

IMUNOMARCAÇÃO DE RECEPTORES DA ENZIMA AROMATASE EM OVÁRIOS FETAIS EQUINOS

MORGANA ALVES BORGES¹; LETÍCIA FISS²; GABRIELA CASTRO DA SILVA³;
CARINE DAHL CORCINI⁴; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR⁵; BRUNA DA
ROSA CURCIO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – *ab.morgana@hotmail.com*

²Universidade Federal de Pelotas – *tici.fiss@gmail.com*

³Universidade Federal de Pelotas – *gabicastrovini@gmail.com*

⁴Universidade Federal de Pelotas – *corcinicd@gmail.com*

⁵Universidade Federal do Rio Grande – *varelajras@gmail.com*

⁶Universidade Federal de Pelotas – *curciobruna@hotmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A formação normal dos ovários durante a vida fetal é fundamental para assegurar a alta qualidade dos oócitos na vida adulta de uma fêmea (DE BOO & HARDING, 2006). No entanto, alterações nas etapas iniciais de diferenciação e formação do ovário fetal são potenciais contribuintes para o desenvolvimento de doenças e infertilidade (DE BOO & HARDING, 2006). Visto que no decorrer do processo da foliculogênese, há regulação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento folicular e oocitário através da ação de hormônios e fatores de crescimento (MAGALHÃES et al., 2012).

Uma alternativa promissora como potencial marcador da capacidade reprodutiva, pode ser a enzima aromatase. Além de ser altamente conservada em mamíferos (TURNER et al., 2002), esta enzima pertence ao grupo de enzimas do citocromo P450 e catalisa o processo da aromatização de andrógenos em estrógenos (SIMPSON et al., 2002). Uma vez que a função ovariana depende da síntese de estradiol, e este é expresso nos ovários, particularmente pelas células da granulosa (SIMPSON et al., 2002; BOON et al., 2010).

Desta forma, os estudos sobre a foliculogênese e a oogênese são cruciais para aprimorar e potencializar as biotécnicas reprodutivas na espécie equina. Dada a importância da aromatase como responsável pela síntese de estrogênios, o objetivo deste estudo é ampliar o entendimento sobre a foliculogênese e o perfil de expressão da aromatase em ovários fetais equinos.

2. METODOLOGIA

As amostras fetais utilizadas neste estudo foram provenientes de um abatedouro especializado em equinos, localizado no município de São Gabriel – RS, à 315 km da Universidade Federal de Pelotas. Após a coleta realizou-se medições da distância cefalococcígea (CR), espaço intercostal, perímetro torácico (na região das cruzes) e dos diâmetros de órbita, crânio e tórax (região da segunda costela). A determinação do tempo de desenvolvimento gestacional (DG) foi realizada de acordo com a descrição de NAVES et al (2008), pela utilização da fórmula de regressão $DG = 22,623 + 4,2528 CR - 0,0124 CR^2$ ($r^2 = 0,98$). Em seguida, os indivíduos foram agrupados em primeiro terço de gestação (50-120 dias), segundo terço de gestação (120- 210 dias) e terceiro terço de gestação (210- 300 dias).

Ambos os ovários fetais foram coletados e acondicionados em formol a 10% para posterior processamento histológico clássico e técnica de imunofluorescência. Os ovários foram seccionados em espessura de 5 µm, em micrótomo automático e distendido em lâminas impregnadas com trietoxi-

organosilano a 3% (Sigma®, USA). Para a realização da técnica de imunofluorescência foram utilizados anticorpos primários policlonais anti-receptor de aromatase. Finalmente, as lâminas foram montadas com lamínulas e Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich®,USA). A observação e a captura de imagens foram realizadas em microscópio confocal invertido de varredura a Laser, Leica, TCS SP8. A leitura das secções foi baseada na intensidade de marcação fluorescente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da fluorescência emitida pelos anticorpos, pôde-se verificar a distribuição do receptor da aromatase no tecido ovariano fetal equino. O receptor da aromatase estava presente ao redor dos folículos e estroma durante todo o período gestacional, porém sua quantificação variou em média de 56-88%. Os resultados sugerem uma baixa produção da enzima aromatase nos dois primeiros terços gestacionais, uma vez que pouca imunomarcagem para seus receptores foi registrada com este protocolo de imunofluorescência. Estudos indicam que a expressão da aromatase em ovários fetais de murinos e ovinos é extremamente baixa, porém, é limitado o conhecimento sobre o papel regulatório que esta enzima exerce no desenvolvimento ovariano mesmo com estes índices de expressão basais (GEORGE; OJEDA, 1987; VIGIER et al., 1989), principalmente na espécie equina. Contudo, estima-se que a falta de síntese desta enzima pode ser compensada pelos estrogênios maternos.

No entanto, no terceiro terço gestacional com a aproximação do momento do parto, a aromatase já tem sua atividade iniciada estando o ovário fisiologicamente ativo ao nascimento. Conforme descrito na literatura, a medula ovariana é formada por células de característica esteroideogênica produtoras de estrógenos, formados a partir da aromatização da testosterona pela ação da aromatase (VERMA; KRISHNA, 2017; MŁODAWSKA et al., 2018). E estes dados corroboram com nossos resultados, que demonstram uma acentuada imunomarcagem da enzima aromatase no terço final da gestação, o que pode indicar um aumento na produção de estradiol pelas células do ovário já completamente formado.

4. CONCLUSÕES

Pôde-se concluir que o receptor da enzima aromatase está presente durante todo o desenvolvimento do ovário fetal equino, principalmente ao redor dos folículos e estroma ovariano, com expressão acentuada no terço final da gestação. Em síntese, novos estudos serão realizados através de protocolos de imunofluorescência inovadores com o intuito de ampliar o conhecimento sobre estes preditores da capacidade reprodutiva e aprimorar as principais biotécnicas reprodutivas utilizadas na espécie equina.

Agradecimentos – À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado que me foi concedida, e às agências de fomento CNPq e FAPERGS pelo financiamento de bolsas e recursos aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da UFPEl.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOON, Wah Chin; CHOW, Jenny DY; SIMPSON, Evan R. The multiple roles of estrogens and the enzyme aromatase. In: Progress in brain research. **Elsevier**, 2010. p. 209-232.

DE BOO, Hendrina A.; HARDING, Jane E. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 46, n. 1, p. 4-14, 2006.

GEORGE, Fredrick W.; OJEDA, Sergio R. Vasoactive intestinal peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 16, p. 5803-5807, 1987.

MAGALHÃES, D. M. et al. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses in vivo e in vitro. **R. bras. Reprod. Anim.**, p. 32-38, 2012.

MŁODAWSKA, Wiesława et al. Intrafollicular level of steroid hormones and the expression of androgen receptor in the equine ovary at puberty. **Theriogenology**, v. 121, p. 13-20, 2018.

NAVES, Christiana Savastano et al. Desenvolvimento morfológico dos ovários em fetos eqüinos sem raça definida. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 416-422, 2008.

SIMPSON, Evan R. et al. Aromatase—a brief overview. **Annual review of physiology**, v. 64, n. 1, p. 93-127, 2002.

TURNER, K. J. et al. Development and validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase. **Journal of Endocrinology**, v. 172, n. 1, p. 21-30, 2002.

VERMA, Rachna; KRISHNA, Amitabh. Effect of Letrozole, a selective aromatase inhibitor, on testicular activities in adult mice: both in vivo and in vitro study. **General and comparative endocrinology**, v. 241, p. 57-68, 2017.

VIGIER, Brigitte et al. Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 10, p. 3684-3688, 1989.