver envolvimento do Nodal na fibrose (Jörnvall *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). O Nodal também consegue inibir o BMP7 (Yeo & Whitman, 2001), o qual tem várias funções antifibróticas (revisto por Weiskirchen & Meurer, 2013). Noutros modelos de doenças fibróticas, o TGF $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1) ganha destaque como pró-fibrótico (revisto por Leask & Abraham, 2004; Wynn, 2012; Verrechia & Mauviel, 2007), assim como a PGE<sub>2</sub>, embora como anti-fibrótica (Huang *et al.*, 2009; Bozyk & Moore, 2011; Boor, 2012; Van Ly *et al.*, 2012; Garrison *et al.*, 2013), e por esse motivo, incidimos o nosso estudo, sobre a sinalização de ambos.

### 1.1.1. Caracterização da endometriose

Avaliações histológicas têm sido feitas ao longo do tempo, para ajudar na avaliação da fertilidade das éguas, sendo Kenney (1978) um dos primeiros a criar um sistema de categorização para as alterações observadas, usando como critérios o padrão de distribuição das lesões (em frequência e em localização), o tipo de inflamação celular (por tipo celular ou pelo aspeto do *foci*) e ainda a gravidade das lesões (inflamatórias ou de fibrose periglandular) (Kenney, 1978; Snider *et al.*, 2011). Outros sistemas de categorização foram revistos por Snider *et al.* (2011). O sistema de Kenney era inicialmente constituído por três categorias, as quais foram associadas com a taxa de partos esperada (Tabela 1).

**Tabela 1. Sistema de Categorização de Kenney (Kenney 1978)**

Cat.	Alterações Principais	TPE%
I	Sem alterações de atrofia ou hipoplasia. Caso exista inflamação ou fibrose são ligeiras e dispersas.	70 a 92%
II	Infiltrações difusas ligeiras a moderadas (1 a 10 camadas de colagénio) no estrato compacto ou dispersa, mas com frequentes <i>foci</i> na <i>lamina propria</i> , Alterações fibróticas frequentes, mas dispersas, rodeando ramos individuais de glândulas endometriais ou ninhos de ramos até 3 a 5,5 mm (até 4 campos lineares), <i>Lacunae</i> linfáticas extensas. Atrofia Endometrial.	50 a 67%
III	Fibrose periglandular grave (>10 camadas de colagénio) e extensa (5 ou mais ninhos de 5.5mm, em pelo menos 4 campos lineares). Infiltrações inflamatórias graves e extensas (infiltração contínua) e <i>lacunae</i> linfáticas que dão características palpáveis de flacidez à parede uterina.	<10%

Este sistema foi melhorado, por Kenney & Doig, em 1986 (Schoon & Schoon, 2003; Snider *et al.*, 2011), e tem sido amplamente utilizado na investigação científica, como referência universal à progressão da fibrose (Tabela 2) (Snider *et al.*, 2011). Neste novo sistema houve a subdivisão da categoria II em IIA e IIB. Nesta subdivisão consideraram a atrofia endometrial no fim da época reprodutiva (qualifica para inserção na categoria IIA), e a natureza aditiva das lesões, (*i.e.*, mais de uma lesão qualificante e sobe de categoria). Além disso, consideraram um aspeto não histológico, *i.e.*, quando uma égua tem como história pregressa mais de 2 anos sem partos, como qualificante para subir de categoria (Snider *et al.*, 2011).

**Tabela 2. Sistema de categorização de Kenney e Doig, de 1986 (Adaptado de Snider *et al.*, 2011)**

<b>Cat.</b>	<b>Alterações Principais</b>	<b>TPE%</b>
<b>I</b>	Sem alterações de atrofia ou hipoplasia. Se existir alguma alteração inflamação ou fibrose é ligeira (1 a 3 camadas de colagénio) e dispersa.	80 a 90%
<b>IIA</b>	Infiltrações inflamatórias ligeiras e dispersas, Fibrose ligeira (1 a 3 camadas de colagénio) e atrofia endometrial no fim da época reprodutiva.	50 a 80%
<b>IIIB</b>	Infiltrações inflamatórias moderadas e dispersas, fibrose moderada (4 a 10 camadas de colagénio).	10 a 50%
<b>III</b>	Alterações patológicas graves e irreversíveis, como a fibrose e a inflamação.	<10%

É importante referir que Kenney menciona a importância de considerar outros fatores, não só esta categorização mas também a fase do ciclo éstrico, alterações comportamentais e hormonais da égua, assim como a história clínica e reprodutiva do animal (Kenney, 1978). Existem também outras características histológicas, morfológicas e funcionais que afetam a taxa de fertilidade, como a má diferenciação glandular, angiopatias ou o carácter reversível/irreversível das lesões, e ainda alterações nos padrões de secreção que devem ser tidas em conta nas avaliações de biópsias (Schoon & Schoon, 2003; Lehmann *et al.*, 2011). A lesão mais característica da endometrose é a fibrose periglandular, a qual é causada pela deposição de colagénio fibrilar, por camadas concêntricas de fibroblastos transformados em miofibroblastos (Evans *et al.*, 1998; Walter *et al.*, 2001b).

O início da fibrose é caracterizado histomorfologicamente por células epiteliais que hipertrofiam, ou que podem tornar-se hiperplásicas, e células do estroma periglandulares, caracterizadas por uma forma poligonal grande e pela produção activa de colagénio. Posteriormente, as células epiteliais degeneram ou atrofiam, acompanhadas de alterações glandulares (glândulas císticas, ninhos glandulares, hipertrofia ou atrofia glandulares, ectasias), havendo congestão intraluminal das glândulas e, por vezes, a presença de sedimentos (Kenney, 1978; Walter *et al.*, 2001a, 2003).

Quando foi observado que havia diferentes estados metabólicos das células do estroma, a endometrose foi caracterizada como activa ou inactiva, (Aupperle *et al.*, 2000; Schoon & Schoon, 2003), cuja observação foi sustentada por estudos mais recentes (Hoffmann *et al.*, 2009a, Lehmann *et al.*, 2011; Hanada *et al.*, 2014). A endometrose também foi caracterizada como destrutiva ou não destrutiva, (Hoffmann *et al.*, 2009a). Por fim, também pode ser caracterizada de acordo com o padrão de diferenciação do endométrio em síncrono com o ciclo éstrico ou assíncrono com o ciclo éstrico (Hoffmann *et al.*, 2009b). Estas diferentes caracterizações estão sumarizadas na Tabela 3.

**Tabela 3. Resumo dos diferentes tipos de caracterização da endometrose.**

<b>Activo (se 75% do estroma)</b>	<b>Inativo (se 75% do estroma)</b>
Glândulas individuais com várias células do estroma fibróticas desordenadas. Diferenciação metabólica activa é caracterizada por células de núcleo de tamanho médio a grande, hipocromático e de citoplasma pálido.	Pequenos ninhos glandulares rodeados por células do estroma fibróticas que se organizam de forma alinhada com o eixo da glândula adjacente (periglandulares). Diferenciação metabólica inativa é caracterizada por núcleo fusiforme hiperchromático e de citoplasma alongado.
<b>Destrutiva Activa</b>	<b>Destrutiva Inativa</b>
+ várias células epiteliais degeneradas e camadas de células do estroma fibróticas invasivas, que penetram o lúmen.	+vários focos de destruição de células epiteliais individuais, com congestão das secreções uterinas.
<b>Padrão Síncrono com o Ciclo</b>	<b>Padrão Assíncrono com o Ciclo</b>
Padrão Imunohistoquímico do epitélio glandular afetado, no <i>foci</i> fibrótico, corresponde ao padrão típico (ciclo-dependente) das glândulas adjacentes inalteradas.	Padrão Imunohistoquímico do epitélio glandular afetado, no <i>foci</i> fibrótico, não corresponde ao padrão típico (ciclo-independente) das glândulas adjacentes inalteradas.

O endométrio é um dos alvos das hormonas esteróides ou hormonas sexuais, o estradiol ( $E_2$ ), produzido pelas células da granulosa nos folículos ováricos durante a fase folicular, e a progesterona ( $P_4$ ), que é produzida pelas células esteroidogénicas do corpo lúteo, durante a fase lútea, e também pela placenta (Aupperle *et al.*, 2000, Hoffmann *et al.*, 2009a, Szóstek *et al.*, 2014a). Estas hormonas são responsáveis por controlar a diferenciação e a proliferação celular (Schoon *et al.*, 1999, Aupperle *et al.*, 2000, Szóstek *et al.*, 2014a), a angiogénese, a motilidade uterina, o comportamento reprodutivo, e também a produção de PGs, do histotrofo, de NO (nitric oxide), entre outros (Roberto da Costa *et al.*, 2008; Szóstek *et al.*, 2014a).

Este leque de funções exige que estas hormonas estejam associadas a padrões histomorfológicos, enzimohistoquímicos e imunohistoquímicos característicos de cada fase (folicular ou lútea) do ciclo éstrico (Hoffmann *et al.*, 2009a), ajustadas às necessidades do seu estado reprodutivo. A má diferenciação endometrial desigual é, provavelmente, resultado de um endométrio parcialmente refractário com alteração na expressão protéica de recetores de  $E_2$  (ESR) e/ou de  $P_4$  (PGR) (Schoon *et al.*, 1999). A expressão de ESR e PGR é indispensável para o controlo hormonal do útero, como forma de manter o ovário e o útero sincronizados, pelo eixo hipotálamo-pituitária-ovário.

Com a progressão da endometriose, foram detetados padrões assíncronos da expressão de ESR e PGR (Tabela 4), os quais variam, de acordo com o tipo de endometriose (destrutiva ou não destrutiva) e/ou com o tipo de actividade metabólica do estroma (activo, inactivo ou misto), mas sendo predominantemente caracterizado por uma diminuição da expressão (Aupperle *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2009a, Lehmann *et al.*, 2011).

**Tabela 4. Resultados imunohistoquímicos sobre a expressão de ESR e PGR em foci fibróticos comparados com áreas inalteradas (Adaptado de Hoffmann *et al.*, 2009a e Lehmann *et al.*, 2011)**  
A intensidade da marcação é indicada por setas: (↓)-diminuição fraca, ↓- diminuição ligeira; ↓(↓)-diminuição ligeira a moderada; ↓↓- diminuição moderada; ↓↓↓-diminuição forte ; (↑)- aumento fraco; ↑-aumento ligeiro; ↑(↑)-aumento ligeiro a moderado; ↑↑-aumento moderado.

Referências		Não destrutiva			Destrutiva		
		Activa	Inactiva	Mista	Activa	Inactiva	Mista
<b>Células Estromais</b>							
<b>ESR</b>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2009a	↓↓	↓↓		↓↓	↓↓	
	Lehmann <i>et al.</i> , 2011	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓(↓)	↓(↓)
<b>PGR</b>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2009a	↓(↓)	↓(↓)		↓↓	↓(↓)	
	Lehmann <i>et al.</i> , 2011	↓↓(↓)	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
<b>Células Epiteliais Glandulares</b>							
<b>ESR</b>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2009a	↑	↓		↓↓	↓↓	
	Lehmann <i>et al.</i> , 2011	↑↑	↓↓	↑(↑)	↑	↓	↓(↓)/ ↑(↑)
<b>PGR</b>	Hoffmann <i>et al.</i> , 2009a	(↑)	(↓)		↓(↓)	(↓)	
	Lehmann <i>et al.</i> , 2011	↑(↑)	↓(↓)	↓/↑	↓	↓(↓)	↓↓

No endométrio, a expressão protéica de ESR e PGR nas células do estroma fibrótico apresentou uma diminuição da sua expressão, comparativamente às células de estroma não fibrótico, a qual foi relativamente semelhante entre tipos de endometriose e/ou de actividade do estroma (Hoffmann *et al.*, 2009a; Lehmann *et al.*, 2011). No entanto, nas células epiteliais glandulares, já se observou uma influência, nomeadamente, a expressão protéica de ESR encontrou-se diminuída nas formas inactivas e aumentada na forma não destrutiva activa (Hoffmann *et al.*, 2009a; Lehmann *et al.*, 2011). A expressão de PGR mostrou-se aumentada na forma não destrutiva activa e diminuída nas restantes (Hoffmann *et al.*, 2009a; Lehmann *et al.*, 2011).

Outra alteração importante, consequente da endometriose, é a alteração da secreção do histotrofo, já sugerido anteriormente pela alteração de padrão de glucoconjugados (Walter *et al.*, 2001a). A secreção do histotrofo pelo endométrio é indispensável para a criação dum microambiente uterino favorável ao desenvolvimento do embrião, especialmente na égua, devido ao longo período pré-implantação (Walter *et al.*, 2001a; Lehmann *et al.*, 2011).

Tanto a quantidade como a qualidade do histotrofo são essenciais e se alterados, podem ser a causa de infertilidade e perda embrionária precoce (Hoffmann *et al.*, 2009b). O histotrofo é composto por uteroglobina (UGL), uteroferrina (UF), uterocalina (UCA), calbidina (CAL) e carboidratos como o glicogénio (GLY), e mucopolissacáridos (MS).

A UGL, UF e UCA são secretadas de forma P<sub>4</sub>-dependente. Em relação às suas funções, a UGL tem papel imunomodulador, anti-inflamatório e anti-fibrótico (Hoffmann *et al.*, 2009b; Lehmann *et al.*, 2011), sendo o seu possível papel o de proteger o embrião. Alguns estudos imunohistoquímicos foram desenvolvidos para caracterizar a expressão de proteínas em relação à endometriose e à sincronidade do endométrio. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 5.

**Tabela 5. Alterações imunohistoquímicas da expressão de proteínas do histotrofo em foci fibróticos, de acordo com o tipo de endometriose, e comparativamente a tecido inalterado (Adaptado de Hoffmann *et al.*, 2009b e Lehmann *et al.*, 2011)** A alteração da expressão é indicada por setas: ↓- diminuição ligeira; ↓(↓) - diminuição ligeira a moderada; ↓↓- diminuição moderada; (↑)- aumento fraco; ↑-aumento ligeiro. ND - Endometriose não destrutiva, D- Endometriose destrutiva; UGL – uteroglobina; CAL -calbidina; UCA - uterocalina; GLY – glicogénio; UF – uteroferrina.

Referências	Hoffmann <i>et al.</i> , 2009b				Lehmann <i>et al.</i> , 2011			
	ND		D		ND		D	
<b>Tipo de endometriose</b>								
	75%	25%	96%	4%	F	I	F	I
<b>UGL</b>	↓↓	↑	↓↓	↑	↑(↑)*	↓(↓)	↓(↓)/↑	↓↓↓*
<b>CAL</b>	↓	↑	↓		↓/↑	↑	↓/↑	↓/↑
<b>UCA</b>	↓	↑	↓		↓(↓)	↓(↓)	↓	↓(↓)
<b>GLY</b>	↓↓	↑	↓↓	(↑)				
	21%	79%	40%	60%				
<b>UF</b>	↓↓	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑

## 1.2. Mecanismos da Endometriose

O mecanismo para o desenvolvimento da endometriose, sugerido por Hoffmann *et al.* (2009a), é iniciado por uma alteração e activação do epitélio, com aumento da espessura da lâmina basal, das zonas afetadas. A lâmina basal tem uma função importante na regulação do epitélio e na síntese de fatores, sendo que apenas no seu estado intacto é que consegue haver uma comunicação e regulação adequadas (revisado por Buczkowska *et al.*, 2014). Nesta situação, pode surgir um conjunto de factores auto-induzíveis e que conseguem interagir de forma agonista e/ou antagonista, uns com os outros, e assim desencadear a fibrose (Atamas, 2002; Cadario *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2009a). A alteração do epitélio pode ocorrer por uma variedade de fatores, tais como a endometrite, a hipóxia, a angioesclerose grave, bem com alterações no processo de reparação do tecido e no *turnover* da lâmina basal. A fibrose é definida por excessiva produção, deposição e contracção da ECM (particularmente de colagénio 1 e fibronectina), resultando em disfunção orgânica e, possivelmente, na morte (Leask & Abraham, 2004; Wynn & Ramalingam, 2012; Verrechia & Mauviel, 2007). O TGFβ1 e o CTGF são considerados citocinas centrais da fibrogénese (Verrechia & Mauviel, 2007), estimulando os miofibroblastos, os quais são os principais produtores de ECM e são capazes de causar fortes contracções da ECM (revisado por Hinz *et al.*, 2012).

### 1.2.1. A inflamação e a resposta Th2, como mediadores da fibrose

Um dos mecanismos propostos é que a endometriose será uma seqüela de processos inflamatórios crônicos, à semelhança do que ocorre noutras doenças fibróticas (Wynn & Ramalingam, 2012; Rebordão *et al.*, 2014b). Fisiologicamente, a inseminação, induz uma inflamação do endométrio (Endometrite induzida pela reprodução), a qual é considerada um mecanismo normal e necessário para eliminar o sêmen e qualquer agente possivelmente patogénico, de modo a preparar o útero para receber o embrião (LeBlanc & Causey 2009; Woodward & Troedsson, 2015). As éguas dependem de vários mecanismos para realizarem uma limpeza uterina num tempo apropriado. Quando um ou mais desses mecanismos falha ou é alterado, e a égua não consegue eliminar a inflamação, a endometrite torna-se persistente. Inicialmente notou-se que algumas éguas apresentavam maior dificuldade em eliminar a inflamação ou a infecção, às quais foram atribuídas o termo de “suscetíveis”. As éguas que conseguiam resolver a inflamação/infecção em 24 a 48 horas foram consideradas “resistentes”. Esta definição de “suscetível” tem tido alterações ao longo das décadas, dependendo dos autores e dos parâmetros de estudo (revisado por Woodward & Troedsson, 2015).

De maneira geral, a suscetibilidade à endometrite deve ser caracterizada tendo em conta a história reprodutiva e a qualidade do endométrio avaliada por biópsia. Há vários mecanismos envolvidos na defesa do útero assim como há vários fatores que influenciam a sua eficiência (revisados por LeBlanc & Causey 2009 e Woodward & Troedsson, 2015). Nestes incluem-se defeitos anatómicos (má conformação perineal, útero pendular, incompetência do selo vestibulo-vaginal, alargamento da vagina ou cérvix incompetente) a defeitos degenerativos (disfunção do miométrio, endometriose, linfagiectasia, angiose). Recentemente, foi avaliada a importância da drenagem uterina e do bom funcionamento/relaxamento do cérvix (Reilas *et al.*, 2016), juntando-se à importância da capacidade contrátil do miométrio (revisado por Woodward & Troedsson, 2015). Neste estudo foi também demonstrada uma forte correlação com a oclusão cervical e, conseqüente aumento de células e citocinas inflamatórias, com um aumento da fibrose e diminuição da fertilidade (Reilas *et al.*, 2016). Existe um fenómeno, a NETose, que ocorre no endométrio equino, como mecanismo alternativo ou complementar à fagocitose, durante a endometrite (Rebordão *et al.*, 2014a, 2014b). No entanto, este mecanismo que é utilizado pelos PMNs (polimorfonucleares, neutrófilos), pode ter uma acção dupla e contrária: por um lado a de antimicrobiano e função imunomodulatória e por outro, a libertação de proteínas que podem vir a danificar as células endometriais. Rebordão *et al.*, (2014a), estudaram o efeito que as NETs (neutrophil extracellular traps) podem ter na modulação da resposta inflamatória e na endometriose e concluíram que os constituintes das NETs conseguiam causar a sobre-expressão de TGFβ1, TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1) e colagénio 1 (Rebordão *et al.*, 2014b). Nos endométrios afetados com endometriose, há alterações do sistema de ILs (interleucinas), das PGs, e das MMPs (matrix metalloproteinases)/TIMPs que podem ser conseqüências, mas também podem agir como factores que promovem o desenvolvimento, ou pelo menos, a manutenção da fibrose (Atamas, 2002; Szóstek *et al.*, 2013; Rebordão *et al.*, 2014a, 2014b).

Vários modelos de estudo de doenças fibróticas demonstraram que o grau de fibrose e o grau de inflamação não estão sempre correlacionados, tanto em humanos (Wynn, 2004) como em estudos da endometriose equina (Hoffmann *et al.*, 2009a; Aresu *et al.*, 2012). Este facto sugere que os mecanismos que regulam a fibrose são independentes daqueles que regulam a inflamação (Cadario, 2002; Wynn, 2004; Aresu *et al.*, 2012). No entanto, as respostas imunitárias do tipo Th<sub>2</sub> (cujas citocinas principais são IL-4, IL-5 e IL-13) estão relacionadas com a activação de mecanismos pró-fibróticos, como pela indução de genes como os do procolagénio I e III, TIMP-1 ou das MMP-2 e -9 (Lee *et al.*, 2001; Wynn, 2004). As citocinas IL-4 e IL-13 são fortes indutoras da fibrose, e, em certos estudos, a IL-4 consegue ser duplamente mais eficiente que o TGFβ na sua capacidade pró-fibrótica (Wynn, 2004). A IL-13 partilha a mesma via de sinalização de IL-4, partilhando também funções, sendo, no entanto, a IL-13 mais potente que a IL-4, possivelmente por diferenças na concentração ou por alterações na via de sinalização (Wynn, 2004). A IL-13 também consegue activar indiretamente o TGFβ, ao induzir MMPs (como a MMP-9) capazes de remover o LAP (latency associated peptide) (Leet *et al.*, 2001; Wynn, 2004). Posteriormente, foi demonstrado que o IL-4 e IL-13 conseguem induzir a diferenciação de fibrócitos (Shao *et al.*, 2008). Para além dos miofibroblastos, os macrófagos também desempenham papéis importantes na fibrose (revisto por Wynn & Barron, 2010). Os macrófagos apresentam duas formas activas, a clássica e a alternativa, as quais são caracterizadas, respetivamente, pela expressão de iNOS (inducible nitric oxide synthase) induzida por IFN-γ (interferão-gama) ou pela expressão de arginase e TGFβ1, induzidos por IL-4 ou IL-13 (Wynn & Ramalingam, 2012). Estas células têm funções dependentes e independentes do TGFβ1, sendo importantes reguladoras da fibrose (Wynn & Barron, 2010).

A Activina A também desempenha funções na inflamação e no estabelecimento de patologias fibróticas (revisto por Werner & Alzheimer, 2006), tendo sido demonstrado que funciona como uma citocina Th<sub>2</sub> promovendo a activação de macrófagos M<sub>2</sub> (Ogawa *et al.*, 2006). Recentemente, foi demonstrado que o Nodal também promove este tipo de resposta, induzindo os macrófagos M<sub>2</sub> (Wang *et al.*, 2014). Por fim, também a PGE<sub>2</sub> promove uma resposta do tipo Th<sub>2</sub> e Th<sub>17</sub> (Kalinski, 2012).

Aliás, a IL-6, produzida pela PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub> em fibroblastos pulmonares (Van Ly *et al.*, 2012) é prófibrótica (Moodley *et al.*, 2003). Num estudo, sobre as alterações do sistema interleucina (IL) no endométrio equino, comparando entre graus de endometriose e fases do ciclo éstrico, mostraram que, particularmente em endométrios de categoria II, há aumento da expressão génica e protéica de IL-6 e dos seus recetores (Szóstek *et al.*, 2013). No mesmo estudo, também mostraram aumento dos níveis de proteína e mRNA de IL-1β no endométrio equino, na fase lútea (Szóstek *et al.*, 2013). A IL-1β foi associada ao efeito bifásico da PGE<sub>2</sub>, anteriormente demonstrado em fibroblastos pulmonares, como mediadora da resposta fibroproliferativa (White *et al.*, 2008). Recentemente conseguiram associar a IL-6 e IL-1β com o aumento de α-SMA (α-smooth muscle actin) no endométrio equino, e sugeriram que a IL-6 poderá estar relacionada com a diferenciação de miofibroblastos e deposição de ECM (extracellular matrix), na endometriose equina (Szóstek *et al.*, 2016).



### 1.2.2. Regulação da ECM

Considera-se que o mecanismo base da fibrose é a desregulação da deposição de ECM, possivelmente iniciado por uma alteração da lâmina basal (Hoffmann *et al.*, 2009a; Wyn, 2012). A expressão génica de colagénio varia de acordo com a fase do ciclo éstrico, ajustando-se às alterações características de cada fase do ciclo éstrico (Gebhardt *et al.*, 2012). O miofibroblasto é a célula comum na génese de doenças fibróticas revistas na literatura (Wynn & Ramalingam, 2012; Hinz *et al.*, 2012), sendo também a célula predominante na endometrose equina (Walter *et al.*, 2001b; Hoffmann *et al.*, 2009a). Esta célula é temporariamente activada durante a reparação de tecidos e normalmente é desativada por apoptose, sendo a sua persistência que condiciona a progressão da fibrose (Hinz *et al.*, 2012). O miofibroblasto é uma célula que pode ter diferentes fontes, *i.e.*, fibroblastos residentes, fibrócitos e por EMT (epithelial–mesenchymal transition), sendo geralmente identificado pelo marcador  $\alpha$ -SMA. A sua característica fundamental é a capacidade de produzir e manter constante o desenvolvimento de fibras de stress de força contrátil, a qual supera no tempo a capacidade contrátil do músculo liso (Hinz *et al.*, 2012). Os mecanismos pelos quais os miofibroblastos são capazes de criar e manter as contraturas nos tecidos por tanto tempo (dias, a semanas e a anos), ainda não são conhecidos. No entanto, sugere-se que seja o grau de stress mecânico que indica a estratégia de produção e contracção de ECM (Hinz *et al.*, 2012). No endométrio da égua, há maior actividade miofibroblástica na forma destrutiva da endometrose que na forma não destrutiva, em particular na forma activa (Hoffmann *et al.*, 2009a).

Outro aspeto importante que regula o *turnover* da ECM, são as proteínas responsáveis pela sua degradação, nomeadamente a plasmina e as metaloproteinases de matriz (MMPs), e por sua vez, as proteínas que inibem as anteriores, como o PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) e as TIMPs, respetivamente (Branton & Kopp, 1999). A regulação da ECM por estas proteínas é importante para diversos fenómenos fisiológicos, como, na regulação da implantação do trofoblasto em que o Nodal-*ALK7* consegue promover a expressão protéica de TIMP-1 e assim diminuir a actividade de MMP-2 e MMP-9 (Nadeem *et al.*, 2011). Por outro lado, a expressão destas proteínas também pode estar associada com a fibrose, sendo induzidas pelo TGF $\beta$ 1 e expressas por macrófagos e miofibroblastos (Leask & Abraham, 2004; Wynn & Ramalingam, 2012).

As MMPs, particularmente a -2 e -9, conseguem activar o TGF $\beta$ 1 latente (Leask & Abraham, 2004). Podem também estar associadas com fenótipos mais agressivos e invasivos de tumores, como ocorre no melanoma ou tumor pancreático, por acção do Nodal (Fang *et al.*, 2013; Duan *et al.*, 2015). Apesar de ainda não ter sido encontrada uma correlação entre a expressão protéica de MMP2- e MMP-9 com a endometrose (Aresu *et al.*, 2012), este pode ser um mecanismo que contribui para a sua progressão ou manutenção. Um estudo anterior mostrou uma correlação entre o aumento da expressão de MMP-2 com a endometrose, não tendo, no entanto, conseguido demonstrar se o aumento seria uma tentativa de regular a ECM ou parte do mecanismo patológico (Walter *et al.*, 2005).

A endometriose pode apresentar uma morfologia destrutiva a qual é caracterizada pela invasão do lúmen por células do estroma fibróticas (Hoffmann *et al.*, 2009). Num estudo em fibrose pulmonar, as MMPs-9 e -13 mostraram-se necessárias para a migração dos precursores de miofibroblastos (Sato *et al.*, 2009).

### **1.2.3. O CTGF**

O CTGF (connective tissue growth factor), também denominado CCN2 (membro 2 da família CCN), é um potente mediador do efeito pró-fibrótico do TGF $\beta$ 1 (Leask & Abraham, 2004). Uma vez activo, o CTGF promove independentemente do TGF $\beta$ 1, a deposição de ECM, a inibição da degradação de ECM e a indução de miofibroblastos (Holmes *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2010). A hipóxia pode ser uma das causas de lesão da lâmina basal (Hoffmann *et al.*, 2009a) e a angiose será também uma degenerescência relacionada com a idade da égua que pode causar ou acompanhar o desenvolvimento da endometriose (Inoue *et al.*, 2000; Hanada *et al.*, 2014). O HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) é um factor importante em alguns processos fibróticos, tendo sido demonstrado que o HIF-1 regula os níveis de mRNA de CTGF e que o pode fazer de forma independente do TGF $\beta$  (Higgins *et al.*, 2004). O HIF em doenças fibróticas é pouco estudado no equino, no entanto, num estudo sobre alterações fibróticas da regeneração de feridas (tecido da granulação exuberante), a hipóxia estimulou a proliferação intensiva de fibroblastos por indução do HIF-1, que também alterou o *turnover* de ECM, aumentando os níveis de mRNA de *COL1A1* (colagénio tipo I alfa 1) e diminuindo os de MMP2 (Deschene *et al.*, 2011). No endométrio humano, a expressão de HIF-1 encontra-se co-localizada com a expressão do recetor *EP2*, havendo estimulação da transcrição génica do HIF-1, pela PGE<sub>2</sub>, como parte do mecanismo fisiológico que regula as alterações do endométrio, de acordo com a fase do ciclo menstrual (Critchley *et al.*, 2006). Noutro estudo, demonstraram a indução de CTGF e *COL1A1*, pela PGE<sub>2</sub>-EP, na ausência de *EP2*, embora não tenham determinado por qual recetor (*EP1*, *EP3* ou *EP4*) (Yu *et al.*, 2002).

### **1.3. A superfamília do TGF $\beta$ e a sua sinalização**

A superfamília do TGF $\beta$  é constituída por factores de crescimento cujas funções e vias de sinalização foram conservadas ao longo da evolução, acompanhando o desenvolvimento de organismos multicelulares, dos mais simples aos mais complexos, e sendo, possivelmente, fortes contribuidores para a diversidade e complexidade desses organismos (de Caestecker, 2004; Ten Dijke & Hill, 2004; Wu & Hill, 2009). Podemos dividir a superfamília em dois ramos filogenéticos: o ramo TGF $\beta$ /Activina, o qual contém os TGF $\beta$ s, as activinas, as inibinas, o Nodal e os Leftys (1 e 2); e o ramo BMP/GDF (bone morphogenic protein/growth differentiation factor) (Shi & Massagué, 2003; de Caestecker, 2004).

Os membros desta superfamília são determinantes no desenvolvimento embrionário, na manutenção da homeostase dos tecidos, na regulação de mecanismos celulares (Wu & Hill, 2009; Pauklin & Vallier, 2015) e na inflamação (Wynn, 2004; Wynn & Barron, 2012; Werner & Alzheimer, 2006; Wang et al., 2014) entre outras funções, como no aparelho reprodutivo (Jones *et al.*, 2002).

#### **1.3.1. Via de sinalização comum**

Os membros da superfamília do TGF $\beta$  sinalizam de forma semelhante, isto é, sinalizam por um par de recetores serina/treonina cinase do tipo I e do tipo II e por factores intracelulares de transdução de sinal, nomeadamente os Smads. São vários os mecanismos e outros fatores que intervêm na sinalização, de forma a permitir a diversidade de funções que estes ligandos apresentam (Shi & Massagué, 2003, Ten Dijke & Hill, 2004; de Caestecker, 2004; Shen, 2007). Estes mecanismos de regulação actuam em vários níveis, *i.e.*, ao nível do ligando, dos recetores e na transdução de sinal. Nos ligandos ocorrem variações de expressão génica, havendo a necessidade de processamento, estando também regulados a nível da estabilidade do precursor e da forma activa, da afinidade com o recetor e da suscetibilidade a “ligand-traps” (Shi & Massagué, 2003; Schier, 2009; Sampath & Robertson, 2016). A nível dos recetores, esta regulação depende da activação dos mesmos, da eficiência da ligação para a produção de sinal, da modulação/dependência de outras proteínas, e dos inibidores que se ligam aos recetores; ou ainda, a nível da regulação do transporte e da degradação intracelular (Blanchet *et al.*, 2008; Schier, 2009). A sinalização, a nível intracelular, também está muito regulada por factores de transcrição génica, assim como por co-activadores e co-repressores (Shi & Massagué, 2003).

#### **1.3.2. Regulação do sinal extracelular e a nível da membrana celular**

Abordando os recetores, estes são cinases de serina/treonina e são caracterizados como tipo I ou tipo II de acordo com a sequência conservada no seu domínio cinase. Nos recetores tipo I existe, especificamente, uma “caixa GS” (GS box), ou seja, um domínio justamembranário rico em glicina-serina, que é necessário para a activação deste recetor e para dar continuidade à cascata de sinalização intracelular (de Caestecker, 2004).

Existem 7 recetores tipo I, chamados de ALK (Activin receptor-Like Kinase; 1-7) e 5 recetores tipo II, que são denominados de acordo com o ligando dominante (TGF $\beta$ : *TGF $\beta$  RII*; BMPs: *BMP RII*; Activinas: *Act RIIA* e *Act RIIB*; Müllerian Inhibiting Substance: *MIS RII*) (Inman *et al.*, 2002; Shi & Massagué, 2003; de Caestecker, 2004; Ten Dijke & Hill, 2004).

A existência de poucos recetores, para o número de membros da família do TGF $\beta$ , que são mais de 30 membros, e para o número de funções que desempenham nos tecidos, gera a necessidade de vários mecanismos redundantes de forma a criar especificidade ao ligando e à função a exercer (Shi & Massagué, 2003; Ten Dijke & Hill, 2004; de Caestecker, 2004).

A sinalização a nível do recetor começa pela formação do complexo ligando-recetor, havendo geralmente maior afinidade para o recetor do tipo II, nomeadamente no caso do TGF $\beta$ 1 (Shi & Massagué, 2003; Gray *et al.*, 2006) e da Activina (Kelber *et al.*, 2008). Este complexo vai recrutar o recetor tipo I, cuja ligação causa a fosforilação da GS box, a qual recruta os R-Smads (Shi & Massagué, 2003). O TGF $\beta$  sinaliza principalmente pelo *ALK5* (Ten Dijke & Hill, 2004) mas também consegue sinalizar pelo *ALK1* e pelo *ALK2*, sempre via recetor *TGFR2* (Ten Dijke & Hill, 2004). A Activina e o Nodal partilham os recetores *ALK4*, *ActRIIA* e *ActRIIB* (Kumar *et al.*, 2001). O Nodal também sinaliza através do recetor *ALK7* via *ActRIIB* (Reissmann *et al.*, 2001), tendo sido descoberto que as Activinas B e AB também têm afinidade para este recetor via *ActRIIA*, apesar de sinalizarem preferencialmente pelo recetor *ALK4* (Tsuchida *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2006). A Activina também tem afinidade para o *ALK2*, no entanto este funciona como inibidor, uma vez que interfere com a ligação da Activina com o recetor tipo II (Renlund *et al.*, 2007).

### 1.3.3. Proteínas moduladoras da sinalização

A ligação entre ligando e recetor é regulada por outras proteínas, algumas extracelulares ou de membrana, as quais podem agir de forma agonista ou antagonista (Shi & Massagué, 2003). Existem proteínas solúveis que agem como “ligand-traps”, sequestrando os ligandos e impedindo a sua ligação ao recetor, *i.e.* no caso do TGF $\beta$  a decorina e  $\alpha_2$ -macroglobulina, no caso da Activina, a folistatina, e no caso do Nodal, as DAN /Cerberus (Shi & Massagué, 2003; Shen, 2007). São exemplo de proteínas de membrana, o betaglicano e a endogлина. Em detalhe, o betaglicano, ou recetor *TGFR3*, facilita a ligação do TGF $\beta$ 1 ao seu recetor tipo I, e é indispensável na sinalização do TGF $\beta$ 2 (Shi & Massagué, 2003; Yan *et al.*, 2002, Ten Dijke & Hill, 2004; Gray *et al.*, 2006). No entanto, também pode facilitar a ligação de inibinas aos recetores de activina, resultando da inibição da última e de BMPs que usem estes recetores (Yan *et al.*, 2002). A endogлина já tem duas funções, desviando a ligação do TGF $\beta$  do recetor *ALK5* (função antagonista) para o recetor *ALK1* (função agonista), tendo um papel essencial na modulação de sinal, uma vez que esses recetores causam a activação de diferentes Smads (Yan *et al.*, 2002; Shi & Massagué, 2003; Ten Dijke & Hill, 2004; Gray *et al.*, 2006). Um outro exemplo de proteína reguladora é a BAMBI (BMP and Activine receptor Membrane-Bound Inhibitor) que actua como pseudo-receptor e forma complexos inactivos com BMP, Activina e TGF $\beta$  (Shi & Massagué, 2003; Gray *et al.*, 2006).

Existe um último conjunto de proteínas importantes para a sinalização, as proteínas EGF-CFC, nomeadamente, o Cripto, que é um importante modulador da sinalização do Nodal (Yan *et al.*, 2002; Kelber *et al.*, 2008) e também da Activina (Kelber *et al.*, 2008) e do TGF $\beta$ 1 (Gray *et al.*, 2006), o qual será abordado adiante.

#### 1.3.4. Regulação do sinal intracelular

Os Smads, são mediadores intracelulares dos membros da superfamília do TGF $\beta$ , sendo subdivididos em três subfamílias: os Smads regulados por recetor (R-Smads1, 2, 3, 5 e 8) que são os únicos que são diretamente fosforilados pelos recetores tipo I activados; o Co-Smad que actua como mediador comum e é recrutado pelos R-Smads (Smad4); e os Smads inibidores, que antagonizam a sinalização (I-Smad6 e 7) (Itoh *et al.*, 2000; Itoh & Ten Dijke, 2007). Os R-smads geralmente estão localizados no citoplasma, enquanto que os I-Smads localizam-se no núcleo e o Co-Smad distribui-se por ambos os compartimentos celulares (Shi & Massagué, 2003). Quando os R-Smads são fosforilados e formam o complexo Smad com o Co-Smad, *i.e.* no caso do TGF/Activina/Nodal forma-se o complexo Smad2/3/4 o qual é depois transportado para o núcleo e vai interagir com os diferentes factores de transcrição, coactivadores e corepressores que vão determinar a expressão génica (Shi & Massagué, 2003; Ten Dijke & Hill, 2004). A expressão é regulada pela quantidade intranuclear de complexos Smad activos e também pela duração que estes actuam (Shi & Massagué, 2003; Ten Dijke & Hill, 2004; Schier, 2009). Existem fosfatases, como a PPM1A (protein serine/threonine phosphatase 1A), que vão desactivar/desfosforilar os Smads a baixo ritmo (Lin *et al.*, 2006). Estes Smads inativos voltam para o citoplasma e podem ser fosforilados novamente enquanto o complexo recetor permanecer activo. Desta forma, a activação do recetor mantém um fluxo de Smads para o núcleo, os quais vão sendo reciclados, e são representativos da duração da activação e da concentração do ligando (Bourillot *et al.*, 2002). A sensibilidade de determinadas células aos ligandos e à capacidade de sustentar a activação de Smads ou não, define o tipo de efeito que o ligando tem, *i.e.* o TGF $\beta$  em células epiteliais é citostático, mas em células pancreáticas tumorais a activação de Smad2 é demasiado curta para ter esse efeito. No entanto, as células respondem a outras funções induzidas pelo TGF $\beta$  (Shi & Massagué, 2003).

Os I-Smads regulam a sinalização de outra forma, sendo transportados para o citoplasma onde vão competir com os R-smads pela ligação ao complexo recetor (Itoh & Ten Dijke, 2007). O I-Smad6 aparenta usar outros mecanismos para além da competição pelo recetor. Contudo, como inibe preferencialmente os BMPs não iremos aprofundar aqui (Itoh *et al.*, 2000).

A degradação dos recetores ocorre por actuação de enzimas E3 ubiquitina ligases, como os Smurfs (SMad Ubiquitination Regulatory Factors 1 e 2), que são recrutados pelo I-Smad7 no núcleo, e depois ligam-se ao complexo ligando-recetor, marcando-os e acelerando a sua degradação proteassomal e lisossomal (Itoh & Ten Dijke, 2007). No entanto, já existem estudos em que os I-Smad6 e 7 regularam positivamente o TGF $\beta$  promovendo a diferenciação de adipócitos induzida pelo TGF $\beta$ , ou, no caso do I-Smad7, mediando a apoptose induzida por TGF $\beta$  em células de carcinoma prostático (Itoh *et al.*, 2000).

Existe uma proteína, a Arkadia, que se assemelha às enzimas E3 ubiquitina ligases, mas tem funções opostas, promovendo a sinalização em vez de inibi-la. Concretamente, Koinuma *et al.*, (2003) demonstraram que esta proteína interage fisicamente com o I-Smad7 mas não é recrutada para o complexo recetor-ligando. Assim, a Arkadia, que promove a poli-ubiquinação de I-Smad7, reduz o *pool* intranuclear deste, e amplifica assim a sinalização da superfamília TGF $\beta$ .

A Arkadia é particularmente importante na sinalização do Nodal durante o desenvolvimento embrionário, como demonstrado por Mavrakis *et al.*, (2007), em que amplifica a actividade transcripcional de pSmad2/3 mas limita a duração de actuação ao induzir o seu *turnover*. Resumindo, a Arkadia amplifica a sinalização de TGF $\beta$ /Nodal, promovendo a degradação de I-Smad7 (Koinuma *et al.*, 2003) e amplificando a actividade de pSmad2/3, aumentando a disponibilidade de Smad2 e Smad3 para nova activação (Mavrakis *et al.*, 2007).

Existe um outro componente essencial à sinalização, a SARA (Smad anchor for receptor activation), que localiza, transporta e imobiliza de forma específica, para perto da membrana celular, o Smad2 e Smad3 não fosforilados, para que possam ser activados pelo complexo recetor. O SARA é necessário para a sinalização via Smad2 (Tsukazaki *et al.*, 1998).

### **1.3.5. Internalização dos recetores da superfamília TGF $\beta$**

Os recetores sofrem internalização por, pelo menos, duas vias de endocitose. Uma das vias é clatrina-dependente, em que se formam endossomas precoces que contêm SARA, activando os Smads efectores e havendo reposição dos recetores na membrana. Outra via, é caveolina-positiva, formando endossomas tardios que contêm recetores para o complexo I-Smad7-Smurf, promovendo a poli-ubiquinação e degradação lisossomal (Shi & Massagué, 2003; Itoh & Ten Dijke, 2007). Este transporte dos recetores é regulado por mecanismos ainda não totalmente conhecidos, mas que constituem uma forma adicional de regulação da sinalização, uma vez que afetam a duração de sinal e disponibilidade dos recetores para ocupação/activação (Shi & Massagué, 2003; Schier, 2009). Por exemplo, o Nodal demonstra alguma instabilidade na sua capacidade de sinalização parácrina, provavelmente devido à rápida captação por endocitose e transporte por lisossomas (Blanchet *et al.*, 2008). No entanto, o Cripto promove a estabilização do Nodal, regulando a internalização e triagem endossomal deste, como será descrito adiante (Blanchet *et al.*, 2008).

Também, na sinalização do TGF $\beta$ 1, existe uma relação entre a deficiência em ILK (integrin-linked kinase) e a diminuição do *TGFR2*. Esta relação foi justificada por um possível papel do ILK na estabilização do *TGFR2*, atenuando a sua degradação, e assim promovendo a sinalização do TGF $\beta$ 1 (Vi *et al.*, 2014).

## **1.4. A sinalização do Nodal versus a da Activina**

O Nodal foi primeiro isolado em 1986 e associado com o início da gastrulação e com a superfamília do TGF $\beta$  na década de 90 (Shen, 2007). A sua actividade tinha sido atribuída até então à Activina (Shen, 2007). A caracterização bioquímica da sua via de sinalização determinou que o Nodal partilha a mesma via de sinalização com a Activina (Kumar *et al.*, 2001), como já foi mencionado. No entanto, existem diferenças entre a sinalização da Activina e do Nodal que são importantes de referir, e traduzem-se em bioactividades diferentes. O Nodal é dependente da proteína EGF-CFC, o Cripto, para activar o *ALK4* (Kumar *et al.*, 2001) e possui afinidade para o recetor *ALK7* (Reissmann *et al.*, 2001).

Apesar da Activina B e AB também terem alguma afinidade com o *ALK7*, elas formam complexos com *ActRIIA* (Tsuchida *et al.*, 2004), enquanto que o Nodal forma complexos com *ActRIIB*, e a Activina A não possui qualquer afinidade com o *ALK7* (Reissmann *et al.*, 2001; Bernard *et al.*, 2006).

Outras diferenças entre a sinalização do Nodal com a da Activina incluem a duração da fosforilação de Smad2, *i.e.*, o Nodal induz uma fosforilação de Smad2 mais prolongada que a Activina ou o TGF $\beta$ , o que poderá ser atribuído a diferentes mecanismos de ubiquinação ou maior estabilidade do complexo recetor (Kumar *et al.*, 2001). O *ALK7*, por splicing alternativo, pode regular a sinalização do Nodal, como demonstrado na placenta humana ao longo da gestação (Roberts *et al.*, 2002). A via de sinalização Nodal/*ALK7* é mais que suficiente para a indução de genes necessários durante a embriogénese, sendo por vezes essencial, para certas funções do Nodal (Reissmann *et al.*, 2001).

#### **1.4.1. O Nodal, como morfogénio, e os seus inibidores**

O Nodal é principalmente identificado em tecidos embrionários nos quais desempenha várias funções essenciais, como definir os eixos corporais, ajudar na padronização neuronal e na manutenção da pluripotência de células estaminais (Brennan *et al.*, 2002; Shen, 2007; Schier, 2009; Pauklin & Vallier, 2015; Sampath & Robertson, 2016). A importância deste facto reside que o Nodal pode actuar como um morfogénio, ou seja, pode originar um sistema de reacção-difusão, em que ele próprio induz a sua expressão e a de um inibidor, *i.e.* Lefty, e tem a capacidade de actuar a curtas e longas distâncias, assim como de originar um gradiente, capaz de induzir respostas de forma concentração- e tempo-dependente (Schier, 2009; Pauklin & Vallier, 2015).

Os principais inibidores do Nodal são as proteínas Lefty, que também pertencem à superfamília do TGF $\beta$ , e são induzidas pelo próprio Nodal, apresentando uma via de sinalização não canónica (Schier, 2009). Estas proteínas utilizam, pelo menos, dois mecanismos pelos quais vão inibir a sinalização do Nodal (Chen & Shen, 2004). Estes inibidores têm papel fulcral no desenvolvimento embrionário, tendo também capacidade de actuar a longa distância, sendo inclusive difundidas mais rapidamente que o Nodal, constituindo assim o sistema de reacção-difusão que caracteriza o nodal como um morfogénio (Brennan *et al.*, 2002; Chen & Shen, 2004; Schier, 2009). As proteínas Lefty inibem por ligação ao Nodal ou ao Cripto, tendo sido demonstrado que, em solução, têm a capacidade de imunoprecipitar o Nodal, preferencialmente se este estiver na sua forma activa. Esta inibição é reversível e competitiva, e as duas vias são independentes uma da outra, sublinhando a necessidade de regulação estrita da sinalização do Nodal (Chen & Shen, 2004).

O outro conjunto de proteínas inibidoras são as Cerberus/DAN, nomeadamente Cer1 e Cer2, que interagem com o Nodal diretamente (Shen, 2007; Schier, 2009).

### 1.5. As proteínas EGF-CFC na sinalização dos membros do TGF $\beta$ , em particular, do Nodal

O Cripto foi a primeira proteína a ser descoberta e a fundar a família de proteínas EGF-CFC (Bianco *et al.*, 2002). Esta proteína regula a sinalização do Nodal de diversas formas, chegando a regular também a de outros ligandos da superfamília do TGF $\beta$ , como o GDF1, o GDF3, a Activina (Kelber *et al.*, 2008), o GDF8 e o TGF $\beta$ 1 (Gray *et al.*, 2006).

Primeiro, a função mais conhecida do Cripto é como co-recetor do Nodal, sendo indispensável para a sinalização Nodal/*ALK4* (Yan *et al.*, 2002; Blanchet *et al.*, 2008; Kelber *et al.*, 2008). Esta proteína também actua de forma concentração-dependente (Kelber *et al.*, 2008). O Nodal/*ALK7* activa os Smad2 e Smad3 independentemente da presença ou ausência do co-recetor Cripto, apesar deste potencializar a sua sinalização (Reissmann *et al.*, 2001). Contudo, não apresenta qualquer afinidade para os recetores tipo II ou para o *ALK2*, *ALK5* ou *ALK6* (Yan *et al.*, 2002), estando dependente do Nodal para activar o Smad2 mas tem capacidade de activar outras vias de forma independente do Nodal/*ALK4*, como o ras/raf/MAPK (mitogen activated protein kinase) ou PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt (protein kinase B) (Bianco *et al.*, 2002). O Cripto, liga-se à membrana por ligação GPI (glycosyl-phosphatidylinositol), a qual é indispensável para a sua bioactividade (Yan *et al.*, 2002; Blanchet *et al.*, 2008), e possui um domínio semelhante ao de EGF (epithelial growth factor) e um domínio Cripto-FRL1-Cryptic (CFC) (Yeo & Whitman, 2001; Blanchet *et al.*, 2008). Para realizar a sua função como co-recetor, é necessário que ambos os domínios estejam intactos, e, especificamente, no domínio EGF, é necessária uma fucosilação O, para que seja possível ligar-se ao Nodal (Yeo & Whitman, 2001; Yan *et al.*, 2002).

No entanto, apesar de ser normalmente referido que é necessário o domínio EGF e que este serve de ligação ao Nodal (Yeo & Whitman, 2001; Kleber *et al.*, Blanchet *et al.*, 2008), na verdade o Nodal consegue ligar-se ao *ALK4* e *ActRIIB* na ausência do co-recetor, apesar desta ligação ser demasiado instável para produzir sinalização intracelular (Chen & Shen, 2004). O domínio EGF não é necessário para a ligação física do Nodal ao *ALK4*, mas é necessário como estabilizador e é importante na triagem endossomal, servindo para localizar o Nodal. O Cripto regula a sua internalização, juntamente com a do Nodal/*ALK4*, para endossomas precoces, nos quais também poderá mediar o acesso a mecanismos intracelulares de transdução de sinal, prolongando assim a sinalização do Nodal (Blanchet *et al.*, 2008). O domínio EGF também é necessário para antagonizar a sinalização do TGF $\beta$ , em que o Cripto forma um complexo inativo com o TGF $\beta$ -*TGFRII* e compete assim com o recetor *ALK5* (Gray *et al.*, 2006).



Por último, o Cripto também pode actuar como co-ligando na sinalização do Nodal, (Yan *et al.*, 2002; Blanchet *et al.*, 2008). É indispensável para a função do Nodal como morfogénio, devido ao facto de amplificar o sinal ou melhorar a sensibilidade das células à sinalização para a indução da mesoderme, o posicionamento dos eixos corporais e para o desenvolvimento do coração, sendo também utilizado como marcador de células estaminais (Brennan *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2006). Esta capacidade de actuar como um ligando secretado e difusível pode ocorrer por libertação (“shedding”) activa ou passiva da membrana (Yan *et al.*, 2002, Blanchet *et al.*, 2008) ou por transferência intermembranária (Yan *et al.*, 2002).

### **1.5.1. O Cripto, o Nodal e a Activina**

A função antagonista do Cripto na sinalização da Activina já foi demonstrada, podendo agir de forma competitiva com o recetor ou formando complexos inativos (Gray *et al.*, 2006; Kelber *et al.*, 2008). No entanto, foi também demonstrada uma forma não competitiva e antagonista em que o Cripto forma um complexo de baixa eficiência com o recetor *ALK4*, ao qual tanto a Activina como o Nodal podem ligar-se, originando competição entre eles. No estudo de Kelber *et al.*, (2008), a Activina mostrou-se mais potente do que o Nodal (cerca de 250 vezes) e com maior eficácia intrínseca. No entanto, o Cripto deu origem a uma convergência entre a eficácia de sinalização da Activina com a do Nodal, diminuindo a primeira e aumentando a segunda, mas sem alterar a potência de cada ligando. Este mecanismo poderá ser responsável pela semelhança das funções do Nodal com a Activina, quando o Cripto está presente em concentrações suficientes (Kelber *et al.*, 2008).

### **1.6. Breve descrição das funções do Nodal, do TGFβ1 e da Activina em tecidos adultos, em particular, em órgãos reprodutores.**

Em órgãos reprodutores, o Nodal desempenha funções importantes coordenando eventos de alteração e remodelação do endométrio inerentes à ciclicidade uterina, assim como em processos essenciais ao estabelecimento da gestação (revisto por Park & Dufort, 2013).

A função do Nodal, na manutenção de células estaminais, e a sua expressão, relativamente confinada a tecidos que sofrem grandes remodelações (revisto por Pauklin & Vallier, 2015), nomeadamente a glândula mamária (Bianco *et al.*, 2002), a placenta (Nadeem *et al.*, 2011) e o endométrio (Papageorgiou *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2009; Argañaraz *et al.*, 2013). O Nodal também se encontra expresso no oviducto, como observado em bovinos (Argañaraz *et al.*, 2013) e nos ovários, como observado em rato (Wang *et al.*, 2006) e em equinos (Galvão *et al.*, 2015).

No ovário de rato, o Nodal actuou de forma dependente da fase do ciclo éstrico e do tipo de célula (Wang *et al.*, 2006). Neste estudo demonstraram que o Nodal e o *ALK7* são co-expressos nos folículos ováricos antrais, nos quais induzem a apoptose das células da granulosa. A activação de Smad2 promove a expressão de factores de morte celular, como o Smac/DIABLO, Omi/ HtrA2 ou citocromo c, enquanto que inibe factores de sobrevivência celular, como o Xiap (X-linked inhibitor of apoptosis protein). Foi também demonstrado que esta via Nodal/*ALK7*/Smad2 inibe a sinalização de PI3K/Akt. O Akt, o qual pode ser induzido pela FSH (follicle stimulating hormone), promove a sobrevivência celular ao

estabilizar o Xiap e inibindo a libertação de factores de morte celular, tendo sido demonstrado também que o Akt promove a degradação proteossomal do *ALK7* (Wang *et al.*, 2006).

Recentemente, foi estudada a luteólise no corpo lúteo (CL) equino, e determinaram que o Nodal actua sinérgicamente com a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , na indução da luteólise funcional, promovendo a produção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e inibindo a produção de  $\text{P}_4$  e  $\text{PGE}_2$  (Galvão *et al.*, 2015).

A função da Activina foi primeiro atribuída à indução de FSH, mas várias funções já lhe foram atribuídas desde então, desde a regulação da produção de outras proteínas e hormonas, à regulação do crescimento folicular (revisto por Ethier & Findlay, 2001). A Activina desempenha outras funções, juntamente com o  $\text{TGF}\beta$ , as quais estão relacionadas com a preparação do útero para a implantação, com o estabelecimento da gestação e o desenvolvimento embrionário (revisto por Jones *et al.*, 2006). São também importantes na regulação dos processos que conduzem à decidualização (Jones *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005), e na resposta inflamatória correspondente (Jones *et al.*, 2006). Por fim, o  $\text{TGF}\beta 1$ , no CL bovino, desempenha um papel na luteólise, governando a acção fibroblástica e regulando assim a regressão do CL (Maroni & Davis, 2012).

### **1.7. As Prostaglandinas $\text{PGE}_2$ e $\text{PGF}_{2\alpha}$**

As prostaglandinas (PGs) são pequenas moléculas lipídicas, eicosanoides, que são produzidas e actuam numa variedade de tipos celulares e de tecidos em mamíferos (Blesson & Sahlin, 2014; Kalinski *et al.*, 2012). São de grande importância para a manutenção da homeostase (Blesson & Sahlin, 2014; Sugimoto & Narumiya, 2007; Kalinski *et al.*, 2012) assim como na orquestração de vários processos essenciais, especificamente no aparelho reprodutivo, tais como a ovulação, fertilização, luteólise, implantação, regulação da contratilidade endometrial, no reconhecimento materno da gestação e na regulação da proliferação e diferenciação celular (Silva *et al.*, 2014; Atli *et al.*, 2010; Szóstek *et al.*, 2012; Arosh *et al.*, 2003, 2004; Galvão *et al.*, 2015, Ball *et al.*, 2013, Roberto da Costa *et al.*, 2008). A  $\text{PGE}_2$ , também exerce funções na modulação da inflamação e da imunidade (Arosh *et al.*, 2003; Kalinski, 2012). A  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e a  $\text{PGE}_2$  actuam de forma temporo-espacial específica, em que o próprio equilíbrio entre ambas as PGs é importante para a regulação afinada dos processos em que estão envolvidas (Milne *et al.*, 2001; Arosh *et al.*, 2004; Blesson & Sahlin, 2014; Gajos *et al.*, 2015).

A  $\text{PGE}_2$  é considerada o prostanóide mais versátil, devido aos diferentes subtipos de recetores para os quais tem afinidade (Sugimoto & Narumiya, 2007; Silva *et al.*, 2014). No endométrio humano, a presença e atuação da  $\text{PGE}_2$  está presente durante todo o ciclo menstrual (Milne *et al.*, 2001), assim como também está presente no endométrio equino (Szóstek *et al.*, 2012). Neste, a  $\text{PGE}_2$  tem acção regulatória da mobilidade/invasão, adesão, proliferação e diferenciação celular. Através da sua acção autócrina/parácrina entre o epitélio-endotélio e vice-versa, também actua na produção de fatores angiogénicos (*i.e.* o VEGF- vascular endothelial growth factor), na vasodilatação, na indução de migração endotelial e na formação de tubos microvasculares (Milne *et al.*, 2001; Arosh *et al.*, 2004; Blesson & Sahlin, 2014). A  $\text{PGE}_2$  também tem capacidade de induzir genes anti-apósticos, assegurando a sobrevivência celular (Milne *et al.*, 2001; Blesson & Sahlin, 2014).

Devido a estas acções, a desregulação da PGE<sub>2</sub> está associada a várias patologias reprodutivas da mulher, como a menorreia, a endometriose e tumores (Blesson & Sahlin, 2014), podendo também estar relacionada com patologias uterinas na égua (Szóstek *et al.*, 2012).

### **1.7.1. Produção e Regulação**

A biossíntese e a atuação das PGs são determinadas por um conjunto de componentes não seletivos e seletivos (Arosh *et al.*, 2004). Concretamente, requer primeiro a mobilização de ácido araquidónico (AA) das membranas celulares pela cPLA2 (cytosolic phospholipase A2), e segundo, a metabolização de AA em PGH<sub>2</sub> (prostaglandina H<sub>2</sub>), pelas PTGS1 e PTGS2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 1 e 2) (Kalinski, 2012). Os componentes seletivos correspondem às enzimas, PGES/PTGES (PGE<sub>2</sub> sintase) e a PGFS/PTGFS (PGF<sub>2α</sub> sintase), que vão converter a PGH<sub>2</sub> especificamente em PGE<sub>2</sub> ou PGF<sub>2α</sub>, respetivamente, e aos seus recetores Arosh *et al.*, 2004; Atli *et al.*, 2010). O conjunto de recetores são os EPs (E-prostanoid receptors) e FPs (F-prostanoid receptor), que têm afinidade para a PGE<sub>2</sub> (Critchley *et al.*, 2006) e PGF<sub>2α</sub> (Blesson & Sahlin, 2014), respetivamente, embora a PGE<sub>2</sub> também tenha alguma afinidade para o recetor FP (Olman, 2009). A PTGS1 é geralmente descrita como expressa de forma constitutiva enquanto que a PTGS2 é a forma inductível (Arosh *et al.*, 2004; Boerboom *et al.*, 2004; Atli *et al.*, 2010; Kalinski, 2012). A expressão de PTGS2 é induzida tanto pela PGE<sub>2</sub> como pela PGF<sub>2α</sub>, (Arosh *et al.*, 2004; Tian & Schiemann, 2010) como por stress mecânico (Blesson & Sahlin, 2014), ou hormonas esteróides (Szóstek *et al.*, 2014a). As PGs, devido à sua natureza lipídica, conseguem difundir-se através da membrana celular, mas o influxo e efluxo de PGs não é suficiente para atingir concentrações fisiológicas. Existem moléculas transportadoras de PGs (PGTs) que facilitam a sua deslocação através das membranas celulares (Arosh *et al.*, 2004). Num estudo, realizado em CL de bovino, concluíram que estes PGTs participam na regulação da actuação da PGE<sub>2</sub> e da PGF<sub>2α</sub>, de forma não seletiva, mas competitiva (Arosh *et al.*, 2004).

O endométrio é responsável pela produção de prostaglandinas que são essenciais à regulação e à manutenção da função reprodutiva, na ciclicidade e na manutenção da gestação. As hormonas esteróides, E<sub>2</sub> e P<sub>4</sub>, são responsáveis pela regulação da produção de prostaglandinas (PGs), controlando padrão de expressão das enzimas responsáveis pela produção destas durante o ciclo éstrico e durante a gestação (Atli *et al.*, 2010, Szóstek *et al.*, 2012, 2014).

Outros autores que estudaram o efeito de hormonas esteróides na produção de PGs propuseram a possibilidade da P<sub>4</sub> ser responsável pela expressão do sistema das sintases da PG, que inclui a PTGS2, PGES e PGFS e pelo recrutamento dos percussores, enquanto que a E<sub>2</sub> funcionará mais como um estimulador que intensifica a resposta do sistema das sintases da PG para obter um efeito mais rápido. Esta hipótese foi suportada por um estudo recente (Szóstek *et al.*, 2014a) em que obtiveram maior resposta de produção quando os tecidos eram estimulados com P<sub>4</sub>+E<sub>2</sub>. Provaram também que tanto as células epiteliais (com sobre-expressão de PTGS2, PGES e PGFS) como as do estroma (com sobre-expressão de PTGS2) do endométrio equino, são capazes de responder e produzir PGs numa forma tempo-dependente, revelando a importância da integridade do epitélio (Szóstek *et al.*, 2014a).

Existem outros estimuladores da produção de prostaglandinas, tais como a ocitocina (OXT) e o TNF $\alpha$  (Galvão *et al.*, 2013, Szóstek *et al.*, 2014b). A ocitocina é produzida no hipotálamo e via circulação periférica ou por produção e secreção a nível endometrial vai desempenhar um papel importante sobre a motilidade uterina e na luteólise (Galvão *et al.*, 2013; Keith *et al.*, 2013; de Ruijter-Villani *et al.*, 2015; Rebordão *et al.*, 2016).

O TNF $\alpha$  é produzido maioritariamente por macrófagos e células endoteliais, mas também por células endometriais e desempenha funções coordenadas pelas hormonas E<sub>2</sub> e P<sub>4</sub> no endométrio equino (Galvão *et al.*, 2013; Szóstek *et al.*, 2014b)

O sistema de interleucinas também tem funções importantes a regular o endométrio e a secreção de prostaglandinas, assim como tem papel em processos inflamatórios. Os níveis de mRNA e de proteína de IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6 são ciclo-éstrico-dependentes e a sua expressão é alterada com a fibrose, assim como a dos seus recetores (Szóstek *et al.*, 2013). O seu efeito na produção de PGs também é influenciado pela fibrose, *i.e.*, a produção de PGE<sub>2</sub> em endométrios de categoria I, é estimulada pelas três IL mencionadas, sendo a IL-1 $\beta$  a que tem maior efeito estimulador, enquanto que todas estimulam de forma semelhante a PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (Szóstek *et al.*, 2013). Em endométrios de categoria II, a IL-1 $\alpha$  já não estimula a PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  e a IL-6 tem efeito oposto, diminuindo a PGE<sub>2</sub>. Estas alterações do sistema IL e das PGs, podem ser consequência, mas também podem agir como factores que promovem o desenvolvimento da fibrose (Atamas, 2002; Oلمان, 2009; Szóstek *et al.*, 2013)

### **1.7.2. A expressão das sintases PTGS2, PGES e PGFS e da PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2 $\alpha$</sub> no endométrio equino durante o ciclo éstrico**

No endométrio equino, a expressão génica de PTGS2 aumenta na fase lútea média e fase folicular, e atinge o pico de expressão máxima na fase lútea final (Szóstek *et al.*, 2012). A luteólise na égua tem vindo a demonstrar-se distinta da que ocorre noutros animais doméstico, a nível dos mecanismos moleculares e enzimáticos que a governam assim como os que determinam a produção de PGs e o reconhecimento materno da gestação (Watson & Stertich, 1989; Stout & Allen, 2002; Boerboom *et al.*, 2004; Atli *et al.*, 2010; Galvão *et al.*, 2013). Concretamente, a luteólise pode ser caracterizada pela diminuição da produção e secreção de P<sub>4</sub> (luteólise funcional) e pela regressão do corpo lúteo (luteólise estrutural) (Arosh *et al.*, 2004; Galvão *et al.*, 2015). O padrão de expressão de PTGS2, PGFS, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  e do seu recetor FP, nos estudos de Szóstek *et al.*, (2012), Atli *et al.*, (2010) e Boerboom *et al.*, (2004), no endométrio equino, sugerem um papel importante para a PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  no fim do diestro, concretamente na indução da luteólise.

Relativamente à expressão de PGES e produção de PGE<sub>2</sub>, no endométrio equino, Szóstek *et al.* (2012) reportaram um aumento da expressão de mRNA de PGES na fase lútea média e final, e de produção de PGE<sub>2</sub> maior na fase lútea média e na fase folicular, comparativamente às outras fases do ciclo éstrico. Este estudo sugere um papel da PGE<sub>2</sub> na manutenção do CL, suportado por outros estudos (Vanderwall *et al.*, 1994; Lukasik *et al.*, 2010; Galvão *et al.*, 2015), no entanto, outros investigadores não conseguiram obter resultados nesse sentido (Watson & Stertich, 1989; Stout & Allen, 2002; Boerboom *et al.*, 2004).

A função da PGE<sub>2</sub> no endométrio poderá estar relacionada com a tolerância imunitária do embrião, com a quiescência uterina, entre outras funções já mencionadas, sendo, sem dúvida, indispensável à reprodução (Stout & Allen, 2002; Ball *et al.*, 2013).

### 1.7.3. Sinalização das PGs

Os recetores das PGs são recetores acoplados à proteína G, especificamente, os recetores FPs (subtipo A e B) que se ligam à PGF<sub>2α</sub>, e os recetores EPs que se ligam à PGE<sub>2</sub>, dos quais há 4 subtipos (*EP1*, *EP2*, *EP3*, *EP4*) (Milne *et al.*, 2001; Arosh *et al.*, 2003, 2004; Blesson & Sahlin, 2014; Kalinski, 2012; Silva *et al.*, 2014). A versatilidade das funções da PGE<sub>2</sub> é atribuída à variedade de recetores e também à variedade na transdução de sinal, na sua distribuição pelos tecidos e diferentes tipos celulares e à sua sensibilidade a desensitização induzida por agonistas (Sugimoto & Narumiya, 2007; Kalinski *et al.*, 2012). Descrevendo as vias de transdução de sinal, os recetores *EP2* e *EP4* acoplam-se à proteína G<sub>s</sub>, levando à libertação de cAMP como segundo mensageiro, que por sua vez vai activar a PKA (protein kinase A), demonstrando uma função como relaxantes musculares no endométrio (Milne *et al.*, 2001; Arosh *et al.*, 2003, 2004; Sugimoto & Narumiya, 2007; Kalinski *et al.*, 2012). Ambos os recetores *EP2* e *EP4* também conseguem activar a via GSK3/β-catenina (Kalinski *et al.*, 2012), enquanto que apenas o recetor *EP4* activa a via ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) dependente de PI3K, ao acoplar-se à proteína G<sub>i</sub> (Sugimoto & Narumiya, 2007; Kalinski *et al.*, 2012). Este par de recetores tem assim bioactividades semelhantes e distintas, dependendo de vários factores, tais como diferenças na afinidade do recetor, em que o *EP4* demonstra maior afinidade que o *EP2*, sendo que o primeiro exige menores concentrações de PGE<sub>2</sub> para efectuar a sinalização eficazmente. Também diferem na capacidade de sustentar a activação, que no caso do *EP4* é inferior pois é suscetível a desensitização, enquanto que o recetor *EP2* é mais resistente mediando funções da PGE<sub>2</sub> a longo prazo (Kalinski *et al.*, 2012). Os principais eventos mediados pela PGE<sub>2</sub> a nível do endométrio, são efetuados por activação de cAMP, e vários estudos *knockout* revelam que será o *EP2* o recetor que mais contribui para a regulação dos processos reprodutivos (Arosh *et al.*, 2003; Ball *et al.*, 2013).

O recetor *EP1* regula os canais de cálcio (Ca<sup>2++</sup>) pela proteína G<sub>q</sub> (Tian & Schiemann, 2010), e também apresenta menor afinidade para a PGE<sub>2</sub>, que os recetores *EP3* e *EP4* (Kalinski *et al.*, 2012). Existem diferentes isoformas do recetor *EP3* (α, β e γ), as quais variam entre si em vários aspectos, entre os quais: diferentes vias de transdução de sinal, padrões de trânsito intracelular e actividade constitutiva (Sugimoto & Narumiya, 2007). A principal forma de actuação é pela proteína G<sub>i</sub> ou G<sub>12</sub>, inibindo o cAMP e activando IP3/Ca<sup>2++</sup> ou o Rho, existindo uma isoforma que consegue acoplar-se à proteína G<sub>s</sub> e assim activar o cAMP (Sugimoto & Narumiya, 2007).

Por fim, o recetor FP, activa a PLC (phospholipase C) a qual leva à geração de IP3 (inositol phosphate 3), que também actua na libertação de Ca<sup>2++</sup> intracelular (Arosh *et al.*, 2004; Blesson & Sahlin, 2014), ou à geração de diacilglicerol, que activa a PKC (protein kinase C) (Arosh *et al.*, 2004).

#### 1.7.4. Interações PGE<sub>2</sub>-TGFβ1

Com o objetivo de resumir as diversas formas que a PGE<sub>2</sub> interage com o TGFβ, foram reunidos alguns exemplos. Fisiologicamente, nas células da granulosa humanas, o TGFβ- Smad2/3 não só induz como é necessário para a expressão de PTGS2 e PGE<sub>2</sub>, estabelecendo o TGFβ como um importante mediador da ovulação (Fang *et al.*, 2014). Em estudos sobre a tumorigênese mamária, estabeleceu-se que o TGFβ, geralmente anti-tumorigénico, é desviado para um papel oncogénico, possivelmente devido à acção da PGE<sub>2</sub>-EP2, a qual inibe o efeito supressor/antiproliferativo de TGFβ mediado pela activação de Smad2/3 e expressão de PAI-1 e estimula a capacidade do TGFβ de induzir EMT. A PGE<sub>2</sub>-EP2-PTGS2 formam um *feedback loop* positivo, no qual o TGFβ também participa, uma vez que consegue induzir a expressão de PTGS2-PGE<sub>2</sub> e de EP2, tanto em células malignas como normais. Por fim, demonstraram que a inibição de EP2 foi suficiente para impedir a progressão do tumor mamário mediado por TGFβ e/ou PTGS2 (Tian & Schiemann, 2010). No caso de lesão renal, num modelo de doença diabética, a PGE<sub>2</sub>-EP1 consegue promover a indução de fibronectina por TGFβ, em células mesangiais, e o uso de um antagonista selectivo para o EP1 conseguiu inibir a hipertrofia e proliferação de células mesangiais e a expressão de genes de ECM (Makino *et al.*, 2002). Por fim, em células endoteliais descobriram que a PGE<sub>2</sub> induz a angiogénese via activação de TGFβ, concretamente a PGE<sub>2</sub> induz a activação de MT1-MMP (membrane type 1-matrix metalloproteinase 1) que vai activar o TGFβ latente. O TGFβ pode actuar por vários recetores, um deles é o ALK1, através do qual induz a proliferação e migração endotelial ou o ALK5, através do qual inactiva essa proliferação e migração, geralmente limitando a angiogénese (Alfranca *et al.*, 2008).

## 2. Objetivos

O presente trabalho é parte do projeto, “PTDC/CVT-REP/4202/2014” que tem como objetivo elucidar sobre o mecanismo fisiopatológico responsável pela endometrose na égua, desenvolvido pelo Departamento de Morfologia e Função da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, e pelo Centro de Investigação Interdisciplinar de Sanidade Animal (CIISA).

Na globalidade, este estudo teve como objetivo geral compreender o papel putativo do Nodal no endométrio equino e o seu possível envolvimento na endometrose. Especificamente, um dos objetivos deste trabalho consistiu na avaliação da influência da proteína Nodal sobre a transcrição dos genes dos recetores de Nodal (*ALK4* e *ALK7*); dos recetores de TGF $\beta$ 1 (*ALK5* e *TGFR1*) e dos recetores da PGE<sub>2</sub> (*EP2* e *EP4*) no endométrio equino, nas diferentes fases do ciclo éstrico. O segundo objetivo deste estudo foi averiguar a influência da proteína Nodal sobre a produção *in vitro* de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  pelo endométrio da égua. Pelo que é conhecimento deste autor, não foram publicados trabalhos sobre a influência da proteína Nodal sobre estes recetores, no endométrio equino.

Resumindo, para atingir os objetivos específicos propostos foram efectuadas as seguintes tarefas:

- Ensaio *in vitro* em que explantes de endométrio de égua, agrupados de acordo com a fase do ciclo éstrico, foram incubados com diferentes concentrações de Nodal, TNF $\alpha$  ou ocitocina;
- Classificação das amostras de endométrio de acordo com a classificação de Kenney e Doig (1986);
- Avaliação dos níveis de mRNA por two-step real-time RT-PCR, usando o gene constitutivo *MRPL32* para normalização, e o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para quantificação.
- Determinação da produção *in vitro* de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  pelo endométrio em relação às diferentes estimulações e diferentes grupos de fase do ciclo éstrico, por quantificação por ELISA.

### **3. Materiais e Métodos**

A obtenção de amostras biológicas (genitais de éguas) foi efetuada *post-mortem* em matadouros em Portugal e na Polónia. Após a recolha, os úteros foram transportados em arca frigorífica no tempo mais curto possível e processados no laboratório. Este projecto de investigação foi realizado no laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfologia e Função, FMV-UL, e no Laboratório do Prof. Dariusz Skarzynski, no Instituto de Reprodução Animal, Polish Academy of Science (PAS), Olsztyn, Polónia.

#### **3.1 Animais**

Neste projeto foram utilizadas 12 éguas, consideradas saudáveis durante a inspecção veterinária *postmortem* no matadouro, com idades entre o 2 e os 30 anos, e que apresentassem actividade ovárica normal, com ausência de sinais de patologia uterina.

Após dessensibilização, as éguas foram eutanasiadas de acordo com a legislação Portuguesa (DL 98/96, Art. 1º) e Europeia relativo aos aspectos do bem-estar animal e dos métodos de dessensibilização e eutanásia (EFSA, AHAW/04-027). De acordo com a avaliação morfológica macroscópica dos ovários e do útero (Roberto da Costa *et al.*, 2007), as éguas foram distribuídas em dois grupos - fase folicular ou fase lútea média. As éguas na fase folicular, apresentavam folículos ováricos com dimensões superiores a 35mm de diâmetro e ausência de CL (n=6). Contudo, as éguas que se encontravam na fase lútea média (n=6) tinham um CL, bem desenvolvido, associado a folículos de 30 a 35 mm de diâmetro (Roberto da Costa *et al.*, 2007). Uma vez que a presença de folículos de 30 a 35mm de diâmetro, pode também suceder no início da fase lútea (Evans, 2003), a estrutura histológica do CL foi avaliada para confirmar a presença de trabéculas, uma estrutura consolidada e uma luteinização avançada no CL da fase lútea média (Ginther, 1993). Idealmente, deveria ter sido realizada a medição de progesterona plasmática, como descrito nesses estudos, mas devido à impossibilidade de recolha de sangue, foi considerada exclusivamente a avaliação morfológica dos ovários e do útero. Após avaliação e registo da informação de cada útero, foram obtidas amostras aleatórias de endométrio, lavadas com solução de tampão fosfato salino (PBS) estéril e armazenadas em (i) em criotubos (479-1220, VWR ®), com RNA later (R0901, Sigma ®); ou (ii), em solução isotónica tamponada de formaldeído a 4% (Junqueira & Carneiro, 2008) para avaliação histológica. O restante material, colocado em placas de Petri, com solução estéril de PBS, foi seguidamente usado nas placas de cultura descritas abaixo.

#### **3.2. Cultura de tecidos endometriais**

As culturas foram realizadas com 30 a 40 mg de tecido endometrial por pocilho, em placas de 24 poços CellStar ® (M8812, Sigma ®) com meio DMEM-F12 (D2906, Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham, Sigma ®), suplementado de acordo com as instruções do fabricante, com 1.2g/L de bicarbonato de sódio (11810-025, Gibco BRL), 0.1% de albumina de sêrum bovino (A7906, Sigma-Aldrich ®) e complementado com 100UI/mL de penicilina e 100µg/mL de streptomina (15140122, ThermoFisher®) e 0.5µg/mL de anfotericina B (15290026, Gibco™, ThermoFisher ®) ajustado para pH de 7.4, e por fim filtrado com sistema de vácuo Stericup ® milipore express, com filtro



de 0.22 $\mu$ m (SCGPU11RE, Merck Millipore®) e com bomba de vácuo Millivac®-Mini Vacuum pump (XF54 23050, Merck Millipore®).

Os tecidos foram estimulados com Nodal (0.1ng/mL, 1ng/mL ou 10ng/mL), TNF- $\alpha$  (10ng/mL) ou ocitocina ( $10^{-7}$  M) e incubados, em agitação, na estufa HeraCell150 (LaboSistema®, Lisboa, Portugal), com atmosfera a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Após as 24 horas de incubação, os tecidos foram colocados em criotubos com 600  $\mu$ L de RNA later e armazenados a -80°C. Os meios de cultura foram recolhidos, homogeneizados e armazenados em eppendorfs (20170-170, VWR®) com a adição de 10 $\mu$ L de uma solução de EDTA e aspirina [11.17g de EDTA (E5134, Sigma®, 1g de aspirina (A2093, Sigma®) para 100mL de água bidestilada, pH 7.4], para inibir acção enzimática (Gajos *et al.*, 2015) e permitir a conservação das prostaglandinas até ao momento da sua quantificação. Esses meios foram mantidos a 4°C durante 24 horas e depois armazenadas a -20°C.

Optou-se pelo uso de ocitocina e TNF $\alpha$  como controlos positivos para a estimulação da produção de PGs em endométrio equino (Roberto da Costa *et al.*, 2008; Szóstek *et al.*, 2014a, 2014b). O TNF $\alpha$  é uma citocina que possui uma grande variedade de bioactividades e é capaz de produzir algum tipo de resposta na maioria dos tecidos e tipos celulares diferentes. Também tem interesse por ser um potente mediador da inflamação, como na endometrite da égua (Fumuso *et al.*, 2003) e da apoptose, mostrando uma grande actividade na remodelação de tecidos (Wajant *et al.*, 2003; Verrecchia & Mauviel, 2004; Voloshenyuk *et al.*, 2011). Por fim, demonstra uma dualidade na sua interacção com o TGF $\beta$ 1, inibindo acções mediadas pelo TGF $\beta$  direta ou indiretamente (Bitzer *et al.*, 2000; Verrecchia & Mauviel, 2004), ou promovendo a sua sinalização (Sullivan *et al.*, 2009; Voloshenyuk *et al.*, 2011).

### 3.3. Extracção e Medição de RNA

A extracção de RNA foi efectuada realizando a maceração de 30 a 40 mg de tecido endometrial, em placa de Petri, com auxílio de bisturi. O tecido foi previamente conservado em RNA later, a -80°C. Imediatamente após a pesagem o tecido macerado foi colocado em eppendorf, ao qual foi adicionado TRI®Reagent (T9424, Sigma-Aldrich®) na proporção de 1mL para 100mg de tecido. Procedeu-se à disrupção do tecido, com o aparelho TissueLyzer II (Qiagen®), usando 25HZ de frequência por ciclo de 30 segundos, quatro vezes. Seguindo as indicações do fabricante do TRI®Reagent, usaram-se os seguintes reagentes intercalados com centrifugações: clorofórmio (0.2mL para 1mL de TRIzol) para assegurar dissociação de complexos núcleo-proteicos, realizando a separação da amostra em fase aquosa, que contém o RNA, fase intermédia, que contém o DNA e fase orgânica; Isopropanolol (0.5mL para 1mL de TRIzol) para precipitar o RNA e etanol a 75% (1mL para 1mL de TRIzol) para minimizar contaminantes. Após deixar o etanol evaporar, ressuspendeu-se o RNA com água DEPC (95284, Sigma®). A medição de RNA foi efectuada por espectrofotometria, em comprimento de onda de 260nm, com NanoDrop2000c® (Thermo Fisher Scientific, MA U.S.A), e a qualidade foi avaliada pelo rácio A260/280 (contaminação por DNA) e A260/230 (contaminação por carboidratos, fenóis, etc.) que, de acordo com o boletim do instrumento de medição utilizado, indica que um rácio de, aproximadamente, “2” para os dois valores, é o mais representativo de RNA “puro”.

### **3.4. Avaliação da expressão génica por qRT-PCR**

O método selecionado para avaliar a expressão génica foi o de transcriptase reversa, seguido de reacção em cadeia da polimerase, qRT-PCR (Quantitative Reverse transcription polymerase chain reaction) em tempo real. Esta variação ao método tradicional de PCR tem sido amplamente utilizada e com grande sensibilidade, permitindo utilizar o mRNA como base para a produção de cDNA e depois, com os primers correctos, amplificar o gene-alvo em PCR (Wong & Medrano, 2005). O método de detecção é por fluorescência, e neste projecto foi utilizado o SYBR® Green (4367659, Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific ®). Apesar de ser um agente intercalante inespecífico com afinidade para moléculas de DNA de cadeia dupla, é considerado bastante sensível, com igual limite de detecção a outro tipo de reagentes, entre outros aspectos, e tem a vantagem de ser mais económico e mais prático (Deprez *et al.*, 2002). O protocolo usado foi o de “two step RT-PCR”, em que a síntese de cDNA por transcriptase reversa é feita separadamente da reacção de PCR em tempo real, o que é preferível pois temos que avaliar vários genes-alvo, sendo o cDNA mais estável que o RNA e assim há menos variabilidade no processo de transcrição reversa (Wong & Medrano, 2005).

#### **3.4.1. Síntese de cDNA**

A síntese de cDNA foi realizada usando oligonucleótidos (C1101, Promega ®), mantendo um volume total de 13µL para o primeiro passo no termociclador (Doppio 1732-1210, VWR®), seguindo um programa de 70°C durante 5 min, e de 4°C para infinito. Depois, foi preparado uma mistura de reacção, com o tampão (M531A, Promega ®), dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados), inibidor da ribonuclease (N2511, Promega ®), e transcriptase reversa (M170B, Promega ®), perfazendo por amostra um volume total de 20 µL para o segundo passo no termociclador (programa:42°C durante 1 hora, 90°C durante 5 minutos, 4°C por infinito). A mistura de dNTPs utilizada foi preparada a partir de dATP (desoxiAdenosina trifosfatada; U120D, Promega ®), dGTP (desoxiGuanosina trifosfatada; U121D, Promega ®), dCTP (desoxiCitidina trifosfatada; U122D, Promega ®) e dTTP (desoxiTimidina trifosfatada; U123D, Promega ®).

#### **3.4.2. Avaliação da expressão por PCR em tempo real**

O PCR foi realizado no Step One Plus™ (Applied Biosystems®, Califórnia, USA) e com o reagente SYBR® Green, em placas de reacção de 96 poços (AB19800, Frilabo ®) com volume de reacção de 13 µl. Em cada reacção foram usados, simultaneamente e em duplicado, o gene constitutivo ou housekeeping gene *MRPL32* (proteína ribossomal L32), já previamente validado no endométrio equino (Kayis *et al.*, 2011), e o gene-alvo (primers -Tabela 6). Posteriormente, os resultados foram analisados usando o software Real Time PCR Miner 4.0, baseado no algoritmo para qRT-PCR de Zhao & Fernald (2005) e normalizados, como sugerido pelos autores, em Microsoft Excel ®.

**Tabela 6. Sequência específica de primers usados para os gene-alvo, para real-time PCR quantitativo**

Gene	No. Identificação	Sequência 5'-3'	Comprimento
<i>ALK5</i>	XM_014735928.1	Fw:5'-CACCATCGAGTGCCAAATCA-3' Rv:5'-CTCCTCTCCACTTCCCTCGC-3'	217
<i>TGFR11</i>	XM_005600871.2	Fw:5'-TGCTGCCTGTGTGACTTTGG-3' Rv:5'-TCTGGGGCCATGTATCTTGC-3'	107
<i>ALK7</i>	XM_001492118.5	Fw:5'-GGATTGGCTGTGAAGCATGA-3' Rv:5'-CCTTCGGGCTATTTCCCAGT-3'	186
<i>ALK4</i>	XM_001494129.5	Fw:5'-GGGTATCCAGGCTCTGCTGT-3' Rv:5'-GCAGTGGGTGTTACGCAGGT-3'	205
<i>PGER2</i>	NM_001127352.1	Fw:5'-TCACCATCACCTTCGCCG-3' Rv:5'-GACCGCAGCACTCTTAGCACA-3'	178
<i>PGER4</i>	XM_001499068.4	Fw:5'-GGTGCTCATCTGCTCCATCC-3' Rv:5'-CGGCAGAAGAGGCATTTGAT-3'	210
<i>MRPL32</i>	XM_001492042.5	Fw:5'-AGCCATCTACTCGGCGTCA-3' Rv:5'-GTCAATGCCTCTGGGTTTCC-3'	144

### 3.5. Quantificação da concentração de prostaglandinas por ELISA

A determinação da concentração de prostaglandinas no meio de cultura foi efetuada por ELISA (PGF<sub>2α</sub>: ADI901-069; PGE<sub>2</sub>:ADI901-001, Enzo), seguindo as instruções do fabricante, no laboratório do Instituto de Reprodução Animal, Polish Academy of Science (PAS), Polónia. A concentração de prostaglandina F<sub>2α</sub> foi medida usando uma diluição de 1:50 e a curva-padrão variou de 0.2 a 50 ng/mL, e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4.5%. A medição de prostaglandina E<sub>2</sub> foi feita com diluição de 1:100 e a curva-padrão variou de 0.39pg/mL a 100 pg/mL e o coeficiente de variação intra-ensaio foi 6.1%. Todos os valores foram normalizados para mg de tecido.

### 3.6. Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados estatisticamente com o software GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software, Inc, USA), assumindo que o controlo representa 100. Depois, foram usados o teste two-way Anova e o teste de comparações múltiplas de Tukey, tendo sido analisados para cada recetor e por grupo do ciclo éstrico (fase folicular ou fase lútea média).

Foi também realizado o teste t, para comparações entre dois grupos de valores, nomeadamente, para o grupo de controlo de cada recetor, comparando os níveis de mRNA da fase folicular com a da fase lútea, e também entre éguas de categorias I/II e éguas de categoria III, do grupo de estimulação. Foram considerados estatisticamente significativos valores que apresentassem p<0.05 em todos os testes mencionados. O número de amostras usadas por cada grupo e por cada receptor não é igual, devido a limitações de material, sendo o *n* final de cada recetor apresentado na Tabela 7.

**Tabela 7. Distribuição do número de amostras, representando o  $n$  final de cada análise estatística.**

$n$	PGE <sub>2</sub>	PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	EP2	EP4	ALK5	TGFR <sub>II</sub>	ALK4	ALK7
<b>F.</b>	2	2	6	6	3	6	4	4
<b>Folicular</b>								
<b>F. Lútea</b>	2	2	6	5	5	6	4	4
<b>Total</b>	4	4	12	11	8	12	8	8

### 3.7. Avaliação histológica - Classificação das amostras endometriais

As amostras de endométrio preservadas em formol logo após colheita do material foram posteriormente submetidas a desidratação numa série de concentrações crescentes de etanol (de 70% a 100%), a uma passagem por xilol e posterior inclusão em blocos de parafina. Os cortes histológicos de 4 $\mu$  foram obtidos com um micrótomo Leica SM2000R (Leica Microsistemas Lda ®, Lisboa, Portugal) e corados com hematoxilina- eosina (Junqueira & Carneiro, 2008). As lâminas foram observadas ao microscópio Leica DM500 (Leica Microsistemas Lda ®, Lisboa, Portugal) para classificação de acordo com Kenney (1978), que propôs um modelo de classificação, e que foi completado por Kenney e Doig (1986) e tem sido universalmente aceite e utilizado também neste estudo (Tabela 8).

**Tabela 8. Distribuição das éguas por grupos estatísticos, de acordo com fase do ciclo e categoria de Kenney&Doig.**

<b>Grupo estatístico</b>	F.Folicular		F. Lútea		
	F1	F2	L1	L2	L3
<b>Categoria</b>	I/IIA	IIB/III	I	IIA	IIB/III
<b>Éguas</b>	3	3	2	2	2

#### 4. Resultados

Neste projeto foram realizadas medições da expressão de mRNA dos recetores do TGF $\beta$ 1 (*ALK5* e *TGFR1*), da PGE<sub>2</sub> (*EP2* e *EP4*), e do próprio Nodal e Activina (*ALK4* e *ALK7*), para avaliar de que modo o Nodal pode influenciar estas vias de sinalização. Pretendeu-se ainda analisar as variações causadas pela fase do ciclo éstrico e/ou pelo desenvolvimento da endometriose nessas mesmas vias de sinalização. Também foram realizadas medições da concentração de prostaglandinas no meio de cultura (PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ), para determinar o impacto que o Nodal tem sobre a função secretora do endométrio.

De forma a avaliar os níveis de expressão dos genes estudados, foram feitas diferentes análises estatísticas, as quais foram organizadas do seguinte modo:

1º- Com o objetivo de definir a expressão dos recetores sem influência dos tratamentos, de forma a melhor entender como estes podem influenciar a sinalização foram realizadas várias comparações relativas da expressão de mRNA dos pares de recetores, no grupo de controlo. Estas comparações foram feitas entre fases do ciclo éstrico (Fase Folicular *versus* Fase Lútea), entre endométrios de categorias de Kenney diferentes (*I/IIA versus IIB/III*), e nos diferentes subgrupos (em endométrios de categoria *I/IIA* ou *IIB/III*, entre F. Folicular *versus* F. Lútea, e, no mesmo gráfico, na mesma fase do ciclo, *i.e.*, na F. Folicular ou na F. Lútea, entre endométrios do tipo *I/IIA versus IIB/III*). Por fim, também foi feita uma comparação nos diferentes subgrupos, entre a expressão génica dos recetores (*ALK5 versus TGFR1*, *EP2 versus EP4* e *ALK4 versus ALK7*).

2º- Com o objetivo de definir o efeito de cada tratamento sobre a expressão de mRNA, em cada subgrupo, foi realizada a quantificação relativa da expressão em relação ao controlo, entre o grupo de categoria *I/IIA* e o grupo de categoria *IIB/III*, nas diferentes fases do ciclo éstrico (F. Folicular e F. Lútea).

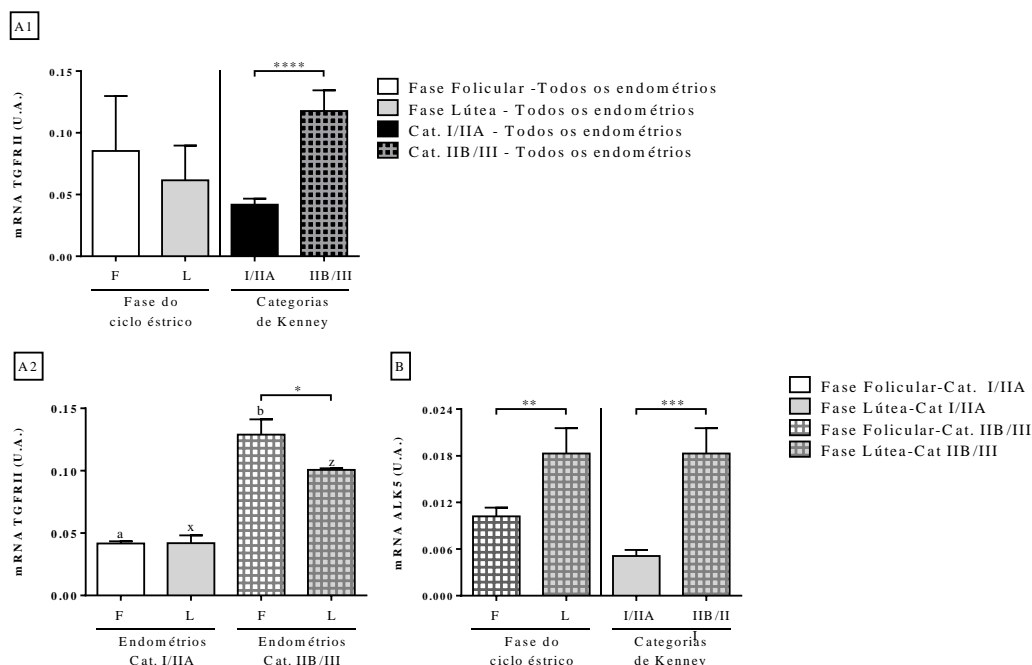
3º- Por fim, foi realizada a comparação entre o efeito do Nodal nas suas diferentes concentrações (0.1, 1 e 10ng/mL), quando num grupo de éguas da mesma categoria (*I/IIA* ou *IIB/III*), o Nodal tenha tido efeitos estimuladores/inibitórios, bem como o efeito entre as diferentes fases do ciclo éstrico.

#### 4.1. Recetores do TGFβ1: *ALK5* e *TGFR11*

Devido ao papel pró-fibrótico do TGFβ1 (revisado por Branton & Kopp, 1999, e por Leask & Abraham, 2004), foi avaliada a expressão de mRNA dos seus recetores *ALK5* e *TGFR11* no âmbito do nosso trabalho. No entanto, neste trabalho de investigação, devido à exiguidade das amostras obtidas não foi possível analisar a expressão de mRNA de *ALK5* em endométrios de categoria I/IIA, na fase folicular.

##### 4.1.1. A variação na expressão génica dos recetores *ALK5* e *TGFR11*, no endométrio equino, de acordo com a fase do ciclo e com a evolução da fibrose

No grupo de controlo, foi feita a comparação, da expressão de mRNA de *TGFR11* entre as fases do ciclo éstrico e entre endométrios de categoria I/IIA com endométrios de categoria IIB/III (Fig. 1, A1). Não se verificou diferença estatisticamente significativa na expressão génica de *TGFR11*, entre as fases do ciclo éstrico (Fig. 1, A1,  $p>0.05$ ). Em endométrios de categoria I/IIA a expressão génica de *TGFR11* foi menor que em endométrios de categoria IIB/III (Fig. 1, A1,  $p<0.0001$ ).

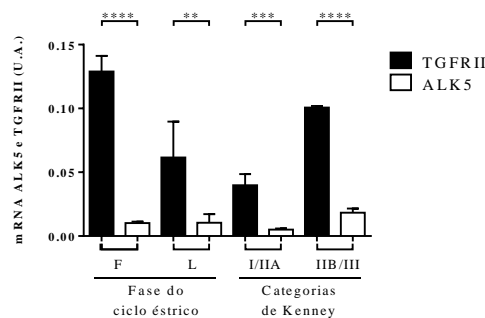


**Figura 1** Comparação da expressão de mRNA de *TGFR11* e *ALK5*, no endométrio equino, no grupo de controlo, entre fases do ciclo diferentes, e em endométrios de diferentes categorias de Kenney. Os dados foram comparados utilizando unidades arbitrárias (U.A.). Comparação da expressão génica entre fases do ciclo éstrico (F- Fase Folicular, L-Fase Lútea) e entre endométrios de categoria I/IIA com IIB/III: A1) em relação à expressão de mRNA de *TGFR11*. Comparação entre subgrupos, considerando a fase do ciclo éstrico juntamente com a classificação de Kenney dos endométrios: A2) em relação à expressão de mRNA de *TGFR11* e B2) em relação à expressão de mRNA de *ALK5*. Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por asteriscos (\*= $p<0.05$ ; \*\*= $p<0.01$ ; \*\*\*= $p<0.001$ ; \*\*\*\*= $p<0.0001$ ) e por letras para comparar a expressão génica, na fase folicular, da categoria I/IIA com a categoria IIB/III (“a” com “b”= $p<0.0001$ ) e na fase lútea, da categoria I/IIA com categoria IIB/III (“x” com “z”= $p<0.0001$ ).

Foi realizada uma comparação considerando as fases do ciclo éstrico e a classificação do endométrio de acordo com Kenney, tanto sobre os níveis de mRNA de *TGFR11* como de *ALK5* (Fig. 1, A2 e B, respetivamente). No gráfico A2 podemos observar que, em endométrios de categoria I/IIA não há diferenças na expressão génica de *TGFR11* entre a fase folicular e fase lútea (Fig. 1, A2,  $p>0.05$ ). No entanto, em endométrios de categoria IIB/III, a expressão de mRNA de *TGFR11* varia de acordo com o

ciclo éstrico, sendo maior na fase folicular que na fase lútea (Fig. 1. A2,  $p < 0.05$ ). Devido à falta de dados mencionada sobre a expressão de mRNA de *ALK5*, a comparação entre fases do ciclo éstrico foi feita considerando apenas endométrios de categoria IIB/III e a comparação entre categorias de Kenney I/IIA com IIB/III foi realizada considerando apenas endométrios na fase lútea (Fig. 1, B). A expressão de mRNA de *ALK5* também varia em endométrios de categoria IIB/III, mas, contrariamente ao *TGFR2*, é maior na fase lútea que na fase folicular (Fig. 1, B,  $p < 0.01$ ). Em relação à transcrição génica em endométrios de categoria diferente, esta comporta-se, na fase lútea, de forma semelhante à de *TGFR2* em ambas as fases do ciclo, *i.e.*, a expressão génica dos recetores *TGFR2* e *ALK5* é menor em endométrios de categoria I/IIA em relação aos de categoria IIB/III (Fig. 1. A2,  $p < 0.0001$ , em ambas as fases; B,  $p < 0.001$ ; respetivamente).

Por fim, foi feita a comparação dos níveis de mRNA, no grupo de controlo, de *TGFR2* com a de *ALK5* (Fig. 2). Relembrando que, devido à falta de tecido endometrial, a comparação entre a expressão de mRNA de *ALK5* com a de *TGFR2*, entre as diferentes fases do ciclo éstrico, na fase folicular, foi feita apenas considerando endométrios de categoria IIB/III, enquanto que na fase lútea já foram considerados todos os endométrios, independentemente da sua categoria de Kenney. Em ambas as fases do ciclo éstrico, a expressão génica de *ALK5* foi inferior à de *TGFR2* (Fig. 2.,  $p < 0.0001$  e  $p < 0.01$ , respetivamente).



**Figura 2. Comparação da expressão de mRNA de *TGFR2* com a expressão de mRNA de *ALK5*, no endométrio equino, não tratado, durante as diferentes fases do ciclo éstrico, considerando a classificação de Kenney.** Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por asteriscos (\*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ ). F- Fase Folicular, apenas em endométrios de categoria IIB/III; L- Fase Lútea, em todos os endométrios; I/IIA – endométrios na fase lútea de categoria I/IIA; IIB/III- endométrios na fase lútea, de categoria IIB/III.

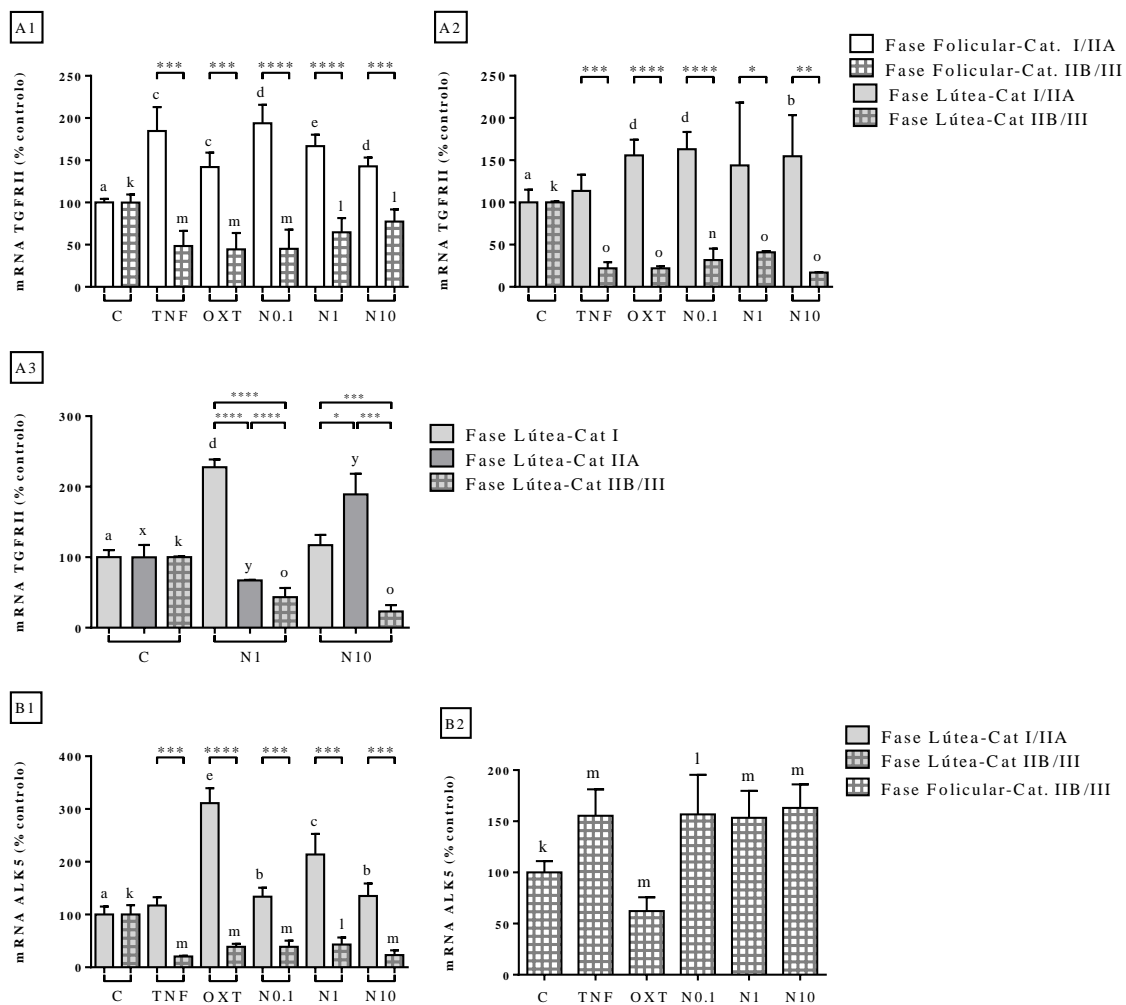
A comparação entre os níveis de mRNA de *ALK5* com a de *TGFR2*, em endométrios de categoria I/IIA foi feita apenas considerando a fase lútea, enquanto que, em endométrios de categoria IIB/III já foram considerados todos os endométrios (fase folicular e fase lútea). Independentemente do grau de endometrose, a expressão génica de *ALK5* é inferior à de *TGFR2* (Fig. 2,  $p < 0.001$  e  $p < 0.0001$ , respetivamente).

#### 4.1.2. Efeito dos tratamentos com Nodal, TNF $\alpha$ e ocitocina, no endométrio equino, sobre a expressão de mRNA dos recetores

O efeito dos tratamentos com o Nodal (0.1, 1 e 10ng/mL) sobre a expressão génica de *TGFR2*, em endométrios de categoria I/IIA, é semelhante entre as fases do ciclo éstrico, estimulando a expressão génica na fase folicular (Fig. 3. A1, 0.1 e 10ng/mL;  $p < 0.001$ ; 1ng/mL:  $p < 0.0001$ ) e na fase lútea (Fig. 3. A2, 0.1ng/mL:  $p < 0.001$  e 10ng/mL:  $p < 0.05$ ). Contudo, quando as categorias I e IIA foram consideradas separadamente, observou-se uma diferença nos níveis de mRNA do recetor *TGFR2*, na fase lútea, tendo sido feita uma avaliação quantitativa em relação ao controlo, e depois uma comparação entre as categorias (Anexo 1). Nesta avaliação determinou-se que os tratamentos só foram diferentes em relação à ocitocina e ao Nodal a 1ng/mL e a 10ng/mL (Anexo 1, Fig. A,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.0001$  e  $p < 0.05$ , respetivamente). O tratamento com ocitocina não diferiu do controlo, (Anexo 1, Fig. A,  $p > 0.05$ ) não tendo por isso sido representado na Fig. 3, A3, onde estão representados estes tratamentos (Nodal a 1ng/mL e a 10ng/mL) relativos às categorias de endométrio de Kenney I, IIA e IIB/III, na fase lútea. Podemos observar que o Nodal a 1 ng/mL tem um efeito em endométrios de categoria I oposto ao efeito em endométrios de categoria IIA, nomeadamente, em endométrios do tipo I estimula a expressão génica e em endométrios do tipo IIA inibe (Fig. 3, A3,  $p < 0.001$  e  $p < 0.05$ , respetivamente). O Nodal a 10ng/mL demonstra um efeito estimulador (Fig. 3, A3,  $p < 0.05$ ) em endométrios do tipo IIA que não possui em endométrios de categoria I (Fig. 3, A3,  $p > 0.05$ ). Em relação ao efeito dos tratamentos em endométrios de categoria IIB/III, o Nodal tem um efeito inibidor, em ambas as fases do ciclo éstrico e em todas as concentrações, concretamente, a 0.1 ng/mL (Fig. 3, A1,  $p < 0.01$  e A2,  $p < 0.001$ ), a 1 (Fig. 3, A1,  $p < 0.05$  e A2,  $p < 0.0001$ ) e a 10ng/mL (Fig. 3, A1,  $p < 0.05$  e A2,  $p < 0.0001$ ). Comparativamente, o efeito inibidor do Nodal a 1ng/mL é maior sobre endométrios de categoria IIB/III que em endométrios de categoria IIA (Fig. 3, A3,  $p < 0.0001$ ).

Avaliando as variações na expressão de mRNA de *ALK5*, primeiro em endométrios do tipo I/IIA, como na fase folicular não foi possível de se obter, observamos apenas na fase lútea (Fig. 3, B1). Na fase lútea, podemos analisar que, em endométrios do tipo I/IIA, o Nodal estimula a transcrição génica em todas as concentrações (Fig. 3, B1, 0.1 e 10ng/mL:  $p < 0.05$ ; 1ng/mL: $p < 0.01$ ). Em endométrios de categoria IIB/III, o efeito do Nodal é condicionado pela fase do ciclo éstrico, estimulando na fase folicular (Fig. 3, B2, a 0.1ng/mL:  $p < 0.05$ ; 1 e 10ng/mL: $p < 0.01$ ) e inibindo na fase lútea (Fig. 3, B1, 0.1 e 10ng/mL: $p < 0.01$ ; 1ng/mL: $p < 0.05$ ).





**Figura 3. Quantificação relativa da expressão de mRNA de *TGFRII* e *ALK5*, em endométrio equino, durante as diferentes fases do ciclo éstrico, considerando a classificação de Kenney.** Os gráficos representam a quantificação da expressão gênica, relativamente ao controle de cada grupo representado (% controle). A expressão de mRNA de *TGFRII* é representada nos gráficos A1) na fase folicular, e A2) na fase lútea, em ambos, os endométrios foram agrupados de acordo com a classificação de Kenney (I/IIA ou IIB/III). A3) Representa a expressão de mRNA de *TGFRII*, relativamente às categorias de endométrio de Kenney I, IIA e IIB/III, na fase lútea. A expressão de mRNA de *ALK5* é representada pelos gráficos B1) na fase lútea, no qual os endométrios estão agrupados de acordo com a classificação de Kenney, e em B2) na fase folicular, apenas em endométrios de categoria IIB/III. Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por asteriscos quando em relação a categorias diferentes (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ ); e por letras, quando em relação ao controle, em endométrios de categoria I/IIA representado por “a” e em endométrios de categoria IIB/III por “k” em que  $p < 0.05$  = “b” ou “l”;  $p < 0.01$  = “c” ou “m”;  $p < 0.001$  = “d” ou “n”;  $p < 0.0001$  = “e” ou “o”. No gráfico A3, o controle em endométrios de categoria IIA é representado por “x”, em que “x” com “y” =  $p < 0.05$ .

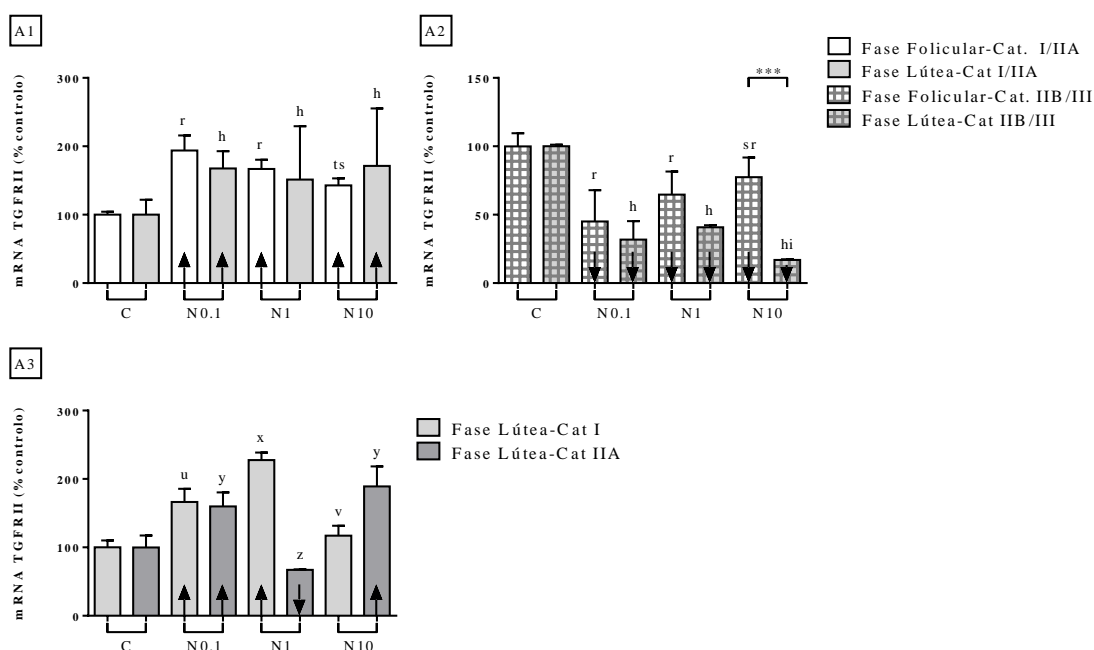
Em relação ao efeito do  $TNF\alpha$  sobre os níveis de mRNA destes recetores, em endométrios de categoria I/IIA, apenas exerce efeito na fase folicular, estimulando a expressão de mRNA de *TGFRII* (Fig. 3, A1,  $p < 0.01$ ). Em endométrios de categoria IIB/II, o  $TNF\alpha$  tem efeito inibidor sobre a expressão de mRNA de *TGFRII*, na fase folicular e na fase lútea (Fig. 3, A1,  $p < 0.01$ ; A2,  $p < 0.0001$ , respetivamente).

No entanto, o seu efeito sobre a expressão de mRNA de *ALK5*, no mesmo tipo de endométrios (IIB/III), é influenciado pela fase do ciclo éstrico, estimulando na fase folicular e inibindo na fase lútea (Fig. 3, B1,  $p < 0.01$  e B2,  $p < 0.01$ , respetivamente). O efeito da ocitocina é semelhante em ambos os recetores, estimulando a expressão gênica de ambos os recetores, *TGFRII* e *ALK5*, em endométrios de categoria

I/IIA (Fig. 3 A1,  $p<0.01$  e A2,  $p<0.001$ ; B1,  $p<0.0001$ , respetivamente) e inibindo em endométrios de categoria IIB/III, independentemente da fase do ciclo éstrico (Fig. 3. A1,  $p<0.01$  e A2,  $p<0.0001$ ; B1,  $p<0.01$  e B2,  $p<0.01$ , respetivamente).

#### 4.1.3. Comparação entre os efeitos do Nodal, nas diferentes concentrações.

Em relação ao recetor *TGFRII*, em endométrios de categoria I/IIA, os efeitos estimuladores, na fase folicular, quase que ocorrem de forma inversamente proporcional à sua concentração, *i.e.*, nas concentrações de 0.1 e 1 ng/mL, o Nodal é mais estimulante que a 10ng/mL (Fig. 4, A1,  $p<0.01$  e  $p<0.05$ , respetivamente), mas sem diferença estatística significativa entre si, nas concentrações menores de 0.1 e 1 ng/mL (Fig. 4, A1,  $p=0.08$ ).

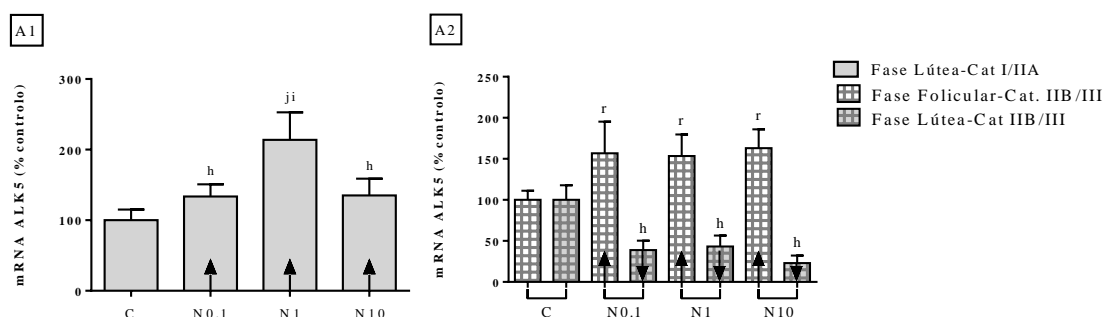


**Figura 4. Comparação da expressão de mRNA de *TGFRII*, no endométrio equino, sob o efeito de diferentes concentrações de Nodal, considerando a classificação de Kenney dos endométrios, e a fase do ciclo éstrico.** Os dados representam a quantificação relativamente ao controlo de cada grupo representado (% controlo). A1) Representa a expressão génica em endométrios de categoria I/IIA, de acordo com cada fase do ciclo éstrico; A2) Representa a expressão génica em endométrios de categoria IIB/III, de acordo com cada fase do ciclo éstrico. A3) Representa a expressão génica, na fase lútea, em endométrios de categoria I separadamente dos de categoria II. Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada, nos gráficos A1 e A2 por letras (Fase Folicular – “r” com “s” =  $p<0.05$  e “r” com “t” =  $p<0.01$ ; Fase Lútea – “h” com “i” =  $p<0.0001$ ); e por asteriscos, quando comparando efeitos semelhantes entre fases do ciclo diferentes (\*\*\*) . No gráfico A3, a significância estatística é representada por letras (Cat. I – “u” com “v” =  $p<0.05$ ; “u” com “x” =  $p<0.01$ , “v” com “x” =  $p<0.001$ ; Cat. II – “y” com “z” =  $p<0.01$ ). As setas representam o efeito do tratamento já demonstrado em gráficos anteriores ↑-estimulador e ↓-inibidor.

Na fase lútea, o efeito estimulador de 0.1 e 10ng/mL é semelhante entre si (Fig. 4, A1,  $p>0.05$ ), e semelhante ao efeito na fase folicular, nas respetivas concentrações (Fig. 4, A1,  $p>0.05$ , para ambas as concentrações). Em endométrios de categoria IIB/III, o Nodal inibe a expressão de mRNA de *TGFRII*, na fase folicular possuindo maior efeito inibidor na concentração de 0.1ng/mL, relativamente à concentração de 10ng/mL (Fig. 4., A2,  $p<0.05$ ). O oposto ocorre na fase lútea, possuindo maior efeito na concentração de 10ng/mL relativamente a 1ng/mL (Fig. 4, A2,  $p<0.0001$ ). No que diz respeito ao efeito entre as fases do ciclo éstrico, apenas na concentração de 10ng/mL o efeito é maior na fase lútea

que na fase folicular (Fig. 4, A2,  $p < 0.001$ ). Contudo, devido às diferenças nas expressões de mRNA de *TGFR2*, em relação ao Nodal a 1 e 10ng/mL, já mencionadas, foi feito um gráfico comparativo entre endométrios de categoria I e de categoria IIA, na fase lútea (Fig. 4, A3). Neste podemos observar que a estimulação por Nodal, em endométrios de categoria I, é maior na concentração de 1ng/mL relativamente a 0.1ng/mL (Fig. 4, A3,  $p < 0.01$ ). Em endométrios de categoria IIA, o efeito estimulador de Nodal a 0.1ng/mL é semelhante ao de Nodal a 10ng/mL (Fig. 4, A3,  $p > 0.05$ ).

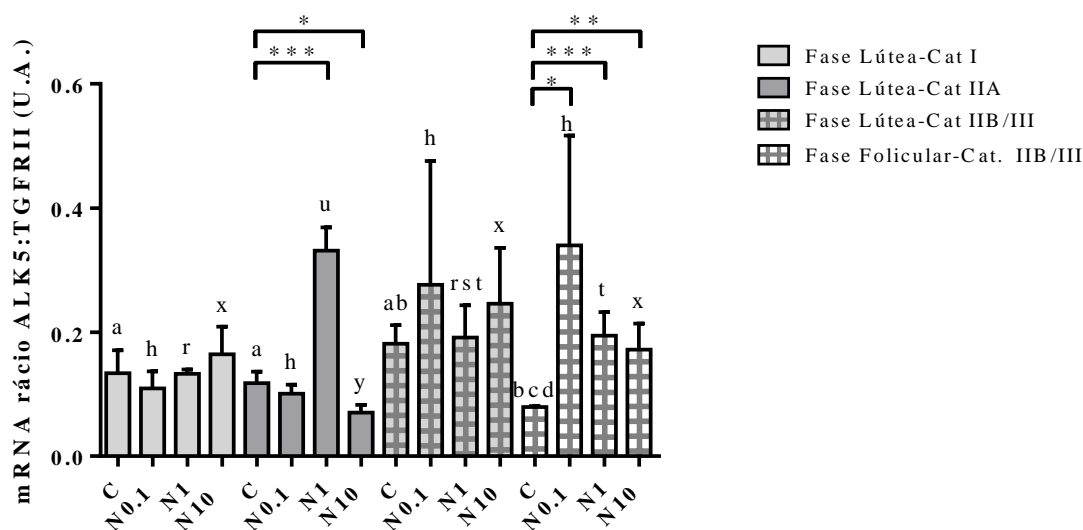
Na Fig. 5 observamos essa mesma comparação, mas sobre a expressão de mRNA de *ALK5*, onde, na fase lútea, em endométrios de categoria I/IIA, o efeito estimulador é maior na concentração de 1ng/mL comparativamente à concentração de 0.1ng/mL e de 10ng/mL (Fig. 5, A1,  $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ , respectivamente). No entanto, em endométrios de categoria IIB/III já não se observa diferenças entre os efeitos estimuladores na fase folicular, nem entre os efeitos inibitórios na fase lútea (Fig. 5, A2,  $p > 0.05$ , para ambas as fases).



**Figura 5. Comparação da expressão de mRNA de *ALK5*, no endométrio equino, sob o efeito de diferentes concentrações de Nodal, considerando a classificação de Kenney dos endométrios, e a fase do ciclo éstrico.** Os dados representam a quantificação relativamente ao controle de cada grupo representado (% controle). A1) Representa a expressão génica em endométrios de categoria I/IIA, na fase lútea; A2) Representa a expressão génica em endométrios de categoria IIB/III, de acordo com cada fase do ciclo éstrico. Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por letras (Fase Folicular – “r”; Fase Lútea – “h” com “i”= $p < 0.05$  e “j”= $p < 0.01$ ). As setas representam o efeito do tratamento já demonstrado em gráficos anteriores ↑- estimulador e ↓-inibidor.

#### 4.1.4. Determinação e Comparação do rácio mRNA *ALK5:TGFRII*

No âmbito da investigação realizada, sugere-se a possibilidade de haver uma desregulação do par de recetores *ALK5* e *TGFRII*, um em relação ao outro. Por este motivo, calculou-se o rácio para cada égua, para cada tratamento, em cada subgrupo, e comparou-se os valores entre si (Fig. 6).



**Figura 6. Representação do rácio mRNA *ALK5:TGFRII*, no endométrio equino, considerando a classificação de Kenney e a fase do ciclo estrico.** Os dados representam o rácio mRNA de *ALK5:TGFRII* de cada animal, agrupado de acordo com a fase do ciclo estrico e categorização de Kenney, em unidades arbitrárias (U.A.). Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por asteriscos, quando se compara dentro do mesmo subgrupo, em relação ao controlo (\*= $p<0.05$ ; \*\*= $p<0.01$ ; \*\*\*= $p<0.001$ ); e por letras, quando se compara, para o mesmo tratamento, entre os diferentes subgrupos, em que, para o grupo de controlo (C) (“a” com “b”= $p<0.05$ , “a” com “c”= $p<0.01$ ; “b” com “d”= $p<0.001$ ), para o grupo de tratamento com Nodal a 0.1ng/mL (N0.1) (“h”); a 1ng/mL (N1) (“r” com “t”= $p<0.05$ ; “r” com “u”= $p<0.001$ ; “u” com “s”= $p<0.05$ ; “u” com “t”= $p<0.01$ ); a 10ng/mL (N10) (“x” com “y”= $p<0.05$ ).

Analisando o gráfico (Fig. 6), observamos que, em endométrios de categoria I ou de categoria III, na fase lútea, não há diferenças entre os rácios, comparativamente ao controlo. No entanto, em endométrios de categoria IIA, há um aumento do rácio pelo tratamento com Nodal a 1ng/mL (Fig. 6,  $p<0.001$ ) e uma diminuição do rácio pelo tratamento com Nodal a 10ng/mL (Fig. 6,  $p<0.05$ ). Na fase folicular, só nos é possível analisar o rácio para endométrios de categoria IIB/III, no qual há um aumento do rácio por todos os tratamentos com Nodal (Fig. 6, 0.1ng/mL: $p<0.05$ ; 1ng/mL: $p<0.001$ ; 10ng/mL: $p<0.01$ ). Com o objetivo de avaliar como os rácios podem variar de acordo com a fase do ciclo estrico ou com o grau de endometrose, foi feita a comparação para cada tratamento. Em relação ao grupo de controlo, na mesma fase do ciclo estrico, apenas foram encontradas diferenças entre o rácio na categoria II com o de categoria IIB/III (Fig. 6,  $p<0.05$ ), indicando um aumento do rácio com o grau de endometrose. Comparando na mesma categoria (IIB/III), entre fases do ciclo diferentes, o rácio está diminuído na fase folicular em relação à fase lútea (Fig. 6,  $p<0.001$ ). Em relação ao grupo de tratamento com Nodal a 0.1ng/mL, não foram encontradas diferenças. Em relação ao grupo de tratamento com Nodal a 1ng/mL, como era esperado, obtiveram-se diferenças. Avaliando primeiro, entre graus de endometrose, o rácio está aumentado em endométrios de categoria IIA, em relação aos de categoria I e aos de categoria IIB/III

(Fig. 6,  $p < 0.001$  e  $p < 0.05$ , respetivamente). Comparando na mesma categoria (IIB/III), não foram encontradas diferenças entre as fases do ciclo éstrico (Fig. 6,  $p > 0.05$ ). Por fim, em relação ao grupo de tratamento com Nodal a 10ng/mL, foram encontradas diferenças, na fase lútea, estando diminuído em endométrios de categoria IIA, relativamente aos de categoria I e de categoria IIB/III (Fig. 6,  $p < 0.05$ , para ambas).

Resumindo, o Nodal estimula a transcrição génica de ambos os recetores, em endométrios de categoria I/IIA, independentemente da fase do ciclo éstrico, mas dependente da concentração. Na fase folicular, o Nodal estimula mais nas concentrações de 0.1ng/mL e 1ng/mL, comparativamente a 10ng/mL (Fig. 4,  $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ , respetivamente). Na fase lútea, o Nodal tem uma acção particular na concentração de 1ng/mL. É nesta concentração que o Nodal tem maior efeito estimulador da expressão génica de *ALK5*, comparativamente às concentrações de 0.1ng/mL e 10ng/mL (Fig. 5, A1,  $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ , respetivamente). É, também, nesta concentração (1ng/mL) que o Nodal apresenta um efeito dependente da existência ou não de fibrose, ainda que leve (IIA), nomeadamente, estimulando a expressão génica de *TGFR2* em endométrios saudáveis (I) e inibindo em endométrios com grau ligeiro de fibrose (IIA) ou mesmo com fibrose mais avançada (IIB/III) (Fig. 3, A3,  $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$  e  $p < 0.0001$ , respetivamente). Aliás, o Nodal estimula mais a 1ng/mL que a 0.1ng/mL, a transcrição génica de *TGFR2* em endométrios saudáveis (Fig. 4, A3,  $p < 0.01$ ). Esta particularidade do efeito do Nodal a 1ng/mL é demonstrada também, pela alteração do rácio mRNA *ALK5:TGFR2*, em que, relativamente ao controlo, o rácio encontra-se aumentado (Fig. 6,  $p < 0.001$ ). A acção diferencial ocorre também na concentração de 10ng/mL, mas nesta o Nodal estimula apenas em endométrios de categoria IIA e inibe em endométrios IIB/III (Fig. 3, A3,  $p < 0.05$  e  $p < 0.0001$ , respetivamente). Tal também é demonstrado a nível de alteração do rácio, mas diminuindo este, relativamente ao controlo (Fig. 6,  $p < 0.05$ ).

Em endométrios com grau de fibrose superior (IIB/III) o Nodal inibe em todas as concentrações (0.1, 1 e 10ng/mL) a expressão génica de ambos os recetores, na fase lútea (*TGFR2*: Fig. 3, A2,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ ; *ALK5*: Fig. 3, B1,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ; respetivamente). No entanto, na fase folicular, já apresenta efeitos opostos sobre a transcrição génica dos recetores, estimulando a expressão de *ALK5* (Fig. 3, B2,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ , respetivamente) e inibindo a expressão de *TGFR2* (Fig. 3, A1,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.1$ , respetivamente). Esse efeito também é demonstrado, por uma alteração do rácio, aumentando-o, em todas as concentrações (Fig. 6, 0.05,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ , respetivamente).

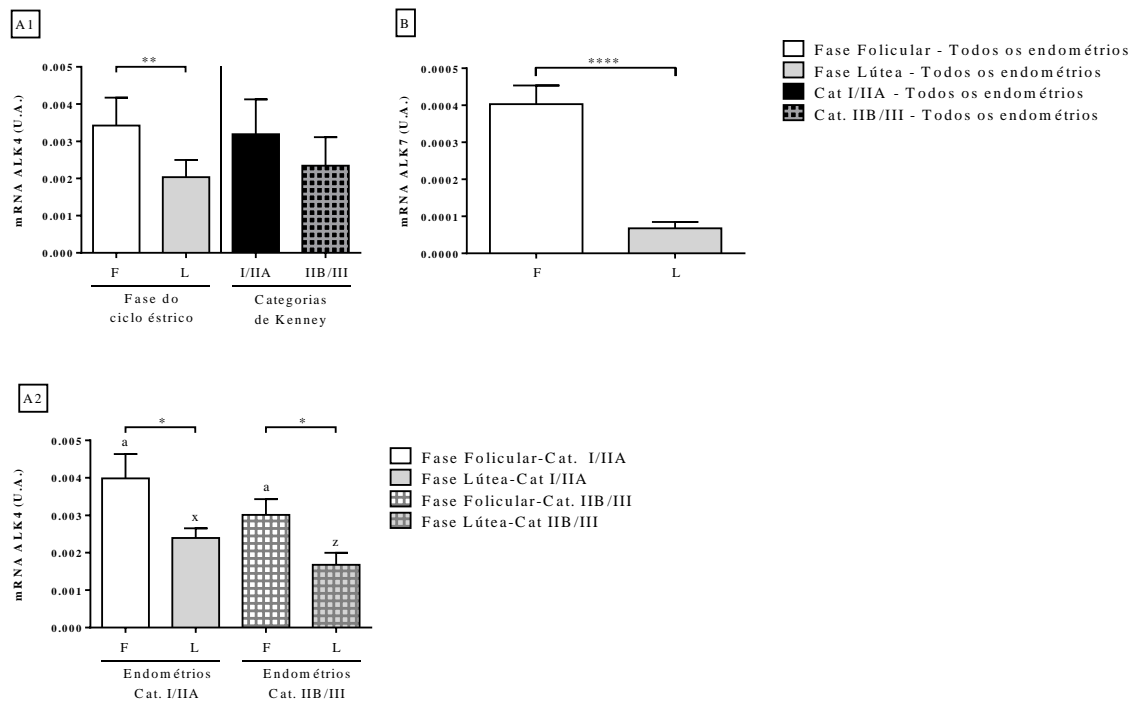
## 4.2. Recetores do Nodal: *ALK4* e *ALK7*

O objetivo da avaliação do mRNA de *ALK4* e *ALK7* foi para compreender se o Nodal possui efeito sobre a expressão génica dos seus próprios recetores. Apesar de ser necessário o recetor *ActRIIA* ou *ActIIB* para completar a sinalização e activar o Smad2/3 (Yeo & Whitman, 2001; Reissmann *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2001; Shen, 2007), estes recetores não foram avaliados embora também possam interagir com outros ligandos da família do TGF $\beta$ , (*i.e.*, o BMP6/7, o GDF8/11, etc.), (de Caestecker, 2004). Contudo, na nossa análise teremos em conta como as alterações no recetor *ALK4* ou recetor *ALK7*, podem influenciar a sinalização da Activina A, B ou AB (Tsuchida *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2006), por estas também desempenharem um papel no endométrio (Mylonas *et al.*, 2004) e na fibrose (Myllärniemi *et al.*, 2014).

A expressão génica de *ALK7* é bastante reduzida no endométrio equino, tendo sido difícil obter dados viáveis sobre a expressão deste recetor. Por esse motivo, os dados foram agrupados, sendo apenas possível separá-los de acordo com a fase do ciclo éstrico, mas não de acordo com a classificação de Kenney.

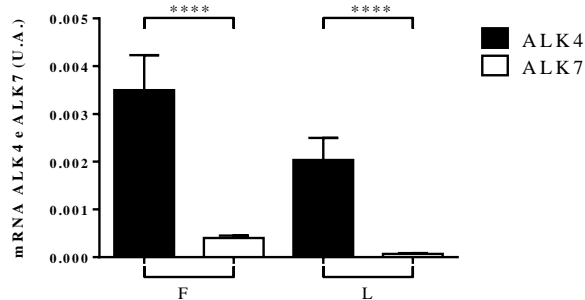
### 4.2.1. A variação na expressão génica dos recetores *ALK4* e *ALK7*, no endométrio equino, de acordo com a fase do ciclo e com a evolução da fibrose

A comparação da expressão génica dos recetores *ALK4* e *ALK7* no endométrio equino, foi realizada no grupo de controlo de forma a obter informações sobre a sua variação de acordo com a fase do ciclo éstrico e com o grau de fibrose, cujos resultados estão apresentados na Fig. 7. Nesta podemos observar a expressão de *ALK4* e *ALK7*, em que a expressão de ambos é maior na fase folicular que na fase lútea (Fig. 7, A1,  $p < 0.01$ ; B,  $p < 0.0001$ , respetivamente). A transcrição génica, entre endométrios de categoria I/IIA e endométrios de categoria IIB/III, só foi avaliada em relação ao recetor *ALK4*, no qual não se observa diferença significativa (Fig. 7, A1,  $p > 0.05$ ). Foi feita a comparação entre os subgrupos, e a expressão na fase folicular foi superior que na fase lútea, independentemente do grau de endometrose (Fig. 7, A2,  $p < 0.05$ , em ambas as categorias I/IIA e IIB/III). Contudo, quando se compara a expressão entre endométrios de categorias diferentes, na fase lútea observa-se que a expressão está reduzida em endométrios de categorias IIB/III, relativamente a endométrios de categoria I/IIA (Fig. 7, A2,  $p < 0.05$ ).



**Figura 7. Comparação da expressão de mRNA de *ALK4* e *ALK7*, no endométrio equino, no grupo de controle, entre fases do ciclo diferentes, considerando a classificação de Kenney dos endométrios.** Os dados foram comparados utilizando unidades arbitrárias (U.A.). Comparação da expressão entre fases do ciclo éstrico (F- Fase Folicular, L-Fase Lútea) e entre endométrios de categoria I/IIA com IIB/III: A1) em relação à expressão de mRNA de *ALK4*, e B) em relação à expressão de MRNA de *ALK7*. Comparação entre subgrupos, considerando a fase do ciclo éstrico juntamente com a classificação de Kenney dos endométrios: A2) em relação à expressão de mRNA de *ALK4*. Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por asteriscos (\*=p<0.05; \*\*=p<0.01; \*\*\*\*=p<0.0001) e por letras para comparar a expressão, ilustrada no gráfico A2, na fase folicular, da categoria I/IIA com a categoria IIB/III (“a”) e na fase lútea, da categoria I/IIA com categoria IIB/III (“x” com “z”=p<0.05).

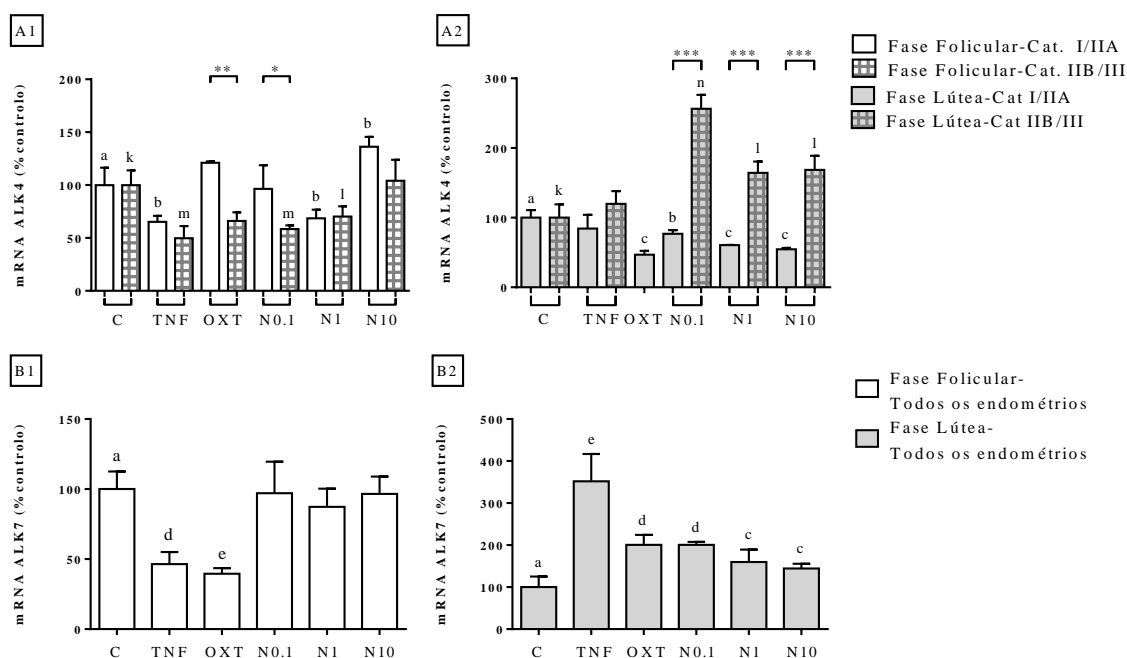
Por fim, quando comparamos a expressão dos recetores entre eles, observamos que a expressão de *ALK4* é sempre superior à de *ALK7*, independentemente da fase do ciclo éstrico (Fig. 8, p<0.0001, em ambas).



**Figura 8. Comparação da expressão de mRNA de *ALK4* com a expressão de mRNA de *ALK7*, no endométrio equino, não tratado, durante as diferentes fases do ciclo éstrico, independentemente da classificação de Kenney.** Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por asteriscos (\*\*\*\*=p<0.0001). F- Fase Folicular, L – Fase Lútea.

#### 4.2.2. Efeito dos tratamentos com Nodal, TNF $\alpha$ e ocitocina, no endométrio equino, sobre a expressão de mRNA dos recetores.

A avaliação do efeito dos tratamentos sobre a transcrição génica dos recetores *ALK4* e *ALK7* está representada na Fig. 9. No que concerne a expressão génica de *ALK4*, em endométrios de categoria I/IIA, na fase folicular, o Nodal tem efeito inibidor na concentração de 1ng/mL ou estimulador na concentração de 10ng/mL (Fig. 9, A1,  $p < 0.05$ , para ambas). Enquanto que, na fase lútea, o Nodal tem efeito inibidor em todas as concentrações (Fig. 9, A2, 0.1ng/mL:  $p < 0.05$ ; 1ng/mL:  $p < 0.01$ ; 10ng/mL:  $p < 0.01$ ). Em endométrios de categoria IIB/III, na fase folicular, o Nodal é inibidor nas concentrações de 0.1 ng/mL e 1ng/mL (Fig. 9, A1,  $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ , respetivamente) e na fase lútea (A2) é estimulador a 0.1ng/mL (Fig. 9, A2,  $p < 0.001$ ) assim como a 1 e a 10ng/mL (Fig. 9, A2,  $p < 0.05$ , para ambas). Em termos percentuais, o efeito inibidor do Nodal a 1ng/mL, na fase folicular é igual entre endométrios do tipo I/IIA com endométrios do tipo IIB/III (Fig. 9, A1,  $p > 0.05$ ).



**Figura 9. Quantificação relativa da expressão de mRNA de *ALK4* e *ALK7*, em endométrio equino, durante as diferentes fases do ciclo éstrico, considerando a classificação de Kenney.** Os gráficos representam a quantificação da expressão, relativamente ao controlo de cada grupo representado (% controlo). A expressão de mRNA de *ALK4* é representada nos gráficos A1) na fase folicular, e A2) na fase lútea, em ambos, os endométrios foram agrupados de acordo com a classificação de Kenney (I/IIA ou IIB/III). A expressão de mRNA de *ALK7* é representada pelos gráficos B1) na fase folicular e em B2) na fase lútea, em ambos os endométrios estão agrupados independentemente da classificação de Kenney. Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média $\pm$ DP. A significância estatística é representada por asteriscos quando em relação a categorias diferentes (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ); e por letras, quando em relação ao controlo, em endométrios de categoria I/IIA representado por “a” e em endométrios de categoria IIB/III por “k” em que  $p < 0.05$  = “b” ou “l”;  $p < 0.01$  = “c” ou “m”;  $p < 0.001$  = “d” ou “n”;  $p < 0.0001$  = “e” ou “o”.

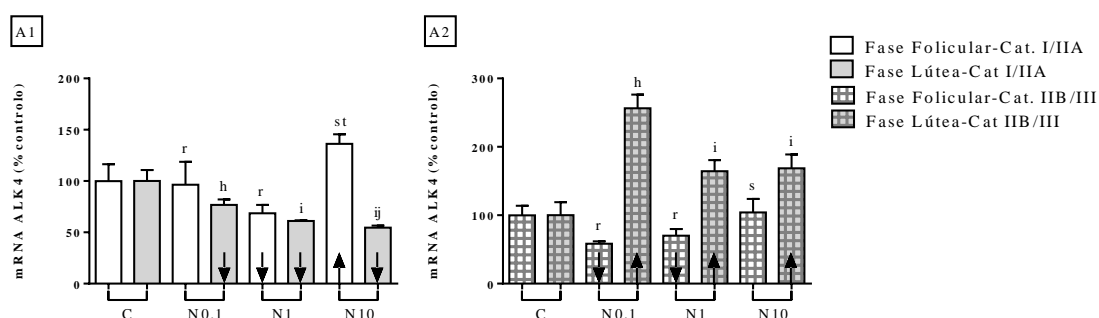
A expressão de mRNA de *ALK7* não sofre alterações com a incubação dos explantes com Nodal na fase folicular (Fig. 9, B1) mas sim na fase lútea, na qual o Nodal estimula em todas as concentrações (Fig. 9, B2, 0.1ng/mL:  $p < 0.001$ ; 1ng/mL:  $p < 0.01$ ; 10ng/mL:  $p < 0.01$ ).



O TNF $\alpha$  tem uma ação inibidora na fase folicular, tanto na expressão de *ALK4*, em ambos os tipos de endométrio (Fig. 9, A1,  $p < 0.05$  para ambos) como na expressão de *ALK7* (Fig. 9, B1,  $p < 0.001$ ). Na fase lútea, o TNF $\alpha$  tem efeito oposto sendo estimulador da expressão do *ALK7* (Fig. 9, B2,  $p < 0.0001$ ). A ocitocina exerce também um efeito sobre a expressão gênica dos recetores. Em relação à expressão do *ALK4*, na fase folicular, a ocitocina não apresenta diferenças estatisticamente significativas (Fig. 9, A1,  $p > 0.05$ ), mas observa-se uma diferença entre os efeitos sobre os endométrios de categoria I/IIA em relação aos de categoria IIB/III (Fig. 9, A1,  $p < 0.01$ ). Na fase lútea, a ocitocina inibe a expressão de *ALK4* em endométrios do tipo I/IIA (Fig. 9, A2,  $p < 0.01$ ). Em relação à expressão de *ALK7*, a ocitocina desencadeia um efeito semelhante ao do TNF $\alpha$ , sendo inibidora na fase folicular e estimuladora na fase lútea (Fig. 9, B1,  $p < 0.0001$ ; B2,  $p < 0.001$ ).

#### 4.2.3. Comparação entre os efeitos do Nodal, nas diferentes concentrações.

O efeito do Nodal sobre a expressão de *ALK4*, em endométrios de categoria I/IIA é maioritariamente inibidor, o qual é comparado entre si e entre as diferentes concentrações na Fig. 10. Na fase lútea foi observado que o Nodal tem um efeito inibidor, o qual parece ser proporcional à concentração, *i.e.*, o efeito inibidor do Nodal a 10ng/mL é maior que o de Nodal a 0.1 ng/mL ou a 1ng/mL (Fig. 10, A1,  $p < 0.01$ , para ambas) e o de Nodal a 1ng/mL é maior que o de Nodal a 0.1 ng/mL (Fig. 10, A1,  $p < 0.01$ ). Relativamente ao efeito inibidor entre fases do ciclo éstrico que é observado a 1ng/mL, este não apresenta diferenças entre si (Fig. 10, A1,  $p > 0.05$ ).

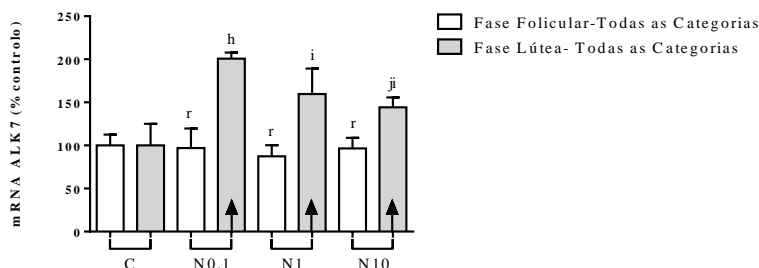


**Figura 10. Comparação da expressão de mRNA de *ALK4*, no endométrio equino, sob o efeito de diferentes concentrações de Nodal, considerando a classificação de Kenney dos endométrios, e a fase do ciclo éstrico.** Os dados representam a quantificação relativamente ao controlo de cada grupo representado (% controlo). A1) Representa a expressão em endométrios de categoria I/IIA, de acordo com cada fase do ciclo éstrico; A2) Representa a expressão em endométrios de categoria IIB/III, de acordo com cada fase do ciclo éstrico. Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por letras (Fase Folicular – “r” com “s” =  $p < 0.05$  e “r” com “t” =  $p < 0.001$ ; Fase Lútea – “h” com “i” =  $p < 0.01$  e “i” com “j” =  $p < 0.01$ ). As setas representam o efeito do tratamento já demonstrado em gráficos anteriores ↑- estimulador e ↓- inibidor.

Em endométrios de categoria IIB/III, o efeito do Nodal foi oposto entre as fases do ciclo éstrico. Na fase folicular teve um efeito inibidor nas concentrações menores (0.1 e 1 ng/mL), o qual foi igual entre si (Fig. 10, A2,  $p > 0.05$ ).

Na fase lútea, o Nodal teve efeito estimulador, o qual foi maior na concentração de 0.1ng/mL que na concentração de 1 ou 10ng/mL (Fig. 10, A2,  $p < 0.01$ , para ambas).

Em relação ao efeito estimulador do Nodal sobre a expressão de mRNA do *ALK7*, este também se apresentou maior a 0.1 ng/mL em relação ao Nodal a 1 ng/mL e a 10ng/mL (Fig. 11,  $p<0.05$  e  $p<0.0001$ , respetivamente), enquanto que entre o efeito do Nodal a 1 e a 10ng/mL, já não houve diferenças (Fig. 11,  $p>0.05$ ).



**Figura 11. Comparação da expressão de mRNA de *ALK7*, no endométrio equino, sob o efeito de diferentes concentrações de Nodal, considerando apenas a fase do ciclo estrico.** Os dados representam a quantificação relativamente ao controlo de cada grupo representado (% controlo). Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por letras (Fase Folicular – “r”; Fase Lútea – “h” com “i”= $p<0.05$  e “h” com “j”= $p<0.0001$ ). As setas representam o efeito do tratamento já demonstrado em gráficos anteriores ↑- estimulador e ↓-inibidor.

Resumidamente, o Nodal actua na transcrição génica dos seus recetores *ALK4* e *ALK7*, embora seja principalmente inibidor da expressão do *ALK4* enquanto que é estimulador da expressão do *ALK7*. O seu efeito é concentração-dependente, variando também com a fase do ciclo estrico e com o grau de endometrose. Concretamente, em endométrio relativamente saudáveis (I/IIA), na concentração de 1ng/mL, o Nodal inibe a expressão de *ALK4*, na fase folicular de igual forma à sua acção na fase lútea (Fig. 10, A1,  $p>0.05$ ). Neste tipo de endométrios (I/IIA), na fase lútea, o seu efeito inibidor é proporcional à concentração (Fig. 10, A1,  $p<0.01$ , em todas as comparações entre concentrações). Também tem efeito inibidor da transcrição génica de *ALK4* em endométrios de categoria IIB/III, na fase folicular (Fig. 9, A1, 0.1ng/mL:  $p<0.01$ ; 1ng/mL:  $p<0.05$ ). No entanto, também pode estimular a expressão deste recetor (*ALK4*), na fase folicular, em endométrios de categoria I/IIA (10ng/mL; Fig. 9, A1,  $p<0.05$ ) assim como na fase lútea, em endométrios de categoria IIB/III (Fig. 9, A2, 0.1ng/mL:  $p<0.001$ ; 1 e 10ng/mL:  $p<0.05$ ). O seu efeito estimulador, que ocorre na fase lútea sobre a expressão de *ALK7*, em todos os endométrios, e *ALK4*, em endométrios do tipo IIB/III, é maior em ambos, na concentração de 0.1ng/mL, comparativamente às outras concentrações testadas (*ALK7*: Fig. 11, 0.1ng/mL-1ng/mL:  $p<0.05$ ; 0.1ng/mL-10ng/mL:  $p<0.0001$ ; *ALK4*: Fig. 10,  $p<0.01$  para ambas).

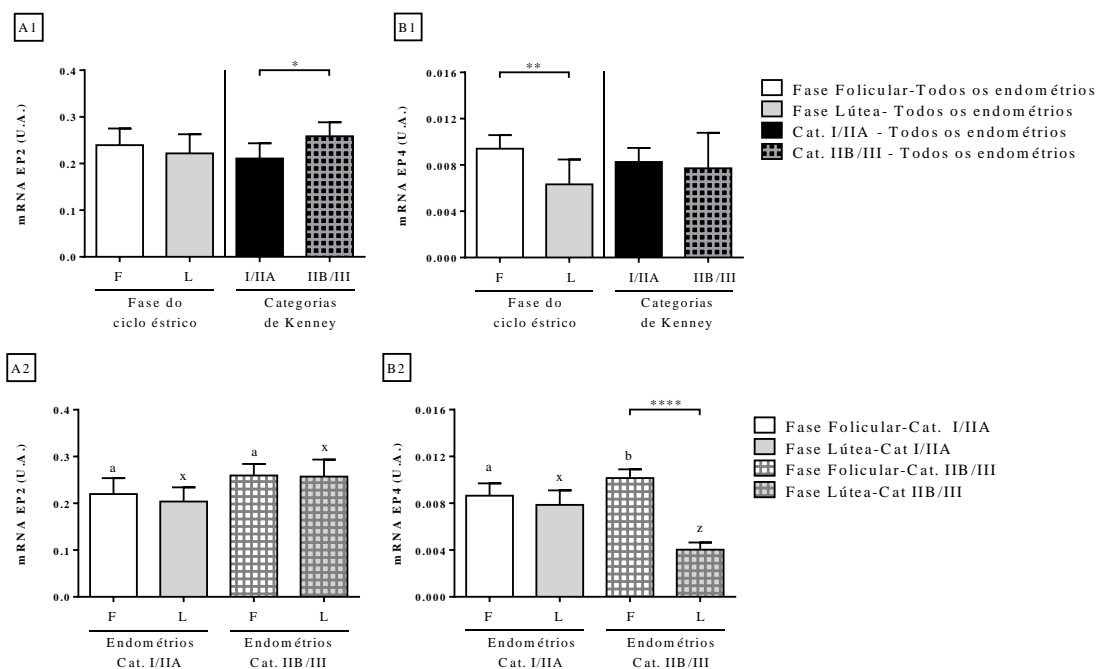
### **4.3. Prostaglandinas: recetores da PGE<sub>2</sub> e medição da PGE<sub>2</sub> e da PGF<sub>2α</sub>**

Neste trabalho avaliámos a transcrição génica dos recetores da PGE<sub>2</sub>, o *EP2* e o *EP4*, no endométrio equino, porque, na reprodução a função da PGE<sub>2</sub> é sinalizada indispensavelmente pelo *EP2* (Arosh *et al.*, 2003), o qual também é o principal recetor com funções anti-fibróticas (White *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009; Bozyk & Moore, 2011; Garrison *et al.*, 2013). Decidimos avaliar o *EP4* pela proximidade no mecanismo de transdução de sinal, *i.e.*, pela activação de cAMP (Sugimoto & Narumiya, 2007) e pela relação também com doenças fibróticas (Mezzano *et al.*, 2001; Vukicevic *et al.*, 2006; Boor, 2012; Mohamed *et al.*, 2013; Nasrallah *et al.*, 2014). Realizámos também a medição das PGs, devido ao papel antifibrótico da PGE<sub>2</sub> e pró-fibrótico da PGF<sub>2α</sub> (Oga *et al.*, 2009; Olman *et al.*, 2009).

#### **4.3.1. A variação na expressão génica dos recetores *EP2* e *EP4*, no endométrio equino, de acordo com a fase do ciclo e com a evolução da fibrose**

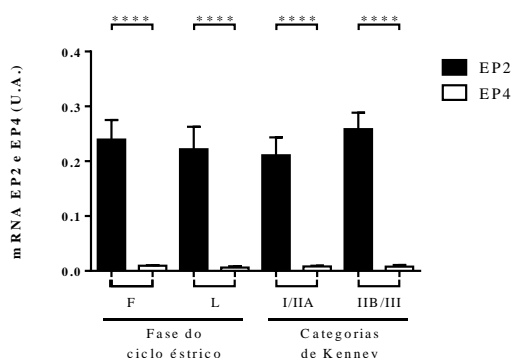
Em amostras não tratadas, a expressão de mRNA de *EP2* não varia com a fase do ciclo éstrico, enquanto que a expressão de mRNA de *EP4* é maior na fase folicular que na fase lútea (Fig. 12, A1,  $p > 0.05$ ; B1,  $p < 0.01$ , respetivamente). Considerando as diferenças entre endométrios com graus de endometrose diferentes, a expressão génica de *EP2* é menor em endométrios de categoria I/IIA comparativamente aos de categoria IIB/III, mas a expressão de *EP4* já não variou (Fig. 12, A1,  $p < 0.05$ ; B1,  $p > 0.05$ , respetivamente). Foi feita a separação nos respetivos subgrupos, e em endométrios de categoria I/IIA ou em endométrios de categoria IIB/III, a expressão de mRNA de *EP2*, confirmámos que não varia com a fase do ciclo éstrico (Fig. 12, A2,  $p > 0.05$ ), e surpreendentemente, também não variou entre categorias diferentes, na fase folicular (A2,  $p > 0.05$ ) nem na fase lútea (Fig. 12, A2,  $p > 0.05$  e  $p = 0.06$ , respetivamente).

Em relação à expressão génica de *EP4*, observamos que, em endométrios de categoria I/IIA, não há diferenças entre a expressão na fase folicular e na fase lútea (Fig. 12, B2,  $p > 0.05$ ). Mas, em endométrios de categoria IIB/III, já obtemos diferenças, sendo a expressão maior na fase folicular que na fase lútea (Fig. 12, B2,  $p < 0.0001$ ). Também, feita a comparação entre endométrios de categorias diferentes, observa-se que a expressão na fase folicular, está aumentada em endométrios de categoria IIB/III em relação aos de categoria I/IIA enquanto que, na fase lútea, a expressão está reduzida em endométrios de categoria IIB/III, comparativamente (Fig. 12, B2,  $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ , respetivamente). Esta variação contrária entre as duas fases do ciclo éstrico não salienta a importância de considerar ambos os fatores (fase do ciclo éstrico e grau de endometrose), na análise da variação da expressão génica.



**Figura 12. Comparação da expressão de mRNA de EP2 e EP4, no endométrio equino, no grupo de controle, entre fases do ciclo diferentes, considerando a classificação de Kenney.** Os dados são comparados utilizando unidades arbitrárias (U.A.). A comparação da expressão entre fases do ciclo éstrico e entre endométrios de categoria I/IIA com IIB/III é feita em: A1) em relação à expressão de mRNA de EP2 e B1) em relação à expressão de mRNA de EP4. A comparação entre subgrupos, considerando a fase do ciclo éstrico juntamente com a classificação de Kenney dos endométrios é feita em: A2) em relação à expressão de mRNA de EP2 e B2) m relação à expressão de mRNA de EP4. Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por asteriscos (\*= $p < 0.05$ ; \*\*= $p < 0.01$ ; \*\*\*\*= $p < 0.0001$ ) e por letras para comparar a expressão, ilustrada no gráfico B2, na fase folicular, da categoria I/IIA com a categoria IIB/III (a, b= $p < 0.05$ ) e na fase lútea, da categoria I/IIA com categoria IIB/III (x, z= $p < 0.01$ ). F- Fase Folicular, L – Fase Lútea.

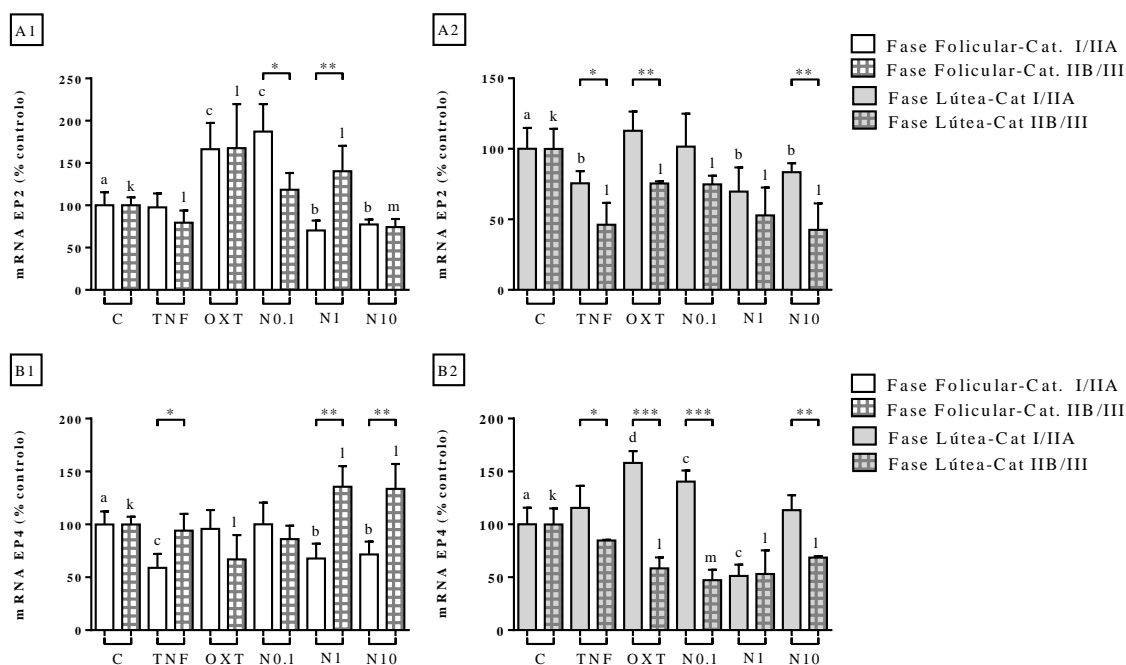
No endométrio equino, independentemente da fase do ciclo éstrico (Fig. 13,  $p < 0.0001$ , para ambas as fases) ou do grau de endometriose (Fig. 13,  $p < 0.0001$ , para ambas as categorias), a expressão génica de EP2 é sempre superior à de EP4.



**Figura 13. Comparação da expressão de mRNA de EP2 com a expressão de mRNA de EP4, no endométrio equino, não tratado, durante as diferentes fases do ciclo éstrico, independentemente da classificação de Kenney.** Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por asteriscos (\*\*\*\*= $p < 0.0001$ ). F- Fase Folicular, L – Fase Lútea.

### 4.3.2. Efeito dos tratamentos com Nodal, TNF $\alpha$ e ocitocina, no endométrio equino, sobre a expressão de mRNA dos recetores.

Na fase folicular, em endométrios de categoria I/IIA, o Nodal (1 e 10ng/mL) tem um papel maioritariamente inibitório sobre a expressão de mRNA de *EP2*, tanto na fase folicular (Fig. 14, A1,  $p < 0.05$ , para ambas) como na fase lútea (Fig. 14, A2,  $p < 0.05$ , para ambas).



**Figura 14. Quantificação relativa da expressão de mRNA de *EP2* e *EP4*, em endométrio equino, durante as diferentes fases do ciclo éstrico, considerando a classificação de Kenney.** Os gráficos representam a quantificação da expressão, relativamente ao controlo de cada grupo representado (% controlo). A expressão de mRNA de *EP2* é representada nos gráficos A1) na fase folicular, e A2) na fase lútea, em ambos, os endométrios foram agrupados de acordo com a classificação de Kenney (I/IIA ou IIB/III). A expressão de mRNA de *EP4* é representada pelos gráficos B1) na fase folicular e em B2) na fase lútea, em ambos os endométrios estão agrupados de acordo com a classificação de Kenney. Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por asteriscos quando em relação a categorias diferentes (\*= $p < 0.05$ ; \*\*= $p < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$ ); e por letras, quando em relação ao controlo, em endométrios de categoria I/IIA representado por “a” e em endométrios de categoria IIB/III por “k” em que  $p < 0.05$ = “b” ou “l”;  $p < 0.01$ = “c” ou “m”;  $p < 0.001$ = “d” ou “n”.

No entanto, na concentração menor (0.1ng/mL) apresenta uma função oposta, estimulando a transcrição de *EP2* na fase folicular (Fig. 14, A1,  $p < 0.01$ ). Em endométrios de categoria IIB/III, na fase folicular, o Nodal estimula a expressão numa concentração superior (1ng/mL), em relação a endométrios do tipo I/IIA (Fig. 14, A2,  $p < 0.05$ ) e mantém a função inibitória na concentração de 10ng/mL (Fig. 14, A1,  $p < 0.01$ ). Na fase lútea, em endométrios do tipo IIB/III, o Nodal é inibitório a todas as concentrações (Fig. 14, A2; 0.1, 1 e 10ng/mL:  $p < 0.05$ ). O efeito inibitório do Nodal sobre a expressão génica de *EP2* entre endométrios de categorias diferentes, é igual, na fase folicular na concentração de 10ng/mL e na fase lútea na concentração de 1ng/mL (Fig. 14, A1,  $p > 0.05$ ; A2,  $p > 0.05$ ), mas na concentração de 10ng/mL, já é maior em endométrios do tipo IIB/III (Fig. 14, A2,  $p < 0.01$ ).

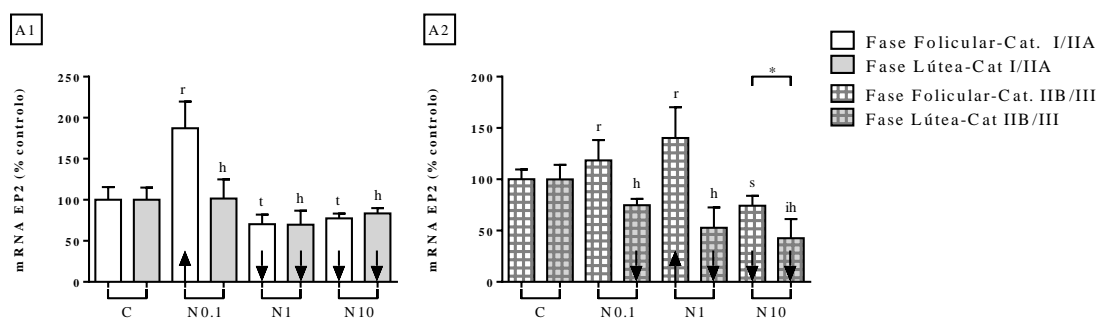
Analisando as variações na expressão gênica de *EP4*, em endométrios do tipo I/IIA, semelhante ao que ocorre com a expressão de *EP2*, o Nodal inibe a expressão na fase folicular a 1 e a 10ng/mL (Fig. 14, B1,  $p < 0.05$ , para ambas) e na fase lútea a 1ng/mL (Fig. 14, B2,  $p < 0.01$ ). O efeito estimulador do Nodal a 0.1ng/mL, observado sobre a expressão de *EP2*, na fase folicular (Fig. 14, A1,  $p < 0.01$ ), ocorre sobre a expressão de *EP4* na fase lútea (Fig. 14, B2,  $p < 0.01$ ). Em endométrios de categoria IIB/III, similar ao efeito sobre a expressão de *EP2*, o Nodal é estimulador na concentração de 1ng/mL, na fase folicular (Fig. 14, B1,  $p < 0.05$ ) e inibidor na fase lútea, em todas as concentrações (Fig. 14, B2; 0.1:  $p < 0.01$ , 1 e 10ng/mL:  $p < 0.05$ ). Contrariamente ao efeito sobre a expressão de *EP2*, o Nodal a 10ng/mL estimula a expressão de mRNA de *EP4* (Fig. 14, B1,  $p < 0.05$ ). O efeito inibitório de Nodal a 1ng/mL, na fase lútea, é semelhante entre endométrios de categorias diferentes (Fig. 14, B2,  $p > 0.05$ ).

Em relação ao efeito do tratamento com  $TNF\alpha$ , sobre a expressão dos recetores *EP2* e *EP4*, em endométrios de categoria I/IIA, este teve efeitos semelhantes, inibindo a expressão de *EP2* na fase lútea, e a de *EP4*, na fase folicular (Fig. 14, A2,  $p < 0.05$ ; B1,  $p < 0.01$ , respetivamente). Em endométrios de categoria IIB/III, o  $TNF\alpha$  inibiu a expressão de mRNA de *EP2* em ambas as fases do ciclo éstrico (Fig. 14; A1,  $p < 0.05$ ; A2,  $p < 0.05$ ). O efeito da ocitocina, foi oposto ao do  $TNF\alpha$ , em endométrios de categoria I/IIA, estimulando a expressão de *EP2*, na fase folicular, e a de *EP4*, na fase lútea (Fig. 14; A1,  $p < 0.01$ ; B2,  $p < 0.001$ , respetivamente). Em endométrios de categoria IIB/III, a ocitocina inibe a expressão de *EP2* na fase lútea (Fig. 14, A2,  $p < 0.05$ ), e a de *EP4*, em ambas (Fig. 14; B1,  $p < 0.05$ , B2,  $p < 0.05$ ), mas estimula a expressão de *EP2*, na fase folicular (Fig. 14, A1,  $p < 0.05$ ).

#### **4.3.3. Comparação entre os efeitos do Nodal, nas diferentes concentrações.**

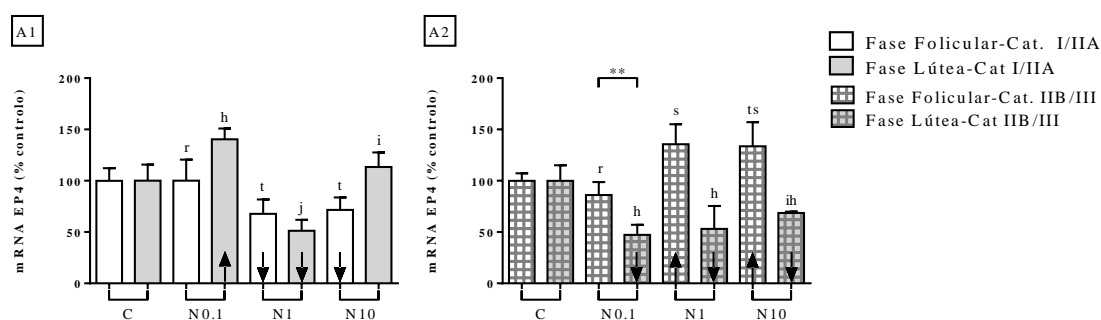
Em endométrios com ligeiro grau de fibrose (I/IIA), observa-se que o efeito inibidor do Nodal sobre a expressão de mRNA de *EP2* é igual entre as concentrações de 1 e 10ng/mL independentemente da fase do ciclo éstrico (Fig. 15, A1,  $p > 0.05$ ).

No entanto, em endométrios com maior grau de fibrose (IIB/III), o efeito inibidor, na fase lútea, é maior na concentração de 10ng/mL, comparativamente à concentração de 0.1 ng/mL (Fig. 15, A2,  $p < 0.05$ ), e maior, em relação ao efeito inibidor na fase folicular e na mesma concentração (10ng/mL; Fig. 15, A2,  $p < 0.05$ ).



**Figura 15. Comparação da expressão de mRNA de *EP2*, no endométrio equino, sob o efeito de diferentes concentrações de Nodal, considerando a classificação de Kenney dos endométrios, e a fase do ciclo éstrico.** Os dados representam a quantificação relativamente ao controlo de cada grupo representado (% controlo). A1) Representa a expressão em endométrios de categoria I/IIA, de acordo com cada fase do ciclo éstrico; A2) Representa a expressão em endométrios de categoria IIB/III, de acordo com cada fase do ciclo éstrico. Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por letras (Fase Folicular – “r” com “s” =  $p < 0.01$  e “r” com “t” =  $p < 0.001$ ; Fase Lútea – “h” com “i” =  $p < 0.05$ ). As setas representam o efeito do tratamento já demonstrado em gráficos anteriores ↑- estimulador e ↓-inibidor.

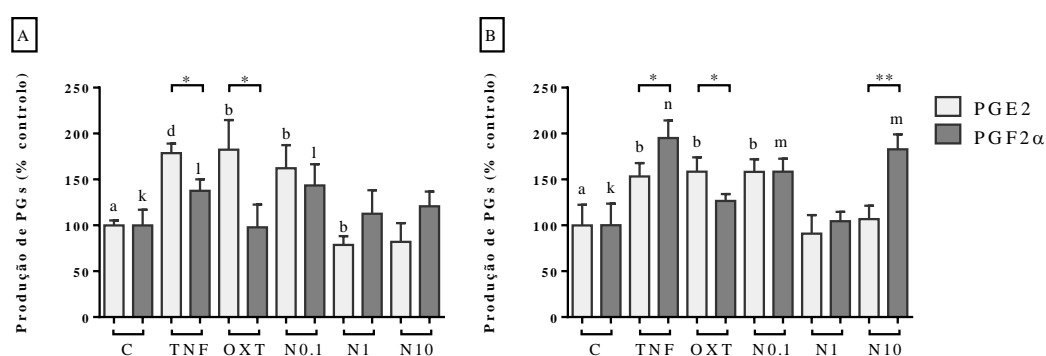
O efeito inibidor do Nodal, sobre a expressão de *EP4*, em endométrios do tipo I/IIA, é igual na concentração de 1ng/mL, entre fases do ciclo éstrico (Fig. 16, A1,  $p > 0.05$ ) e igual ao efeito na concentração de 10ng/mL, na fase folicular (Fig. 16, A1,  $p > 0.05$ ). O efeito estimulador, em endométrios do tipo IIB/III, também é igual entre a concentração de 1ng/mL com a de 10ng/mL (Fig. 16, A2,  $p < 0.05$ ). No entanto, contrário ao que ocorre sobre a expressão de mRNA de *EP2*, o efeito inibidor, na fase lútea, é maior na concentração de 0.1ng/mL, comparativamente à de 10ng/mL (Fig. 16, A2,  $p < 0.05$ ).



**Figura 16. Comparação da expressão de mRNA de *EP4*, no endométrio equino, sob o efeito de diferentes concentrações de Nodal, considerando a classificação de Kenney dos endométrios, e a fase do ciclo éstrico.** Os dados representam a quantificação relativamente ao controlo de cada grupo representado (% controlo). A1) Representa a expressão em endométrios de categoria I/IIA, de acordo com cada fase do ciclo éstrico; A2) Representa a expressão em endométrios de categoria IIB/III, de acordo com cada fase do ciclo éstrico. Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por letras (Fase Folicular – “r” com “s” =  $p < 0.05$  e “r” com “t” =  $p < 0.01$ ; Fase Lútea – “h” com “i” =  $p < 0.05$ ). As setas representam o efeito do tratamento já demonstrado em gráficos anteriores ↑- estimulador e ↓-inibidor.

#### 4.3.4. Medição das Prostaglandinas E<sub>2</sub> e F<sub>2α</sub>

A medição das prostaglandinas foi realizada antes de se obter a classificação dos endométrios, de acordo com Kenney, e devido a uma limitação do kit ELISA utilizado, houve a necessidade de reduzir o número de amostras de cada fase, resultando numa representação do grupo folicular por endométrios de categoria I/IIA e do grupo lúteo por endométrios de categoria IIB/III. Tendo isso em conta, pareceu correto realizar apenas a quantificação relativamente ao controlo e comparar apenas na mesma fase, e, portanto, na mesma categoria, o efeito dos diferentes tratamentos (Fig. 17). Assim, observa-se que, na fase folicular, o Nodal a 0.1ng/mL consegue aumentar a produção de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub>, enquanto que na concentração de 1ng/mL causa uma diminuição da produção de PGE<sub>2</sub> (Fig. 17, A, p<0.05, para ambas). O efeito do Nodal na concentração menor (0.1ng/mL) repete-se na fase lútea (Fig. 17, B; PGE<sub>2</sub>: p<0.05, PGF<sub>2α</sub>: p<0.01), acrescentando que na concentração maior (10ng/mL) causa um aumento da produção de PGF<sub>2α</sub> (Fig. 17, B, p<0.01). Em relação aos tratamentos com TNFα e ocitocina, estes funcionaram como controlos positivos para a PGE<sub>2</sub> em ambas as fases do ciclo (Fig. 17, A, p<0.001 e p<0.05, respetivamente; B, p<0.05 para ambos), mas apenas o TNFα estimulou a PGF<sub>2α</sub> (Fig. 17, A, p<0.05; B, p<0.001). Concretamente, o TNFα conseguiu exercer um efeito mais pronunciado sobre a PGE<sub>2</sub> na fase folicular e sobre a PGF<sub>2α</sub> na fase lútea (Fig. 17, A, p<0.05; B, p<0.05, respetivamente). Acrescenta-se que o efeito do Nodal a 0.1ng/mL sobre a PGF<sub>2α</sub>, na fase lútea, não foi considerado estatisticamente diferente ao do Nodal a 10ng/mL (Fig. 17, B, p=0.06).



**Figura 17. Medição da produção de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub> pelo endométrio equino nas diferentes fases do ciclo éstrico.** Os gráficos representam a medição da produção, relativamente ao controlo de cada grupo representado (% controlo). A) Fase Folicular; B) Fase Lútea. As barras representam a média±DP. A significância estatística é representada por asteriscos quando comparando o efeito entre a produção de PGE<sub>2</sub> com PGF<sub>2α</sub> (\* =p<0.05; \*\* = p<0.01); e por letras, quando em relação ao controlo, na medição da PGE<sub>2</sub>, é representado por “a” e, na medição da PGF<sub>2α</sub>, é representado por “k” em que p<0.05= “b” ou “l”; p<0.01= “c” ou “m”; p<0.001= “d” ou “n”.

Resumidamente, em endométrios relativamente saudáveis (I/IIA), o Nodal é maioritariamente inibidor da expressão génica de ambos os recetores *EP2* e *EP4*, independentemente da fase do ciclo éstrico, nas concentrações de 1 e 10 ng/mL, e de igual forma entre elas (Fig. 15, A1, p>0.05; Fig. 16, A1, p>0.05, respetivamente).



Contudo, o Nodal também pode ser estimulador, em endométrios do tipo I/IIA, na concentração menor (0.1ng/mL), sobre a expressão de mRNA de *EP2* (Fig. 12, A1,  $p<0.01$ ), na fase folicular, e sobre a expressão de mRNA de *EP4* (Fig. 12, B2,  $p<0.01$ ), na fase lútea. Estes efeitos do Nodal, inibidor a 1ng/mL e estimulador a 0.1ng/mL, coincidem, na fase folicular, com a inibição da produção de  $PGE_2$ , na mesma concentração (1ng/mL), e com a estimulação da mesma, na concentração de 0.1ng/mL (Fig. 17,  $p<0.05$  para ambas). Em endométrios do tipo IIB/III, na fase folicular, a expressão de mRNA de *EP2* e de *EP4* não é afectada pela concentração de 0.1ng/mL, mas é estimulada na concentração de 1ng/mL (Fig. 12, *EP2*: A1,  $p<0.05$ ; *EP4*: B1,  $p<0.05$ ), e, ainda, na concentração de 10ng/mL (Fig. 12, *EP4*: B1,  $p<0.05$ ). O efeito do Nodal é semelhante entre fases do ciclo éstrico, havendo respostas dependentes da concentração, na fase lútea, em endométrios do tipo IIB/III, quando o Nodal na concentração de 10ng/mL inibe mais que a 0.1ng/mL, a expressão de *EP2* (Fig. 15, A2,  $p<0.05$ ), enquanto que o inverso ocorre com *EP4* (Fig. 16, A2,  $p<0.05$ ). É também nesta fase (FL) que o Nodal consegue estimular a produção de  $PGF_{2\alpha}$ , nas concentrações de 0.1 e 10ng/mL (Fig. 17, B,  $p<0.05$  para ambas).

## 5. Discussão

### 5.1. Expressão dos recetores *TGFR2* e *ALK5* no endométrio equino

O TGF $\beta$ 1 está presente em células epiteliais e do estroma do endométrio humano (Kim *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2006; Chevronnay *et al.*, 2008), e foi recentemente demonstrado no endométrio equino (Cardoso *et al.*, 2016). No nosso estudo, a expressão do recetor *TGFR2* não apresenta variações entre ambas as fases do ciclo éstrico, em endométrios relativamente normais (*i.e.*, endométrios de categoria I/IIA). Em endométrios com um grau elevado de fibrose (*i.e.*, endométrios de categoria IIB/III), verificou-se um aumento da expressão na fase folicular em relação à fase lútea. Em relação ao *ALK5*, apenas podemos observar que a expressão é contrária à do *TGFR2* em endométrios de categoria IIB/III, sendo a expressão maior na fase lútea que na fase folicular. Um estudo realizado no endométrio humano, também obteve pouca variação entre a expressão de mRNA de ambos os recetores na fase folicular comparativamente à fase lútea (Chevronnay *et al.*, 2008). A expressão de TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 2 também não apresenta variações durante o ciclo menstrual, no endométrio humano (Jones *et al.*, 2006). Os efeitos dos tratamentos utilizados neste trabalho, considerando apenas a sua acção estimuladora ou inibidora, sobre a expressão génica de *TGFR2* também foram independentes da fase do ciclo éstrico, variando apenas entre endométrios de categorias diferentes (I/IIA *versus* IIB/III).

#### 5.1.1. Expressão dos recetores no decurso da endometrose e como são expressos noutros modelos de doenças fibróticas

No endométrio equino, que seja do conhecimento do autor, não há estudos comparativos ou quantitativos sobre a expressão dos recetores, entre endométrios de diferentes graus de fibrose. Contudo, existe um estudo que determinou um aumento proporcional do TGF $\beta$ 1, no endométrio equino, em relação às categorias de Kenney (Ganjam & Evans, 2006). Recentemente, também foi reportada a sua presença em endométrios de éguas com endometrose, pela imunolocalização do TGF $\beta$ 1, do *ALK5* e do *TGFR2* (Cardoso *et al.*, 2016). Nesse estudo, houve maior intensidade na marcação de TGF $\beta$ 1 e do *ALK5* nas glândulas dilatadas ou em glândulas em focos fibróticos, em relação ao epitélio glandular inalterado (Cardoso *et al.*, 2016). Considerando a necessidade do complexo de sinalização TGF $\beta$ 1-*TGFR2*-*ALK5* para activar o Smad2 ou Smad3 e assim causar a expressão de genes associados com a fibrose (Leask & Abraham, 2004; Denton *et al.*, 2003, 2005; Verrecchia & Mauviel, 2007), em vários modelos de doenças fibróticas houve maior expressão de ambos os recetores (Bobik *et al.*, 1999; revisto por Verrecchia & Mauviel, 2007 e por Pohlers *et al.*, 2009). No nosso estudo, também obtivemos maior expressão dos recetores *TGFR2* e *ALK5* em endométrios com endometrose (IIB/III), comparativamente aos endométrios mais saudáveis (I/IIA), sendo consistente com esses estudos, uma vez que a endometrose é também uma doença fibrótica (Kenney, 1978; Hoffmann *et al.*, 2009a).

A nossa hipótese teórica era que o Nodal podia influenciar a sinalização a favor da progressão da fibrose. Considerando que o Nodal, na fase folicular, estimula a expressão génica de *TGFR2*, em todas as concentrações, e de *TGFR2* e *ALK5*, na fase lútea, é possível que o Nodal participe na indução da fibrose por causar a sobre-expressão dos recetores do TGFβ1. O efeito inibidor, em endométrios com endometriose (IIB/III) poderá estar relacionado com um mecanismo regulatório. A expressão de mRNA de *ALK5* é maior na fase lútea que na fase folicular, neste tipo de endométrios (IIB/III). No entanto, o efeito do Nodal sobre a transcrição génica deste recetor (*ALK5*), é contrária, estimulando-a na fase folicular e inibindo-a na fase lútea. Possivelmente, o mecanismo regulatório que actua sobre a expressão de *TGFR2*, o qual não apresenta diferenças entre as fases do ciclo éstrico, em endométrios com fibrose (IIB/III), só se activa após um limiar de expressão de recetores, e como a expressão do *ALK5* nesta fase é inferior, o Nodal conserva o seu papel estimulador.

### **5.1.2. Alteração do rácio de mRNA *ALK5:TGFR2* pelo Nodal e a sua relação com a progressão da fibrose**

Um outro possível mecanismo, através do qual o Nodal possa ter acção pró-fibrótica, é na desregulação em si, dos recetores, *i.e.*, do equilíbrio entre *ALK5* e *TGFR2*. A expressão de mRNA de *TGFR2* foi superior à de *ALK5* independentemente da fase do ciclo éstrico, cujo resultado foi coincidente com o dum estudo em endométrio humano, que sugere que o *ALK5* possa ser limitante à sinalização do TGFβ1 (Chevronnay *et al.*, 2008). No entanto, no nosso estudo, foi observado que, na concentração de 1ng/mL, o Nodal tinha efeitos opostos, relativamente à expressão génica de *TGFR2*, em endométrios de categoria I relativamente aos de categoria IIA, na fase lútea, estimulando nos primeiros e inibindo nos segundos. Na mesma fase, em ambos os tipos de endométrios, o Nodal estimulou a expressão génica de *ALK5*, mais ainda que nas outras concentrações. Por este motivo, foi calculado o rácio de mRNA de *ALK5:TGFR2*, o qual demonstrou ser elevado relativamente ao controlo, na concentração de 1ng/mL, e diminuído na concentração de 10ng/mL. Esta alteração no efeito do Nodal, entre os endométrios de categoria I e os de categoria IIA, e considerando que é nesta categoria que surgem primeiro pequenas infiltrações difusas e fibrose ligeira (Kenney, 1978; Snider *et al.*, 2011), e ainda, o efeito oposto com a concentração maior utilizada (10ng/mL), sugere fortemente que seja nesta fase inicial da endometriose, que se iniciam os mecanismos pró-fibróticos, possivelmente associados com a actuação do Nodal na concentração de 1ng/mL.

Em estudos iniciais sobre a acção do TGFβ1, descobriram que o *TGFR2* é necessário para mediar os efeitos anti-proliferativos do TGFβ1 mas não a indução de síntese proteica (Chen *et al.*, 1993). Recorrendo a uma técnica de inibição da sinalização, removendo o domínio citoplasmático do recetor *TGFR2* (TβRIIΔk), em células Mv1Lu, mesmo utilizando concentrações variáveis de TGFβ1, o efeito anti-proliferativo foi completamente abolido, embora não tenha havido alteração na capacidade de induzir PAI-1 ou fibronectina (Chen *et al.*, 1993). Foi também demonstrado noutro estudo que células Mv1Lu que não expressem o *ALK5* mas apresentam níveis de expressão normais de *TGFR2*, não apresentam resposta ao TGFβ1 (Chen *et al.*, 1993). Esta falta de resposta é também suportada pelo o

uso de inibidores específicos do *ALK5*, em diferentes tipos de células, os quais foram eficazes a reduzir o efeito pró-fibrótico mediado pelo TGF $\beta$  (Inman *et al.*, 2002; Denton *et al.*, 2005; de Gouville *et al.*, 2005).

Mais tarde, num estudo em células vasculares, as células obtidas em lesões, como placas de arterosclerose, demonstraram menor expressão de *TGFR2* comparativamente a células normais, e ganharam uma maior capacidade de resposta à indução de proteínas pelo TGF $\beta$  (McCaffrey *et al.*, 1995). Esta dissociação entre o efeito antiproliferativo e indutor de proteínas foi outra vez demonstrado em células hepáticas, num modelo de estudo de fibrose hepática, e, novamente, num estudo sobre a escleroderma, em cultura de fibroblastos, em que a diminuição de *TGFR2* acompanhou-se de diminuição do efeito anti-proliferativo e o aumento da expressão de *ALK5* com o aumento da síntese de colagénio (Roulot *et al.*, 1999; Pannu *et al.*, 2004). No último estudo, Pannu *et al.*, (2004) demonstraram o efeito da alteração do rácio *ALK5:TGFR2* na produção de colagénio, em que o aumento da expressão de *ALK5* correlacionou-se com o aumento de colagénio. Também conseguiram causar a sobre-expressão de cada recetor separadamente e avaliar o seu efeito, comprovando que a indução de colagénio é mediada pelo recetor *ALK5* (Pannu *et al.*, 2004). Por fim, Denton *et al.* (2003, 2005), estudaram a sinalização do TGF $\beta$  em ratos transgênicos, com T $\beta$ R2 $\Delta$ k, e observaram que estes ratos apresentavam fibrose pulmonar e dermal. Realizaram cultura de fibroblastos, e comprovaram que o recetor T $\beta$ R2 $\Delta$ k, a baixos níveis de expressão, poderá facilitar a sinalização TGF $\beta$ -*ALK5*, enquanto que a níveis elevados já poderá inibir (Denton *et al.*, 2005). Neste estudo, os genes mais expressos, na cultura de fibroblastos, foram o PAI-1 e o CTGF, e determinaram que o recetor *ALK5* é o responsável pelo fenótipo pró-fibrótico induzido por TGF $\beta$  (Denton *et al.*, 2005). Estes estudos sugerem uma dissociação entre o efeito anti-proliferativo e indutor de proteínas na sinalização do TGF $\beta$ . Foi demonstrado que o T $\beta$ R2 $\Delta$ k causa uma activação paradoxal da sinalização do TGF $\beta$ 1 (Böttinger *et al.*, 1997; Roulot *et al.*, 1999; Denton *et al.*, 2003, 2005).

A resistência de certos fibroblastos à inibição do TGF $\beta$ 1 pode estar associada com este desequilíbrio entre recetores, como foi demonstrado por McCaffrey *et al.*, (1995), Denton *et al.*, (2003 e 2005) e Pannu *et al.*, (2004). O efeito deste recetor T $\beta$ R2 $\Delta$ k pode ser explicado pelo fenómeno em que a inibição da sinalização, estimula a expressão de *TGFR2* e de TGF $\beta$ 1 (Böttinger *et al.*, 1997). Outro possível efeito pode ser o de estabilizar a sinalização e diminuir a degradação do complexo recetor *TGFR2-ALK5* (Denton *et al.*, 2005). Contudo, outro estudo em que utilizaram T $\beta$ R2 $\Delta$ k já obtiveram uma redução da expressão endógena de *TGFR2* (Chen *et al.*, 1993).

Assim, pode ser que a importância do rácio *ALK5:TGFR2* ou o papel do recetor T $\beta$ R2 $\Delta$ k, seja variável de acordo com o tipo de célula, e de tecido, ou esteja relacionada com a fase de progressão da fibrose. Por exemplo, Bobik *et al.* (1999) obtiveram sobre-expressão de ambos os recetores em lesões vasculares, enquanto que McCaffrey *et al.* (1995) obtiveram diminuição do *TGFR2* e nenhuma alteração relativamente ao *ALK5*. Com estes estudos sublinha-se que a diminuição do *TGFR2* não é limitante à

sinalização do *ALK5*, provavelmente por estar geralmente mais expresso que o último (McCaffrey et al., 1995).

Recentemente, no estudo em que foi realizada a imunomarcação do TGF $\beta$ 1 e dos seus recetores em endométrios de éguas com endometrose, observaram que a imunomarcação de *TGFR2* era mais esporádica comparativamente à de *ALK5* e TGF $\beta$ 1 (Cardoso, 2015). No nosso estudo, obtivemos um efeito particularmente diferente, na fase lútea, em que em endométrios de categoria I, o Nodal a 1ng/mL teve uma acção estimuladora da expressão de *TGFR2*, mais ainda que a 0.1ng/mL, mas em endométrios de categoria IIA, a sua acção foi inibidora. Na mesma fase, e na mesma concentração (1ng/mL) também foi quando se obteve maior estimulação pelo Nodal, sobre a expressão de mRNA de *ALK5*. Portanto, estes dados sugerem a possibilidade de existir um mecanismo que condiciona uma actuação diferente do Nodal sobre a expressão destes recetores, e que, em endométrios com um ligeiro grau de endometrose (IIA), a concentração de 1ng/mL torna-se favorável para a expressão de *ALK5*, mas desfavorável para a expressão de *TGFR2*, contribuindo assim para uma alteração do rácio. Consequentemente, o Nodal poderá promover uma diminuição dos efeitos anti-proliferativos do TGF $\beta$ 1, ao mesmo tempo que promove a síntese de ECM via *ALK5* (McCaffrey et al., 1994; Denton et al., 2003, 2005; Pannu et al., 2004).

Em relação ao efeito do TNF $\alpha$  sobre a expressão destes recetores, em endométrios de categoria I/IIA, apenas exerce efeito estimulador na fase folicular sobre a expressão de mRNA de *TGFR2*. Este efeito foi demonstrado em fibroblastos de rato, num modelo de estudo da fibrose cardíaca, em que o TNF $\alpha$  induziu a expressão de *TGFR2* e do TGF $\beta$ 1 (Voloshenyuk et al., 2011). A capacidade indutora de TGF $\beta$ 1 pelo TNF $\alpha$  também foi demonstrada em fibroblastos pulmonares (Sullivan et al., 2009). Foi também, demonstrado que as acções indutora e pró-fibrótica do TNF $\alpha$  eram reduzidas com a inibição do *ALK5*, e que o TNF $\alpha$  conseguia induzir a fosforilação de Smad3, demonstrando a existência de comunicação cruzada entre o TNF $\alpha$  e o TGF $\beta$ , e o Smad3, como mediador da acção fibrótica (Voloshenyuk et al., 2011).

## 5.2. Expressão dos recetores *ALK4* e *ALK7* no endométrio equino

A expressão do Nodal, ou mesmo da Activina, no endométrio equino, tem sido muito pouco estudada. Trabalhos realizados no nosso laboratório demonstraram que o Nodal é expresso no endométrio equino, nas células epiteliais, tanto glandulares como luminais, nas células do estroma e nos fibroblastos (Volpi, 2013). No endométrio bovino, o Nodal também é expresso, havendo um aumento da expressão génica no estro e uma diminuição no diestro, sendo a expressão do proestro intermédia (Argañaraz, et al., 2013). Neste estudo também identificaram a expressão do Nodal no estroma e em fibroblastos (Argañaraz, et al., 2013). A imunolocalização do Nodal, na área perinuclear de células epiteliais do lúmen e das glândulas endometriais ou mesmo do oviducto, demonstraram uma imunomarcção ligeiramente maior durante a fase lútea que durante a fase folicular (Argañaraz et al., 2013). No endométrio humano, a expressão de mRNA e de proteína Nodal no epitélio é estável entre fases do ciclo menstrual, estando fortemente expressa tanto no epitélio luminal como glandular (Torres et al., 2009; Papageorgiou et al., 2009). No entanto, nas células do estroma a expressão de proteína Nodal ocorre apenas na fase folicular e no início da fase lútea, e a diminuição global de mRNA do Nodal na fase lútea acompanha esta diminuição da expressão protéica no estroma, sugerindo que sejam as células do estroma as principais produtoras de Nodal (Papageorgiou et al., 2009). No endométrio humano, o Lefty é apenas fracamente expresso no fim da fase lútea e durante a menstruação (Papageorgiou et al., 2009). A diminuição da expressão do Lefty durante a fase lútea foi previamente demonstrada por Cornet et al. (2002), tendo sido demonstrado também que a P4 consegue inibir a expressão génica do Lefty, em explantes endometriais humanos.

As Activinas também sinalizam através do *ALK4* e do *ALK7* (de Caestecker, 2004), e têm sido identificadas no endométrio humano (Mylonas et al., 2004). Particularmente as Activinas A (constituídas pelas sub-unidades  $\beta A-\beta A$ ), sinalizam através do *ALK4*, e as Activinas B (constituídas pelas sub-unidades  $\beta B-\beta B$ ) e AB (constituídas pelas sub-unidades  $\beta A-\beta B$ ), sinalizam pelo *ALK4* e *ALK7* (de Caestecker, 2004). Duma forma geral, todas as sub-unidades de inibina/activina, as quais são predominantemente produzidas pelas células epiteliais, são expressas durante todo o ciclo menstrual, mas apresentam um pico de expressão no fim da fase lútea. As células do estroma, sintetizam maioritariamente as sub-unidades  $\beta A$  e  $\beta B$ , coincidente com o fim da fase lútea, acompanhando-se de marcação reduzida da sub-unidade  $\alpha A$  (Mylonas et al., 2004). No endométrio humano, *ALK4*, *ActRIIA* e *ActRIIB* atingem o pico de expressão no início da fase lútea, predominantemente em células do estroma ou células endoteliais (Jones et al., 2002). O Cripto, encontra-se expresso durante todo o ciclo menstrual, com maior expressão durante a fase lútea, particularmente no fim da mesma (Papageorgiou et al., 2009). Contrariamente aos estudos realizados em endométrio humano, a expressão de *ALK4* no endométrio equino, demonstrada por imunomarcção, revelou uma expressão preferencialmente em células epiteliais em detrimento das células do estroma (Volpi, 2013). No nosso estudo, a expressão de mRNA de *ALK4* foi maior na fase folicular que na fase lútea, sugerindo que a função do Nodal e possivelmente do *ALK4* na sua relação com o Nodal e as Activinas, será diferente no equino relativamente ao ser humano. Estes dados vão ao encontro do que ocorre em bovinos, com aumento da expressão génica de

Nodal durante a fase folicular, relativamente à fase lútea (Argañaraz et al., 2013). Por fim, no endométrio equino, Yamanouchi et al., (1997), não obtiveram expressão das sub-unidades  $\alpha A$  nem  $\beta A$ , na fase lútea, muito embora este estudo tenha sido realizado apenas numa égua.

Interessantemente, no endométrio equino, no epitélio glandular inalterado, a expressão proteica de *ALK7* localizava-se em zonas mais profundas das glândulas, sendo ausente ou fracamente expresso em zonas glandulares mais próximas do lúmen (Volpi, 2013). Neste trabalho, a expressão de *ALK7* foi maior na fase folicular que na fase lútea. No entanto, na fase lútea, o Nodal revela uma acção inibidora sobre a expressão de mRNA de *ALK4*, que ocorre de forma proporcional à sua concentração, enquanto que tem acção estimuladora sobre a expressão de mRNA de *ALK7* de forma inversamente proporcional. Esta capacidade de inibir a expressão génica de *ALK4* coincide com as diferenças encontradas entre endométrios de categoria I/IIA com endométrios de categoria IIB/III, no nosso estudo, a qual está reduzida em endométrios com maior grau de fibrose. Sobre a expressão génica de *ALK7* não foi possível obter dados suficientes para comparar entre endométrios de categorias diferentes. Contudo, estes dados sugerem uma preferência na sinalização, pela via *ALK7* que pela *ALK4*, na fase lútea, sendo que nesta fase, há maior expressão de Cripto e uma expressão mínima de Lefty (Papageorgiou et al., 2009). Duma maneira geral a FSH também poderá influenciar a sinalização do Nodal, uma vez que esta induz o Akt, o qual inibe o *ALK7*, apesar deste também conseguir, por sua vez, inibir o Akt (Wang et al., 2006).

### **5.2.1. O recetor *ALK7* na endometriose da égua e noutras doenças fibróticas**

O recetor *ALK7* foi considerado um recetor órfão, pois apesar da sua homologia com os recetores *ALK5* (78%) e *ALK4*(77%) no seu domínio intracelular, o seu domínio extracelular é bastante diferente, sugerindo a ligação com um ligando particular. Foi demonstrado que tinha afinidade para o Nodal, juntamente com o *ActRIIB*, e assim fosforilar o Smad2 e Smad3 (Reissmann *et al.*, 2001). Este estudo demonstrou também que o *ALK7* é essencial para a sinalização do Nodal, e é uma via independente do Cripto, apesar deste potenciar a sua sinalização (Reissmann *et al.*, 2001). Na mesma altura, um outro estudo determinou que, devido às similaridades no domínio intracelular, o *ALK7* conseguia, em igual magnitude, activar as mesmas vias do TGF $\beta$ 1-*ALK5*, como Smad2, Smad3, e as vias MAPKs, nomeadamente, a via ERK1/2 e a JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Jörnvall *et al.*, 2001). O mesmo estudo, também avaliou se o *ALK7* conseguia activar promotores tipicamente relacionados com o TGF $\beta$ 1-*ALK5*, assim como genes regulados endogenamente por esta via, como o I-Smad7 e o PAI-1 (Jörnvall *et al.*, 2001). Determinaram que o *ALK7* conseguiu induzir todos os genes associados com o fenótipo TGF $\beta$ 1-*ALK5* estudados, e também, o efeito anti-proliferativo. Por fim, o *ALK7* conseguiu induzir alterações morfológicas nas células, que o *ALK5* não conseguiu, as quais estão associadas com uma via de comunicação cruzada com as proteínas Rho (Jörnvall *et al.*, 2001). Esta semelhança entre efeitos da activação do *ALK7* com a activação do *ALK5* foi demonstrada novamente no primeiro estudo a demonstrar o efeito pró-apóptico do *ALK7* (Kim *et al.*, 2004). O efeito pró-apóptico é mediado pela activação de Smad2/3, e pela activação de JNK, p38, das caspases-3 e -9, e pela libertação do citocromo c (Kim *et al.*, 2004). Um outro factor pró-apóptico é o CTGF, e neste estudo foi sugerido que, com base

nestes resultados, o *ALK7* consegue comunicar com outras vias (*i.e.* MAPKs), tal como o TGF $\beta$ 1, e possivelmente induzir os mesmos genes. Tal facto já foi testemunhado com o GDF8, que pela via *ALK4/5* e *Smad2/3*, também conseguiu induzir o CTGF (Chang *et al.*, 2015), ou mesmo a Activina A, que também consegue induzir o CTGF (Gressner *et al.*, 2008).

Recentemente, num modelo de estudo da fibrose renal, descobriram que havia aumento da expressão dos recetores *ALK5* e *TGFR2*, mas também do *ALK7*, com aumento de pSmad2/3, e diminuição do *ALK6* (Shen *et al.*, 2013). Outro estudo, sobre a deposição de colagénio na parede aórtica, na diabetes tipo 2, demonstraram que o silenciamento génico de *ALK7* reduziu a fosforilação de *Smad2/3* e, conseqüentemente, a deposição de colagénio, revertendo a rigidez da aorta (Li *et al.*, 2015). Desta forma, é possível que a preferência do Nodal, na fase lútea, pela sinalização do *ALK7* tenha um papel pró-fibrótico. Este facto iria explicar o aumento da expressão de *ALK7*, no endométrio equino em zonas próximas a ninhos fibróticos (Volpi, 2013).

No entanto, as Activinas B e AB também têm afinidade para este recetor (Tsuchida *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2006), e Activina B também pode estar envolvida em doenças fibróticas (Myllärniemi *et al.*, 2014). A expressão da sub-unidade  $\beta$ B, no endométrio humano, não variou durante o ciclo menstrual, apresentando uma maior expressão nas células do estroma que nas células epiteliais glandulares (Mylonas *et al.*, 2004). A combinação de *ALK7* com *ActRIIA* aumenta a sensibilidade à ligação das Activinas B ou AB (Tsuchida *et al.*, 2004).

Esta via de sinalização promove a fosforilação de *Smad3* mas não a de *Smad2*, e, em células que expressem o *ALK7*, a Activina AB e B tornam-se tão potentes como a Activina A (Tsuchida *et al.*, 2004). Noutro estudo, obtiveram o mesmo efeito com células a expressar *wild-type ALK7*, em que o efeito da Activina B foi equivalente ao de Activina A, embora neste, a Activina B tenha demonstrado maior afinidade com o recetor *ALK4*. Neste estudo, a expressão de *ALK7* na forma constitutiva activa, mostrou-se mais potente a mediar a sinalização da Activina B que *ALK4* (Bernard *et al.*, 2006). Estes estudos sugerem que as Activinas B e AB podem, dependendo do tecido e do tipo de células, ter preferências de sinalização por diferentes conjuntos de recetores (Tsuchida *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2006), ou mesmo, sinalizar por outras vias, como a *ALK3/Smad1/5/8* (Myllärniemi *et al.*, 2014). Desta forma, não se pode excluir que, à semelhança do que ocorre com os recetores do TGF $\beta$ 1, o Nodal poderá contribuir para o desenvolvimento de fibrose de forma indireta, em vez de direta, desregulando a sinalização da Activina B.

O *ALK7* é um recetor pouco expresso, no endométrio equino (Volpi, 2013), tendo sido demonstrado no nosso estudo que a sua expressão é bastante inferior à do recetor *ALK4*. No entanto, o *ALK7* poderá ser igualmente potente a induzir pSmad2 e pSmad3 que o *ALK4* (Bernard *et al.*, 2006). Isto será importante num contexto em que o *Smad3* é considerado um dos principais mediadores da resposta pró-fibrótica do TGF $\beta$ 1 (revisto por Flanders, 2004; Roberts *et al.*, 2006; Verrecchia & Mauviel, 2007). Desde que se determinou o papel do TGF $\beta$ 1 na fibrogénese, vários estudos têm sido feitos para desenvolver



inibidores da sua sinalização. Um dos primeiros inibidores foi o SB-431542, que inibe o *ALK5*, mas devido às semelhanças estruturais, também tem efeito inibidor, apesar de inferior, sobre o *ALK4* e o *ALK7* (Inman *et al.*, 2002). Outros seguiram-no, numa tentativa de obterem inibidores mais potentes e mais específicos a inibir o efeito pró-fibrótico do TGFβ1 (de Gouville *et al.*, 2005; Tojo *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2008). Contudo todos destes inibidores também inibem o *ALK4* e o *ALK7*, nalguns casos o *TGFRII* e, até o *ActRIIA* (Petersen *et al.*, 2008), o que nem sempre permite atribuir o resultado terapêutico apenas à inibição do *ALK5*.

Na maioria dos estudos de bloqueio da sinalização do TGFβ1 ou mesmo no caso de bloquear as três isoformas de TGFβ (Yu *et al.*, 2003), chegaram à conclusão que existem mecanismos TGFβ-independentes que continuam a actuar na progressão da fibrose (Yu *et al.*, 2003; Smoktunowicz *et al.*, 2015). Um destes mecanismos pode ser a indução do CTGF pelo TGFβ1 mas cuja expressão se torna proporcional à quantidade de fibrose, e mantém-se de forma independente de TGFβ-Smad (Holmes *et al.*, 2001). Outro mecanismo, poderá ser o facto de o *ALK7* ser menos inibido que o *ALK5* e que o *ALK4*, e ter capacidade de induzir genes semelhantes aos induzidos pelo TGFβ1-*ALK5* (Jörnvall *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004).

É possível que hajam outros mecanismos pelos quais o Nodal consegue promover estes efeitos prófibróticos. Num estudo de Gressner *et al.*, (2008) foi possível demonstrar que a Activina A é capaz de induzir a expressão de CTGF por mecanismos intracelulares, com aumento da expressão de Smad3. Adicionalmente, foi também demonstrada a activação e translocação para o núcleo de Smad3/4 em fibroblastos em lesões fibróticas, na ausência de TGFβ1, e conseguiram excluir a possibilidade de sinalização autócrina pelo TGFβ1, inibindo especificamente por recurso a anticorpos ou pela construção de recetores dominante negativos de *TGFRII* (Mori *et al.*, 2003). Nesse mesmo estudo verificaram que tal efeito também não era devido a algum defeito no I-Smad7, uma vez que verificaram que a sua indução, expressão e localização estavam normais (Mori *et al.*, 2003). As possíveis explicações foram limitadas a uma sensibilização dos fibroblastos em lesões fibróticas ao TGFβ, de forma a que ligeiras variações conseguem induzir respostas de maior magnitude; ou existem outros ligandos que podem induzir a acumulação de Smad3/4 e de genes normalmente atribuídos ao TGFβ1, como é exemplo o IGFBP-3 (insulin-like growth factor-binding protein 3) (Mori *et al.*, 2003) ou o GDF8 (Chang *et al.*, 2015), ou possivelmente, a Activina (Gressner *et al.*, 2008) ou o Nodal (Jörnvall *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004).

Um outro aspeto a considerar é que o Nodal tem igual capacidade de induzir pSmad3 que o TGFβ1 (Kumar *et al.*, 2001). No mesmo estudo, avaliaram a capacidade de induzir Smad2, e o Nodal em 15 minutos conseguiu atingir o pico de indução de pSmad2, o qual se manteve elevado até às 4 horas e voltou a valores basais às 24 horas, contrastando com a Activina, que só demonstrou um pico de indução ao fim de 1 hora e às 4 horas já tinha regressado a valores basais (Kumar *et al.*, 2001).

Por último, o Nodal partilha outros aspetos com a sinalização do TGF $\beta$  que podem sugerir uma acção direta na progressão da fibrose, como a capacidade de comunicar com a via de PI3K/Akt e induzir EMT e alterar a expressão de MMPs, dependendo da situação (Valcourt *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2013; Duan *et al.*, 2015). Aliás, num estudo realizado de forma a determinar quais os recetores da superfamília do TGF $\beta$  que eram capazes de induzir EMT, demonstraram que apenas o *ALK5*, *ALK4* e *ALK7* tinham essa capacidade (Valcourt *et al.*, 2005). Outro exemplo, no folículo ovárico, o Nodal-*ALK7* diminuiu a expressão de Akt de forma a permitir a apoptose, promovendo a atresia folicular (Wang *et al.*, 2006). No entanto, em tumores, já pode activar o Akt e desta forma, promover a sobrevivência celular e estabilizar a expressão de Snail (Fang *et al.*, 2013; Duan *et al.*, 2015). O Nodal também consegue inibir o BMP7 (Yeo & Whitman, 2001), o qual tem várias funções antifibróticas (revisto por Weiskirchen & Meurer, 2013)

### 5.3. Produção de PGs no endométrio equino, sob a influência do Nodal

Há estudos realizados *in vitro* que demonstram a indução da PGE<sub>2</sub>, tanto pelo TGFβ1, em células mesangiais (Rodríguez-Barbero *et al.*, 2006) como pela Activina A, em macrófagos e em células do corpo lúteo (Nüsing & Barsing, 1999; Liu *et al.*, 2016). Considerando as semelhanças nas vias de sinalização e nas funções imunomodulatórias e no possível papel na regeneração de tecidos (Papageorgiou *et al.*, 2009), será possível que o Nodal também possa ter capacidade de induzir a PGE<sub>2</sub>.

O efeito do Nodal sobre a produção de prostaglandinas não se encontra muito documentado na literatura, no entanto, no equino, este foi demonstrado no corpo lúteo, como parte do mecanismo responsável pela luteólise funcional, diminuindo a PGE<sub>2</sub> e aumentando a PGF<sub>2α</sub> (Galvão *et al.*, 2015).

A produção de PGE<sub>2</sub> assim como a de PGF<sub>2α</sub> está alterada em endométrios com endometriose (Szóstek *et al.*, 2012; Gajos *et al.*, 2015). Em endométrios de categoria I, a expressão natural de PGE<sub>2</sub> está aumentada na fase lútea média e na fase folicular (Szóstek *et al.*, 2012), atingindo o mínimo no fim da fase lútea (Szóstek *et al.*, 2012; Gajos *et al.*, 2015). A expressão de PGF<sub>2α</sub>, está também aumentada na fase lútea média e folicular, e também no fim da fase lútea, atingindo o mínimo de expressão no início da fase lútea (Szóstek *et al.*, 2012; Gajos *et al.*, 2015). Esta diferença na produção de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub> no fim da fase lútea, coincide com a luteólise, (Szóstek *et al.*, 2012), e com a acção do Nodal sobre a produção de ambas as prostaglandinas no corpo lúteo equino (Galvão *et al.*, 2015). No nosso estudo, o Nodal estimulou a produção de PGE<sub>2</sub> na concentração de 0.1ng/mL em ambas as fases do ciclo éstrico, e estimulou a PGF<sub>2α</sub>, apenas na fase lútea, na concentração de 0.1 e 10ng/mL, embora nesta já foi em endométrios com endometriose (IIB/III). Num estudo realizado no endométrio equino, avaliando as alterações na produção de PGs, de acordo com o grau de fibrose e fase do ciclo éstrico, observou-se que a produção da PGE<sub>2</sub> estava alterada apenas em certas fases do ciclo éstrico (início e fim da fase lútea comparativamente a endométrios saudáveis), nas quais estava aumentada, em vez de diminuída (Szóstek *et al.*, 2012). Um outro estudo, também observou que a PGE<sub>2</sub> estava aumentada apenas em casos de endometrite concomitante com endometriose de categoria IIB/III (Gajos *et al.*, 2015). Assim, o efeito estimulador do Nodal, na concentração menor (0.1ng/mL), sobre a produção de PGE<sub>2</sub> e a expressão génica dos seus recetores, poderá sugerir um papel fisiológico tal como ocorre no corpo lúteo equino (Galvão *et al.*, 2015).

No nosso estudo, o TNFα e a ocitocina funcionaram como controlos positivos para a produção de PGE<sub>2</sub>, à semelhança de outros estudos sobre a produção de PGs no endométrio equino (Galvão *et al.*, 2013; Roberto da Costa *et al.*, 2008; Szóstek *et al.*, 2014b). Nos mesmos estudos foi demonstrado que o TNFα também serve como controlo positivo para a produção de PGF<sub>2α</sub>, tendo sido observado o mesmo no presente trabalho (Galvão *et al.*, 2013; Roberto da Costa *et al.*, 2008; Szóstek *et al.*, 2014b).

No entanto, a ocitocina não conseguiu estimular a produção da PGF<sub>2α</sub> nem na fase folicular nem na fase lútea, contrariamente ao observado por Galvão *et al.*, (2013) e Szóstek *et al.*, (2014b), no endométrio equino. Tal poderá ser devido à baixa expressão dos recetores de ocitocina no endométrio na fase

folicular (de Ruijter-Villani *et al.*, 2015), os quais são regulados de forma a controlar a libertação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por ocitocina (Keith *et al.*, 2013). Com isto, sugere-se que a acção estimuladora da ocitocina poderá ter variado no nosso estudo, devido ao efeito bifásico que esta apresenta e à dependência de outros factores (Keith *et al.*, 2013; Rebordão *et al.*, 2016).

#### **5.4. Expressão dos recetores *EP2* e *EP4* no endométrio equino**

Os recetores *EP2* e *EP4*, são recetores da  $\text{PGE}_2$  e são expressos no endométrio equino (Atli *et al.*, 2010; Gebhardt *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). A expressão de *EP2* é maior na fase lútea média e diminui no fim da fase lútea e na fase folicular (Atli *et al.*, 2010). Um outro estudo, em endométrio equino, obteve maior expressão de *EP2* também na fase lútea média e diminuição no fim da fase lútea, atingindo o mínimo de expressão no dia da ovulação (Gebhardt *et al.*, 2012). No entanto, acerca da expressão de *EP4*, há estudos que não apresentam variações durante o ciclo éstrico (Atli *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014). Contudo, há um estudo que demonstra que a expressão de *EP4* está aumentada na fase folicular, enquanto que está diminuída no início da fase lútea (Gebhardt *et al.*, 2012). A expressão de *EP4* é geralmente muito reduzida (Silva *et al.*, 2014), ou mesmo indetetável, como no caso do endométrio bovino (Arosh *et al.*, 2003). No nosso estudo, em endométrios relativamente saudáveis (I/IIA), não obtivemos variações entre as fases do ciclo éstrico, indo ao encontro dos dados obtidos por Silva *et al.*, (2014), para ambos os recetores, no endométrio equino. Também obtivemos uma maior expressão do recetor *EP2* em relação ao *EP4*. No oviducto equino, também demonstraram a expressão génica de *EP2* e *EP4*, sem variações entre as fases do ciclo éstrico e também com uma maior expressão génica de *EP2* relativamente a *EP4* (Ball *et al.*, 2013).

#### **5.5. Relação da $\text{PGE}_2$ e dos recetores *EP2* e *EP4*, na endometrose e noutros modelos fibróticos**

A  $\text{PGE}_2$  é conhecida pelo seu papel antifibrótico, especialmente via *EP2* no modelo de estudo de fibrose pulmonar idiopática. Resumidamente, a via *EP2* tem efeito antifibrótico, conseguindo inibir a proliferação de miofibroblastos e induzir a apoptose destes (Huang *et al.*, 2009; Bozyk & Moore, 2011). A  $\text{PGE}_2$  também inibe a produção de colagénio (Garrison *et al.*, 2013, Van Ly *et al.*, 2012), mesmo em células estimuladas com  $\text{TGF}\beta_1$ , inibindo também a expressão de fibronectina, ao induzir a expressão de MMP9 que a vai degradar (Van Ly *et al.*, 2012). A  $\text{PGE}_2$  não só inibe praticamente todos os aspectos funcionais dos fibroblastos, desde a sua produção, migração, à sua diferenciação, como também consegue reverter o estado de miofibroblasto de volta a fibroblasto (Garrison *et al.*, 2013).

No pulmão, o desenvolvimento de fibrose está associado com uma diminuição da produção de  $\text{PGE}_2$  e/ou da expressão do recetor *EP2* (Huang *et al.*, 2008; Bozyk & Moore, 2011), gerando uma resistência dos fibroblastos aos efeitos da  $\text{PGE}_2$ . Um outro exemplo de resistência, neste caso, em fibroblastos gengivais, ocorre por activação de *EP3* (Black *et al.*, 2007). Nestes fibroblastos a inibição pela  $\text{PGE}_2$  ocorre principalmente por inibição de JNK. No entanto, a activação de *EP3* vai estimular esta via (Black *et al.*, 2007; Bozyk & Moore, 2011). Em mais detalhe, foi demonstrado pela primeira vez a acção bifásica da  $\text{PGE}_2$ , dependente da sua concentração e do recetor, nas mesmas células, em fibroblastos pulmonares (White *et al.*, 2008). Foi observado que, em concentrações baixas ( $<10^{-10}$  M) ou elevadas

(>10<sup>-6</sup> M), e via recetor *EP2*, a PGE<sub>2</sub> tem acção supressiva da proliferação dos fibroblastos pulmonares, enquanto que, em concentrações intermédias (10<sup>-9</sup> a 10<sup>-7</sup> M) e via o recetor *EP3*, a PGE<sub>2</sub> estimula a sua proliferação (White *et al.*, 2008). Relativamente ao recetor *EP4*, os dados já serão mais confusos. Na fibrose renal a expressão de *EP4* está fortemente associada com um efeito protector renal (Vukicevic *et al.*, 2006; revisto por Boor, 2012). No entanto, a PGE<sub>2</sub>-*EP4* consegue estimular a produção de IL-6 e fibronectina, assim como de angiotensina II, a expressão das quais pode estar envolvida em mecanismos pró-fibróticos (Mezzano *et al.*, 2001; Mohamed *et al.*, 2013; Nasrallah *et al.*, 2014).

Observando o papel do Nodal, numa perspectiva global, este é principalmente inibidor, nas concentrações de 1 e 10ng/mL, tanto sobre a expressão génica de *EP2* como de *EP4*, e de forma independente das fases do ciclo éstrico e do grau de fibrose. Na mesma concentração (1ng/mL), o Nodal inibe a produção de PGE<sub>2</sub>, na fase folicular, em endométrios de categoria I/IIA. Considerando a análise dos outros pares de recetores (*ALK5*, *TGFR1*, *ALK4* e *ALK7*), a concentração de Nodal considerada mais provável como pró-fibrótica foi a de 1ng/mL, a qual coincide nesta avaliação. Nesta concentração, o Nodal poderá mediar ou mesmo ser responsável pelo mecanismo de resistência dos fibroblastos, considerando que o Nodal é expresso nestes, no endométrio equino (Volpi, 2013). Aliás, a diminuição da expressão dos recetores *EP2* e *EP4* poderá promover a sinalização da PGE<sub>2</sub> via *EP1* ou *EP3*, as quais têm demonstrado ser vias pró-fibróticas (Makino *et al.*, 2002; White *et al.*, 2008; Harding & LaPointe, 2011; Nasrallah *et al.*, 2014).

Por outro lado, no nosso estudo, principalmente em relação à expressão génica de *EP2*, obtivemos um aumento, ainda que ligeiro, em endométrios de categoria IIB/III. Possivelmente este resultado estará relacionado com o papel da PGE<sub>2</sub> na inflamação. Relembrando que a única situação, no estudo da endometrose, em que se obteve aumento da PGE<sub>2</sub> foi em casos de endometrite concomitante (Gajos *et al.*, 2015) e a PGE<sub>2</sub> tem funções no processo inflamatório, principalmente mediadas pelos recetores *EP2* e *EP4*, através dos quais também promove uma resposta do tipo Th2 (Kalinski, 2012).

Por fim, em relação ao efeito do Nodal sobre a PGF<sub>2α</sub>, este estimula a produção na fase lútea, em endométrios fibróticos (IIB/III), mas curiosamente apenas nas concentrações de 0.1 e 10ng/mL. A PGF<sub>2α</sub> tem um papel fibrótico, independente do TGFβ, em modelos de fibrose pulmonar (Oga *et al.*, 2009; Van Ly *et al.*, 2012). No entanto, nos mesmo estudos em que foram avaliadas a produção de PGE<sub>2</sub> e a de PGF<sub>2α</sub>, esta última estava diminuída em endométrios de categoria II ou III (Szóstek *et al.*, 2012) ou não apresentava alterações (Gajos *et al.*, 2015).

Apesar destes dados há que considerar o potencial papel pró-fibrótico da PGF<sub>2α</sub> no endométrio equino, e que o Nodal poderá ser parte do mecanismo que a estimula. Estes resultados coincidem com o papel fibrótico do Nodal na concentração de 1ng/mL sobre os recetores avaliados neste trabalho. Contudo, futuros trabalhos deveriam ser desenvolvidos a fim de melhor elucidar a relação entre as vias estudadas e a endometrose na égua.

## 6. Conclusões

Com este trabalho propusemos clarificar o potencial papel do Nodal como pró-fibrótico, no endométrio equino. A endometrose é uma patologia crónica e degenerativa com graves implicações na saúde reprodutiva do animal e com forte impacto económico na indústria equina. Fundamentalmente, por ser uma patologia fibrótica, avaliámos como o Nodal poderia influenciar a sinalização do TGF $\beta$ 1 e da PGE2. Com este trabalho, conseguimos demonstrar que o Nodal poderá ter funções fibróticas, quer diretamente quer indiretamente, principalmente na concentração de 1ng/mL. O Nodal demonstrou a capacidade de induzir a expressão do mRNA dos recetores do TGF $\beta$ 1, o *ALK5* e o *TGFR2*, os quais se mostraram aumentados em endométrios fibróticos, à semelhança do que ocorre noutras patologias fibróticas (Bobik *et al.*, 1999; Verrecchia & Mauviel, 2007; Pohlers *et al.*, 2009). Ainda, o Nodal poderá ser responsável pela desregulação destes recetores, aumentando o rácio mRNA *ALK5:TGFR2*, o qual, em certos contextos, promove a fibrose (McCaffrey *et al.*, 1995; Roulot *et al.*, 1999; Denton *et al.*, 2003, 2005; Pannu *et al.*, 2004). Em relação à PGE2, o Nodal inibiu a sua produção juntamente com a expressão de mRNA dos seus recetores *EP2* e *EP4*, potencialmente inibindo assim a função anti-fibrótica da PGE2 (Huang *et al.*, 2009; Bozyk & Moore, 2011; Van Ly *et al.*, 2012; Garrison *et al.*, 2013). Por fim, o Nodal, diminuiu a expressão do seu recetor *ALK4* enquanto que aumentou a expressão do recetor *ALK7*, o qual partilha a mesma capacidade de activação de genes que o TGF $\beta$ 1 (Jörnvall *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004) e tem sido implicado noutras doenças fibroproliferativas (Shen *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015). Os nossos dados sugerem uma preferência do Nodal, pela via *ALK7*, na fase lútea, durante a qual o Nodal consegue alterar o rácio mRNA de *ALK5:TGFR2*.

Este trabalho apenas reflete as alterações na expressão génica, sendo necessários estudos que aprofundem se o Nodal tem capacidade de alterar a expressão de proteína destes recetores, e se estas alterações de facto influenciam os mecanismos da fibrose como a diferenciação de miofibroblastos, a expressão de colagénio, de CTGF ou o turnover de ECM. Será também de enorme importância avaliar a expressão do principal inibidor do Nodal, o Lefty, no endométrio equino, no desenvolvimento da endometrose, uma vez que a ausência de expressão deste correlaciona-se com outras afecções associadas à acção do Nodal (Papageorgiou *et al.*, 2009).

## 7. Bibliografia

1. Alfranca, A., López-Oliva, J.M., Genís, L., López-Maderuelo, D., mirones, I., Salvado, D., Quesada, A.J., Arroyo, A.G. & Redondo, J.M. (2008). PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGF $\beta$ /Alk5 signaling pathway. *Blood*, 112, 1120 – 1128.
2. Aresu, L., Benali, S., Giannuzzi, D., Mantovani, R., Castagnaro, M. & Falomo, M.E. (2012). The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. *Journal of Veterinary Science*, 13(2), 171-177.
3. Argañaraz, M.E., Apichela S.A., Kenngott, R., Vermeheren, M., Rodler, D., Palma, G.A., Miceli, D.C. & Sinowatz, F. (2013). Expression and localization of nodal in bovine oviduct and uterus during different functional stages of oestrus cycle and pregnancy. *Histochemistry and Cell Biology*, 139, 89–97.
4. Arosh, J.A., Banu, S.K., Chapdelaine, P., emond, V., Kim, J.J., Maclaren, L.A. & Fortier, M.A. (2003). Molecular cloning and characterization of bovine prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4: expression and regulation in endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology*, 144 (7), 3076 – 3091.
5. Arosh, J.A., Banu, S.K., Chapdelaine, P., Madore, E., Sirois, J. & Fortier, M.A. (2004). Prostaglandin biosynthesis, transport, and signalling in corpus luteum: A basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology*, 145 (5), 2551 – 2560.
6. Atamas, S.P. (2002). Minireview: Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sciences*, 72, 631–643.
7. Atli, M.O., Kurar, E., Kayis, S.A., Aslan, S., Semacan, A., Celik, S. & Guzeloglu, A. (2010). Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. *Animal Reproductive Science*, 122, 124–132.
8. Aupperle, H., Özgen, S., Schoon, H.-A., Schoon, D., Hoppen, H.-O., Sieme, H. & Tannapfel, A. (2000). Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine Veterinary Journal*, 32(3), 228 –32.
9. Ball, B.A., Scoggin, K.E., Troedsson, M.H.T. & Squires, E.L. (2013). Characterization of prostaglandin E2 receptors (EP2, EP4) in the horse oviduct. *Animal Reproduction Science*, 142, 35 – 41.
10. Bernard, D.J., Lee, K.B. & Santos, M.M. (2006). Activin B can signal through both *ALK4* and *ALK7* in gonadotrope cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 52.
11. Bianco, C., Adkins, H., Wechselberger, C., Seno, M., Normanno, N., De Luca, A., Sun, Y., Khan, N., Kenney, N., Ebert, A., Williams, K., Sanicola, M. & Salomon, D.S. (2002). Cripto-1 activates Nodal- and ALK4-dependent and -independent signalling pathways in mammary epithelial cells. *Molecular and Cell Biology*, 22 (8), 2586 – 2597.
12. Bitzer, M., von Gersdorff, G., Liang, D., Dominguez-Rosales, A., Beg, A.A., Rojkind, M. & Böttinger, E. (2000). A mechanism of suppression of TGF- $\beta$ /SMAD signalling by NF- $\kappa$ B/RelA. *Genes & Development*, 14, 187 – 197.
13. Black, S.A., Palamakumbura, A.H., Stan, M. & Trackman, P.C. (2007). Tissue-specific mechanisms for CCN2/CTGF persistence in fibrotic gingiva: Interactions between cAMP and MAPK signalling pathways, and prostaglandin E2-EP3 receptor mediated activation of the c-JUN-N-Terminal Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (21), 15416 – 15429.
14. Blanchet, M.-H., Le Good, J.A., Oorschot, V., Baflast, S., Minchiotti, G., Klumperman, J. & Constam, D.B. (2008). Cripto localizes Nodal at the limiting membrane of early endosomes. *Science Signalling*, 1(45), ra13, 1-9.

15. Blesson, C.S. & Sahlin, L. (2014). Review: Prostaglandin E and F receptors in the uterus. *Receptors & Clinical Investigation*, 1: e115.
16. Bobik, A., Agrotis, A., Kanellakis, P., Diley, R., Krushinsky, A., Smirnov, V., Tararak, E., Condrón, M. & Kostolias, G. (1999). Distinct patterns of Transforming Growth Factor- $\beta$  Isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions colocalization implicates TGF- $\beta$  in fibrofatty lesion development. *Circulation*, 99, 2883-2891.
17. Boerboom, D., Brown, K.A., Vaillancourt, D., Poitras, P., Goff, A.K., watanabe, K., Doré, M. & Sirois, J. (2004). Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. *Biology of Reproduction*, 70, 391 – 399.
18. Boor, P. (2012). EP4: a new piece in the fibrotic puzzle. *Kidney International*, 82, 132 – 135.
19. Böttinger, E.P., Jakubczak, J.L., Roberts, I.S.D., Mumy, M., Hemmati, P., Bagnall, K., Merlino, G & Wakefield, L.M. (1997). Expression of a dominant-negative mutant TGF- $\beta$  type II receptor in transgenic mice reveals essential roles for TGF- $\beta$  in regulation of growth and differentiation in the exocrine pancreas. *The EMBO Journal*, 16 (10), 2621 – 2633.
20. Bourillot, P.-Y., Garrett, N. & Gurdon, J.B. (2002). A changing morphogen gradient is interpreted by continuous transduction flow. *Development*, 129, 2167-2180.
21. Bozyk, P.D. & Moore, B.B. (2011). Prostaglandin E2 and the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 45, 445 – 452.
22. Branton, M.H. & Kopp, J.B. (1999). TGF- $\beta$  and fibrosis. *Microbes and Infection*, 1, 1349 – 1365.
23. Brennan, J., Norris, D.P. & Robertson, E.J. (2002). Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. *Genes & Development*, 16, 2339-2344.
24. Buczkowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M., Ras, A. & Mrowiec, J. (2014). Endometrosis – significance for horse reproduction, pathogenesis, diagnosis, and proposed therapeutic methods- Review. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17 (3), 547–554.
25. Cadario, M.E., Losinno, L., Giguere, S., Aguilar, J., Jack, T.J., Macpherson, M., Fitzpatrick, C. & Uhl, E.W. (2002). Uterine expression of fibrogenic cytokines in the mare. *Theriogenology*, 58, 449-452.
26. Cardoso, A.C.J. (2015). *Efeitos da terapêutica com células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea na expressão da citocina pró-fibrótica TGF- $\beta$ 1 no endométrio de éguas com endometrose*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária.
27. Cardoso, A.C., Rebordão, M.R., Cantore, S., Herrera, M., Carmo, M., Landim, F., Alvarenga, M.A., Ferreira-Dias, G. & Fumuso, E. (2016). Bone marrow derived mesenchymal stem cells therapy on the expression of pro- fibrotic cytokine TGF-  $\beta$ 1 in mare’s endometrosis [abstract]. In H. Rodríguez-Mártinez & G. Opsomer (Eds). *Proceedings of the 20th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) and the 13th Conference of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA)*, Portugal, 27 – 29 October, *Reproduction in Domestic Animals*, 51 (2), 79.
28. Chang, H.-M., Pan, H.-H., Cheng, J.-C., Zhu, Y.-M. & Leung, P. C. K. (2015). Growth differentiation factor 8 suppresses cell proliferation by up-regulating CTGF expression in human granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1-9.
29. Chen, R.-H., Ebner, R. & Derynck, R. (1993). Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF- $\beta$  activities. *Science*, 260, 1335-1338.
30. Chen, C. & Shen, M.M. (2004). Two modes by which Lefty proteins inhibit Nodal signaling. *Current Biology*, 14, 618-624.



31. Chevronnay, H.P.G., Cornet, P.B., Delvaux, D., Lemoine, P., Courtoy, P.J., Henriët, P. & Marbaix, E. (2008). Opposite regulation of Transforming Growth Factors- $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 expression in the human endometrium. *Endocrinology*, 149 (3), 1015–1025.
32. Cornet, P.B., Picquet, C., Lemoine, P., Osteen, K.G., Bruner-Tran, K.L., Tabibzadeh, S., Courtoy, P.J., Eeckhout, Y., Marbaix, E. & Henriët, P. (2002). Regulation and function of LEFTY-A/EBAF in the human endometrium. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (45), 42496-42504.
33. Critchley, H.D.O., Osei, J., Henderson, T.A., Boswell, L., Sales, K.J., Jabbour, H.N. & Hirani, N. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in human endometrium and its regulation by prostaglandin E-series prostanoid receptor e (EP2). *Endocrinology*, 147 (2), 744 – 753.
34. De Caestecker, M. (2004). Mini Review: The transforming growth factor- $\beta$  superfamily of receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 15, 1–11.
35. De Gouville, A.-C., Boullay, V., Krysa, G., Pilot, J., Brusq, J.-M., Loriolle, F., Gauthier, J.-M., Papworth, S.A., Laroze, A., Gellibert, F. & Huet, S. (2005). Inhibition of TGF- $\beta$  signaling by an ALK5 inhibitor protects rats from dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis. *British Journal of Pharmacology*, 145, 166–177.
36. Denton, C.P., Zheng, B., Evans, L.A., Shi-wen, X., Ong, V.H., Fisher, I., Lazaridis, K., Abraham, D.J., Black, C.M. & de Crombrughe, B. (2003). Fibroblast-specific expression of a kinase-deficient type II Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) receptor leads to paradoxical activation of TGF $\beta$  signaling pathways with fibrosis in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (27), 25109-25119.
37. Denton, C.P., Lindahl, G.E., Khan, K., Shiwen, X., Ong, V.H., Gaspar, N.J., Lazaridis, K., Edwards, D.R., Leask, A., Eastwood, M., Leoni, P., Renzoni, E.A., Gharios, G.B., Abraham, D.J. & Black, C.M. (2005). Activation of key profibrotic mechanisms in transgenic fibroblasts expressing kinase-deficient type II Transforming Growth Factor- $\beta$  receptor (T $\beta$ RII $\Delta$ k). *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (16), 16053-16065.
38. Deprez, R.H.L., Fijnvandraat, A.C., Ruitjer, J.M. & Moorman, A.F.M. (2002). Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry*, 307, 63 – 69.
39. De Ruijter-Villani, M., van Tol, H.T.A. & Stout, T.A.E. (2015). Effect of pregnancy on endometrial expression of luteolytic pathway components in the mare. *Reproduction, Fertility and Development*, 27, 834 – 845.
40. Duan, W., Li, R., Ma, J., Lei, J., Xu, Q., Jiang, Z., Nan, L., Li, X., Wang, Z., Huo, X., Han, L., Wu, Z., Wu, E. & Ma, Q. (2015). Overexpression of nodal induces a metastatic phenotype in pancreatic cancer cells via the Smad2/3 pathway. *Oncotarget*, 6 (3), 1490 – 1505.
41. Ethier, J.-F. & Findlay, J.K. (2001). Review: Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction*, 121, 667-675.
42. Evans, T.J.1., Miller, M.A., Ganjam, V.K., Niswender, K.D., Eilersieck, M.R., Krause WJ & Youngquist RS. (1998). Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. *American journal of Veterinary Research*, 59(10), 1209.
43. Evans, A.C.O. (2003). Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals*, 38, 240 – 246.
44. Fang, R., Zhang, G., Guo, Q., Ning, F., Wang, H., Cai, S. & Du, J. (2013). Nodal promotes aggressive phenotype via Snail-mediated epithelial–mesenchymal transition in murine melanoma. *Cancer Letters*, 333, 66–75.
45. Fang, L., Chang, H.-M., Cheng, J.-C., Leung, P.C.K. & Sun, Y.-P. (2014). TGF- $\beta$ 1 induces COX-2 expression and PGE2 production in human granulosa cells through Smad signalling pathways. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99 (7), E1217 – E1226.

46. Flanders, K.C. (2004). Review: Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 85, 47 – 64.
47. Fumuso, E., Giguère, S., Wade, J., Rogan, D., Videla-Dorna, I. & Bowden, R.A. (2003). Endometrial IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , mRNA expression in amres resistant or susceptible to post-breeding endometritis. Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 96, 31 – 41.
48. Gajos, K., Kozdrowski, R., Nowak, M. & Siemieniuch, M.J. (2015). Altered secretion of selected arachidonic acid metabolites during subclinical endometritis relative to estrous cycle stage and grade of fibrosis in mares. *Theriogenology*, 84, 457–466.
49. Galvão, A., Valente, L., Skarzynski, D.J., Szóstek, A., Piotrowska-Tomala, K., Rebordão, M.R., Mateus, L. & Ferreira-Dias, G. (2013). Effect of cytokines and ovarian steroids on equine endometrial function: an *in vitro* study. *Reproduction, Fertility and Development*, 25, 985 – 997.
50. Galvão, A., Skarzynski, D. & Ferreira-Dias, G. (2015). Nodal promotes functional luteolysis via downregulation of progesterone and prostaglandins E2 and promotion of PGF2 alpha synthetic pathways in mare corpus luteum. *Endocrinology*, 157(2), 858-871.
51. Ganjam, V.K. & Evans, T.J. (2006). Equine endometrial fibrosis correlates with 11 $\beta$ -HSD2, TGF- $\beta$ 1 and ACE activities. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 248, 104 – 108.
52. Garrison, G., Huang, S.K., Okunishi, K., Scoot, J.P., Penke, L.R.K., Scruggs, A.M. & Peters-Golden, M. (2013). Reversal of myofibroblast differentiation by prostaglandin E2. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 48 (5), 550 – 558.
53. Gebhardt, S., Merkl, M., Herbach, N., Wanke, R., Handler, J. & Bauersachs, S. (2012). Exploration of global gene expression changes during the estrous cycle in equine endometrium. *Biology of Reproduction*, 87 (6): 136, 1 – 13.
54. Ginther, O.J. (Ed.) (1992). Characteristics of the ovulatory season. *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*, 2<sup>o</sup>Ed., 173 – 232. Cross Plains, Wisconsin: Equiservices.
55. Gray, P.C., Shani, G., Aung, K., Kelber, J. & Vale, W. (2006). Cripto binds Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and inhibits TGF- $\beta$  signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), 9268-9278.
56. Gressner, O.A., Lahme, B., Siluschek, M., Rehbein, K., Weiskirchen, R. & Gressner, A.M. (2008). Intracrine signalling of activin A in hepatocytes upregulates connective tissue growthfactor (CTGF/CCN2) expression. *Liver International*, 28(9),1207-1216.
57. Hanada, M., Maeda, Y. & Oikawa, M. (2014). Histopathological characteristics of endometriosis in thoroughbred mares in Japan: Results from 50 necropsy cases. *Journal of Equine Sciences*, 25(2), 45-52.
58. Harding, P. & LaPointe, M.C. (2011). Prostaglandin E2 increases cardiac fibroblast proliferation and increases cyclin D expression via EP1 receptor. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 84, 147 – 152.
59. Higgins, D.F., Biju, M.P., Akai, Y., Wutz, A., Johnson, R.S. & Haase, V.H. (2004). Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 287, F1223-F1232.
60. Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., De Wever, O., Mareel, M. & Gabbiani, G. (2012). Review: Recent developments in myofibroblast biology-Paradigms for connective tissue remodelling. *The American Journal of Pathology*, 180(4), 1340-1355.
61. Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R.C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B. & Schoon, H.-A. (2009a). The equine endometriosis: New insights into the pathogenesis. *Animal Reproduction Science*, 111, 261–278.

62. Hoffmann, C., Bazer, F.W., Klug, J., Aupperle, H., Ellenberger, C. & Schoon, H.-A. (2009b). Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium Expression patterns for mares suffering from endometriosis. *Theriogenology*, 71, 264–274.
63. Holmes, A., Abraham, D.J., Sa, S., Shiwen, X., Black, C.M. & Leask, A. (2001). CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signalling. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (14), 10594-10601.
64. Huang, S.K., Wettlaufer, S.H., Hogaboam, C.M., Flaherty, K.R., Martinez, F.J., Myers, J.L., Colby, T.V., Travis, W.D., Toews, G.B. & Peters-Golden, M. (2008). Variable prostaglandin E2 resistance in fibroblasts from patients with usual interstitial pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177, 66 – 74.
65. Huang, S.K., White, E.S., Wettlaufer, S.H., Grifka, H., Hogaboam, C.M., Thannickal, V.J., Horowitz, J.C. & Peters-Golden, M. (2009). Prostaglandin E2 induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival pathways. *The FASEB Journal*, 23, 4317 – 4326.
66. Inman, G.J., Nicolás, F.J., Callahan, J.F., Harling, J.D., Gaster, L.M., Reith, A.D., Laping, N.J. & Hill, C.S. (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of Transforming Growth Factor- $\beta$  superfamily type I Activin Receptor-Like Kinase (ALK) receptors *ALK4*, *ALK5*, and *ALK7*. *Molecular Pharmacology*, 62(1), 65-74.
67. Inoue, Y., Ito, K., Terada, T., Nishimura, N., Hatazoe, T. & Sato, K. (2000). Degenerative changes in the endometrial vasculature of the mare detected by videoendoscopic examination. *Proceedings of the 46<sup>th</sup> American Association of Equine Practitioners (AAEP) Annual Convention*, Estados Unidos da América, 26 – 29, November, IVIS: 46, 325-329.
68. Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M.-J. & ten Dijke, P. (2000). Mini review: Signaling of transforming growth factor- $\beta$  family members through Smad proteins. *European Journal of Biochemistry*, 267, 6954-6967.
69. Itoh, S. & ten Dijke, P. (2007). Review: Negative regulation of TGF- $\beta$  receptor/Smad signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 19, 176–184.
70. Jones, R.L., Salamonsen, L.A., Zhao, Y.C., Ethier, J.-F., Drummond, A.E. & Findlay, J.K. (2002). Expression of activin receptors, follistatin and betaglycan by human endometrial stromal cells; consistent with a role for activins during decidualization. *Molecular Human Reproduction*, 8 (4), 363 – 374.
71. Jones, R.L., Stoikos, C., Findlay, J.K., & Salamonsen, L.A. (2006). Review: TGF- $\beta$  superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction*, 132, 217–232.
72. Jörnvall, H., Blokzijl, A., ten Dijke, P. & Ibáñez, C. (2001). The orphan receptor serine/threonine kinase *ALK7* signals arrest of proliferation and morphological differentiation in a neuronal cell line. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (7), 5140-5146.
73. Junqueira, L.C & Carneiro, J. (2008). *Histologia Básica*. (11ªEdição). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.
74. Kalinski, P. (2012). Review: Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *The Journal of Immunology*, 188, 21 – 28.
75. Kalluri, R. & Weinberg, R.A. (2009). Review series: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119, 1420–1428.
76. Kayis, S.A., Atli, M.O., Kurar, E., Bozkaya, F., Semacan, A., Aslan, S. & Guzeloglu, A. (2011). Rating putative housekeeping genes for quantitative gene expression analysis in cyclic and pregnant equine endometrium. *Animal Reproduction Science*, 125, 124 – 132.
77. Keith, L., Ball, B.A., Scoggin, K., esteller-Vico, A., Woodward, E.M., Troedsson, M.H.T. & Squires, E.L. (2013). Diestrus administrations of oxytocin prolongs luteal maintenance and reduces

- plasma PGFM concentrations and endometrial Cox-2 expression in mares. *Theriogenology*, 79, 616–624.
78. Kelber, J.A., Shan, G., Booker, E.C., Vale, W.W. & Gray, P.C. (2008). Cripto is a noncompetitive activin antagonist that forms analogous signaling complexes with activin and nodal. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 4490-4500.
  79. Keller, A., Neves, A.P., Aupperle, H., Steiger, K., Garbade, P., Schoon, H.-A., Klug, E. & Mattos, R.C. (2006). Repetitive experimental bacterial infections do not affect the degree of uterine degeneration in the mare. *Animal Reproduction Science*, 94, 276–279.
  80. Kenney, R.M. (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 172(3), 241-262.
  81. Kim, B.-C., van Gelder, H., Kim, T.A., Lee, H.-J., Baik, K.G., Chun, H.H., Lee, D.A., Choi, K.S. & Kim, S.-J. (2004). Activin Receptor-like Kinase-7 induces apoptosis through activation of MAPKs in a Smad3-dependent mechanism in hepatoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (27), 28458–28465.
  82. Kim, M.R., Park, D.W., Lee, J.h, Choi, D.S., Hwang, K.J., Ryu, H.S. & Min, C.K. (2005). Progesterone-dependent release of transforming growth factor-beta1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells. *Molecular Human Reproduction*, 11(11), 801–808.
  83. Koinuma, D., Shinozaki, M., Komuro, A., Goto, K., Saitoh, M., Hanyu, A., Ebina, M., Nukiwa, T., Miyazawa, K., Imamura, T. & Miyazono, K. (2003). Arkadia amplifies TGF- $\beta$  superfamily signalling through degradation of Smad7. *The EMBO Journal*, 22(24), 6458-6470.
  84. Kumar, A., Novoselov, V., Celeste, A.J., Wolfman, N.M., ten Dijke, P. & Kuehn, M.R. (2001). Nodal signaling uses Activin and Transforming growth factor- $\beta$  receptor-regulated Smads. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (1), 656-661.
  85. Leask, A. & Abraham, D.J. (2004). TGF- $\beta$  signalling and the fibrotic response. *The FASEB Journal*, 18, 816 – 827.
  86. LeBlanc, M.M. & Causey, R.C. (2009). Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both Threats to Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3),10-22.
  87. Lee, C.G., Homer, R.J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang, X., Koteliensky, V. Shipley, J.M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., Senior, R.M. & Elias, J.A. (2001). Interleukin-13 Induces Tissue Fibrosis by Selectively Stimulating and Activating Transforming Growth Factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(6), 809-821.
  88. Lehmann, J., Ellenberger, C., Hoffmann, C., Bazer, F.W., Klug, J., Allen, W.R., Sieme, H. & Schoon, H.-A. (2011). Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. *Theriogenology*, 76, 1326 –1336.
  89. Li, W., Zhao, J., Liu, L., Wang, Z., Han, L., Zhong, M., Zhang, Y., Zhang, W. & Tang, M. (2015). Silencing of activin receptor-like kinase 7 alleviates aortic stiffness in type 2 diabetic rats. *Acta Diabetologica*, 52(4), 717-726.
  90. Lin, X., Duan, X., Liang, Y.-Y., Su, Y., Wrighton, K.H., Long, J., Hu, M., Davis, C.M., Wang, J., Brunicardi, F.C., Shi, Y., Chen, Y.-G., Meng, A. & Feng, X.-H. (2006). PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGF $\beta$  signaling. *Cell*, 125, 915–928.
  91. Liu, P.-P., Chang, H.-M., Cheng, J.-C. & Leung, P.C.K. (2016). Activin A upregulates PTGS2 expression and increases PGE2 production in human granulosa-lutein cells. *The Journal of the Society for Reproduction*, 152, 655-664.
  92. Lukasik, K., Gola, B., Ferreira-Dias, G. & Skarzynski, D. (2010). Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2 $\alpha$</sub>  on progesterone production of equine corpus luteum cells [abstract]. *Proceedings of the 14<sup>th</sup>*

*Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) and the 22th Annual Meeting of European AI-Vets, Hungria, 15 – 18 September, Reproduction in Domestic Animals, 47 (4):e62, 67.*

93. Makino, H., Tanaka, I., Mukoyama, M., Sugawara, A., mori, K., Muro, S., Suganami, T., Yahata, K., Ishibashi, R., Ohuchida, S., Maruyama, T., Narumiya, S. & Nakao, K. (2002). Prevention of diabetic nephropathy in rats by prostaglandin E receptor EP1-selective antagonist. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13, 1757 – 1765.
94. Maroni, D. & Davis, J.S. (2012). Transforming Growth Factor Beta 1 stimulates profibrotic activities of luteal fibroblasts in cows. *Biology of Reproduction*, 87(5):127, 1–11.
95. Mavrakis, K.J., Andrew, R.L., Lee, K.L., Petropoulou, C., Dixon, J.E., Navaratnam, N., Norris, D.P. & Episkopou, V. (2007). Arkadia enhances Nodal/TGF- $\beta$  signaling by coupling phospho-Smad2/3 activity and turnover. *PLoS Biology*, 5(3): e67, 586-603.
96. McCaffrey, T.A., Consigli, S., Du, B., Falcone, D.J., Sanborn, T.A., Spokojny, A.M. & Bush, H.L. (1995). Decreased Type II/Type I TGF- $\beta$ 1 receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions – Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF- $\beta$ 1. *The Journal of Clinical Investigation*, 96, 2667-2675.
97. Mezzano, S.A., Ruiz-Ortega, M. & Egido, J. (2001). Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension*, 38 (part2), 635 – 638.
98. Milne, S.A., Perchick, G.B., Boddy, S.C. & Jabbour, H.N. (2001). Expression, localization, and signalling of PGE2 and EP2/EP4 receptors in human nonpregnant endometrium across the menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86 (9), 4453 – 4459.
99. Mohamed, R., Jayakumar, C. & Ramesh, G. (2013). Chronic administration of EP4-selective agonist exacerbates albuminuria and fibrosis of the kidney in streptozocin-induced diabetic mice through IL-6. *Laboratory Investigation*, 93, 933 – 945.
100. Moodley, Y.P., Scaffidi, A.K., Misso, N.L., Keerthisingam, C., McAnulty, R.J., Laurent, G.J., Mutsaers, S.E., Thompson, P.J. & Knight, D.A. (2003). Fibroblasts isolated from normal lungs and those with idiopathic pulmonary fibrosis differ in Interleukin-6/gp130-mediated cell signaling and proliferation. *American Journal of Pathology*, 163 (1), 345–354.
101. Mori, Y., Chen, S.-J. & Varga, J. (2003). Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*, 48 (7), 1964-1978.
102. Myllärniemi, M., Tikkanen, J., Hulmi, J.J., Pasternack, A., Sutinen, E., Rönty, M., Leppäranta, O., Ma, H., Ritvos, O. & Koli, K. (2014). Upregulation of activin-B and follistatin in pulmonary fibrosis – a translational study using human biopsies and a specific inhibitor in mouse fibrosis models. *BMC Pulmonary Medicine*, 14, 170.
103. Mylonas, I., Jeschke, U., Wiest, I., Hoeing, A., Vogl, J., Shabani, N., Kuhn, C., Schulze, S., Kupka, M.S. & Friese, K. (2004). Inhibin/activin subunits alpha, beta-A and beta-B are differentially expressed in normal human endometrium throughout the menstrual cycle. *Histochemistry and Cell Biology*, 122, 461 – 471.
104. Nadeem, L., Munir, S., Fu, G., Dunk, C., Baczyk, D., Caniggia, I., Lye, S. & Peng, C. (2011). Nodal signals through Activin Receptor-Like Kinase 7 to inhibit trophoblast migration and invasion - Implication in the pathogenesis of preeclampsia. *The American Journal of Pathology*, 178(3), 1177-1189.
105. Nasrallah, R., Hassouneh, R. & Hébert, R.L. (2014). Review: Chronic kidney disease: targeting prostaglandin E2 receptors. *American Journal of Physiology – Renal Physiology*, 307, F243 – F250.
106. Nüsing, R.M. & Barsig, J. (1999). Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A. *British Journal of Pharmacology*, 127, 919-926.

107. Oga, T., Matsuoka, T., Yao, C., nonomura, K., kitaoka, S., Sakata, D., Kita, Y., Tanizawa, K., Taguchi, Y., Chin, K., Mishima, M., Shimizu, T. & Narumiya, S. (2009). Prostaglandin F2 $\alpha$  receptor signalling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of transforming growth factor- $\beta$ . *Nature Medicine*, 15, 1426.
108. Ogawa, K., Funaba, M., Chen, Y. & Tsujimoto, M. (2006). Activin A functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of Macrophages1. *The Journal of Immunology*, 177, 6787-6794.
109. Olman, M.A. (2009). Beyond TGF- $\beta$ : a prostaglandin promotes fibrosis. *Nature Medicine*, 15(12), 1360-1361.
110. Pannu, J., Gore-Hyer, E., Yamanaka, M., Smith, E.A., Rubinchik, S., Dong, J.-Y., Jablonska, S., Blaszczyk, M. & Trojanowska, M. (2004). An increased Transforming Growth Factor  $\beta$  receptor Type I:Type II ratio contributes to elevated collagen protein synthesis that is resistant to inhibition via a kinase-deficient Transforming Growth Factor  $\beta$  receptor type II in scleroderma. *Arthritis & Rheumatism*, 50 (5), 1566-1577.
111. Papageorgiou, I., Nicholls, P.K., Wang, F., Lackmann, M., Mankanji, Y., Salamonsen, L.A., Robertson, D.M. & Harrison, C.A. (2009). Expression of nodal signalling components in cycling human endometrium and in endometrial cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7, 122.
112. Park, C.B. & Dufort, D. (2011). Nodal expression in the uterus of the mouse is regulated by the embryo and correlates with implantation. *Biology of Reproduction*, 84, 1103-1110.
113. Park, C.B. & Dufort, D. (2013). Review: NODAL signaling components regulate essential events in the establishment of pregnancy. *Reproduction*, 145, R55–R64.
114. Pauklin, S. & Vallier, L. (2015). Activin/Nodal signalling in stem cells. *The Company of Biologists*, 142, 607-619.
115. Petersen, M., Thorikay, M., Deckers, M., van Dinther, M., Grygielko, E.T., Gellibert, F., de Gouville, A.C., Huet, S., ten Dijke, P. & Laping, N.J. (2008). Oral administration of GW788388, an inhibitor of TGF- $\beta$  type I and II receptor kinases, decreases renal fibrosis. *Kidney International*, 73, 705–715.
116. Pohlers, D., Brenmoehl, J., Löffler, I., Müller, C.K., Leipner, C., Schultze-Mosgau, S., Stallmach, A., Kinne, R.W. & Wolf, G. (2009). Review: TGF- $\beta$  and fibrosis in different organs – molecular pathways imprints. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792, 746 – 756.
117. Rebordão, M.R., Carneiro, C., Alexandre-Pires, G., Brito, P., Pereira, C., Nunes, T., Galvão, A., Leitão, A., Vilela, C. & Ferreira-Dias, G. (2014a). Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *Journal of Reproductive Immunology*, 106, 41-49.
118. Rebordão, M.R., Galvão, A.M., Szóstek, A.Z., Amaral, A., Mateus, L., Skarzynski, D.J. & Ferreira-Dias, G. (2014b). Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(4), 82-87.
119. Rebordão, M.R., Amaral, A., Galvão, A., Szóstek, A.Z., Pinto-Bravo, P., Skarzynski, D.S. & Ferreira-Dias, G. (2016). Dual effect of hormones on mare reproductive physiology and dysfunction. *Pferdeheilkunde*, 32, 36-38
120. Reilas, T., Rivera del Alamo, M.M., Liepina, E., Yeste, M. & Katila, T. (2016). Effects on the equine endometrium of cervical occlusion after insemination. *Theriogenology*, 85, 617–624.
121. Reissmann, E., Jörnvall, H., Blokijl, A., Andersson, O., Chang, C., Minchiotti, G., Persico, M.G., Ibáñez, C.F. & Brivanlou, A.H. (2001). The orphan receptor *ALK7* and the Activin receptor *ALK4* mediate signaling by Nodal proteins during vertebrate development. *Genes & Development*, 15, 2010-2022.

122. Renlund, N., O'Neill, F.H., Zhang, L., Sidis, Y. & Teixeira, J. (2007). Activin receptor-like kinase-2 inhibits activin signaling by blocking the binding of activin to its type II receptor. *Journal of Endocrinology*, 195, 95–103.
123. Roberto da Costa, R.P., Serrão, P.M., Monteiro, S., Pessa, P., Ferreira-Dias, G. (2007). Caspase-3 mediated apoptosis and cell proliferation in the equine endometrium during the oestrus cycle. *Reproduction, Fertility and Development*, 19 (8), 925 – 932.
124. Roberto da Costa, R., Costa, A.S., Korzekwa, A.J., Platek, R., Siemieniuch, M., Galvão, A., Redmer, D.A., Silva, J.R., Skarzynski, D.J. & Ferreira-Dias, G. (2008). Actions of a nitric oxide donor on prostaglandin production and angiogenic activity in the equine endometrium. *Reproduction, Fertility and Development*, 20, 674 – 6983.
125. Roberts, A.B., Tian, F., Byfield, S.D., Stuelten, C., Ooshima, A., Saika, S. & Flanders, K.C. (2006). Smad3 is key to TGF- $\beta$ -mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 17, 19–27.
126. Roberts, H.J., Hu, S., Qiu, Q., Leung, P.C.K., Caniggia, I., Gruslin, A., Tsang, B. & Peng, C. (2002). Identification of novel isoforms of Activin Receptor-Like Kinase 7 (*ALK7*) generated by alternative splicing and expression of *ALK7* and its ligand, Nodal, in human placenta. *Biology of Reproduction*, 68, 1719-1726.
127. Rodríguez-Barbero, A., Dorado, F., Velasco, S., Pandiella, A., Banas, B. & López-Novoa, J.M. (2006). TGF- $\beta$ 1 induces COX-2 expression and PGE2 synthesis through MAPK and PI3K pathways in human mesangial cells. *Kidney International*, 70, 901–909.
128. Roulot, D., Sevcik, A.-M., Coste, T., Strosberg, A.D. & Marullo, S. (1999). Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  type II receptor in hepatic fibrosis: Studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats. *Hepatology*, 29, 1730-1738.
129. Sampath, K., Robertson, E.J. (2016). Keeping a lid on nodal: transcriptional and translational repression of nodal signalling. *Open Biology*, 6:150200.
130. Sato, M., Hirayama, S., Lara-Guerra, H., Anraku, M., Waddell, T.K., Liu, M. & Keshavjee, S. (2009). MMP-dependent migration of extrapulmonary myofibroblast progenitors contributing to posttransplant airway fibrosis in the lung. *American Journal of Transplantation*, 9, 1027 – 1036.
131. Schier, A.F. (2009). Nodal Morphogens. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1:a003459.
132. Schoon, H.-A., Schoon, D., Wiegandt, I., Bartmann, C.-P. & Aupperle, H. (1999). “Endometrial maldifferentiation”- A clinically significant diagnosis in equine reproduction?. *Pferdeheilkunde*, 5 (6), 555-559.
133. Schoon, H.-A & Schoon, D. (2003). The Category I mare (Kenney and Doig 1986): Expected foaling rate 80-90% - fact or fiction?. *Pferdeheilkunde*, 19 (6), 698-701.
134. Shao, D.D., Suresh, R., Vakil, V., Gomer, R.H. & Pilling, D. (2008). Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. *Journal of Leukocyte Biology*, 83, 1323-1333.
135. Shen, M.M. (2007). Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development*, 134, 1023-1034.
136. Shen, N., Lin, H., Wu, T., Wang, D., Wang, W., Xie, H., Zhang, J. & Feng, Z. (2013). Inhibition of TGF- $\beta$ 1-receptor posttranslational core fucosylation attenuates rat renal interstitial fibrosis. *Kidney International*, 84, 64–77.
137. Shi, Y. & Massagué, J. (2003). Review: Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113, 685-700.
138. Silva, E.S.M., Scoggin, K.E., Canisso, I.F., Troedsson, M.H.T., Squires, E.L. & Ball, B.A. (2014). Expression of receptors for ovarian steroids and prostaglandin E2 in the endometrium and

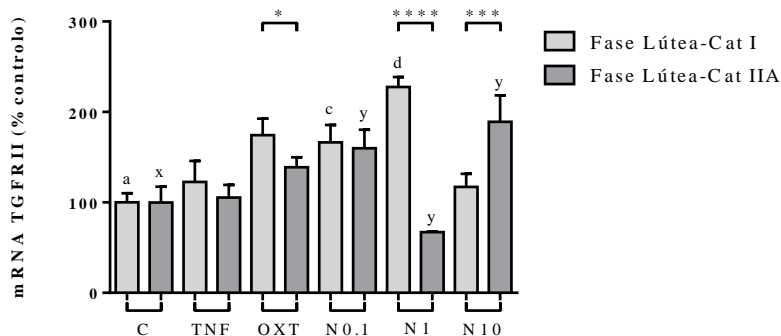
- myometrium of mares during estrus, diestrus and early pregnancy. *Animal Reproduction Science*, 151 (3-4), 169 – 181.
139. Smoktunowicz, N., Alexander, R.E., Franklin, L., Williams, A.E., Holman, B., Mercer, P.F., Jarai, G., Scotton, C.J. & Chambers, R.C. (2015). The anti-fibrotic effect of inhibition of TGF $\beta$ -ALK5 signalling in experimental pulmonary fibrosis in mice is attenuated in the presence of concurrent  $\gamma$ -herpesvirus infection. *The Company of Biologists*, 8, 1129-1139.
  140. Snider, T.A., Sepoy, C. & Holyoak, G.R. (2011). Review: Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology*, 75, 1567–1581.
  141. Sugimoto, Y. & Narumiya, S. (2007). Minireview: Prostaglandin E receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (16), 11613 – 11617.
  142. Sullivan, D.E., Ferris, M., Nguyen, H., Abboud, E. & Brody, A.R. (2009). TNF- $\alpha$  induces TGF- $\beta$ 1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13 (8B), 1866 – 1876.
  143. Stout, T.A.E. & Allen, W.R. (2002). Prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2 $\alpha$</sub>  production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *Reproduction*, 123, 261 – 268.
  144. Szóstek, A.Z., Siemieniuch, M.J., Lukasik, K., Galvão, A.M., Ferreira-Dias, G.M. & Skarzynski, D.J. (2012). mRNA transcription of prostaglandin synthases and their products in the equine endometrium in the course of fibrosis. *Theriogenology*, 78, 768–776.
  145. Szóstek A.Z., Lukasik, K., Galvão, A.M., Ferreira-Dias, G.M. & Skarzynski, D.J. (2013). Impairment of the interleukin system in equine endometrium during the course of endometrosis. *Biology of Reproduction*, 89(4):79, 1-13.
  146. Szóstek, A.Z., Galvão, A.M., Ferreira-Dias, G.M. & Skarzynski, D.J. (2014a). Ovarian steroids affect prostaglandin production in equine endometrial cells in vitro. *Journal of Endocrinology*, 220 (3), 263–276.
  147. Szóstek, A.Z., Adamowski, M., Galvão, A.M., Ferreira-Dias, G.M. & Skarzynski, D.J. (2014b). Ovarian steroid-dependent tumor necrosis factor- $\alpha$  production and its action on the equine endometrium *in vitro*. *Cytokine*, 67, 85 – 91.
  148. Szóstek, A.Z., Okuda, K., Szarzynski, D. (2016). The role of proinflammatory cytokines in the progression of equine endometrosis [abstract]. In H. Rodriguez-Mártinez & G. Opsomer (Eds). *Proceedings of the 20th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) and the 13th Conference of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA)*, Portugal, 27 – 29 October, *Reproduction in Domestic Animals*, 51 (2), 145.
  149. Ten Dijke, P. & Hill, C.S. (2004). Review: New insights into TGF- $\beta$ -Smad signalling. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(5), 265-273.
  150. Tian, M. & Schiemann, W.P. (2010). PGE2 receptor EP2 mediates the antagonistic effect of COX-2 on TGF- $\beta$  signalling during mammary tumorigenesis. *The FASEB Journal*, 24, 1105 – 1116.
  151. Tojo, M., Hamashima, Y., Hanyu, A., Kajimoto, T., Saitoh, M., Miyazono, K., Node, M. & Imamura, T. (2005). The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signalling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor- $\beta$ . *Cancer Science*, 96 (11), 791– 800.
  152. Torres, P.B., Florio, P., Galleri, L., Reis, F.M., Borges, L.E. & Petraglia, F. (2009). Activin A, Activin Receptor Type II, Nodal, and Cripto mRNA are expressed by eutopic and ectopic endometrium in women with ovarian endometriosis. *Reproductive Sciences*, 16 (8), 727-733.
  153. Tsuchida, K., Nakatani, M., Yamakawa, N., Hashimoto, O., Hasegawa, Y. & Sugino, H. (2004). Activin isoforms signal through type I receptor serine/threonine kinase ALK7. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 220, 59–65.



154. Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L. & Wrana, J.L. (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF $\beta$  receptor. *Cell*, 95, 779-791.
155. Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C.-H. & Moustakas, A. (2005). TGF- $\beta$  and the Smad signalling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 1987 – 2002.
156. Vanderwall, D.K., Woods, G.L., Weber, J.A. & Lichtenwalner, A.B. (1994). Corpus luteal function in nonpregnant mares following intrauterine administration of prostaglandin E<sub>2</sub> or estradiol-17 $\beta$ . *Theriogenology*, 42, 1069 – 1083.
157. Van Ly, D., Burgess, J.K., Brock, T.G., Lee, T.H., Black, J.L. & Oliver, B.G. (2012). Prostaglandins but not leukotrienes alter extracellular matrix protein deposition and cytokine release in primary human airway smooth muscle cells and fibroblasts. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303, L239 – L250.
158. Verrecchia, F. & Mauviel, A. (2004). Review: TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$ : antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. *Cellular Signalling*, 16, 873 – 880.
159. Verrecchia, F. & Mauviel, A. (2007). Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*. 13 (22), 3056 – 3062.
160. Vi, L., Boo, S., Sayedyahosseini, S., Singh, R.K., McLean, S., Di Guglielmo, G.M. & Dagnino, L. (2015). Modulation of type II TGF- $\beta$  receptor degradation by Integrin-Linked Kinase. *Journal of Investigative Dermatology*, 135, 885–894.
161. Voloshenyuk, T.G., Hart, A.D., Khoutorova, E. & Gardner, J.D. (2011). TNF- $\alpha$  increases cardiac fibroblast lysyl oxidase expression through TGF- $\beta$  and PI3Kinase signalling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413, 370 – 375.
162. Volpi, A. (2013). *Ruolo di Nodale e dei principal recettori associati (ALK-4 e ALK-7) nella fibrosi dell's endométrio della cavalla: uno studio preliminare*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Pádova: Università Degli studi di Padova. Dipartimento de Medicina Animale, Produzione e Salute.
163. Vukicevic, S., Simic, P., Borovecki, F., Grgurevic, L., Rogic, D., Orlic, I., Grasser, W.A., Thompson, D.D. & Paralkar, V.M. (2006). Role of EP2 and EP4 receptor-selective agonists of prostaglandin E2 in acute and chronic kidney failure. *Kidney International*, 70, 1099 – 1106.
164. Wajant, H., Pfizenmaier, K & Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signalling. *Cell Death and Differentiation*, 10, 45 – 65.
165. Walter, I., Handler, J., Miller, I. & Aurich, C. (2005). Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue transglutaminase (TG 2) are expressed in periglandular fibrosis in horse mares with endometriosis. *Histology and Histopathology*, 20, 1105-1113.
166. Walter, I., Handler, J., Reinfinger, M. & Aurich, C. (2001b). Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction*, 121, 581–586.
167. Walter, I., Helmreich, M., Handler, J. & Aurich, C. (2003). Mineralised deposits in the uterine glands of mares with chronic endometrial degeneration. *Veterinary Record*, 153, 708-710.
168. Walter, I., Klein, M., Handler, J., Aurich, J.E., Reifinger, M. & Aurich, C. (2001a). Lectin binding patterns of uterine glands in mares with chronic endometrial degeneration. *American journal of Veterinary Research*, 62(6), 840-845.
169. Wang, H., Jiang, J.-Y., Peng, C. & Tsang, B.K. (2006). Role and regulation of Nodal/Activin receptor-Like Kinase 7 signaling pathway in the control of ovarian follicular atresia. *Molecular Endocrinology*, 20(10), 2469–2482.

170. Wang, X., McLennan, S.V., Allen, T.J. & Twigg, S.M. (2010). Regulation of pro-inflammatory and pro-fibrotic factors by CCN2/CTGF in H9c2 cardiomyocytes. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 4, 15 – 23.
171. Wang, X.-F., Wang, H.-S., Zhang, F., Guo, Q., Wang, H., Wang, K.-F., Zhang, G., Bu, X.-Z., Cai, S.-H. & Du, J. (2014). Nodal promotes the generation of M2-like macrophages and downregulates the expression of IL-12. *European Journal of Immunology*, 44, 173–183.
172. Watson, E.D. & Sertich, P.L. (1989). Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnant mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87, 331 – 336.
173. Weiskirchen, R. & Meurer, S.K. (2013). BMP-7 counteracting TGF-beta1 activities in organ fibrosis. *Frontiers in Bioscience*, 18, 1407 – 1434.
174. Werner, S. & Alzheimer, C. (2006). Survey: Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 17, 157–171.
175. White, K.E., Ding, Q., Moore, B.B., Peters-Golden, M., Ware, L.B., Matthay, M.A. & Olman, M.A. (2008). Prostaglandin E2 mediates IL-1 $\beta$ -related fibroblast mitogenic effects in acute lung injury through differential utilization of prostanoid receptors. *The Journal of Immunology*, 180, 637 – 646.
176. Wong, M.L. & Medrano, J.F. (2005). Review: Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39, 75 – 85.
177. Woodward, E.M. & Troedsson M.H. (2015). Inflammatory mechanisms of endometritis: Review. *Equine Veterinary Journal*, 47, 384–389.
178. Wu, M.Y. & Hill, C.S. (2009). Review: TGF- $\beta$  Superfamily signalling in embryonic development and homeostasis. *Developmental Cell*, 16, 329 – 343.
179. Wynn, T.A. (2004). Review: Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. *Nature Reviews Immunology*, 4(8), 583 – 594.
180. Wynn, T.A. & Barron, L. (2010). Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Seminars in Liver Disease*, 30 (3), 245 – 257.
181. Wynn, T.A. & Ramalingam, T.R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease -a Review. *Nature Medicine*, 8(7), 1028 – 1040.
182. Yamanouchi, K., Hirasawa, K., Hasegawa, T., Ikeda, A., Chang, K.-T., Matsuyama, S., Nishihara, M., Miyazawa, K., Sawasaki, T., Tojo, H., Tachi, C., & Takashi, M. (1997). Equine Inhibin/Activin $\beta$ A Subunit mRNAs expressed in the endometrial gland, but not in the trophoblast, during pregnancy. *Molecular Reproduction and Development*, 47, 363 – 369.
183. Yan, Y.-T., Liu, J.-J., Luo, Y., Chaosu, E., Haltiwanger, R.S., Abate-Shen, C. & Shen, M.M. (2002). Dual roles of Cripto as a ligand and coreceptor in the Nodal signalling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 22 (13), 4439 – 4449.
184. Yeo, C.-Y. & Whitman, M. (2001). Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. *Molecular Cell*, 7(5), 949 – 957.
185. Yu, J., Prado, G.N., Schreiber, B., Polgar, P. & Taylor, L. (2002). Role of prostaglandin E2 receptors and cAMP in the expression of connective tissue growth factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 404, 302 – 308.
186. Yu, L., Border, W.A., Huang, Y. & Noble, N.A. (2003). TGF- $\beta$  isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney International*, 64, 844 – 956.
187. Zhao, S. & Fernald, R.D. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology*, 12(8), 1047 – 1064.

## Anexo 1



**Figura A. Quantificação relativa da expressão de mRNA de *TGFRII* por qRT-PCR, em endométrio equino, na fase lútea, em endométrios de categoria I e IIA.** Os gráficos representam a quantificação da expressão, relativamente ao controlo de cada grupo representado (% controlo). Os dados foram normalizados com o gene de housekeeping ou gene constitutivo *MRPL32*. As barras representam média±DP. A significância estatística é representada por asteriscos quando em relação a categorias diferentes (\* = $p < 0.05$ ; \*\*\*= $p < 0.001$ ; \*\*\*\*= $p < 0.0001$ ); e por letras, quando em relação ao controlo, em endométrios de categoria I representado por “a” e em endométrios de categoria IIA por “x”, em que “c”= $p < 0.01$  e “d”= $p < 0.001$ ; “y”= $p < 0.05$ , respetivamente.