“Imunolocalização e expressão gênica de receptores hormonais na sínfise púbica de camundongos primíparos e multíparos senescentes na prenhez e no pós-parto”

Palavras-chave: Sínfise púbica, multiparidade, disfunções de assoalho pélvico, progesterona, estrogênio, relaxina.

Rafaela Ferraz Teixeira – IB – UNICAMP; Lizandra Maia de Souza – IB – UNICAMP; Fernanda Silva de Oliveira – IB - UNICAMP

Prof. Dr. Sílvio Roberto Consonni, (orientador) - IB - UNICAMP

INTRODUÇÃO

Durante o ciclo reprodutivo feminino, diversos fatores fisiológicos e mecânicos, como idade, gestação, paridade e envelhecimento, contribuem para modificações estruturais nos órgãos pélvicos. A sínfise púbica, articulação que conecta os ossos do quadril anteriormente, desempenha um papel crucial na sustentação e proteção dos órgãos pélvicos, especialmente durante a gestação e o parto. Nesse contexto, hormônios sexuais como estrogênio, progesterona e relaxina atuam diretamente na modulação dos tecidos da sínfise púbica, promovendo sua expansão, flexibilidade e posterior retorno à condição pré-gestacional. Alterações nos níveis hormonais ou falhas na resposta tecidual a esses hormônios podem comprometer a integridade dessa região, predispondo a mulher ao desenvolvimento de disfunções do assoalho pélvico (DAP), como o prolapso de órgãos pélvicos, a incontinência urinária e fecal, e o parto pré-termo. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares que governam essas alterações ainda são pouco compreendidos. Diante das limitações dos estudos em humanos, especialmente por questões éticas e de acesso a tecidos, o uso de modelos animais torna-se essencial para investigar a dinâmica hormonal a dinâmica hormonal e estrutural da sínfise púbica, contribuindo para o avanço no entendimento das DAP e possibilitando a identificação de possíveis alvos terapêuticos para prevenção e tratamento dessas condições.

OBJETIVOS DA PESQUISA

Objetivo geral: Avaliar e caracterizar a morfologia da sínfise púbica e o perfil dos receptores hormonais na sínfise púbica de camundongos C57BL/6J primíparos e multíparos senescentes nos 12º e 18º dias de prenhez e no 3º e 21º dia pós-parto.

Objetivos específicos:

- Caracterizar morfologicamente as células e os tecidos presentes na sínfise púbica desses grupos experimentais, por microscopia de luz.
- Avaliar a expressão espaço-temporal dos receptores ER-α, ER-β, PR-A, PR-B e LGR7, por imuno-histoquímica, na sínfise púbica desses grupos experimentais.
- Identificar e analisar a expressão gênica de ER-α, ER-β, PR-A, PR-B e LGR7 por meio da técnica de qPCR na sínfise púbica dos grupos experimentais.

MÉTODOS DA PESQUISA

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J foram divididos em dois grupos experimentais: primíparas (fêmeas jovens que passaram pela primeira gestação) e multíparas senescentes (fêmeas com histórico reprodutivo de, no mínimo, cinco partos). Os animais foram acasalados, e a sínfise púbica foi coletada em quatro momentos distintos: nos dias 12 e 18 de gestação (D12, D18) e nos dias 3 e 21 do pós-parto (3dpp, 21dpp), permitindo avaliar as fases de remodelação ativa e recuperação tecidual. As amostras foram submetidas a diferentes técnicas analíticas: análise morfológica com cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina (HE), tricrômico de Masson (TM) e Sirius Red, visando à identificação de tipos celulares, organização da matriz extracelular e deposição de colágeno.

Para investigação da expressão de receptores hormonais, realizou-se imuno-histoquímica com cromógeno DAB, utilizando anticorpos específicos para ER-β, PR e LGR7. Além disso, fragmentos dos tecidos interpúbicos foram congelados em nitrogênio líquido e utilizados para análise da expressão gênica relativa por qPCR, com foco nos genes ESRRA (ER-α) e LGR7 (RXFP1). A análise estatística dos dados de qPCR foi realizada com teste Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas fêmeas primíparas em estágio de 12 dias de gestação, identificamos fibrocondrócitos na matriz fibrocartilaginosa (Figuras 1A e 1B, 3A e 3B), situados na porção central da sínfise púbica. Esses fibrocondrócitos aparecem agrupados em conjuntos isógenos, representando grupos de células que se dividiram recentemente. Além disso, uma camada basofílica de cartilagem hialina reveste os ossos púbicos (OP) de ambos os lados da fibrocartilagem (Figura 1B).

No 18º dia de prenhez, ou seja, ao final da gravidez, alterações na basofilia da matriz extracelular da cartilagem hialina e o desenvolvimento da entese fibrocartilaginosa possibilitam a distinção de uma região próxima ao osso e uma mais distante. A região adjacente ao osso púbico contém células arredondadas e próximas entre si, com cromatina mais frouxa (Figura 2D). Na área distal ao osso, que conecta a região adjacente ao ligamento interpúbico, predominam células alongadas e uma quantidade maior de matriz extracelular (MEC). É notável que essas células não se orientam paralelamente à abertura da articulação interpúbica, diferentemente das células do ligamento interpúbico (LI) (Figura 3D). Nessa fase (D18), a matriz extracelular exibe uma transição gradativa na organização das fibras de colágeno entre a área próxima ao osso púbico e o ligamento, com a presença de crimps (Figura 2C).

Durante o período pós-parto, observamos que a reabsorção do ligamento interpúbico nas fêmeas primíparas ocorre em 3dpp (Figura 4F). A região próxima ao osso contém menos MEC e várias células alongadas orientadas perpendicularmente à abertura articular. Tal como em D18, a matriz extracelular em 3dpp apresenta uma organização gradativa das fibras de colágeno entre as regiões óssea e do ligamento interpúbico (Figura 1F).

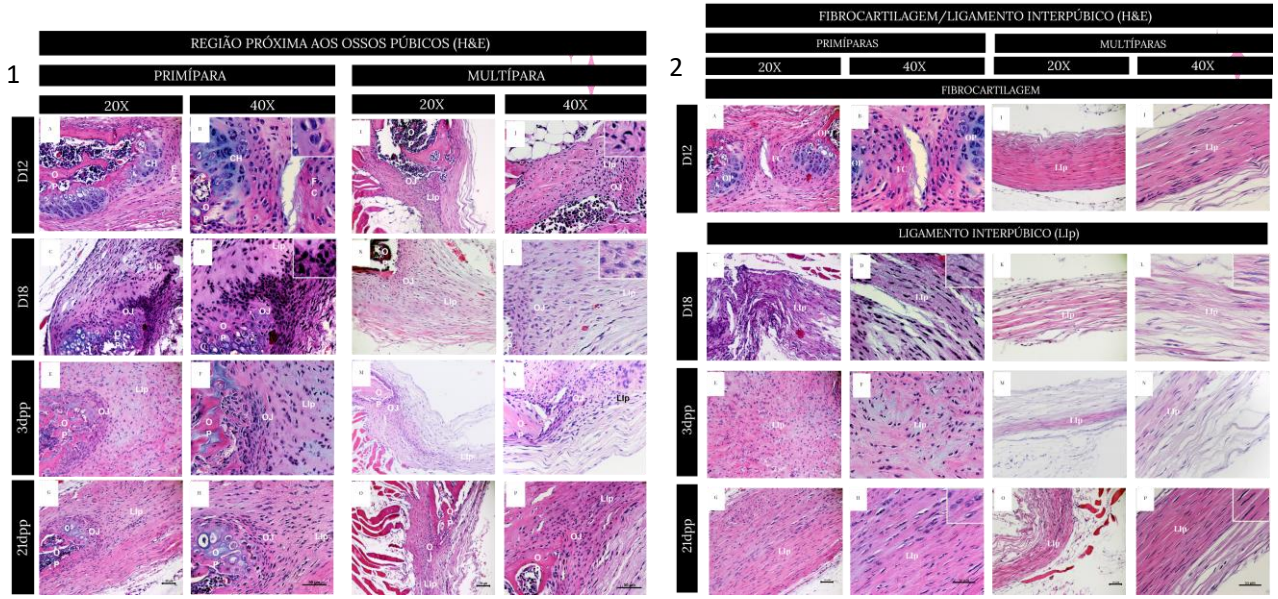


Figura 1 e 2. Fotomicrografias representativas da secção longitudinal da sínfise púbica, na região próxima aos ossos pubianos e do ligamento interpúbico, de camundongos primíparas e multíparas em D0, D18, 3DPP e 21DPP coradas com Hematoxilina e Eosina na objetiva de 20x (A, C, E, G, I, K, M e O) e de 40x (B, D, F, H, J, L, N e P). FC = fibrocartilagem; OP = ossos púbicos; LIp = ligamento interpúbico; OJ = junção osteoligamentosa; CH = cartilagem hialina. Barra de escala G, O, H e P = 50 µm.

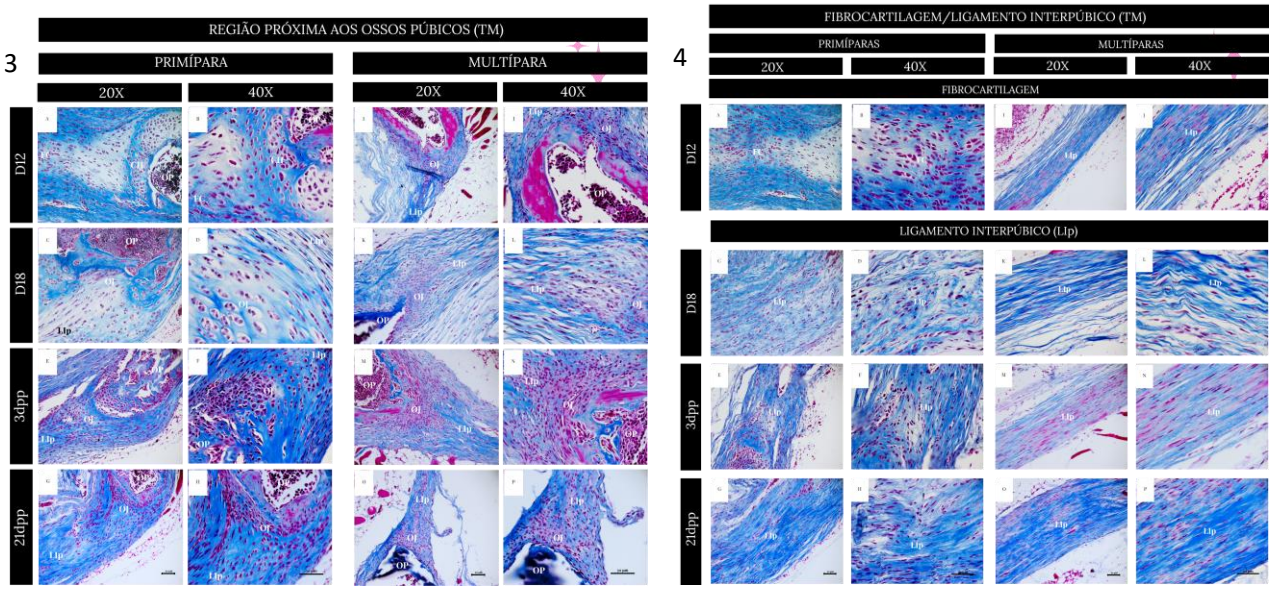


Figura 3 e 4. Fotomicrografias representativas da secção longitudinal da sínfise púbica, na região próxima aos ossos pubianos e do ligamento interpúbico, de camundongos primíparas e multíparas em D0, D18, 3DPP e 21DPP coradas com Tricrômico de Masson na objetiva de 20x (A, C, E, G, I, K, M e O) e de 40x (B, D, F, H, J, L, N e P). FC = fibrocartilagem; OP = ossos púbicos; LIp = ligamento interpúbico; OJ = junção osteoligamentosa; CH = cartilagem hialina. Barra de escala G, O, H e P = 50 µm.

Em 21dpp, há uma grande reabsorção do LI, restabelecendo a arquitetura tecidual nas fêmeas primíparas (Figuras 1G e 3G), promovendo o desenvolvimento de tecidos que lembram tanto a cartilagem hialina quanto a fibrocartilagem, como observado em D12. Por outro lado, nas fêmeas senescentes multíparas em D12, as características da sínfise púbica, após múltiplas gestações, diferem das fêmeas primíparas. A entese pubiana (região próxima ao osso) permanece ligada ao LI após sucessivas gestações (Figura 1I). Próximo ao OP, observam-se células com citoplasma rico em projeções celulares, imersas em fibras de colágeno altamente densas (Figuras 1J e 3J). No estágio D18, as células são alongadas e ficam imersas na matriz fibrilar (Figuras 1L e 3L). Após o parto, na região óssea de camundongos multíparas, predominam células fusiformes com cromatina frouxa em 3dpp (Figuras 1N e 3N). Nos camundongos fêmeas multíparas, observa-se uma restauração incompleta do tecido cartilaginoso após o sexto parto, especialmente ao analisar o período de 21dpp. A entese sinfisiana é composta por uma variedade de células com citoplasma abundante ou reduzido, envoltas em fibras de colágeno densamente dispostas (Figura 2O).

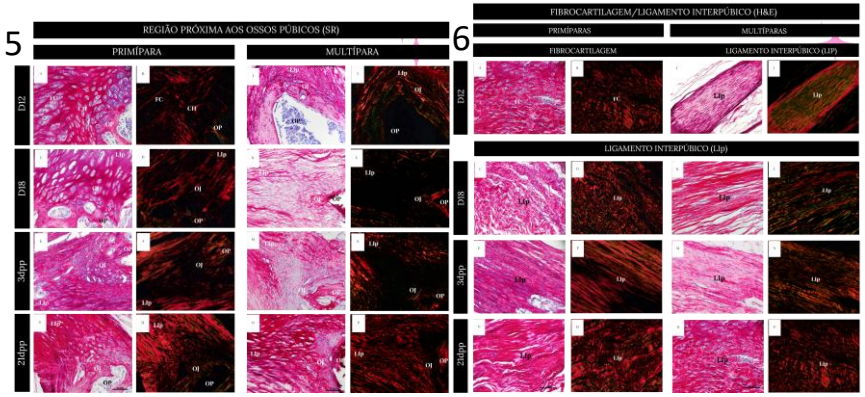
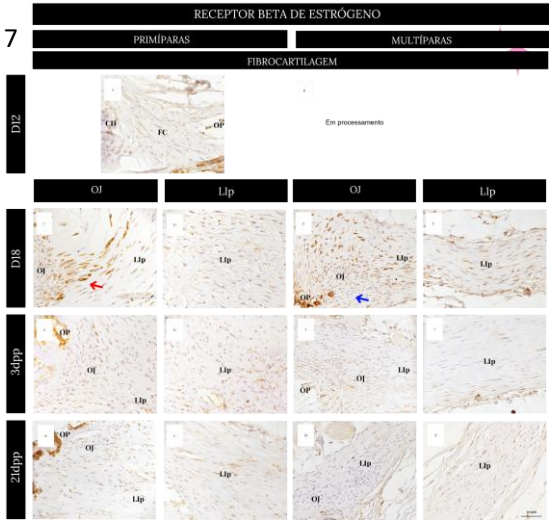


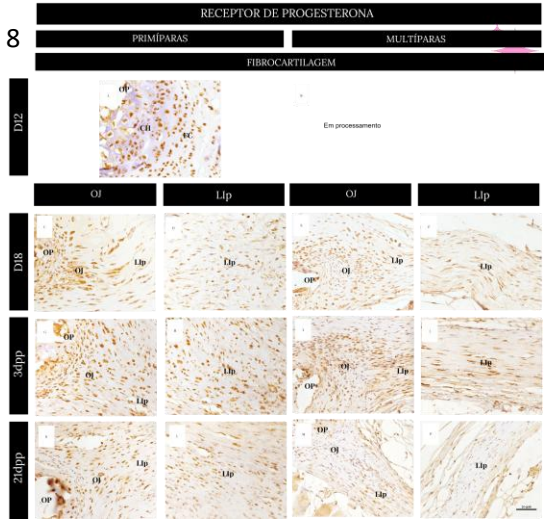
Figura 5 e 6. Fotomicrografias representativas da secção longitudinal da sínfise púbica, na região próxima aos ossos pubianos e do ligamento, de camundongos primíparas e multíparas em D0, D18, 3DPP e 21DPP coradas com Sirius Red na objetiva de 40x. FC = fibrocartilagem; OP = ossos púbicos; LIp = ligamento interpúbico; OJ = junção osteoligamentosa; CH = cartilagem hialina. Barra de escala G e O = 50 µm.

Quanto à imuno-histoquímica, No que diz respeito ao receptor de estrogênio beta (**ER-β**) (Figura 7), observou-se imunomarcação predominantemente nuclear ao longo dos diferentes momentos analisados. Em D12, os condrócitos das primíparas apresentaram marcação fraca, restrita a algumas células, enquanto nas multíparas a expressão foi mínima ou ausente (Figura 7). Em D18, a marcação tornou-se bastante evidente no LIp de ambos os grupos, embora com padrões distintos: nas primíparas, a imunopositividade distribuiu-se de forma central no ligamento (indicada pela seta vermelha), enquanto nas multíparas a marcação concentrou-se de forma periférica (seta azul), sugerindo diferenças na organização e atividade celular entre os grupos (Figura 7C e 7E) . Em 3dpp, houve redução da expressão nos dois grupos, com marcação ainda observada em fibroblastos e condrócitos periféricos, sendo mais evidente nas multíparas. Já em 21dpp, a expressão apresentou-se bastante reduzida em ambos os grupos, mas algumas células do LIp ainda exibiam imunomarcação detectável.

Para o receptor de progesterona (**PR**) (Figura 8), cuja expressão também se deu majoritariamente no núcleo das células, foi possível observar imuno-positividade nos condrócitos já em D12, com intensidade moderada em ambos os grupos. Em D18, o padrão manteve-se relativamente estável, com leve tendência à redução da expressão à medida que o parto se aproximava. Em 3dpp, contudo, notou-se um aumento na expressão de PR nas primíparas, com marcação forte nos fibroblastos do ligamento interpúbico, sugerindo possível envolvimento na reorganização tecidual pós-parto. Nas multíparas, a expressão manteve-se semelhante à observada em D18, sem elevação significativa. Em 21dpp, a imunomarcação foi reduzida em ambos os grupos, mas ainda era possível identificar células fusiformes positivas, indicando uma possível manutenção de atividade residual do receptor nesse período.

No caso do receptor de relaxina (**RXFP1**) (Figura 9), cuja marcação apresentou padrão cito-membranar, condizente com sua classificação como receptor acoplado à proteína G, a expressão foi inicialmente moderada em D12 em ambos os grupos. Em D18, observou-se uma expressão mais intensa nos condrócitos periféricos e no LIp. Nas primíparas, essa marcação apresentou padrão homogêneo ao longo do tecido (seta amarela), enquanto nas multíparas concentrou-se de forma periférica (seta roxa), semelhante ao observado para o ER-β, o que pode indicar um padrão funcional semelhante ou complementar (Figuras 9C e 9E). Em 3dpp, nas primíparas, a expressão manteve-se intensa e com distribuição difusa ao longo do ligamento, indicando alta atividade do receptor nesse período. Já nas multíparas, a intensidade da marcação foi levemente reduzida. Em 21dpp, a expressão foi reduzida nos dois grupos, mas ainda claramente identificável nas multíparas, sugerindo que essas mantêm maior atividade do receptor em fases mais tardias do puerpério.





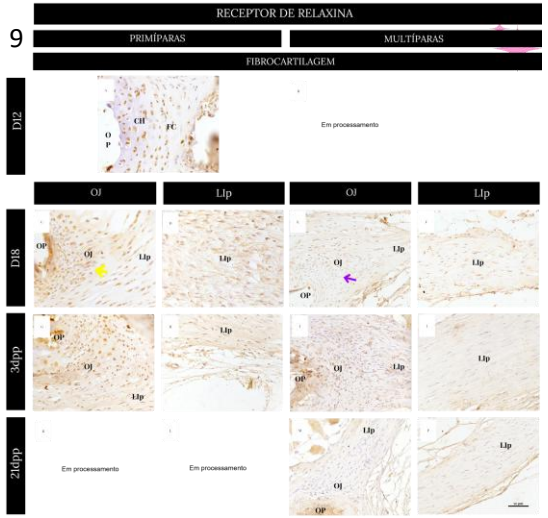


Figura 7, 8 e 9. Fotomicrografias representativas da localização celular do receptor beta de estrógeno, receptor de progesterona e receptor de relaxina em secção de sínfise púbica de camundongos primíparas e multíparas em D12, D18, 3dpp e 21dpp na objetiva de 40x. Barra de escala R = 50 µm. Imuno-histoquímica com revelação por DAB e contra-coloração por Hematoxilina de Harrys. FC = fibrocartilagem; OP = ossos púbicos; LIp = ligamento interpúbico; OJ = junção osteoligamentosa; CH = cartilagem hialina.

Já os dados de qPCR demonstraram que, nas fêmeas primíparas, os níveis de ESRRA foram significativamente menores em D15, D18 e 3dpp em comparação ao D12, com uma discreta elevação em 21dpp, embora ainda abaixo do valor inicial (Figura 10). Os testes estatísticos demonstraram diferenças significativas entre D12 e os demais dias de estudo.

Em multíparas, a expressão foi globalmente mais baixa, sem aumento expressivo em 21dpp. A comparação entre grupos mostrou que primíparas expressam mais ESRRA em D12 e 21dpp, comparando com multíparas, indicando regulação mais ativa da via estrogênica nestes períodos. Quanto ao gene do receptor RXFP1, em primíparas, observou-se aumento significativo da expressão em 3dpp e manutenção dos níveis elevados em 21dpp, em comparação ao D12 (Figura 11). Em multíparas, a expressão desse gene foi relativamente constante entre D12 e D18, mas apresentou redução significativa em 3dpp e permaneceu diminuída em 21dpp, quando comparadas ao D12 do mesmo grupo. As diferenças entre primíparas e multíparas foram significativas no 3dpp e 21dpp, evidenciando papel mais ativo da relaxina na primeira .

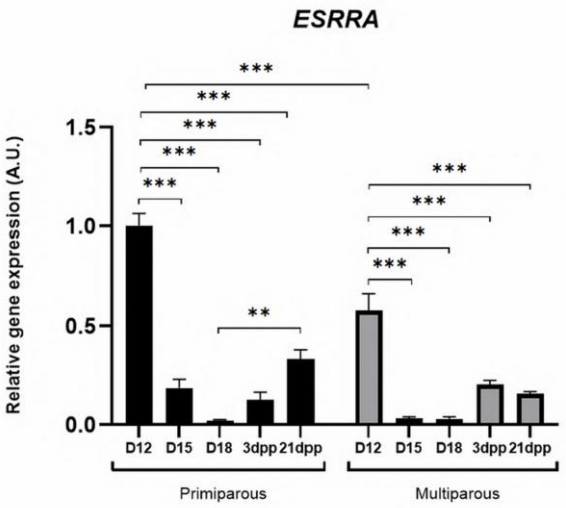


Figura 10. Expressão relativa do gene ESRRA na sínfise púbica de camundongos primíparas e multíparas nos dias 12 (D12), 15 (D15) e 18 (D18) de prenhez, e no 3 (3dpp) e 21 (21dpp) dias pós-parto. Os dados estão expressos em unidades arbitrárias (A.U.), representando a média ± erro padrão. Diferenças estatísticas entre os grupos foram indicadas por p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), e p < 0,001 (***)

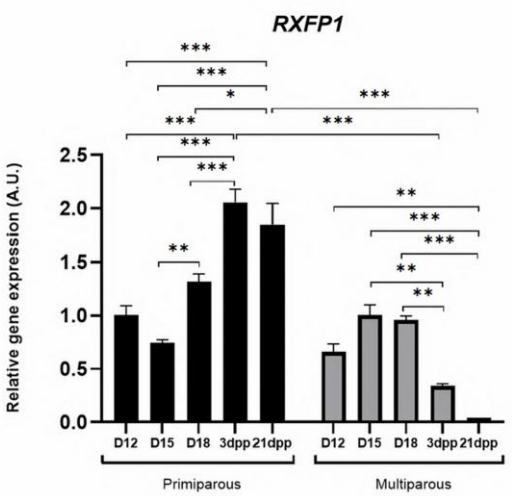


Figura 11. Expressão relativa do gene RXFP1 na sínfise púbica de camundongos primíparas e multíparas nos dias 12 (D12), 15 (D15) e 18 (D18) de prenhez, e no 3 (3dpp) e 21 (21dpp) dias pós-parto. Os dados estão expressos em unidades arbitrárias (A.U.), representando a média ± erro padrão. Diferenças estatísticas entre os grupos foram indicadas por p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), e p < 0,001 (***)

CONCLUSÕES

A expressão dos receptores hormonais ER-β, PR e LGR7 (RXFP1) na sínfise púbica de camundongos mostrou-se notavelmente dinâmica ao longo das diferentes fases da gestação e do puerpério, revelando uma clara influência da paridade sobre os padrões espaço-temporais de imunomarcação. Camundongos primíparos apresentaram expressão padrão, associado a uma remodelação ativa, com reorganização da matriz extracelular e maior plasticidade celular, refletindo a necessidade de adaptação estrutural para o parto e subsequente recuperação.

Por outro lado, os camundongos multíparos demonstraram uma regressão mais lenta da expressão dos receptores, além de uma alteração no padrão espacial de distribuição, como observado para ER-β e RXFP1, cujas imunomarcações periféricas podem refletir mudanças nos nichos celulares responsivos aos hormônios. Essas modificações podem estar relacionadas às adaptações cumulativas decorrentes de exposições gestacionais anteriores, impactando a organização e a capacidade de resposta do tecido a novas gestações.

A integração entre os dados morfológicos, imunohistoquímicos e, futuramente, moleculares, reforça o papel crítico dos receptores hormonais na regulação da plasticidade da sínfise púbica. Além disso, destaca a importância da paridade como fator modulador da resposta tecidual, com possíveis implicações para a integridade funcional da pelve em gestações subsequentes e no envelhecimento reprodutivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Thomas, T. M. et al. Prevalence of urinary incontinence. British medical journal, v. 281, n. 6250, p. 1243–5, 8 nov. 1980.
2. ROSA, RENATA GIARDINI JOAZEIRO, PAULO PINTO HYSLOP, STEPHEN. Caracterização molecular das fases de separação, relaxamento e remodelação da sínfise púbica do camundongo, durante a prenhez, parto e pós-parto. 2010
3. Dahal, S., Kuang, M., Rietsch, A., Butler, R. S., Ramamurthi, A., & Damaser, M. S. (2021). Quantitative Morphometry of Elastic Fibers in Pelvic Organ Prolapse. Annals of Biomedical Engineering, 49(8), 1909–1922. https://doi.org/10.1007/s10439-021-02760- 9
4. Hewitt SC, Harrell JC, Korach KS. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. Annu Rev Physiol. 2005;67:285-308. 21.
5. Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. Reproduction. 2004 Oct;128(4):139-46. 22.
6. Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. Genes Dev. 1995 Aug 1;9(18):2266-78.6. Parry, Laura J. et al.
7. Mechanisms of Relaxin Action in the Reproductive Tract. Adv Exp Med Biol. 2007;612:34-48
8. Mechanisms of Relaxin Action in the Reproductive Tract. Adv Exp Med Biol. 2007;612:34-48 9. YANG, S. et al. Relaxin receptors in mice: demonstration of ligand binding in symphyseal tissues and uterine membrane fragments. Endocrinology, v. 130, n. 1, p. 179–185, 1 jan. 1992.
9. K. LÓPEZ-GARCÍA et al. Effect of multiparity on morphometry and oestrogen receptor expression of pelvic and perineal striated muscles in rabbits: is serum oestradiol relevant? European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v. 169, n. 1, p. 113–120, 7 maio 2013.
10. PAULO SALINAS, M. A. M. E. M. DEL S. Immunofluorescence Analysis of Estrogen and Progesterone Receptors and Ki-67 Nuclear Protein in Canine Uteri Treated with Medroxyprogesterone Acetate During Anestrus. [s.l.] Int. J. Morphol., 41(3):725-732, 2023.
11. CONSONNI, S. R.; JOAZEIRO, P. P.; WERNECK, C. C. Avaliação morfológica, bioquímica e molecular da elastogênese em tecidos adultos no modelo da sínfise púbica de camundongos durante e após a prenhez. 2011.
12. Parry, Laura J. et al. Mechanisms of Relaxin Action in the Reproductive Tract. Adv Exp Med Biol. 2007;612:34-48
13. Hewitt SC, Harrell JC, Korach KS. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. Annu Rev Physiol. 2005;67:285-308.
14. Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. Reproduction. 2004 Oct;128(4):139-46.
15. de Sousa LM, et al. Multiparity and Aging Impact Chondrogenic and Osteogenic Potential at Symphyseal Enthesis: New Insights into Interpubic Joint Remodeling. Int J Mol Sci. 2023 Feb 26;24(5):4573
16. Castelucci, Bianca G., et al. "Recruitment of monocytes and mature macrophages in mouse pubic symphysis relaxation during pregnancy and postpartum recovery." Biology of reproduction 101.2 (2019): 466-477