



Comparação da imunolocalização de receptores de progesterona em placentas de bovinos normais e clonados

Comparison of the immunolocalization of progesterone receptors in placentas of bovine normal and cloned

V.M. Fernandes¹, T.P.A. Aloia¹, S.E.A.L. Will¹, C.E. Ambrósio², A.L.R. Francioli¹,
M.A. Miglino¹, R.E.G. Rici^{1,3}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, São Paulo, SP, Brasil.

²Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Departamento de Ciências Básicas, Pirassununga, SP, Brasil.

³Correspondência: roseeli@usp.br

Resumo

A progesterona é um hormônio fundamental na manutenção da gestação nos mamíferos. Em bovinos clonados, perdas gestacionais significativas ocorrem devido à deficiência placentária. Tendo em vista esse problema, o objetivo do trabalho foi analisar em diferentes idades gestacionais a imunolocalização para receptores de progesterona em placentas de animais não clonados e clonados. Tecidos placentomais de bovinos não clonados foram obtidos da linha de abate no Matadouro Mantiqueira, enquanto os tecidos placentomais dos animais clonados com idades gestacionais de 68, 135, 225 e 270 dias de gestação foram obtidos em empresas especializadas em clonagem animal. Os tecidos foram processados e embebidos em paraplast para localização de receptores de progesterona, utilizando-se a técnica de imuno-histoquímica pelo anticorpo monoclonal (Progesterone receptor SER 294). Pela imuno-histoquímica, comparando-se a concentração de receptores de progesterona na placenta de animais clonados com as de animais não clonados, em diferentes idades gestacionais, observou-se que as células dos placentomas dos animais clonados apresentaram uma marcação mais intensa de receptor de progesterona nas idades de 135 e 270 dias de gestação em relação aos não clonados. Tal fato sugere que a presença de progesterona no final da gestação pode ser mais uma das possíveis causas de gestações prolongadas.

Palavras-chave: bovino, clone, imuno-histoquímica, placentomas, progesterona.

Abstract

To progesterone is a fundamental hormone in the maintenance of the gestation in the mammals. In bovine they cloned, losses gestational significant, occur due to the placental deficiency. Having in mind that problem, the objective of the work was analyze in different gestational ages to immune stained for receivers of progesterone in placentas of normal animals and cloned. Placentomal tissues of bovine normal were obtained of the line of counts on in the Slaughterhouse Mantiqueira, while the placentomal tissues of the animals cloned with gestational ages of 68, 135, 225 and 270 days of gestation were obtained in companies specialized in animal cloning. The fabrics were prosecuted and absorbed in paraplast for progesterone receivers location, utilizing itself to technical of immunohistochemistry by the antibody monoclonal (Progesterone receiver BE 294). By the immunohistochemistry comparing the progesterone receivers concentration in the placenta of animals cloned, with the of animals done not manipulate, in different gestational ages we observe that the cells of the placentomal tissues of the animals manipulated (cloned) presented a more intense marking of receiver of progesterone in the ages of 135 and 270 days of gestation regarding the done not manipulate. Suggesting that the presence of progesterone in the end of the gestation can be more one of the possible cause of gestations prolonged.

Keywords: bovine, cloned, immunohistochemistry, placentome, progesterone.

Introdução

A síntese de progesterona pelas células binucleadas da placenta de bovinos foi determinada por Reimers et al. (1985) e confirmada por Ullman e Reimers (1989), inicialmente mediante cultura celular. O corpo lúteo é o responsável pela produção de progesterona e pela manutenção da gestação em bovinos. A placenta também tem um papel importante, embora temporário, neste processo. Por meio de imuno-histoquímica, foi detectada a presença de receptores para progesterona na região dos placentomas e carúncula, além de reatividade no pericito dos vasos carunculares (Shuler et al., 1999). A presença de receptores de progesterona na placenta bovina já tem sido discutida no contexto da esteroidogênese placentária (Boss et al., 2003, 2006).

A gestação, numa definição mais precisa, compreende o período entre a fecundação do ovócito e a liberação do feto, caracterizado por alta concentração de progesterona em circulação e íntimo contato materno-fetal. Este evento fisiológico está compreendido dentro das fases de metaestro e diestro do ciclo estral. O ciclo



reprodutivo em bovinos é dividido em estro, metaestro, diestro e, caso não haja fecundação, proestro. Durante o estro, ocorre a ovulação e a receptividade sexual. O metaestro é a fase pós-ovulatória, quando o corpo lúteo se desenvolve e começa a secretar progesterona. A fase de diestro é quando a progesterona proveniente do corpo lúteo influencia nas estruturas sexuais acessórias, ou seja, quando o corpo lúteo passa a ser funcional, já que ele tem como função preparar o útero para o início e a manutenção da gestação. As fases de metaestro e diestro são conhecidas também como fases progesterônicas ou secretoras, por justamente secretarem em maior quantidade progesterona (McDonald, 1981).

A placenta começa a se desenvolver com a implantação do blastocisto no endométrio materno. A concentração de progesterona circulante afeta a sobrevivência e o crescimento do blastocisto no começo da gestação (Mann e Lamming, 1999; Mann et al., 2006). Em bovinos, o estabelecimento da gestação e o rápido desenvolvimento do blastocisto ocorrem ao mesmo tempo em que a concentração de progesterona sobe (Sreenan e Diskin, 1983; Mann e Lamming, 2001).

No curso de uma gestação normal, há um período em que o corpo lúteo involui e a placenta se torna responsável pela síntese de progesterona. Esse período se inicia, aproximadamente, no 180º dia de gestação até o 250º (Reimers et al., 1985). Durante o período pré-parto, ocorre uma diminuição da síntese de progesterona, o que é um sinal para o parto e para a expulsão da placenta. Porém, observou-se que essa concentração de progesterona se manteve alta em animais que necessitaram de cesariana e em animais que apresentaram retenção placentária, o que sugere haver uma relação entre a concentração placentária de progesterona, o parto e a retenção da placenta.

Graças aos avanços da biologia molecular, tornou-se possível a clonagem, o que gerou um grande valor a esses animais, possibilitando que as características desejadas a eles pudessem ser selecionadas e transmitidas de maneira mais efetiva. Entretanto, uma grande ineficiência nessas gestações sugere que uma das causas seja a deficiência placentária, visto ser um órgão relacionado à sobrevivência do feto (Miglino, 2004).

Por fim, ao se deparar com ineficiência placentária em animais clonados, quando comparados aos não clonados, este trabalho teve como objetivo imunolocalizar os receptores de progesterona nas placentas de bovinos clonados e não clonados, a fim de comparar, em diferentes idades gestacionais, sua imunolocalização, uma vez que este hormônio é o responsável pela manutenção da gestação.

Material e Métodos

Foram obtidos úteros gravídicos de bovinos não clonados da linha de abate no Matadouro Mantiqueira, em São José dos Campos - SP. Os cinco placentomas de bovinos clonados no final de gestação (270 dias) foram obtidos na empresa Cyagra - Mogi Mirim, SP. Os placentomas de bovinos clonados com idades de 68, 135 e 225 dias de prenhez foram produzidos pela equipe Minerembryo Reprodução e Produção Animal Ltda. - Alfenas, MG, sendo que as manipulações de embriões clonados foram realizadas pela equipe do Prof. Dr. Flávio Meirelles, da FZEA-USP - Clonest Biotecnologia Animal - Pirassununga, SP. Já os placentomas de bovinos clonados com idades de 225 e 270 dias de prenhez foram produzidos pela equipe do Prof. Dr. Marcelo Bertolini, em Lages - SC. As medidas cefalococcígeas dos fetos (CR - *crownrump*) foram tomadas para se determinar a idade de prenhez, a fim de serem comparadas com as medidas dos animais clonados, pela fórmula: $X = 2,5 (Y + 21)$, Richardson, 1989).

Macroscopicamente, as placentas foram abertas na região antimesometrial e os placentomas foram coletados aleatoriamente, sendo estes fixados em solução de formaldeído tamponado a 10%. Para microscopia, o material foi desidratado em série crescente de concentração de etanóis (de 70 a 99,8%) e diafanizado em xilol, com posterior inclusão em paraplast. Com os blocos de paraplast, foram produzidos cortes histológicos de 5 µm de espessura utilizando-se micrótomo (Leika, German). Em seguida, os cortes foram colocados em lâminas silanizadas.

Para realizar a análise imuno-histoquímica para progesterona, os cortes foram desparafinizados em estufa a 37°C por 24 h. Em seguida, foram imersos em xilol (10 min), álcool absoluto (5 min), álcool 95º (5 min), álcool 70º (5 min) e água destilada (5 min).

Posteriormente, os cortes histológicos foram imersos em tampão citrato, pH 6,0, e irradiados em micro-ondas na potência máxima por quatro ciclos de cinco minutos para recuperação antigênica. Depois de terem retornado à temperatura ambiente, eles foram lavados com água destilada, em dois banhos de dois minutos cada, e reequilibrados em PBS pH 7,4 (um banho de 5 min). A peroxidase celular endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 3% em metanol (dois banhos de 10 min cada). Procedeu-se, então, à incubação com anticorpo monoclonal produzido em camundongo, diluído na proporção de 1:60 em PBS 0,1 M, pH 7,4 (Progesterone receptor SER 294), durante 20 h, em câmara fria e úmida a 5°C.

Após a incubação, no segundo dia, os cortes foram lavados com PBS (três banhos de 5 min cada) e submetidos à incubação com o anticorpo secundário biotilado anticamundongo (*Biotinylated anti-mouse IgG (H+L) Vector USA*), diluído na proporção de 1:200 em PBS 0,1 M, pH 7,4, por 15', em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS (três banhos de 5 min cada) e incubados com o complexo ABC (*Vector USA*), diluído em PBS 0,1M, pH 7,4, por 15 min, em câmara úmida a 37°C.

Foram lavados em PBS 0,1M, pH 7,4 (três banhos de 5 min cada) e revelados com DAB (*Diaminobenzidine-Sigma - USA*) 0,06 g em 10 mL de PBS 0,1M, pH 7,4, e adicionado 120 mL de peróxido de hidrogênio 30V (volumes) por três a sete minutos. A seguir, após lavagem em água corrente e destilada, foram contracolorados por hematoxilina de Harris. Controles foram realizados em iguais condições, omitindo-se a incubação com anticorpo primário.

Resultados

Todos os cortes apresentaram coloração positiva para receptores de progesterona no núcleo das células trofoblásticas gigantes, diferindo em sua concentração em relação ao estágio da gestação e à origem do embrião (clonados e não clonados).

A análise imuno-histoquímica para o receptor de progesterona nas idades de 68 e 225 dias de gestação não apresentou diferenças na intensidade de marcação positiva entre os animais clonados e não clonados. Os animais clonados apresentaram uma marcação mais intensa de receptor de progesterona de 135 dias e 270 dias de gestação em relação aos não clonados, como mostra a Fig. 1. Encontraram-se células trofoblásticas gigantes ao longo de toda a gestação, sendo estas binucleadas, trinucleadas ou com a presença de apenas um núcleo gigante (mononucleada). Esta figura permite uma comparação na imunomarcação com receptor de progesterona entre os animais clonados e não clonados, em todas as idades gestacionais analisadas.

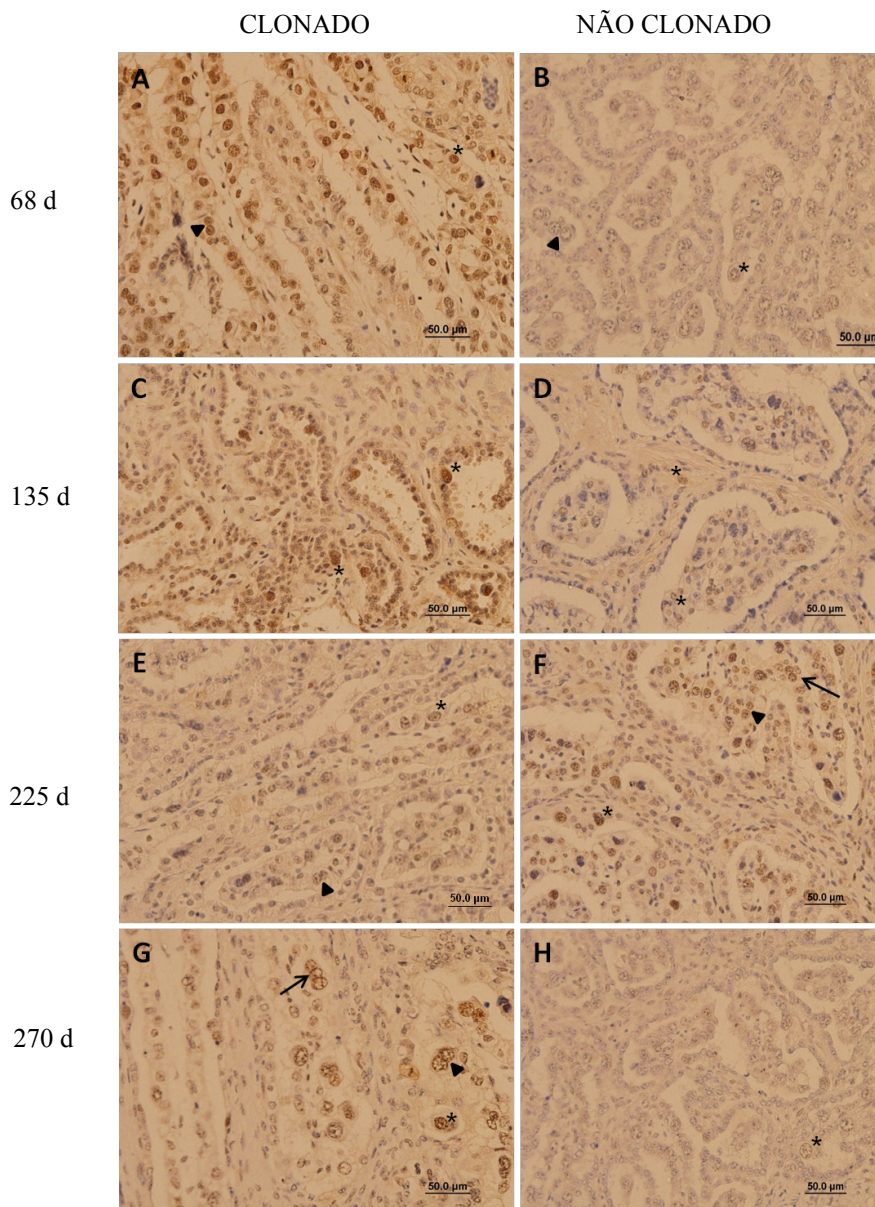


Figura 1. Fotomicrografia dos placentomas de bovinos não clonados e clonados com imunolocalização dos receptores de progesterona em diferentes idades de prenhez. Notar a imunolocalização nas células: mononucleadas (asterisco), binucleadas (cabeça de seta) e trinucleadas (seta).

O material resultante desta reação imuno-histoquímica foi analisado pelo software Image J, por meio do qual foi feita a contagem das células que apresentaram marcação positiva para receptores de progesterona. Foram analisados cortes das regiões sobre uma ampliação de 400x, e contados os núcleos das células trofoblásticas que tiveram marcação positiva para receptores de progesterona. Não houve um padrão de intensidade de coloração que pôde ser identificado. Os valores médios obtidos foram analisados estatisticamente pelo método da análise de variância (Anova), Fig. 2.

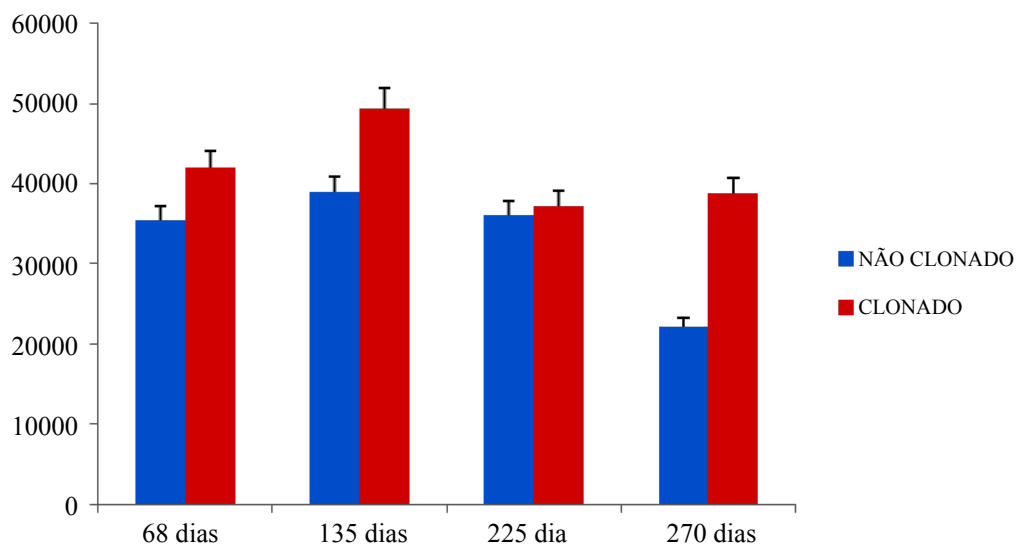


Figura 2. Valores médios dos índices de progesterona nas diferentes idades gestacionais em bovinos clonados e não clonados.

Discussão

Esteroides são hormônios lipofílicos, logo muito apolares para se dissolverem no sangue, sendo necessário o uso de proteínas carreadoras, como a transcortina (Cunningham, 1999), que os levem ao seu local de liberação em seus tecidos específicos. Nas células-alvo, esses hormônios passam através da membrana plasmática por simples difusão e se ligam a proteínas específicas no núcleo. A ligação do hormônio desencadeia alterações na conformação das proteínas receptoras de tal forma que elas se tornam capazes de interagir com sequências regulatórias do DNA, alterando, assim, a expressão gênica. O complexo hormônio-receptor ligado pode intensificar ou suprimir a expressão de genes específicos, porém o tempo para que isso ocorra é longo, podendo levar horas ou dias (Nelson et al., 2004). Para que possa penetrar na célula-alvo e produzir atividade biológica, o hormônio deve estar em sua forma livre (Cunningham, 1999), assim a concentração de esteroides no plasma é um bom reflexo para medir a taxa de secreção.

A esteroidogênese placentária é feita pelas células trofoblásticas gigantes, sendo que algumas delas são binucleadas. As células trofoblásticas gigantes foram facilmente identificadas, pois possuem tamanho muito maior que as células mononucleadas, e foram coradas mais intensamente que as células adjacentes. Essas células, também conhecidas como células binucleadas, são responsáveis pela síntese de progesterona na placenta. Com três núcleos, elas são resultantes da fusão de uma célula fetal (binucleada trofoblástica) com uma célula materna, corroborando os achados de Wooding (1984).

Segundo Shemesh et al. (1992, 1994), em uma gestação normal, a placenta de bovinos só produz quantidades significativas de progesterona a partir de 90 dias de gestação, o que também foi observado. Porém, o mesmo fato não aconteceu em placentas de animais manipulados. Houve marcação significativa para os receptores de progesterona nos placentônios de 68 dias.

As células binucleadas têm papel importante no mecanismo de separação das membranas fetais durante o parto (Gross et al., 1991; Wooding, 1992). No final da gestação e no parto imediato, o número de células binucleadas está reduzido (Wooding, 1984), o que não foi observado nos placentônios de embriões clonados. A expressão de receptores de progesterona no placentoma desses animais se manteve relativamente constante, com poucas variações, durante todo o período gestacional.

Segundo Rici et al. (2009), as placentas dos animais clonados exibiam maior atividade de proliferação e taxa reduzida de apoptose nas regiões centrais dos placentomas quando comparadas com as dos animais-controle no final da gestação. Outro ponto a ser abordado refere-se que nas placentas de vacas não clonadas a proliferação e a apoptose não houve um padrão específico, segundo Facciotti et al. (2009).



Em conclusão, sugere-se que a porcentagem de células imunomarcadas pela progesterona no final da gestação e, aliado a isso, a permanência de células trofoblásticas gigantes, que sintetizam progesterona, bem como uma diminuição de células em apoptose, no final da gestação de animais clonados, indicam que há uma ineficiência da placenta e do mecanismo de sinalização do parto, ocasionando o prolongamento da gestação, o aumento da necessidade de cesarianas e também o aumento dos índices de morte fetal.

Referências

- Boss A, Janssen V, Mülling C.** Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. *Reproduction*, v.126, p.469-480, 2003.
- Boss A, Kohtes J, Janssen V, Mülling C, Stelljes A, Zerbe H, Hässig M, Thole HH.** Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.55-76, 2006.
- Cunningham JG.** Tratado de fisiologia veterinária. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 377p.
- Facciotti PR, Rici REG, Maria DA, Bertolini M, Ambrósio CE, Miglino MA.** Patterns of cell proliferation and apoptosis by topographic region in normal *Bos taurus* vs. *Bos indicus* crossbreeds bovine placentae during pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*, v.7, p.25, 2009.
- Gross TS, Williams WF, Russek-Coihen E.** Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation. *Placenta*, v.12, p.27-35, 1991.
- McDonald LE.** Veterinary endocrinology and reproduction. Philadelphia, PA: Lea & Febiger, 1981. 201p.
- Mann GE, Fray MD, Lamming GE.** Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet J*, v.171, p.500-503, 2006.
- Mann GE, Lamming GE.** Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, v.121, p.175-180, 2001.
- Mann GE, Lamming GE.** The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Domest Anim*, v.34, p.269-274, 1999.
- Miglino MA.** Clonagem animal e placentação. *Ciênc Cult*, v.56, p.31-33, 2004.
- Nelson DL, Cox MM.** Lehninger principles of biochemistry. 4.ed. New York: W.H. Freeman, 2004. 422p.
- Reimers TJ, Ullmann MB, Hansel W.** Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol Reprod*, v.33, p.1227-1236, 1985.
- Rici REG, Facciotti PR, Ambrósio CE, Maria DA, Kfoury Jr. JR, Bertolini M, Miglino MA.** Cell cycle and apoptosis in normal and cloned bovine near-term placenta. *Anim Reprod Sci*, v.115, p.29-38, 2009.
- Richardson C.** Personal communication. In: Arthur GH, Noakes DE, Pearson H. (Ed.). *Veterinary reproduction and obstetrics*. 6.ed. London: Baillière Tindal, 1989. p.49-59.
- Shemesh M, Harel-Markowitz M, Gurevich ELS.** Staurosporine stimulates progesterone production by bovine placental cells. *Biol Reprod*, v.51, p.146-151, 1994.
- Shemesh M, Izhar M, Pasmanik M.** Regulation of steroidogenesis in the bovine placenta. *Indian J Physiol Pharmacol*, v.43, p.153-163, 1992.
- Shuler G, Wirth C, Klisch K, Pfarrer C, Leiser R, Hoffmann B.** Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and parturition. *Biol Reprod*, v.61, p.797-801, 1999.
- Sreenan JM, Diskin MG.** Early embryonic mortality in the cow: its relationship with progesterone concentration. *Vet Rec*, v.112, p.517-521, 1983.
- Ullman MB, Reimers TJ.** Progesterone production by binucleate trophoblastic cells of cows. *J Reprod Fertil*, v.37, p.173-179, 1989.
- Wooding FBP.** Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*, v.13, p.101-113, 1992.
- Wooding FBP.** Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. *Am J Anat*, v.170, p.233-250, 1984.