

## EFEITO DE TERAPIAS HORMONAIS SOBRE A EXPRESSÃO PLACENTÁRIA DE RECEPTORES ESTEROIDES EM ÉGUAS COM PLACENTITE ASCENDENTE

BIANCA DE FÁTIMA DALLO<sup>1</sup>; CARLOS EDUARDO WAYNE NOGUEIRA<sup>2</sup>;  
FLÁVIA MOREIRA<sup>3</sup>; FERNANDA MARIA PAZINATO<sup>4</sup>; LORENA SOARES  
FEIJÓ<sup>5</sup>; BRUNA DA ROSA CURCIO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – biancadallo@ufpr.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – cewnogueira@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – flaviamoreira1357@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – fezinha\_mpz@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – feijo.lorena.s@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – curciobruna@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Classicamente definida como um órgão de troca materno-fetal, a placenta equina exerce papel não apenas na nutrição e oxigenação do feto, mas também como estrutura endócrina ativa, sintetizando hormônios esteroides essenciais para a manutenção da gestação (ALLEN, 2001). Contudo, alguns processos fisiopatológicos podem comprometer a sua integridade, dentre os principais, infecciosos e inflamatórios como a placentite (LEBLANC et al., 2002).

A placentite, especialmente do tipo ascendente, corresponde por até 30% das perdas gestacionais, e é uma importante causa de parto prematuro e aborto em éguas, em parte devido a ação das prostaglandinas liberadas que aumentam a contratilidade uterina (LEBLANC et al., 2002). Terapias hormonais, como o uso de progesterona e/ou estrógenos associado a terapia de eleição com antimicrobianos e antiinflamatórios, são comumente utilizadas no tratamento da placentite. Sabe-se que esses hormônios são os principais mantenedores da gestação em éguas, no entanto, os efeitos da aplicação exógena sobre a placenta ainda são pouco compreendidos (BAILEY et al., 2010; CURCIO et al., 2017).

A análise da expressão de receptores esteroides incluindo receptores de progesterona (RP), de estrogênio  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (RE $\alpha$ , RE $\beta$ , RE $\gamma$ ) e da enzima aromatase pode contribuir para o entendimento das rotas metabólicas e na resposta placentária às terapias. A presença destes receptores na placenta humana está diretamente relacionada a fatores de proliferação e estimulação da atividade da aromatase, entretanto, não há descrição dos mesmos na placenta equina. Assim, técnicas sensíveis como a imunofluorescência confocal tornam-se fundamentais para a avaliação morfológica e molecular da placenta em situações de desafio inflamatório.

O objetivo desse estudo foi descrever e quantificar a expressão dos receptores RP, RE $\alpha$ , RE $\beta$ , RE $\gamma$  e aromatase na placenta de éguas com placentite ascendente induzida, submetidas a diferentes terapias hormonais.

### 2. METODOLOGIA

Este estudo foi realizado durante duas temporadas reprodutivas no Centro de Experimentação Agropecuário da Palma da Universidade Federal de Pelotas - UFPEL. Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (nº 3891). Aos 300 dias de gestação, 23 éguas foram submetidas à indução de placentite ascendente com infusão intra-cervical de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* como descrito em Curcio et al., (2017).

As éguas foram alocadas em cinco grupos conforme a terapia hormonal instituída: Controle (n=6; sem indução), placentite Sem tratamento (n=5), tratamento com altrenogest (ALT; n=4), cipionato de estradiol (ECP; n=4) e associação de ALT + ECP (n=4). O tratamento iniciou 48h após a indução experimental de placentite ascendente e foi mantida por 10 dias consecutivos, seguindo as seguintes posologias: trimetoprim-sulfametoxazol, administrado por via intravenosa (IV) na dose de 30 mg/kg a cada 12 horas por 10 dias; flunixin meglumine, IV, na dose de 1,1 mg/kg a cada 24 horas por 10 dias; altrenogest de ação prolongada, administrado por via intramuscular (IM) na dose de 0,088 mg/kg a cada 7 dias, totalizando duas aplicações; e cipionato de estradiol, IM, na dose de 10 mg por égua, com aplicações a cada 3 dias, totalizando três aplicações.

No parto, a placenta foi pesada e avaliada macroscopicamente imediatamente após sua expulsão, e consideradas presenças de lesões macroscópicas de placentite como descrito por SCHLAFER (2004), em seguida, fragmentos do corno gravídico foram coletados, fixados em paraformaldeído 4%, processados para crioseções e submetidos à técnica de imunofluorescência indireta. Os cortes foram incubados com anticorpos primários anti-RP, anti-RE $\alpha$ , anti-RE $\beta$ , anti-RE $\gamma$  e anti-aromatase, seguidos por anticorpos secundários conjugados aos fluorocromos Alexa Fluor 488 e 546.

As lâminas foram analisadas por microscópio confocal (Zeiss LSM 510 META), e a intensidade de fluorescência foi quantificada por meio do software ImageJ®. As fotos foram convertidas para escala de cinza 16 bits e depois em imagens binárias, destacando as áreas de interesse em vermelho para reduzir ruídos de fundo, e então áreas de imunomarcagem foram selecionadas e medidas em pixels. Por fim, realizou-se análise de partículas, obtendo-se a média de pixels das estruturas avaliadas.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e a análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn, no software Statistix 10.0. A significância foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão dos receptores hormonais variou de acordo com o tratamento hormonal instituído (TABELA 1). A quantificação de pixels referente a presença de receptores de progesterona (RP) e RE $\alpha$ , foi predominantemente citoplasmática nas

células epiteliais de microcotilédones e região areolar e marcação nuclear rara no estroma alantoideano, e em quantidade superior para as éguas do grupo Sem tratamento e grupo ALT + ECP. Como observado também por Wilsher (2011), aos 309 dias de gestação, a presença de RP foi pobremente marcada nos microcotilédones e endométrio materno, sugerindo que os RP são negativamente regulados pelas altas concentrações de outros progestágenos.

Para os receptores RE $\beta$  foi observada maior presença nas éguas do grupo ALT+ECP, além de marcação predominantemente no citoplasma e rara expressão a nível nuclear de células de estroma e de epitélio de microcotilédones, similar em todas as placentas avaliadas. No tecido placentário humano foi verificado transição da expressão RE $\alpha$  para RE $\beta$ , com co-expressão temporária destes, conforme as células se diferenciam em sinciotrofoblasto (BUKOVSKY, et al., 2003), no entanto em éguas, ainda não há evidência direta, mas o ECP pode ter sido capaz de estimular receptores de estrogênio placentários, promovendo essa diferenciação.

**TABELA 1.** Média  $\pm$  DV da área imunomarcada, expressa em pixels, obtida no software ImageJ, de receptores hormonais para progesterona, estrógeno  $\beta$  (RE $\beta$ ),  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) e receptor relacionado ao estrógeno  $\gamma$  (RRE $\gamma$ ), e aromatase na placenta de éguas com indução experimental de placentite ascendente recebendo diferentes protocolos de terapia hormonal.

GRUPOS	RP	RE $\beta$	Re $\alpha$	RRE $\gamma$	Aromatase
Controle (n=6)	4,5 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>	25,2 $\pm$ 16,4 <sup>b</sup>	21,1 $\pm$ 14,1 <sup>b</sup>	5,7 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>	5,9 $\pm$ 1,8 <sup>c</sup>
Sem tratamento (n=5)	12,4 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup>	22,1 $\pm$ 14,4 <sup>b</sup>	24,5 $\pm$ 14,6 <sup>ab</sup>	21,9 $\pm$ 15,9 <sup>a</sup>	15,6 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>
ALT (n=4)	3,8 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	23,3 $\pm$ 10,2 <sup>b</sup>	8,3 $\pm$ 9,1 <sup>c</sup>	5,8 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>	12,4 $\pm$ 12,4 <sup>b</sup>
ALT+ECP (n=4)	9,9 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>	40,7 $\pm$ 9,0 <sup>a</sup>	36,4 $\pm$ 11,8 <sup>a</sup>	19,5 $\pm$ 15,2 <sup>a</sup>	11,7 $\pm$ 5,6 <sup>bc</sup>
ECP (n=4)	4,2 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	23,2 $\pm$ 6,3 <sup>b</sup>	8,4 $\pm$ 2,3 <sup>c</sup>	5,3 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	25,4 $\pm$ 14,1 <sup>a</sup>

a,b,c Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

Para os RRE $\gamma$  foi observada imunomarcagem semelhante à dos outros receptores de estrógenos, com marcação consistente a nível citoplasmático de células epiteliais e de estroma alantoideano, raras marcações nucleares em células epiteliais, similar aos receptores de E $\alpha$ , a quantificação de RRE $\gamma$  foi maior nas placentas dos grupos Sem tratamento e ALT+ECP. A enzima aromatase foi visualizada no epitélio de microcotilédones e no epitélio areolar em todas as placentas avaliadas, com marcação citoplasmática predominante e raras células com marcação nuclear no estroma. A imunomarcagem foi mais consistente nas éguas dos grupos Sem tratamento e ECP, enquanto no grupo Controle foi fraca.

Em placentas humanas, foi observada correlação entre a expressão de RRE $\gamma$  e a atividade da aromatase, o estudo sugere que os RRE $\gamma$  estão relacionados ao incremento de enzima e consequentemente maior diferenciação celular do trofoblasto (KUMAR e MENDELSON, 2011). No nosso estudo, não foi

observado maior incremento na imunomarcção de receptores de RREy nas éguas que receberam terapia com ECP, entretanto, essas éguas apresentaram maior imunomarcção da aromatase, o que pode ser um indicador que a suplementação estrogênica pode potencializar a atividade da enzima. A atividade específica do RREy na placenta equina segue desconhecida.

#### 4. CONCLUSÕES

Concluí-se que éguas com placentite sem tratamento e com terapia associada de altrenogest e cipionato de estradiol apresentaram elevado número de receptores de progesterona. Já as éguas que receberam terapia com cipionato de estradiol apresentaram incremento no número de receptores de aromatase, inferindo relação direta com o metabolismo placentário.

Agradecimentos: à CAPES pela concessão de bolsas de pós-graduação.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, v. 121, p. 513–527, 2001.

BAILEY, C.S.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.A.; TROEDSSON, M.H.T.; BENSON, S.; GIGUERE, S.; SANCHEZ, L.C.; LEBLANC, M.M.; VICKROY, T.W. Treatment efficacy of trimethoprim sulphametoxazole, pentoxifylyne and altrenogest in experimentally induced equine placentitis. **Theriogenology**, v.74, p.402-412, 2010.

BUKOVSKY, A.; CAUDLE, M.R.; CEKANOVA, M.; FERNANDO, R.I.; WIMALASENA, J.; FOSTER, J.S.; HENLEY, D.C.; ELDER, R.F. Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant – comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.36, 2003.

CURCIO, B.R.; CANISSO, I.F.; PAZINATO, F.M.; BORBA, L.A.; FEIJÓ, L.; FINGER, I.S.; TORIBIO, R.E.; NOGUEIRA, C.E.W. Estradiol cypionate aided treatment for experimentally induced ascending placentitis in mares. **Theriogenology**, v.102, p.98-107, 2017.

KUMAR, P.; MENDELSON, C.R. Estrogen-Related Receptor  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) Mediates Oxygen-Dependent Induction of Aromatase (CYP19) Gene Expression during Human Trophoblast Differentiation. **Molecular Endocrinology**, v.25, p. 1513–1526, 2011.

LEBLANC, M.M.; GIGUERE, S.; LESTER, G.D.; BAUER, K.; PACCAMONTI, L. Relationship between infection, inflammation and premature parturition in mares with experimentally induced placentitis. **Equine Vet Journal**, Suppl 41, p. 8-14, 2012.

SCHLAFER, D. H. Postmortem Examination of the Equine Placenta, Fetus, and Neonate: Methods and Interpretation of Findings. **Proceedings AAEP**, v. 50, p. 18, 2004.

WILSHER, S.; GOWER, S.; ALLEN, W.R. Immunohistochemical localisation of progesterone and oestrogen receptors at the placental interface in mares during early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v.129, p. 200–208, 2011.