



## **Análise da expressão de receptores para progesterona e estrógeno $\alpha$ em placentas caninas provenientes de eutocia e distocia**

*Analysis of the expression of receptors for progesterone and estrogen  $\alpha$  in canine placentas from eutocia and dystocia*

**I.F.Costa<sup>1,5</sup>, M.C.R. Luvizotto<sup>2</sup>, M.F. Costa<sup>3</sup>, J.A.C. Lourenção<sup>1</sup>, C.R. Padovani<sup>4</sup>,  
R.L. Amorim<sup>1</sup>, N.C. Prestes<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Araçatuba, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Médica veterinária autônoma, Manduri, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>5</sup>Correspondência: isa\_frazon@hotmail.com

### **Resumo**

Para a espécie canina, pouco se conhece a respeito da interação hormônio-receptor nos tecidos reprodutivos. Assim, a administração de hormônios durante a gestação e o parto é aplicada de forma empírica nessa espécie. Objetiva-se com o presente estudo a análise da expressão RP e do estrógeno  $\alpha$  em placentas de cadelas e a possível correlação com os casos de distocia. Foram coletadas 25 placentas, provenientes de 25 cadelas, com e sem raça definida. Conforme o tipo de parto, as placentas foram divididas em três grupos experimentais: GN (n = 13), placentas obtidas de parto normal; GC (n = 9), placentas obtidas de cesariana; e GAUP (n = 3), placentas oriundas de cadelas em atonia uterina primária. Os fragmentos placentários foram parafinizados e seccionados em cortes de 3 $\mu$ m, e a análise imuno-histoquímica foi realizada com incubação do anticorpo primário na diluição de 1:50 para progesterona e estrógeno  $\alpha$ . A expressão dos RP foi evidente nas células decíduais do labirinto placentário no GN e no GC. Nas placentas GAUP, não houve marcação ou esta se apresentou fraca e escassa para RP. Não foi possível a detecção de RE $\alpha$  nas placentas dos três grupos experimentais. Conclui-se que a expressão de RP em placentas provenientes de atonia uterina é fraca ou ausente quando comparada à intensa expressão encontrada nas placentas provenientes de parto normal e cesárea. Placentas caninas a termo podem não expressar RE $\alpha$ .

**Palavras-chave:** cadela, célula decidual, labirinto placentário, receptor de estrógeno, receptor de progesterona.

### **Abstract**

*For the canine species almost nothing we know regarding to the interreaction hormone-receptor in the reproductive tissues. Thus the administration of hormones during pregnancy and whelping is applied empirically in this species. The aim of this study is the expression RB analysis and estrogen  $\alpha$  in the bitch placentas and the possible correlation with the dystocia cases. Were collected 25 placentas from 25 bitch, with and without defined race. According to the kind of whelping the placentas were divided into three experimental groups, GN (n = 13) placentas obtained from normal whelping, GC (n = 9) placentas obtained from cesarian section and GAUP (n = 3) placentas from bitch in primary uterine atony. The placenta fragments were paraffin embedded and sectioned in 3  $\mu$ m cuts, a immunohistochemical analysis was performed with incubation of the primary antibody at a dilution of 1:50 for progesterone and estrogen  $\alpha$ . The expression of RP was evident in the decidual cells in the placental labyrinth in GN and GC. In the GAUP placentas there was no mark or it performed weak and scarce for RP. It wasn't possible to detect RE $\alpha$  in the placentas of three experimental groups. We got the conclusion that the RP expression in placentas from uterine atony is weak or absent when compared to intense expression found in the placentas from normal whelping and cesarian section. Canine placentas themselves don't express RE $\alpha$ .*

**Keywords:** bitch, decidual cells, estrogen receptor, placental labyrinth, progesterone receptor.

### **Introdução**

A indústria *pet* brasileira ocupa o segundo lugar absoluto no mercado mundial. O número de cães no país chega a 52,2 milhões, equivalente a 1,8 cachorro por domicílio (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2014). Inicialmente as pesquisas pertinentes à reprodução animal eram direcionadas aos animais de produção. Com a evolução do vínculo entre o cão e o homem, os estudos relacionados a essa espécie tornaram-se mais relevantes (Aralla et al., 2013).

A placentação e o desenvolvimento das membranas fetais na espécie canina atualmente são estudados de forma extensiva, já que o conhecimento da morfologia placentária possibilita reconhecer corretamente



alterações patológicas e sua possível correlação com a viabilidade neonatal (Miglino et al., 2006; Aralla et al., 2013).

Na cadela, esta é classificada como endoteliocorial, pois apenas o endotélio separa o sangue materno do tecido fetal, já que, durante o período de implantação, o epitélio e o tecido conjuntivo desaparecem (Banks, 1992). Como do tipo zonária, com base na localização central, ao redor dos embriões/fetos, e também em formato de faixa, na qual as vilosidades coriônicas se agrupam semelhante a uma cinta em contato direto com o útero. Estas vilosidades também são consideradas do tipo invasiva, contém sincitiotrofoblasto, que interfere no estabelecimento das conexões com o sangue materno. (Hafeze Hafez, 2004; Lacroix, 2004; Furukawa et al., 2014).

A placenta é uma estrutura complexa, formada pela união das membranas fetais com o endométrio. Existente somente nos mamíferos, é considerada um órgão de transição presente apenas no período gestacional e sua função é a ligação entre a mãe e o feto para promover suprimento de oxigênio e nutrientes, remoção de detritos metabólicos, produção e secreção de hormônios, fatores de crescimento fetal e regulação do ambiente uterino do feto (Prestes e Landim-Alvarenga, 2006).

Sabe-se que a placenta tem capacidade de produzir e secretar hormônios, além de possuir receptores hormonais. Os principais hormônios reguladores da função e do crescimento do trato reprodutivo da fêmea são a progesterona e o estrógeno, cuja ação é mediada pela interação específica com seus receptores intracelulares, entretanto a presença desses receptores na placenta canina ainda não está bem estabelecida (Veiga et al., 2009; Ithurralde et al., 2013).

Conforme descrito por Henríquez et al. (2012), a progesterona integra a formação das células decíduais no útero materno, cuja função é vital para a nutrição do embrião no início do período gestacional. Kowalewski (2012) menciona as células decíduais como sendo a única célula da placenta canina capaz de expressar receptores de progesterona (RP).

Alguns estudos demonstraram que o estrógeno é sintetizado na placenta de humanos e animais, no entanto não há síntese desse hormônio na placenta de cães, ratos e coelhos, fato atribuído ao curto período gestacional nestas espécies. Em contrapartida, seres humanos, primatas, ruminantes e equinos são capazes de produzir estrógeno placentário por apresentarem longo período gestacional (Nishiyama et al., 1999).

A expressão de RP e de RE $\alpha$  estão significativamente correlacionadas (Veiga et al., 2009. De acordo com Wu et al. (1993), esses receptores foram observados nas células decíduais de placentas de primatas e humanos. Segundo Vermeirsch et al. (2000), o RP e o RE $\alpha$  estão presentes apenas na porção materna da placenta canina, acarretando na possível não regulação direta da função placentária por ambos os hormônios.

Objetiva-se com o presente estudo a análise da expressão de receptores para progesterona e estrógeno alfa ( $\alpha$ ) em placentas de cadelas e a possível correlação com os casos de distocia.

## Material e Métodos

Os procedimentos experimentais do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional, sob o número de protocolo 129/2013-Ceua.

Foram coletadas 25 placentas, provenientes de 25 cadelas, com e sem raça definida, idade entre dois e 10 anos, com peso médio de 20kg, primíparas e múltíparas, fecundadas por monta natural, previamente submetidas a exame clínico para confirmação da higiene.

De acordo com a necessidade apresentada individualmente pelas cadelas, a coleta das placentas foi realizada por meio de parto normal, cesariana ou pelo uso de fármacos indutores do parto, sendo o protocolo utilizado: ocitocina 1UI/kg por via subcutânea, gluconato de cálcio 50mg/kg por via intravenosa (IV) e glicose 0,5g/kg/IV/h. Conforme o tipo de parto, as placentas foram divididas em três grupos experimentais: GN (n = 13), placentas obtidas de parto normal; GC (n = 9), placentas obtidas de cesariana; e GAUP (n = 3), placentas oriundas de cadelas em atonia uterina primária.

Fragmentos placentários 1 x 1cm foram seccionados da região próxima ao cordão umbilical e armazenados em formol tamponado 10% durante 48h e posteriormente incluídos em parafina na orientação transversal.

Os fragmentos placentários parafinizados foram seccionados em cortes de 3 $\mu$ m de espessura e colocados em lâminas silanizadas, posteriormente desparafinizados em xilol e seguidamente hidratados em banhos de álcool. A recuperação antigênica foi realizada em solução de citrato de sódio 10mM, pH 6,0 corrigido com hidróxido de sódio, com incubação em panela de pressão tipo pascal (Dako, USA).

O bloqueio das peroxidases endógenas ocorreu em solução de peróxido de hidrogênio a 8% por 20min; em seguida, o bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com leite em pó desnatado (g/100 mL) por 60min e, posteriormente, por lavagens em solução tampão Tris-pH 7,4.

Foi realizada a incubação com o anticorpo primário na diluição de 1:50 para progesterona e estrógeno  $\alpha$  (anticorpo monoclonal cat. n° 1546, Immunotech, France e anticorpo Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor  $\alpha$  clone 1D5 - Dako - CA, USA, Cód M7047, respectivamente) em câmara úmida, durante 18h a 4°C.

Para ambos os receptores, os controles positivos utilizados foram cortes histológicos de endométrio canino com hiperplasia endometrial cística e glândula mamária canina com presença de células tumorais (Srisuwatanasagul et al., 2005; Volpato et al., 2012; Mainenti et al., 2014). Como controle negativo, a lâmina contendo tecido placentário foi incubada omitindo o anticorpo primário.

Após o período de incubação, as lâminas foram submetidas a banhos de TRIS e, posteriormente, incubadas com o anticorpo secundário Histofine® (polímero hrp - Nichirei Bioscience cod. 414154f) por 30min em estufa a 27°C. Ao término dessa etapa, foi realizada nova lavagem com solução tampão TRIS - pH 7,4 e revelação com o cromógeno 3,3 -diaminobenzidina (DAB) durante cinco minutos.

Os cortes histológicos foram contracordados com hematoxilina de Mayer por dois minutos; em seguida, foi realizada a desidratação do material com banhos de álcool e xilol. Por fim, as lâminas foram montadas utilizando-se resina sintética e, posteriormente, avaliadas em microscopia óptica quanto à intensidade da imunomarcagem, de acordo com o descrito por Hewitt et al. (2011), para marcação nuclear: 0, ausência de coloração; 1, coloração fraca em menos de 50% das células; 2, coloração forte em menos de 50% das células ou coloração fraca em mais de 50% das células; e 3, coloração forte em mais de 50% das células.

Para a associação das variáveis imunomarcagem das células para estrógeno  $\alpha$  e progesterona nos tecidos placentários dos grupos experimentais, utilizou-se o teste de Goodman, complementado com as comparações múltiplas entre e dentro de populações multinomiais, no nível de 5% de significância (Goodman, 1964, 1965).

## Resultados e Discussão

Nos controles negativos, não houve marcação; já os controles positivos exibiram marcação para ambos os anticorpos utilizados.

A fim de chegar aos resultados pertinentes a este estudo, inicialmente foi testado o receptor de progesterona (RP), clone 1A6 (cod M3529) Dako, contudo sem resultados satisfatórios nas diluições empregadas para o tecido placentário. Testou-se também alíquota dos anticorpos Monoclonal Rabbit Estrogen receptor clone SP1, Biogen® e RP clone SP42, Biogen®, nas diluições 1:50 e 1:100, porém eles não demonstraram êxito para este estudo.

A expressão dos receptores para progesterona foi nuclear, corroborando com Vermeirsch et al. (2000) e Veiga et al. (2009). Segundo esses autores, não há evidência da expressão do RP na porção fetal da placenta, ou seja, ela está presente apenas nos tecidos de origem materna.

Sabe-se que há declínio plasmático das concentrações de progesterona anteriormente ao parto, entretanto o mesmo fato não ocorre com a disponibilidade do receptor, o que explica a intensa expressão de RP nas placentas do GN (Fig. 1a) e do GC. Dessa maneira, sugere-se que a redução da concentração sérica da progesterona seja mais importante para o desencadeamento do trabalho de parto do que a disponibilidade de seus receptores placentários, de acordo com a literatura (Vermeirsch et al., 2000).

A expressão dos receptores de progesterona foi evidente (Fig. 1) em toda a região do labirinto placentário, provavelmente nas células decíduais, pois estas foram citadas por Kowalewski et al. (2010) como as únicas capazes de expressar RP.

Nas placentas do GAUP, a marcação foi fraca (Fig. 1b) ou não houve marcação (Fig. 1c) para RP. Segundo Kowalewski et al. (2010) e Gram et al. (2014), os receptores de ocitocina também são expressos nas células decíduais placentárias, portanto colocalizados aos RP. Como neste grupo houve a administração de ocitocina exógena a fim de promover estímulos às contrações uterinas, acredita-se que tal fato possa ter inibido a expressão dos RP nessas placentas.

Embora Vermeirsch et al. (2000) tenham demonstrado a expressão de RE $\alpha$  nas placentas caninas, nas condições em que este trabalho foi realizado, utilizando a técnica de imuno-histoquímica, não foi possível a detecção de RE $\alpha$  nas placentas dos três grupos experimentais (Fig. 1d). Contudo, Al-Blander (2006), em seu estudo com ratas, sugeriu que, no transcórter da gestação, há uma diminuição dos RE $\alpha$  placentários devido a um mecanismo protetor contra os efeitos deletérios do estrógeno ao final da gestação, pois existe aumento sérico desse hormônio para desencadear o trabalho de parto e, por consequência, nesse período a placenta apresenta menor capacidade de resposta aos estímulos desse hormônio.

As placentas analisadas neste estudo foram obtidas de gestação a termo, visto que Veiga (2008), utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de RE placentário em cadelas, concluiu que o ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para RE $\alpha$  possui maior expressão até 40º dia de gestação, portanto placentas a termo tendem a apresentar pouca expressão ou não apresentar RE $\alpha$ , o que pode esclarecer a não exibição desses receptores nas placentas avaliadas.

De acordo com Shoni et al. (2013), placentas normais ou com doenças trofoblásticas gestacionais em humanos possuem RE $\alpha$  nas células decíduais, porém estes encontram-se em níveis não detectáveis imuno-histoquimicamente. Em contrapartida, Rawden e Leavitt (1980) descreveram a inibição de RE $\alpha$  devido à intensa expressão de RP pela ação parácrina entre esses receptores. No presente estudo, as placentas do GN e do GC expressaram RP nas células decíduais do labirinto placentário, o que pode ter ocasionado a não expressão dos

RE $\alpha$ , conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição imuno-histoquímica da expressão do receptor para progesterona nas células do labirinto placentário segundo os grupos experimentais na espécie canina.

Grupo	Ausente	Fraca	Forte < 50% ou fraca > 50%	Forte > 50%	Total
GN	0%(0/13) <sup>aA</sup>	7,7%(1/13) <sup>aA</sup>	61,5%(8/13) <sup>bB</sup>	30,8%(4/13) <sup>bAB</sup>	13
GC	0%(0/9) <sup>aA</sup>	11,1%(1/9) <sup>aAB</sup>	55,6%(5/9) <sup>bB</sup>	33,3%(3/9) <sup>bAB</sup>	9
GAUP	33,3%(1/3) <sup>aA</sup>	66,7%(2/3) <sup>aA</sup>	0%(0/3) <sup>aA</sup>	0%(0/3) <sup>aA</sup>	3

GN: grupo parto normal; GC: grupo cesariana; GAUP: grupo atonia uterina primária. <sup>a,b</sup> Comparação de grupos fixada a categoria de resposta ( $P < 0,05$ ). <sup>A,B</sup> Comparação das categorias de resposta dentro do grupo ( $P < 0,05$ ).

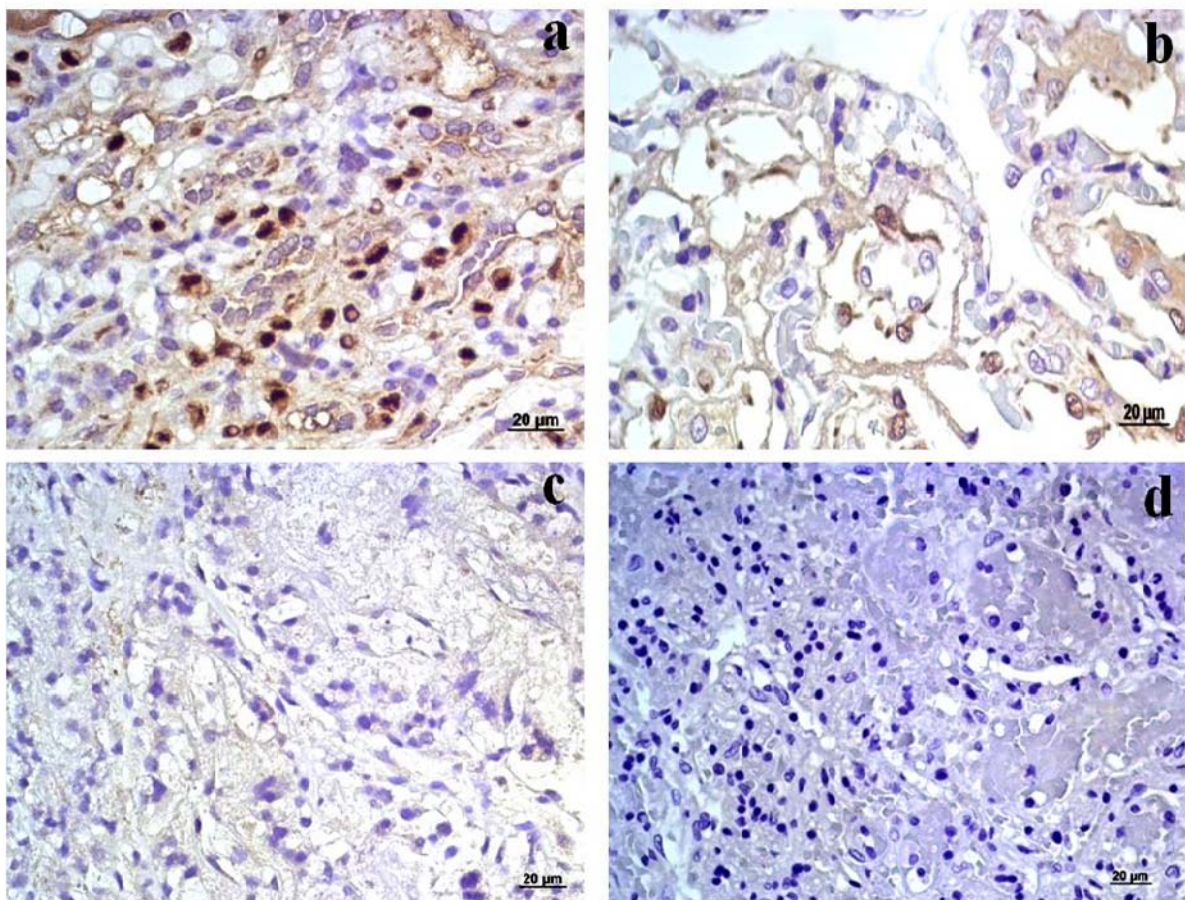


Figura 1. Fotomicrografia da zona lamelar de placenta de cadela; (a) GN - imunomarcção nuclear intensa para progesterona, hematoxilina de Mayer 40x; (b) GAUP - imunomarcção para progesterona, intensidade fraca, hematoxilina de Mayer 40x; (c) GAUP - ausência de imunomarcção para progesterona, hematoxilina de Mayer 40x; (d) GN - ausência de imunomarcção para estrógeno  $\alpha$ , hematoxilina de Mayer 20x. Fonte: Arquivo pessoal.

### Conclusões

Com base no presente estudo, conclui-se que a expressão de receptores para progesterona em placentas provenientes de atonia uterina é fraca ou ausente quando comparada à intensa expressão encontrada nas placentas provenientes de parto normal e cesária. Placentas caninas a termo podem não expressar receptores para estrógeno  $\alpha$ .

### Agradecimento

À Fapesp, pelo auxílio concedido à pesquisa.



## Referências

- Al-Blader DM.** Estrogen receptors alpha e beta in rat placenta: detection by RT-PCR, real-time PCR and Western blotting. *Reprod Biol Endocrinol*, v.4, p.1-10, 2006.
- Aralla M, Groppetti D, Caldarini L, Cremonesi F, Arrighi S.** Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from early implantation to term. *Res Vet Sci*, v.95, p.15-22, 2013.
- Banks WJ.** *Histologia veterinária aplicada*. 2.ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.
- Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A.** A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *J Toxicol Pathol*, v.27, p.11-18, 2014.
- Goodman LA.** On simultaneous confidence intervals for multinomial population. *Technometrics*, v.7, p.247-254, 1965.
- Goodman LA.** Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial population. *Ann Math Statist*, v.35, p.716-725, 1964.
- Gram A, Boos A, Kowalewski MP.** Uterine and placental expression of canine oxytocin receptor during pregnancy and normal and induced parturition. *Reprod Domest Anim*, v.49, p.41-49, 2014.
- Hafez ESE, Hafez B.** *Reprodução animal*. 7. ed. São Paulo, SP: Manole, 2004. v.7, 513 p.
- Henríquez I R, Smok C S, Prieto G R.** Placenta: compared anatomy and histology. *Int J Morphol*, v.30, p.1490-1496, 2012.
- Hewitt SM, Robinowitz M, Bogen SA.** Quality assurance for design control and implementation of immunohistochemistry assays: approved guideline. 2. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011. (CLSI document I/LA28-A2).
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Censo populacional de 2014. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 2014.
- Ithurralde J, Costas AL, Pessina P, Cueto E, Fila, Meikle A.** Immunohistochemical determination of estrogen receptor-  $\alpha$  in canine vaginal biopsies throughout proestrus, estrus, and early diestrus. *Theriogenology*, v.80, p.805-811, 2013.
- Kowalewski MP, Beceriklisoy HB, Pfarrer C, Aslan, S, Kindahl H, Kucukaslan I, Hoffmann B.** Canine placenta: a source of prepartal protaglandins during normal and antiprogesterone-induced parturition. *Reprod Res*, v.139, p.655-664, 2010.
- Kowalewski MP, Michel E, Gram A, Boos A, Guscetti F, Hoffmann B, Aslan, S, Reichler I.** Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition. *Reprod Biol Endocrinol*, v.9, p.109, 2012.
- Lacroix CFE.** *Endocrinología y Fisiología de hembra canina*. In: Gobello C. *Temas de reproducciones de caninos y felinos por autores latino-americanos*. Buenos Aires: Grafica Latina, 2004. p.175-190.
- Mainenti M, Rasotto R, Carnier P, Zappulli V.** Oestrogen- $\alpha$  and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. *Vet J*, v.202, p.62-68, 2014.
- Miglino MA, Ambrósio CE, Martins DS, Wenceslau CV, Pfarrer C, Leiser R.** The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes. *Theriogenology*, v.66, p.1699-1702, 2006.
- Nishiyama T, Tsumagari S, Ito M, Kimura J, Watanabe K, Taya K, Takeishi M.** Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog. *Anat Histol Embryol*, v.28, p.125-129, 1999.
- Prestes NC, Landim-Alvarenga FC.** *Obstetrícia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 241 p.
- Rawden W E, Leavitt W W.** Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen receptor: dependence on RNA and protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci*, v.77, p.5856-5860, 1980.
- Shoni M, Nagymányoki Z, Vitonis AF, Jimenez C, Shu-Wing NG, Quade BJ, Berkowitz R.S.** p-21-Activated kinase-1, -4 and -6 and estrogen receptor expression pattern in normal placenta and gestational trophoblastic diseases. *Gynecol Oncol*, v.131, p.759-763, 2013.
- Srisuwatanasagul K, Sukjumlong S, Sirivaidyapong S, Pianchop S.** An immunohistochemical study of the progesterone receptor (pr) expression in pyometra cases and normal uteri at the time of dioestrus in the bitch. *Thai J Vet Med*, v.35, p.58-64, 2005.
- Veiga GAL.** Expressão gênica dos receptores de estrógeno e ocitocina no endométrio miométrio e placenta durante a gestação e parto em cadelas. 2008. 73f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2008.
- Veiga GAL, Silva LCG, Lúcio CF, Rodrigues JA, Vannucchi CI.** Endocrinologia da gestação e parto em cadelas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.33, p.3-10, 2009.
- Vermeirsch H, Simoens P, Lauwers H.** Immunohistochemical detections of the estrogen receptor- $\alpha$  and progesterone receptor in the canine pregnant uterus and placental labyrinth. *Anat Rec*, v.260, p.42-50, 2000.
- Volpato R, Martin I, Ramos RS, Tsunemi MH, Laufer-Amorin R, Lopes MD.** Imunoistoquímica de útero e cérvix de cadelas com diagnóstico de piometra. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.64, p.1117-1117, 2012.
- Wu W, Brooks J, Millar MR, Ledger WL, Gliaser AF, McNeilly AS.** Immunolocalization of oestrogen and progesterone receptors in the human decidua in relation to prolactin production. *Hum Reprod*, v.8, p.1129-1135, 1993.