

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Tese

**Identificação de receptores hormonais na placenta e avaliação do efeito da  
hormonioterapia em éguas com placentite**

**Fernanda Maria Pazinato**

Pelotas, 2018

**Fernanda Maria Pazinato**

**Identificação de receptores hormonais na placenta e avaliação do efeito da  
hormonioterapia em éguas com placentite**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Coorientadora: Bruna da Rosa Curcio

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

P348i Pazinato, Fernanda Maria

Identificação de receptores hormonais na placenta e avaliação do efeito da hormonioterapia em éguas com placentite / Fernanda Maria Pazinato ; Carlos Eduardo Wayne Nogueira, orientador ; Bruna da Rosa Curcio, coorientadora. — Pelotas, 2018.

67 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Placentite. 2. Equinos. 3. Imunofluorescência. 4. Progesterona. 5. Estrógeno. I. Nogueira, Carlos Eduardo Wayne, orient. II. Curcio, Bruna da Rosa, coorient. III. Título.

CDD : 636.1

Fernanda Maria Pazinato

Identificação de receptores hormonais na placenta e avaliação do efeito da  
hormonioterapia em éguas com placentite

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências,  
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade  
Federal de Pelotas.

Data da defesa: 10/12/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira  
Doutor em Ciências Agrárias pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Gevehr Fernandes  
Doutora em Ciências Agrárias pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Lucke Stigger  
Doutora em Sanidade Animal pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Araujo Lins  
Doutora em Sanidade Animal pela Universidade Federal de Pelotas

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos alcançadas, oportunidades e conquistas, pelas pessoas especiais que colocou em meu caminho e pela sabedoria nas horas mais necessárias. À minha família por todo o amor e apoio dedicado, que mesmo distantes apoiaram e auxiliaram em minhas decisões, da maneira mais sabia possível.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira, pelas oportunidades e orientação, desde o período da residência e co-orientação no período de mestrado. Agradeço não somente pelo auxílio na formação profissional, mas também por todos os conselhos e sabedoria transmitidos como pessoa. A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bruna da Rosa Curcio, pelo companheirismo e paciência em todo esse período, auxiliando sempre na construção deste trabalho e orientações desde a residência. Além disso, agradeço pela amizade construída.

Aos colegas do Hospital Veterinário e do Grupo Clineq, que não foram apenas colegas, mas sim grandes amigos, auxiliando nos momentos de dificuldade e decisões. Em especial aqueles que estiveram junto na construção deste trabalho, Lorena Feijó, Gabriela Castro, Camila Wendt, Taís Scheffer, Francine Belém, Jhemally Dillenburg, Carolina Brasil, Luciana Araujo e Fernanda Timbó.

Agradeço também aos professores Antônio Sérgio Varela Junior, Carine Corcini e Fabiana Moreira, por toda disponibilidade e contribuição no desenvolvimento experimental.

Enfim, a todos aqueles que auxiliaram na construção de mais uma etapa, meu muito obrigada.

## Resumo

PAZINATO, Fernanda Maria. **Identificação de receptores hormonais na placenta e avaliação do efeito da hormonioterapia em éguas com placentite**. 2018. 67f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Foi realizado um estudo com o objetivo de identificar a imunomarcagem dos receptores de progesterona, receptores de estrógeno alfa ( $RE\alpha$ ), beta ( $RE\beta$ ) e receptor relacionado ao estrógeno gama ( $RRE\gamma$ ), e de aromatase na placenta de éguas com placentite ascendente, tratadas com diferentes terapias hormonais, bem como a avaliação da imunolocalização de leptina e seu receptor na placenta de éguas saudáveis. O primeiro estudo teve como objetivo avaliar a presença da leptina e seu receptor na placenta equina a termo, bem como as concentrações de leptina durante a gestação e no pós-parto. Foram utilizadas 8 (oito) éguas, mestiças Crioulas, com gestações saudáveis. Foram coletados fragmentos placentários para avaliação da imunolocalização da leptina e seu receptor através da técnica de imunofluorescência. Também foram realizadas dosagens séricas de leptina do 8º mês de gestação até 24 horas pós-parto. Foi identificada a presença de leptina e seu receptor no epitélio de microcotilédones e região areolar, caracterizando possível função autócrina e parácrina da leptina em relação a gestação em equinos. No segundo estudo, o objetivo foi descrever a imunomarcagem e quantificação de receptores de progesterona (RP), receptores de estrógeno  $\alpha$  ( $RE\alpha$ ),  $\beta$  ( $RE\beta$ ) e receptor relacionado ao estrógeno  $\gamma$  ( $RRE\gamma$ ), e de aromatase na placenta de éguas com placentite ascendente tratadas com diferentes terapias hormonais. Foram utilizadas 23 gestações, de 20 éguas mestiças Crioulas, com indução de placentite experimental aos 300 dias de gestação, e sobre diferentes terapias hormonais. Os grupos foram constituídos de um grupo controle sem indução de placentite (n=6); sem tratamento (com indução de placentite, porém sem terapia, n=3); sulfametoxazole+trimetoprima e flunixin meglumine junto a terapia hormonal com altrenogest (n=6); sulfametoxazole+trimetoprima e flunixin meglumine junto a terapia hormonal com altrenogest associada com cipionato de estradiol (n=4); e sulfametoxazole+trimetoprima e flunixin meglumine junto a terapia hormonal com cipionato de estradiol (n=4). Foi observada marcação consistente de receptores de progesterona, de estrógeno  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $RRE\gamma$ , e de aromatase, predominantemente no citoplasma das células de microcotilédones e epitélio coriônico de região areolar. As éguas com placentite recebendo terapia com cipionato de estradiol demonstraram maior tempo de gestação e quantificação de aromatase na placenta. Enquanto, as éguas com terapia de altrenogest demonstraram menor tempo gestacional, e menor expressão de receptores de estrógeno  $\alpha$ . Já nas éguas sem tratamento e com terapia associada de altrenogest e cipionato, foi observado elevado número de receptores de progesterona na placenta.

**Palavras-Chave:** placentite; equinos; imunofluorescência; progesterona; estrógeno.

## Abstract

PAZINATO, Fernanda Maria. **Immunolocalization of hormonal receptors in mare placenta and evaluation of the different combined hormone therapy in mares with placentitis**. 2018. 67f. Teshis (Doctor in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

The aim of this study was to identify the expression of progesterone receptors, alpha (RE $\alpha$ ), beta (RE $\beta$ ) receptors and estrogen related-receptor gamma (RE $\gamma$ ), and aromatase expression in placenta of mares with ascending placentitis treated with different hormonal therapies, as well as the evaluation of leptin expression and its receptor in the placenta of healthy mares. The first study aimed to evaluate the presence of leptin and its receptor in the placenta at term, as well as leptin concentrations during pregnancy and after delivery. Eight (8) mares, crossbred Crioulo, with healthy pregnancies were used in the study. Placental fragments were collected to evaluate the immunolocalization of leptin and its receptor by the immunofluorescence technique. Serum levels of leptin from the 8th month of gestation up to 24 hours postpartum were also performed. Expression of leptin and its receptor in the microcotyledary epithelium and areolar region were identified, characterizing an autocrine and paracrine function of leptin in equine placenta. In the second study, the aim was to describe the expression and quantification of progesterone (PR) receptors, estrogen receptors  $\alpha$  (RE $\alpha$ ),  $\beta$  (RE $\beta$ ) and estrogen-related receptor  $\gamma$  (RE $\gamma$ ), and aromatase in the placenta of mares with ascending placentitis treated with different hormonal therapies. Twenty-three (23) pregnancies of twenty (20) crossbred Crioulo mares were used, the mares had induction of experimental ascending placentitis at 300 days of gestation, and were treated with different hormonal therapies. The groups was formed by control group, without induction of placentitis (n=6), no treatment group (with placentitis induced but without treatment n=3); trimetoprim+sulfamethoxazole with flunixin meglumine and hormonal therapy with altrenogest (n=6); trimetoprim+sulfamethoxazole with flunixin meglumine and hormonal therapy with altrenogest and estradiol cypionate (n=4); and trimetoprim+sulfamethoxazole with flunixin meglumine and hormonal therapy with estradiol cypionate (n=4). Consistent immunostaining of progesterone,  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  estrogen receptors was observed, and also aromatase, all the immunostaining with predominance in the cytoplasm of the microcotyledons cells and areolar region of chorionic epithelium. Mares with placentitis on estradiol cypionate therapy demonstrated higher gestation length and quantification of aromatase in the placenta. The mares with altrenogest therapy have demonstrated shorter gestational length, and least immunostaining for  $\alpha$  oestrogens. Meanwhile, mares without treatment and those with associated altrenogest and estradiol cypionate therapy have demonstrated increased immunostaining to progesterone receptors in the placenta.

**Key-Words:** placentitis; equine; immunofluorescence; progesterone; oestrogens.

## Lista de Figuras

### Artigo 1

- Figura 1 Immunofluorescence of equine placenta at term. A. Immunostaining of leptin in microcotyledons and chorionic epithelium (green - antibody Alexa 488). B. Presence of ObR-b in microcotyledons and chorionic epithelium (red - antibody Alexa 647). C. Nuclear immunofluorescence with Hoescht 33342 (blue). D. Leptin (green - antibody Alexa 488) immunofluorescence and Hoescht 33342 nuclear staining. E. ObR-b (red - antibody Alexa 647) immunofluorescence and Hoescht 33342 nuclear staining. F. Merge image of co-localization of leptin and ObR-b, with the nuclear immunostaining..... 26
- Figura 2 Figure 2. Description of plasmatic leptin concentrations at the 8th, 9th and 10th month of gestation, at foaling and 24 hours after foaling ( $P > 0.05$ )..... 27

### Artigo 2

- Figura 1 Imunomarcção de receptores de progesterona, estrógenos  $\alpha$ ,  $\beta$  e receptor relacionado ao estrógeno  $\gamma$ , e aromatase na placenta de éguas com placentite sobre diferentes terapias hormonais..... 45



## Lista de Tabelas

### Artigo 2

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Protocolos terapêuticos utilizados nas éguas com indução de placentite ascendente do presente estudo.....   | 40 |
| Tabela 2 | Dados gestacionais e de peso da placenta e do neonato, em éguas com indução experimental de placentite ascendente recebendo diferentes protocolos de terapia hormonal.....  | 43 |
| Tabela 3 | Achados macroscópicos e histológicos das placentas de éguas com indução experimental de placentite ascendente recebendo diferentes protocolos de terapia hormonal.....  | 44 |
| Tabela 4 | Quantificação da imunomarcção de receptores hormonais para progesterona, estrógenos $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ , e aromatase na placenta de éguas com indução experimental de placentite ascendente recebendo diferentes protocolos de terapia hormonal..... | 45 |

## Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Introdução.....</b>  | <b>09</b> |
| <b>2 Objetivos.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>2.1 Objetivo Geral.....</b>                                      | <b>11</b> |
| <b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>                               | <b>11</b> |
| <b>3 Revisão de Literatura.....</b>                                 | <b>12</b> |
| <b>3.1 Progesterona e progestágenos na gestação em equinos.....</b> | <b>12</b> |
| <b>3.2 Estrógenos na gestação em equinos.....</b>                   | <b>13</b> |
| <b>3.3 Aromatase na gestação em equinos.....</b>                    | <b>15</b> |
| <b>3.4 Leptina na gestação em equinos.....</b>                      | <b>15</b> |
| <b>3.5 Placentite em éguas.....</b>                                 | <b>16</b> |
| <b>4 Artigos.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>4.1 Artigo 1.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>4.2 Artigo 2.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>5 Considerações Finais.....</b>                                  | <b>53</b> |
| <b>Referências.....</b>   | <b>54</b> |
| <b>Anexos.....</b>  | <b>66</b> |

## 1 Introdução

A placentite é uma das principais doenças que resultam em abortos e nascimento de potros natimortos. Em equinos, a forma mais comum de placentite é a infecção ascendente, tendo a cérvix como porta de entrada dos patógenos, e representando mais de 30% de partos prematuros e perdas dentro das primeiras 24 horas de vida (LEBLANC, 2008). Diversos patógenos bacterianos e fúngicos são relacionados com quadros de placentite em éguas, entretanto, os principais agentes isolados em placentites ascendentes são os *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos, como *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus*, e coliformes como a *Escherichia coli* (GILES, et al. 1993).

A placentite resulta em incremento de citocinas inflamatórias e pode levar a quadros de sepse fetal. Dessa forma, a terapia é baseada no controle da proliferação bacteriana e redução do dano inflamatório, além do uso associado de hormônios na tentativa da manutenção da gestação (MACPHERSON, 2005).

A terapia para placentite consta com utilização de antibióticos que atingem concentrações inibitórias mínimas nos líquidos fetais, como a associação de sulfametazona e trimetoprima. A associação com anti-inflamatórios não esteroidais, como a flunixinina meglumina e a pentoxifilina também são descritos para auxiliar na redução da expressão de citocinas inflamatórias (MACPHERSON & BAYLE, 2008; LEBLANC, 2010).

Além da associação de antibiótico e anti-inflamatórios, a terapia baseada em hormônios esteroides também tem sido utilizada em éguas com placentite. Dentre os hormônios necessários para a manutenção da gestação, que são aplicados em terapia, estão a progesterona e o estrógeno. A progesterona atua na manutenção da quiescência uterina, e do fechamento da cérvix, estando descrita como fundamental para a manutenção da gestação (WILSHER, 2011). Enquanto os estrógenos de modo geral atuam como uterotônicos, com ações opostas à progesterona (BOLLWEIN, et al. 2004).

Já foi demonstrado variações nas concentrações séricas maternas de progestágenos e estrógenos em quadro de doença placentária. Com relação aos

progestágenos, em doenças crônicas na placenta, como nas placentites, foi demonstrado um incremento gradual nas concentrações de pregnanas, enquanto em quadros agudos são observadas reduções nas concentrações (ROSSDALE, et al. 1991; OUSEY, 2006). Para os estrógenos, foi observado redução abrupta das concentrações séricas em quadros de placentite (DOUGLAS, 2004; CANISSO, et al. 2012).

Apesar de vários estudos estarem relacionando os valores séricos de progestinas e estrógenos com diagnóstico e prognóstico de placentite, para estabelecer relação da terapia hormonal, não há descrição da dinâmica de expressão de receptores hormonais na placenta. Estudos descreveram a presença de receptores para estrógeno e progesterona na placenta de éguas entre os dias 110 e 309 de gestação (CHAVETE & PALMER, 2000; ABD-ELNAEIM, 2008).

Os receptores de progesterona apresentam maior expressão quando da fase inicial até o terço médio de gestação. Enquanto, a expressão dos receptores de estrógenos foi observada de forma consistente no tecido placentário até o terço final de gestação, sugerindo uma função primária dos estrógenos placentários como reguladores do crescimento e diferenciação celular da placenta (ABD-ELNAEIM, et al. 2008; WILSHER, et al. 2011).

A utilização de diferentes terapias hormonais podem intervir na expressão dos hormônios na placenta em quadros inflamatórios. Não há descrição da atividade de receptores placentários quando da utilização de terapia hormonal em éguas com placentite. Além disso, outros hormônios, como a leptina podem desenvolver papel importante no metabolismo placentário e desenvolvimento fetal no terço final de gestação.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo é avaliar a presença de leptina e do receptor de leptina na placenta equina, como coadjuvantes no metabolismo placentário em terço final de gestação. Bem como, avaliar a presença de receptores de progesterona, receptores de estrógenos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , e de aromatase na placenta de éguas com placentite induzida, sob diferentes terapias hormonais e sua relação com a histopatologia placentária e viabilidade neonatal.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a imunolocalização da leptina e seu receptor na placenta equina de éguas saudáveis no pós-parto.
- Avaliar a imunomarcção e quantificação de receptores de progesterona, receptores de estrógenos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , e expressão de aromatase na placenta de éguas com placentite ascendente.
- Relacionar os achados de marcação hormonal, através da técnica de imunofluorescência, com os dados da égua, achados histopatológicos da placenta e viabilidade neonatal.

### **3 Revisão de literatura**

#### **3.1 Progesterona e progestágenos durante a gestação em equinos**

A progesterona faz parte dos hormônios esteroides, que no mamíferos atua como essencial na manutenção da gestação, promovendo a quiescência uterina. Os progestágenos são subclassificados como pregnanas e  $5\alpha$  pregnanas. Na espécie equina os progestágenos são produzidos inicialmente pelos corpos lúteos acessórios, e a partir do segundo trimestre (120 a 150 dias) passam a ser produzidos pela unidade feto-placentária (BARNES, et al. 1975; PASHEN, 1984).

Durante os primeiros 100 dias de gestação a progesterona é a principal progestina produzida, e  $5\alpha$ DHP também apresenta-se em níveis séricos elevados (SCHOLTZ, et al. 2014). Após este período, a partir do transcorrer da metade até o final da gestação os níveis séricos de P4 são praticamente indetectáveis, estando abaixo de 1ng/mL. Enquanto outros progestágenos apresentam quantidades significativas, podendo exceder 500ng/mL para alguns progestágenos no terço final de gestação (HOLTAN, et al. 1975; HOLTAN, et al. 1991).

Os níveis detectáveis de P4 são provenientes da metabolização da P5 como precursor no tecido útero-placentário, sugerindo sua ação no metabolismo esteroide e na regulação da atividade miométrial (OUSEY, 2006; WYNN, et al. 2018). As concentrações de progestágenos no sangue de cordão umbilical são superiores as séricas maternas, devido a elevada quantidade de pregnenolona sintetizada pelo feto, sugerido que provavelmente esses valores elevados correspondem a presença de P5 proveniente de atividade adrenal, e outros progestágenos liberados diretamente na circulação umbilical, inclusive as progestinas resultantes da metabolização de P4 na placenta (PASHEN, 1984; OUSEY, et al. 2005).

Com relação as múltiplas progestinas presentes durante a gestação em equinos, apesar de haver poucas descrições a respeito de suas atividades biológicas. Entretanto, já é descrito a ação de inibição da contratilidade uterina pela  $5\alpha$ DHP em mulheres, além da atividade agonista em receptores de progesterona ser elevada (LOFGREN, et al. 1992).

A monitoração da sanidade feto-placentária pode ser realizada a partir da mensuração de progesterona. Nas últimas semanas de gestação, as concentrações plasmáticas maternas de progestágenos aumentam significativamente, tendo uma queda acentuada durante os últimos dias, ou mesmo horas, pré-parto (OUSEY, 2006).

O declínio rápido das concentrações de progesterona estão associadas a lesões placentárias agudas (LE BLANC, 2010). Essa condição, leva a redução da aromatização dos precursores e conseqüentemente, redução de níveis séricos de progesterona na égua, propiciando a morte fetal ou aborto.

Já o aumento precoce das concentrações de progestágenos, é associado a situações de estresse fetal, o qual geralmente ocorre em quadros crônicos de lesão placentária. Essa elevação nas concentrações de progestágenos, está relacionada a hiperplasia e aceleração da maturação da glândula adrenal, ocorrendo aumento da liberação de cortisol fetal frente ao estresse, com conseqüente aumento na produção adrenal de pregnenolona, molécula utilizada como precursora de progesterona pela placenta (OUSEY, et al. 2005).

Situações de lesão placentária também podem cursar com redução da capacidade placentária de metabolizar a progesterona em outras progestinas, levando a elevação dos níveis séricos de progesterona. A mensuração de progesterona deve ser realizada de forma sequencial, com amostras obtidas em intervalos de 48 a 72 horas, para adequada estimativa da cinética em quadros de alteração gestacional (DOUGLAS, 2004).

A presença de receptores para progesterona na placenta como demonstrada por Abd-Elnaeim et al. (2008) e Wilsher et al. (2011), indica receptores para P4 durante a fase inicial de gestação, com presença de imunomarcção nuclear em microcotilédones até os 179 dias de gestação, e reduzindo a intensidade a nível de epitélio no terço final. Entretanto, não há descrição destes receptores em quadros de alterações inflamatórias como a placentite, em éguas com terapia hormonal.

### **3.2 Estrógeno durante a gestação em equinos**

Os estrógenos naturais, pertencem ao grupo dos hormônios esteróides, são derivados do colesterol e sintetizados principalmente pelos ovários e placenta (BEATO & KLUG, 2000). Os estrógenos predominantes em éguas são estrona, equilina, equilinina,  $17\beta$ -estradiol e  $17\alpha$ -estradiol.

A produção de estrógeno fetal em equinos é realizado a partir das gônadas, e também pela placenta a partir dos 70 dias de gestação. O mesmo apresenta síntese placentária a partir das moléculas estrogênicas, atingindo um pico de concentração entre os 150 a 270 dias de gestação (PASHEN & ALLEN, 1979). Dessa forma, em éguas gestantes, podemos encontrar valores elevados de estrógeno sérico entre os 150 até os 310 dias de gestação (DOUGLAS, 2004).

Determinações séricas das concentrações de sulfato de estrona tem sido sugeridas como avaliação do bem-estar fetal, e mais recentemente, para monitorar dano placentário (KASHMAN, et al. 1988).

O estrógeno promove estimulação de mudanças quantitativas e qualitativas do histotrofo em fetos jovens. Atua também, no aumento do fluxo sanguíneo uterino, tanto de forma direta, como por estímulo da produção endometrial de prostaglandina (BAZER & FIRST, 1983; MCDOWELL, et al. 1987). A partir disso, a terapia com estrógeno também é de interesse na fase inicial de gestação, como na preparação de éguas como receptoras de embrião, uma vez que o estrógeno estimula o aumento dos receptores uterinos de P4 (ZAVY, et al. 1979).

Em estudo de Douglas (2004) foi observado menores concentrações séricas de estrógenos em éguas com aborto e placentite, podendo ser indicativo de sofrimento fetal, sugerindo dessa forma, a suplementação com cipionato de estradiol (ECP) ou 17 $\beta$ -estradiol para prevenção de aborto em éguas com placentite. Também foi visualizada redução das concentrações do sulfato de 17 $\beta$ -estradiol em éguas com placentite induzida (TROEDSSON, 2007).

Além disso, em estudo conduzido por Pashen & Allen (1979) a partir da gonadectomia fetal no terço final de gestação, foram observadas fracas contrações miométrais durante os partos e ausência de incremento da prostaglandina F no soro materno. Os potros também apresentaram redução severa no desenvolvimento muscular. A partir disso, a utilização de estrógeno como auxiliar na terapia para placentite tem sido proposto (STOUT & ALLEN, 2001; DOUGLAS, 2004).

Em estudo de Abd-Elnaiem, et al. (2008) foi identificada presença de receptores de estrógenos  $\alpha$  e  $\beta$ , através da imunohistoquímica, nas regiões de epitélio microcotiledonar, microcaruncular e também no estroma placentário com alto percentual de células positivas, sendo maior em região de epitélio que em estroma em diferentes fases gestacionais. Chegando a 91,2% para receptores  $\alpha$  em região de



epitélio microcotiledonar, aos 110 dias de gestação. Entretanto, a técnica utilizada não realizou quantificação da expressão dos hormônios no tecido placentário.

A presença consistente de receptores de estrógeno na placenta de outras espécies, como em humanos (BUKOVSKY, et al. 2003) e bovinos (SCHULER, et al. 2005) sugerem uma função primária dos estrógenos placentários como reguladores parácrinos ou autócrinos do crescimento e diferenciação placentária, maior do que a função a função hormonal clássica. Apesar da identificação de receptores hormonais de progesterona, estrógenos  $\alpha$  e  $\beta$ , e aromatase na placenta equina, ainda não há descrição da presença dos receptores destes hormônios na placenta pós-parto, tanto em éguas saudáveis, como em quadros de placentite.

### **3.3 Aromatase durante a gestação em equinos**

A aromatase pertence ao grupo molecular das enzimas do citocromo p450 e age como mediador da aromatização de andrógenos em estrógenos (AINSWORTH & RYAN, 1996). Na fase inicial de gestação, a aromatase é responsável pela conversão da androstenediona, metabolito proveniente da pregnenolona, em estradiol, essa ação diretamente estimulada pelo eCG.

Já no terço final de gestação, o principal precursor de estrogênio, o DHEA é produzido em grandes quantidades pela gônada fetal a partir do colesterol por ação das enzimas clivagem de cadeia lateral de colesterol (P450scc) e 17 $\alpha$ -hidroxilase (PASHEN, et al. 1982; RAESIDE, et al. 1979). Porém o tecido gonadal não possui aromatase, conseqüentemente esta conversão é realizada pela placenta.

Na placenta a aromatase também apresenta grande atividade intrínseca, a qual é responsável pela conversão de compostos esteróides neutros C<sub>18</sub> e C<sub>19</sub> em estrógeno, originando estrona e estradiol 17 $\alpha$  e 17 $\beta$  (PASHEN, et al. 1982; HASEGAWA, et al. 2001). Dessa forma, a avaliação da expressão da aromatase no tecido placentário pode ser indicativo da atividade da mesma, e conseqüente incremento dos níveis séricos de estrógenos maternos, e receptores placentários.

### **3.4 Leptina durante a gestação em equinos**

A leptina é um hormônio peptídico produzido e liberado pelo tecido adiposo, responsável pela modulação do apetite e estímulo do gasto energético por ativação

do sistema nervoso simpático (ZHANG, et al. 1994). A mesma também está relacionada a regulação dos hormônios produzidos pelo tecido adiposo, no metabolismo da glicose pelo aumento a sensibilidade a insulina e hormônios esteroides sexuais (BARB, et al. 2008; KIMURA, et al. 2002). Estudos demonstram que a leptina atua como modulador tanto de processos reprodutivos quanto relacionado à funções imunes.

Diversos estudos em animais também apontam a importância da leptina nas funções reprodutivas, de crescimento e desenvolvimento. Há hipótese de que o envolvimento da leptina na saciedade, atividade, crescimento e desenvolvimento pode estar relacionada a ação da leptina no gasto e conservação de energia. (HASSINK, et al. 1997).

Na placenta em humanos, a leptina já foi identificada na região de sinciotrofoblasto, sendo esta responsável pela produção e metabolização endócrina na gestação, sugerindo que a leptina está associada a regulação da função placentária (CHALLIER, et al. 2003, BODNER, et al. 1999; UZELAC, et al. 2010). A mesma também foi observada na placenta de animais de laboratório e felinos.

Em equinos, tanto a leptina sérica, quanto seu receptor, já foram identificados, sendo descrita a relação da mesma com a condição corporal (BUFF, et al. 2002). A nível placentário, a leptina foi identificada em equinos através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Entretanto, não há descrição da imunolocalização da leptina e seu receptor na placenta de equinos.

### **3.5 Placentite em éguas**

A placentite é uma das principais causas de perdas fetais no terço final de gestação e morte neonatal em equinos, correspondendo a quase 5% de todas as alterações placentárias (TROEDSSON & ZENT, 2004; BUCCA, 2006). Dessa forma, o reconhecimento e intervenção precoce da placentite são importantes para adequado desenvolvimento fetal e obtenção de um potro viável. A forma mais frequente de placentite é a ascendente, associada a agentes bacterianos, principalmente *Streptococcus equi*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (LE BLANC, 2004).

Segundo Le Blanc (2010) quadros infecciosos que cursam com inflamação da placenta, levam ao desprendimento da interface útero-placenta, com consequente

redução da área de troca materno-fetal cursando com hipóxia no feto, além de distúrbios relacionados a produção hormonal para manutenção adequada da gestação. Além disso, o processo inflamatório cursa com liberação de diversos mediadores, incluindo a prostaglandina, o que gera redução da quiescência uterina, favorecendo quadros de abortos (LE BLANC, et al. 2002).

A placentite cursa com redução das trocas nutricionais, metabólicas e gasosas entre a mãe e o feto, bem como alterações na produção hormonal. Dentre os hormônios produzidos pela unidade feto-placentária, destacam-se os hormônios esteroides progestágenos e estrógenos, ambos associados a manutenção gestacional (BUCCA, 2006).

O tratamento para a placentite, visa instituir uma terapia eficaz para bloquear a multiplicação bacteriana, reduzir a liberação de mediadores inflamatórios e manter a quiescência miometrial (MACPHERSON & BAYLE, 2008). A escolha do antibiótico deve considerar o possível agente infeccioso, bem como a biodisponibilidade do antibiótico na unidade feto-placentária, já que muitas drogas não ultrapassam a barreira útero-placentária em concentrações adequadas (MURCHIE, et al. 2006; REBELLO, et al. 2006).

Como terapia antimicrobiana inclui-se a penicilina potássica (22.000 UI/kg, IV, a cada 6 horas); penicilina procaína (22.000 UI/kg, IM, a cada 12 horas); ceftiofur (2,2 mg/kg, IV ou IM a cada 12 horas); cefazolina (20 mg/kg, IV a cada 6 horas); sulfatrimetoprima (15-30 mg/kg, IV ou PO, a cada 12 horas). A terapia com sulfatrimetoprima é frequentemente recomendada, devido este agente alcançar maiores níveis de concentração inibitória mínima nos fluidos fetais, além disso apresenta a vantagem da possibilidade de administração oral (MACPHERSON, 2008).

Na terapia anti-inflamatória a Flunixin Meglumina (1 mg/kg, IV, cada 12 ou 24 horas) é frequentemente utilizada. A Pentoxifilina (8,5mg/kg, PO, a cada 12 horas), também tem sido utilizada, devido redução de citocinas pró-inflamatórias e melhora no fluxo sanguíneo uterino (MACPHERSON, 2005; LE BLANC, 2010). A utilização de anti-inflamatórios também auxilia na redução da produção de prostaglandinas, evitando assim, aumento das contrações uterinas e parto prematuro (LE BLANC, et al. 2002).

A utilização de terapia hormonal tem como objetivo auxiliar na manutenção da gestação, evitando a contratilidade uterina e viabilizando o desenvolvimento fetal. A utilização de progestágenos em éguas gestantes é amplamente difundida, tanto na

fase inicial de gestação, como em quadros de doenças maternas ou da unidade feto-placentária no terço gestacional final, visando a manutenção da quiescência uterina.

A terapia com progestágenos também é utilizada em mulheres para prevenção de parto prematuro. Em estudo de Meies, et al. (2003) foi demonstrado efeitos benéficos sobre taxas de parto prematuro, reduzindo a recorrência em mulheres tratadas com 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona quando comparadas as sem tratamento (36,3% vs. 54,9%). A ação inibitória sobre os receptores de prostaglandina e ocitocina contribuem para redução da atividade miometrial.

A avaliação da efetividade do tratamento hormonal para placentite é possível através da avaliação dos níveis hormonais séricos de progestágenos e estrógenos. O acompanhamento dos animais acometidos através de avaliações hormonais séricas já é descrito. Entretanto, não há descrição da expressão destes hormônios na placenta em quadros de placentite, sob diferentes terapias hormonais.

Dessa forma, a avaliação da expressão de receptores de progesterona, receptores de estrógenos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , e de aromatase na placenta de éguas com placentite pode auxiliar a compreender como diferentes protocolos de terapia hormonal influenciam na secreção e modulação destes hormônios a nível placentário, quando na presença de doença inflamatória.

## **4 Artigos**

### **4.1 Artigo 1**

#### **Immunolocalization of leptin and its receptor in the term equine placenta**

Fernanda Maria Pazinato<sup>1</sup>; Bruna da Rosa Curcio<sup>1</sup>; Antônio Sergio Varela Junior<sup>23</sup>;  
Carine Dahl Corcini<sup>23</sup>; Camila Gervini Wendt<sup>1</sup>; Fabiana Moreira<sup>4</sup>; Rubia Alves  
Schmit<sup>5</sup>; Carlos Eduardo Wayne Nogueira<sup>1</sup>

**Short communication submetida a: Journal of Equine Veterinary Science**

## **Immunolocalization of leptin and its receptor (ObR-b) in equine placenta at term**

### **Abstract**

The aim of the present study was to investigate the presence and distribution of leptin and ObR-b in the equine placenta at term by immunofluorescence staining and, changes on plasma leptin concentrations during late gestational period. The present study enrolled eight Criollo-type mares carrying healthy pregnancies. Blood samples were collected during the third trimester of gestation, at foaling, and 24 h after foaling. Leptin concentrations were analyzed via radioimmunoassay. Plasma leptin concentrations did not change from the eighth to the tenth month of gestation, and displayed a discrete decrease 24 h after parturition ( $P = 0.07$ ). The expression of leptin and ObR-b was observed in the cytoplasm of pseudostratified epithelial cells in the areolar region and in the epithelium of microcotyledons. Also, leptin receptor was allocated in the apical surface of the cells. The presence of leptin and its receptor (ObR-b) in the placenta of mares at term supports an endocrine and autocrine/paracrine action of leptin within this organ.

**Keywords:** Mares, immunofluorescence, gestation, placental metabolism

### **1. Introduction**

Leptin (encoded by the Ob gene) is a peptide hormone produced and released by adipose tissue. This hormone acts on appetite modulation and energy consumption by activating the sympathetic nervous system [1]. Leptin also plays a major role in regulating food intake, growth, glucose metabolism, and reproduction [2]. In humans and rodents, leptin and its receptor (ObR-b) are expressed in different tissues, such as salivary glands, gastric mucous, pancreas, and placenta.

In the human placenta, leptin and ObR-b are localized in decidual and syncytiotrophoblastic cells within the endocrine unit of the placenta [3]. The presence of leptin has been described in many mammalian placentas, including ovines, porcines, cats, and canines [4,5]. The co-localization of leptin and ObR-b in the placentas of these species is consistent with data obtained from humans and rats, which suggests that placental leptin in domestic animals has similar roles to those in humans and rodents [6].

In equines, leptin and ObR-b have been identified in salivary glands, pancreas, ovaries, and uterus [7,8,9]. Furthermore, in mares, high plasma leptin levels corresponded positively with their reproductive ability [10,11,12,13]. Leptin appears to participate in the control of reproduction to inform the GnRH neurons when the body condition is adequate to support reproduction and on initiation of the estrous cycle [14]. However, there is limited information about the role of leptin during pregnancy in mares.

Although the expression of leptin has been observed in equine placentas from polymerase chain reaction (PCR) techniques [15], there is no description in the literature for the immunolocalization of leptin and its receptor. Therefore, the aim of the present study was to investigate the presence and distribution of leptin and its receptor (ObR-b) in the equine placenta at term, as well as the plasma leptin concentrations in mares during late gestation and delivery.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Animals**

The study was performed with eight Criollo and Criollo-type mares carrying healthy pregnancies (aged  $10.4 \pm 1.2$  years; parity  $2 \pm 0.7$ ). The mares were housed at Palma Farm of Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil. All procedures carried out in this study were approved by the Ethical Committee on Animal

Experimentation of the UFPel under protocol #5810. Animal procedure herein followed the guidelines Council for the International Organizations of Medical Sciences.

After 300 days of gestation, the mares were maintained in paddocks near the foaling barn. After rupture of the chorioallantois, the mares were brought into the foaling stalls for assisted foaling. All mares experiencing eutocic delivery of healthy neonatal foals.

## **2.2.Placental collection and histopathologic evaluation**

Immediately after placental release, the fetal membranes were weighed and placed in an “F” shape for gross evaluation, as described elsewhere [16]. Nine samples (full thickness of 3 × 3 cm) were obtained from each fetal membrane (three points of umbilical cord, amnion, cervical star area, and segments of chorioallantois corresponding to the cranial uterine body, pregnant horn, and non-pregnant horn) and fixed in 10% formalin for histological evaluation. Histological sections (5 µm thick) were obtained with an automated rotatory microtome (Leica) and, mounted on glass slides and stained using hematoxylin and eosin. The slides were examined by optical microscopy (Olympus BX51; Olympus America, Center Valley, PA). The inclusion criteria for mares in the present study was the presence of healthy placentas, which considered no placental features during the gross and histological evaluations. The chorioallantois were checked for abnormalities in color, thickened areas, presence of exudate and areas devoid of villi. Histological examination looking for abnormalities in cuboidal to columnar cells in the areolar regions of the chorionic surface and villous clumps forming the microcotyledons.

Duplicate samples of the pregnant horn and uterine body were also fixed in 10% formalin for 24 h prior to tissue fixation and stored in 70% alcohol until analysis by immunofluorescence staining.



### 2.3. Immunofluorescence (IF)

Histological sections (5  $\mu\text{m}$ ) from chorioallantois tissue corresponding to region of uterine body and pregnant horn were mounted on glass slides with 3% organosilane (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). The sections were deparaffinized and rehydrated in xylene and ethanol series. Antigen retrieval was carried out in a microwave oven (for 15 min at 590W in citrate buffer, pH 6.0), cooled slowly, and then transferred to PBS at 4°C. The slides were then blocked for 1 h in 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS at 4°C to prevent non-specific binding of primary antibody. The primary polyclonal antibodies were as follow: anti-leptin [Ob antibody; A-20, sc-842-rabbit (IgG)] diluted 1:1000 and anti-leptin receptor [anti-ObR-b; pAb M-18-goat (IgG)] diluted 1:100. Antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) and diluted in 1.5% BSA solution. The slides were placed in a humidified chamber and kept in the dark overnight at 4°C. Next day, slides were thoroughly rinsed with PBS and re-covered with 4 mg/ml Anti-Rabbit-IgG-Atto 647N (Sigma) for at least 3 h. Slides were rinsed again with PBS and covered with secondary antibodies. Slides with anti-leptin antibody were instilled with Alexa Fluor 488 anti-rabbit [Goat Anti-rabbit (IgG H&L) Alexa Fluor 488; Abcam] and, slides with anti-leptin receptor antibody were instilled with Alexa Fluor 647 anti-mouse [Donkey Anti-mouse (IgG H&L) Alexa Fluor 647; Abcam], nuclei were stained with bisbenzimidazole 2% (Hoescht 33342-ab145597; Abcam) incubated at room temperature (25 °C) in a dark and humid chamber for 30 min.

Finally, slides were mounted with Fluoroshield (ab104135; Abcam) and 0.7 mm coverslip. Images were acquired with TCS SP8 scanning spectral confocal microscope (Leica). For confocal images, settings were fixed at the beginning of both acquisition and analysis steps and were unchanged. Images were acquired sequentially using the following settings: Hoescht 33342 (blue) channel (confocal at 405 nm/PMT 420-470 nm), Alexa 488 (green) channel

(confocal at 488 nm/PMT 510–550 nm), and Alexa 647 (red) channel (confocal 647 nm/PMT 660–690 nm).

Sections in which the primary antibodies were omitted it was used as a control of non-specific staining. The normal endometrium mare tissue was served as an internal positive control in assays. The cells were considered positive for Ob and ObR only when cytoplasmic staining was evident, independent of its immunointensity. The Ob antibodies used were described as reactive with different species, including the equines [9,17] and, as described in the data sheet of the manufacturer.

All IF procedures were conducted by the same technician.

#### **2.4. Blood collection and radioimmunoassay**

Blood samples were collected from the external jugular vein using a vacutainer system into sterile tubes containing sodium heparin for leptin measurements. The samples were collected monthly, from 8<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> months of gestation, at foaling, and 24 h after foaling. The samples were centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min, placed into 2 mL Eppendorf tubes, and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis by radioimmunoassay.

Leptin concentrations was determined using a radioimmunoassay commercial kit (EMD Millipore's Multi-Species Leptin; MO, USA). The lowest concentration detected by the kit was 0.6 ng/mL and the intra-assay coefficient of variation was 7.5%. The assay tube containing 100  $\mu\text{L}$  of buffer solution was added to 100  $\mu\text{L}$  of the non-diluted plasmatic sample and 100  $\mu\text{L}$  of the antibody anti-leptin multi species, and the samples was incubated at  $4^\circ\text{C}$  for 24 h. After the initial incubation, 100  $\mu\text{L}$  of human leptin (1251) was added to each tube and incubation continued for an additional 24 h at  $4^\circ\text{C}$ . Subsequently, 1 mL of precipitated reagent was added to each sample and incubated at  $4^\circ\text{C}$  for 20 min. The tubes were centrifuged at  $200 \times g$  for 10 min. The supernatant was decanted and excess liquid removed. The analysis was performed

with a gamma counter (WIZARD2 Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). The concentrations of leptin in the samples were determined using the standard curves.

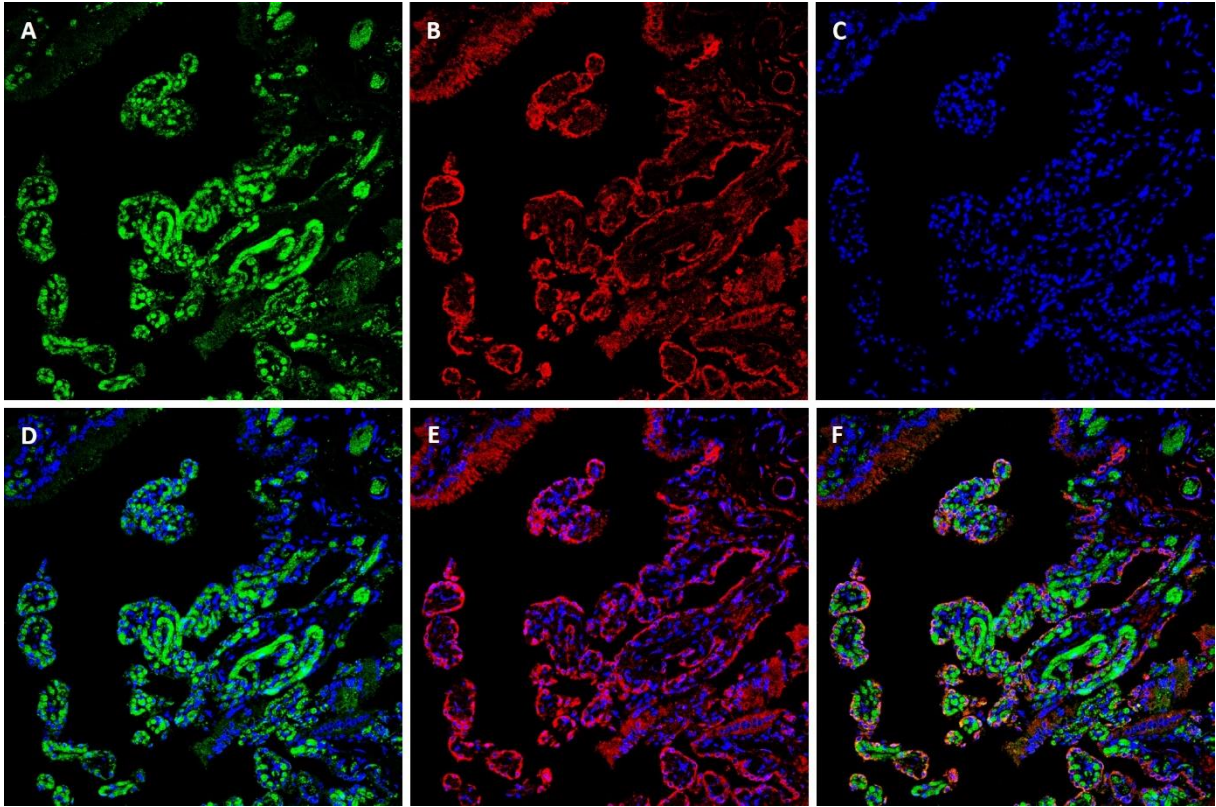
### **2.5. Statistical analysis**

Data were subjected to statistical analysis using Statistix® 10.0 software (Tallahassee, 2013). Shapiro-Wilk test was applied to analyze the normality. Comparison of leptin concentrations between months was performed using the Kruskal-Wallis one-way test, to depict non-normally distributed data. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## **3. Results**

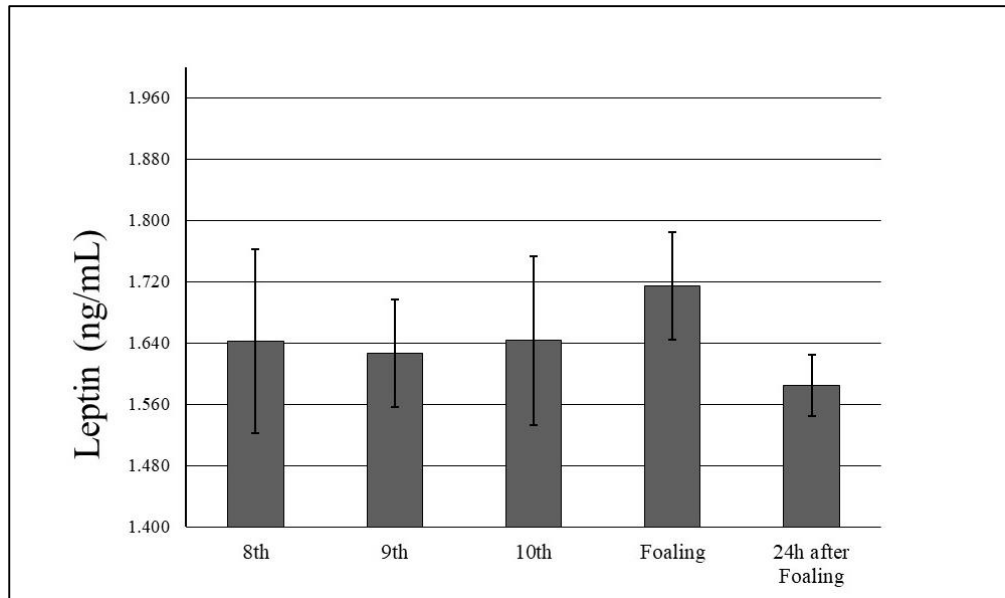
Immunofluorescence on placental tissue revealed positive markings for leptin and ObR-b in all placentas. Immunostaining for leptin was observed in the cytoplasm of pseudostratified epithelial cells in the areolar region and in the epithelium of microcotyledons, and weak marking appeared in cells of the stromal region and allantois epithelium (Figure 1A). The leptin receptor (ObR-b) was also identified in the cytoplasm of epithelial cells in areolar region and in the microcotyledons, and discretely in stromal and allantoic cells (Figure 1B). In the apical portion of the cytoplasm, ObR-b marking was more evident, although it was less intense than the marking for leptin.

The co-localization between leptin and ObR-b was 84.67% for the microcotyledons region and 95.76% for the areolar region.



**Figure 1. Immunofluorescence of equine placenta at term. A. Immunostaining of leptin in microcotyledons and chorionic epithelium (green - antibody Alexa 488). B. Presence of ObR-b in microcotyledons and chorionic epithelium (red - antibody Alexa 647). C. Nuclear immunofluorescence with Hoescht 33342 (blue). D. Leptin (green - antibody Alexa 488) immunofluorescence and Hoescht 33342 nuclear staining. E. ObR-b (red - antibody Alexa 647) immunofluorescence and Hoescht 33342 nuclear staining. F. Merge image of colocalization of leptin and ObR-b, with the nuclear immunostaining.**

Plasma leptin concentrations in those mares remained constant during third trimester of gestation, while leptin concentrations showed tendency ( $P=0.07$ ) to decrease at 24 h after foaling (Figure 2).



**Figure 2. Plasma leptin concentrations at 8th, 9th and 10th month of gestation, at foaling and 24 hours after foaling ( $P > 0.05$ ).**

#### 4. Discussion

Immunofluorescence study of equine placental tissue revealed leptin and ObR-b in the areolar and microcotyledons regions of placenta. This is the first study about immunolocalization of leptin and its receptor (ObR-b) in placentas from mares, in our knowledge. In the other hand, the presence of leptin in equine placentas has been demonstrated previously via the expression of leptin mRNA detected by PCR, and the placental leptin mRNA levels were lower in horses than in humans, since the leptin mRNA in horse placentas required 35 PCR cycles to amplify the expression, while only 25 PCR cycles were required in human samples [15].

Leptin and ObR-b were observed in the areolar and microcotyledons regions in the equine placenta, similar to that observed in humans and rodents. In the human placenta, leptin and ObR-b were observed in the syncytiotrophoblast region, which is characterized as the endocrine portion of the placenta. Thus, leptin is directly related to the endocrine function of the placenta during pregnancy [19,20].

The labeling for the leptin receptor (ObR-b) was more evident in the apical portion of cells, which characterized its action as a membrane receptor in the placenta, as described for other organs. Thus, the presence of leptin and ObR-b in the microcotyledons and areolar regions suggests that the endocrine function of leptin in the equine placenta is not directly related to the energetic metabolism of the pregnant mare.

The presence of leptin and ObR-b in the same cells suggests that the placenta is not only a site for production and release of leptin, but is also an endocrine-targeting organ, which has also been demonstrated in humans and rodents [21,22].

Leptin and ObR-b proteins are expressed in early embryos of equines. The presence of both leptin and ObR-b in oocytes and in ICSI embryos suggests that leptin acts as an autocrine/paracrine hormone, similar to that observed in placentas, and also in horse embryo maturation, fertilization, and early development [17].

In the placenta of cats, the presence of leptin and ObR-b was demonstrated to occur exclusively in decidual and syncytiotrophoblast cells by immunohistochemical technique [8]. Thus, the presence of leptin and ObR-b in the equine placenta suggests that a peripheral leptin metabolic pathway is involved, similar to that observed in other species.

Leptin levels observed in the present study are considered low for horses (from  $1.59 \pm 0.04$  to  $1.71 \pm 0.07$ ), such as observed in a previous study with Criollo mares in southern Brazil [23]. Plasma leptin concentrations is quite variable among breeds, physiological conditions, age, sex, reproductive status, and animal husbandry [24,25].

In the present study, leptin concentrations remained constant from the eighth to the tenth month of gestation until foaling, with a tendency to decrease during at 24 h after foaling.

In many species, plasma leptin concentrations are elevated throughout pregnancy as a result of upregulation of maternal adipose tissue synthesis, and are stimulated by estrogen concentrations, with leptin production by the fetus and placenta also contributing toward

hyperleptinemia [26]. Although, the reduction in leptin concentrations after foaling promotes an increase in food intake to avoid energy deficiency throughout early lactation. These is described in many horse breeds, including Lipizzaner mares [27], Quarter Horse [28], and pony mares [25]. Thus, these decreases in leptin concentrations may be caused by expulsion of placenta, that was producing leptin.

## **5. Conclusion**

Leptin and its receptor (ObR-b) are present in the microcotyledons and chorionic epithelium of areolar regions in equine placentas. The co-localization of leptin and ObR-b in the placenta of mares at term supports an endocrine and autocrine/paracrine action of leptin within this organ. These findings could be helpful in understanding the endocrine pathways of leptin in the placentas of mares during pregnancy.

## **6. Declarations conflict of interest: None.**

## **7. Authors' contribution:**

BRC, ASVJ, CDC, and CEWN participated in the conceptualization of the study and funding acquisition. BRC, FMP, CGM and CEWN obstetric aid of the mares. FMP, FM, CGW and ASVJ immunofluorescence and confocal analysis. FMP and RAS performed the radioimmunosay. FMP, BRC and CEWN analyzed the data and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

## **8. Acknowledgments**

The Brazilian Association of Criollo Horse Breeders (ABCCC) is acknowledged for funding part of this study. The funding agencies CAPES, FAPERGS and CNPq are

acknowledged for providing scholarships to graduate and ungraduated students (FMP, CGW, RAS and FM).

## 9. References:

- [1] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-32.
- [2] Kimura M, Irahara M, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Yamano S, et al. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002;290:1349-53.
- [3] Guibourdenche J, Tarrade A, Laurendeau I, Rochette-Egly C, Chambon P, Vidaud M, et al. Retinoids stimulate leptin synthesis and secretion in human syncytiotrophoblast. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2000;85:2550-5.
- [4] Balogh O, Staub LP, Gram A, Boos A, Kowalewski MP, Reichler IM. Leptin in the canine uterus and placenta: possible implications in pregnancy. *Reproductive biology and endocrinology* 2015;13:13.
- [5] Dall'Aglio C, Polisca A, Boiti C, Ceccarelli P. Immunolocalization of leptin and its receptor in the placenta of cats. *Acta Histochemica* 2012;114:719-22.
- [6] Ashworth CJ, Hoggard N, Thomas L, Mercer JG, Wallace JM, Lea RG. Placental leptin. *Reviews of reproduction* 2000;5:18-24.



- [7] Bohlender J, Rauh M, Zenk J, Groschl M. Differential distribution and expression of leptin and the functional leptin receptor in major salivary glands of humans. *The Journal of endocrinology* 2003;178:217-23.
- [8] Dall'Aglio C, Maranesi M, Pascucci L, Mercati F, Ceccarelli P. Immunohistochemical distribution of leptin receptor in the major salivary glands of horses. *Res Vet Sci* 2012;93:1116-8.
- [9] Dall'Aglio C, Mercati F, Pascucci L, Ceccarelli P. Immunolocalization of leptin and its receptor in the pancreas of the horse. *Acta Histochem* 2013;115:757-60.
- [10] Cebulj-Kadunc N, Kosec M, Cestnik V. Serum leptin concentrations in Lipizzan fillies. *Reproduction in Domestic Animals* 2009;44:1-5.
- [11] El-Maaty AM, Gabr FI. Relation between leptin and estradiol levels in Egyptian lactating Arab mares during foaling heat. *Animal Reproduction Science* 2010;117(1-2):95-8.
- [12] Ferreira-Dias C, Claudino F, Carvalho H, Agricola R, Alpoim-Moreira J, Robalo Silva J. Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, body weight and immune status. *Domestic Animal Endocrinology* 2005;29:203-13.
- [13] Gentry LR, Thompson Jr DL, Gentry Jr GT, Davis KA, Godke RA, Cartmill JA. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. *Journal Animal Science* 2002;80:2695-703.

- [14] Fitzgerald BP, McManus CJ. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. *Biology Reproduction* 2000;63:335-40.
- [15] Chavatte-Palmer PC, Madia DJ, Duchamp G, Wimel L, Camous S, Guillaume D, et al. Placental expression and neonatal plasma concentrations of leptin in horses and ponies, Book of Abstracts of the 61st Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 2010;1:1.
- [16] Schlafer DH. Postmortem Examination of the Equine Placenta, Fetus, and Neonate: Methods and Interpretation of Findings Proceedings AAEP 2004;50:18.
- [17] Consiglio AL, Dell'Aquila ME, Fiandanese N, Ambruosi B, Cho YS, Bosi G, et al. Effects of leptin on in vitro maturation, fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in the horse. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009;7:11p, vi.: <http://www.rbej.com/content/7/1/113>.
- [18] Statistix. Statistix® 10 Analytical Software. Tallahassee. FL, USA, 2013.
- [19] Senaris R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, et al. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 1997;138:4501-4.
- [20] Sivan E, Whittaker PG, Sinha D, Homko CJ, Lin M, Reece EA, et al. Leptin in human pregnancy: the relationship with gestational hormones. *American journal of obstetrics and gynecology* 1998;179:1128-32.

[21] Bodner J, Ebenbichler CF, Wolf HJ, Muller-Holzner E, Stanzl U, Gander R, et al. Leptin receptor in human term placenta: in situ hybridization and immunohistochemical localization. *Placenta* 1999;20:677-82.

[22] Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:11073-8.

[23] Marchiori MO, Kasinger S, Silva KR, Souza LS, Amaral LA, Nogueira CEW, et al. Medidas comparativas do padrão morfométrico e perfil energético de éguas Crioulas no terço final da gestação, com diferentes escores corporais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2015;67(3):707-15.

[24] Amato C, Martin L, Dumon H, Jaillardon L, Nguyen P, Siliart B. Variations in plasma leptin in show horses during a work season. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (berl)* 2012;96:850-9.

[25] Kędzierski W, Kapica M. Plasma concentration of leptin and ghrelin in Standard bred foals as related to the age, sex, exercise and training. *Animal* 2008;2(4):582–7.

[26] Henson MC, Castracane VD. Leptin in pregnancy: an update. *Biology of Reproduction* 2006;74:218-29.

[27] Heidler B, Parvizi N, Sauerwein H, Bruckmaier RM, Heintges U, Aurich JE, et al. Effects of lactation on metabolic and reproductive hormones in Lipizzaner mares. *Domestic animal endocrinology* 2003;25:47-59.

[28] Berg EL, McNamara DL, Keisler DH. Endocrine profiles of periparturient mares and their foals. *Journal of animal science* 2007;85:1660-8.

## 4.2 Artigo 2

**Expressão de receptores de progesterona, estrógenos alfa, beta, receptor relacionado ao estrógeno gama, e de aromatase na placenta de éguas com placentite submetidas a diferentes protocolos hormonais**

Fernanda Maria Pazinato, Bruna da Rosa Curcio, Lorena Soares Feijó, Camila Gervini Wendt, Gabriela Castro, Luciana Araújo Borba, Antônio Sérgio Varella Junior, Carlos Eduardo Wayne Nogueira

**Será submetido à revista: Theriogenology**

## **Expressão de receptores de progesterona, estrógenos alfa, beta, receptor relacionado ao estrógeno gama, e de aromatase na placenta de éguas com placentite submetidas a diferentes protocolos hormonais**

### **Resumo**

A placentite é a principal causa de perda no terço final de gestação em equinos, e a terapia visa reduzir o agente patogênico, controlar o processo inflamatório e manter a gestação. Nesse contexto, a adequada terapia hormonal que possa promover manutenção da gestação durante terapia para placentite ainda não está bem esclarecida. O objetivo do estudo foi descrever a imunomarcagem e quantificação de receptores de progesterona (RP), receptores de estrógeno  $\alpha$  (RE $\alpha$ ),  $\beta$  (RE $\beta$ ), receptor relacionado ao estrógeno  $\gamma$  (RE $\gamma$ ), e de aromatase na placenta de éguas com placentite ascendente tratadas com diferentes terapias hormonais. Foram utilizadas 26 gestações, de 21 éguas mestiças Crioulas, com indução de placentite experimental aos 300 dias de gestação, e sobre diferentes terapias hormonais. Foi observada expressão consistente de receptores de progesterona, de estrógeno  $\alpha$ ,  $\beta$  e receptor relacionado ao estrógeno  $\gamma$ , e de aromatase com predomínio no citoplasma das células de microcotilódoens e epitélio coriônico de região areolar. As éguas com placentite sobre terapia com cipionato de estradiol demonstrados maior tempo de gestação e quantificação de aromatase na placenta. Enquanto éguas com terapia de altrenogest demonstraram menor tempo gestacional, e aquelas sem tratamento e com terapia associada de altrenogest e cipionato de estradiol demonstraram incremento na quantificação de receptores hormonais de progesterona placenta.

### **Introdução**

A placenta é um órgão transitório responsável pelo transporte de nutrientes, pelas trocas metabólicas entre a mãe e o feto e ainda pela produção hormonal para a manutenção da gestação [1]. Quadros de lesão placentária, como a placentite levam a insuficiência placentária, resultando em comprometimento das trocas metabólicas e gasosas entre a mãe e o feto [2]. A placentite ascendente em éguas é a causa de mais de 30% dos partos prematuros e mortes neonatais dentro das primeiras 24h de vida [3].

A placentite é caracterizada pela produção de algumas citocinas pró-inflamatórias, dentre elas, as prostaglandinas, que podem resultar em aumento de contratilidade uterina e aumentar os riscos de abortos e partos prematuros [4,5].

A progesterona e os estrógenos são os principais hormônios necessários a manutenção da gestação em éguas. A progesterona tem origem de corpos lúteos durante o primeiro trimestre

de gestação, e está associada a manutenção da quiescência uterina e fechamento da cérvix [6,7]. Com o transcorrer da gestação, os progestágenos presentes passam a ser produzidos pela unidade feto-placentária, sendo os precursores dos progestágenos secretados pelas adrenais do feto [8,9].

Estrógenos de modo geral atuam como uterotônicos, com ações opostas à progesterona, e elevadas concentrações de estrógeno estão relacionadas ao maior fluxo sanguíneo uterino, seja durante a gestação ou durante o estro [10,11]. Em um estudo onde se realizou gonadectomias fetais no terço médio de gestação, foi observada uma queda imediata dos níveis séricos de estrógeno, e manutenção dos níveis baixos até o momento do parto. Durante o parto as éguas apresentaram contrações uterinas amenas e baixos níveis de prostaglandina [12]. O que demonstra que os estrógenos são fundamentais para o suprimento sanguíneo e nutrição adequada do feto, além de atuarem no processo físico do parto.

A aromatização estrogênica na placenta equina durante a gestação é realizada a partir da enzima aromatase, a qual apresenta papel essencial no processo de homeostase endócrina [13]. Já foi demonstrado que a inibição da aromatase em éguas gestantes, a partir do uso de inibidores como o letrozole, resulta em redução das concentrações de estrógeno circulante, além do nascimento de potros menores, quando comparadas com éguas saudáveis sem tratamento. Fatores que demonstram a importância do estrógeno como hormônio envolvido no desenvolvimento e bem-estar fetal [14].

A terapia para placentite visa inibição do patógeno envolvido, redução do processo inflamatório e manutenção da gestação resultando no nascimento de potros viáveis [15]. Com relação a terapia antimicrobiana, vários estudos demonstram a importância e ação das drogas em quadros de placentite ascendente [15, 16, 17]. Porém, com relação a suplementação hormonal, há poucos estudos que resultem na definição da terapia mais adequada.

Os progestágenos são comumente utilizados na terapia de placentite, com intuito de manter a quiescência uterina reduzindo riscos de abortos [14,15]. Entretanto, alguns estudos não obtiveram maior sobrevivência neonatal com a adição de progesterona de longa ação, como o altrenogest, na terapia [17]. No entanto, continua a ser determinar se as progestinas são benéficas para o tratamento da placentite. A terapia com estrógenos tem sido indicada para quadros de placentite por reduzir as perdas decorrentes de abortos e natimortos, e já foi demonstrado melhor desfecho neonatal e menor incidência de lesões placentárias em éguas com placentite ascendente suplementadas com cipionato de estradiol [18].

A presença de receptores de estrógeno  $\alpha$  e progesterona foi descrita no endométrio de éguas gestantes entre os dias 20 e 68 de gestação, sem a evidência dos mesmos receptores nos envoltórios fetais [7]. Em 2009, um estudo com éguas entre os 110 e 309 dias de gestação identificou a presença de estrógeno  $\alpha$  e estrógeno  $\beta$  no epitélio e estroma das microcarúnculas e microcotilédones [19]. No entanto, não há descrição da expressão destes hormônios quando em quadros de lesão placentária, como a placentite, em éguas suplementadas com diferentes terapias hormonais.

Os receptores relacionados ao estrógeno gama (RRE $\gamma$ ) constituem um tipo de receptor da classe de receptores relacionados aos estrógenos, os quais são receptores nucleares órfãos que apresentam homologia aos receptores de estrógeno (RE $\alpha$  e RE $\beta$ ) [20,21]. Embora o RRE $\gamma$ , compartilhe um parentesco estrutural muito semelhante com os receptores de estrógenos, os mesmos não se ligam aos estrógenos [20,21,22]. No entanto, os receptores relacionados aos estrógenos podem interagir com diversos co-ativadores em diferentes tecidos, independente dos ligantes, devido apresentarem vários níveis de atividade constitutiva [23]. 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.

Temos como hipótese inicial que éguas submetidas a diferentes terapias hormonais apresentam diferentes expressões de receptores hormonais na placenta, os quais atuam diretamente sobre rotas metabólicas que podem auxiliar na manutenção da gestação e sobrevivência neonatal em quadros de placentite.

O objetivo do presente estudo foi descrever a imunomarcção e quantificação de receptores de progesterona (RP), receptores de estrógeno  $\alpha$  (RE $\alpha$ ),  $\beta$  (RE $\beta$ ) e receptor relacionado ao estrógeno  $\gamma$  (RRE $\gamma$ ), e de aromatase na placenta de éguas com placentite ascendente tratadas com diferentes terapias hormonais.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais**

Um total de 23 gestações provenientes de 20 éguas multíparas, de raça Crioula e mestiças Crioulas, com média de idade de 10 (dez) anos, foram utilizadas neste experimento. Os animais são provenientes da Fazenda da Palma da Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. Todas as éguas utilizadas apresentavam-se



saudáveis, sem histórico prévio de subfertilidade ou alterações gestacionais. Inicialmente foi realizado o acompanhamento folicular, com determinação da ovulação a partir das avaliações por palpação transretal e ultrassonografia. Todas as éguas foram inseminadas artificialmente com sêmen fresco proveniente do mesmo garanhão. As éguas eram mantidas em pastagem e suplementadas com concentrado comercial, a água era disponível *ad libitum*. Próximo a data do parto, as éguas eram mantidas em piquetes e encaminhadas a cocheiras próprias quando da ruptura bolsa alatoideana.

Este estudo foi realizado durante a temporada reprodutiva do Hemisfério Sul, dos meses de Agosto a Dezembro dos anos de 2013 e 2014. Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas – UFPel, sobre número de protocolo 3891.

### **Indução experimental da placentite ascendente**

A indução experimental de placentite foi realizada através da inoculação intracervical de  $10^7$  unidades formadoras de colônia de *Streptococcus equi* subspécie *zooepidemicus*, como descrito anteriormente por Mays et al. [24] e Curcio et al. [18]. O agente utilizado neste estudo foi isolado da placenta de uma égua PSI com sinais clínicos e achados patológicos de placentite ascendente.

A caracterização do isolado foi realizada através de técnicas microbiológicas padrão, como a coloração de Gram, a presença de  $\beta$ -hemólise em meio de ágar sangue e caracterização bioquímica [25]. O inóculo foi cultivado em meio aeróbico, aliqüotado em glicerol 10% e criopreservado em nitrogênio líquido até o uso. Aproximadamente 48 h antes da inoculação, um aaliqüota era descongelada e semeada em agra sangue ovino por 24 h para confirmação do crescimento de *Streptococcus equi* subspécie *zooepidemicus*. No dia da indução, era preparada o inóculo em uma solução de 1mL de solução salina a 0,9% com concentração de  $10^7$  unidades formadoras de colônia, através do método de turbidez de McFarland para suspensão bacteriana (McFarland Turbidity Standard No 0.5, BD Diagnostics Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA).

A indução de placentite foi realizada através da infusão intracervical de *Streptococcus equi* subspécie *zooepidemicus* na concentração de  $1 \times 10^7$  UFC, aos 300 dias de gestação, conforme protocolo descrito por Bailey et al. [15].

### **Delineamento experimental e Protocolos terapêuticos**

Aos 300 dias de gestação as éguas foram divididas em grupo de éguas saudáveis, com gestações sem alteração (Controle, n=6), e um grupo de éguas com indução de placentite ascendente (n=17). As éguas do estudo foram divididas de acordo com a indução de placentite e os protocolos terapêuticos utilizados, no que segue: [1] Controles (sem indução de placentite, n=6); [2] Sem tratamento (com indução de placentite, porém sem terapia, n=3); [3] STM+FM+ALT (n=6); [4] STM+FM+ALT+ECP (n=4); [5] STM+FM+ECP(n=4). O tratamento iniciou 48h após a indução experimental de placentite ascendente e foi mantida por 10 dias consecutivos. A terapia instituída e sua duração foram realizadas de acordo com estudos anteriores [18]. Os protocolos de tratamento utilizados estão descritos a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolos terapêuticos utilizados nas éguas com indução de placentite ascendente do presente estudo.

| <b>Fármacos</b>                     | <b>Dose</b> | <b>Via de administração e posologia</b>    | <b>Fabricante</b>                                      |
|-------------------------------------|-------------|--|--|
| <b>Sulfametoxazole-Trimetoprima</b> | 30mg/kg     | IV, cada 12h por 10 dias                   | Trissulfim®, Ouro Fino Saúde Animal, São Paulo, Brasil |
| <b>Flunixinameglumine</b>           | 1,1mg/kg    | IV, cada 24h por 10 dias                   | Desflan®, Ouro Fino Saúde Animal, São Paulo, Brasil    |
| <b>Altrenogest (longa ação)</b>     | 0,088mg/kg  | IM, cada 7 dias com total de 2 tratamentos | Altrenogest®, Botupharma, São Paulo, Brasil            |
| <b>Cipionato de Estradiol</b>       | 10mg/kg     | IM, cada 3 dias com total de 3 tratamentos | E.C.P.®, Zoetis, São Paulo, Brasil                     |

### **Coleta e avaliação da placenta**

A placenta foi pesada e avaliada macroscopicamente imediatamente após sua expulsão. Par avaliação macroscópica a mesma foi disposta em formato de “F”, e consideradas presenças de lesões macroscópicas de placentite, como descrito por Schlafer [26]. Para avaliação histológica foram obtidos sete fragmentos (medindo 3x3) de cada placenta (correspondentes aos pontos cordão umbilical, âmnion, estrela cervical, corpo uterino, corno gravídico e corno não gravídico), fixados em formalina 10% até processamento.

Amostras de corno gravídico foram coletadas em duplicata para realização da avaliação de imunofluorescência, estas acondicionados em formalina 10% por 24h para fixação, com

posterior acondicionamento em álcool 70% até o processamento para realização da imunofluorescência.

Cortes histológicos (5 µm de espessura) foram montados em laminas histológicas e corados por hematoxilina e eosina para avaliação histológica. As laminas foram analisadas por microscopia ótica (Olympus BX51; Olympus America, Center Valley, PA). Foram consideradas lesões de placentite aguda, presença de infiltrado de polimorfonucleares, com predomínio de neutrófilos, necrose tecidual e conteúdo eosinofílico característico de secreção purulenta, enquanto placentite crônica foi considerada a partir da presença de infiltrado de mononucleares com necrose de microcotilédones, por vezes com hiperplasia de alantocóron [26,27].

### **Imunofluorescência**

Para realização da técnica de imunofluorescência, foram obtidos cortes de placenta com 7µm de espessura montados sobre laminas histológicas embebidas em organossilano a 3% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), e parafinados em paraplast. As amostras foram deparafinadas com xilol e reidratadas em álcool com graduação seriada. A recuperação antigênica foi realizada em micro-ondas (590W por 15min) em solução de citrato de sódio (pH 6.0). Após resfriamento, as laminas foram transferidas para PBS a 4°C, e então realizado o bloqueio de reações inespecíficas através do uso de albumina sérica bovina (BSA) a 3% (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), durante 15min. Os anticorpos primários policlonais foram: anti-progesterone receptor antibody [YR85, ab32085, Abcam], anti-estrogen alpha receptor antibody [ab75635, Abcam], anti-estrogen beta receptor antibody [ab3576, Abcam] and anti-estrogen related receptor gamma antibody [ab49129, Abcam], anti-aromatase antibody [H4, ab139492]. Todos os anticorpos primários foram diluídos na proporção de 1:200 em solução de BSA 1,5% de acordo com a indicação dos fabricantes.

As amostras foram incubadas por 12h em câmara úmida a temperatura de 4°C. Os anticorpos secundários utilizados foram: Alexa Fluor 647 anti-mouse [Donkey Anti-mouse (IgG H&L) Alexa Fluor 647; Abcam] para o anticorpo anti-progesterone receptor, anticorpo anti-estrogen related receptor gamma, e anticorpo anti-aromatase; e Alexa Fluor 488 anti-rabbit [Goat Anti-rabbit (IgG H&L) Alexa Fluor 488; Abcam] para o anticorpo anti-estrogen alpha receptor, e anticorpo anti-estrogen beta receptor, e para fluorescência do núcleo foi utilizado cromógeno Bisbenzimidaz H2% (Hoescht 33342-ab145597; Abcam). Após diluição e adição dos anticorpos secundários no tecido, foi realizada incubação em temperatura ambiente (25°C)

em câmara úmida e escura por 30 min. As laminas foram cobertas com lamínula montados sobre meio de selante resinoso Fluoroshield (ab104135; Abcam) e resfriadas a 4° C até análise em microscopia confocal, as análises eram realizadas em até 5 dias após a confecção das laminas. As imagens espectrais foram adquiridas em microscópio de laser confocal Leica TCS SP8 (Solms, Germany). Os comandos de espectro das imagens foram fixados no início da aquisição e análise, e não foram modificados durante a análise das amostras. As imagens foram obtidas sequencialmente usando os comandos: de 405 nm/PMT 420–470 nm (H33342), 488 nm/510–550 nm (Alexa 488), e 647nm/660–690nm (Alexa 647) (solid-state laser/spectral photomultiplier tube).

Controles negativos para cada fragmento placentário foram obtidos através da exclusão dos anticorpos primários, enquanto controles positivos foram obtidos a partir da imunomarcação em tecido de ovário equino. Os anticorpos primários foram selecionados a partir de sua reatividade para a espécie equina já ser demonstrada em estudos anteriores [7, 19]. Todos os procedimentos da técnica de imunofluorescência foram conduzidos pelo mesmo técnico laboratorial.

### **Quantificação da imunomarcação dos receptores na imunofluorescência**

Para quantificação dos receptores de progesterona, estrógeno  $\alpha$ ,  $\beta$ , receptor relacionado ao estrógeno  $\gamma$ , e aromatase nas placentas avaliadas foi utilizado o software de domínio público ImageJ, as mensurações foram realizadas de acordo com os protocolos base de avaliação de imagens [28,29].

As imagens foram primariamente convertidas em escala de cinza 16 bits para utilização de um canal único de quantificação. A partir da imagem obtida, a mesma foi convertida em binária e todas as estruturas pertinentes a imunomarcação de interesse foram realçadas em vermelho, minimizando-se os ruídos de pixels do background.

Após realçar as áreas de imunomarcação foi criada uma imagem binária de canal único, minimizando as interferências da imagem, esta com duas intensidades de pixel (preto=0 e branco=255). As imagens foram então submetidas para análise, com seleção de área em pixels. A partir da seleção de áreas foram realizadas análises de partículas, as quais também foram tomadas em pixels, totalizando a média em pixels de todas as partículas analisadas.

### Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis que apresentaram distribuição não paramétrica de análise de foram avaliadas por teste de Kruskal-Wallis One-Way comparação entre as médias pelo teste de Dunn. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Statistix 10.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

### Resultados

#### Dados de tempo de gestação e intervalo inoculação/parto

Menor tempo de gestação e intervalo inoculação/parto foi observado nas éguas Sem tratamento e STM+FM+ALT. Enquanto que o grupo STM+FM+ECP demonstraram maior tempo de gestação, similar as éguas do grupo Controle. As éguas Sem tratamento apresentarem menor intervalo inoculação/parto, e menor peso do neonato, similar ao observado para as éguas dos grupos STM+FM+ALT e STM+FM+ALT+ECP (Tabela 2).

Tabela 2. Dados gestacionais e de peso da placenta e do neonato, em éguas com indução experimental de placentite ascendente recebendo diferentes protocolos de terapia hormonal.

|                             | Intervalo<br>inoculação/parto (d) | Tempo de<br>gestação (d)  | Peso placenta<br>(kg) | Peso neonato<br>(kg)    |
|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------------|
| <b>Controles (n=6)</b>      | 39,4±9,4 <sup>a</sup>             | 339,6±10,1 <sup>a</sup>   | 5,1±0,3               | 42,8±4 <sup>a</sup>     |
| <b>Sem tto (n=3)</b>        | 1,6±0,5 <sup>b</sup>              | 303,6±2,8 <sup>b</sup>    | 3,8±0,3               | 26,2±1,5 <sup>b</sup>   |
| <b>STM+FM+ALT (n=6)</b>     | 18,3±12 <sup>a,b</sup>            | 318,3±12,4 <sup>a,b</sup> | 5,2±0,7               | 28,8±4,5 <sup>b</sup>   |
| <b>STM+FM+ALT+ECP (n=4)</b> | 23,5±20 <sup>a,b</sup>            | 334±25,4 <sup>a,b</sup>   | 5±1,6                 | 34±8,5 <sup>a,b</sup>   |
| <b>STM+FM+ECP (n=4)</b>     | 49,5±11,2 <sup>a</sup>            | 350±13,7 <sup>a</sup>     | 5,4±1,5               | 37,2±3,2 <sup>a,b</sup> |

<sup>a,b</sup> Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

#### Dados da placenta

Na macroscopia da placenta as éguas do grupo STM+FM+ALT apresentaram maior porcentagem de lesões compatíveis com placentite, enquanto éguas do grupo STM+FM+ECP, apresentar Na histologia as éguas do grupo Sem tratamento e STM+FM+ALT apresentaram maior número de placentite aguda. Enquanto as éguas com terapia STM+FM+ECP demonstraram predomínio de placentite crônica (Tabela 3).

Tabela 3. Achados macroscópicos e histológicos das placentas de éguas com indução experimental de placentite ascendente recebendo diferentes protocolos de terapia hormonal.

|                             | Macroscopia da Placenta |                | Histologia da Placenta |                      |                        |
|-----------------------------|-------------------------|----------------|------------------------|----------------------|------------------------|
|                             | Sem alteração (%)       | Placentite (%) | Sem alteração (%)      | Placentite aguda (%) | Placentite crônica (%) |
| <b>Controles (n=6)</b>      | 100 (6/6)               | 0              | 100 (6/6)              | 0                    | 0                      |
| <b>Sem tto (n=3)</b>        | 75 (2/3)                | 25 (1/3)       | 0                      | 100 (3/3)            | 0                      |
| <b>STM+FM+ALT (n=6)</b>     | 33,3 (2/6)              | 66,7 (4/6)     | 16,7 (1/6)             | 83,3 (5/6)           | 0                      |
| <b>STM+FM+ALT+ECP (n=4)</b> | 50 (2/4)                | 50 (2/4)       | 25 (1/4)               | 50 (2/4)             | 25 (1/4)               |
| <b>STM+FM+ECP (n=4)</b>     | 75 (3/4)                | 25 (1/4)       | 25 (1/4)               | 0                    | 75 (3/4)               |

### Imunomarcção dos receptores hormonais

A imunomarcção de RP foi visualizada no citoplasma das células de epitélio de microcotilédones e região areolar, e pobremente demarcadas no núcleo das células de estroma alantoideano (Figura 1). Quanto a quantificação de pixels referente a presença de receptores de progesterona, a mesma foi superior para as éguas do grupo Sem tratamento e STM+FM+ALT+ECP (Tabela 4).

Para o RE $\beta$  foi observada marcação positiva predominantemente no citoplasma, e rara expressão a nível nuclear de células de estroma e de epitélio de microcotilédones, de forma semelhante em todas as placentas (Figura 1). Na comparação entre os grupos de tratamento, a maior presença de RE $\beta$  foi observada para as éguas do grupo STM+FM+ALT+ECP.

O RE $\alpha$  demonstrou marcação positiva no citoplasma para células epiteliais de microcotilédones e de região areolar de forma semelhante em todos os animais do estudo, e raras células epiteliais e de estroma alantoideano demonstraram marcação a nível nuclear. A imunomarcção de RE $\alpha$  foi maior nos grupos Sem tratamento e STM+FM+ALT+ECP.

Enquanto, para os RRE $\gamma$  foi observada imunomarcção semelhante à dos outros receptores de estrógenos, com marcação mais consistente a nível citoplasmático de células epiteliais e de estroma alantoideano, algumas raras células epiteliais apresentaram marcação nuclear. Similar ao observado para os receptores de E $\alpha$ , a quantificação de RRE $\gamma$  foi maior nas placentas dos grupos Sem tratamento e STM+FM+ALT+ECP.

A imunomarcção positiva para aromatase foi visualizada na região de epitélio de microcotilédones, bem como na região de epitélio areolar, em todas as placentas avaliadas. A mesma foi observada com maior proporção a nível nuclear de estroma, enquanto em epitélio areolar e microcotiledonário demonstrou maior marcação citoplasmática, com raras células

epiteliais apresentando marcação nuclear. Quanto a marcação entre os grupos, a imunomarcação foi mais consistente nas éguas dos grupos Sem tratamento e STM+FM+ECP, enquanto no grupo Controle foi pobremente marcada.

Tabela 4. Quantificação da imunomarcação 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.

|                             | RP                          | RE $\beta$                   | RE $\alpha$                    | RRE $\gamma$                 | Aromatase                     |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <b>Controle (n=6)</b>       | 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>    |
| <b>Sem tratamento (n=3)</b> | 12,4 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup> | 22,1 $\pm$ 14,4 <sup>b</sup> | 24,5 $\pm$ 14,6 <sup>a,b</sup> | 21,9 $\pm$ 15,9 <sup>a</sup> | 15,6 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>   |
| <b>STM+FM+ALT (n=6)</b>     | 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>  |
| <b>STM+FM+ALT+ECP (n=4)</b> | 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>b,c</sup> |
| <b>STM+FM+ECP (n=4)</b>     | 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>  |

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

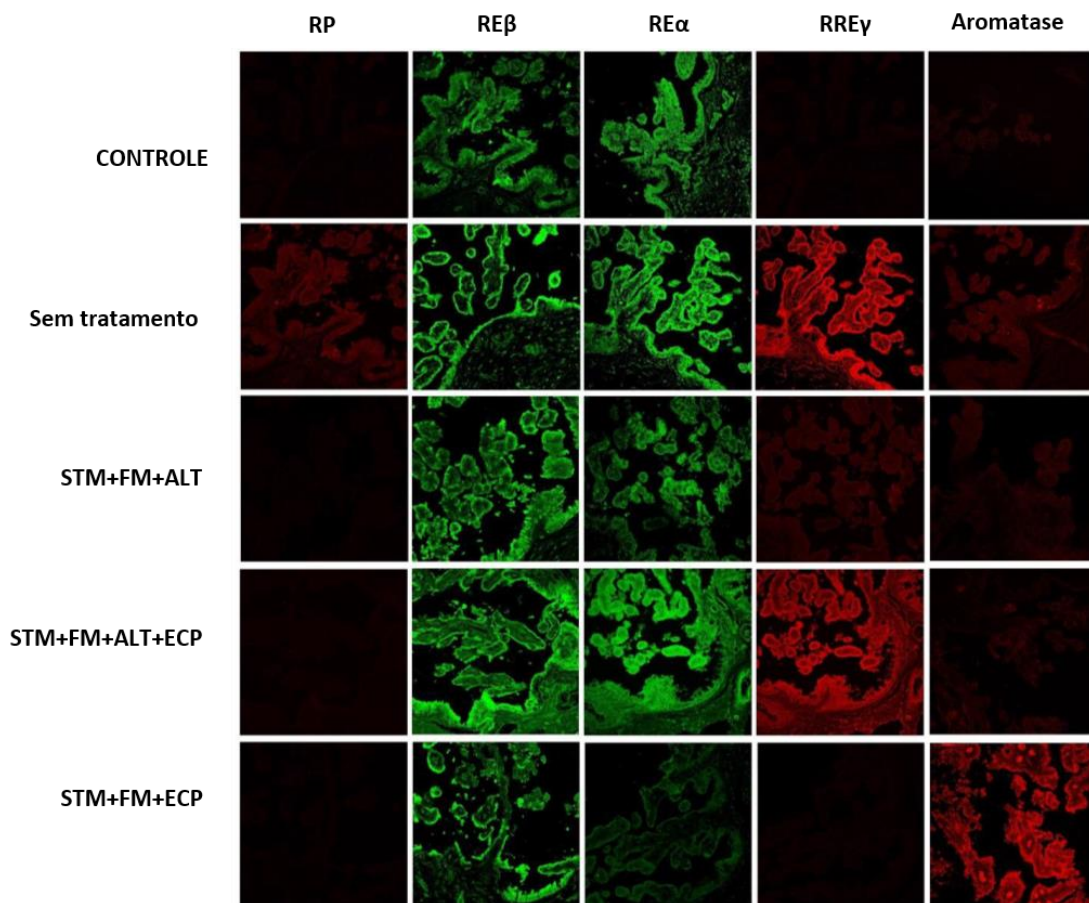


Figura 1. Imunomarcação de receptores de progesterona, estrógenos  $\alpha$ ,  $\beta$ , receptor relacionado ao estrógeno  $\gamma$ , e aromatase na placenta de éguas com placentite sobre diferentes terapias hormonais.

## Discussão

No presente estudo, os dados observados na gestação e o peso neonatal caracterizaram os achados pertinentes a quadros de placentite nas éguas Sem tratamento. De forma similar, as éguas dos grupos STM+FM+ALT e STM+FM+ALT+ECP, apresentaram menor tempo gestacional e menor peso neonatal. Além disso, foi observada maior incidência de achados macroscópicos e placentite aguda no grupo STM+FM+ALT, caracterizando que a suplementação com altrenogest em éguas com placentite não leva a melhora no quadro clínico e remissão de lesões placentárias.

A suplementação de progestágenos tem sido recomendada como uma prática terapêutica similar a realizada em mulheres com gestações de risco [30]. Entretanto, em equinos não há evidências que a suplementação com progestágenos em éguas com placentite seja necessária [31]. De forma contrária, vários autores relatam que a inclusão de terapia com progesterona, como o altrenogest não traz benefícios para quadros de placentite ascendente experimental [17].

As éguas do grupo STM+FM+ALT demonstraram predomínio de lesões agudas na histologia, enquanto as éguas do grupo STM+FM+ECP tiveram predomínio de lesões crônicas. Já é descrito que quadros de placentite crônicas, podem qualificar a resposta de maturação fetal, devido ao estresse crônico resultar em níveis elevados de cortisol fetal e acelerar a maturação do feto, resultando em nascimento de neonatos viáveis [9]. Além disso, as lesões crônicas podem estar associadas com maior remissão do agente patogênico e consequente manutenção da gestação [15].

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a terapia com cipionato de estradiol propiciou melhores resultados placentários e neonatal, semelhante ao observado em estudos anteriores [18]. As éguas recebendo terapia com cipionato de estradiol, demonstraram maior tempo gestacional e peso neonatal. Outros estudos demonstram que a suplementação de estrógenos em éguas com placentite resultou na manutenção do tempo de gestação, permitindo o desenvolvimento fetal e maturação antes do parto [18, 31].

Estudos anteriores também demonstraram que somente o uso de antimicrobianos, associado com diferentes anti-inflamatórios apresentou resultados superiores ao uso associado com progestágenos [17]. A terapia com antimicrobianos na placentite visa reduzir ou mesmo eliminar os microorganismos nas membranas fetais [4,15]. Dentre os agentes antimicrobianos, a sulfametoxazole+trimetoprim constitui um dos principais utilizados, visto que ultrapassam a barreira placentária e atingem concentrações ótimas a nível de fluidos fetais, além de serem aparentemente seguras ao feto [32,33]. Devido a isso, este antimicrobiano tem sido amplamente



utilizada por diversos autores para tratamento da placentite espontânea [15] e placentite experimental [16,17,34], semelhante ao utilizado nestes estudo.

Com relação a macroscopia da placenta, somente 25% (1/4) das éguas do grupo STM+FM+ECP apresentou lesões de placentite. Enquanto, as éguas que receberam terapia com progesterona, a presença de lesões macroscópicas na placenta foi de 66,7% (4/6), dados estes que corroboram com Curcio et al [18], que também visualizaram menor taxa de lesões placentárias em éguas com placentite tratadas com estrógeno.

No presente estudo, a imunomarcção dos receptores de progesterona apresentou predomínio a nível de citoplasma para todos os grupos, e a mesma foi pobremente marcada corroborando com estudos anteriores [19]. Em estudo de Wilsher [7], aos 309 dias de gestação, foi observada baixa presença de RP no tecido fetal, compreendendo os microcotilédones e endométrio materno, os quais sugerem que os RP são negativamente regulados nos microplacentônios de equinos nessa fase gestacional, pelas altas concentrações de outros progestágenos.

Já no terço inicial e médio de gestação, as concentrações de RP são elevados tanto em células epiteliais da placenta como do endométrio uterino, o que vai em desconcontro ao conceito que a exposição a longo prazo do tecido a progestágenos regula negativamente a expressão de RP epiteliais [35]. Porém, nas éguas do estudo maior presença de RP na placenta foi observado nos grupos que apresentaram maior quantidade de placentite aguda e abortos.

Diferentemente do observado em suínos, o RE nas éguas é predominantemente localizado no citoplasma das células epiteliais e não nos seus núcleos. A imunomarcção para os RE foi predominantemente citoplasmática, similar ao encontrado por outros autores no terço final de gestação. Entretanto, há descrições que sugerem que o padrão de imunocoloração para os RE pode apresentar variações dependendo do anticorpo primário utilizado [36,37], existindo, portanto, a possibilidade de que a localização predominante citoplasmática encontrada neste estudo esteja relacionada ao isotipo do anticorpo utilizado.

Porém, vários estudos em outras espécies, como humanos, primatas e roedores, corroboram que independentemente da localização dos RE, os mesmos possuem afinidade similar de ligação esteroide [38]. Além disso, o RE citoplasmático pode atuar como um local de armazenamento temporário de receptores que estão em processo de translocação para outros locais da célula, caracterizando maior atividade estrogênica neste local [39].

Quando comparada a quantificação de RE entre os grupos de tratamento, a imunomarcção de RE $\beta$  foi superior no grupo STM+FM+ALT+ECP. Já foi demonstrado que

o estrógeno E2 exógeno tem capacidade de estimular marcadamente o desenvolvimento de agregados sinciciais no trofoblasto humano, estando diretamente relacionado a diferenciação trofoblástica [40,41]. Entretanto, a atividade estrogênica em éguas vazias tende a estimular maior número de receptores de progesterona, resultando em maior atividade de progestágenos a nível endometrial. A associação da terapia com altrenogest e cipionato de estradiol, pode ter acarretado em maior atividade estimulatória positiva dos hormônios com consequente incremento de receptores epiteliais.

De forma similar ao observado em outras espécies, as éguas do grupo STM+FM+ECP deste estudo, podem ter apresentado maior diferenciação celular, contribuindo para remissão das lesões placentárias. Em placentas de humanos e roedores, a diferenciação trofoblástica está associada à transição da expressão RE $\alpha$  para RE $\beta$ , com a co-expressão temporária de ambos, o que sugere que ambos os REs estão envolvidos na diferenciação do trofoblasto estimulado por estrogênio [40,42,43].

Nas éguas do grupo STM+FM+ECP, foi observada ainda maior marcação tecidual para aromatase. A aromatase está associada a conversão de esteroides placentários, apresentando alta atividade intrínseca na placenta, onde realiza a conversão de compostos esteróides neutros C<sub>18</sub> e C<sub>19</sub> em estrógeno, originando estrona e estradiol 17 $\alpha$  e 17 $\beta$ . Dessa forma, o estímulo com estrógeno exógeno pode estar associada com incremento de atividade de aromatase na placenta, contribuindo para incremento da produção endógena de estrógenos a nível placentário mesmo em quadros de lesão [13,44].

A imunomarcação para RRE $\gamma$  foi maior somente nas éguas sem tratamento e com ambas terapias hormonais. Com relação aos receptores relacionados ao estrógeno  $\gamma$ , em estudo com placentas humanas, foi observada correlação entre a expressão de RRE $\gamma$  e a atividade da aromatase [45], sugerindo que os RRE $\gamma$  estão relacionados ao incremento de aromatase e consequentemente maior diferenciação celular [46]. Entretanto, no presente estudo, não foi observado maior incremento na imunomarcação de receptores de RRE $\gamma$  nas éguas que receberam terapia com ECP, as quais apresentaram maior imunomarcação da aromatase, sendo a atividade do RRE $\gamma$  na placenta equina ainda desconhecida.

## **Conclusão**

Éguas com placentite ascendente que receberam terapia com cipionato de estradiol apresentaram incremento no número de receptores de aromatase, inferindo relação direta com

o metabolismo placentário. Foi observado elevado número de receptores de progesterona nas éguas com placentite sem tratamento e com terapia associada de altrenogest e cipionato.

## Referências

- [1] Leiser R, Kaufmann P. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol* 1994;102:122–134.
- [2] Marconi AM, Paolini CL, Stramare L, Cetin I, Fennessey P, Pardi G, et al. Steady state maternalfetal leucine enrichments in normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Pediatr Res* 1999;46:14-119.
- [3] Mckinnon AO. Maintenance of pregnancy. In: Annual Resort Symposium of the American association of equine practitioners, 2009, Gold Coast. Proceeding AAEP, Gold Coast: [AAFP], 2009, 10:81- 117.
- [4] LeBlanc MM, Giguere S, Lester GD, Bauer K, Paccamonti L. Relationship between infection, inflammation and premature parturition in mares with experimentally induced placentitis. *Equine Vet J Suppl* 2012;41:8-14.
- [5] McGlothlin JA, Lester GD, Hansen PJ, Thomas M, Pablo L, Hawkins DL, et al. Alteration in uterine contractility in mares with experimentally induced placentitis. *Reproduction* 2004;127:57-66.
- [6] Allen WR. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction* 2001;121:513–527.
- [7] Wilsher S, Gower S, Allen WR. Immunohistochemical localisation of progesterone and oestrogen receptors at the placental interface in mares during early pregnancy *Animal Reproduction Science* 2011;129:200-208.
- [8] Short RV. Progesterone in blood: IV. Progesterone in the blood of mares. *J Endocrinol* 1959; 19:207–10.
- [9] Rossdale PD, Ousey JC, Cottrill CM, Chavatte P, Allen WR, McGladden AJ. Effects of placental pathology on maternal plasma progestogen and mammary secretion calcium concentrations and on neonatal adrenocortical function in the horse. *J Reprod Fertil Suppl* 1991;44:579-90.
- [10] Bollwein H, Weber F, Woschee I, Stolla R. Transrectal Doppler sonography of uterine and umbilical blood flow during pregnancy in mares. *Theriogenology* 2004;61:499–509.
- [11] Bollwein H, Mayer R, Weber F, Stolla R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 2002;57:2043–51.

- [12] Pashen RL, Allen WR. The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. *J Reprod Fert Suppl* 1979;27:499–509.
- [13] Ainsworth L, Ryan KJ. Steroid hormone transformation by the endocrine organs from pregnant mammals. I. Estrogen biosynthesis by mammalian placental preparations *in vitro*. *Endocrinology* 1966;79:875-83.
- [14] Ousey JC, Houghton E, Grainger L, Rosedale PD, Fowden AL. Progestagen profiles during the last trimester of gestation in Thoroughbred mares with normal or compromised pregnancies. *Theriogenology* 2005;63:1844-56.
- [15] Bailey CS, Macpherson ML, Pozor MA, Troedsson MHT, Benson S, Giguere S, et al. Treatment efficacy of trimethoprim sulphamethoxazole, pentoxifylyne and altrenogest in experimentally induced equine placentitis. *Theriogenology* 2010;74:402-12.
- [16] Macpherson MI, Giguere S, Hatzel JN, Pozor M, Benson M, Diaw M, et al. Disposition of desfuroylceftiofur acetamide in serum, placental tissue, fetal fluids, and fetal tissues after administration of ceftiofur crystalline free acid (CCFA) to pony mares with placentitis. *J Vet Pharmacol Ther* 2013;36:59-67.
- [17] Christiansen DL, Moultona K, Hopper RM, Walters FK, Cooleya AJ, LeBlanc MM, et al. Evidenced-based medicine approach to develop efficacious therapies for late-gestation mares presenting with uterine infections using an experimentally-induced placentitis model. *Anim Reprod Sci* 2010;121S:345-6.
- [18] Curcio BR, Canisso IF, Pazinato FM, Borba LA, Feijó L, Finger IS, Toribio RE, Nogueira CEW. Estradiol cypionate aided treatment for experimentally induced ascending placentitis in mares. *Theriogenology* 2017;102:98-107.
- [19] Abd-Elnaeim MM, Derar IR, Wilsher S, Allen, W.R., Leiser, R., Schuler, G. Immunohistochemical localization of oestrogen receptors alpha and beta, progesterone receptor and aromatase in the equine placenta. *Reprod Domest Anim* 2008;44:312–319.
- [20] Duellman SJ, Calaoagan JM, Sato BG, et al. A novel steroidal inhibitor of estrogen-related receptor alpha (ERR alpha). *Biochem Pharmacol* 2010;80(6):819–826.
- [21] Eichner LJ, Guigeré V. Estrogen related receptors (ERRs): a new dawn in transcriptional control of mitochondrial gene networks. *Mitochondrion* 2011;11(4):544-552.
- [22] Poidatz D, Dos Santos E, Brulé A, Mazancourt D, Diudonné MN. Estrogen-related receptor gamma modulates energy metabolism target genes in human trophoblast. *Placenta* 2012;33(9):688-695.
- [23] Abad M. C., Askari H, O'Neill J, Klinger AL, Milligan C, Lewandowski F, Springer B, Spurlino J, Rentzeperis D. Structural determination of estrogen-related receptor gamma in the presence of phenol derivative compounds. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;108:44-54.

- [24] Mays MB, LeBlanc MM, Paccamonti DL. Route of fetal infection in a model of ascending placentitis. *Theriogenology* 2002;58:791-2.
- [25] Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical veterinary microbiology*. first ed. London: Elsevier; 1993.
- [26] Schlafer DH. Postmortem Examination of the Equine Placenta, Fetus, and Neonate: Methods and Interpretation of Findings. *Proceedings AAEP* 2004;50:18.
- [27] Hong, C. B.; Donahue, J. M.; Giles, RC, et al. Etiology and Pathology of Equine Placentitis. *Journal Veterinary Diagnostic and Investigation* 1993;5:55-63.
- [28] Hartig SM. Basic Image Analysis and Manipulation in ImageJ. *Current Protocols in Molecular Biology* 2013; 14.15:1-12.
- [29] Labno C. *Basic Intensity Quantification with ImageJ. Integrated Light Microscopy Core, University of Chicago*, 2012.
- [30] Saccone G, Schoen C, Franasiak J, Scott Jr RT, Berghella V. Supplementation with progestogens in the first trimester of pregnancy to prevent miscarriage in women with unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Fert Steril* 2016;107:430-8.
- [31] Canisso IF, Ball BA, Erol E, Squires EL, Troedsson MHT. Comprehensive review on equine placentitis. *Proc Am Assoc Equine Pract* 2015;61:490-509.
- [32] Murchie TA, Macpherson ML, LeBlanc M, Luznar S, Vickroy TW. Continuous monitoring of penicillin G and gentamicin in allantoic fluid of pregnant pony mares by in vivo microdialysis. *Equine Vet J* 2006;38:520-5.
- [33] Rebello S, Macpherson M, Murchie T, LeBlanc MM, Vickroy TW. Placental transfer of trimethoprim sulfamethoxazole and pentoxifylline in pony mares. *Anim Reprod Sci* 2006;94:432-433.
- [34] Graczyka J, Macpherson ML, Pozor MA, Troedsson MHT, Eichelberger AC, LeBlanc MM, et al. Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole and pentoxifylline in equine placentitis. *Anim Reprod Sci* 2006;94:434-5.
- [35] Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biology of Reproduction* 2004;71:2-10.
- [36] Sierralta WD, Thole HH. Retrieval of estradiol receptor in paraffin sections of resting porcine uteri by microwave treatment. Immunostaining patterns obtained with different primary antibodies. *Histochemical cell Biology* 1996;105(5):357-63.
- [37] Schuler G, Teichmann U, Taubert A, Failing K, Hoffmann B. Estrogen receptor beta (ERbeta) is expressed differently from ERalpha in bovine placentomes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005;113:107-114.

- [38] Kelly MJ, Levin ER. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metabolism* 2001;12(4):152-6.
- [39] Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Molec Endocrinol* 2005;19(8):1951-9.
- [40] Bukovsky A, Cekanova M, Caudle MR, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC, Elder RF. Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:13.
- [41] Bukovsky A, Caudle MR, Cekanova M, Fernando RI, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC, Elder RF. 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. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:36.
- [42] Younes MA, Besch NF and Besch PK Estradiol and progesterone binding in human term placental cytosol *Am J Obstet Gynecol* 1981, 141:170-174.
- [43] Khan-Dawood FS and Dawood MY Estrogen and progesterone receptor and hormone levels in human myometrium and placenta in term pregnancy *Am J Obstet Gynecol* 1984, 150:501-505.
- [44] Hasegawa T, Sato F, Nambo Y, Ishida N. Expression of steroidogenic enzyme genes in the equine feto-placental unit. *Journal of Equine Science* 2001;12:25.
- [45] Kumar P & Mendelson CR. Estrogen-Related Receptorgamma (ERR $\gamma$ ) Mediates Oxygen-Dependent Induction of Aromatase (CYP19) Gene Expression during Human Trophoblast Differentiation. *Mol Endocrinol* 2011; 25: 1-14.
- [46] Poidatz D, Dos Santos E, Brulé A, De Mazancourt P, Dieudonné MN. Estrogen-related receptor gamma modulates energy metabolism target genes in human trophoblast. *Placenta* 2012; 33: 688-95.

## 5 Considerações Finais

A leptina e seu receptor estão presentes na placenta equina a termo, em regiões de microcotilédones e no epitélio coriônico de porção areolar. A co-localização da leptina e seu receptor confirma a possível ação autócrina e paracrina deste hormônio a nível placentário.

Os achados do presente estudo contribuem para o entendimento de rotas metabólicas placentárias, e na atividade da leptina no terço final de gestação. A identificação da leptina e seu receptor na placenta pós-parto indica que a mesma pode atuar como um possível metabólito auxiliar em quadros de lesões placentárias.

A terapia com cipionato de estradiol resultou em melhor desfecho gestacional, com maiores tempo de gestação e peso neonatal. Além disso, a expressão de receptores hormonais nas éguas com placentite foi consistente com o observado nas éguas controle.

A imunomarcção de receptores hormonais nas éguas com placentite foi consistente com o observado nas éguas controle. As éguas recebendo terapia associada de altrenogest e cipionato de estradiol demonstraram maior presença de receptores de progesterona e estrógeno  $\beta$ , enquanto éguas em terapia com cipionato de estradiol mantiveram a marcação de receptores semelhante as éguas controle, mesmo em quadros de lesão placentária, e incrementaram a expressão de aromatase.

Estes achados sugerem maior atividade intrínseca de diferenciação placentária, inferindo que diferentes terapias hormonais modificam metabolismo placentário, de forma que a terapia com cipionato de estradiol pode ser auxiliar nos metabolismo placentário quando em quadros de lesão.

## Referências

ABAD, M. C.; ASKARI, H.; O'NEILL, J.; KLINGER, A. L.; MILLIGAN, C.; LEWANDOWSKI, F.; SPRINGER, B.; SPURLINO, J.; RENTZEPERIS, D. Structural determination of estrogen-related receptor gamma in the presence of phenol derivative compounds. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 108, p. 44-54, 2008.

ABD-ELNAEIM, M. M.; DERAR, I. R.; WILSHER, S.; ALLEN, W. R.; LEISER, R.; SCHULER, G. Immunohistochemical localization of oestrogen receptors alpha and beta, progesterone receptor and aromatase in the equine placenta. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 312-319, 2008.

AINSWORTH, L.; RYAN, K. J. Steroid hormone transformation by the endocrine organs from pregnant mammals. I. Estrogen biosynthesis by mammalian placental preparations *in vitro*. **Endocrinology**, v. 79, p. 875-883, 1966.

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

AMATO, C.; MARTIN, L.; DUMON, H.; JAILLARDON, L.; NGUYEN, P.; SILIART, B. Variations in plasma leptin in show horses during a work season. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (berl)**, v. 96, p. 850-859, 2012.

ASHWORTH, C. J.; HOGGARD, N.; THOMAS, L.; MERCER, J. G.; WALLACE, J. M.; LEA, R. G. Placental leptin. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 18-24, 2000.

BAILEY, C. S.; MACPHERSON, M. L.; POZOR, M. A.; TROEDSSON, M. H.; BENSON, S.; GIGUERE, S.; SANCHEZ, L. C.; LE BLANC, M. M.; VICKROY, T. W. Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole, pentoxifylline and altrenogest in experimentally induced equine placentitis. **Theriogenology**, v. 74, n. 3, p. 402-412, 2010.

BALOGH, O.; STAUB, L. P.; GRAM, A.; BOOS, A.; KOWALEWSKI, M. P.; REICHLER, I. M. Leptin in the canine uterus and placenta: possible implications in pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, p. 13, 2015.



BARNES, R. J.; NATHANIELSZ, P. W.; ROSSDALE, P. D.; COMLINE, R. S.; SILVER, M. Plasma progestagens and oestrogens in fetus and mother in late pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.** v. 23, p. 617-623, 1975.

BAZER, F. W.; FIRST, N. L. Pregnancy and parturition. **Journal of Animal Science**, v. 57(Suppl 2), p. 425-458, 1983.

BERG, E. L.; MCNAMARA, D. L.; KEISLER, D. H. Endocrine profiles of periparturient mares and their foals. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1660-1668, 2007.

BODNER, J.; EBENBICHLER, C. F.; WOLF, H. J.; MULLER-HOLZNER, E.; STANZL, U.; GANDER, R.; HUTER, O.; PATSCH, J. R. Leptin receptor in human term placenta: in situ hybridization and immunohistochemical localization. **Placenta**, v. 20, p. 677-682, 1999.

BOHLENDER, J.; RAUH, M.; ZENK, J.; GROSCHL, M. Differential distribution and expression of leptin and the functional leptin receptor in major salivary glands of humans. **The Journal of Endocrinology**, v. 178, p. 217-223, 2003.

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER, F.; STOLLA, R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 57, p. 2043-2051, 2002.

BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; WOSCHEE, I.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine and umbilical blood flow during pregnancy in mares. **Theriogenology**, v. 61, p. 499-509, 2004.

BUCCA, S. Diagnosis of the compromised equine pregnancy. **Veterinary Clinics - Equine Practice**, v. 22, p.749-761, 2006.

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, n. 36, p. 21, 2003.

BUKOVSKY, A.; CEKANOVA, M.; CAUDLE, M. R.; WIMALASENA, J.; FOSTER, J.S.; HENLEY, D. C.; ELDER, R. F. Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast

differentiation by estradiol. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 13, 2003.

CANISSO, I. F.; BALL, B. A.; EROL, E.; SQUIRES, E. L.; TROEDSSON, M. H. T. Comprehensive review on equine placentitis. **Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, v. 61, p. 490-509, 2015.

CEBULJ-KADUNC, N.; KOSEC, M.; CESTNIK, V. Serum leptin concentrations in Lipizzan fillies. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 1-5, 2009.

CHAVATTE-PALMER, P. C.; MADIA, D. J.; DUCHAMP, G.; WIMEL, L.; CAMOUS, S.; GUILLAUME, D.; et al. Placental expression and neonatal plasma concentrations of leptin in horses and ponies. **Book of Abstracts of the 61st Annual Meeting of the European Association for Animal Production**, v. 1, p. 1, 201, 2010.

CHRISTIANSEN, D. L.; MOULTONA, K.; HOPPER, R. M.; WALTERS, F. K.; COOLEYA, A. J.; LEBLANC, M. M.; RYAN, P. L. Evidenced-based medicine approach to develop efficacious therapies for late-gestation mares presenting with uterine infections using an experimentally-induced placentitis model. **Animal Reproduction Science**, v. 121(Suppl), p. 345-346, 2010.

CRAIG, J.; ZHU, H.; DYCE, P. W.; PETRIK, J.; LI, J. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 5355-5363, 2004.

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.

DALL'AGLIO, C.; POLISCA, A.; BOITI, C.; CECCARELLI, P. Immunolocalization of leptin and its receptor in the placenta of cats. **Acta Histochemica**, v. 114, p. 719-722, 2012.

DALL'AGLIO, C.; MARANESI, M.; PASCUCCI, L.; MERCATI, F.; CECCARELLI, P. Immunohistochemical distribution of leptin receptor in the major salivary glands of horses. **Research of Veterinary Science**, v. 93, p. 1116-1118, 2012.

DALL'AGLIO, C.; MERCATI, F.; PASCUCCI, L.; CECCARELLI, P. Immunolocalization of leptin and its receptor in the pancreas of the horse. **Acta Histochemica**, v.115, p. 757-760, 2013.

DOUGLAS, R. H. Endocrine diagnostics in the broodmare: What you need to know about progestins and estrogens. In: **Proceedings of the Society for Theriogenology**, p. 106-115, 2004.

DUELLMAN, S. J.; CALAOAGAN, J. M.; SATO, B. G.; FINE, R.; KLEBANSKY, B.; CHAO, W.; HOBBS, P.; COLLINS, N.; SAMBUCETTI, L.; LADEROUTE, K. R. A novel steroidal inhibitor of estrogen-related receptor alpha (ERR alpha). **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 6, p. 819–826, 2010.

EICHNER, L. J.; GUIGERÉ, V. Estrogen related receptors (ERRs): a new dawn in transcriptional control of mitochondrial gene networks. **Mitochondrion**, v. 11, n. 4, p. 544-552, 2011.

EL-MAATY, A. M.; GABR, F. I. Relation between leptin and estradiol levels in Egyptian lactating Arab mares during foaling heat. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 1-2, p. 95-98, 2010.

ESTELLER-VICO, A.; TROEDSSON, E. L.; SQUIRES, E. L.; BALL, B. A. Inhibition of estrogen synthesis during the last trimester of gestation: changes in endocrine patterns, fetal growth and uterine artery hemodynamics in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 207, 2014.

FERREIRA-DIAS, C.; CLAUDINO, F.; CARVALHO, H.; AGRICOLA, R.; ALPOIM-MOREIRA, J.; ROBALO SILVA, J. Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, body weight and immune status. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 203-213, 2005.

FITZGERALD, B. P.; MCMANUS, C. J. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. **Biology Reproduction**, v. 63, p. 335-340, 2000.

FRADINHO, M. J.; CORREIA, M. J.; GRACIO, V.; BLIEBERNICHT, M.; FARRIM, A.; MATEUS, L.; MARTIN-ROSSET, W.; BESSA, R. J.; CALDEIRA, R. M.; FERREIRA-DIAS, G. Effects of body condition and leptin on the reproductive performance of Lusitano mares on extensive systems. **Theriogenology**, v. 81, p. 1214-1222, 2014.

GENTRY, L. R.; THOMPSON, JR. D. L.; GENTRY, JR. G. T.; DAVIS, K. A.; GODKE, R. A.; CARTMILL, J. A. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2695-2703, 2002.

GRACZYKA, J.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.A.; TROEDSSON, M.H.T.; EICHELBERGER, A.C.; LEBLANC, M.M.; VICKROY, T. W. Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole and pentoxifylline in equine placentitis. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 434-435, 2006.

GREGORASZCZUK, E. L.; PTAK, A.; WOJCIECHOWICZ, T.; NOWAK, K. Action of IGF-I on expression of the long form of the leptin receptor (ObRb) in the prepubertal period and throughout the estrous cycle in the mature pig ovary. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p. 289–295, 2007.

GUIBOURDENCHE, J.; TARRADE, A.; LAURENDEAU, I.; ROCHETTE-EGLY, C.; CHAMBON, P.; VIDAUD, M.; EVAIN-BRION, D. Retinoids stimulate leptin synthesis and secretion in human syncytiotrophoblast. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, p. 2550-2555, 2000.

HAMON, M.; CLARKE, S. W.; HOUGHTON, E.; FOWDEN, A. L.; SILVER, M.; ROSSDALE, P. D.; OUSEY, J. C.; HEAP, R. B. Production of 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone during late pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44(Suppl), p. 529-535, 1991.

HARTIG, S.M. Basic Image Analysis and Manipulation in ImageJ. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 14-15, p. 1-12, 2013.

HASEGAWA, T.; SATO, F.; NAMBO, Y.; ISHIDA, N. Expression of steroidogenic enzyme genes in the equine fetoplacental unit. **Journal of Equine Science**, v. 12, p. 25-32, 2001.

HEIDLER, B.; PARVIZI, N.; SAUERWEIN, H.; BRUCKMAIER, R. M.; HEINTGES, U.; AURICH, J. E.; AURICH, C. Effects of lactation on metabolic and reproductive hormones in Lipizzaner mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 25, p. 47-59, 2003.

HENSON, M. C.; CASTRACANE, V. D. Leptin in pregnancy: an update. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 218-229, 2006.

HOGGARD, N.; HUNTER, L.; DUNCAN, J. S.; WILLIAMS, L. M.; TRAYHURN, P.; MERCER, J. G. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 11073-11078, 1997.

HOLTAN, D. W.; HOUGHTON, E.; SILVER, M.; FOWDEN, A. L.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D. Plasma progestagens in the mare, fetus and newborn foal. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 44, p. 517-528, 1991.

HOLTAN, D. W.; NETT, T. M.; ESTERGREEN, V. L. Plasma progestins in pregnant, postpartum and cycling mares. **Journal of Animal Science**, v. 40, n. 2, p. 251-260, 1975.

HONG, C. B.; DONAHUE, J. M.; GILES, R. C.; PETRITES-MURPHY, M. B. Jr.; POONACHA, K. B.; ROBERTS, A. W.; SMITH, B. J.; TRAMONTIN, R. R.; TUTTLE, P. A.; SWERCZEK, T. W. Etiology and Pathology of Equine Placentitis. **Journal Veterinary Diagnostic and Investigation**, v. 5, p. 55-63, 1993.

JIN, Y. X.; CUI, X. S.; HAN, Y. J.; KIM, N. H. Leptin accelerates pronuclear formation following intracytoplasmic sperm injection of porcine oocytes: possible role for MAP kinase inactivation. **Animal Reproduction Science**, v. 115, p. 137-148, 2009.

KHAN-DAWOOD, F. S.; DAWOOD, M. Y. Estrogen and progesterone receptor and hormone levels in human myometrium and placenta in term pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 150, p. 501-505, 1984.

KASHMAN, L. H.; HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; STARR, M. D.; LASLEY, B. L. Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal demise in horses. **American Journal of Veterinary Research**, n. 49, p. 184-187, 1988.

KĘDZIERSKI, W.; KAPICA, M. Plasma concentration of leptin and ghrelin in Standard bred foals as related to the age, sex, exercise and training. **Animal**, v. 2, n. 4, p. 582-587, 2008.

KELLY, M. J.; LEVIN, E. R. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.12, n. 4, p. 152-156, 2001.

KIMURA, M.; IRAHARA, M.; YASUI, T.; SAITO, S.; TEZUKA, M.; YAMANO, S.; KAMADA, M.; AONO, T. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, p. 1349-1353, 2002.

KUMAR, P.; MENDELSON, C. R. Estrogen-Related Receptorgamma (ERR $\gamma$ ) Mediates Oxygen-Dependent Induction of Aromatase (CYP19) Gene Expression during Human Trophoblast Differentiation. **Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 1-14, 2011.

LABNO, C. Basic Intensity Quantification with ImageJ. **Integrated Light Microscopy Core**, University of Chicago, v. 1, p. 1-5, 2012.

LANGE CONSIGLIO, A.; ARRIGHI, S.; FIANDANESE, N.; POCAR, P.; ARALLA, M.; BOSI, G. P.; BORROMEO, V.; BERRINI, A.; MEUCCI, A.; DELL'AQUILA, M. E.; CREMONESI, F. Follicular fluid leptin concentrations and expression of leptin and letin receptor in equine ovary and in vitro-matured oocyte with reference to pubertal development and breeds. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, p. 837-846, 2013.

LANGE CONSIGLIO, A.; DELL'AQUILA, M. E.; FIANDANESE, N.; AMBRUOSI, B.; CHO, Y. S.; BOSI, G.; ARRIGHI, S.; LACALANDRA, G. M.; CREMONESI, F. Effects of leptin on in vitro maturation, fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in the horse. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p.11, 2009. vi.: <http://www.rbej.com/content/7/1/113>.

LE BLANC, M. M. Ascending Placentitis in the Mare: An Update. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 45, p. 28-34, 2010.

LE BLANC, M. M.; GIGUERE, S.; BRAUER, K.; PACCAMONTI, D. L.; HOROVY, D. W.; LESTER, G. D.; O'DONNELL, L. J.; SHEERIN, B. R.; PABLO, R.; RODGERSON, D. H. Premature delivery in ascending placentitis is associated with increased expression of placental cytokines and allantoic fluid prostaglandins E-2 and F-2 alpha. **Theriogenology**. v.58, p. 841-844, 2002.

LE BLANC, 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 Veterinary Journal**, Suppl v. 41, p. 8-14, 2012.

LE BLANC, M. M.; MACPHERSON, M.; SHEERIN, P. Ascending Placentitis: What We Know About Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. In: **Proceedings of 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, v.50, p. 2004.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 102, p. 122–134, 1994.

LEVIN, E. R. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 8, p. 1951-1959, 2005.

LOFGREN, M.; HOST, J.; BACKSTROM, T. Effects in vitro of progesterone and two 5 $\alpha$ -reduced progestins, 5 $\alpha$ -pregnan,3,20- dione and 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one, on contracting human myometrium at term. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 71, p. 28–33, 1992.

MACPHERSON, M. L.; BAILEY, C. S. A clinical approach to managing the mare with placentitis. **Theriogenology**, v. 70, p. 435-440, 2008.

MACPHERSON, M.I.; GIGURE, S.; HATZEL, J.N.; POZOR, M.; BENSON, M.; DIAW, M.; SANCHEZ, L. C.; VICKROY, T. W.; TELL, L.; WETZLICH, S.; SIMS, J. Disposition of desfuoylceftiofur acetamide in serum, placental tissue, fetal fluids, and fetal tissues after administration of ceftiofur crystalline free acid (CCFA) to pony mares with placentitis. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 36, p. 59-67, 2013.

MACPHERSON, M. L. Treatment strategies for mares with placentitis. **Theriogenology**, v. 64, p. 528-534, 2005.

MARCHIORI, M. O.; KASINGER, S.; SILVA, K. R.; SOUZA, L. S.; AMARAL, L. A.; NOGUEIRA, C. E. W.; ROLL, V. F. B. Medidas comparativas do padrão morfométrico e perfil energético de éguas Crioulas no terço final da gestação, com diferentes escores corporais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 707-715, 2015.

MARCONI, A. M.; PAOLINI, C. L.; STRAMARE, L.; CETIN, I.; FENNESSEY, P. V.; PARDI, G.; BATTAGLIA, F. Steady state maternal-fetal leucine enrichments in normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. **Pediatric Research**, v. 46, p.14-119, 1999.

MAYS, M. B.; LEBLANC, M. M.; PACCAMONTI, D. L. Route of fetal infection in a model of ascending placentitis. **Theriogenology**, v. 58, p. 791-792, 2002.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; GRUBAUGH, W. Comparison of progesterone and progesterone + oestrogen on total and specific uterine proteins in pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supp. 35, p. 335-342, 1987.

MCGLOTHLIN, J. A.; LESTER, G. D.; HANSEN, P. J.; THOMAS, M.; PABLO, L.; HAWKINS, D. L.; LEBLANC, M. M. Alteration in uterine contractility in mares with experimentally induced placentitis. **Reproduction**, v. 127, p. 57-66, 2004.

MCKINNON, A. O. Maintenance of pregnancy. In: Annual Resort Symposium of the American association of equine practitioners, 2009, Gold Coast. **Proceeding AAEP**, Gold Coast: [AAFP], v. 10, p. 81-117, 2009.

MEIS, P. J., KLEBANOFF, M.; THOM, E.; DOMBROWSKI, M. P.; SIBAI, B.; A. H. MOAWAD, A. H.; SPONG, C. Y.; HAUTH, J. C.; MIODOVNIK, M.; VARNER, M. W.; LEVENO, K. J.; CARITIS, S. N.; IAMS, J. D.; WAPNER, R. J.; CONWAY, D.; O'SULLIVAN, M. J.; CARPENTER, M.; MERCER, B.; RAMIN, S. M.; THORP, J. M.; PEACEMAN, A. M.; GABBE, S. Prevention of recurrent preterm delivery by 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 24, p. 2379-2385, 2003.

MOREIRA, F.; CORCINI C. D.; MONDADORI, R. G.; GEVERH-FERNANDES, C.; MENDES, F. F.; ARAÚJO, E. G.; LUCIA, T Jr. Leptin and mitogen-activated protein kinase (MAPK) in oocytes of sows and gilts. **Animal Reproduction Science**, v. 139, p. 89-94, 2013.

MOREIRA, F.; GHELLER, S. M.; MONDADORI, R. G.; VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; LUCIA, T. JR. Presence of leptin and its receptor in the hypothalamus, uterus and ovaries of Swine females culled with distinct ovarian statuses and parities. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 6, p. 1074-1078, 2014.

MURCHIE, T. A.; MACPHERSON, M. L.; LEBLANC, M. M.; LUZNAR, S.; VICKROY, T. W. Continuous monitoring of penicillin G and gentamicin in allantoic fluid of pregnant pony mares by in vivo microdialysis. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, p. 520-525, 2006.

OUSEY, J. C. Hormone profiles and treatments in the late pregnant mare. **Veterinary Clinics of North American Equine Practice**, v. 22, p. 727-747, 2006.

OUSEY, J. C.; HOUGHTON, E.; GRAINGER, L.; ROSSDALE, P. D.; FOWDEN, A. L. Progestagen profiles during the last trimester of gestation in Thoroughbred mares with normal or compromised pregnancies. **Theriogenology**, v. 63, p. 1844-1856, 2005.

PASHEN, R. L. Maternal and foetal endocrinology during late pregnancy and parturition in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, p. 233-238, 1984.



PASHEN, R. L.; ALLEN, W. R. The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 499-509, 1979.

POIDATZ, D.; DOS SANTOS, E.; BRULÉ, A.; DE MAZANCOURT, P.; DIEUDONNÉ, M. N. Estrogen-related receptor gamma modulates energy metabolism target genes in human trophoblast. **Placenta**, v. 33, n. 9, p. 688-695, 2012.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. Clinical veterinary microbiology. 1 ed. London: Elsevier; 1993, 920p.

REBELLO, S. A.; MACPHERSON, M. L.; MURCHIE, T. A.; LEBLANC, M. M.; VICKROY, T.W. Placental transfer of trimethoprim sulfamethoxazole and pentoxifylline in pony mares. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p.432-433, 2006.

ROSSDALE, P. D.; OUSEY, J. C.; COTTRILL, C. M.; CHAVATTE, P.; ALLEN, W. R.; MCGLADDEN, A. J. Effects of placental pathology on maternal plasma progesterone and mammary secretion calcium concentrations and on neonatal adrenocortical function in the horse. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl v. 44, p. 579-90, 1991.

SACCONE, G.; SCHOEN, C.; FRANASIAK, J.; SCOTT, J. R.; R.T.; BERGHELLA, V. Supplementation with progesterone in the first trimester of pregnancy to prevent miscarriage in women with unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. **Fertility and Sterility**, v. 107, p. 430-438, 2016.

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

SCHOLTZ, E. L.; KRISHNAN, S.; BALL, B. A.; CORBIN, C. J.; MOELLER, B. C.; STANLEY, S. D.; MCDOWELL K. J.; HUGHES, A. L.; MCDONNELL, D. P.; CONLEY, A. J. Pregnancy without progesterone in horses defines a second endogenous biopotent progesterone receptor agonist, 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 9, p. 3365-3370, 2014.

SCHULER, G.; TEICHMANN, U.; TAUBERT, A.; FAILING, K.; HOFFMANN, B. Estrogen receptor beta (ERbeta) is expressed differently from ERalpha in bovine

placentomes. **Experimental and Clinical Endocrinology Diabetes**, v. 113, p. 107–114, 2005.

SENARIS, R.; GARCIA-CABALLERO, T.; CASABIELL, X.; GALLEGO, R.; CASTRO, R.; CONSIDINE, R. V.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F. F. Synthesis of leptin in human placenta. **Endocrinology**, v. 138, p. 4501-4504, 1997.

SHORT, R. V. Progesterone in blood: IV. Progesterone in the blood of mares. **J Endocrinology**, v. 19, p. 207-210, 1959.

SIERRALTA, W. D.; THOLE, H. H. Retrieval of estradiol receptor in paraffin sections of resting porcine uteri by microwave treatment. Immunostaining patterns obtained with different primary antibodies. **Histochemical Cell Biology**, v. 105, n. 5, p. 357-363, 1996.

SIVAN, E.; WHITTAKER, P. G.; SINHA, D.; HOMKO, C. J.; LIN, M.; REECE, E. A.; BODEN, G. Leptin in human pregnancy: the relationship with gestational hormones. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 179, p. 1128-32, 1998.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 2-10, 2004.

STATISTIX. Statistix® 10 Analytical Software. Tallahassee. FL, USA, 2013.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Oestrogens and pregnancy maintenance in the mare: For or against? **Pferdeheilkunde**, v. 17, n. 6, p. 579-582, 2001.

TROEDSSON, M. H. T. High risk pregnant mare. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 49, (suppl 1) S9, 2007.

TROEDSSON, M. H. T.; ZENT, W. W. Clinical ultrasonographic evaluation of the equine placenta as a method to successfully identify and treat mares with placentitis. In: **Proceedings Workshop on the Equine Placenta**, v.1, p. 66-67, 2004.

YOUNES, M. A.; BESCH, N. F.; BESCH, P. K. Estradiol and progesterone binding in human term placental cytosol. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 141, p. 170-174, 1981.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425-432, 1994.

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.

## **Anexos**



Pelotas, 06 de Janeiro de 2014

**De:** Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)*

**Para:** Professor Carlos Eduardo Wayne Nogueira

*Faculdade de Veterinária*

Senhor Professor:

A *CEEA* analisou o projeto intitulado: “**Avaliação do efeito da hormonioterapia em éguas com placentite através da identificação de receptores na placenta e grau de perfusão sanguínea uterina e sua relação com a viabilidade do neonato**”, processo nº23110.003891/2013-37, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à *CEEA*.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 3891**).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva**

*Presidente da CEEA*

Ciente em: 7/1/2014

Assinatura do Professor Responsável: