

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE VETERINARIE

E

DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA, PATOLOGIA COMPARATA E IGIENE VETERINARIA

TESI DI LAUREA

**ESPRESSIONE DELLE METALLOPROTEASI 2, 9, 14 E DELL'INIBITORE
TISSUTALE DELLE METALLOPROTEASI 2 (TIMP-2) NELLE CAVALLE
CON ENDOMETRIOSI**

Relatore: **dott.ssa Maria Elena FALOMO**

Correlatore: **dott. Luca ARESU**

Laureanda: **Diana GIANNUZZI**

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

SOMMARIO

SOMMARIO	III
1 INTRODUZIONE	7
1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DELL'UTERO EQUINO.....	7
1.1.1 <i>Anatomia macroscopica</i>	7
1.1.2 <i>Struttura istologica</i>	8
1.1.2.1 Endometrio.....	8
1.1.2.2 Miometrio.....	9
1.1.2.3 Perimetrio.....	9
1.1.3 <i>Alterazioni fisiologiche dell'endometrio in relazione al ciclo estrale</i>	10
1.2 ENDOMETRIOSI.....	13
1.2.1 <i>Primi studi</i>	13
1.2.2 <i>Eziologia</i>	13
1.2.3 <i>Definizione e classificazione</i>	14
1.2.3.1 <i>Classificazione di Kenney e Doig (1986)</i>	14
1.2.4 <i>Patogenesi</i>	15
1.2.5 <i>Tecniche diagnostiche</i>	16
1.3 LE METALLOPROTEASI.....	17
1.3.1 <i>Le metalloproteasi (MMP)</i>	17
1.3.2 <i>Struttura e attivazione</i>	19
1.3.2.1 <i>Attivazione di MMP-2 e MMP-9</i>	20
1.3.3 <i>Gli inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMP): TIMP-2</i>	22
1.3.4 <i>Ruolo delle MMP</i>	22
1.3.5 <i>MMP nel cavallo</i>	25
1.3.6 <i>MMP nella fibrosi</i>	26
2 OBIETTIVI	28
3 MATERIALI E METODI	29
3.1 CAMPIONAMENTO.....	29
3.2 ISTOLOGIA.....	29

3.2.1	<i>Processazione dei campioni</i>	29
3.2.1.1	Ematossilina-Eosina	30
3.2.1.2	Tricromica di Masson	30
3.2.2	<i>Classificazione istologica dei campioni</i>	31
3.3	INDAGINE IMMUNOISTOCHEMICA	40
3.3.1	<i>Valutazione immunoistochimica</i>	42
3.4	ANALISI STATISTICHE	42
4	RISULTATI E DISCUSSIONE	43
4.1	VALUTAZIONE E CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA	44
4.2	ANALISI STATISTICHE	47
4.2.1	ANOVA	47
4.2.2	<i>Test di correlazione di Pearson</i>	49
4.2.3	<i>Test del χ^2</i>	53
4.3	INDAGINE IMMUNOISTOCHEMICA	56
4.3.1	<i>MMP-2, MMP-14 e TIMP-2</i>	57
4.3.2	<i>MMP-9</i>	63
5	CONCLUSIONI	65
	APPENDICE	68
	BIBLIOGRAFIA	72

1 INTRODUZIONE

1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DELL'UTERO EQUINO

1.1.1 Anatomia macroscopica

Da un punto di vista embrionale, l'utero (in greco *metra*, *hystera*, in latino *uterus*) ha origine dai dotti di Müller. Le porzioni craniali dei dotti di Müller nei mammiferi domestici permangono separate, dando all'utero il tipico aspetto bicorni. L'utero pienamente sviluppato è quindi costituito dalle seguenti strutture:

- due corna uterine;
- un corpo uterino;
- una cervice uterina (o collo dell'utero).

Nella cavalla, l'utero è formato da un **corpo** ampio che si continua con le due **corna**, lunghe circa 25 cm. Le corna sono entrambe completamente contenute in cavità addominale, sono sospese sulla parete dorsale dell'addome per mezzo dei legamenti larghi e sono nettamente divergenti l'una dall'altra. Mentre le due estremità delle corna uterine sono rivolte cranio-dorsalmente verso i reni, la porzione caudale presenta una convessità ventrale che prende contatto con le anse intestinali. Il corpo uterino è più breve rispetto alle corna (intorno ai 20 cm) ed è contenuto parzialmente all'interno dell'addome e parzialmente nella pelvi. Quando l'utero è vuoto si ha la scomparsa del lume e si può osservare uno schiacciamento di corpo e corna in senso dorso-ventrale. Anche la **cervice** è piuttosto breve, ed è ben riconoscibile solo alla palpazione grazie alla consistenza maggiore rispetto al resto dell'utero; all'osservazione macroscopica invece risulta difficile individuarne estensione e posizione. La porzione caudale della cervice sporge nella vagina dove appare circondata da un solco anulare detto *fornice*. Questa porzione vaginale della cervice presenta un aspetto lobato per la presenza di pliche mucosali che rivestono il canale cervicale. Quest'ultimo ha origine all'interno della cavità del corpo uterino con l'*ostio uterino interno* e termina nell'*ostio uterino esterno*, localizzato appunto sulla porzione vaginale della cervice. Il canale cervicale, fatta eccezione per l'estro ed il momento del parto nei quali risulta pervio, è chiuso in maniera imperfetta dal secreto mucoso cervicale, tanto che è sufficiente una moderata pressione per introdurvisi. Durante la

gravidanza invece, il muco prodotto si condensa e forma il tappo cervicale (Dyce *et al.*, 2002; König *et al.*, 2002).

1.1.2 Struttura istologica

In sezione la parete uterina si compone di tre tonache, la cui denominazione assume particolare importanza ai fini della terminologia clinica.

Dall'interno verso l'esterno sono:

- tonaca mucosa (endometrio);
- tonaca muscolare (miometrio);
- tonaca sierosa (perimetrio).

Il perimetrio, lo strato longitudinale e lo strato vascolare del miometrio sono in continuità con strutture corrispondenti localizzate nel legamento largo dell'utero.

1.1.2.1 Endometrio

L'endometrio riveste il lume uterino ed è a sua volta costituito da più porzioni che differiscono tra loro per struttura e funzione. La **zona funzionale** è lo strato più superficiale e che degenera parzialmente o completamente dopo la gravidanza o dopo l'estro. Questa zona funzionale è costituita, nella sua porzione più superficiale, da un epitelio di rivestimento batiprismatico semplice o cubico semplice, dove l'altezza e la morfologia delle cellule sono legate per tutto il ciclo alla secrezione degli ormoni ovarici. La porzione sub-epiteliale è costituita da un abbondante strato di connettivo ricco di ghiandole tubulari semplici ramificate a decorso spiralato. L'epitelio ghiandolare è anch'esso batiprismatico e comprende cellule secernenti e cellule ciliate non secernenti. Sotto l'effetto degli estrogeni le ghiandole si accrescono e si ramificano; tuttavia la spiralizzazione e l'abbondante secrezione hanno avvio solamente per azione del progesterone. Questa porzione sub-epiteliale è inoltre fortemente vascolarizzata e ricca di macrofagi, mastociti e in misura minore neutrofili, eosinofili, linfociti e plasmacellule. In profondità, la quantità di cellule diminuisce. Si arriva quindi alla **zona basale**, che costituisce lo strato da cui si ripristina la zona funzionale. Risalendo all'interno della *lamina propria*, dopo lo strato basale incontriamo lo *strato spongioso* (contiene la porzione basale delle ghiandole) e quindi lo *strato compatto* (più superficiale); questi ultimi due sono gli strati che subiscono

evidenti rimaneggiamenti durante tutto il ciclo e che sono quindi in continuo rinnovamento (Delmann *et al.*, 1998).

1.1.2.2 Miometrio

Il miometrio è costituito da due strati: uno strato circolare interno ispessito ed uno strato longitudinale esterno formato da cellule muscolari lisce i quali vanno incontro ad ipertrofia ed iperplasia durante la gravidanza. Nella porzione profonda dello strato interno o, più frequentemente, tra i due strati, è disposta una zona vascolare composta da arterie, vene e vasi linfatici di grosso calibro.

1.1.2.3 Perimetrio

Il perimetrio è costituito da tessuto connettivo lasso e ricoperto da mesotelio peritoneale; possiamo ritrovare inoltre numerosi vasi linfatici e sanguigni, cellule muscolari lisce e fibre nervose. I nervi appartengono principalmente al sistema simpatico e provengono dai plessi uterino e pelvico, ramificandosi nelle tre tonache. Dal plesso pelvico proviene anche l'innervazione parasimpatica, fornita dai segmenti sacrali.

La cervice possiede caratteristiche istologiche nettamente differenti rispetto al resto dell'utero, presentando una parete muscolare ispessita ricca di fibre elastiche. La mucosa forma delle pieghe primarie, secondarie e terziarie. Le ghiandole uterine non si estendono nella cervice e le cellule secernenti dell'epitelio cervicale sono in prevalenza mucipare. Gli strati muscolari della cervice sono in continuità con quelli del corpo dell'utero e della vagina e la porzione intravaginale della cervice è quasi completamente costituita dallo strato muscolare circolare ispessito. Nella tonaca sierosa della cervice può essere presente un condotto longitudinale dell'*epooforon* (Delmann *et al.*, 1998).

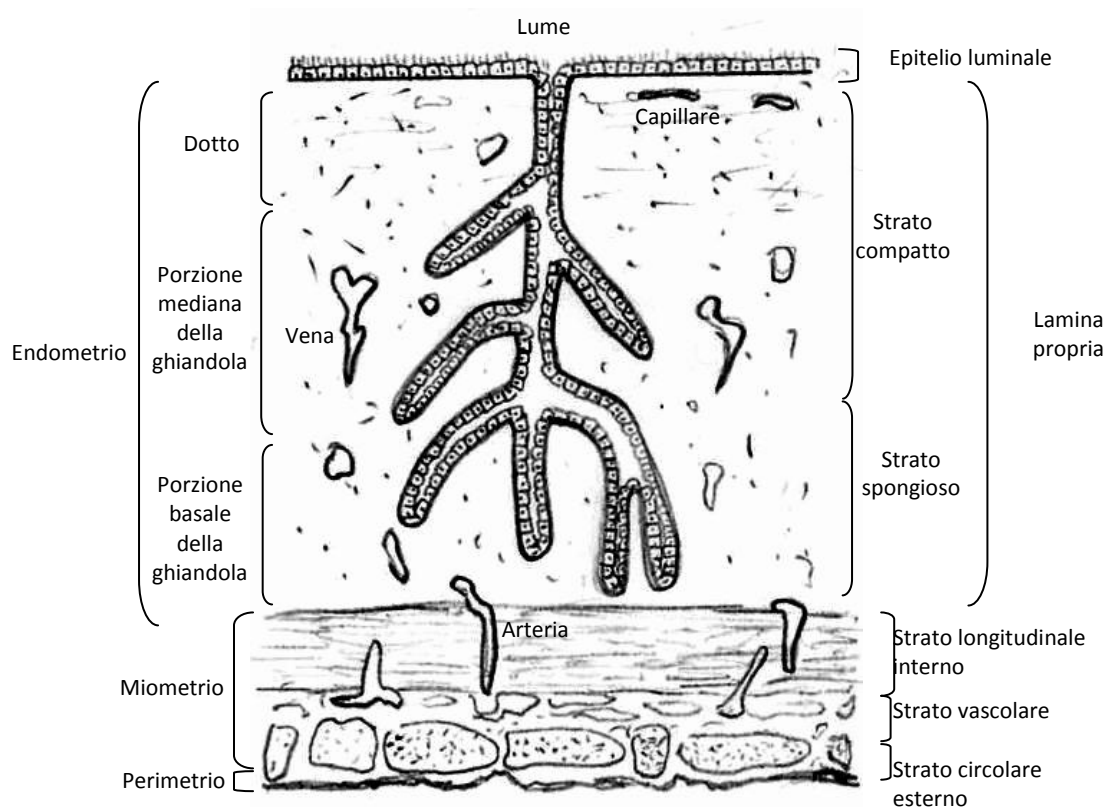


Figura 1. Struttura istologica dell'utero

1.1.3 Alterazioni fisiologiche dell'endometrio in relazione al ciclo estrale

La fisiologia dell'apparato riproduttore è strettamente correlata alla stagionalità. Il ciclo riproduttivo equino infatti è di tipo poliestrile stagionale a fotoperiodo positivo (Romagnoli *et al.*, 2008). Dopo il raggiungimento della pubertà intorno ai 2 anni e la conseguente attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi, sono le stagioni a scandire le varie fasi del ciclo. Il fotoperiodo calante determina un graduale arresto della produzione di GnRH, mentre il fotoperiodo crescente ne determina una graduale ripresa (Romagnoli *et al.*, 2008). Nell'emisfero boreale, quindi, la stagione riproduttiva fisiologica inizia in primavera e si estende fino al termine dell'estate, con un picco localizzabile al solstizio d'estate in giugno (Kenney e Doig, 1986). Questa rappresenta la fase attiva del ciclo, caratterizzata a sua volta da una fase follicolare (*proestro* ed *estro*) e una fase luteinica (*metaestro* e *diestro*). Prima e dopo la stagione riproduttiva abbiamo due periodi di transizione (primaverile e autunnale) e quindi una fase di inattività corrispondente al fotoperiodo calante, detta *anestro*. Anche l'endometrio, così come l'intero apparato riproduttore, assume caratteristiche istologiche differenti in base alla fase del ciclo

ovarico e alla funzione che deve espletare. In particolare, le modifiche endometriali sono il risultato dei diversi livelli degli ormoni ovarici (Kenney e Doig, 1986).

Durante l'anestros le ghiandole endometriali sono inattive. Le cellule dell'epitelio luminale e ghiandolare appaiono cuboidali o squamose e presentano un aumento della basofilia citoplasmatica. Il diametro delle ghiandole in sezione trasversale appare diminuito e in sezione longitudinale le ghiandole appaiono sottili e lineari. Si possono osservare ghiandole non atrofiche sparse con epitelio colonnare basso. Allontanandosi dal lume, l'atrofia ghiandolare appare più pronunciata. E' possibile osservare la presenza di ghiandole sezionate trasversalmente associate l'una all'altra nelle aree più profonde dell'endometrio (Doig e Waelchli, 1993).

Le caratteristiche istologiche dell'endometrio in fase di transizione non sono chiaramente definite. Durante la transizione dall'anestros invernale al periodo di ciclicità, l'endometrio recupera gradualmente la sua funzionalità. Le cellule epiteliali luminali e ghiandolari spesso riflettono differenti gradi di funzionalità. Generalmente le ghiandole più superficiali sono le prime a rimettersi in attività e l'epitelio appare colonnare, mentre le ghiandole più in profondità continuano a presentare un epitelio basso (Doig e Waelchli, 1993).

Durante l'estro (fig. 2a), l'epitelio ghiandolare e luminale appare da colonnare a colonnare alto. A causa dell'altezza delle cellule epiteliali ghiandolari, in sezione trasversale le ghiandole appaiono con ampio diametro e in sezione longitudinale diritte e non tortuose. Le cellule dell'epitelio sono pallidamente colorate ed è abbastanza comune la presenza di vacuoli nella porzione basale dell'epitelio luminale. Nella lamina propria si può osservare la presenza di cellule polimorfonucleate attorno ai capillari sub-epiteliali e attorno alle venule ed un forte edema. In diestro (fig. 2b) invece, le cellule epiteliali variano da colonnari (se precedono la fase estrale) a cuboidali (se seguono la fase estrale). Le ghiandole appaiono tortuose e, in sezione longitudinale, assumono la tipica conformazione "a collana di perle" (Doig e Waelchli, 1993).

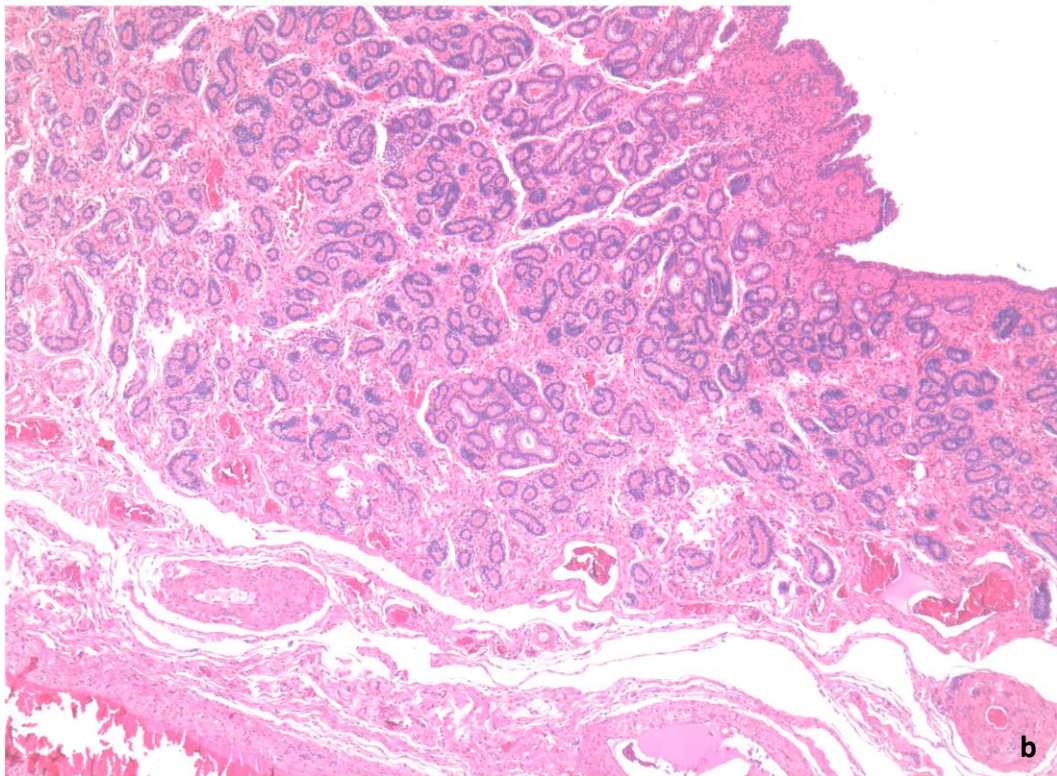
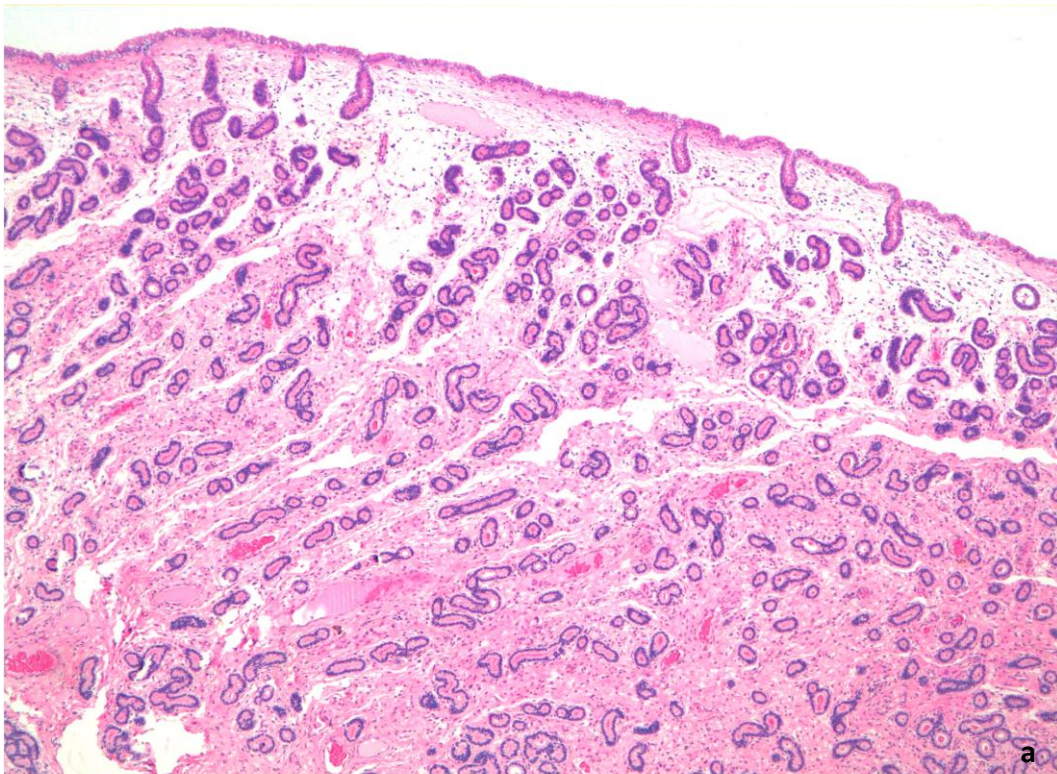


Figura 2a. Sezione endometriale di cavalla in diestro. Le cellule epiteliali luminali e ghiandolari sono colonnari basse. La tortuosità delle ghiandole conferisce la tipica conformazione “a collana di perle” (ematossilina-eosina, 5x).

Figura 2b. Sezione endometriale di cavalla in estro. Le cellule epiteliali luminali e ghiandolari sono colonnari alte e le ghiandole hanno un maggiore diametro in sezione rispetto alla fase diestrale. Le ghiandole non sono tortuose (ematossilina-eosina, 5x).

1.2 ENDOMETRIOSI

1.2.1 Primi studi

Le lesioni degenerative dell'endometrio si possono frequentemente ritrovare in cavalle con più di 10 anni d'età (Kenney, 1978; Kenney e Doig, 1986; Ricketts e Alonso, 1991). La degenerazione endometriale è stata associata a una diminuzione della fertilità ed è considerata un processo progressivo (Doig *et al.*, 1981; Ricketts e Alonso, 1991). In passato è stato proposto l'uso di un *curettaggio* chimico o meccanico per stimolare la crescita di nuovo tessuto endometriale sano (Ricketts, 1985). Questa tecnica non risulta però particolarmente efficace e può inoltre sfociare in un ampliamento del danno uterino (Davies Morel, 2008). Ad oggi, non sono presenti trattamenti efficaci per rinnovare l'endometrio degenerato o fermare il processo (Ley, 1994; Davies Morel, 2008). Nel corso degli anni, sono stati utilizzati diversi termini per definire questa patologia: endometrite cronica degenerativa (Kenney e Ganjam, 1975; Ricketts, 1975; Ricketts 1985), fibrosi endometriale (Doig *et al.*, 1981; Kenney e Doig, 1986) e malattia cronica endometriale (Ricketts e Alonso, 1991). Dal 1992 è stato definitivamente adottato il termine endometriosi, come proposto da Kenney (Flores *et al.*, 1995).

1.2.2 Eziologia

L'eziologia dell'endometriosi è largamente sconosciuta (Hoffmann *et al.*, 2009). In diversi studi l'età è risultata uno dei fattori determinanti l'insorgenza e il grado di gravità dell'endometriosi (Doig *et al.*, 1981; Ricketts e Alonso, 1991); tra gli altri fattori che contribuiscono alla degenerazione risultano importanti l'infiammazione cronica e i disturbi endocrini (Kenney e Ganjam, 1975). In particolare, la degenerazione endometriale può avere origine dalle reazioni infiammatorie ripetute (Troedsson, 1997). Ogni lesione che provoca una reazione infiammatoria può indurre fibrosi (Fiala *et al.*, 2010). Dopo l'insorgenza della lesione, la sostituzione del tessuto da parte dei fibroblasti e l'accumulo di matrice extracellulare (MEC) può continuare anche se la lesione iniziale si è risolta (Cadario *et al.*, 2002). La fibrosi endometriale è sicuramente la caratteristica peculiare di questo processo degenerativo. La fibrosi può colpire singole ghiandole o può localizzarsi a livello perighiandolare portando alla formazione dei cosiddetti "nidi" ghiandolari fibrotici (Kenney, 1978); questi assumono dimensioni

variabili a seconda del numero di ghiandole coinvolte. I “nidi” fibrotici non devono essere confusi con gli “pseudo-nidi”, ovvero “nidi” non fibrotici di ghiandole aggregate, presenti fisiologicamente nelle fasi di anestro o di transizione poiché l’endometrio è condensato e non edematoso (Kenney, 1978). Nelle ghiandole fibrotiche si è osservato che la morfologia funzionale dell’epitelio non corrisponde al ciclo ovarico; questo fenomeno è detto “differenziazione asincrona” delle ghiandole fibrotiche (Aupperle *et al.*, 2004).

1.2.3 Definizione e classificazione

Possiamo definire l’endometriosi come una fibrosi attiva o inattiva, perighiandolare e/o stromale dell’endometrio con alterazioni ghiandolari all’interno dei *foci* fibrotici (Hoffmann *et al.*, 2009). È proprio l’alterazione fibrotica il fondamento del metodo di classificazione dell’endometriosi su base istologica ad oggi più largamente utilizzato, il sistema di Kenney e Doig (1986). Le altre due voci fondamentali del sistema sono il grado d’inflammazione acuta o cronica e l’atrofia (o ipoplasia) endometriale (Schlafer DH, 2007). Il sistema si basa sull’identificazione delle suddette caratteristiche istologiche (fibrosi, infiammazione e atrofia) e sulla formazione di quattro categorie di gravità: I, IIA, IIB e III, dove la categoria I non ha endometriosi e la categoria III presenta caratteristiche di endometriosi grave. La definizione di queste categorie in combinazione con i dati anamnestici riassume lo stato di salute dell’endometrio. L’appartenenza ad una categoria diviene inoltre un dato di rilevanza clinica vista la forte correlazione osservata tra endometriosi (e quindi lesioni endometriali) e capacità di portare a termine una gravidanza (Doig *et al.*, 1981).

1.2.3.1 Classificazione di Kenney e Doig (1986)

L’iniziale sistema di classificazione proposto da Kenney (1978) era costituito da tre categorie: un gruppo essenzialmente normale (categoria I), con una percentuale di concepimento che è il risultato delle condizioni complessive di *management*; un gruppo intermedio (categoria II), in cui il *management* e le alterazioni endometriali contribuiscono insieme alla percentuale di concepimento; un gruppo gravemente compromesso (categoria III), la cui percentuale di concepimento riflette le gravi alterazioni dell’endometrio.

Si era inoltre osservato che endometri appartenenti alle categorie II e III potevano essere spostati di categoria in funzione alla diminuzione o totale assenza di una o più alterazioni patologiche quali l'infiammazione multifocale diffusa e le lacune linfatiche multifocali. L'ulteriore suddivisione della categoria II in categoria IIA e categoria IIB fu inserita successivamente quando si associò a una differente estensione della fibrosi una differente capacità di portare a termine la gravidanza (Doig *et al.*, 1981). Questa classificazione della fibrosi in quattro categorie (assente, lieve, moderata e grave), ebbe come risultato una più precisa predizione della probabilità di concepimento rispetto al precedente sistema costituito da tre categorie. Il sistema modificato di Kenney e Doig del 1986 utilizza definitivamente la classificazione in quattro categorie. Fattrici con endometri istologicamente ascrivibili nella categoria III non risultano sterili, ma possiedono scarsissime capacità di portare a termine la gravidanza.

I termini chiave della classificazione sono correlati ai differenti *pattern* di distribuzione delle lesioni nella biopsia. Possiamo avere infatti lesioni *diffuse*, numerose e che appaiono largamente distribuite nella sezione, o lesioni *multifocali*, poche e irregolarmente distribuite. La presenza di lesioni diffuse aumenta la difficoltà nel portare a termine la gravidanza.

I *foci* patologici possono essere ulteriormente suddivisi in *foci* discreti o *foci* diffusi. Nei primi le alterazioni sono focali e a margini netti; nei *foci* diffusi, invece, le lesioni appaiono disseminate e a margini indefiniti. La diffusione della lesione sarà quindi inversamente proporzionale alla possibilità di ottenere una gravidanza. Di conseguenza lesioni diffuse di qualsiasi grado di severità risultano essere più importanti di lesioni multifocali e gravi.

1.2.4 Patogenesi

La patogenesi dell'endometriosi non è ancora chiaramente stabilita (Walter *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2009). Il primo segno di endometriosi è la differenziazione morfologica e funzionale atipica delle cellule stromali perighiandolari. Il primo stadio della fibrosi è caratterizzato dalla formazione di cellule stromali (tipo I) grandi e poligonali capaci di sintetizzare fibre collagene (Hoffmann *et al.*, 2009). Nella fibrosi avanzata predominano invece cellule stromali (tipo II) metabolicamente attive o inattive che non sintetizzano collagene e miofibroblasti (Hoffmann *et al.*, 2009). I

miofibroblasti sono fibroblasti capaci di esprimere fattori di differenziazione muscolare come α -actina del muscolo liscio, troponina e desmina (Walter *et al.*, 2001). La capacità di contrarsi dei miofibroblasti può portare alla contrazione delle ghiandole uterine con conseguente dilatazione delle stesse; i miofibroblasti sono anche in grado di modificare la composizione e la quantità di matrice extracellulare (MEC) poiché secernono proteine, come il collagene di tipo IV, laminina e fibronectina e svariati mediatori (Walter *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2009). In base quindi alla tipologia di cellule stromali coinvolte (tipo I o tipo II) possiamo definire l'endometriosi "attiva" o "inattiva". Un'endometriosi inattiva è correlata alla presenza di ghiandole dilatate. Quando invece le cellule stromali invadono il lume ghiandolare si parla di endometriosi "distruttiva" (Hoffmann *et al.*, 2009). Questi nuovi parametri di valutazione gettano le basi per ulteriori differenziazioni nella classificazione di Kenney e Doig.

1.2.5 Tecniche diagnostiche

La tecnica standard per la diagnosi di endometriosi è, da più 30 anni, la biopsia endometriale (Schlafer DH, 2007). Per anni, una singola biopsia è stata ritenuta rappresentativa delle condizioni dell'intero utero (Ricketts, 1975; Kenney, 1978; Blanchard *et al.*, 1987). Waelchli e Winder nel 1989 osservarono che la distribuzione delle lesioni istopatologiche risultava omogenea purché non vi fossero lesioni focali palpabili. In studi recenti, è stata riscontrata una rilevante variabilità nella classificazione della fibrosi e dell'endometriosi valutando biopsie provenienti da punti differenti di uno stesso utero (Dybdal *et al.*, 1999; Keller *et al.*, 2006; Fiala *et al.*, 2010). È necessario ricordare inoltre che nell'analisi di biopsie seriali la disomogeneità dei campioni è correlata alle variazioni cicliche stagionali (Gross e LeBlanc, 1984). Anche le alterazioni patologiche risentono delle variazioni stagionali ma, come si è detto, la fibrosi ne modifica la corrispondenza con il ciclo ovarico (fenomeno della "differenziazione asincrona").

Le ragioni che hanno portato alla diffusione su scala mondiale della biopsia endometriale sono la relativa facilità e sicurezza della tecnica (Kenney e Doig, 1986) e la stretta correlazione dimostrata tra i risultati dell'istopatologia endometriale e la fertilità, valutata come capacità di portare a termine una gravidanza (Kenney, 1978; Ricketts e Alonso, 1991). Questa correlazione attribuisce alla biopsia endometriale un

forte valore prognostico. Nell'idea dei pionieri di questa tecnica, la biopsia acquisiva valore diagnostico e prognostico solo se valutata in associazione ad un'anamnesi dettagliata, un esame clinico generale e un meticoloso esame dell'apparato riproduttore (Kenney e Doig, 1986). L'eventuale mancanza di queste informazioni quindi limita le potenzialità della biopsia endometriale. Per conferire valore alla biopsia, può essere utile generare dati quantitativi capaci di eliminare gli aspetti soggettivi ereditati con l'istopatologia (Schlafer, 2007). L'associazione all'istopatologia di nuove tecniche diagnostiche, come l'immunoistochimica, potrebbe migliorare in questo senso l'uso della biopsia endometriale a scopo diagnostico.

1.3 LE METALLOPROTEASI

1.3.1 Le metalloproteasi (MMP)

Le metalloproteasi di matrice sono una famiglia di endopeptidasi zinco-dipendenti altamente regolata. Sono state identificate 24 diverse metalloproteasi, classificate in 6 gruppi sulla base della loro sequenza amminoacidica e dei substrati con i quali interagiscono (classificazione in Tabella 1). Queste proteine insieme sono capaci di degradare la maggior parte, se non tutte, le componenti della MEC. Esse risultano attive nei processi fisiologici e patologici che coinvolgono il rimodellamento del tessuto (Rodgers *et al.*, 1994). Il rimodellamento della MEC è infatti parte integrante della normale crescita e differenziazione tissutale, così come, nei processi patologici, è coinvolto nella distruzione di tessuto e nella crescita abnorme di esso.

La loro espressione è regolata a livello trascrizionale da mediatori infiammatori, tra cui le citochine e diversi fattori di crescita: appare quindi evidente uno stretto legame tra infiammazione e MMP (Clutterbuck *et al.*, 2010). Ad eccezione delle metalloproteasi di membrana (MT MMP) che sembrano essere attivate primariamente dall'interazione con la membrana cellulare, esse sono secrete come proenzimi e necessitano di attivazione extracellulare per esacerbare l'attività proteolitica. Una volta attivate, le MMP possono essere inibite da un'altra famiglia di proteine, gli inibitori tissutali delle MMP (TIMP), anch'essi largamente distribuiti nei tessuti, tra cui l'endometrio umano (Salamonsen *et al.*, 2000).

	Gruppi	Attività
MMP-1, 8, 13, 18	Collagenasi	Attività collagenolitica su colagene di tipo I, II e III
MMP-2, 9	Gelatinasi	Attività collagenolitica, degradazione di laminina, gelatina e fibronectina. Responsabili dell'attivazione di molte citochine e di altre MMP.
MMP-3, 10	Stromalisine	Degradazione di collagene, fibronectina, laminina, caseina e altre MMP.
MMP-7, 26	Matrilisine	Degradazione di diverse componenti della matrice e di molecole di superficie come l'E-caderina.
MMP-14 (MT1 MMP) MMP-15 (MT2 MMP) MMP-16 (MT3 MMP) MMP-17 (MT4 MMP) MMP-24 (MT5 MMP) MMP-25 (MT6 MMP)	Metalloproteasi di membrana (Membrane-Type MMP)	Proteine transmembranarie coinvolte nel meccanismo di attivazione di altre MMP.
MMP-11, 12, 19, 20, 21, 22, 23, 28	Altre metalloproteasi	Difficile classificazione. Tipicamente espresse in un singolo tessuto o in particolari condizioni

Tabella 1 Classificazione delle metalloproteasi

1.3.2 Struttura e attivazione

Una tipica metalloproteasi è costituita da un prodominio di circa 80 aminoacidi, un sito catalitico di circa 170 aminoacidi, un peptide *linker* di variabile lunghezza (detto *hinge region*) ed un dominio *hemopexin-like* di circa 200 aminoacidi (Nagase *et al.*, 2006). La proteina viene secreta nella sua forma inattiva (pro-MMP), nella quale l'atomo di zinco presente nel sito catalitico non è disponibile alla formazione di legami per la presenza di una cisteina (Visse *et al.*, 2003). L'attivazione deriva quindi dall'esposizione del sito catalitico, che può così interagire con i substrati. L'attivazione può essere di due tipi, enzimatica o non enzimatica: nel primo caso avviene per azione di enzimi proteolitici, fra i quali plasmina o altre MMP (Visse *et al.*, 2003).

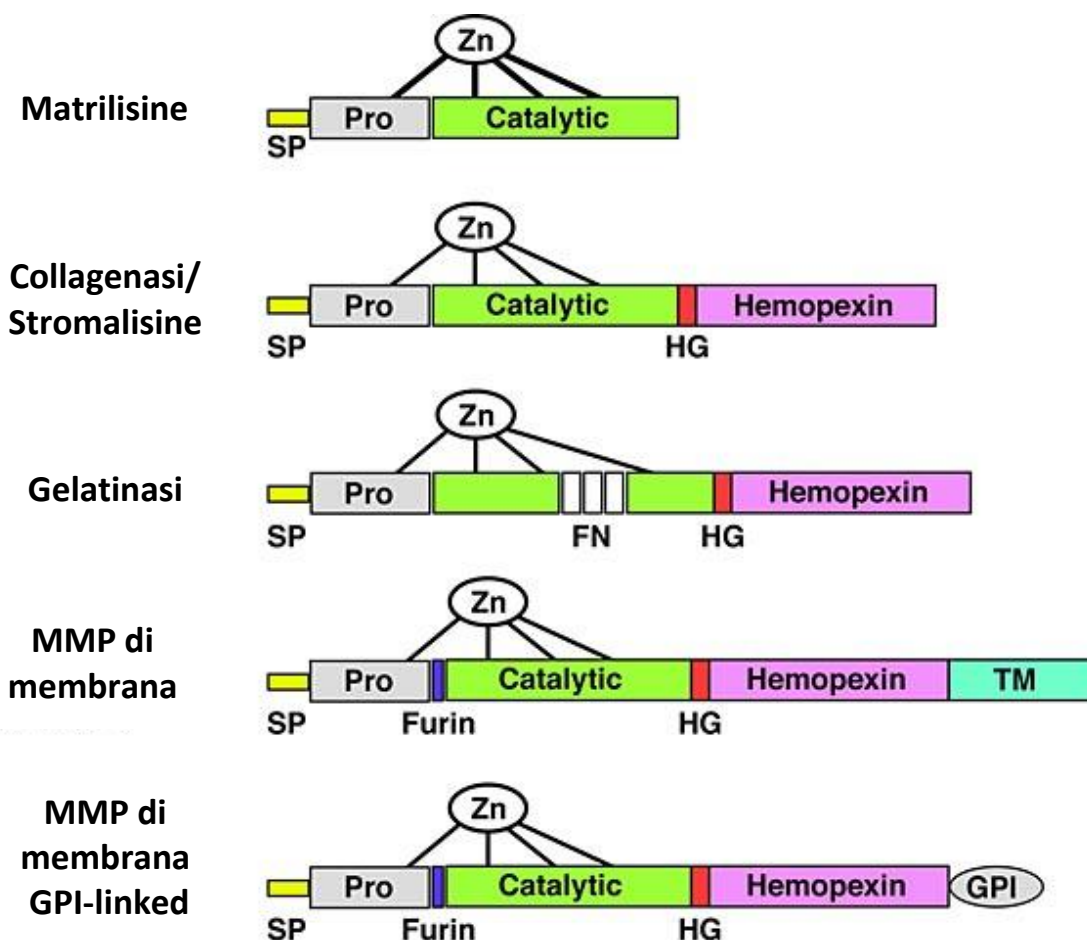


Figura 3. Struttura delle metalloproteasi. Abbreviazioni: SP, peptide segnale (sequenza di secrezione); Pro, prodominio; Catalytic, sito catalitico; FN, dominio *fibronectin-like*; HG, *hinge region*; TM, dominio transmembrana; GPI, glycosylphosphatidylinositol anchor; Zn, atomo di zinco. Alcune MMP presentano un sito di clivaggio di tipo furinico (Furin) tra il prodominio e il sito catalitico.

1.3.2.1 Attivazione di MMP-2 e MMP-9

MMP-2

Per MMP-2 è stata osservata una particolare via di attivazione. L'attivazione avviene nello spazio extracellulare a livello della superficie cellulare e richiede l'assistenza di una molecola di TIMP-2 e due molecole di MMP-14 (o MT1 MMP) (Visse *et al.*, 2003). Come si è detto, MMP-14 è una molecola transmembranaria, attivata dall'interazione con la membrana cellulare e capace di formare dimeri o polimeri sulla superficie cellulare attraverso l'interazione dei domini *hemopexin-like*. Nel processo di attivazione di MMP-2, una molecola di MMP-14 attivata si lega ad una molecola di TIMP-2 che la inibisce. La pro-MMP-2 si lega quindi al neoformato complesso MMP-14/TIMP-2 e tramite l'azione di una seconda MMP-14 (libera dal legame con il TIMP-2) la cisteina viene scissa e l'enzima attivato (Visse *et al.*, 2003).

Per favorire il processo di attivazione, è necessario da una parte un notevole numero di MMP-14 libere dal legame con TIMP-2 attorno al complesso ternario MMP-14/TIMP-2/pro-MMP-2, dall'altra una bassa concentrazione di TIMP-2, che, se in eccesso, inibisce l'azione della seconda MMP-14 (Visse *et al.*, 2003; Nagase *et al.*, 2006).

MMP-9

MMP-9 viene attivata *in vitro* da svariati enzimi proteolitici. *In vivo* l'attivazione è correlata a una cascata di eventi che coinvolgono altre MMP, tra cui la MMP-14, MMP-2, MMP-3 e il sistema della plasmina (Roth *et al.*, 2003).

La plasmina è rilasciata sotto forma di plasminogeno; quest'ultimo è attivato dall'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) fibrino-associato e dall'attivatore del plasminogeno tipo urochinasico (uPA) legato al suo specifico recettore di membrana (uPA receptor). Sia tPA sia uPA sono associati alla membrana e creano così un'attivazione localizzata della pro-MMP e il conseguente *turnover* della MEC (Visse *et al.*, 2003). Una volta attivata, MMP-9 viene rapidamente inattivata dal suo inibitore tissutale, TIMP-1.

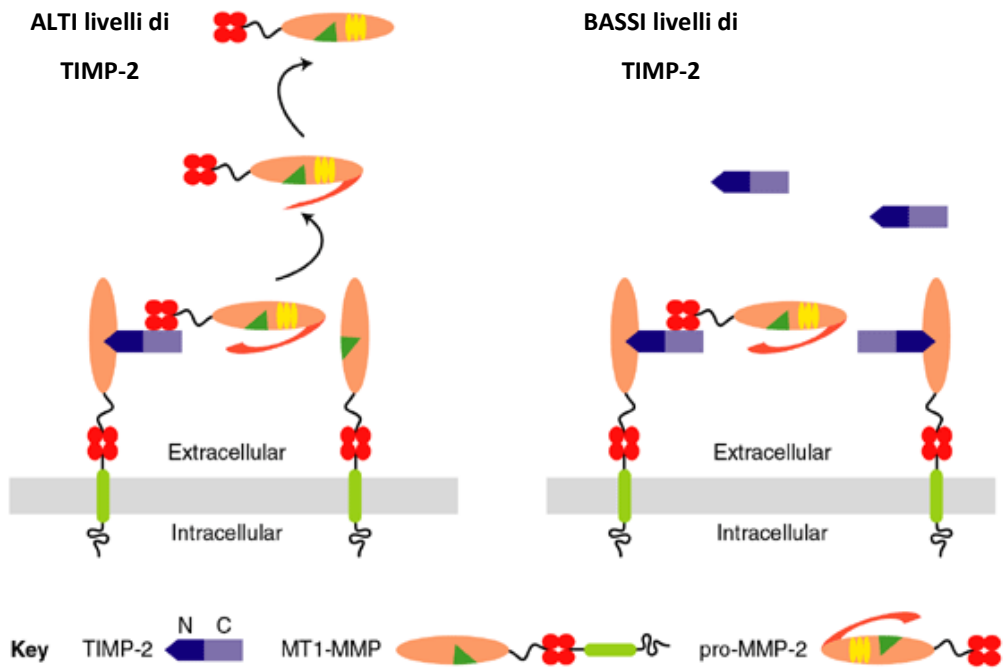


Figura 4. Meccanismo di attivazione della pro-MMP-2 in presenza di bassi (a) o alti (b) livelli di TIMP-2 (Lafleur *et al.*, 2003)

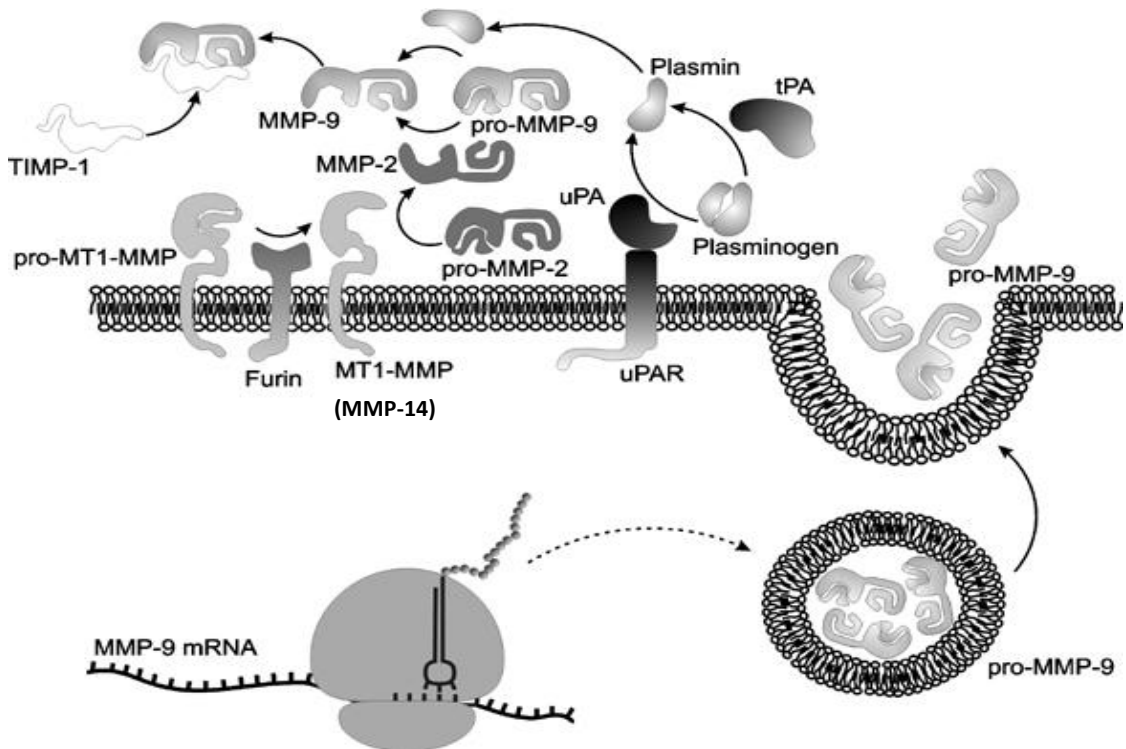


Figura 5. Meccanismo di sintesi, attivazione e inibizione della pro-MMP-9. TIMP-1, inibitore tissutale delle metalloproteasi di matrice-1; MMP, metalloproteasi di matrice; MT, membrane-type; tPA, attivatore tissutale del plasminogeno; uPA, attivatore del plasminogeno tipo urochinasico ; uPAR, recettore dell'uPA (Michaluk *et al.*, 2007)

1.3.3 Gli inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMP): TIMP-2

Gli inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMP) sono enzimi endogeni inibitori delle MMP; nei vertebrati ne sono stati identificati quattro: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 E TIMP-4 (Visse *et al.*, 2003). Strutturalmente presentano una conformazione a cuneo e si legano al sito attivo dell'enzima che vogliono inibire, occupandolo e impedendo il legame con i substrati con cui normalmente interagisce (Visse *et al.*, 2003).

I TIMP possono influenzare tutti i processi MMP-mediati. In particolare, TIMP-2 è capace di inibire tutte le metalloproteasi ed è un forte inibitore per MMP-9 e MMP-2. Come si è detto, per MMP-2 è un attivatore se presente a basse concentrazioni, ma è un inibitore ad alte concentrazioni (Nagase *et al.*, 2006).

Sebbene la funzione fisiologica più conosciuta per i TIMP sia la loro capacità di modulare la proteolisi della MEC mediata dalle MMP, diversi studi hanno riconosciuto ai TIMP altre importanti funzioni biologiche non direttamente correlabili all'inibizione delle MMP. Per esempio, TIMP-2:

1. inibisce la crescita tumorale e le metastasi in animali ed anche in studi su colture cellulari;
2. ha attività eritroide potenziante e stimola la crescita di numerosi tipi di cellule tra cui cheratinociti e fibroblasti;
3. inibisce la crescita delle cellule endoteliali;
4. ha attività antiapoptotica (Visse *et al.*, 2003).

Per quanto riguarda la degenerazione fibrotica, studi in umana sulla fibrosi epatica mostrano nelle fasi di recupero una diminuzione dei livelli di TIMP, mentre l'attività delle MMP rimane alta (Clutterbuck *et al.*, 2010). Nel tessuto endometriale fibrotico sembra inoltre che la coespressione di TIMP e MMP provochi la soppressione dell'attività collagenolitica e l'aumento della fibrosi (Clutterbuck *et al.*, 2010).

1.3.4 Ruolo delle MMP

Le metalloproteasi giocano un importante ruolo nel rimodellamento della matrice extracellulare (MEC). La MEC è la componente acellulare dei tessuti connettivi ed è importante per la morfogenesi e il supporto strutturale dei vertebrati; è costituita da una componente fibrillare (collagene, fibronectina, elastina, laminina) e una componente amorfa (una fase acquosa contenente una miscela di enzimi,

glicoproteine e proteoglicani) (Rosati *et al.*, 1997). Durante le fasi di crescita e rinnovamento i componenti della MEC vengono degradati e sintetizzati tramite un sistema altamente regolato dai fibroblasti interstiziali. Questi sono responsabili della produzione della matrice, degli enzimi che la degradano e dei fattori che ne modulano il *turnover* continuo (Rosati *et al.*, 1997). Le MMP, modulate dai TIMP, portano alla degradazione della matrice, svolgendo un importante **funzione strutturale**. L'equilibrio dinamico che sottosta all'attività di MMP e TIMP è di cruciale importanza nei processi fisiologici dell'individuo, come la crescita. Ogni alterazione di questo equilibrio può avere conseguenze a livello locale e sistemico (Clutterbuck *et al.*, 2010).

Tuttavia la MEC e con essa le MMP non svolge semplicemente funzioni strutturali e di barriera. La componente amorfa, infatti, funge da *reservoir* per diverse molecole biologicamente attive e la membrana basale, sottile stato di MEC localizzato nelle zone dove le cellule non connettivali vengono a contatto con la componente amorfa del connettivo (Rosati *et al.*, 1997), influenza la crescita e la sopravvivenza delle cellule epiteliali. L'azione proteolitica delle MMP sulla MEC potrebbe alterare la presenza di questi segnali di sopravvivenza cellulare, causando l'**apoptosi** (McCawley *et al.*, 2001). Risulta evidente come le MMP, grazie alla loro attività proteolitica, siano in grado di svolgere diverse attività biologiche conseguenti alla liberazione dalla MEC di molecole o frammenti di esse (McCawley *et al.*, 2001).

Di marcata importanza è il ruolo delle MMP nella **proliferazione cellulare**. Parecchi fattori di crescita presentano un'affinità per le componenti matriciali: la proteolisi di tali componenti porta alla solubilizzazione dei fattori stessi (McCawley *et al.*, 2001). In particolare, la proteolisi del perlecano ad opera di MMP-1 e MMP-3 porta alla liberazione del *fibroblast growth factor* (FGF); MMP-2, 3 e 7 lisando la decorina provocano il rilascio del TGF- β (McCawley *et al.*, 2001).

Talvolta le MMP agiscono direttamente sui fattori di crescita, attivandoli: MMP-2 e 9 convertono in un ligando attivo TGF- β ; MMP-2, 3 e 9 trasformano il precursore dell'interleuchina 1- β (IL1- β) nella sua forma attiva (McCawley *et al.*, 2001).

Le MMP entrano in gioco anche nella **migrazione cellulare**. La migrazione è un meccanismo finemente complesso che richiede la regolazione simultanea sia delle interazioni cellula-cellula sia di quelle cellula-matrice. L'attività proteolitica delle MMP favorisce la rimozione dei siti di adesione delle cellule alla matrice o alla membrana

basale, o altera i dispositivi giunzionali, portando alla migrazione cellulare. Ad esempio, la proteolisi MMP-2-dipendente della laminina-5 porta indirettamente alla migrazione dei cheratinociti; se la proteolisi della laminina-5 avviene invece ad opera di MMP-14, sono più tipi cellulari a migrare (McCawley *et al.*, 2001). Come nella proliferazione, anche in questo caso l'azione delle MMP è duplice. Esse infatti possono agire anche in maniera diretta: MMP-7 è in grado di scindere la β -integrina e MMP-3 e 7 scindono invece l'E-caderina (McCawley *et al.*, 2001). La migrazione ha spesso inizio come risposta ad uno stimolo chemotattico. Anche in questo senso, le MMP assumono un'importanza chiave, essendo capaci di generare stimoli chemotattici, come nel caso del rilascio MMP-9 dipendente di *vascular endothelial growth factor* (VEGF), coinvolto nello sviluppo delle ossa lunghe, o al contrario di sopprimerli, ad esempio MMP-2 scinde e inattiva *monocyte chemoattractant protein* (MCP-3), diminuendo la chemiotassi e la risposta infiammatoria (McCawley *et al.*, 2001).

Un ulteriore ruolo attribuito alle MMP è la **comunicazione intercellulare**: esse consentono il rilascio di fattori che agiscono per via paracrina, influenzando il comportamento delle diverse tipologie cellulari. La mediazione delle MMP nella comunicazione intercellulare è stata dimostrata sia durante la risposta infiammatoria sia nell'interazione con cellule procariote. Per citare un esempio di quest'ultimo caso, l'espressione di MMP-7 a livello delle cellule di Paneth nell'intestino tenue innesca l'attivazione di pro- α -difensine, coinvolte nella risposta immunitaria innata che porta alla distruzione dei batteri (McCawley *et al.*, 2001).

Le MMP svolgono un'azione modulante anche sulle **patologie tumorali**, tramite il controllo della sopravvivenza e proliferazione cellulare. In numerosi studi su modelli murini, l'eliminazione di una singola MMP attenua la progressione tumorale negli stadi precoci e comunque prima dello sviluppo delle metastasi. Ad oggi non ci sono dati sufficienti per dimostrare che l'eliminazione di una singola MMP riduca l'invasione tumorale e le metastasi. Un'eccezione a ciò è stata individuata nella MMP-2: la sua completa eliminazione, infatti, riduce la colonizzazione delle cellule carcinomatose polmonari di Lewis dopo iniezione intravenosa (McCawley *et al.*, 2001). Probabilmente è l'inibizione di più classi di proteasi a incidere sulla progressione di tumori in stadi avanzati: così infatti avviene nel processo di guarigione delle ferite, completamente impedito dall'inibizione combinata di MMP e plasmina (McCawley *et al.*, 2001).

1.3.5 MMP nel cavallo

Negli ultimi anni, le MMP sono state più volte chiamate in causa nello studio della patogenesi delle patologie equine.

In corso di **laminite**, patologia infiammatoria dello zoccolo causata dall'interruzione della connessione tra le lamine dermiche ed epidermiche della muraglia a livello di membrana basale, è stato osservato un alto livello trascrizionale di MMP-2 (Clutterbuck *et al.*, 2010). L'incremento di MMP-2 è accompagnato dall'aumento di MMP-14 e dalla concomitante diminuzione di TIMP-2. Poiché MMP-2 e 14 sono state isolate anche da tessuto lamellare sano, si è supposto che un'irregolare attivazione di MMP-14 liberi MMP-2 dall'inibizione di TIMP-2 e porti alla proteolisi della giunzione dermo-epidermica (Clutterbuck *et al.*, 2010). Inoltre, la produzione di citochine (IL-1 β , IL-6 e IL-8) nelle fasi precoci della patologia stimola l'attrazione e attivazione dei neutrofili, direttamente implicati nell'accumulo di pro-MMP-9 nello zoccolo. È sempre a seguito dell'azione delle citochine pro-infiammatorie che avviene anche l'attivazione: le citochine sono in grado di attivare e/o regolare le MMP tramite la produzione di determinati agenti quali l'ossido nitrico (NO) o la ceramide (Clutterbuck *et al.*, 2010).

In uno studio recente si è osservato che cavalli in **colica** presentano livelli sierici di MMP-2 più elevati rispetto agli individui sani. È stato quindi proposto un probabile ruolo delle MMP nella patogenesi delle coliche, legato alla loro capacità di aumentare la permeabilità cellulare, in seguito alla distruzione della barriera epiteliale intestinale (Clutterbuck *et al.*, 2010).

Studi molecolari su articolazioni equine dimostrano la produzione da parte di condrociti e fibroblasti sinoviali di MMP-2, 3, TIMP-1 e TIMP-2. Nei cavalli affetti da **osteoartrite** (OA), la produzione di collagenasi, gelatinasi e stromalisine appare aumentata (Clutterbuck *et al.*, 2010). *In vitro* si è osservato che l'aggiunta della citochina pro-infiammatoria IL-1 β (ricombinante equina) a colture di condrociti articolari sani di cavallo aumenta l'espressione di MMP-1, 3, 13 e TIMP-1 (Clutterbuck *et al.*, 2010). Come si è già sottolineato, le citochine oltre ad aumentarne la produzione attivano le MMP (Clutterbuck *et al.*, 2010). Inoltre, l'accumulo di pro-MMP-9 e MMP-9 attivata nel fluido sinoviale delle articolazioni osteoartritiche è correlato alla presenza di leucociti (Clutterbuck *et al.*, 2010). È probabile che, nella patogenesi dell'OA equina, sia le cellule articolari residenti sia le cellule infiammatorie contribuiscano all'eccessiva

produzione di MMP. Nell'OA umana è stato dimostrato che l'eccesso di MMP su TIMP provoca il collasso della cartilagine e che, nelle cartilagini sane, prevale la quantità di TIMP su quella di MMP (Clutterbuck *et al.*, 2010).

Le MMP appaiono coinvolte anche nella patogenesi della **recurrent airway obstruction** (RAO). Questa patologia, di cui eziologia e patogenesi sono ancora molto controverse, è l'esito di un'inflammatione cronica delle vie respiratorie, dovuta ad un'iperreattività (patologica) ad alcuni allergeni inalatori. Esaminando lavaggi tracheo-bronchiali (BAL) effettuati sia su cavalli sani sia su cavalli affetti da RAO dopo esposizione a polveri di fieno o paglia ammuffiti, pro-MMP-9 e MMP-9 attivata appaiono aumentate nei soggetti malati (Clutterbuck *et al.*, 2010). I livelli di MMP-9 risultano ancora una volta significativamente correlati all'accumulo di neutrofili, dovuto alla risposta infiammatoria della reazione allergica. Oltre a ciò, recenti ricerche dimostrano che alcuni funghi, come *Aspergillus fumigatus*, sono in grado di attivare la pro-MMP-9 (Clutterbuck *et al.*, 2010).

La **cheratite ulcerativa** è una patologia oculare caratterizzata da una rapida degenerazione stromale. Sia MMP-2 sia MMP-9 sono state riconosciute responsabili del rimodellamento dello stroma corneale (Clutterbuck *et al.*, 2010). In uno studio effettuato su campioni di film lacrimale pre-corneale, sono stati osservati livelli di MMP-2 e 9 significativamente più alti in animali affetti da cheratite ulcerativa rispetto ad animali sani. Il sopracitato studio non precisa se MMP-2 e 9 sono attive o inattive, ma nell'uomo è dimostrato che le gelatinasi sono attive nelle ulcere corneali e che una loro inibizione è preventiva nei confronti della progressione dell'ulcera (Clutterbuck *et al.*, 2010). Nel cavallo affetto da cheratite ulcerativa, però, l'attività gelatinolitica appare aumentata in una prima fase e diminuita al momento della risoluzione dell'ulcera: è difficile quindi stabilire i gradi di inibizione necessari per fare fronte ai diversi stadi della patologia (Clutterbuck *et al.*, 2010).

1.3.6 MMP nella fibrosi

Uno dei processi patologici in cui le MMP sono coinvolte è la fibrosi. La fibrosi si manifesta quando la normale composizione della MEC viene sostituita da tessuto fibrotico e la MEC non è più in grado di svolgere le sue funzioni. Le MMP sono coinvolte in numerosi processi fibrotici descritti nell'uomo, tra cui la fibrosi polmonare

ed epatica (Clutterbuck *et al.*, 2010). Nel fegato, ad esempio, insulti prolungati provocano la degradazione della MEC normale da parte delle MMP. Questo evento stimola la trasformazione di normali epatociti rigenerativi in miofibroblasti, promuovendo l'attività di TIMP e un conseguente eccesso di deposizione di MEC, che può condurre alla cirrosi e all'insufficienza epatica (Clutterbuck *et al.*, 2010). L'incremento della fibrosi epatica risulta correlato ad un aumento di espressione e attivazione di MMP-2 e MMP-14, non supportato però dall'intensificazione della loro azione collagenolitica a causa di alti livelli di TIMP (Clutterbuck *et al.*, 2010).

Analogamente a quanto appena osservato, anche nella fibrosi endometriale perighiandolare della cavalla ritroviamo le MMP. In particolare pro-MMP-2 e MMP-2 sono presenti sia nel tessuto endometriale sano sia in condizioni patologiche (Walter *et al.*, 2005). Nell'endometrio equino affetto da endometriosi, però, l'espressione e l'attività di MMP-2 perighiandolare appaiono aumentate (Walter *et al.*, 2005).

Nella donna, poco prima e durante la mestruazione le cellule stromali producono MMP, probabilmente indotte direttamente e indirettamente dai leucociti (Salamonsen *et al.*, 2000). Nella cavalla non esiste un fenomeno sovrapponibile alla mestruazione, ma nel passaggio da una fase del ciclo estrale ad un'altra si assiste ad un notevole rimodellamento della MEC; è stato infatti dimostrato che le fibre collagene (tipo I) hanno diversa distribuzione in base alle fasi del ciclo (Walter *et al.*, 2001).

Risulta a questo punto intuitivo che la presenza delle MMP nell'endometrio sia correlata al mantenimento dell'omeostasi della MEC; l'alterazione dell'ambiente extracellulare provoca l'instaurarsi di fenomeni fibrotici. Si è già accennato al fatto che non solo l'eccesso, ma anche l'assenza o l'inibizione delle MMP possono perpetrare il processo fibrotico: come accade infatti nelle fasi di recupero dalla fibrosi epatica, anche nel tessuto endometrioso in riparazione alti livelli di MMP potrebbero aiutare la distruzione di MEC fibrotica (Clutterbuck *et al.*, 2010).

2 OBIETTIVI

In questo studio sono stati esaminati 70 campioni di tessuto uterino, appartenenti a 35 casi. Il prelievo è stato effettuato per ciascun animale attraverso due campionamenti standardizzati: uno a tutta parete e l'altro simil biopsia (solo tonaca mucosa).

Per ogni caso è stata effettuata la valutazione istologica tramite colorazioni specifiche ed è stato formulato un *grading* di endometriosi secondo i parametri del sistema di classificazione di Kenney e Doig (1986). L'esame al microscopio ottico ha permesso di valutare la fase del ciclo estrale e il grado di infiammazione e di fibrosi perighiandolare.

Gli scopi di questo lavoro sono stati:

- ✓ verificare la concordanza tra la nostra casistica e i dati presenti in bibliografia relativamente alla correlazione tra età e categoria di Kenney e Doig;
- ✓ valutare eventuali differenze nell'attribuzione di una categoria di endometriosi al campione istologico sulla base delle due tecniche di prelievo (parete o biopsia);
- ✓ valutare se e come differiscano il *grading* basato sull'infiammazione e quello basato sulla fibrosi e la loro assonanza con il *grading* finale;
- ✓ verificare l'espressione delle metalloproteasi 2, 9, 14 e di TIMP-2 e le eventuali correlazioni con il *grading* di endometriosi;
- ✓ valutare l'eventuale valore prognostico dell'analisi immunohistochimica associata all'istologia e la possibilità di individuare nelle MMP dei *marker* di fertilità.

3 MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONAMENTO

I prelievi sono stati effettuati *post mortem* su 35 cavalle, di cui 20 di età compresa tra i 2 e i 4 anni e 15 di età superiore ai 12 anni. L'età rappresenta l'unico dato anamnestico considerato per il prelievo. Il campione di tessuto è stato prelevato alla base del corpo uterino con due tecniche differenti: un prelievo dell'intera parete di 2 cm³ ed uno simil bioptico, di una misura minima compresa tra 10 e 20 x3x3 mm (Kenney e Doig, 1986) di sola mucosa. I prelievi sono stati effettuati entro 10 minuti dalla macellazione nel macello Pantano Carni s.r.l. (Arre, Pd) in un periodo compreso tra maggio 2009 e ottobre 2009. Le cavalle si trovavano al momento del prelievo presumibilmente durante la fase attiva del ciclo estrale, variabile tra estro e diestro.

3.2 ISTOLOGIA

3.2.1 Processazione dei campioni

I campioni (fig.6) sono stati fissati in formalina (4%) per 24-48 ore e quindi disidratati e inclusi in paraffina mediante una centralina di inclusione (Bio-Optica® UT200). Sono stati tagliati in sezioni dello spessore di 4 µm (microtomo Leica® RM 2145) in modo da ottenere sezioni a singolo strato di cellule.



Figura 6. I campioni di parete (A e C) e di biopsia (B e D) una volta fissati in formalina e ridotti di dimensione vengono sistemati in biocassette all'interno delle quali vengono disidratati ed inclusi in paraffina.

Per valutare e classificare correttamente i campioni si è ricorsi all'utilizzo di colorazioni specifiche. Per ogni campione, una sezione di parete ed una di biopsia sono state colorate rispettivamente con ematossilina ed eosina e Tricromica di Masson.

3.2.1.1 Ematossilina-Eosina

È una colorazione classicamente utilizzata per la valutazione morfologica di campioni istologici: nella valutazione della fibrosi uterina consente di osservare l'infiltrato infiammatorio.

L'ematossilina basica permette la colorazione del nucleo, che assume una colorazione blu, mentre l'eosina colora il citoplasma di rosa-rosso.

La procedura è stata effettuata per mezzo di un coloratore automatico (Leica® Auto Stainer XL) seguendo il seguente procedimento:

1. deparaffinare e idratare le sezioni in acqua deionizzata
2. colorare in ematossilina per 7 minuti
3. risciacquare in acqua corrente per 5 minuti
4. colorare in eosina per 1 minuto
5. disidratare in soluzioni ascendenti di alcool (50%, 70%, 90%, 100%) e xilene
6. montare con Eukit (Bio-Optica®).

3.2.1.2 Tricromica di Masson

Colorazione d'elezione per la valutazione del tessuto connettivo. Il metodo associa una colorazione nucleare ottenuta con ematossilina ferrica di Weigert, una colorazione delle emazie con acido picrico e una colorazione del connettivo con due differenti coloranti acidi: blu di anilina per il collagene e strutture ricche in mucopolisaccaridi, fucsina di Ponceau per le fibre muscolari. Le diverse strutture assumono quindi le seguenti colorazioni:

- nuclei e gameti: nero
- citoplasma, cheratina fibre muscolari e granuli acidofili: rosso
- collagene e muco: blu
- eritrociti: giallo

Nella valutazione dell'endometriosi, la colorazione tricromica si rivela utile poiché dimostra maggiore efficienza nella capacità di individuare la distribuzione e la gravità del tessuto connettivo fibroso stromale rispetto a colorazioni classiche come l'Ematossilina-Eosina (Kenney *et al.*, 1987).

Procedimento:

1. deparaffinare e idratare le sezioni in acqua deionizzata
2. porre sulla sezione ematossilina ferrica secondo Weigert per 10 minuti
3. senza lavare, sgocciolare il vetrino e porre sulla sezione l'acido picrico (soluzione alcolica) per 4 minuti
4. lavare rapidamente in acqua distillata e porre sul vetrino fucsina di Ponceau (soluzione) per 4 minuti
5. lavare in acqua distillata e porre sulla sezione acido fosfomolibdico (soluzione) per 10 minuti
6. senza lavare, sgocciolare il vetrino e porre sulla soluzione blu di anilina secondo Masson per 8 minuti
7. lavare in acqua distillata e disidratare rapidamente attraverso la serie ascendente degli alcool (50%, 70%, 90%, 100%) e xilene
8. montare con Eukit (Bio-Optica®).

3.2.2 Classificazione istologica dei campioni

I campioni istologici così preparati sono stati osservati al microscopio ottico (Nikon® Eclipse E200).

Il primo passo è stato classificare i campioni secondo la fase del ciclo estrale, attenendosi ai criteri morfologici descritti nel 1993 da Doig e Waelchli (vedi Introduzione).

Per la classificazione dell'endometriosi invece si è scelto il sistema proposto da Kenney e Doig (1986).

Di seguito vengono riportati i criteri istopatologici della classificazione:

Categoria I (fig. 7). L'endometrio appare normale, con minimi segni da focali a multifocali di infiammazione o fibrosi.

Categoria IIA (fig. 8). L'endometrio si presenta con infiltrato infiammatorio diffuso da minimo a moderato dello strato compatto o con infiltrato infiammatorio multifocale sia nello strato compatto sia nello strato spongioso.

La fibrosi coinvolge multifocalmente le ghiandole con diverso grado di severità, formando da uno a tre strati o presentando meno di due "nidi" ghiandolari su 5,5mm di campo lineare (valutato in almeno quattro campi).

La presenza di lacune linfatiche è un dato significativo in questa categoria.

Anche una parziale atrofia endometriale presente nel periodo terminale della stagione riproduttiva fisiologica può portare alla classificazione dell'endometrio come IIA.

Categoria IIB (fig. 9). Le alterazioni infiammatorie si presentano diffuse, con *foci* di gravità moderata. Le alterazioni fibrotiche sono più gravi ed estese di quelle osservate nella categoria IIA. La presenza di fibrosi attorno alle ghiandole ha distribuzione uniforme, formando quattro o più strati o mostrando in media da due a quattro "nidi" di ghiandole fibrotiche su 5,5mm di campo lineare (valutato in almeno quattro campi). Se alterazioni infiammatorie classificabili come categoria IIB coesistono con alterazioni fibrotiche della stessa entità, l'endometrio è classificato come categoria III.

Categoria III (fig. 10). Le quattro alterazioni che portano a classificare l'endometrio in categoria III sono le seguenti:

1. presenza di lesioni infiammatorie diffuse e gravi
2. fibrosi diffusa e uniforme a carico delle ghiandole con cinque o più "nidi" di ghiandole fibrotiche su 5,5mm di campo lineare
3. presenza di lacune linfatiche così ampie da produrre una sostanza simil gelatinosa tra le pliche endometriali o sulla parete uterina
4. presenza di una profonda atrofia durante la stagione riproduttiva fisiologica.

Se sono presenti due o più tipologie di alterazioni contemporaneamente, la condizione dell'endometrio è molto più critica.

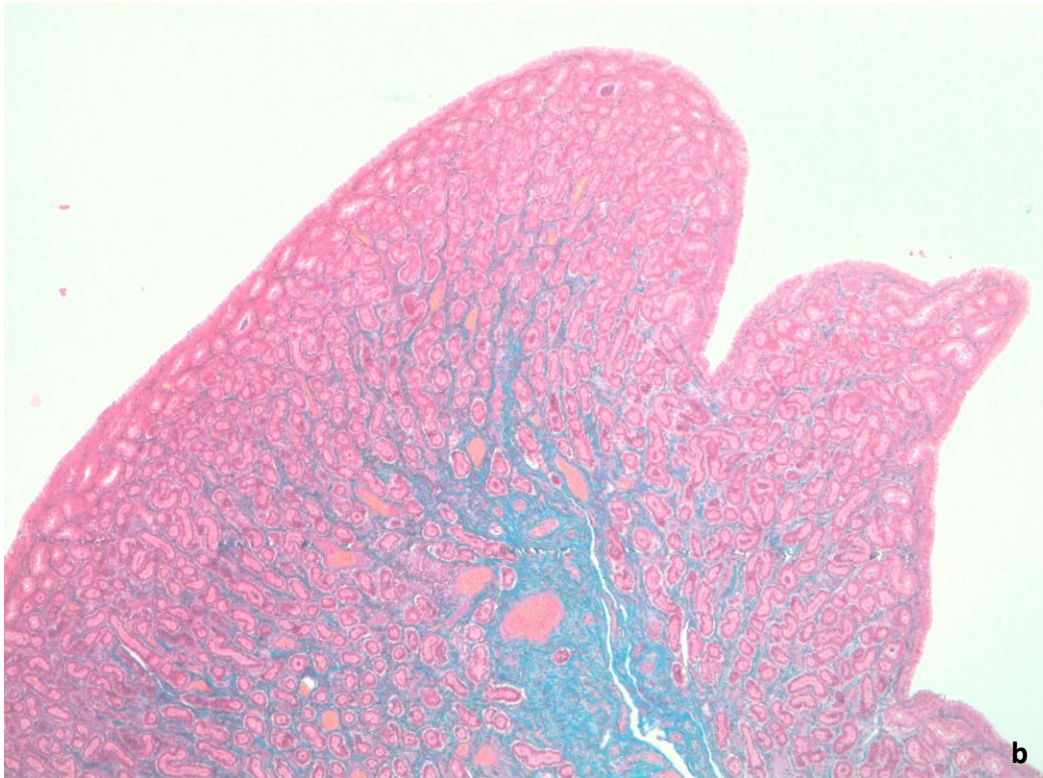
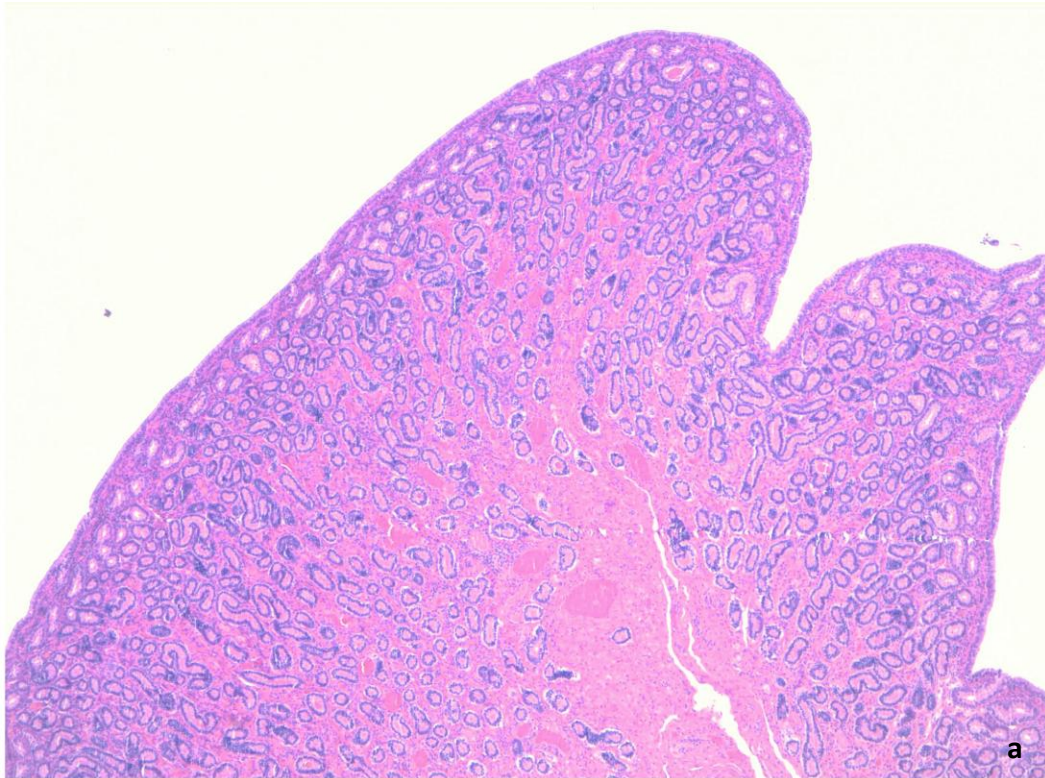


Figura 7. Sezione endometriale, categoria I. **a:** ematossilina-eosina, 5x; **b:** tricromica di Masson, 5x.

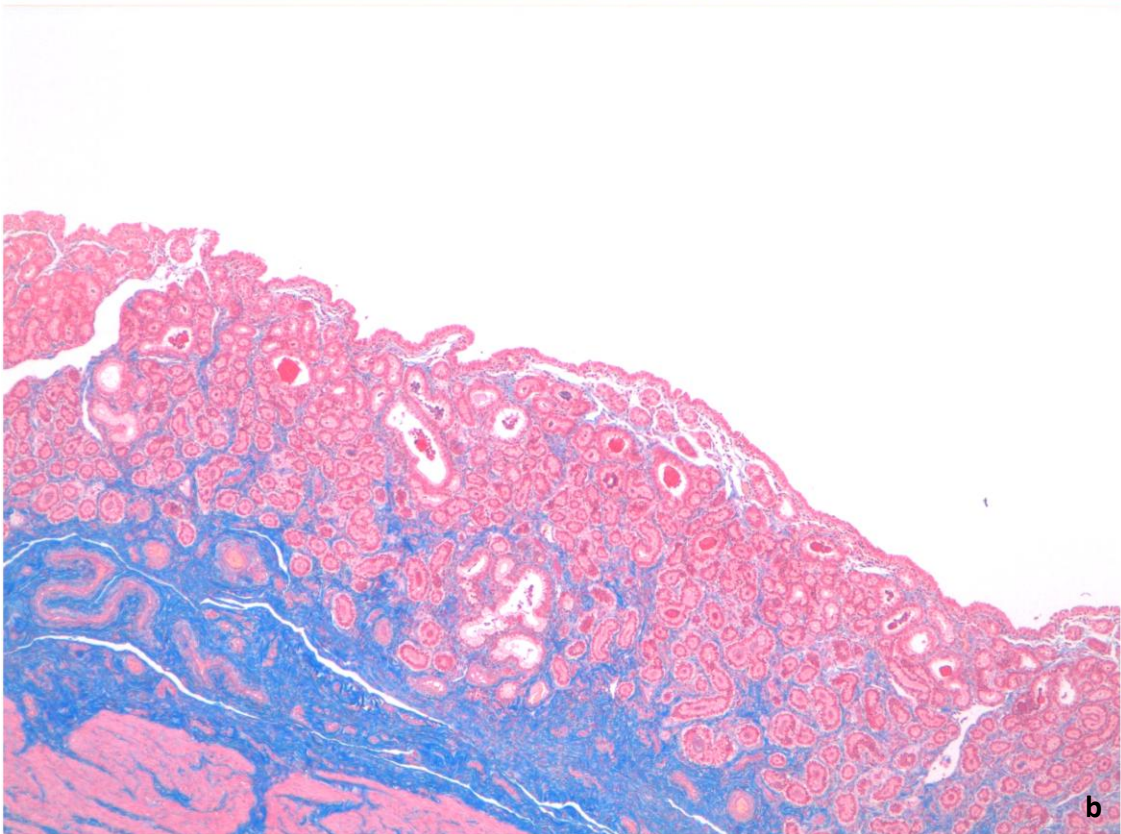
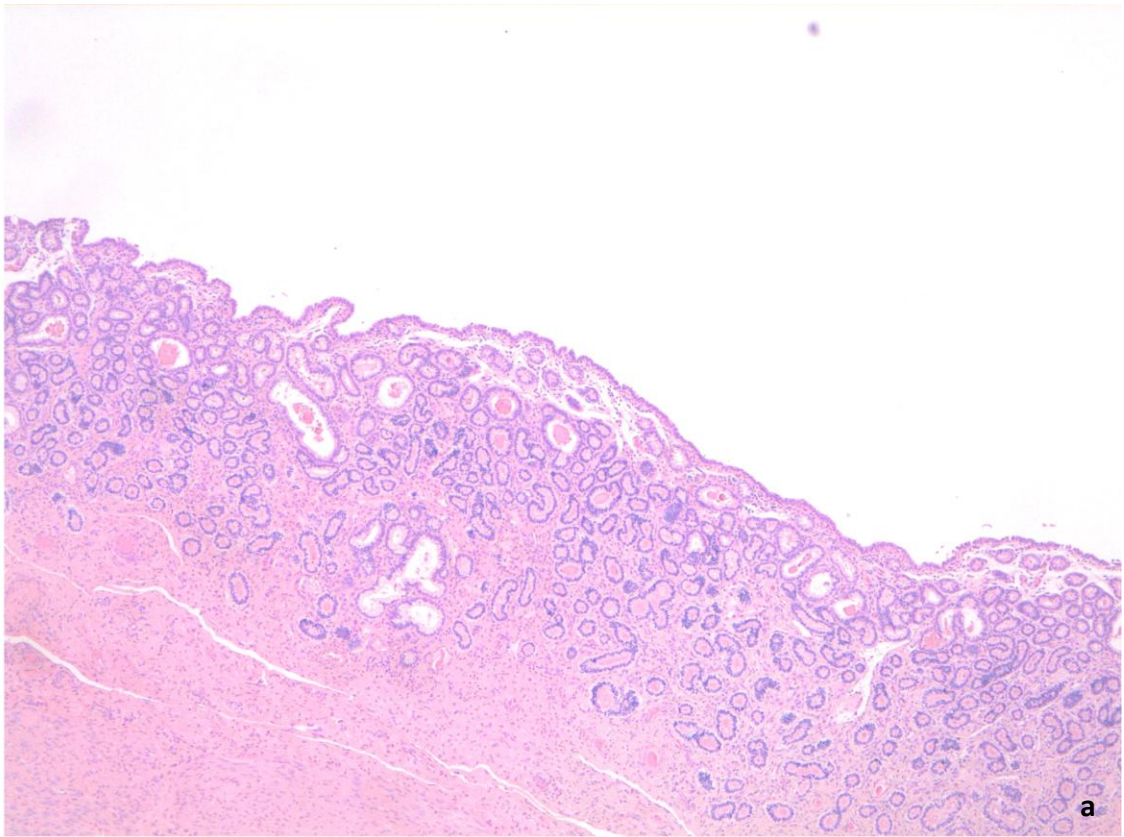


Figura 8. Sezione endometriale, categoria IIa. **a:** ematossilina-eosina, 5x; **b:** tricromica di Masson, 5x.

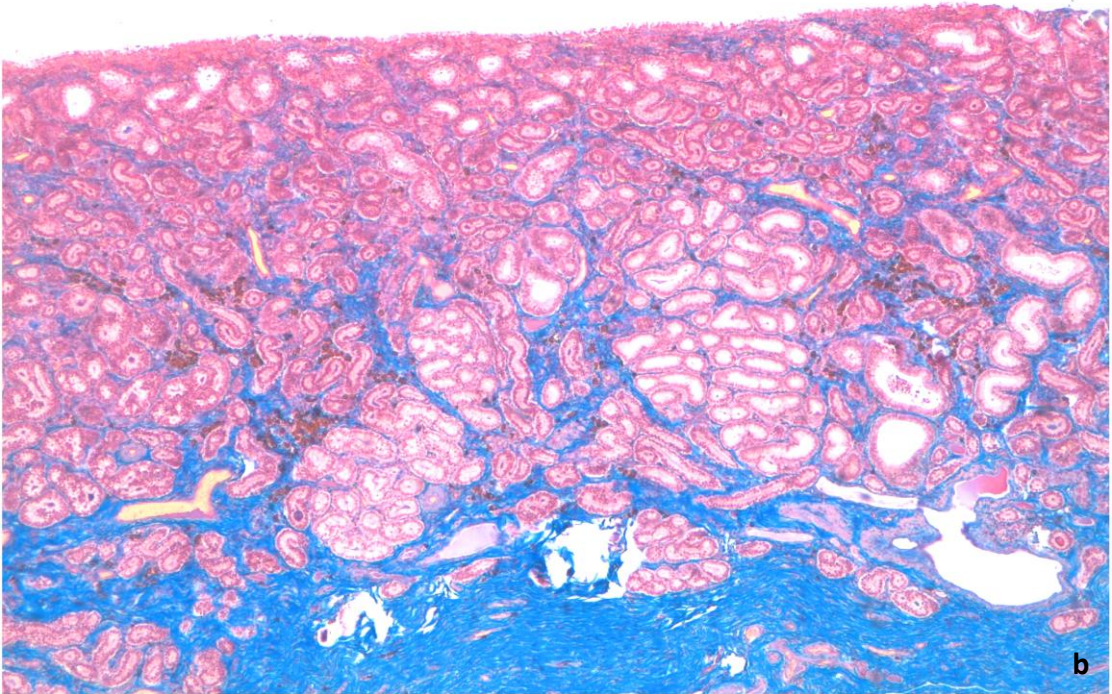
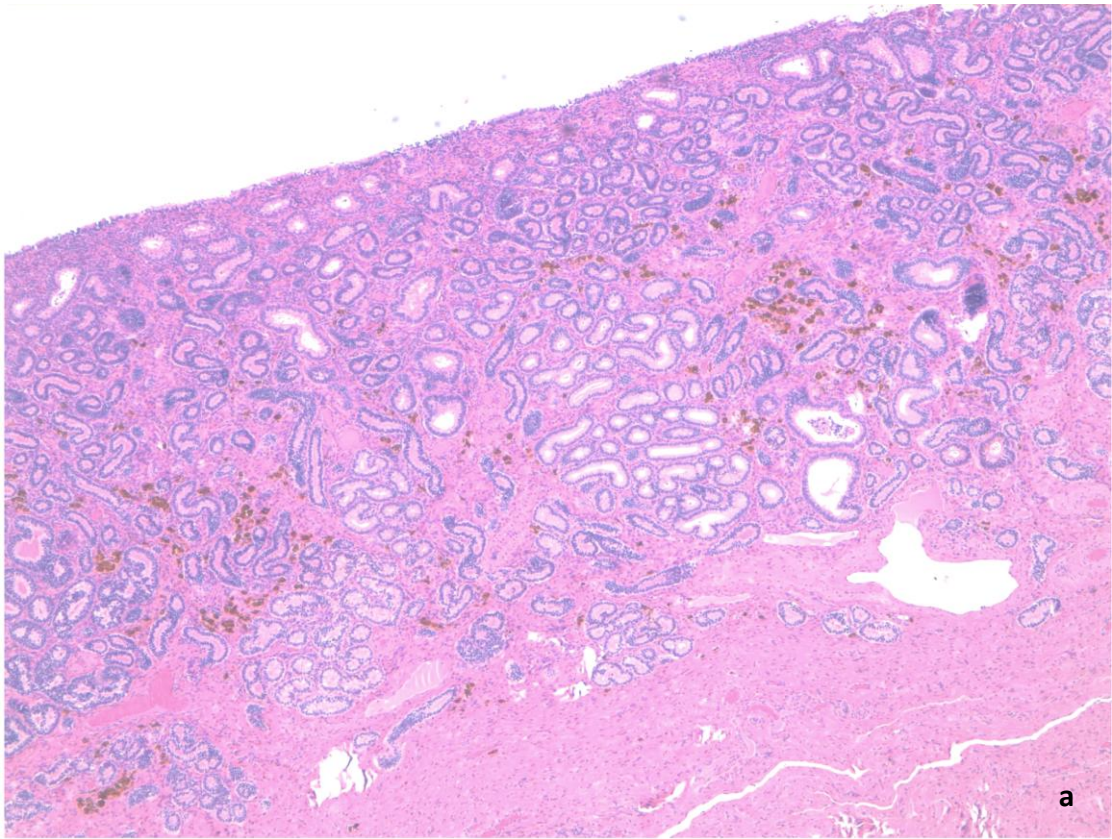


Figura 9. Sezione endometriale, categoria IIb. **a:** ematossilina-eosina, 5x; **b:** tricromica di Masson, 5x.

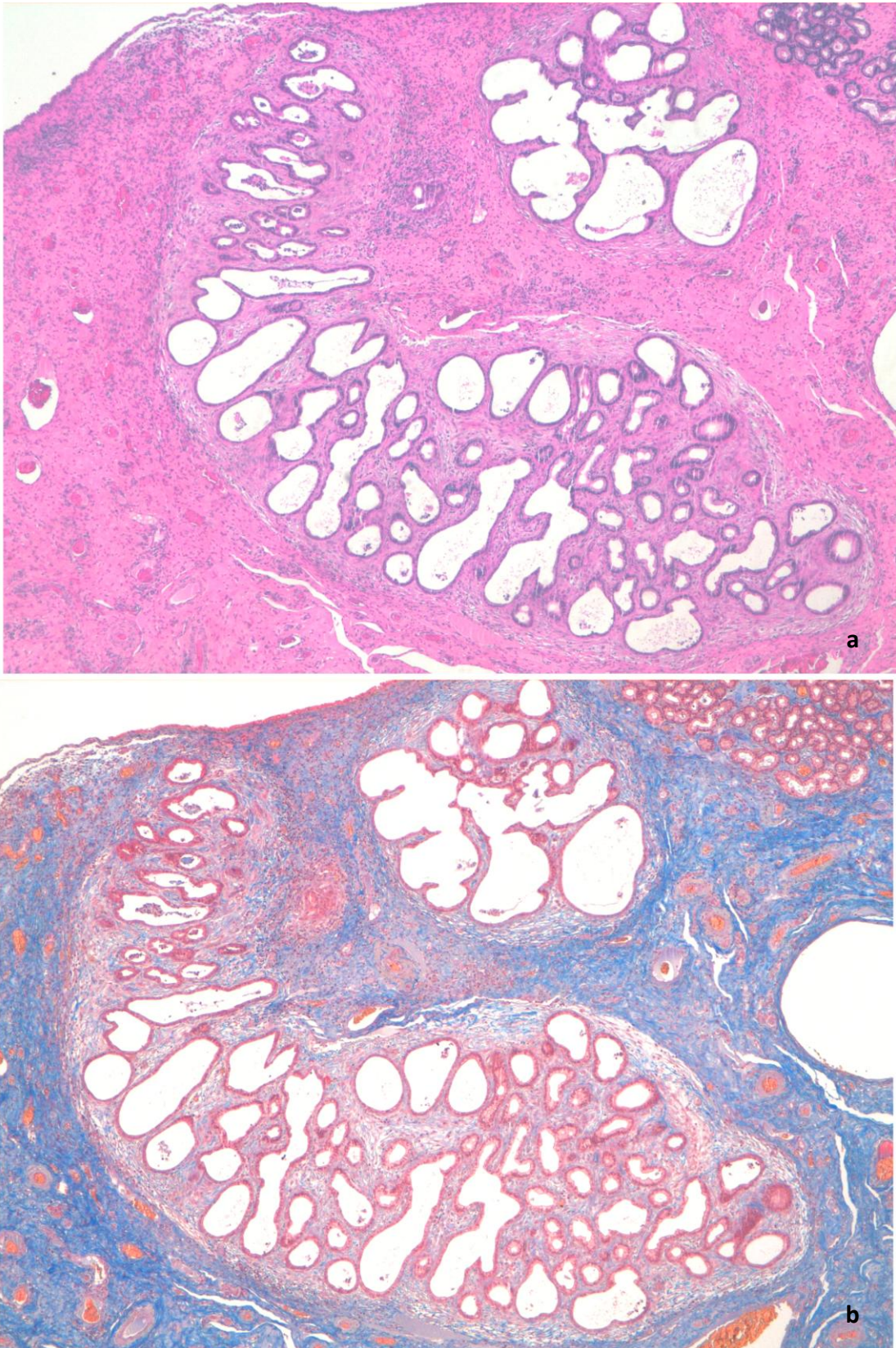


Figura 10. Sezione endometriale, categoria III. **a:** ematossilina-eosina, 5x; **b:** tricromica di Masson, 5x.

Le sezioni di parete uterina e le sezioni biottiche sono state separatamente valutate nelle due colorazioni, al fine di determinare un *grading* per la parete e uno per la biopsia.

La classificazione finale del campione è costituita dalla media dei due *grading*.

A loro volta, il *grading* di parete e il *grading* di biopsia sono il risultato di un'analisi della fibrosi e dell'infiammazione, ottenuto utilizzando i seguenti quattro parametri:

1. numero di "nidi" ghiandolari fibrotici (fig. 11a);
2. numero di ectasie nelle ghiandole endometriali (fig. 11b);
3. numero di cellule infiammatorie a livello sub epiteliale (fig. 11c);
4. numero di esocitosi nell'epitelio ghiandolare (fig. 11d).

I parametri 1 e 2 sono stati usati per la valutazione della fibrosi, i parametri 3 e 4 per l'infiammazione.

Il parametro fondamentale su cui ci si è basati è il **numero di "nidi" ghiandolari fibrotici**.

In base ad esso, le categorie sono state così attribuite (valutate su quattro campi lineari di 5mm ciascuno):

- <1 "nido" ghiandolare fibrotico per campo (da 1 a 3 totali): categoria I
- <2 "nidi" ghiandolari fibrotici per campo (da 4 a 7 totali): categoria IIA
- da 2 a 4 "nidi" ghiandolari fibrotici per campo (da 8 a 16 totali): categoria IIB
- >5 "nidi" ghiandolari fibrotici per campo (>16 totali): categoria III

Il **numero di ectasie ghiandolari** è stato valutato come valore soglia: oltre il numero di 50 ectasie ghiandolari (in almeno quattro campi lineari di 5mm ciascuno), il campione è stato classificato nella categoria di gravità superiore (vedi tabella 2, es. 1).

Per quanto riguarda l'analisi dell'infiammazione, le categorie sono state così assegnate (valutando 10 campi microscopici a 40x):

per il **numero di cellule infiammatorie**:

- <100 cellule infiammatorie: categoria I
- tra 100 e 150 cellule infiammatorie: categoria IIA

- tra 150 e 200 cellule infiammatorie: categoria IIB
- >200 cellule infiammatorie: categoria III

per il **numero di esocitosi**:

- < 5 esocitosi: categoria I
- tra 5 e 15 esocitosi: categoria IIA/IIB
- > 15 esocitosi: categoria III

L'infiammazione è stata analizzata come parametro in aggiunta alla fibrosi. Nei casi in cui il *grading* infiammatorio fosse risultato inferiore a quello fibrotico, rimaneva valido quest'ultimo (vedi tabella 2, es. 2); se il *grading* infiammatorio fosse stato invece superiore, veniva attribuita al campione una categoria in più rispetto a quella stabilita con il *grading* di fibrosi (vedi tabella 2, es. 3).

Nei casi che presentassero assenza di fibrosi sia nel campione di parete sia nel campione di biopsia (categoria I), il *grading* infiammatorio non veniva considerato (vedi tabella 2, es. 4).

Il *grading* infiammatorio ha come parametro cardine il numero di cellule infiammatorie. Il **numero di esocitosi** è stato preso in considerazione quando la categoria attribuita ad un campione secondo il numero di esocitosi risultasse superiore rispetto a quella attribuita secondo la conta di cellule infiammatorie: in questo caso si manteneva la categoria con maggiore gravità (vedi tabella 2, es. 5).

Nei casi appartenenti alle categorie IIA e IIB, quando sia le alterazioni infiammatorie sia quelle fibrotiche qualificassero per la stessa categoria, l'endometrio è stato classificato come appartenente ad una categoria di maggiore gravità (da IIA a IIB e da IIB a III) (vedi tabella 2, es. 6).

Nel confrontare il *grading* di parete e di biopsia al fine di determinarne uno totale, qualora i due *grading* differissero, se il *grading* fibrotico della biopsia risultasse inferiore a quello della parete e le categorie infiammatorie di biopsia e/o di parete fossero basse (I o IIA), si manteneva il *grading* di biopsia (quindi in genere una categoria al di sotto del *grading* di parete) (vedi tabella 2, es. 7).

Nella tabella 2 sono stati esemplificati i metodi di attribuzione del *grading*:

Esempio			
1	Nr "nidi": 5 (IIA)	Nr ectasie: 52	G finale: IIB
2	G fibrosi: IIB	G infiammazione: IIA	G finale: IIB
3	G fibrosi: IIA	G infiammazione: IIB	G finale: IIB
4	G fibrosi: I	G infiammazione: IIB	G finale: I
5	CCI: 155 (IIB)	Nr ectasie: 18 (III)	G finale: III
6	G fibrosi: IIA	G infiammazione: IIA	G finale: IIB
7	<u>Parete</u>	<u>Biopsia</u>	G finale: IIA
	G fibrosi: IIB	G fibrosi: IIA	
	G infiammazione: IIA	G infiammazione: I	

Tabella 2 Tabelle esplicative del metodo di attribuzione dei *grading* di endometriosi. G: *grading*; CCI: conta cellule infiammatorie.

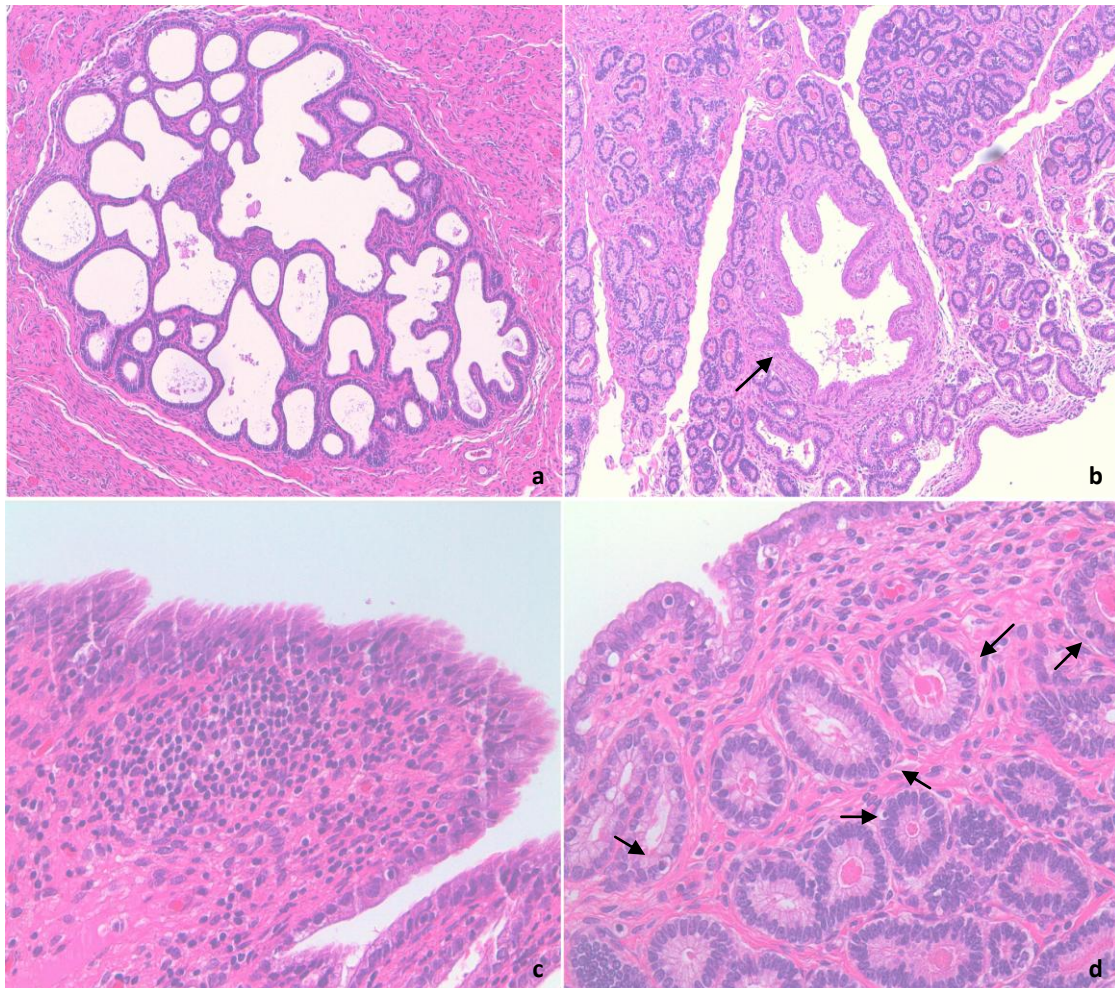


Figura 11a. Sezione endometriale con nido ghiandolare fibrotico (ematossilina-eosina, 5x).

Figura 11b. Sezione endometriale con ectasia ghiandolare, segnata con la freccia (ematossilina-eosina, 5x).

Figura 11c. Sezione endometriale con infiltrato infiammatorio sub-epiteliale (ematossilina-eosina, 20x).

Figura 11d. Sezione endometriale con esocitosi nell'epitelio ghiandolare, segnate con le frecce (ematossilina-eosina, 20x).

3.3 INDAGINE IMMUNOISTOCHEMICA

Dei 35 campioni, sono stati testati tutti i 15 campioni provenienti dalle cavalle anziane e 2 campioni di cavalle giovani, uno in fase di estro ed uno in fase di diestro, scelti tra gli appartenenti alla categoria I ed usati come controllo. Ogni campione è stato analizzato con 4 anticorpi differenti: MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-2. L'analisi è stata effettuata solo sui campioni di intera parete uterina.

Nel dettaglio sono state effettuate sezioni seriali consecutive a 4 µm, montate su vetrini trattati in polilisina (Superfrost® Plus).

Il primo passaggio ha previsto l'incubazione per 30 minuti a 37°C.

L'indagine immunoistochimica è avvenuta mediante l'uso di un immunocoloratore automatico BenchMark® (Ventana Medica System). L'immunocoloratore è in grado di lavorare a temperature variabili stabilite dalle diverse fasi del protocollo e utilizza un sistema di rilevazione *ultraView™ Universal DAB*, un sistema *biotina-free* basato sull'utilizzo di un multimeri complessato all'enzima perossidasi *Horse-raddish*, capace di identificare in modo sensibile anticorpi primari di topo e coniglio. Il kit comprende 5 componenti:

- *ultraView™ Universal DAB Inhibitor*, impedisce un'aspecifica per ossidazione della DAB;
- *ultraView™ Universal DAB HPR Multimer*, un multimeri *biotina-free* complessato con la perossidasi *horse-raddish*;
- *ultraView™ Universal DAB Chromogen* (diaminobenzidina);
- *ultraView™ Universal DAB H₂O₂* (perossido di idrogeno), permette l'attivazione della perossidasi che a sua volta attiva la diaminobenzidina. Quest'ultima, fungendo da substrato, consente la formazione del prodotto finale (di colore marrone e insolubile in alcool);
- *ultraView™ Universal DAB Copper*.

Durante tutta la procedura i vetrini sono ricoperti di una soluzione oleosa che crea una camera umida sul tessuto; i reagenti sono distribuiti automaticamente, fatta eccezione per la titolazione con l'anticorpo primario che viene dispensato manualmente.

Al termine della corsa i vetrini vengono accuratamente lavati in acqua e sapone per eliminare la soluzione oleosa; poi si procede alla disidratazione attraverso passaggi di

due minuti ciascuno in soluzioni ascendenti di alcool (50%, 70%, 90%, 100) e in xilene; infine i vetrini vengono montati con Eukit (Bio-Optica®).

I protocolli adottati e gli anticorpi utilizzati sono stati riassunti nella tabella 2.

Marcatore molecolare	Anticorpo	Diluizione	Fasi di smascheramento	Tempo e temperatura di incubazione	Contro-colorazione
MMP 2	Rabbit polyclonal Ab RB 1537- P Thermo scientific® Labvision	1: 100	CRS	30 min a 42°C	4 min Ematossilina
MMP 9	Mouse monoclonal Ab MAB 3309 Clone 56-2A4 Millipore™	1:200	CCR	32 min a 42°C	4 min Ematossilina
MMP 14	Rabbit polyclonal Ab AB 8221 Millipore™	1:500	CCR	32 min a 42°C	4 min Ematossilina
TIMP 2	Mouse monoclonal Ab MAB 3310 Clone 67- 4H11 Chemicon International®	1:500	CCR	32 min a 42°C	4 min Ematossilina

Tabella 3 Descrizione fasi principali protocolli immunostochimici adottati. CRS, *cell conditioning standard*: 60 minuti a 95°C; CCR, *cell conditioning ridotto*: 30 minuti a 95°C.

3.3.1 Valutazione immunoistochimica

L'immunoreattività è stata valutata semi-quantitativamente al microscopio ottico (Nikon® Eclipse E200).

Per **MMP-2, 9 e 14** sono stati valutati due parametri:

- la **percentuale di cellule stromali positive (A)**. Sono stati selezionati due campioni di parete controllo e due campioni di parete di cavalle anziane per contare il numero di cellule stromali presenti in 10 campi microscopici a 40x, ottenendo così due valori medi: 2620 sui campioni controllo, 2330 sui campioni di cavalle anziane. Il numero di cellule risultate positive all'anticorpo rispetto al totale di cellule contate è stato poi espresso in percentuale;
- l'**intensità** della reazione colorimetrica (**B**), classificata come segue:
 - 0: assenza della reazione colorimetrica (-),
 - 1: reazione colorimetrica di scarsa intensità (+),
 - 2: reazione colorimetrica di moderata intensità (++) ,
 - 3: reazione colorimetrica intensa (+++).

I parametri **A** (percentuale di cellule stromali positive) e **B** (intensità della reazione colorimetrica) sono stati correlati tra loro attraverso una moltiplicazione (AxB), ottenendo un dato numerico tra 0 e 300.

Per **TIMP 2** è stata valutata solamente l'**intensità** di reazione colorimetrica, sempre con la stessa modalità di classificazione precedente.

3.4 ANALISI STATISTICHE

I risultati istologici sono stati analizzati tramite analisi della varianza (ANOVA, SAS Inst., Inc., Cary, NC), test di correlazione di Pearson e test del χ^2 .

I risultati immunoistochimici sono stati analizzati tramite analisi della varianza (ANOVA, SAS Inst., Inc., Cary, NC) e test di correlazione di Pearson.

Il limite di significatività è stato posto <0,05.

4 RISULTATI e DISCUSSIONE

Sono stati esaminati 35 campioni di utero di cavalla. La tabella 4 riassume le informazioni relative ai soggetti esaminati che, come si è detto, sono stati scelti in base ad un unico dato anamnestico, l'età (compresa tra 2 e 4 anni o > di 12 anni). Eccetto che per l'età, l'anamnesi di questi individui, tutti ovviamente di sesso femminile, è muta.

	Cavalle giovani (2-4 anni)			Cavalle anziane (>12anni)		
	Data di nascita	Età	Codice CASO	Data di nascita	Età	Codice CASO
1	28/08/06	3a	23018	18/03/1996	13a	23024
2	05/07/05	4a	23019	1992	17a	23424
3	28/02/05	4a	23020	15/04/1992	17a	23426
4	16/03/06	3a	23021	1993	16a	23427
5	26/03/06	3a	23022	12/03/1990	19a	23547
6	19/06/06	3a	23062	25/04/1995	14a	23691
7	20/07/06	3a	23064	20/03/1996	13a	23989
8	20/05/05	4a	23065	22/04/1996	13a	23990
9	30/10/06	3a	23067	28/04/1995	14a	24391
10	25/01/05	4a	23068	09/05/1996	13a	24394
11	22/04/06	3a	23195	25/04/1993	16a	25325
12	20/02/06	3a	23196	10/04/1994	15a	25326
13	26/10/06	3a	23197	1996	13a	25501
14	15/06/06	3a	23198	1996	13a	25502
15	05/05/06	3a	23199	27/03/1996	13a	26009
16	25/05/07	2a	23200			
17	17/04/06	3a	23202			
18	02/04/06	3a	23546			
19	27/03/05	4a	23986			
20	27/06/05	4a	24390			

Tabella 4. Elenco dei casi esaminati suddivisi nelle due categorie: animali giovani e animali anziani, con età e codice di catalogazione.

4.1 VALUTAZIONE E CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA

I campioni uterini sono stati così classificati in base al ciclo estrale:

- nel gruppo delle cavalle giovani: 8 casi in diestro, 12 casi in estro;
- nel gruppo delle cavalle anziane: 2 casi in diestro, 13 casi in estro.

Nella valutazione dell'endometriosi, i campioni sono stati classificati:

- nel gruppo delle cavalle giovani: 19 casi di categoria I, 1 caso di categoria IIA;
- nel gruppo delle cavalle anziane: 2 casi di categoria IIA, 6 casi di categoria IIB e 7 casi di categoria III.

Le tabelle 5 e 5.1 riassumono i dati ottenuti nei due gruppi per ogni parametro, i diversi *grading* di fibrosi e infiammazione per il campione di parete uterina e biotico, *grading* totale di parete, di biopsia e il *grading* finale.

Campione	Fase del Ciclo	Nr "nidi" ghiandolari		Nr Ectasie Ghiandolari		Conta Cellule Infiammatorie		Nr Esocitosi		Grading						
		C	D	C	D	C	D	C	D	Cf	Ci	Ctot	Df	Di	Dtot	Tot
23018	estro	0	3	31	37	105	20	15	7	I	IIA	I	I	I	I	I
23019	diestro	0	2	25	7	257	230	18	8	I	III	I	I	III	I	I
23020	estro	0	0	21	2	43	70	4	5	I	I	I	I	I	I	I
23021	estro	0	2	27	16	64	56	37	7	I	I	I	I	I	I	I
23022	diestro	0	0	20	6	67	35	4	1	I	I	I	I	I	I	I
23062	estro	0	1	16	5	17	15	8	10	I	I	I	I	I	I	I
23064	diestro	0	0	19	7	74	66	5	6	I	I	I	I	I	I	I
23065	diestro	0	0	0	0	104	106	6	5	I	IIA	I	I	IIA	I	I
23067	estro	3	3	25	11	54	160	5	6	I	I	I	I	IIA	I	I
23068	estro	3	3	52	25	18	62	7	3	I	I	I	I	I	I	I
23195	diestro	0	0	113	28	76	234	2	2	IIA	I	IIA	I	IIB	I	IIA
23196	estro	2	2	4	0	149	159	11	11	I	IIA	I	I	IIB	I	I
23197	estro	0	0	6	2	88	102	9	7	I	I	I	I	IIA	I	I
23198	estro	0	0	5	3	63	78	5	6	I	I	I	I	I	I	I
23199	diestro	2	2	11	46	74	108	7	6	I	I	I	I	IIA	I	I
23200	diestro	0	1	2	6	47	74	0	2	I	I	I	I	I	I	I
23202	estro	0	0	14	2	197	83	7	4	I	IIB	I	I	I	I	I
23546	estro	0	0	0	0	154	118	5	3	I	IIB	I	I	IIA	I	I
23986	diestro	0	1	10	14	250	124	2	3	I	III	I	I	IIA	I	I
24390	estro	0	0	5	7	99	87	3	2	I	I	I	I	I	I	I

Tabella 5. Animali giovani (2-4 aa). Classificazione istologica dei campioni secondo la fase del ciclo e il *grading* di endometriosi. C: campione parete, D: campione biopsia; Cf: *grading* fibrosi parete; Ci: *grading* infiammazione parete; Ctot: *grading* totale parete; Df: *grading* fibrosi biopsia; Di: *grading* infiammazione biopsia; Dtot: *grading* totale biopsia; Tot: *grading* finale.

Campione	Fase del Ciclo	Nr "nidi" ghiandolari		Nr Ectasie ghiandolari		Conta Cellule Infiammorie		Nr Esocitosi		Grading						
		C	D	C	D	C	D	C	D	Cf	Ci	Ctot	Df	Di	Dtot	Tot
23024	estro	10	8	47	17	400	500	7	12	III	III	III	IIB	III	III	III
23424	diestro	28	14	13	14	92	41	5	3	III	I	III	IIB	I	IIB	IIB
23426	diestro	19	14	140	45	332	89	12	10	III	III	III	III	IIA	III	III
23427	estro	20	34	50	24	113	121	12	9	III	IIA	III	III	IIA	III	III
23547	estro	32	17	27	21	166	195	8	4	III	IIB	III	III	IIB	III	III
23691	estro	6	15	13	12	209	197	5	4	IIA	III	IIB	IIB	IIA	IIB	IIB
23989	estro	19	14	19	15	212	98	0	0	III	III	III	IIB	I	IIB	IIB
23990	estro	4	2	9	4	119	224	3	2	IIA	IIA	IIA	I	III	I	IIA
24391	estro	8	13	8	6	86	102	4	0	IIB	I	IIB	IIB	IIA	IIB	IIB
24394	estro	6	7	7	6	164	193	5	10	IIA	IIB	IIB	IIA	IIB	IIB	IIB
25325	estro	1	8	6	4	103	98	1	1	I	IIA	I	IIB	I	IIB	IIA
25326	estro	38	32	29	13	177	95	3	2	III	IIB	III	III	I	III	III
25501	estro	17	11	9	16	73	93	3	2	III	I	III	IIB	I	IIB	IIB
25502	estro	21	18	14	26	112	253	9	7	III	IIA	III	III	III	III	III
26009	estro	9	13	12	10	230	212	7	6	IIB	III	III	IIB	III	III	III

Tabella 5.1 Animali anziani (>12 aa). Classificazione istologica dei campioni secondo la fase del ciclo e il grading di endometriosi. C: campione parete, D: campione biopsia; Cf: grading fibrosi parete; Ci: grading infiammazione parete; Ctot: grading totale parete; Df: grading fibrosi biopsia; Di: grading infiammazione biopsia; Dtot: grading totale biopsia; Tot: grading finale.

Al momento del prelievo, non sono state osservate lesioni **a livello macroscopico**. Tutti i campioni classificati in fase estrale presentavano pliche uterine ben sviluppate e un certo grado di edema, mentre quelli classificati in diestro presentavano pliche di ridotte dimensioni e assenza di edema.

All'**istologia**, nei **soggetti giovani**, le ghiandole apparivano normali e i pochi "nidi" ghiandolari fibrotici avevano distribuzione multifocale ed erano di modeste dimensioni, coinvolgendo una o poche ghiandole. Ove presente, l'ectasia era di moderata entità. A livello perighiandolare, lo stroma connettivale manteneva la normale struttura.

L'infiltrato infiammatorio a livello sub-epiteliale (strato compatto) si presentava da lieve a moderato, con prevalenza di linfociti e plasmacellule ed era disposto in *foci* discreti. Si osservavano in sporadici casi granulociti eosinofili e neutrofili.

Mentre questi ultimi sono generalmente abbondanti nelle endometriti acute (Doig e Waelchli, 1993), linfociti e plasmacellule sono tipici di infiammazioni croniche e lo stato

patologico si aggrava se sono presenti anche nello strato spongioso (Doig e Waelchli, 1993).

Solo in due casi (23019 e 23986) l'infiltrato infiammatorio si presentava grave.

Le esocitosi (presenza cellule infiammatorie tra le cellule dell'epitelio ghiandolare) si osservavano soprattutto a livello dello strato compatto e generalmente in corrispondenza dei *foci* infiammatori.

La presenza di edema mucosale era fisiologicamente (Doig e Waelchli, 1993) più elevata nei campioni in fase estrale rispetto a quelli in diestro.

Nei **soggetti anziani** si osservavano "nidi" ghiandolari fibrotici diffusi che coinvolgevano spesso più ghiandole contemporaneamente. I nidi apparivano generalmente separati dal resto dello stroma connettivale da più strati di connettivo fibroso, in numero crescente in base alla gravità della lesione. La loro distribuzione non era uniforme, fatta eccezione per quattro casi.

23426 e 23427 presentavano sia nello strato compatto, sia in quello spongioso enormi "nidi" ghiandolari suddivisi solamente da tessuto fibrotico: l'aspetto morfologico risultava completamente alterato. 23547 e 25326 invece presentavano "nidi" ghiandolari di piccole dimensioni, che coinvolgevano per lo più una o poche ghiandole mantenendo sostanzialmente la struttura funzionale dell'endometrio.

All'interno dei "nidi", le ghiandole apparivano fortemente ectasiche e davano spesso all'endometrio il tipico aspetto "a formaggio svizzero", fisiologico nelle fasi di transizione ma non nelle fasi attive del ciclo (estro e diestro) (Doig e Waelchli, 1993).

L'infiltrato infiammatorio appariva nella maggior parte dei casi da moderato a grave. Anche in questo caso prevalevano i linfociti e plasmacellule, con una distribuzione diffusa sia a livello sub-epiteliale, sia più in profondità nella lamina propria.

Le esocitosi presentavano la stessa distribuzione dei soggetti giovani.

In entrambe le categorie non sono stati osservati campioni con atrofia endometriale.

Le lacune linfatiche non sono mai state valutate come parametro poiché i campioni sono prelevati da animali dissanguati.

4.2 ANALISI STATISTICHE

4.2.1 ANOVA

Nella tabella 6 sono riassunti i valori di media stimata, errore standard, valore di significatività (*p-value*), varianza di errore ed R^2 del modello di analisi, ottenuti comparando i diversi rilievi relativamente all'effetto dei due gruppi di età.

	Anziane		Giovani		p	Var. errore	R ²
	LSMEANS	e. s.	LSMEANS	e. s.			
"Nidi" ghiandolari:							
- Biopsia	14,48	1,69	0,95	1,30	<0,001***	32,61	0,61
- Parete	16,61	2,12	0,70	1,63	<0,001***	51,74	0,55
Ectasie:							
- Biopsia	18,47	3,46	12,00	2,66	0,13 ns	137,05	0,11
- Parete	34,55	8,37	22,39	6,43	0,24 ns	802,70	0,11
Conta Cellule Infiammatorie:							
- Biopsia	166,13	25,69	99,00	19,75	0,04*	7567,43	0,14
- Parete	185,33	23,58	103,49	18,12	0,007**	6370,73	0,20
Esocitosi:							
- Biopsia	4,51	0,98	5,12	0,76	0,61 ns	11,10	0,01
- Parete	4,80	1,94	7,78	1,49	0,21 ns	43,27	0,05
Grading Fibrosi:							
- Biopsia	2,17	0,16	0,01	0,12	<0,001***	0,30	0,80
- Parete	2,38	0,20	0,08	0,16	<0,001***	0,47	0,73
Grading Infiammazione:							
- Biopsia	1,40	0,31	0,67	0,24	0,062 ns	1,11	0,10
- Parete	1,75	0,33	0,67	0,25	0,01 **	1,23	0,18
Grading finale:							
	2,39	0,15	0,06	0,11	<0,001***	0,25	0,84

Tabella 6 LSMEANS: media stimata; e. s. : errore standard; p: *p-value*; Var. errore: varianza di errore; ns: non significativo; *: significativo $p < 0,05$, **: molto significativo $p < 0,01$; ***: fortemente significativo $p < 0,001$. I valori numerici assegnati alle categorie per consentirne la valutazione sono stati: categoria I: 0; categoria IIA: 1, categoria IIB: 2; categoria III: 3.

I valori evidenziati in arancione sono rappresentati nel grafico 1.

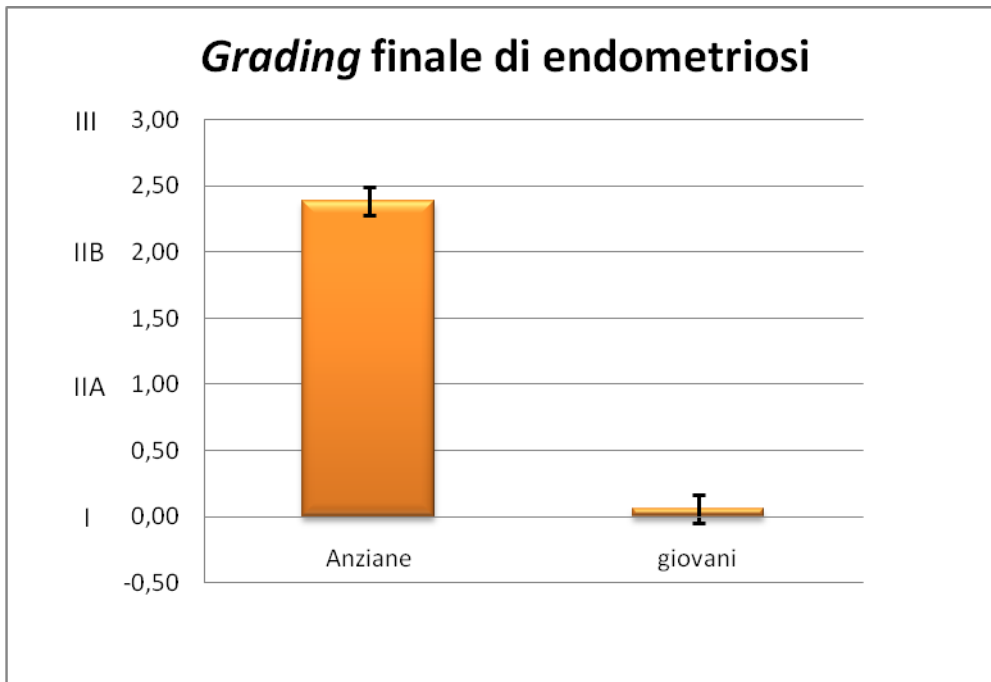


Grafico 1 Istogramma raffigurante la media stimata del *grading* finale di endometriosi e l'errore standard nelle due classi d'età: cavalle anziane e cavalle giovani.

Grafico 1

Questo istogramma rappresenta graficamente la media stimata dei *grading* finali delle cavalle anziane rispetto a quello delle cavalle giovani. È evidente una notevole differenza, significativamente legata all'età ($p < 0,001$).

Come già affermato in altri studi (Doig *et al.*, 1981; Ricketts e Alonso, 1991), anche la nostra casistica conferma la relazione tra età e categoria di endometriosi.

In particolare l'età ha un effetto:

- fortemente significativo ($p < 0,001$) sul numero di "nidi" ghiandolari fibrotici e sul *grading* di fibrosi, sia nel campione di parete sia in quello bioptico;
- significativo ($p < 0,05$) sul numero di cellule infiammatorie nel campione di parete e di biopsia e sul *grading* infiammatorio nel campione di parete.

Al contrario, per il campione di parete o di biopsia la differenza di fase del ciclo (estro o diestro) non dimostra un effetto significativo ($p > 0,05$) né sul il *grading* di endometriosi, né sugli altri rilievi effettuati (vedi tabella I in Appendice).

Questo dato ci appare di particolare importanza: il prelievo per la diagnosi di endometriosi può essere effettuato in estro o in diestro senza il rischio che la fase del ciclo influenzi significativamente il *grading*. È però vero, come affermano diversi studi (Doig e Waelchli, 1993; Evans *et al.*, 1998), che la corretta stima della fase del ciclo

basata solo sulle caratteristiche istologiche non è spesso attendibile per tutte le cavalle, poiché esistono parecchie differenze individuali e talvolta anche tra le sezioni di uno stesso campione. Al fine di avvalorare quanto inizialmente affermato, sarebbe dunque utile affiancare al prelievo biotico dei dosaggi ormonali.

4.2.2 Test di correlazione di Pearson

I risultati del test di correlazione di Pearson per le diverse variabili considerate sono riassunti nelle tabelle 7 e 7. 1.

Coefficiente di correlazione (r) tra parete e biopsia	
Numero "nidi" ghiandolari	0,86
Numero ectasie ghiandolari	0,64
Conta cellule Infiammatorie	0,61
Numero esocitosi	0,50
<i>Grading</i> fibrosi	0,90
<i>Grading</i> infiammazione	0,45
<i>Grading</i> totale	0,92

Tabella 7 Coefficiente di correlazione tra i quattro parametri e i *grading* nel campione di parete uterina e nel campione biotico.

Coefficiente di correlazione (r) con il <i>grading</i> finale	
<i>Grading</i> fibrosi PARETE	0,93
<i>Grading</i> fibrosi BIOPSIA	0,94
<i>Grading</i> infiammazione PARETE	0,47
<i>Grading</i> infiammazione BIOPSIA	0,39
<i>Grading</i> totale PARETE	0,97
<i>Grading</i> totale BIOPSIA	0,97

Tabella 7.1 Coefficiente di correlazione tra i *grading* parziali di parete o biopsia e il *grading* finale.

La fibrosi appare fortemente correlata al *grading* finale per entrambe le tecniche di prelievo ($r=0,93$ per la parete, $r=0,94$ per la biopsia); questo risultato è concorde con i più recenti studi (Hoffmann *et al.*, 2009), nei quali è sottolineato come la degenerazione fibrotica perighiandolare e/o stromale sia concausa ed esito dell'endometriosi.

Il *grading* sulla base dell'infiammazione invece ha scarsi legami con la classificazione finale dell'endometriosi: in particolare, osservando le due tecniche di prelievo, il campione di parete uterina dimostra una correlazione più marcata ($r=0,47$) rispetto al

campione bioptico ($r=0,39$). Nello studio effettuato da Hoffmann *et al.* nel 2009, si è osservata un'affinità statisticamente significativa tra endometrite ed endometriosi; inoltre 10 dei 20 casi in cui è stata indotta un'endometrite batterica essudativa hanno mostrato un'attivazione delle cellule stromali fibrotiche 5 giorni post-infezione. Tuttavia, la maggior parte dei casi (18 su 20) non ha mostrato un aggravamento del grado di endometriosi durante i due anni di sperimentazione. Questo appare in accordo con i nostri risultati: come si è già spiegato a proposito delle MMP, l'infiammazione è un agente causale patogeneticamente influente nella formazione della fibrosi, ma la sua presenza in concomitanza con l'endometriosi non è direttamente dimostrabile come invece la fibrosi.

Per quanto riguarda invece l'attendibilità della biopsia rispetto al campione di intera parete, non esistono dati in bibliografia. Quanto si osserva dalla nostra casistica è una forte correlazione positiva tra i due *grading* ($r=0,92$), questo significa che la biopsia è sicuramente attendibile come metodo di verifica dell'endometriosi. Analizzando i singoli parametri di parete e di biopsia, c'è una forte correlazione per i "nidi" ghiandolari ($r=0,86$) e una correlazione moderata per il numero di ectasie ($r=0,64$); per entrambi gli indicatori dell'infiammazione, numero di cellule infiammatorie e numero delle esocitosi, la correlazione è moderata (rispettivamente $r=0,61$ e $r=0,50$).

Nei grafici 2 e 3 sono analizzati in dettaglio i valori ottenuti nel campione di parete e in quello bioptico per i parametri numero "nidi" ghiandolari fibrotici e conta delle cellule infiammatorie.

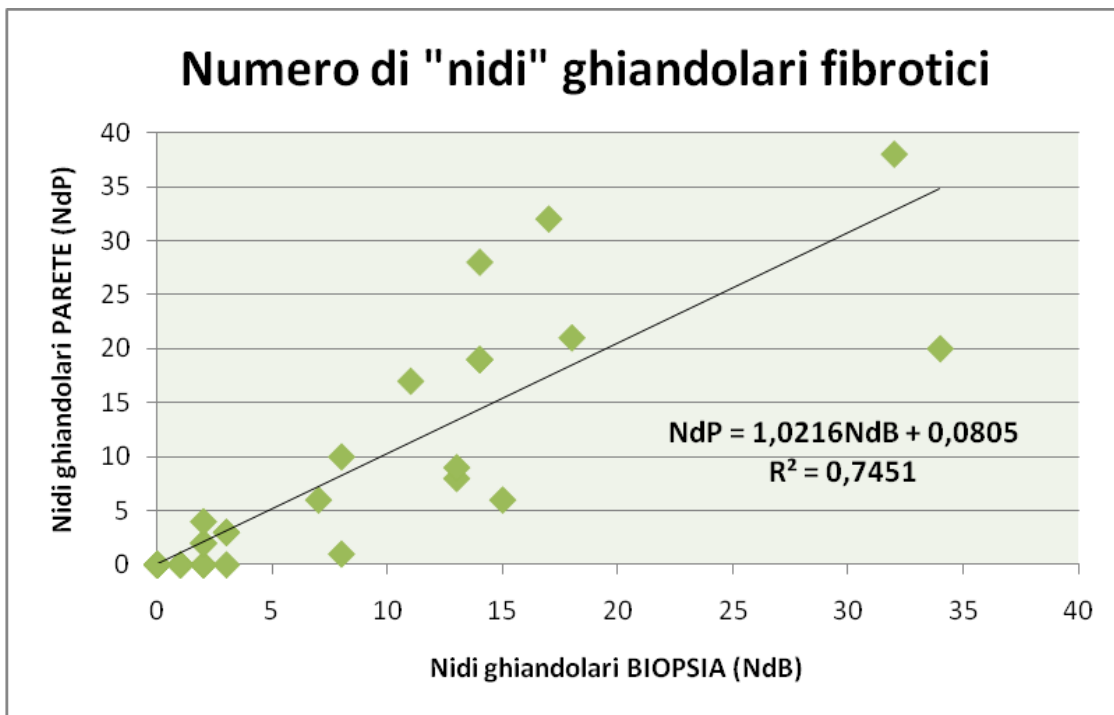


Grafico 2 Modello di regressione lineare: i "nidi" ghiandolari in biopsia (NdB) sono in ascissa, mentre i "nidi" ghiandolari in parete (NdP) sono in ordinata.

Grafico 2

Grafico a dispersione dei valori osservati sui "nidi" ghiandolari. Il numero di "nidi" ghiandolari fibrotici osservati in biopsia è utilizzato come variabile dipendente ed il numero dei "nidi" ghiandolari fibrotici in parete come predittore. Tracciata la retta di regressione lineare, si osserva come rispetto alla parete, la biopsia tenda a **sottostimare** leggermente il numero di "nidi" ghiandolari fibrotici (ogni 102 "nidi" in parete, la biopsia ne stima 100).

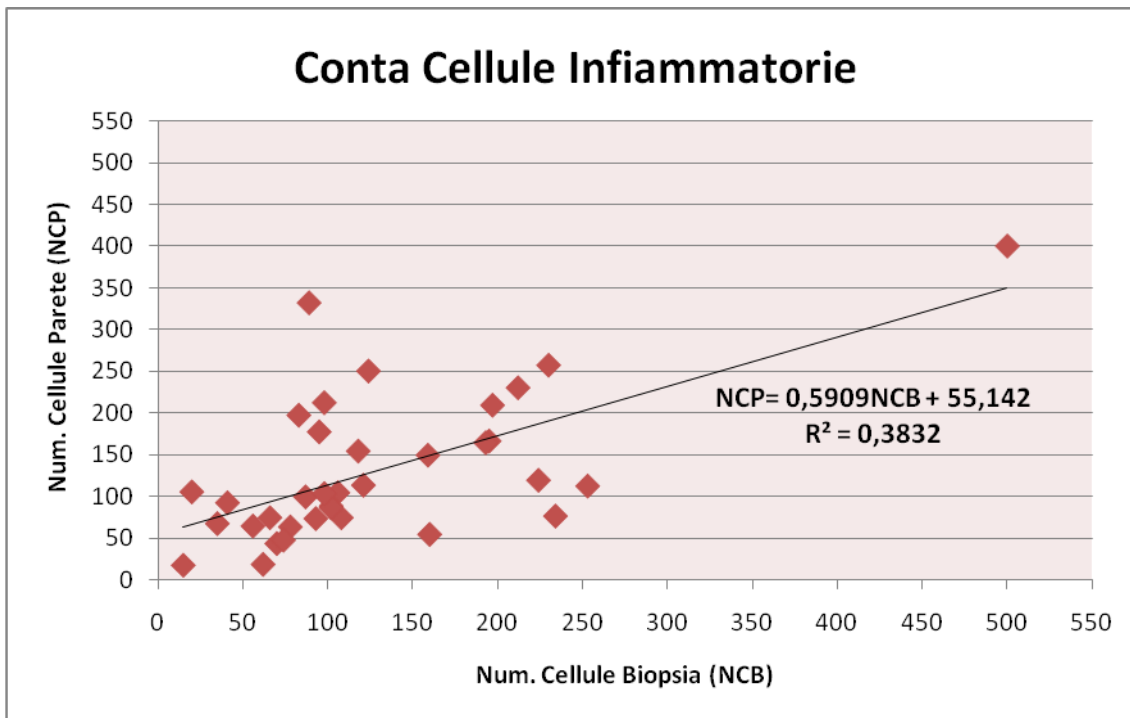


Grafico 3 Modello di regressione lineare: il numero di cellule infiammatorie in biopsia (NCB) è in ascissa, mentre il numero di cellule infiammatorie in parete (NCP) è in ordinata.

Grafico 3

Grafico a dispersione dei valori osservati nella conta di cellule infiammatorie. Il numero di cellule infiammatorie osservato in biopsia è utilizzato come variabile dipendente ed il numero cellule infiammatorie in parete come predittore. Tracciata una retta di regressione lineare, si osserva come rispetto alla parete, la biopsia tenda a **sovrastimare** in modo abbastanza evidente il numero di cellule infiammatorie (ogni 10 cellule contate nella biopsia, ne trovo circa 6 in parete).

Le variazioni osservate nel grafico 2 e 3 consentono comunque di mantenere un buon grado di accordo tra *grading* di parete e biopsia grazie agli intervalli considerati per ogni categoria.

4.2.3 Test del χ^2

Nella tabella 8 sono messi in evidenza i valori in accordo e in disaccordo nell'attribuzione del *grading* di endometriosi tra campione di parete e campione bioptico.

Campione	Gruppo di età	Fase del ciclo	Nr "nidi" Parete	Nr "nidi" Biopsia	Nr ectasie Biopsia	Nr ectasie Parete	CCI Biopsia	CCI Parete	Nr esocitosi Parete	Nr esocitosi Biopsia
23018	G	estro	3	0	37	31	20	105	7	15
23019	G	diestro	2	0	7	25	230	257	8	18
23020	G	estro	0	0	2	21	70	43	5	4
23021	G	estro	2	0	16	27	56	64	7	37
23022	G	diestro	0	0	6	20	35	67	1	4
23062	G	estro	1	0	5	16	15	17	10	8
23064	G	diestro	0	0	7	19	66	74	6	5
23065	G	diestro	0	0	0	0	106	104	5	6
23067	G	estro	3	3	11	25	160	54	6	5
23068	G	estro	3	3	25	52	62	18	3	7
23195	G	diestro	0	0	28	113	234	76	2	2
23196	G	estro	2	2	0	4	159	149	11	11
23197	G	estro	0	0	2	6	102	88	7	9
23198	G	estro	0	0	3	5	78	63	6	5
23199	G	diestro	2	2	46	11	108	74	6	7
23200	G	diestro	1	0	6	2	74	47	2	0
23202	G	estro	0	0	2	14	83	197	4	7
23546	G	estro	0	0	0	0	118	154	3	5
23986	G	diestro	1	0	14	10	124	250	3	2
24390	G	estro	0	0	7	5	87	99	2	3
23024	A	estro	8	10	17	47	500	400	12	7
23424	A	diestro	14	28	14	13	41	92	3	5
23426	A	diestro	14	19	45	140	89	332	10	12
23427	A	estro	34	20	24	50	121	113	9	12
23547	A	estro	17	32	21	27	195	166	4	8
23691	A	estro	15	6	12	13	197	209	4	5
23989	A	estro	14	19	15	19	98	212	0	0
23990	A	estro	2	4	4	9	224	119	2	3
24391	A	estro	13	8	6	8	102	86	0	4
24394	A	estro	7	6	6	7	193	164	10	5
25325	A	estro	8	1	4	6	98	103	1	1
25326	A	estro	32	38	13	29	95	177	2	3
25501	A	estro	11	17	16	9	93	73	2	3
25502	A	estro	18	21	26	14	253	112	7	9
26009	A	estro	13	9	10	12	212	230	6	7

Tabella 8 Sono evidenziati con un colore diverso per ogni parametro i valori che, nell'attribuzione del *grading* di endometriosi, risultano in disaccordo tra campione di parete e campione bioptico. G: gruppo cavalle giovani; A: gruppo cavalle anziane; CCI: conta cellule infiammatorie.

In base alle distribuzioni di accordo e disaccordo dei valori osservati in tabella 8, è stato effettuato il test del χ^2 sulle quattro variabili (numero di “nidi” ghiandolari fibrotici, numero di ectasie ghiandolari, conta delle cellule infiammatorie e numero di esocitosi), stimando i valori attesi e indagando i fattori classi d’età e fase del ciclo.

Per la variabile numero di “nidi” ghiandolari fibrotici, la distribuzione osservata per le due classi d’età (giovani e anziane) rispetto a quella attesa evidenzia una carenza di disaccordo sulle cavalle giovani e, al contrario, un eccesso di disaccordo sulle cavalle anziane nell’attribuzione del *grading* di parete e biopsia. Infatti la probabilità che i valori osservati corrispondano a quelli attesi è significativamente bassa ($p \chi^2 < 0,001$). Ciò implica in definitiva una maggiore difficoltà di predizione del *grading* nelle cavalle di età avanzata rispetto alle cavalle giovani basandosi sul campione bioptico. Al contrario, riguardo al confronto tra le due fasi del ciclo (estro e diestro), la variabile numero di “nidi” ghiandolari fibrotici non ha messo in luce significative differenze di distribuzione sul grado di accordo o disaccordo ($p \chi^2 = 0,84$).

La tabella 9 schematizza quanto appena spiegato:

Test del χ^2 . Numero “nidi” ghiandolari fibrotici							
	OSSERVATI (O)			ATTESI (A)			$p \chi^2$
	Accordo	Disaccordo	Totale	Accordo	Disaccordo	Totale	
Giovani	20	0	20	16,0	4,0	20	< 0,001
Anziane	8	7	15	12,0	3,0	15	
Totale	28	7	35	28	7	35	
Estro	21	5	26	20,8	5,2	26	0,84
Diestro	7	2	9	7,2	1,8	9	
Totale	28	7	35	28	7	35	

Tabella 9 La tabella mostra, per la variabile numero di “nidi” ghiandolari fibrotici, le distribuzioni di accordo e disaccordo nell’attribuzione del *grading* di endometriosi dei valori osservati e attesi, sia in base alle due classi d’età sia alle due fasi del ciclo. $P \chi^2$: probabilità di χ^2 che i valori attesi (A) corrispondano a quelli osservati (O).

Per quanto concerne invece le altre variabili rilevate (numero delle ectasie ghiandolari, conta delle cellule infiammatorie, numero delle esocitosi), né il confronto tra le due classi d'età né quello tra le due fasi del ciclo hanno fornito distribuzioni significativamente diverse (vedi tabelle IIa, IIb e IIc in Appendice).

In questo caso appare quindi evidente una sostanziale possibilità di predire in modo corretto il dato di *grading* di endometriosi tramite il campione bioptico, senza discostarsi troppo da ciò che si osserverebbe con un'analisi di un campione di parete uterina.

4.3 INDAGINE IMMUNOISTOCHEMICA

Nella tabella 10 sono elencati in dettaglio i risultati dell'indagine immunohistochemica per la ricerca di MMP-2, 9, 14 e TIMP-2 sui 17 campioni di parete uterina selezionati.

	Numero e % cellule stromali positive (10 campi a 40x) (A)						Intensità (da 0 a 3) (B)				AxB (da 0 a 300)		
	MMP-2		MMP-9		MMP-14		MMP-2	MMP-9	MMP-14	TIMP-2	MMP-2	MMP-9	MMP-14
23022c D	26	0,99%	7	0,27%	10	0,38%	2	2	1	3	1,98	0,54	0,38
23546c E	24	0,92%	11	0,42%	1	0,04%	2	2	0	1	1,84	0,84	0
23024 D	6	0,25%	6	0,25%	0	0%	1	1	0	2	0,25	0,25	0
23424 D	11	0,47%	7	0,30%	1	0,04%	1	1	0	2	0,47	0,3	0
23426 E	251	10,7%	221	9,50%	218	9,35%	3	3	3	3	32,1	28,5	28,05
23427 E	12	0,52%	8	0,34%	10	0,43%	3	2	1	3	1,56	0,68	0,43
23547 E	6	0,26%	3	0,12%	1	0,04%	1	1	0	3	0,26	0,12	0
23691 E	7	0,30%	3	0,12%	3	0,12%	1	1	0	3	0,3	0,12	0
23989 E	17	0,72%	3	0,12%	3	0,12%	2	1	2	2	1,44	0,12	0,24
23990 E	10	0,43%	3	0,12%	9	0,38%	2	1	1	3	0,86	0,12	0,38
24391 E	8	0,34%	2	0,09%	5	0,21%	1	1	1	3	0,34	0,09	0,21
24394 E	4	0,17%	3	0,12%	1	0,04%	1	2	1	2	0,17	0,24	0,04
25325 E	231	9,90%	214	9,20%	222	9,5%	3	3	3	3	29,7	27,6	28,5
25326 E	4	0,17%	1	0,04%	5	0,21%	1	2	1	3	0,17	0,08	0,21
25501 E	2	0,09%	9	0,38%	2	0,09%	1	2	1	3	0,09	0,76	0,09
25502 E	8	0,34%	6	0,25%	19	0,81%	2	2	2	2	0,68	0,5	1,62
26009 E	4	0,17%	4	0,17%	2	0,09%	1	2	1	3	0,17	0,34	0,09

Tabella 10 Riepilogo risultati immunohistochemica. I casi contrassegnati con una "c" sono i casi controllo, appartenenti al gruppo delle cavalle giovani; "D" ed "E", indicano la fase del ciclo estrale, rispettivamente diestro ed estro. I dati percentuali sono calcolati sul totale di cellule presenti in 10 campi a 40x: 2620 per i casi controllo e 2330 per le cavalle anziane. Per TIMP-2 è stata valutata la sola intensità.

Nella tabella 11 sono riassunti i risultati della correlazione della positività (AxB) dei campioni a MMP-2, 9 e 14

	Coefficiente di correlazione (r)
MMP- 2 e MMP-9	0,99
MMP-2 e MMP-14	0,99
MMP-9 e MMP-14	0,99

Tabella 11 Coefficienti di correlazione dei valori di positività (AxB) dei campioni tra le diverse metalloproteasi 2, 9 e 14.

Nella tabella 11.1 sono riassunte le correlazioni tra le intensità di positività delle MMP-2, 9 e 14 rispetto a TIMP-2.

	Coefficiente di correlazione (r)
MMP- 2 e TIMP-2	0,06
MMP-9 e TIMP-2	0,13
MMP-14 e TIMP-2	0,25

Tabella 11.1 Coefficienti di correlazione dei valori di intensità (B) dei campioni tra le metalloproteasi 2, 9 e 14 e TIMP-2.

4.3.1 MMP-2, MMP-14 e TIMP-2

Come abbiamo già osservato precedentemente MMP-2, MMP-14 e TIMP-2 presentano stretti legami di interazione fra loro (vedi capitolo 1.3.2.1); per questo si è deciso di analizzarli insieme.

Per quanto riguarda la MMP-14, non esistono studi immunoistochimici nel cavallo. La MMP-14 degrada diverse componenti della membrana extracellulare (MEC) e grazie al suo ancoraggio alla membrana è in grado di effettuare una degradazione matricale più localizzata ed efficiente rispetto alle MMP secrete (Osenkowski *et al.*, 2004). La sua importanza nel rimodellamento è inoltre legata alla capacità di attivare la pro-MMP-2 e indirettamente anche la pro-MMP-9 (Osenkowski *et al.*, 2004). Questo è confermato anche dalla nostra casistica, nella quale osservando le analisi semi-quantitative di positività tra MMP-14 e rispettivamente MMP-2 e MMP-9, appaiono in entrambi i casi fortemente correlate ($r=0,99$).

Si è osservato che TIMP-2 regola i livelli di MMP-14 sulla superficie cellulare influenzandone il turnover e l'endocitosi, inibisce la MMP-14 attivata e promuove con essa l'attivazione di pro-MMP-2 in un ruolo biunivoco (Osenkowski *et al.*, 2004). Nel nostro studio, la correlazione tra l'intensità di espressione di TIMP-2 e MMP-14 appare bassa ($r=0,25$), probabilmente a causa dell'impossibilità di rilevare MMP-14 attivata da MMP-14 inattivata con la tecnica immunoistochimica.

È ipotizzabile che, viste le interazioni biologiche (sia regolatorie, sia inibitorie) tra le due molecole, non sarebbero comunque correlabili né positivamente né negativamente in maniera netta, nemmeno se la forma attiva venisse distinta da quella inattiva.

Lo stesso si può osservare per MMP-2: la correlazione tra l'intensità di espressione di TIMP-2 e MMP-2 appare estremamente bassa ($r=0,06$). Bisogna ricordare infatti che TIMP-2 è inibitore di MMP-2 ad alte concentrazioni e attivatore a basse concentrazioni (Visse *et al.*, 2003; Nagase *et al.*, 2006). Osservando i risultati ottenuti, nella maggior parte dei casi (12 su 17), ad intensità elevate di TIMP-2 corrispondono intensità scarse o moderate di MMP-2. Nei restanti casi (5 su 17), l'espressione delle due molecole è paritaria: questo indica la presenza di ulteriori meccanismi che portano MMP-2 ad essere più espressa a discapito dell'inibizione di TIMP-2. Proprio in questi casi che si discostano dalla teoria, sarebbe interessante osservare se MMP-2 è espressa in forma attiva o latente.

All'osservazione dei campioni al microscopio ottico, l'intensità di espressione di MMP-2 appariva moderata nei casi controllo, da scarsa a intensa invece nelle cavalle anziane (fig. 12a). In particolare, mentre nello strato compatto la presenza di MMP-2 era evidente sia nei casi controllo sia nelle cavalle anziane, nello strato spongioso MMP-2 era evidenziabile solo nelle cavalle anziane (fig. 12a) ed in particolare nei casi che presentavano reazione colorimetrica intensa (23426, 23427 e 25325). Nei siti di infiltrazione di linfociti e plasmacellule l'intensità dell'espressione era maggiormente evidente (fig. 12b). Queste osservazioni risultano in accordo con quanto osservato da Walter *et al.* (2005). La positività delle cellule stromali nell'espressione di MMP-2 era evidente anche a livello perighiandolare, ma nella maggior parte dei casi non circondava i "nidi" ghiandolari fibrotici né le cellule positive erano identificabili tra gli strati di connettivo fibroso attorno ai "nidi". Solo in pochi casi la distribuzione delle cellule stromali positive a MMP-2 è correlabile a ghiandole ectasiche o ai "nidi" ghiandolari fibrotici. Le osservazioni qualitative appaiono supportate anche dalle analisi statistiche: la positività delle cellule stromali non differisce significativamente né tra le quattro categorie di endometriosi (valutate sul *grading* di fibrosi, di infiammazione e *grading* finale) né tra cavalle sane (categoria I) e affette da endometriosi (categoria IIA, IIB e III) (vedi Tabelle IIIa, IIIb e IIIc in Appendice). Nello studio di Walter *et al.* (2005) invece, era stato riscontrato che le cellule positive a MMP-2 circondavano spesso i "nidi" ghiandolari fibrotici.

Per quanto riguarda le osservazioni al microscopio ottico su MMP-14, è stata osservata una positività citoplasmatica delle cellule dell'epitelio ghiandolare e, in buona parte dei

campioni, anche nell'epitelio luminale. Questo appare in accordo con uno studio in medicina umana nel quale l'espressione di MMP-14 nell'endometrio è stata osservata nelle cellule dell'epitelio ghiandolare e più raramente (e con minore intensità) nell'epitelio luminale (Zhang *et al.*, 2000). Sempre nello stesso studio, la positività immunohistochimica epiteliale di MMP-14 era accompagnata da un'espressione di scarsa intensità nelle cellule stromali (Zhang *et al.*, 2000).

Anche nel nostro studio, la positività delle cellule stromali appariva associata a quella delle cellule epiteliali, con un'intensità da assente a moderata nella maggior parte dei casi (fig. 13). La distribuzione delle cellule stromali positive non appariva associata né alla fibrosi perighiandolare, né ai "nidi" ghiandolari fibrotici (fig. 13). Ad eccezione di due casi (23546 e 25325), il numero di cellule stromali positive appariva basso (<1%). Per il numero di cellule stromali positive inoltre non è stata osservata una differenza significativa né tra le quattro categorie di endometriosi (valutate sul *grading* di fibrosi, di infiammazione e *grading* finale) né tra cavalle sane e affette da endometriosi (vedi Tabelle IIIa, IIIb e IIIc in Appendice).

In uno studio è risultato che la presenza di progesterone diminuisce l'espressione di MMP-14 e MMP-2 (Zhang *et al.*, 2000). In accordo con ciò, nei campioni in diestro analizzati nel nostro studio, l'intensità di espressione di MMP-14 appariva da assente a scarsa.

Per quanto riguarda TIMP-2, è stata valutata soltanto l'intensità di positività della reazione colorimetrica: la conta delle cellule stromali positive risultava infatti difficoltosa poiché era presente un problema tecnico di fondo sui campioni. La positività della reazione colorimetrica è apparsa da moderata a intensa in quasi tutti i campioni (16 su 17). Inoltre, TIMP-2 è stato rilevato anche a livello di epitelio luminale e ghiandolare in tutti i campioni, in accordo con quanto osservato in uno studio in medicina umana (Zhang e Salamonsen, 1997) (fig. 14). Nella maggior parte dei casi inoltre le cellule stromali apparivano positive a livello perighiandolare (fig. 14).

La correlazione tra TIMP-2 e MMP-2 e 14 è già stata discussa. Tra TIMP-2 e MMP-9 la correlazione è risultata bassa ($r=0,13$): questo appare in accordo con la bibliografia, ad oggi non sembrano esserci legami tra le due molecole.

L'intensità della reazione non differisce significativamente né tra le quattro categorie di endometriosi (valutate sul *grading* di fibrosi, di infiammazione e *grading* finale) né

tra cavalle sane e affette da endometriosi (vedi Tabelle IIIa, IIIb e IIIc in Appendice). Nemmeno le fasi del ciclo estrale mostrano significative relazioni con l'intensità di positività per TIMP-2. Questo appare in accordo con quanto osservato in uno studio sull'endometrio umano, nel quale l'espressione di TIMP-2 è presente indipendentemente dalla fase del ciclo mestruale (Zhang e Salamonsen, 1997).

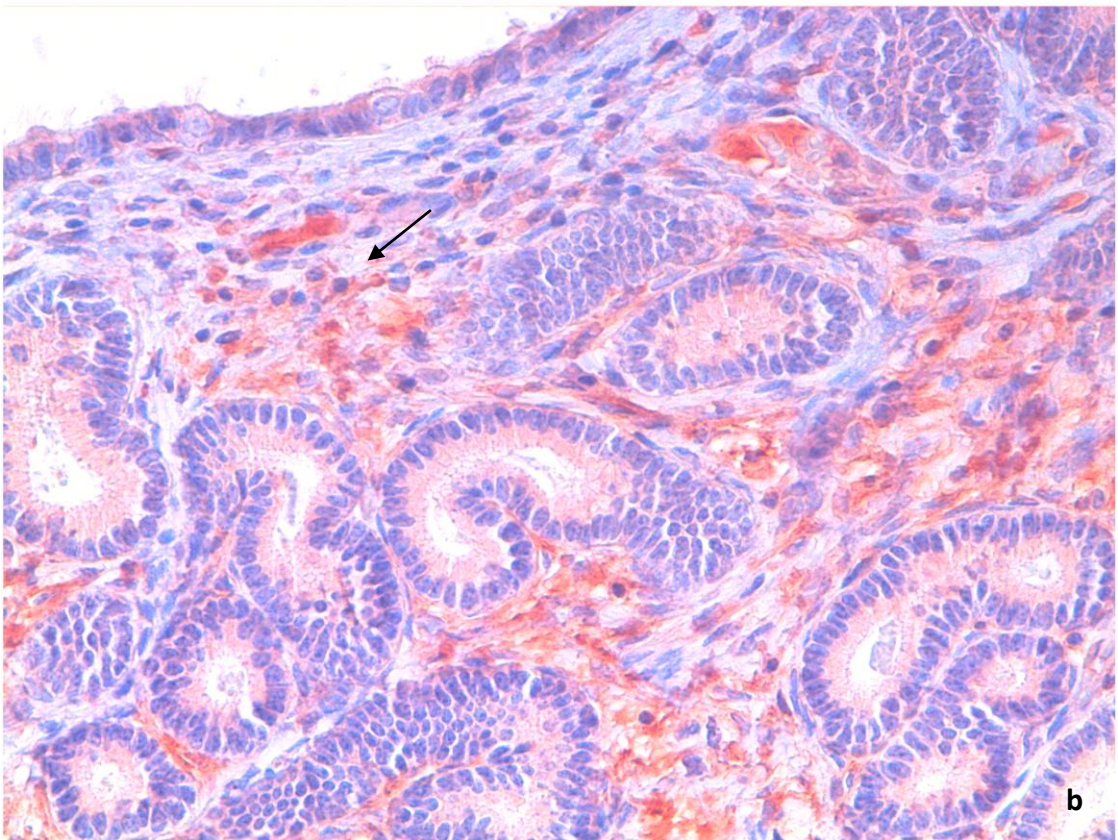
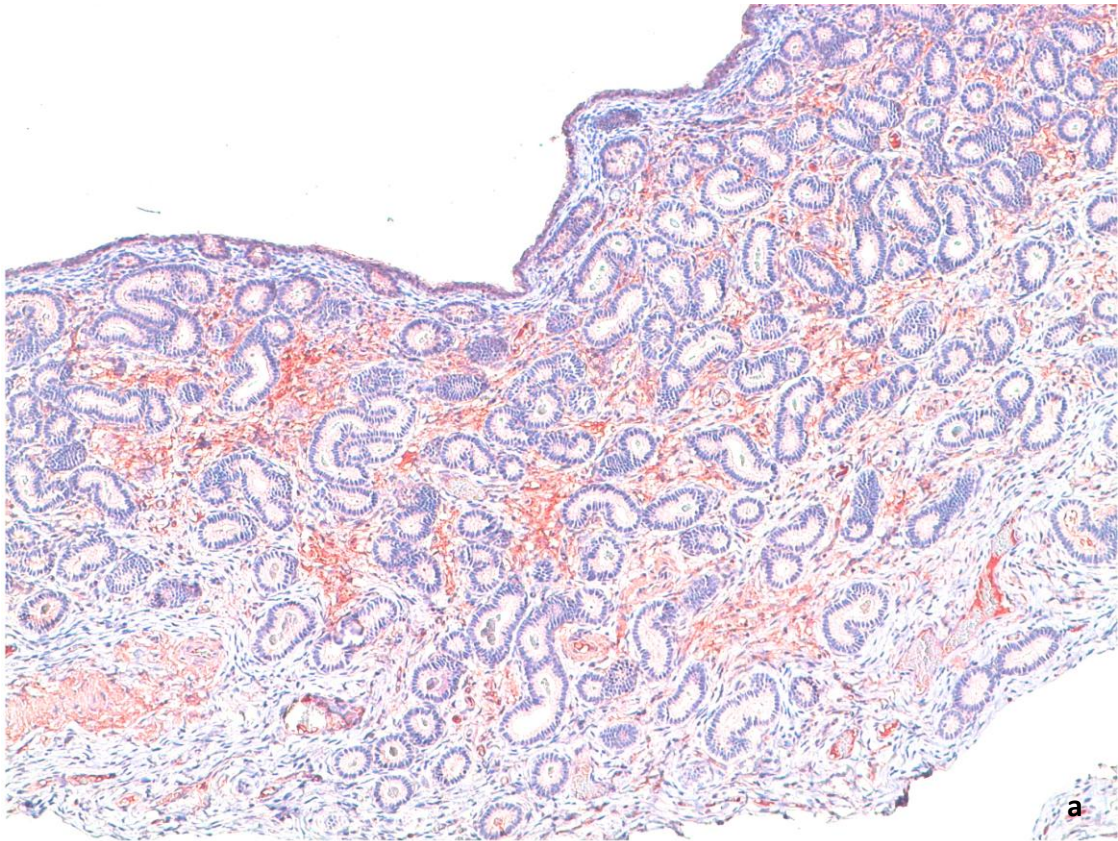


Figura 12. Immunoistochimica, MMP-2, **a:** 5x, **b:** 20x.

a: sezione endometriale di cavalla anziana. Positività delle cellule stromali nello strato spongioso.

b: sezione endometriale di cavalla anziana. Positività dell'infiltrato infiammatorio linfoplasmacellulare (freccia).

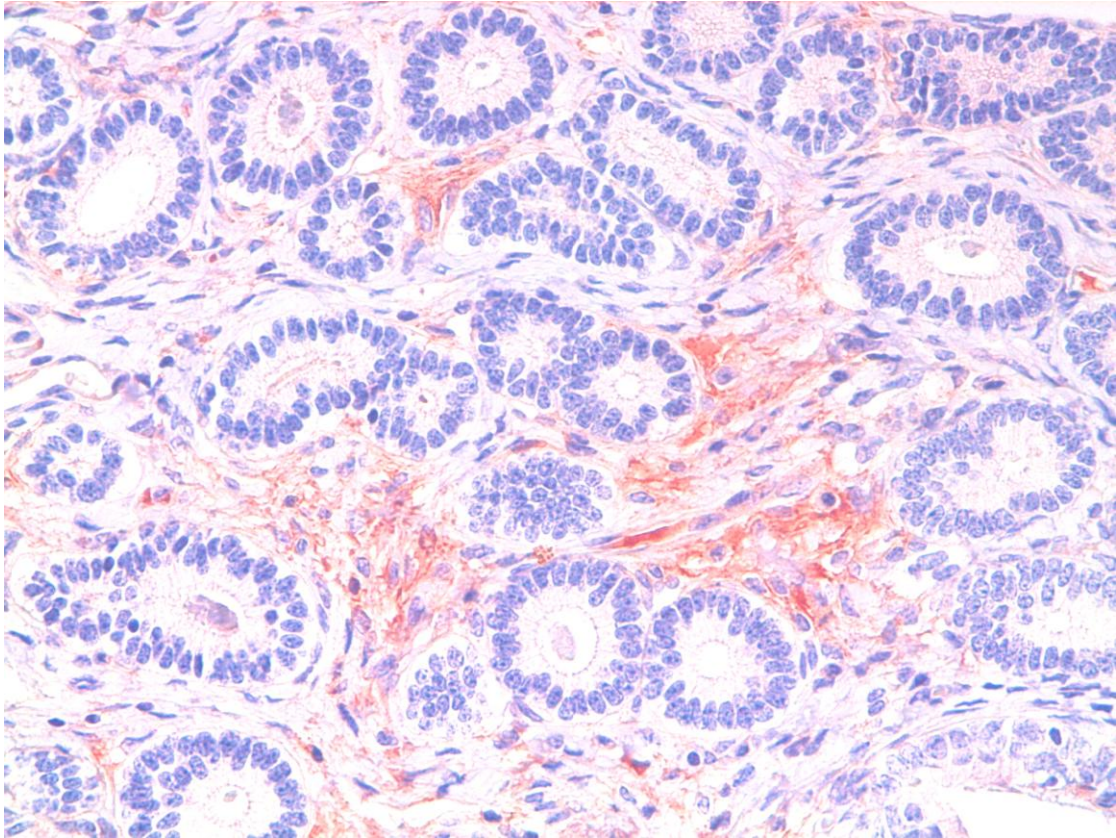


Figura 13. Immunoistochimica, MMP-14, 20x.
Cellule stromali con positività moderata.

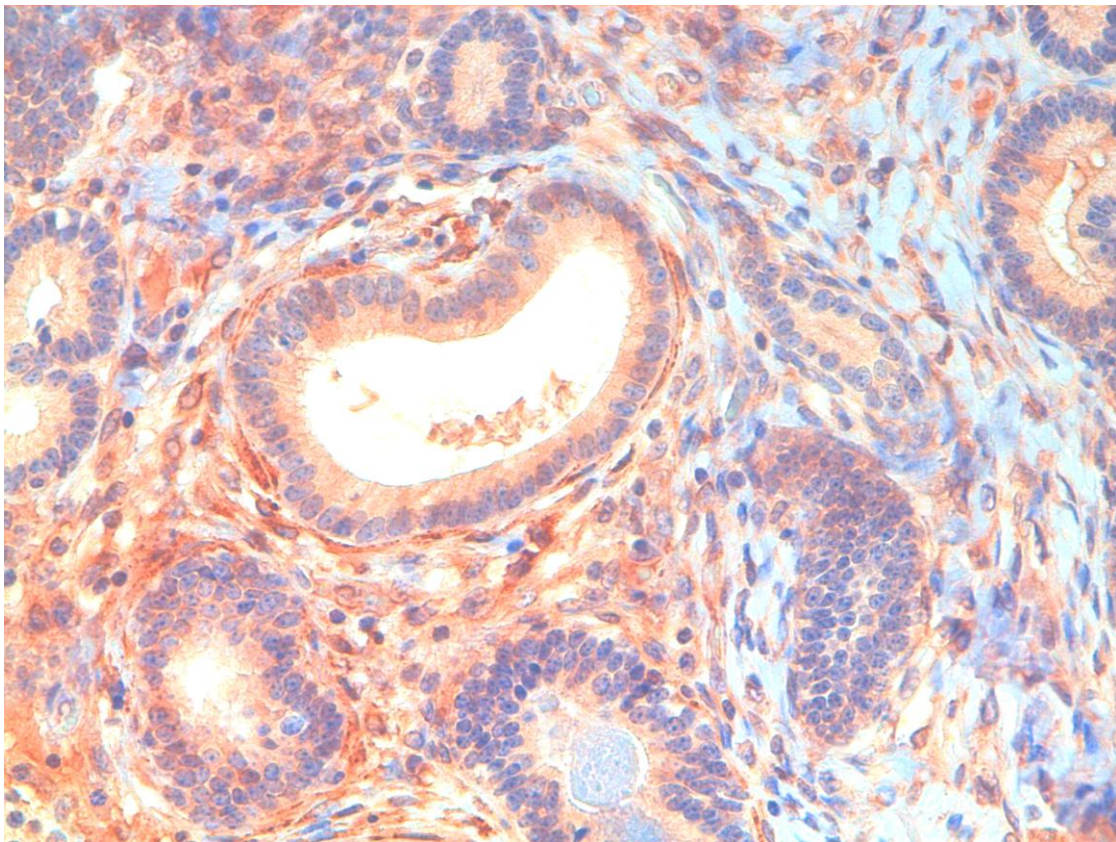


Figura 14. Immunoistochimica, TIMP-2, 20x.
Positività dell'epitelio ghiandolare e delle cellule stromali localizzata a livello perighiandolare.

4.3.2 MMP-9

La MMP-9 o gelatinasi B, ha come principale substrato il collagene IV, ma la sua attività proteolitica si esplica a carico di diverse molecole (Skinner *et al.*, 1999). Nell'endometrio equino l'espressione di MMP-9 non è mai stata indagata. Studi in medicina umana invece, effettuati tramite diverse tecniche, ne attestano l'espressione nelle cellule infiammatorie (neutrofili, eosinofili, macrofagi e plasmacellule) e nelle cellule ghiandolari e stromali dell'endometrio (Skinner *et al.*, 1999; McCawley *et al.*, 2001). Questo appare in accordo con le nostre osservazioni: in tutti i campioni esaminati, è stata riscontrata una forte positività citoplasmatica per MMP-9 a livello dell'epitelio ghiandolare; la positività era di aspetto granulare omogeneamente diffuso (fig. 15). Sporadicamente anche l'epitelio luminale si presentava positivo. Nella donna, l'espressione di MMP-9 nelle cellule epiteliali ghiandolari e stromali è variabile a seconda delle fasi del ciclo mestruale (Skinner *et al.*, 1999). In relazione a questo, sembra che la presenza di progesterone influenzi l'espressione della gelatinasi B. Uno studio *in vivo* in individui sani mostra che ad alte concentrazioni di progesterone, corrisponde una notevole espressione di MMP-9 da parte delle cellule epiteliali ghiandolari e a basse dosi di progesterone (periodo mestruale) l'espressione di MMP-9 è comunque mantenuta; interessante risulta il fatto che nella maggioranza dei casi si trattava di pro-MMP-9 (Skinner *et al.*, 1999). In un altro studio, sempre *in vivo*, è stato osservato che le cellule stromali endometriali nella fase mestruale (basse dosi di progesterone) non producono MMP-9 (Salamonsen *et al.*, 1997). Nella nostra analisi semi-quantitativa, il numero di cellule stromali positive appariva basso (<1%) e con un'intensità di positività scarsa o moderata (fig. 15); costituivano un'eccezione solo due casi (23426 e 25325) che presentavano una più alta positività (rispettivamente 9,5% e 9,2%), concomitante ad una reazione colorimetrica intensa. La diversa fase del ciclo (estro o diestro) non ha mostrato legami significativi con la positività per MMP-9 (vedi tabella IV in Appendice). Nelle cellule stromali equine sembra quindi che la regolazione dell'espressione di MMP-9 sia legata anche ad altri fattori, come il GnRH (Chou *et al.*, 2003), oltre alla presenza o meno di progesterone.

In uno studio si è osservato che il collagene di tipo IV, normalmente presente solo a livello della membrana basale, è presente attorno alle cellule stromali nella fibrosi

perighiandolare di ghiandole singole o “nidi” ghiandolari di cavalle affette da endometriosi (Walter *et al.*, 2001). Poiché la MMP-9 presenta come substrato principale il collagene di tipo IV (Skinner *et al.*, 1999), si è ipotizzato che l’espressione di MMP-9 nelle cellule stromali potesse essere correlata alla presenza di collagene IV nel tessuto fibrotico e quindi all’endometriosi. Dalle analisi statistiche è emerso che la positività delle cellule stromali non differisce significativamente né tra le quattro categorie di endometriosi né tra cavalle sane e affette da endometriosi (vedi Tabelle IIIa, IIIb e IIIc in Appendice). Lo studio immunocistochimico non permette di distinguere MMP-9 attivata da MMP-9 inattivata. Risulterebbe a questo punto utile indagare se la forma attiva di MMP-9 risulta maggiormente espressa nelle cavalle affette da endometriosi rispetto alle cavalle sane attraverso un’analisi zimografica.

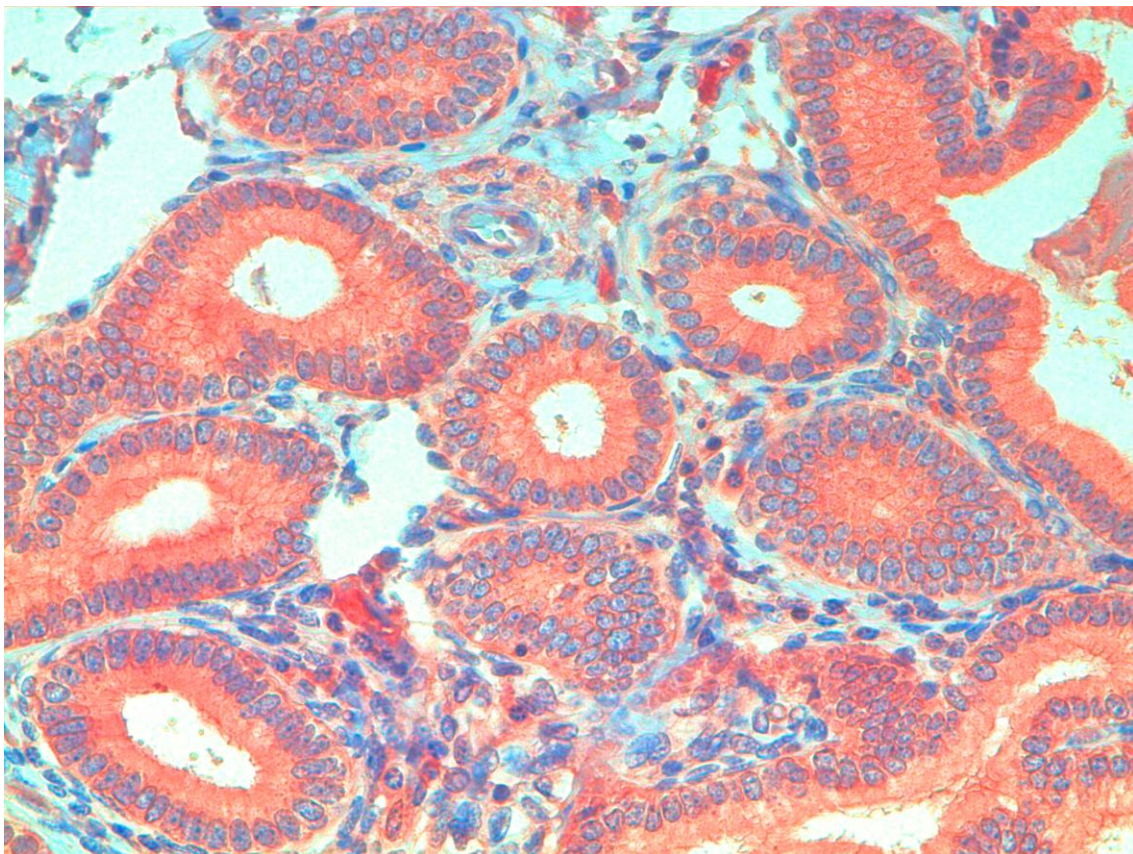


Figura 15. Immunocistochimica, MMP-9, 20x.
Positività delle cellule epiteliali ghiandolari con rare cellule stromali positive.

5 CONCLUSIONI

Lo studio è stato svolto su 70 campioni di tessuto uterino equino analizzati dal punto di vista istologico attraverso colorazioni istochimiche; su 17 campioni è stata effettuato uno studio immunoistochimico.

Dal punto di vista **istologico** è stato possibile identificare e descrivere la fase del ciclo estrale e classificare le diverse lesioni infiammatorie e/o fibrotiche secondo un *grading* di endometriosi, osservando un significativo aumento del grado di endometriosi nei soggetti di età superiore ai 12 anni e una significativa assenza della patologia nei soggetti di età inferiore ai 4 anni. In particolare, le lesioni fibrotiche risultano maggiormente correlate alla gravità dell'endometriosi rispetto alle lesioni infiammatorie.

È stato possibile inoltre osservare una significativa attendibilità del campione bioptico rispetto al campione di intera parete uterina nell'attribuzione del *grading* di endometriosi.

Le **metalloproteasi** sono proteine enzimatiche coinvolte in processi fisiologici e patologici a carico di molti apparati, il cui meccanismo d'azione ad oggi non è completamente compreso. Nel tessuto uterino equino è stato effettuato un solo studio allo scopo di indagare l'espressione e il ruolo di questi enzimi, in particolare di MMP-2 (Walter *et al.*, 2005). Il presente lavoro si è posto l'obiettivo di osservare nel tessuto uterino equino l'espressione e la localizzazione non solo di MMP-2, ma per la prima volta anche di MMP-9, MMP-14 e TIMP-2 attraverso la tecnica immunoistochimica. Tale tecnica presenta il limite di non consentire la distinzione tra forma attiva e inattiva delle MMP. Questo tipo di indagine potrebbe essere effettuata tramite zimografia su gel, con lo scopo di chiarire il ruolo di questi enzimi nella patogenesi e nella progressione dell'endometriosi.

In conclusione, nel nostro studio sperimentale si è osservato che:

- la presenza di MMP-2 nello strato spongioso dell'endometrio è prerogativa delle cavalle anziane (con maggiore intensità nelle cavalle affette da grave endometriosi);
- l'espressione di MMP-2 è associata ai *foci* infiammatori;

- MMP-14 è espressa sia nelle cellule epiteliali sia stromali di soggetti sani e malati;
- MMP-9 è espressa nelle cellule epiteliali ghiandolari e stromali di soggetti sani e malati;
- l'espressione di MMP-2, 9 e 14 nelle cellule stromali risultano fortemente correlate;
- TIMP-2 è intensamente espresso sia nelle cavalle sane, sia in quelle malate ed in tutte le cellule: epiteliali ghiandolari, epiteliali luminali e stromali;
- l'intensità di espressione di TIMP-2 non appare direttamente correlata all'intensità di nessuna delle MMP esaminate.

Nel presente studio non è apparso nessun legame significativo tra *grading* di endometriosi ed espressione delle MMP-2, 9, 14 e TIMP-2.

Questi risultati mostrano come l'espressione delle metalloproteasi nell'endometrio equino sia correlata a processi fisiologici o patologici. Per poter comprendere completamente il meccanismo d'azione delle MMP nell'endometriosi sono necessarie ulteriori indagini tramite l'utilizzo di altre tecniche diagnostiche, come la zimografia su gel o tecniche di espressione genica. Appare di primaria importanza, infatti, capire se esiste una differenza nell'espressione delle forme attive e inattive delle metalloproteasi tra cavalle sane e cavalle affette da endometriosi.

Come nella fisiologia uterina della donna (Bruner *et al.*, 1997), la sensibilità dell'endometrio equino alle variazioni ormonali è di cruciale importanza (Kenney e Doig, 1986). Nella donna, la modulazione delle MMP da parte degli ormoni steroidei è già stata dimostrata (Bruner *et al.*, 1997). Nella cavalla è stata osservata l'influenza steroidea sulle MMP nell'ovaio (Riley *et al.*, 2001). Walter *et al.* (2005) hanno osservato una significativa influenza del progesterone su MMP-2 nell'endometrio. Nel nostro studio le fasi del ciclo estrale (e quindi le diverse concentrazioni ormonali) non risultano avere connessioni significative con l'espressione di MMP-2, 9, 14 e TIMP-2. Appaiono quindi necessarie ulteriori indagini al fine di definire con chiarezza l'interazione MMP/steroidi sessuali.

Alla luce del presente studio non si può ritenere l'immunoistochimica una tecnica completa che possa essere affiancata alle analisi istopatologiche nella diagnosi di endometriosi, poiché non ha dimostrato un significativo valore prognostico

nell'attribuzione del *grading* di endometriosi. Di conseguenza, le metalloproteasi non rappresentano per quanto da noi osservato un *marker* di fertilità immediatamente spendibile nella pratica clinica.

Non va dimenticato però che l'identificazione delle MMP e TIMP come fattori coinvolti nell'endometriosi può aprire nuovi panorami terapeutici per questa patologia, ad oggi senza cura. Già da diversi anni in medicina umana l'uso delle metalloproteasi e dei loro inibitori a scopo terapeutico è oggetto di intensa ricerca (Hu *et al.*, 2007): uno studio effettuato su tessuto endometriale umano in modelli murini ha dimostrato che l'inibizione delle MMP impedisce la formazione di lesioni ectopiche e quindi dell'endometriosi umana (Bruner *et al.*, 1997).

APPENDICE

Tabella I

In questa tabella sono riassunti i dati salienti dell'ANOVA effettuata per valutare il legame tra fasi del ciclo e parametri dell'endometriosi. La fase del ciclo ha un effetto non significativo sui valori osservati.

	Estro		Diestro		P	Var. Errore	R ²
	LSMEANS	e.s.	LSMEANS	e.s.			
Nidi ghiandolari:							
Biopsia	7,46	1,91	7,97	1,14	0,82 ns	32,61	0,61
Parete	9,67	2,40	7,64	1,44	0,47 ns	51,74	0,55
Ectasie:							
Biopsia	11,23	2,34	19,24	3,91	0,08 ns	137,05	0,11
Parete	18,00	5,67	38,95	9,46	0,06 ns	802,70	0,11
Conta Cellule Infiammatorie:							
Biopsia	134,30	17,41	130,84	29,05	0,91 ns	7567,43	0,14
Parete	126,96	15,97	161,85	26,65	0,27 ns	6370,73	0,20
Esocitosi:							
Biopsia	5,21	0,67	4,42	1,11	0,54 ns	11,10	0,01
Parete	7,38	1,32	5,21	2,20	0,40 ns	43,27	0,05
Grading Fibrosi:							
Biopsia	1,04	0,11	1,15	0,18	0,60 ns	0,30	0,80
Parete	1,07	0,14	1,39	0,23	0,25 ns	0,47	0,73
Grading Infiammazione:							
Biopsia	0,95	0,21	1,12	0,35	0,68 ns	1,11	0,10
Parete	1,10	0,22	1,32	0,37	0,61 ns	1,23	0,18
Grading finale:							
	1,15	0,10	1,30	0,17	0,48 ns	0,25	0,84

Tabella A LSMEANS: media stimata; e.s.: errore standard; p: *p-value*; Var. errore: varianza di errore; ns: non significativo. I valori numerici assegnati alle categorie per consentirne la valutazione sono: categoria I: 0; categoria IIA: 1, categoria IIB: 2; categoria III: 3.

Tabella IIa, IIb e IIc

Qui di seguito sono riassunti i valori osservati e attesi nel test del χ^2 per i parametri di classificazione dell'endometriosi: numero di ectasie ghiandolari (tabella IIa), conta cellule infiammatorie (tabella IIb), numero di esocitosi (tabella IIc).

Test del χ^2 . Numero di ectasie ghiandolari							
	OSSERVATI (O)			ATTESI (A)			p χ^2
	Accordo	Disaccordo	Totale	Accordo	Disaccordo	Totale	
Giovani	18	2	20	18,3	1,7	20	0,72
Anziane	14	1	15	13,7	1,3	15	
Totale	32	3	35	32	3	35	
Estro	25	1	26	23,8	2,2	26	0,09
Diestro	7	2	9	8,2	0,8	9	
Totale	32	3	35	32	3	35	

Tabella IIa La tabella mostra, per la variabile numero di ectasie ghiandolari, le distribuzioni di accordo e disaccordo nell'attribuzione del *grading* di endometriosi dei valori osservati e attesi, sia in base alle due classi d'età sia alle due fasi del ciclo. P χ^2 : probabilità di χ^2 che i valori attesi (A) corrispondano a quelli osservati (O).

Test del χ^2 . Conta Cellule Infiammatorie							
	OSSERVATI (O)			ATTESI (A)			p χ^2
	Accordo	Disaccordo	Totale	Accordo	Disaccordo	Totale	
Giovani	11	9	20	10,3	9,7	20	0,62
Anziane	7	8	15	7,7	7,3	15	
Totale	18	17	35	18	17	35	
Estro	1	13	26	13,4	12,6	26	0,77
Diestro	5	4	9	4,6	4,4	9	
Totale	18	17	35	18	17	35	

Tabella IIb La tabella mostra, per la variabile conta di cellule infiammatorie, le distribuzioni di accordo e disaccordo nell'attribuzione del *grading* di endometriosi dei valori osservati e attesi, sia in base alle due classi d'età sia alle due fasi del ciclo. P χ^2 : probabilità di χ^2 che i valori attesi (A) corrispondano a quelli osservati (O).

Test del χ^2 . Numero esocitosi							
	OSSERVATI			ATTESI			p χ^2
	Accordo	Disaccordo	Totale	Accordo	Disaccordo	Totale	
Giovani	14	6	20	14,9	5,1	20	0,50
Anziane	12	3	15	11,1	3,9	15	
Totale	26	9	35	26	9	35	
Estro	19	7	26	19,3	6,7	26	0,78
Diestro	7	2	9	6,7	2,3	9	
Totale	26	9	35	26	9	35	

Tabella IIc La tabella mostra, per la variabile numero di esocitosi, le distribuzioni di accordo e disaccordo nell'attribuzione del *grading* di endometriosi dei valori osservati e attesi, sia in base alle due classi d'età sia alle due fasi del ciclo. P χ^2 : probabilità di χ^2 che i valori attesi (A) corrispondano a quelli osservati (O).

Tabella IIIa, IIIb e IIIc

Nella tabella IIIa, IIIb e IIIc sono sintetizzati i risultati dell'ANOVA sui rilievi immunostochimici effettuati sui campioni di parete uterina. Le variabili dipendenti sono rappresentate dalla positività a MMP-2, MMP-9, MMP-14 e TIMP-2 e i fattori di analisi sono rappresentati dalle quattro categorie (I, IIA, IIB e III) assegnate nei diversi *grading* (fibrosi, infiammazione, finale).

Variabile	Grading di fibrosi				p	
	I	IIA	IIB	III	generale	I vs. IIA+IIB+III
TIMP-2 (B)	2,33 ± 0,38	2,67 ± 0,38	3,00 ± 0,46	2,56 ± 0,22	0,73	0,36
MMP-2 (AxB)	11,17 ± 5,99	0,44 ± 5,99	0,26 ± 7,33	4,11 ± 3,46	0,58	0,19
MMP-9 (AxB)	9,66 ± 5,52	0,16 ± 5,52	0,22 ± 6,76	3,48 ± 3,19	0,62	0,21
MMP-14 (AxB)	9,63 ± 5,59	0,14 ± 5,59	0,15 ± 6,85	3,40 ± 3,23	0,63	0,21

Tabella IIIa Valori di media stimata ± l'errore standard delle positività di TIMP-2, MMP-2, MMP-9 e MMP-14 in base al *grading* di fibrosi. (B): intensità della reazione colorimetrica; (AxB): numero cellule stromali positive x intensità reazione colorimetrica; p generale: significatività delle differenze fra le quattro categorie (I, IIA, IIB e III); p I vs. IIA+IIB+III: significatività delle differenze fra categoria cavalle sane (cat.I) e cavalle affette da endometriosi (cat. IIA, IIB e III). P > 0,05= non significativo.

Variabile	Grading di Infiammazione				p	
	I	IIA	IIB	III	generale	I vs. IIA+IIB+III
TIMP-2 (B)	2,75 ± 0,32	2,75 ± 0,32	2,25 ± 0,32	2,60 ± 0,29	0,70	0,57
MMP-2 (AxB)	0,72 ± 5,22	8,20 ± 5,22	0,61 ± 5,22	6,85 ± 4,67	0,62	0,47
MMP-9 (AxB)	0,42 ± 4,79	7,23 ± 4,79	0,32 ± 4,79	5,87 ± 4,29	0,63	0,47
MMP-14 (AxB)	0,17 ± 4,81	7,73 ± 4,81	0,06 ± 4,81	5,68 ± 4,30	0,58	0,45

Tabella IIIb Valori di media stimata ± l'errore standard delle positività di TIMP-2, MMP-2, MMP-9 e MMP-14 in base al *grading* di infiammazione. (B): intensità della reazione colorimetrica; (AxB): numero cellule stromali positive x intensità reazione colorimetrica; p generale: significatività delle differenze fra le quattro categorie (I, IIA, IIB e III); p I vs. IIA+IIB+III: significatività delle differenze fra categoria cavalle sane (cat.I) e cavalle affette da endometriosi (cat. IIA, IIB e III). P > 0,05= non significativo.

Variabile	Grading finale				p	
	I	IIA	IIB	III	generale	I vs. IIA+IIB+III
TIMP-2 (B)	2,00 ± 0,44	3,00 ± 0,44	2,50 ± 0,25	2,71 ± 0,23	0,41	0,14
MMP-2 (AxB)	1,91 ± 7,00	15,28 ± 7,00	0,47 ± 4,04	5,03 ± 3,74	0,36	0,52
MMP-9 (AxB)	0,69 ± 6,38	13,86 ± 6,38	0,27 ± 3,68	4,35 ± 3,41	0,34	0,44
MMP-14 (AxB)	0,19 ± 6,36	14,44 ± 6,36	0,10 ± 3,67	4,34 ± 3,40	0,29	0,39

Tabella IIIc Valori di media stimata ± l'errore standard delle positività di TIMP-2, MMP-2, MMP-9 e MMP-14 in base al *grading* finale. (B): intensità della reazione colorimetrica; (AxB): numero cellule stromali positive x intensità reazione colorimetrica; p generale: significatività delle differenze fra le quattro categorie (I, IIA, IIB e III); p I vs. IIA+IIB+III: significatività delle differenze fra categoria cavalle sane (cat.I) e cavalle affette da endometriosi (cat. IIA, IIB e III). P > 0,05= non significativo.

Tabella IV

La tabella IV riassume i risultati dell'analisi della varianza effettuati sui rilievi immunoistochimici. Le variabili dipendenti sono rappresentate dalla positività a TIMP-2, MMP-2, MMP-9 e MMP-14 in funzione del fattore fase del ciclo (estro/diestro).

Variabile	Diestro		Estro		p
	LSMEANS	e.s.	LSMEANS	e.s.	
TIMP-2 (B)	2,33	0,36	2,64	0,17	0,45
MMP-2 (AxB)	0,90	5,92	4,98	2,74	0,54
MMP-9 (AxB)	0,36	5,41	4,29	2,51	0,52
MMP-14 (AxB)	0,13	5,47	4,28	2,53	0,50

Tabella IV LSMEANS: valori di media stimata; e.s.: errore standard; p: *p-value*; (B): intensità della reazione colorimetrica; (AxB): numero cellule stromali positive x intensità reazione colorimetrica. P > 0,05= non significativo.

BIBLIOGRAFIA

Aupperle H, Schoon D, Schoon HA (2004) *Physiological and pathological expression of intermediate filaments in the equine endometrium*, "Research in Veterinary Science" 76: 249-255

Blanchard TL, Garcia MC, Kintner LD, Kenney RM (1987) *Investigation of the representativeness of a single endometrial sample and the use of trichrome staining to aid in the detection of endometrial fibrosis in the mare*, "Theriogenology" 28: 445-50

Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG (1997) *Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice*, "The Journal of Clinical Investigation", 99: 2851-2857

Cadario ME, Losinno L, Giguere S, Aguilar J, Jack TJ, Macpherson M, Fitzpatrick C, Uhl EW (2002) *Uterine expression of fibrogenic cytokines in the mare*, "Theriogenology" 58: 449-452

Chou CS, Zhu H, MacCalman CD, Leung PCK (2003) *Regulatory Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) I and GnRH II on the Levels of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 in Primary Cultures of Human Extravillous Cytotrophoblasts*, "The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism" 88: 4781-4790

Clutterbuck AL, Harris P, Allaway D, Mobasher A (2010) *Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse*, "The Veterinary Journal" 108: 27-38

Delmann HD, Eurell JA (2000), *Istologia e anatomia microscopica veterinaria*, C.E.A., Milano: 345-349

Davies Morel MCG (2008) *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*, CAB International, Wallingford: 242-243

Dybdal NO, Daels PF, Couto MA, Hughes JP, Kennedy PC (1999) *Investigation of the reliability of a single endometrial biopsy sample, with a note on the correlation between uterine cysts and biopsies grade*, "Journal of Reproduction and Fertility. Supplement" 44: 697

Doig PA, McKnight JD, Miller RB (1981) *The use of endometrial biopsy in the infertile mare*, "The Canadian Veterinary Journal" 22: 72-76

Doig PA, Waelchli RO (1993) *Endometrial biopsy*, in **McKinnon AO, Voss JL** *Equine reproduction*, Blackwell Publishing, Philadelphia – London: 225-233

Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG (2006) *Testo di Anatomia Veterinaria*, Delfino, Roma: 552-554

Evans TJ, Miller MA, Ganjam VK, Niswender KD, Ellersieck MR, Krause WJ, Youngquist RS (1998) *Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares*, "American Journal of Veterinary Research" 59: 1209-1213

Fiala SM, Esmeraldino A, Jobim MIM, Garbade P, Wolf CA, Richter G, Gregory RM, Mattos RC (2010) *Endometrial fibrotic changes. Is one biopsy enough to diagnose degenerative changes?*, "Animal Reproduction Science" 121S: S89-S90

Flores JM, Rodríguez A, Sánchez J, Gómez-Cuétara C, Ramiro F (1995) *Endometrosis in Mares: Incidence of Histopathological Alterations*, "Reproduction in Domestic Animals" 30: 61-65

Ganjam VK, Evans TJ (2006) *Equine endometrial fibrosis correlates with 11 β -HSD₂, TGF- β ₁ and ACE activities*, "Molecular and Cellular Endocrinology" 248: 104-108

Gross TL, LeBlanc MM (1984) *Seasonal variation of histomorphologic features of equine endometrium*, "Journal of the American Veterinary Medical Association" 184: 1379-1382

Hoffmann C, Ellenberger C, Costa Mattos R, Aupperle H, Dhein S, Stief B, Schoon HA (2009) *The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis*, "Animal Reproduction Science" 111: 261–278

Hu J, Van den Steen PE, Sang QX, Opdenakker G (2007) *Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases*, "Nature Reviews Drugs Discovery" 6: 480-498

Keller A, Neves AP, Aupperle H, Steiger K, Garbade P, Schoon HA, Klug E, Mattos RC (2006) *Repetitive experimental bacterial infections do not affect the degree of uterine degeneration in the mare*, "Animal Reproduction Science" 94: 276–279

Kenney RM (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: 241-262

Kenney RM, Doig PA (1986) *Equine Endometrial Biopsy*, in **Morrow DA** *Current Therapy in Theriogenology*, W.B. Saunders, Philadelphia:723-729

Kenney RM, Ganjam VR (1975) *Selected pathological changes of the mare's uterus and ovaries*, "Journal of Reproduction and Fertility. Supplement" 23: 335-339

König HE, Liebich HG (2006) *Anatomia dei mammiferi domestici*, Piccin Nuova Libreria, Padova: vol II, 142-145

Lafleur MA, Handsley MM, Edwards DR (2003) *Mechanism of pro-matrix metalloproteinase 2 (pro-MMP-2) activation*, "Expert reviews in molecular medicine" 5: 1

Ley WB (1994) *Treating endometrosis in mares*, "Vet Med" 89: 778-788

McCawley LJ, Matrisian LM (2001) *Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!*, *Current Opinion in cell Biology*" 13: 534-540

Michaluk P, Kaczmarek L (2007) *Matrix metalloproteinase-9 in glutamate-dependent adult brain function and dysfunction*, "Cell Death and Differentiation" 14: 1255

Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*, "Cardiovascular Research" 69: 562-573

Osenkowski P, Toth M, Fridman R (2004) *Processing, shedding, and endocytosis of MembraneType 1-Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP)*, "Journal of Cellular Biology" 200: 2-10

Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Del Piero F, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K (2008) *American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Subcommittee on Standardization of Immunohistochemistry. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories*, "Journal of Veterinary Diagnostic Investigation" 20: 393-413

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

Ricketts SW (1985) *Endometrial curettage in the mare*, "Equine Veterinary Journal" 17: 324-328

Ricketts SW, Alonso S (1991) *The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease*, "Equine Veterinary Journal" 23: 189-192

Riley SC, Gibson AH, Leask R, Pedersen DJ, Watson ED (2001) *Secretion of MMP-2, MMP-9 and TIMP into follicular fluid during follicle development in equine ovaries*, "Reproduction" 121: 553-560

Rodgers H, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F, Osteen KG (1994) *Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones*, "Journal of Clinical Investigation" 21: 946-953

Rosati P, Colombo R (1997) *I tessuti*, Ermes, Milano: 96-121

Romagnoli S, Falomo ME, Gelli D, Mollo A, Stelletta C (2008) *Dispensa di riproduzione veterinaria*, 257-280

Salamonsen LA, Butt AR, Hammond FR, Garcia S, Zhang J (1997) *Production of endometrial matrix metalloproteinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in an in vitro model for menstruation*, "The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism" 82: 1409-1415

Salamonsen LA, Zhang J, Hampyon A, Lathbury L (2000) *Regulation of metalloproteinases in human endometrium*, "Human Reproduction" 15 (S3): 112-119

Schlafer DH (2007) *Equine endometrial biopsy: Enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new techniques?*, "Theriogenology" 68: 413-422

Skinner JL, Riley SC, Gebbie AE, Glasier AF, Critchley HOD (1999) *Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel*, "Human Reproduction" 14: 793-799

Troedsson, MHT (1997) *Diseases of the uterus*, in **Robinson, ND** (Ed.) *Current Therapy in Equine Medicine*, W.B. Saunders, Philadelphia: 517–523

Visse R, Nagase H (2003) *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*, "Circulation Research" 2 92: 827-839

Waelchli RO, Winder NC (1989) *Distribution of histological lesions in the equine endometrium*, "The Veterinary Record" 124: 274–276.

Walter I, Handler J, Reifinger M, Aurich C (2001) *Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins*, "Reproduction" 121: 581-586

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

Zhang J, Hampton AL, Nie G, Salamonsen LA (2000) *Progesterone inhibits activation of latent matrix metalloproteinase (MMP)-2 by Membrane-Type 1 MMP: enzymes coordinately expressed in human endometrium*, "Biology of Reproduction" 62: 85-94

Zhang J, Salamonsen LA (1997) *Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1,-2 and-3 in human endometrium during the menstrual cycle*, "Molecular Human Reproduction" 3: 735-741

Ringraziamenti

Ai miei genitori, per avermi sempre sostenuto in tutte le mie scelte, per l'appoggio incondizionato e per avermi reso la persona che sono oggi.

A Matteo, per essere al mio fianco sempre, perché "non sono quando non ci sei".

Alla dott.ssa Falomo, per avermi trasmesso l'entusiasmo e la passione per il suo lavoro, per il sostegno e l'incoraggiamento in ogni cosa e per avermi infuso fiducia nelle mie capacità.

A Luca, un ringraziamento speciale per avermi insegnato tantissimo, ma soprattutto per essere stato una guida in questo anno di lavoro.

A Davide, Enrico, Silvia, Rossella, Giuseppe e Manu, per aver reso migliore ogni istante del mio lavoro con la loro simpatia, disponibilità e capacità di insegnare: grazie, non ce l'avrei mai fatta senza di voi!

Al prof. Mantovani, per il grossissimo aiuto con la statistica e l'enorme disponibilità.

A Valentina e Chiara, per avermi sopportato in questi intensissimi cinque anni e per essere le migliori compagne di corso che chiunque possa desiderare.

Ad Anna, per le revisioni stilistiche e soprattutto per la sua amicizia. "Se vi separate dall'amico, non addoloratevi, perché la sua assenza vi illuminerà su ciò che in lui amate".

Ai miei amici più cari Giulia, Sarah, Lele, Fra, Roby e Matteo, per i momenti di gioia e di divertimento passati, per esserci sempre nelle difficoltà e quando sono stata lontana, per farvi in quattro se vi chiedo un aiuto, perché siete parte insostituibile della mia vita e vi adoro.

A papà ed Andrea, per avermi trasmesso l'amore per i cavalli.

Ad Afrodite e Porthos, poiché sono la mia ispirazione, la mia motivazione e la mia forza.