UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

LUCIANO CARDOSO SANTOS

AVALIAÇÃO DO SISTEMA KISS1/KISS1R NO SISTEMA GENITAL DE GATAS CÍCLICAS, GESTANTES E COM PIOMETRA E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE MEDIADORES ANGIOGÊNICOS E IMUNOLÓGICOS

ILHÉUS – BA

2020

LUCIANO CARDOSO SANTOS

AVALIAÇÃO DO SISTEMA KISS1/KISS1R NO SISTEMA GENITAL DE GATAS CÍCLICAS, GESTANTES E COM PIOMETRA E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE MEDIADORES ANGIOGÊNICOS E IMUNOLÓGICOS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Juneo Freitas Silva

ILHÉUS – BA

2020

S237 Santos, Luciano Cardoso.
Avaliação do sistema KISS1/KISS1R no sistema genital de gatas cíclicas, gestantes e com piometra e sua relação com a expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos / Luciano Cardoso Santos. – Ilhéus : UESC, 2020.
161f. : il.
Orientador : Juneo Freitas Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Inclui referências e apêndices.

1. Gata – Doenças. 2. Gata – Útero – Infecção. 3. Felinos – Reprodução. I. Silva, Juneo Freitas. II. Título.
CDD – 636.0896151

LUCIANO CARDOSO SANTOS

AVALIAÇÃO DO SISTEMA KISS1/KISS1R NO SISTEMA GENITAL DE GATAS CÍCLICAS, GESTANTES E COM PIOMETRA E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE MEDIADORES ANGIOGÊNICOS E IMUNOLÓGICOS

Ilhéus – Ba, 20/02/2020

_____

Dr. Juneo Freitas Silva
UESC/DCB
(Orientador)

_____

Drª. Renata Santiago Alberto Carlos
UESC/DCAA

_____

Drª. Cristina Luísa Conceição de Oliveira
UESC/DCB

ILHÉUS – BAHIA

2020

Dedico aos meus pais José Carlos e Ana Lúcia que, mais uma vez, foram essenciais na minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, pela saúde e força todos os dias para realização dessa pesquisa.

Aos meus queridos pais José Carlos e Ana Lúcia, por todo apoio que me dão diariamente na busca pela realização de meus sonhos. Sei que abdicaram de muito por mim. Esse ano, mais do que nunca, vocês foram essenciais.

Ao meu irmão Carlos e meu sobrinho Iago. Obrigado pelas horas de descontração e boas risadas.

Ao meu professor Juneo Freitas, pela orientação e motivação a cada reunião. Obrigado pelos ensinamentos diários, pela paciência e pelas dicas que tem me ajudado a ser um profissional e uma pessoa melhor. Serei eternamente grato.

Ao NuRE, grupo de pesquisa que está cada vez mais forte e desenvolvendo pesquisas tão importantes quanto essa. Em especial, gostaria de agradecer ao nosso “clube das ratas”, Bianca, Erikles, Thayná, Isabella, Jeane, Luciana, Emily, Ivy e Larissa. Vocês têm sido incríveis e sou muito grato pela participação de cada um nessa pesquisa.

À Jeane, amiga e braço direito em todos os momentos. Não tenho palavras para descrever o quanto você tem sido importante nessa jornada. Obrigado.

À Larissa, aluna de iniciação científica, pelo tanto que me ajudou durante todo o ano. Muito obrigado pelo esforço em aprender e dedicação nesse trabalho.

Aos amigos e amigas do mestrado, em especial Larissa, Raquel e Sophia. Obrigado pelas horas divididas de frustração, mas de muito aprendizado na imunohistoquimica. Tenho certeza que nunca nos esqueceremos da frase que mais ouvimos durante aqueles meses: “Imuno é isso, gente”.

Aos amigos Weslem, Laysa, Adriana, Cristhian e Krisnayne. Obrigado por não me deixarem “esquecer de respirar”. Serei eternamente grato pela amizade, companheirismo e paciência de sempre. Amo vocês.

Aos amigos Iuri e Guilherme. Obrigado pela convivência harmoniosa nesse período.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica da UESC (CME), pelo apoio sempre que precisei. Em especial dona Jacira, que tem sido uma “mãe” durante esse tempo.

À Ivo, técnico do Laboratório de Histopatologia do Hospital Veterinário da UESC. Muito obrigado pela grande ajuda na preparação dos cortes para imunohistoquimica.

Aos funcionários do Centro Cirúrgico do Hospital Veterinário da UESC, especialmente à técnica Márcia. Obrigado pela ajuda na coleta de amostras para essa pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pelo oportunidade e apoio incansável.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste estudo. Muito obrigado!

AVALIAÇÃO DO SISTEMA KISS1/KISS1R NO SISTEMA GENITAL DE GATAS CÍCLICAS, GESTANTES E COM PIOMETRA E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE MEDIADORES ANGIOGÊNICOS E IMUNOLÓGICOS

RESUMO

A Kisspeptina é um neuropeptídeo codificado pelo gene *Kiss1* que estimula a liberação hipotalâmica de GnRH via seu receptor Kiss1R. Falhas na sua expressão resulta em hipogonadismo hipogonadotrófico em humanos e animais e por isso ela tem sido considerada o peptídeo chave da reprodução. No entanto, falhas na sinalização periférica de Kp, principalmente no sistema genital, também causa infertilidade. Contudo, estudos sobre o perfil de expressão do sistema Kiss1/Kiss1R no sistema genital e sua relação com mediadores imunológicos e angiogênicos em condições fisiológicas e patológicas são ainda escassos, principalmente na gata doméstica que não há nenhum estudo. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de expressão de Kp e seu receptor (Kiss1R) no útero, ovário e placenta de gatas (*Felis catus*) hígidas e com piometra e sua relação com a expressão de fatores pró-angiogênicos (VEGF, Flk-1 e PIGF) e imunológicos (INFγ, MIF, TNFα, IL6 e IL10). Para isso, o trabalho foi realizado em três etapas: no **CAPITULO 1** avaliou-se a expressão do sistema Kiss1/Kiss1R e dos mediadores angiogênicos e imunológicos no útero de gatas ao longo do ciclo estral e na condição de piometra; no **CAPÍTULO 2** avaliou-se a influência da gestação na expressão uterina do sistema Kiss1/Kiss1R e dos mediadores angiogênicos e imunológicos, como também o perfil de expressão na interface materno-fetal ao longo da gestação; e no **CAPÍTULO 3** avaliou-se o perfil do sistema Kiss1/Kiss1R e dos mediadores angiogênicos e imunológicos durante a foliculogênese, luteogênese e regressão luteal de gatas cíclicas e gestantes. Para o estudo foram utilizados 109 animais divididos nos grupos proestro/estro (N=20), diestro (N=41), anestro (N=32), piometra (N=4) e gestantes (N=12) após avaliação clínica, histopatológica e dosagem hormonal de estradiol (E2) e progesterona (P4) (CEUA 005/18). As amostras de útero, placenta e ovário foram avaliados quanto a expressão de Kiss, Kiss1R, VEGF, Flk-1, PIGF, INFγ, MIF, TNFα, IL6 e IL10 por meio de imunohistoquimica e qPCR. Os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste *Student–Newman–Keuls* (SNK) ou teste t de *Student*. Em relação ao ciclo estral, foi verificado que o útero de gatas em diestro apresenta maior expressão gênica e proteica de Kiss, como também maior expressão de fatores pró-angiogênicos e de *Mif* e *Il6* (*P<0.05*). Em contrapartida, Kiss1R apresentou maior expressão uterina na fase de proestro/estro, semelhante ao observado para a imunomarcação dos fatores inflamatórios (*P<0.05*). Para a maioria desses fatores houve correlação gênica significativa e positiva com a expressão uterina de *Kiss1* e/ou *Kiss1r*, além de ter ocorrido correlação gênica positiva entre Kiss1 e seu receptor no útero de gatas ao longo do ciclo estral (*P<0.05*). Gatas com piometra apresentaram aumento da expressão uterina de Kiss1 e Kiss1R (*P<0.05*), enquanto ocorreu redução significativa da expressão de RNAm para *Vegf, Pigf, Mif* e *Il6*, e aumento da expressão de *Tnf*. Em relação à interface materno-fetal, a gestação em gatas aumenta a expressão uterina de *Kiss1* e *Kiss1r* , principalmente no final da gestação, além de aumentar a expressão endometrial de MIF, *Vegf, Il10* e *Tnf* (*P<0.05*), diferente de *Pigf* que apresentou redução da expressão gênica (*P<0.05*). Na placenta, o sistema Kiss1/Kiss1R foi expresso no meio e final da gestação, com maior expressão gênica de *Kiss1r* ao final

da gestação. A expressão gênica e/ou proteica placentária de VEGF, Flk-1, INFγ, TNFα, IL6 e IL10 foi maior no meio da gestação (*P<0.05*), diferente de *Pigf* que apresentou maior expressão de RNAm no final da gestação (*P<0.05*). Além disso, na placenta houve correlação gênica positiva entre *Kiss1* e *Tnf*, e negativa entre *Kiss1r* e *Infγ*, *Il6* e *Il10* (*P<0.05*), embora não tenha ocorrido correlação significativa entre *Kiss1* e seu receptor (P>0,05). Em relação ao ovário, expressão moderada a intensa de Kiss1 e dos mediadores angiogênicos e imunológicos foi observada em todos os folículos, enquanto Kiss1R apresentou expressão fraca e principalmente em folículos primordiais. Na luteogênese, a gestação aumentou a expressão luteal de *Kiss*, como também houve maior imunomarcação em corpos lúteos (CLs) maduros de gatas gestantes e não-gestantes. Kiss1R, entretanto, apresentou maior expressão proteica somente nos CLs maduros de gatas gestantes (*P<0.05*). A expressão proteica de MIF foi maior em CLs maduros de gatas gestantes e não-gestantes em relação aos CLs vacuolizados e corpos *albicans* (*P<0.05*), enquanto a gestação reduziu a expressão gênica luteal de *Mif* (*P<0.05*). Os corpos *albicans* apresentaram menor expressão de *Kiss*, *Kiss1r*, Vegf e *Mif* em relação aos CLs de animais gestantes e não-gestantes. Conclui-se que o sistema Kiss/Kiss1R é expresso no útero, ovário e placenta da gata doméstica, sendo que o perfil de expressão do mesmo sofre influência não somente do ciclo estral, com maior expressão durante o diestro, como também da gestação, que modulou positivamente a expressão uterina e luteal de Kiss1 e/ou Kiss1R. Além disso, a expressão de *Kiss1*/*Kiss1r* apresenta correlação gênica com a expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos no sistema genital da gata doméstica, sendo que os mesmos variam o seu perfil de expressão de acordo com a fase do ciclo estral e o estágio luteal e gestacional.

Palavras-chave: kisspeptina, ovário, placenta, útero, ciclo estral, felino.

KISS1/KISS1R SYSTEM EVALUATION IN THE GENITAL SYSTEM OF CYCLICAL CATS, PREGNANT AND WITH PIOMETRA AND ITS RELATIONSHIP WITH THE EXPRESSION OF ANGIOGENIC AND IMMUNOLOGICAL MEDIATORS

ABSTRACT

Kisspeptin (Kp) is a neuropeptide encoded by the *Kiss1* gene that stimulates the hypothalamic release of GnRH via its Kiss1R receptor. Failures in its expression results in hypogonadotrophic hypogonadism in humans and animals and has therefore been considered the key peptide of reproduction. However, failures in peripheral Kp signaling, especially in the genital system, also cause infertility. However, studies on the expression profile of the Kiss/Kiss1R system in the genital system and its relationship with immunological and angiogenic mediators in physiological and pathological conditions are still scarce, especially in the domestic cat that there is no study. In this sense, this study aimed to evaluate the expression profile of Kp and its receptor (Kiss1R) in the uterus, ovary and placenta of healthy cats (*Felis catus*) and with pyometra and its relationship with the expression of pro-angiogenic (VEGF, Flk-1, and PIGF) and immunological (INFγ, MIF, TNFα, IL6, and IL10) factors. For this, the work was carried out in three stages: in **CHAPTER 1**, the expression of the Kiss1/ Kiss1R system and of angiogenic and immunological mediators in the uterus of cats throughout the estrous cycle and in the condition of pyometra was evaluated; in **CHAPTER 2**, the influence of pregnancy on the uterine expression of the Kiss/Kiss1R system and of angiogenic and immunological mediators was evaluated, as well as the expression profile in the maternal-fetal interface throughout pregnancy; and in **CHAPTER 3**, the profile of the Kiss1/Kiss1R system and of angiogenic and immunological mediators during folliculogenesis, luteogenesis and luteal regression of cyclical and pregnant cats was evaluated. For the study, 109 animals were used and divided into the groups of proestrus/estrus (N=20), diestrus (N=41), anestrus (N=32), pyometra (N=4) and pregnant (N=12) after clinical and histopathological evaluation and hormonal dosage of estradiol (E2) and progesterone (P4) (CEUA 005/18). Expression of Kiss, Kiss1R, VEGF, Flk-1, PIGF, INFγ, MIF, TNFα, IL6 and IL10 were evaluated in the uterus, placenta and ovary by immunohistochemistry and qPCR. The data were analyzed by ANOVA followed by the Student – Newman – Keuls test (SNK) or Student t test. In relation to the estrous cycle, uterus from cats in diestrus has higher gene and protein expression of Kiss1, as well as higher expression of pro-angiogenic factors and *Mif* and *Il6* ($P < 0.05$). In contrast, Kiss1R showed higher uterine expression in the proestrus/estrus phase, similar to that observed for the immunostaining of inflammatory factors ($P < 0.05$). For most of these factors there was a significant and positive gene correlation with the uterine expression of *Kiss1* and / or *Kiss1r*, in addition to positive gene correlation between *Kiss1* and its receptor in the uterus from cats throughout the estrous cycle ($P < 0.05$). Cats with pyometra showed higher uterine expression of Kiss1 and Kiss1R ($P < 0.05$), while there was a significant reduction in mRNA expression for *Vegf*, *Pigf*, *Mif* and *Il6*, and increased expression of *Tnf*. In relation to the maternal-fetal interface, pregnancy in cats increases the uterine expression of Kiss1 and Kiss1r, especially at the end of pregnancy, in addition to increasing the endometrial expression of MIF, *Vegf*, *Il10* and *Tnf* ($P < 0.05$), differently of *Pigf* that showed reduced gene expression ($P < 0.05$). In the placenta, the

Kiss1/Kiss1R system was expressed in the middle and end of pregnancy, with higher *Kiss1r* gene expression at the end of pregnancy. Placental gene and/or protein expression of VEGF, Flk-1, INFγ, TNFα, IL6 and IL10 was higher in the middle of pregnancy (P <0.05), unlike *Pigf* which showed higher mRNA expression at the end of pregnancy (P <0.05). Furthermore, in the placenta there was a positive gene correlation between *Kiss1* and *Tnf*, and negative between *Kiss1r* and *Infγ, Il6* and *Il10* (P <0.05), although there was no significant correlation between *Kiss1* and its receptor (P> 0.05). In relation to the ovary, moderate to intense expression of Kiss1 and of the angiogenic and immunological mediators was observed in all follicles, while Kiss1R showed weak expression and mainly in primordial follicles. In luteogenesis, pregnancy increased Kiss1 luteal expression, as well as higher immunostaining in mature corpus luteum (CLs) from pregnant and non-pregnant cats. Kiss1R, however, showed higher protein expression only in the mature CLs of pregnant cats (P <0.05). MIF protein expression was higher in mature CLs of pregnant and non-pregnant cats compared to vacuolated CLs and *corpus albicans* (P <0.05), while pregnancy reduced the luteal gene expression of *Mif* (P <0.05). *Corpus albicans* showed lower expression of *Kiss*, *Kiss1r*, *Vegf* and *Mif* in relation to CLs from pregnant and non-pregnant animals. It is concluded that the Kiss1/Kiss1R system is expressed in the uterus, ovary and placenta of the domestic cat, and its expression profile is influenced not only by the estrous cycle, with higher expression during diestrus, but also by pregnancy, which positively modulated the uterine and luteal expression of Kiss1 and/or Kiss1R. In addition, the *Kiss1/Kiss1R* expression has gene correlation with the expression of angiogenic and immunological mediators in the genital system of the domestic cat, and they vary their expression profile according to the estrous cycle phase and the luteal and gestational stage.

Keywords: kisspeptin, ovary, placenta, uterus, estrous cycle, feline.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Caracterização da histologia uterina e ovariana das fases do ciclo estral da gata doméstica. Proestro/estro – ovário (A) com evidente crescimento folicular e folículos pré-ovulatórios (setas), e útero (D) com numerosas glândulas em crescimento; diestro – ovário (B) com corpos lúteos ativos (asteriscos), e útero (E) com glândulas endometriais em atividade secretória (lúmen com conteúdo eosinofílico) e apresentando epitélio vacuolizado; e anestro – ovário (C) sem crescimento folicular evidente e presença de corpos *albicans* (asteriscos), e útero (F) com poucas glândulas endometriais;. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; Barra = 2000 µm (A-C); 50 µm (D-F)). Fonte: Arquivo pessoal.....36

Figura 2. Principais estágios de maturação do corpo lúteo. (A) Corpo lúteo maduro apresentando células luteínicas volumosas e eosinofílicas; (B) Corpo lúteo tardio com vacuolização das células luteínicas; (C) Corpo lúteo em regressão (corpo *albicans*) apresentação células luteínicas menores, retraídas, com formação de tecido fibroso central. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; Barra= 50µm). Fonte: Arquivo pessoal. 37

Figura 3. Placenta zonária circular endoteliocorial da gata doméstica. (A) Caracterização macroscópica: região circular da placenta. (B) Histologia de placenta com aproximadamente 20 dias de gestação (20 dg). (C) Histologia de placenta com aproximadamente 30 dias de gestação (30 dg). (D) Histologia de placenta com aproximadamente 60 dias de gestação (60 dg). (E e F) Histologia endometrial de útero no meio e final da gestação. (G e I) Organização lamelar da placenta de meio da gestação. (H e J) Organização lamelar da placenta de final da gestação. (K e L) Imunomarcação de citoqueratina básica no citotrofoblasto e sincíciotrofoblasto (Estreptavidina-biotina-peroxidase, diluição 1:400). (Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra: B, C e D = 100 µm; E e F = 50 µm; G-L = 20 µm; Siglas: ZL = Zona lamelar; ZJ = Zona juncional; ZG = Zona glandular; e M = Miométrio)). Fonte: Arquivo pessoal.....43

CAPÍTULO I

Figura 4. Confirmação das fases do ciclo estral das gatas hígidas e com piometra. A e D) Fase de proestro/estro apresentando ovário (A) com evidente crescimento folicular e folículos pré-ovulatórios (setas), e útero (D) com numerosas glândulas em crescimento e vascularização proeminente (seta); (B e E) Fase de diestro apresentando ovário (B) com corpos lúteos maduros (asteriscos), e útero (E) com glândulas endometriais em atividade secretória (lúmen com conteúdo eosinofílico) e epitélio vacuolizado; (C e F) Fase de anestro apresentando ovário (C) sem crescimento folicular e presença de corpos *albicans* (asteriscos), e útero (F) com poucas glândulas endometriais; (G) Piometra evidenciando infiltrado inflamatório no interstício e no interior do epitélio luminal uterino (imagem em realce; seta) e de glândulas endometriais (cabeça de seta). (Coloração: Hematoxilina e Eosina; Barra = 2000 µm (A-C), 50 µm (D-G)). (H e I) Dosagem plasmática de Estradiol (E2) e Progesterona (P4). (H) Níveis de E_2 nos grupos experimentais, com maiores níveis nos grupos de proestro/estro, diestro e piometra; (I) Níveis de P4 nos grupos experimentais, com maiores níveis nos grupos diestro e piometra. (**P*<0.05; ***P*<0.01). Fonte: Arquivo pessoal. 68

Figura 5. Expressão proteica e gênica de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) no útero de gatas hígidas em proestro/estro, diestro e anestro. A-H) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de kisspeptina (A-D) e de Kiss1R (E-H) no endométrio das gatas nas fases de proestro/estro (A e E), diestro (B, C, F e G) e anestro (D e H). (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). I) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de kisspeptina e Kiss1R nas fases de proestro/estro, diestro e anestro. (média±SEM; ****P*<0.01;*****P*<0.0001 n=6-7). J) Expressão gênica relativa de *Kiss1* e *Kiss1r* no endométrio das gatas nas fases de proestro/estro, diestro e anestro. (média±SEM; **P*<0.05; n=4-8). K) Correlação da expressão gênica de *Kiss1* com a expressão de *Kiss1r* no endométrio de gatas hígidas (****P*<0.001). Fonte: Arquivo pessoal.…….70

Figura 6. Expressão proteica e gênica de mediadores angiogênicos no útero de gatas hígidas em proestro/estro, diestro e anestro. A-F) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de VEGF (A-C) e seu receptor (Flk-1) (D-E) no endométrio das gatas nas fases de proestro/estro (A e D), diestro (B e E) e anestro (C

e F) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). G) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de VEGF e Flk1 nas fases de proestro/estro, diestro e anestro. (média±SEM; *P<0.05; ***P<0.001; ****P<0.0001; n=6-7) H) Expressão gênica relativa de *Vegf* e *Pigf* no endométrio das gatas nas fases de proestro/estro, diestro e anestro. (média±SEM; *P<0.05; **P<0.01; n=4-8) (I-M) Correlação da expressão gênica de *Vegf* e *Pigf* com a expressão de *Kiss1* e *Kiss1r* no endométrio de gatas hígidas (*P<0.05). Fonte: Arquivo pessoal.....72

Figura 7. Expressão proteica e gênica de mediadores imunológicos no útero de gatas hígidas em proestro/estro, diestro e anestro. A-L) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de INFγ (A-C), MIF (D-F), TNFα (G-I) e IL10 (J-L) no endométrio das gatas nas fases de proestro/estro (A, D, G e J), diestro (B, E, H e K) e anestro (C, F, I e L) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Barra = 50 µm). M) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de INFγ, MIF, TNFα e IL10 nas fases de proestro/estro, diestro e anestro. (média±SEM; *P<0.05; **P<0.01; ****P<0.0001; n=6-7) N) Expressão gênica relativa de *Infγ, Mif, Tnf, Il6* e *Il10* no endométrio das gatas nas fases de proestro/estro, diestro e anestro. (média±SEM; *P<0.05; **P<0.01; n=4-8) O-Z) Correlação da expressão gênica de *Infγ, Mif, Tnf, Il6* e *Il10* com a expressão de *Kiss1* e *Kiss1r* no endométrio de gatas hígidas. (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001). Fonte: Arquivo pessoal.....75

Figura 8. Expressão proteica e gênica de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) no útero de gatas hígidas em diestro e com piometra. A-H) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de kisspeptina (A-D) e de Kiss1R (E-H) na superfície endometrial das gatas em diestro (A e E) e com piometra (C e G) e nas glândulas endometriais profundas das gatas em diestro (B e F) e com piometra (D e H). (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). I) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de kisspeptina e Kiss1R nas gatas em diestro e com piometra. (média±SEM; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001 n=6-7). J) Expressão gênica relativa de *Kiss1* e *Kiss1r* no endométrio das gatas em diestro e com piometra (média±SEM; n=4-8). Fonte: Arquivo pessoal. 77

Figura 9. Expressão proteica e gênica de mediadores angiogênicos no útero de gatas hígidas em diestro e com piometra. A-D) Fotomicrografias da expressão

imunohistoquimica de VEGF (A e B) e de Flk1 (C-D) no endométrio das gatas em diestro (A e C) e com piometra (B e D) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). E) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de VEGF e Flk1 nas gatas em diestro e com piometra. (média±SEM; ***P*<0.01; n=6-7). F) Expressão gênica relativa de *Vegf* e *Pigf* no endométrio das gatas em diestro e com piometra (média±SEM; **P*<0.05; ***P*<0.01; n=4-8). Fonte: Arquivo pessoal. 78

Figura 10. Expressão proteica e gênica de mediadores imunológicos no útero de gatas hígidas em diestro e com piometra. A-D) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de INFγ (A-B), TNFα (C-D), MIF (E-F) e IL10 (G-H) no endométrio das gatas em diestro (A, C, E,G) e com piometra (B, D, F, H) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). I) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de INFγ, MIF, TNFα e IL10 nas gatas em diestro e com piometra. (média±SEM; ***P*<0.01; n=6-7). J) Expressão gênica relativa de *Infγ, Mif, Tnf, Il6* e *Il10* no endométrio das gatas em diestro e com piometra (média±SEM; **P*<0.05;***P*<0.01; n=4-8). Fonte: Arquivo pessoal. 80

CAPÍTULO II

Figura 11. Expressão proteica e gênica de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) no útero de gatas hígidas em diestro e de gatas hígidas no meio e final da gestação. A-F) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de kisspeptina (A-C) e de Kiss1R (D-F) no endométrio das gatas em diestro (A e C) e no endométrio da região inter-placentária de gatas no meio (B e E) e final (C e F) da gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm).G) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de kisspeptina e Kiss1R nas gatas em diestro e na região interplacentária de gatas no meio e final da gestação. (média±SEM; *****P*<0.0001; n=6). F) Expressão gênica relativa de *Kiss1* e *Kiss1r* no endométrio de gatas em diestro e na região inter-placentária de gatas gestantes (média±SEM; **P*<0.05; n=6). Fonte: Arquivo pessoal. 97

Figura 12. Expressão proteica e gênica de Kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) na placenta de gatas no meio e final da gestação. A-F) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de kisspeptina (A-B) e de Kiss1R (C-D) na placenta de

gatas no meio (A e D) e final (B e D) da gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Barra = 50 µm). E) Área de imunomarcação em pixels da expressão placentária de kisspeptina e Kiss1R em gatas no meio e final da gestação. (média±SEM; n=6). F) Expressão gênica relativa de *Kiss1* e *Kiss1r* na placenta de gatas no meio e final da gestação (média±SEM; ****P*<0.001; n=6). G) Correlação da expressão gênica de *Kiss1* com a expressão de *Kiss1r* na placenta de gatas hígidas. Fonte: Arquivo pessoal.....98

Figura 13. Expressão proteica e gênica de mediadores angiogênicos no útero de gatas hígidas em diestro e de gatas hígidas no meio e final da gestação. A-F) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de VEGF (A-C) e Flk1 (D-F) no endométrio de gatas em diestro (A e D) e no endométrio da região inter-placentária de gatas no meio (B e E) e final (C e F) da gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). G) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de VEGF e Flk1 de gatas em diestro e na região inter-placentária de gatas no meio e final da gestação. (média±SEM; **P*<0.05; n=6). F) Expressão gênica relativa de *Vegf* e *Pigf* no endométrio de gatas em diestro e na região interplacentária de gatas gestantes (média±SEM; **P*<0.05.; n=6). Fonte: Arquivo pessoal.....101

Figura 14. Expressão proteica e gênica de mediadores angiogênicos na placenta de gatas no meio e final da gestação. A-F) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de VEGF (A-B) e Flk1 (C-D) na placenta de gatas no meio (A e C) e final (B e D) da gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). E) Área de imunomarcação em pixels da expressão placentária de VEGF e Flk1 em gatas no meio e final da gestação. (média±SEM; **P<0,01; n=6). F) Expressão gênica relativa de *Vegf* e *Pigf* na placenta de gatas no meio e final da gestação (média±SEM; **P*<0.05; ****P*<0.001; n=6). G-J) Correlação da expressão gênica de *Vegf e Flk1* com a expressão de *Kiss* e *Kiss1r* na placenta de gatas hígidas. (***P*<0.01; ****P*<0.001). Fonte: Arquivo pessoal.....102

Figura 15. Expressão proteica e gênica de mediadores imunológicos no útero de gatas hígidas em diestro e de gatas hígidas no meio e final da gestação. A-L) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de INFγ (A-C), MIF (D-F), TNFα (G-I) e IL10 (J-L) no endométrio das gatas em diestro (A, D,G e J) e no endométrio da

região interplacentária de gatas no meio (B,E,H e K) e final (C, F, I e L) da gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Barra = 50 µm). M) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de INFγ, MIF, TNFα e IL10 nas gatas em diestro e na região inter-placentária de gatas no meio e final da gestação. (média±SEM; *P<0.05; **P<0.01; n=6). F) Expressão gênica relativa de *Infγ, Mif, Tnf, Il6* e *Il10* no endométrio das gatas em diestro e na região interplacentária de gatas gestantes (média±SEM; *P<0.05; ***P<0.001 n=6). Fonte: Arquivo pessoal.106

Figura 16. Expressão proteica e gênica de mediadores imunológicos na placenta de gatas no meio e final da gestação. A-F) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de INFγ (A-B), TNFα (C-D), MIF (E-F) e IL10 (G-H) na placenta de gatas no meio (A, C, E, G) e final (B, D, F, H) da gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). I) Área de imunomarcação em pixels da expressão placentária de INFγ, MIF, TNFα e IL10 em gatas no meio e final da gestação. (média±SEM;*$P<0.05$; ***$P<0.001$; n=6). F) Expressão gênica relativa de *Infγ, Mif, Tnf, Il6* e *Il10* na placenta de gatas no meio e final da gestação (média±SEM; **$P<0.01$;****$P<0.0001$; n=6). G) Correlação da expressão gênica de *Infγ, Mif, Tnfα, Il6* e *Il10* com a expressão de *Kiss* e *Kiss1r* na placenta de gatas hígidas (**$P<0.01$; ***$P<0.001$). Fonte: Arquivo pessoal.....107

CAPÍTULO III

Figura 17. Perfil de expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R no desenvolvimento folicular de gatas domésticas em proestro/estro, no corpo lúteo de gatas gestantes e não-gestantes em diestro, e corpo *albicans* de gatas em anestro. A-J) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de Kiss1 (A-E) e Kiss1R (F-J) em folículos primordiais (A e F), primários (B e G), secundários (C e H), terciários (D e I) e pré-ovulatórios (E e J) de ovários de gatas em proestro/estro. K-T) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de Kiss1 (K-O) e Kiss1R (P-T) no corpo lúteo (CL) de gatas não-gestantes em diestro e gestantes e no corpo albicans de gatas em anestro (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Barra = 50 µm (A-C; F-H; K-T), Barra = 100 µm (D-E; I-J)). U) Área de imunomarcação em pixels da expressão de Kiss1 e Kiss1R no CL de gatas em diestro e gestantes e no corpo albicans de gatas em anestro (média ± SEM; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001;

****P<0.0001; ##P<0.01, n=6-7). V) Expressão gênica relativa de Kiss1 e Kiss1r no CL de gatas em diestro e gestantes e no corpo albicans de gatas em anestro. (média ± SEM; *P<0.05; **P<0.01; n=6-7). W) Correlação da expressão gênica de Kiss1 com Kiss1r no CL de gatas hígidas em diestro e gestantes (P>0.05; r = -0.28). Fonte: Arquivo pessoal.....123

Figura 18. Perfil de expressão de mediadores angiogênicos no desenvolvimento folicular de gatas domésticas em proestro/estro, no corpo lúteo de gatas gestantes e não-gestantes em diestro, e corpo *albicans* de gatas em anestro. A-J) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de VEGF (A-E) e Flk-1 (F-J) em folículos primordiais (A e F), primários (B e G), secundários (C e H), terciários (D e I) e pré-ovulatórios (E e J) de ovários de gatas em proestro/estro. K-T) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de VEGF (K-O) e Flk-1 (P-T) no corpo lúteo (CL) de gatas em diestro e gestantes e no corpo *albicans* de gatas em anestro (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Barra = 50 µm (A-C; F-H; K-T), Barra = 100 µm (D-E; I-J)). U) Área de imunomarcação em pixels da expressão de VEGF e Flk-1 no CL de gatas em diestro e gestantes e no corpo *albicans* de gatas em anestro. (média ± SEM; *P<0.05; ****P<0.0001; #P<0.05; ####P<0.0001n=6-7). V). Expressão gênica relativa de *Vegf* e *Pigf* no CL de gatas em diestro e gestantes e no corpo *albicans* de gatas em anestro. (média ± SEM; *P<0.05; n=6-7). W-Z) Correlação da expressão gênica de *Vegf* e *Pigf* com a expressão de *Kiss1* (W-X; P>0.05; r = 0.06; r = 0.09) e *Kiss1r* (Y-Z; P>0.05; r = 0.26; r = -0.08) no CL de gatas hígidas em diestro e gestantes. Fonte: Arquivo pessoal. 126

Figura 19. Perfil de expressão de mediadores imunológicos no desenvolvimento folicular de gatas domésticas em proestro/estro, no corpo lúteo de gatas gestantes e não-gestantes em diestro, e corpo albicans de gatas em anestro. A-J) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de INFγ (A-E) e MIF (F-J) em folículos primordiais (A e F), primários (B e G), secundários (C e H), terciários (D e I) e pré-ovulatórios (E e J) de ovários de gatas em proestro/estro. K-T) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de INFγ (K-O) e MIF (P-T) no corpo lúteo (CL) de gatas em diestro e gestantes e no corpo *albicans* de gatas em anestro (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Barra = 50 µm (A-C; F-H; K-T), Barra = 100 µm (D-E; I-J)). U) Área de imunomarcação em pixels da expressão de INFγ e MIF

no CL de gatas em diestro e gestantes e no corpo *albicans* de gatas em anestro. (média ± SEM; **P*<0.05; ***P*<0.01; *****P*<0.0001; #*P*<0.05; n=6-7). V) Expressão gênica relativa de *Infγ* e *Mif* no CL de gatas em diestro e gestantes e no corpo *albicans* de gatas em anestro. (média ± SEM; ***P*<0.01; n=6-7). W-Z) Correlação da expressão gênica de *Infγ* e *Mif* com a expressão de *Kiss1* (W-Y; *P*>0.05; r = 0.15; r = 0.005) e *Kiss1r* (X-Z; **P*<0.05; r = 0.47) no CL de gatas hígidas em diestro e gestantes. Fonte: Arquivo pessoal.....129

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Níveis séricos de progesterona e estradiol em diferentes estágios do ciclo reprodutivo e gestação da gata doméstica. 33
Tabela 2. Características morfológicas da placenta de gatas domésticas. 39
Tabela 3. Genes regulados pelo INFγ em células endoteliais microvasculares uterinas humanas 49

CAPÍTULO I

Tabela 4. Lista dos anticorpos utilizados na imunohistoquímica. 63
Tabela 5. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qPCR. 66
Tabela 6. Caracterização da imunomarcação de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) no útero de gatas hígidas em proestro/estro, diestro e anestro. 69
Tabela 7. Caracterização da imunomarcação de VEGF e seu receptor (Flk1) no útero de gatas hígidas em proestro/estro, diestro e anestro. 71
Tabela 8. Caracterização da imunomarcação de mediadores imunológicos no útero de gatas hígidas em proestro/estro, diestro e anestro. 74
Tabela 9. Caracterização da imunomarcação de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) no útero de gatas hígidas em diestro e com piometra. 76
Tabela 10. Caracterização da imunomarcação de VEGF e seu receptor (Flk1) no útero de gatas hígidas em diestro e com piometra. 78
Tabela 11. Caracterização da imunomarcação de mediadores imunológicos no útero de gatas hígidas em diestro e com piometra. 79

CAPÍTULO II

Tabela 12. Anticorpos usados na imunohistoquímica. 92
Tabela 13. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qPCR. ... 94
Tabela 14. Caracterização da imunomarcação de Kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) no útero de gatas hígidas em diestro e na região interplacentária de gatas hígidas no meio e final da gestação. 96
Tabela 15. Caracterização da imunomarcação de Kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) na placenta e decídua de gatas hígidas no meio e final da gestação. 96

Tabela 16. Caracterização da imunomarcação de VEGF e seu receptor (Flk1) no útero de gatas hígidas em diestro e na região interplacentária de gatas hígidas no meio e final da gestação. 99
Tabela 17. Caracterização da imunomarcação de VEGF e seu receptor (Flk1) na placenta e decídua de gatas hígidas no meio e final da gestação. 100
Tabela 18. Caracterização da imunomarcação de mediadores imunológicos no útero de gatas hígidas em diestro e na região interplacentária de gatas hígidas no meio e final da gestação. 103
Tabela 19. Caracterização da imunomarcação de mediadores imunológicos na placenta e decídua de gatas hígidas no meio e final da gestação. 104

CAPÍTULO III

Tabela 20. Anticorpos usados na imunohistoquímica. 118
Tabela 21. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qPCR. .120

LISTA DE ABREVIATURAS

ANGs - angiopoietinas
APO - área pré-óptica
ARC - núcleo arqueado
AVPV - núcleo periventricular anteroventral
CASP1 - caspase 1
CCL5 -ligante 5 de quimiocina CCL
CCL8 - ligante 8 de quimiocina CCL
CCNA1 - ciclina A1
CSF2 - fator estimulador de crescimento de colônias 2
CXCL10 - ligante10 de quimiocina CXC
CXCL9 - ligante 9 de quimiocina CXC
CYP11A – citocromo p450 11A
CYP27B1 - citocromo p450 27B1
EGF - fator de crescimento epidermal
EGFR - receptor do fator de crescimento epidermal
ERK1/2 - quinase 1/2 regulada por sinal extracelular
E2 - Estradiol
FGF - fator de crescimento fibroblástico
Flk-1/KDR- receptor do domínio de inserção quinase
FSH - Hormônio folículo estimulante
GBP5 - proteína 5 de ligação ao guanilato
GM-CSF - fator estimulador de crescimento de colônias de macrófagos-granulócitos
GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas
GPR54/Kiss1R – receptor 54 acoplado a proteína G/ receptor 1 de kisspeptina
HIF1 - fator 1 induzido por hipóxia
HPG - eixo hipotalâmico hipofisário gonadal
IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGF-2 - fator de crescimento semelhante à insulina 2
IGFBP3 - proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 3
IL1 - interleucina 1
IL10 - interleucina 10
Il10 – gene codificante da interleucina 10
IL15Rα - subunidade alfa do receptor de interleucina 15
IL17 - interleucina 17
IL1R2 - receptor de interleucina 1 (tipo II)
IL6 - interleucina 6
Il6 – gene codificante da interleucina 6
IL8 - interleucina 8
IL9 - interleucina 9
INFγ - interferon gamma
Infγ – gene codificante do interferon gamma

IRF1 - fator regulador do interferon 1
Kiss1 - gene codificante de Kisspeptina
Kiss1r – gene codificante do receptor de Kisspetina
Kp - Kisspeptina
Kp10 - kisspeptina 10
Kp13 - kisspeptina 13
Kp14 - kisspeptina 14
Kp54 - kisspeptina 54
LH - Hormônio luteinizante
p38 MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno p38
MHC-II - complexo de histocompatibilidade principal do tipo II
MIF - fator inibidor da migração de macrófagos
Mif – gene codificante do fator inibidor da migração de macrófagos
MMP2 - metaloproteinase de matriz 2
MX1 - myxovirus (vírus da gripe) resistência 1
NFE2L3 - fator 3 relacionado ao fator nuclear eritroide 2
OTR - receptor de ocitocina
PD-ECGF - fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas
PFA - fator ativador de plaqueta
PFA-R - receptor do fator ativador de plaqueta
PGF2α - prostaglandina F2 alfa
PIGF - fator de crescimento placentário
Pigf – gene codificante do fator de crescimento placentário
PTGES - prostraglandina sintetase E
P4 – Progesterona
Rps7 – gene codificante da proteína robossomal S7
SOD2 - superóxido dismutase 2
SPP1 - fosfoproteína secretada 1
StAR - proteína reguladora aguda esteroidogênica
TAP1 - transportador 1 (*Transporter 1, ATP Binding Cassette Subfamily B Member*)
TFAP2C - fator de transcrição AP-2 gama
TGFα - fator de crescimento transformador alfa
TGFβ - fator de crescimento transformador beta
TNFR1 - receptor 1 do fator de necrose tumoral
TNFR2 - receptor 2 do fator de necrose tumoral
TNFα - fator de necrose tumoral alfa
Tnf – gene codificante do fator de necrose tumoral
Treg - linfócitos T regulatórios
uNK - células Natural Killer uterinas
VEGF - fator de crescimento endotelial vascular
Vegfa – gene codificante do fator de crescimento endotelial vascular A
WISP2 - proteína 2 da via de sinalização indutível WNT1
3βHSD – enzima 3 beta-hidroxiesteroide desidrogenase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 26

2. OBJETIVOS 29

3. REVISÃO DE LITERATURA 31

3.1 A Reprodução em gatas domésticas 31

3.1.1 Morfofisiologia ovariana e uterina e ciclo estral da gata doméstica 32

3.1.2 Placenta e placentação 38

3.2 Mediadores angiogênicos e imunológicos na morfofisiologia reprodutiva da fêmea 44

3.2.1 Angiogênese 44

3.2.2 Mediadores imunológicos 47

3.3 O sistema Kisspeptina/Kiss1R no trato genital de fêmeas 51

3.3.1 Sistema Kisspeptina/Kiss1R no ovário 52

3.3.2 Kisspeptina no útero: participação nos processos de implantação e decidualização endometrial 53

3.3.3 Kisspeptina e regulação da placentação 55

3.4 Piometra em gatas domésticas 56

4 CAPÍTULO I: A piometra e o ciclo estral influenciam a expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R e de fatores angiogênicos e imunológicos no útero de gatas domésticas 59

4.1 INTRODUÇÃO 59

4.2 MATERIAL E MÉTODOS 61

4.2.1 Procedimento experimental 61

4.2.2 Ovariohisterectomia 61

4.2.3 Processamento dos tecidos e avaliação histopatológica 62

4.2.4 Dosagem hormonal 63

4.2.5 Imunohistoquímica 63

4.2.6 PCR em tempo real (qPCR) 64

4.2.7 Análise estatística 65

4.3 RESULTADOS 67

4.3.1 Classificação dos animais nos estágios do ciclo estral e piometra 67

4.3.2 Perfil do sistema Kisspeptina/Kiss1R no útero de gata doméstica durante o ciclo estral 69

4.3.3 Perfil de mediadores angiogênicos no útero de gata doméstica durante o ciclo estral 70

4.3.4 Perfil de mediadores imunológicos no útero de gatas domésticas no ciclo estral.... 73

4.3.5 Piometra aumenta a imunomarcação do sistema Kisspeptina/Kiss1R no útero de gata doméstica 76

4.3.6 Piometra reduz a expressão gênica endometrial de Vegf e Pigf na gata doméstica 77

4.3.7 Piometra altera o perfil de mediadores imunológicos no útero da gata doméstica 79

4.4 DISCUSSÃO 81

4.5 CONCLUSÃO 85

5 CAPÍTULO II: O Sistema Kisspeptina/Kiss1R e mediadores angiogênicos e imunológicos na interface materno-fetal da gata doméstica 87

5.1 INTRODUÇÃO 87

5.2 MATERIAL E MÉTODOS 89

5.2.1 Procedimento experimental 89

5.2.2 Ovariohisterectomia 90

5.2.3 Processamento dos tecidos e avaliação histopatológica 90

5.2.4 Imunohistoquímica 91

5.2.5 PCR em tempo real (qPCR) 93

5.2.6 Análise estatística 94

5.3 RESULTADOS 95

5.3.1 Perfil de expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R na interface materno-fetal de gatas hígidas gestantes 95

5.3.2 Perfil de expressão de mediadores angiogênicos na interface materno-fetal de gatas hígidas gestantes 98

5.3.3 Perfil de expressão de mediadores imunológicos na interface materno-fetal de gatas hígidas gestantes 102

5.4 DISCUSSÃO 108

5.5 CONCLUSÃO 112

6 CAPÍTULO III: Expressão do sistema Kiss1/Kiss1R e mediadores angiogênicos e imunológicos no ovário de gatas cíclicas e gestantes 113

6.1 INTRODUÇÃO 113

6.2 MATERIAL E MÉTODOS 115

6.2.1 Procedimento experimental 115

6.2.2 Ovariohisterectomia 116

6.2.3 Processamento dos tecidos e avaliação histopatológica 116

6.2.4 Dosagem hormonal 117

6.2.5 Imunohistoquímica 117

6.2.6 PCR em tempo real (qPCR) 119

6.2.7 Análise estatística 120

6.3 RESULTADOS 121

6.3.1 Classificação dos animais nos estágios do ciclo estral 121

6.3.2 Perfil de expressão do sistema Kiss1/Kiss1R na foliculogênese e luteogênese de gatas hígidas cíclicas e gestantes 121

6.3.3 Perfil de expressão de mediadores angiogênicos na foliculogênese e luteogênese de gatas cíclicas e gestantes 124

6.3.4 Perfil de expressão de mediadores imunológicos na foliculogênese e luteogênese de gatas cíclicas e gestantes 126

6.4 DISCUSSÃO 130

6.5 CONCLUSÃO 136

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 136

REFERÊNCIAS 138

APÊNDICE I 157

APÊNDICE II 158

APÊNDICE III 159

APÊNDICE IV 161

1. INTRODUÇÃO

A Kisspeptina é um neuropeptídeo codificado pelo gene *Kiss1* e que tem atuação por meio da ligação com o seu receptor Kiss1R (antes conhecido como GPR54) (KOTANI et al., 2001; OHTAKI et al., 2001). Nas últimas duas décadas, estudos têm elucidado diversas funções associadas ao sistema Kiss1/Kiss1R, desde a sua descoberta em linhagens de células tumorais por Lee et al. (1996). Nesse estudo, a Kisspeptina estava associada à supressão de metástases de melanoma humano e por isso ficou denominada inicialmente como metastina.

Pouco tempo depois, a Kisspeptina foi descrita nos principais órgãos endócrinos do corpo humano, com destaque para sua alta expressão no tecido placentário (KOTANI et al., 2001). Esse foi o primeiro estudo que demonstrou a expressão da Kisspeptina em um órgão associado à reprodução. Nesse âmbito, foi visto em seguida que camundongos com deleção gênica para *Kiss1* ou seu receptor tinham hipogonadismo hipogonodotrófico e eram inférteis (DE ROUX et al., 2003; FUNES et al., 2003; SEMINARA et al., 2003). Assim, a partir de então, a Kisspeptina passou a ser aceita como reguladora chave da reprodução, já que os neurônios produtores de kisspeptina apresentavam receptores específicos localizados no hipotálamo e sua sinalização é essencial para estimular a liberação hipotalãmica do hormônio liberador de gonodotrofinas (GnRH), bem como, do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) pela adenohipófise (GOTTSCH et al., 2004; HAN et al., 2005).

Assim, pelo fato de regular a liberação de GnRH e das gonadotrofinas, a localização da expressão do gene *Kiss1* no sistema nervoso tem sido estudada (DIAS et al., 2015). Em ratos, camundongos, equinos e humanos foi observada sua expressão em neurônios hipotalâmicos do núcleo arqueado (ARC) e periventricular anteroventral (AVPV), designados como neurônios kisspeptinérgicos (CLARKSON et al., 2009; HRABOVSZKY et al., 2010; MAGEE et al., 2009; SMITH et al., 2005). Em ovinos, por sua vez, foram identificados no ARC e área pré-ótica do hipotálamo (BACKHOLER; SMITH; CLARKE, 2009). Em gatos, no entanto, são escassos os trabalhos que avaliaram o perfil de expressão de Kp, sendo que os primeiros estudos presentes na literatura foram publicados recentemente por Amelkina et al. (2019) que verificaram que a expressão hipotalâmica de Kp em gatos é semelhante à de ratos e

camundongos.

Contudo, além de suas ações hipotalâmicas, como a regulação dos neurônios GnRH, a Kiss1 é expressa no sistema genital de humanos e animais (CEJUDO ROMAN et al., 2012; DIAS et al., 2015), sugerindo que alterações na sua sinalização local é suficiente para causar infertilidade (Cao et al., 2019). A expressão gênica de *Kiss1* e seu receptor em ovários de mulheres, ratas e camundongos durante o ciclo menstrual/estral já foi demonstrada, com aumento da expressão em ratas próximo à ovulação (CASTELLANO et al., 2006; CEJUDO ROMAN et al., 2012; MERHI et al., 2016), sendo que camundongos *knockout* para Kp e recebendo reposição de gonadotrofinas apresentam falha ovariana prematura, demonstrando a participação de Kp na regulação da foliculogênese e ovulação (FERNANDOIS et al., 2016; GAYTAN et al., 2014; GAYTÁN et al., 2007). Além disso, já foi demonstrado que a Kp estimula a maturação oocitária *in vitro* de mulheres e bovinos na ausência de gonadotrofinas (OLIVEIRA, 2016), e *in vivo* de mulheres com subfertilidade que fizeram o uso de fertilização *in vitro* (ABBARA et al., 2017; JAYASENA et al., 2014a).

Kisspeptina e seu receptor também são expressos no útero e placenta de mulheres, ratas e cadelas, e o perfil de expressão dessas proteínas no útero canino varia de acordo com o período gestacional, com redução da expressão de Kp durante a gestação (OHTAKI et al., 2001; SCHÄFER-SOMI et al., 2016; TERAO et al., 2004). Em camundongos, a Kp também está envolvida na implantação embrionária e decidualização, via fosforilação das proteínas MAPK, p38 e ERK1/2 (BABA et al., 2014; CALDER et al., 2014; FAYAZI et al., 2015; ZHANG et al., 2014). Em ratas, também já foi verificado sua expressão na tuba uterina, com maior expressão no período de proestro/estro, sugerindo sua participação no processo de fertilização (GAYTÁN et al., 2007). Todos esses estudos comprovam que a sinalização periférica de Kp também é necessária para a reprodução.

É importante ressaltar que embora se tenha demonstrado a expressão de Kp e seu receptor no sistema genital da mulher e de fêmeas domésticas, há escassez de informação sobre o seu papel na morfofisiologia uterina, placentária e ovariana de mulheres e na maioria das espécies domésticas. O dogma que por muito tempo foi aceito é que a progesterona (P4) e estrógenos controlavam totalmente as mudanças cíclicas características do endométrio. Contudo, sugere-se que outros fatores, como a presença da Kisspeptina, também possa influenciar nessa ativação. Estudos

comprovaram que a Kisspeptina influencia o processo de angiogênese *in vitro*, particularmente de vasos sanguíneos placentários, aumentando ou reduzindo a formação deles de forma dose-dependente, via modulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (FRANCIS et al., 2014; GOLZAR; JAVANMARD; DANA, 2014; RAMAESH et al., 2010). Além disso, a Kisspeptina parece estabelecer relações com o sistema imunológico. Foi demonstrado *in vitro* que Kp em células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis favorece a formação de linfócitos T regulatórios (Treg) em detrimento dos linfócitos T17, com aumento da produção de IL10, uma citocina anti-inflamatória, e redução de IL17, com ação pró-inflamatória. Esses dados sugerem que a Kp pode contribuir para a formação da tolerância imune na interface materno-fetal durante a gestação (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014).

Também já foi comprovado que a Kisspeptina reduz a migração de células trofoblásticas *in vitro* (JANNEAU et al., 2002) e que sua administração a ratas em modelo de injúria tecidual por isquemia-reperfusão protege o tecido uterino e ovariano contra estresse oxidativo (ASLAN et al., 2017). Contudo, apesar desses estudos mostrarem seu papel anti-oxidante e possível ação moduladora da angiogênese e resposta imune na interface materno-fetal, nenhuma pesquisa em gata ou outras espécies animais, inclusive na mulher, foi realizada *in vivo* a respeito da expressão de Kp no sistema genital feminino em associação a mediadores angiogênicos e imunológicos. Esses fatores são cruciais na função reprodutiva e estão envolvidos na gênese de diversas condições patológicas que afetam a fertilidade. Entre essas patologias há aborto recorrente, a pré-eclâmpsia e o parto prematuro em mulheres (REYNOLDS; GRAZUL-BILSKA; REDMER, 2002; SHELDON; OWENS, 2017; SILVA; SERAKIDES, 2016) e a piometra em cadelas e gatas (AGUDELO, 2005; JURSZA et al., 2015; NOAKES et al., 2001).

A piometra é uma doença importante do trato genital em cadelas e gatas, e apesar de haver muitos estudos quanto à sua patogênese em cadelas, em gatas as pesquisas são escassas (LAWLER et al., 1991; AGUDELO, 2005; JURSZA et al., 2014, 2015; NOAKES et al., 2001). Como a criação de gatos como animal de companhia vem crescendo exponencialmente nos últimos anos, podendo ultrapassar a população de cães em menos de dez anos, segundo o *World Atlas* e o IBGE de 2017, é salutar a necessidade de mais pesquisas sobre a morfofisiologia reprodutiva

desta espécie animal, não somente no intuito de conhecer melhor sobre a patogênese das doenças que afetam sua fertilidade como também buscar melhores ferramentas terapêuticas e métodos contraceptivos. Além disso, o gato doméstico é um modelo experimental útil para as demais espécies felinas, sobretudo pelo fato de muitas estarem ameaçadas de extinção. Assim, reafirma-se a importância de se estudar o trato genital de gatas domésticas, verificando a expressão do sistema Kiss/Kiss1R ao longo do ciclo estral e na condição de piometra e sua relação com fatores angiogênicos e imunológicos envolvidos na fisiologia reprodutiva.

2. OBJETIVOS

Geral

- Avaliar o perfil de expressão do sistema Kiss1/Kiss1R no sistema genital da gata doméstica ao longo do ciclo estral, na gestação e na condição de piometra e sua relação com a expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos.

Específicos

- Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica de kisspeptina e Kiss1R no útero de gatas durante o ciclo estral, piometra e gestação;
- Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica de VEGF, PIGF e Flk-1 no útero de gatas durante o ciclo estral, piometra e gestação;
- Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica de IL10, INFγ, MIF, IL6 E TNFα no útero de gatas durante o ciclo estral, piometra e gestação;
- Analisar a correlação gênica da expressão do sistema Kiss1/Kiss1R com a expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos no útero de gatas domesticas;
- Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica de kisspeptina e Kiss1R na placenta de gatas gestantes;
- Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica de VEGF, PIGF e Flk-1 na placenta de gatas gestantes;
- Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica de IL10, INFγ, MIF, IL6 E TNFα na placenta de gatas gestantes;
- Analisar a correlação gênica da expressão do sistema Kiss1/Kiss1R com a expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos na placenta de gatas

gestantes.

- Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica de kisspeptina e Kiss1R na foliculogênese de gatas em fase folicular e luteogênese de gatas em diestro e gestantes;
- Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica de VEGF, PIGF e Flk-1 na foliculogênese de gatas em fase folicular e luteogênese de gatas em diestro e gestantes;
- Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica de INFγ e MIF na foliculogênese de gatas em fase folicular e luteogênese de gatas em diestro e gestantes;
- Analisar a correlação gênica da expressão do sistema Kiss1/Kiss1R com a expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos no corpo lúteo da gata doméstica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Reprodução em gatas domésticas

Muito se discute sobre as peculiaridades da reprodução em felinos. Isso porque a gata, assim como égua, ovelha e a cabra, é uma espécie poliéstrica estacional fotopositiva (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; GIMÉNEZ et al., 2006). A estacionalidade reprodutiva nestes animais está diretamente relacionada com o fotoperíodo e controlada pela concentração sérica de melatonina, hormônio derivado da serotonina e sintetizado pela glândula pituitária (MITACEK, 2016). Dias com períodos prolongados de luz, ou seja, com mais de 12 horas de luz, apresentam menor síntese e liberação de melatonina (SCHEER; CZEISLER, 2005) e, consequentemente, liberação pulsátil pelo hipotálamo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). A liberação de GnRH resulta na secreção pulsátil das gonodotrofinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), pela hipófise, que desencadeia a ocorrência dos ciclos estrais (MITACEK, 2016). Estes ocorrem na dependência dos esteroides ovarianos, estrógeno e progesterona, cujos níveis séricos influenciam a liberação de GnRH e das gonadotrofinas, estabelecendo, desta forma, o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG) (ACHERMANN; JAMESON, 1999).

Outro aspecto importante da reprodução da gata é que esses animais fazem parte de um grupo seleto de espécies que apresentam ovulação induzida pela cópula (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; MITACEK, 2016). O estímulo copulatório tem relação direta com a liberação de LH, uma vez que o reflexo neuroendócrino induzido pelo estímulo mecânico dos receptores sensoriais presentes na pele da vulva e vagina resulta no pico de LH (MITACEK, 2016; WILDT; SEAGER; CHAKRABORTY, 1980) Porém, sabe-se que a ovulação em gatas também ocorre na ausência do estímulo mecânico da cópula, por meio da estimulação visual ou cervical (GUDERMUTH et al., 1997; LAWLER et al., 1993), embora com menor frequência.

Assim, por meio do estímulo luminoso e consequente liberação das gonadotrofinas, mudanças na morfofisiologia do sistema genital das fêmeas felinas irão ocorrer, sobretudo no útero e ovários, que serão cruciais para sua função reprodutiva normal (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006).

3.1.1 Morfofisiologia ovariana e uterina e ciclo estral da gata doméstica

A atividade reprodutiva das fêmeas, incluindo a gata, são dependentes do funcionamento orquestrado do útero e dos ovários, que estão sob a influência do eixo HPG. O útero e os ovários sofrem transformações histológicas consideravelmente importantes em cada fase do ciclo reprodutivo e que, por sua vez, também estão relacionadas com as alterações comportamentais da fêmea. Porém, as alterações na morfofisiologia uterina são reflexo da variação cíclica dos esteroides ovarianos, principalmente estrógeno e progesterona, que se apresentam em diferentes concentrações nos estágios do ciclo reprodutivo desses animais (Tabela 1) (CHATDARONG, 2003; CHATDARONG et al., 2005).

Histologicamente, os ovários são formados por uma região cortical e outra medular, sendo que nessa última são encontrados os principais vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas. A cortical, que é revestida pelo epitélio ovariano simples cúbico, apresenta uma túnica albugínea de tecido conjuntivo denso e mais internamente numerosos folículos primordiais, primários e em crescimento; em gatas multíparas, além desses aspectos, é comum a presença de corpo lúteo evidente e/ou corpos *albicans* (Figura 1) (MONTEIRO; KOIVISTO; SILVA, 2006).

Já o útero é separado em três camadas distintas, o perimétrio, mais externo e constituído de tecido conjuntivo frouxo; o miométrio, tecido intermediário composto por fibras musculares lisas; e o endométrio, mais internamente, formado pelo epitélio luminal, pelas glândulas endometriais e tecido conjuntivo frouxo (LOPEZ MERLO et al., 2016). O endométrio, como uma camada mucosa e altamente vascularizada, possui uma zona funcional mais próxima ao lúmen na qual as mudanças histológicas mais acentuadas da variação do ciclo ocorrem, e outra basal, a partir da qual o endométrio se regenera (WESTON; ROGERS, 2000).

Em gatas domésticas pré-púberes ou nulíparas jovens o útero apresenta as três camadas delgadas, com epitélio de revestimento simples cúbico e poucas glândulas no endométrio (MONTEIRO; KOIVISTO; SILVA, 2006), além do lúmen pequeno (CHATDARONG et al., 2005; MONTEIRO; KOIVISTO; SILVA, 2006). Além disso, as glândulas endometriais não estão ativas e se localizam próximas ao ápice das pregas endometriais e revestidas com uma camada cuboide de células (CHATDARONG et al., 2005).

Tabela 1. Níveis séricos de progesterona e estradiol em diferentes estágios do ciclo reprodutivo e gestação da gata doméstica de acordo com a literatura.

Fase	Progesterona (P4)	Estradiol (E2)	Fonte
Gestação (Diestro)	Dia da cópula (indetectável) Dia 11 dpc (22,9 ± 4,1 ng/ ml) Dia 21 dpc (34,9 ± 6,2 ng/ ml) Dia 50 dpc (12,6 ± 0,9 ng/ ml) Antes do parto (4 - 5 ng/ ml) Depois do parto (<1 ng/ ml)	Dia da cópula (60 pg/ ml) Dias 3 e 4 dpc (22 - 30 pg/ ml) Dia 5 dpc (8 -12 pg/ ml) Dia 60 dpc (44 pg/ ml)	**Verhage, Beamer e Brenner (1976)**
Pseudogestação (Diestro)	Primeiros 21 dias (similar à gestação) Dia 21 (pico) (24,6 ± 6 ng/ ml) Dia 40 (4,2 ± 2,5 ng/ ml) Dia 40 – 50 (> 2 ng/ ml) Dia 50 – 62 (≥ 1ng/ ml)	Primeiros 40 dias (similar à gestação) Dia 44 (27 pg/ ml) Dia 56 (34 pg/ ml) Dias 62, 64, 65 e 69 (> 40 pg/ ml)	
Anestro	0,9 ng/ ml	9 pg/ ml	**West, Verhage e Brenner (1977)**
Proestro	0,5 ng/ ml	13 pg/ ml	
Estro	Início (0,2 ng/ ml) Tardio (0,1 ng/ ml)	18 pg/ ml 16 pg/ ml	
Diestro	Dias 2 – 4 (2,0 ng/ ml) Dias 8 – 40 (11,9 ng/ ml)	16 pg/ ml 9 pg/ ml	
Estro e diestro	Dia 0 (estro) (0,1 ± 0,03 ng/ ml) Dia 4 dpc (1,0 ± 0,2 ng/ ml) Dia 7 dpc (7,4 ± 1,9 ng/ ml) Dia 10 - 12 dpc (10,1 ± 3,0 ng/ ml) Dia 14 dpc (10,7 ± 2,7 ng/ ml)	Não avaliado	**Verhage et al. (1984)**
Gestação (Diestro)	Dia 35 (25 ± 3 ng/ ml) Dia 40 (24,1 ± 3 ng/ ml) Dia 45 (14,4 ± 4,2 ng/ ml) Dia 50 (8,5 ± 1,0 ng/ ml)	Não avaliado	**Tsutsui et al. (2009)**
Estro (janeiro a julho)	Não avaliado	Fev (0,077 nmol / l) Mar (0,28 nmol / l) Abr (0,05 nmol / l) Maio (0,124 nmol / l) Jun (0,67 nmol / l) Jul (0,138 nmol / l)	**Katica, Mlaćo e Katica (2014)**
(outubro a dezembro)	Não avaliado	Out (0,093 nmol / l) Nov (0,319 nmol / l) Dez (0,057 nmol / l)	
Gestação (Diestro)	Dia 30 (7,81 ± 5,36 ng/ ml) Dia 40 (8,61 ± 3,88 ng/ ml) Dia 50 (6,61 ± 4,37 ng/ ml) Dia 60 (5,10 ± 2,66 ng/ ml)	Não avaliado	**Ferré-dolcet et al. (2018)**

Em gatas multíparas, por sua vez, o endométrio pode apresentar-se espesso, pregueado, irregular, com revestimento epitelial cúbico a cilíndrico e miométrio espesso ou não, ou seja, há uma variedade maior de características morfológicas resultante das gestações que ocorreram (MONTEIRO; KOIVISTO; SILVA, 2006) e aos vários estágios do ciclo estral que modulam a morfologia deste órgão.

Variações histológicas nos ovários e no útero da gata vão caracterizar os diferentes estágios do ciclo estral, que podem ser divididos em cinco fases distintas, compreendendo um período anovulatório (proestro e estro), um período seguido do estro sem ovulação (interestro), um período antecedente à pseudo-gestação ou gestação (diestro), e um último com cessamento do ciclo reprodutivo (anestro) (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; GRIFFIN, 2001). Histologicamente, nem todas essas fases podem ser facilmente diferenciadas na gata. Por exemplo, as fases de proestro e estro são semelhantes quanto a histologia do ovário e útero, sendo diferenciadas com base na característica clínica e perfil hormonal de estrógeno do animal. Assim, para caracterização histológica, as fases serão apresentadas aqui como anestro; proestro/estro; e diestro (Figura 1).

O **proestro**, com duração entre 1 e 2 dias, é a primeira parte do estágio anovulatório da gata (Figura 1A e 1D). Nesse estágio ocorre crescimento folicular rápido (Figura 1A) sob estímulo do FSH (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; OLIVEIRA et al., 2017), síntese e secreção de estrógenos pelo ovário, além das características comportamentais de esfregar cabeça e pescoço em objetos e atração do macho, mas sem receptividade à cópula (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; GRIFFIN, 2001; OLIVEIRA et al., 2017). Enquanto ocorre o crescimento folicular do estágio secundário para terciário e pré-ovulatório (foliculogênese tônica), sob influência do FSH, as células da granulosa da parede folicular aumentam os níveis séricos de estrógeno levando à uma mudança comportamental da fêmea felina, queratinização vaginal e, consequentemente, ao estágio de estro com receptividade ao macho (SHILLE; LUNDSTROM; STABENFELDT, 1979). No útero, por sua vez, é evidente um aumento no número de glândulas endometriais (Figura 1D), caracterizando um estágio de proliferação endometrial.

O **estro**, ou cio propriamente dito, é a segunda parte do estágio anovulatório (Figura 1A e 1D), apresentando duração média de 7 dias. É o período no qual a fêmea está receptiva ao macho devido aos maiores níveis séricos de estrógeno produzido

pelos ovários (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; GRIFFIN, 2001; OLIVEIRA et al., 2017). Todas essas alterações hormonais são importantes para a vascularização e crescimento do endométrio, principalmente das glândulas endometriais (Figura 1D) (OLIVEIRA et al., 2017). O epitélio luminal uterino apresenta células colunares pseudoestratificadas e as glândulas endometriais superficiais e profundas encontram-se ramificadas e em proliferação (CHATDARONG et al., 2005; LIMAN et al., 2012). No estro, sob estímulo do estrógeno, o endométrio geralmente apresenta dobraduras ou criptas, que tem seu número e profundidade aumentados sensivelmente (LIMAN et al., 2012). É comum que ao fim do estro não ocorra a ovulação, o que leva as fêmeas felinas a reduzirem a síntese de estrógenos a níveis basais, resultando em um período que dura entre 1 e 3 dias, com ausência de receptividade ao macho, chamado de **interestro** (GRIFFIN, 2001; OLIVEIRA et al., 2017), e aparente quiescência ovariana e uterina (OLIVEIRA et al., 2017).

Caso ocorra a ovulação, o ciclo segue para o estágio de **diestro** (Figura 1B e 1E), com duração de 60 dias caso a gata fique gestante (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; OLIVEIRA et al., 2017). Neste período, há elevação dos níveis séricos de progesterona, devido à formação do corpo lúteo no ovário (FELDMAN; NELSON, 1996; GRIFFIN, 2001; ZSCHOCKELT et al., 2014). O corpo lúteo é uma glândula endócrina transitória, formado pela luteinização das células da granulosa e da teca interna da parede folicular, que sofre mudanças morfológicas ao longo do seu estágio funcional (Figura 2) (AMELKINA et al., 2015). Quando jovem, o corpo lúteo apresenta células luteais compactas e eosinofílicas (LIMAN et al., 2012) e, quando totalmente maduro, é composto por células luteais volumosas, além de algumas células mononucleares (linfócito e macrófago) (STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007). Em um estágio mais tardio, apresenta aparente vacuolização nas células luteais (LIMAN et al., 2012), além de fibroplasia discreta a partir do seu centro. Apesar da presença do corpo lúteo, o ovário da gata continua a apresentar crescimento folicular, diferente de outras espécies animais domésticas como fêmeas bovinas (GINTHER et al., 1997; GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; SARTORI et al., 2016) e pequenos ruminantes (GINTHER; KOT, 1994; RUBIANES; MENCHACA, 2003; URIBE-VELÁSQUEZ et al., 2002), em que o crescimento folicular não ocorre na presença de corpo lúteo.

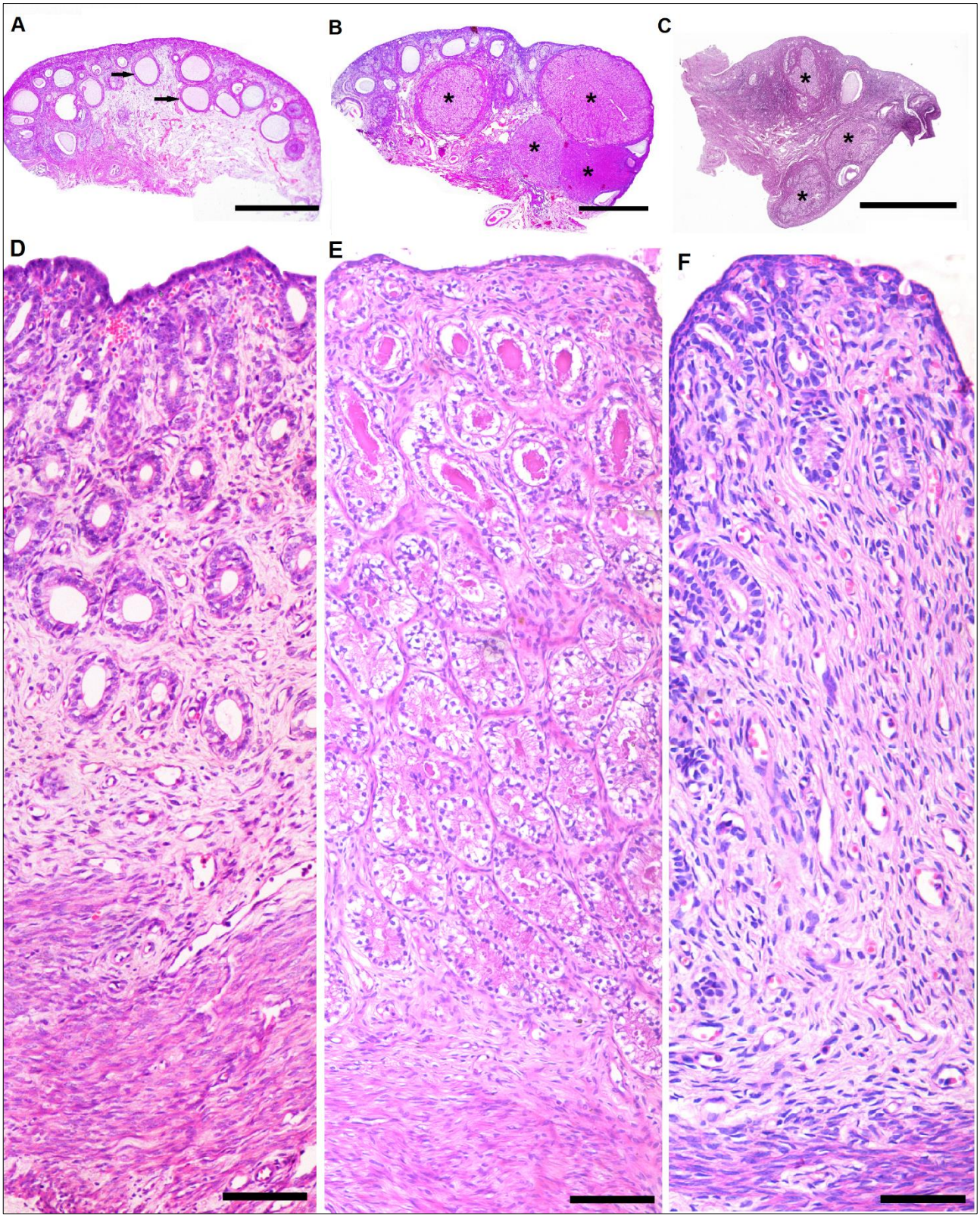

Figura 1. Caracterização da histologia uterina e ovariana das fases do ciclo estral da gata doméstica. Proestro/estro – ovário (A) com evidente crescimento folicular e folículos pré-ovulatórios (setas), e útero (D) com numerosas glândulas em crescimento; diestro – ovário (B) com corpos lúteos ativos (asteriscos), e útero (E) com glândulas endometriais em atividade secretória (lúmen com conteúdo eosinofílico) e apresentando epitélio vacuolizado; e anestro – ovário (C) sem crescimento folicular evidente e presença de corpos *albicans* (asteriscos), e útero (F) com poucas glândulas endometriais. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; Barra = 2000 µm (A-C); 50 µm (D-F)). Fonte: Arquivo pessoal.

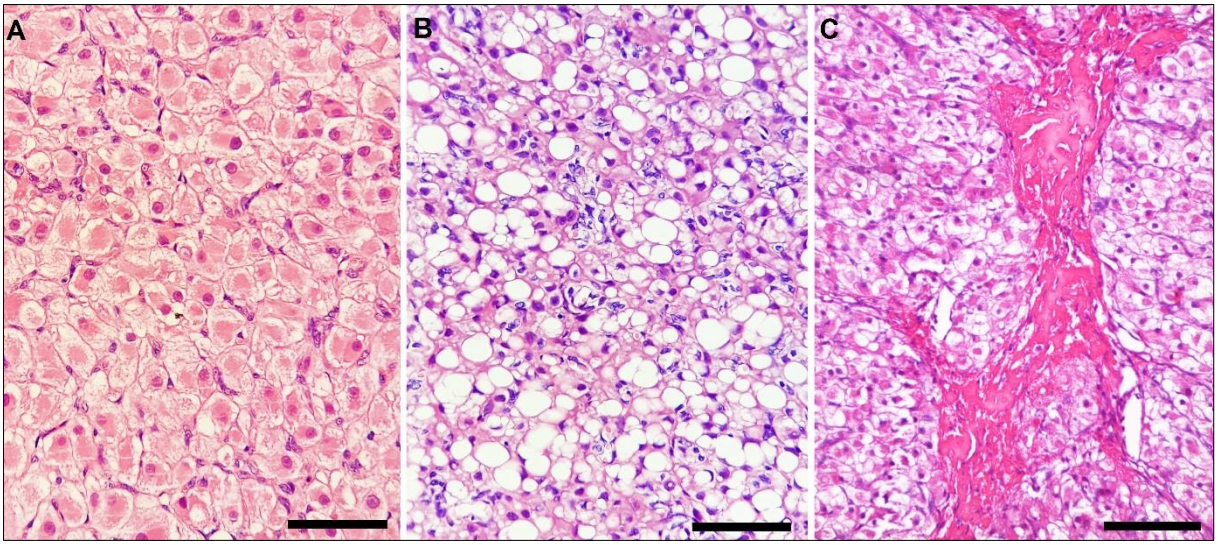

Figura 2. Principais estágios de maturação do corpo lúteo. (A) Corpo lúteo maduro apresentando células luteínicas volumosas e eosinofílicas; (B) Corpo lúteo tardio com vacuolização das células luteínicas; (C) Corpo lúteo em regressão (corpo *albicans*) apresentando células luteínicas menores, retraídas, com formação de tecido fibroso central. (Coloração: Hematoxilina e Eosina; Barra= 50µm). Fonte: Arquivo pessoal.

Há casos de gatas que ovulam, não ficam gestantes, mas apresentam sinais comportamentais e clínicos de animais gestantes, período chamado de **pseudogestação** (GRIFFIN, 2001; OLIVEIRA et al., 2017), um estado longo de atividade luteal com duração de 40 dias (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; SILVA et al., 2017). Na presença do corpo lúteo, ou seja, em animais em diestro não-gestantes, gestantes e pseudogestantes, as mudanças na morfologia uterina incluem o epitélio luminal com células colunares altas, por vezes com aspecto pseudoestratificado ou hiperplásicas, além de glândulas numerosas e ramificadas até a base do endométrio (CHATDARONG et al., 2005; LIMAN et al., 2012), com dilatação discreta a moderada do seu lúmen. Além disso, com o avançar do diestro, as glândulas sofrem um processo fisiológico degenerativo caracterizado por aparente vacuolização (Figura 1E), que começa desde as glândulas profundas da base (início do diestro) até as próximas ao ápice do endométrio (final do diestro), além de atividade secretória caracterizada pelo acúmulo de conteúdo no seu lúmen e acúmulo de fluidos no interior do útero (BAITHALU; MAHARANA; MISHRA, 2010; OLIVEIRA et al., 2017). Essas alterações ocorrem sob a influência da progesterona, que age inibindo a síntese de GnRH pelo hipotálamo que, por sua vez, cessa a síntese de LH e FSH pela adenohipófise (GRIFFIN, 2001). A progesterona produzida pelo corpo lúteo vai

permitir que o útero se prepare para uma possível gestação, uma vez que reduz a resposta imunológica local, inibe a contratilidade do miométrio e causa o fechamento da cérvix (OLIVEIRA et al., 2017).

Na ausência de fecundação ou no final da gestação, o corpo lúteo regride (GRIFFIN, 2001), deixando um remanescente cicatricial no tecido ovariano, o corpus *albicans*, que será reabsorvido (AMELKINA et al., 2015). Apesar da diferença no tempo de funcionalidade do corpo lúteo entre animais não-gestantes em diestro e gestantes, foi demonstrado por histomorfometria que essa glândula, em ambos os casos, passa por um período de desenvolvimento e regressão semelhantes, partindo de um estágio inicial de formação luteal, seguido do desenvolvimento/manutenção, regressão precoce ou tardia e formação do corpo *albicans* (AMELKINA et al., 2015).

Com a regressão funcional e estrutural do corpo lúteo, segue-se um período de **anestro** (Figura 1C e 1F), fase de inatividade do ciclo reprodutivo que ocorre quando há diminuição nas horas diárias de luz natural (OLIVEIRA et al., 2017), com níveis de estrógeno e progesterona basais e elevação dos níveis de melatonina e prolactina (GOBELLO et al., 2003; LIMA, 2009). Esse perfil hormonal resulta em uma fase com ausência de características comportamentais de atração e receptividade aos machos (GRIFFIN, 2001). Nessa fase, o ovário não contém folículos maduros e corpo lúteo (Figura 1C), e o endométrio é revestido por epitélio luminal delgado, com duas ou três camadas de glândulas inativas, localizadas próximo ao ápice do endométrio, além de uma maior proporção de células estromais (Figura 1F) (LIMAN et al., 2012). Nesse estágio, portanto, a morfologia uterina e ovariana reflete a inatividade do ciclo.

3.1.2 Placenta e placentação

A placenta é uma estrutura complexa presente nos mamíferos eutérios[1] (CARTER; MESS, 2014; CHEN; ZHENG, 2014) que se estabelece em todas as regiões onde as membranas fetais se opõem ou se fundem com o tecido uterino adjacente com o objetivo de realizar a troca materno-fetal, já que a placenta aumenta o contato entre essas superfícies (LEISER; KAUFMANN, 1994). Mesmo exercendo essa mesma função primária, existem importantes diferenças macro e microscópicas nessa estrutura dentre os mamíferos placentários. Essa diversidade ocorre

[1] Eutheria é uma classe de mamíferos que possue placenta propriamente dita. Difere das outras classes (Metatheria e Monotremata) que possuem outros modelos de placentação (CARTER; MESS, 2014).

principalmente por influência de vários fatores que estão envolvidos no desenvolvimento extraembrionário como o estágio anaeróbico inicial, a interação entre o concepto e o útero, e os diferentes sistemas placentários (ENDERS, 2009).

Baseando em classificações pré-estabelecidas (KING, 1992; LEISER; KAUFMANN, 1994; LEISER; KOOB, 1993), a diversidade de placentas inclui o tipo e a quantidade de membranas fetais envolvidas na sua formação; a forma macroscópica do órgão; o padrão microscópico de interdigitação das superfícies epiteliais das partes materna e fetal; o tipo e quantidade de camadas de tecido que separam o sangue materno do fetal; e os arranjos dos vasos nessas duas partes. Na gata doméstica, apesar de existirem poucas descrições detalhadas dos componentes placentários, essas classificações mais gerais estão bem estabelecidas e são compartilhadas pela maioria dos carnívoros (Tabela 2).

Em relação à forma macroscópica da placenta, na gata ela se apresenta como um cinturão ao redor do saco coriônico, antes chamada apenas de **placenta zonária** ou de cintura (LEISER; KAUFMANN, 1994) (Figura 3 A), e hoje conhecida também como zonária do tipo anelar/circular, já que a placenta zonária também pode apresentar outros formatos na região de troca, discoidal e cotiledonária, visto em humanos/roedores e ruminantes, respectivamente (KING, 1992; LEISER; KAUFMANN, 1994; WOODING; BURTON, 2008).

Tabela 2. Características morfológicas da placenta de gatas domésticas.

Característica da placenta	Padrão na gata doméstica
Forma macroscópica	Zonária ou de cintura (anelar/circular)
Interdigitação materno-fetal	Lamelar
Membrana interhemal	Endotéliocorial
Arranjo dos vasos sanguíneos materno-fetais	Fluxo contracorrente simples

Fonte: Adaptado de Leiser e Koob (1993)

Sobre a forma da interdigitação materno-fetal, a gata apresenta uma estrutura complexa e ramificada, do tipo **lamelar** (LEISER; KAUFMANN, 1994; LEISER; KOHLER, 1984; LEISER; KOOB, 1993) (Figura 3 B-D), que se estende desde a base do endométrio, onde é aderida, até a sua superfície na qual se distribuem os grandes vasos sanguíneos maternos. O processo inicial de formação das lamelas acontece pela entrada de células do córion no endométrio que se alongam e se alternam com o tecido materno (LEISER; KOOB, 1993).

As lamelas são projeções uterinas que crescem em direção ao embrião como finas dobras e forradas pelo sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto. Dentre seus componentes estruturais, há uma quantidade moderada de células estromais e vasos sanguíneos maternos (Figura 3 G-J). Além desses, o estroma dessas lamelas contém algumas células volumosas que se espalham ao longo do comprimento e ao redor dos vasos sanguíneos maternos e entre os trofoblastos (Figura 3 I; ponta da seta). Essas células, encontradas com menor frequência em cães e presentes também na placenta de ruminantes, foram chamadas de “gigantes” ou “deciduais”, porém sua origem e funções ainda são incertos (WOODING; BURTON, 2008). Para verificar se essas células são de origem trofoblástica ou uterina, por meio de imunomarcação utilizando o anticorpo anti-citoqueratina básica (sc-57004, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA; diluição 1:400), verificamos não-reatividade dessas células para o anticorpo usado (Figura 3 K-L). Assim, confirmamos que essas células não são trofoblásticas e que sua origem é uterina (dados não publicados).

Externamente à zona lamelar, células do córion se distribuem cobrindo toda sua extensão e, em meio a essa camada coriônica, vasos sanguíneos fetais se associam em proximidade aos trofoblastos. Toda essa estrutura que envolve lamelas, células do córion e vasos fetais tende a aumentar a complexidade ao longo da gestação, seja pelo aumento da quantidade de células ou pela alta ramificação das lamelas e vascularização (Figuras 3 H e 3 J).

Quanto às camadas de membrana interhemal, a gata apresenta placentação do tipo **endotéliocorial**, o que significa um contato mais íntimo do epitélio do trofoblasto que invade o endométrio, com o endotélio dos vasos sanguíneos maternos (CARTER; ENDERS, 2004; ENDERS; CARTER, 2012; KING, 1992; LEISER; KAUFMANN, 1994). Estudos ultraestruturais mostram variações no trofoblasto na área interhemal de placentas endotéliocoriais que, no caso dos carnívoros, o trofoblasto é sincicial, um tipo não-fenestrado dessas células (CARTER; ENDERS, 2004; ENDERS; CARTER, 2012). Nesse tipo de placentação não se tem uma separação clara entre as partes materna e fetal como ocorre na placenta epiteliocorial que apresenta pouca reação decidual. Na placenta endoteliocorial e, mais acentuadamente na hemocorial, há uma maior invasão trofoblástica levando a uma reação decidual moderada e alta, respectivamente. Isso dificulta a separação tecidual e causa rompimento de alguns vasos sanguíneos maternos, causando algumas

lesões e sangramento no momento do desprendimento do tecido placentário durante o parto (LEISER; KAUFMANN, 1994).

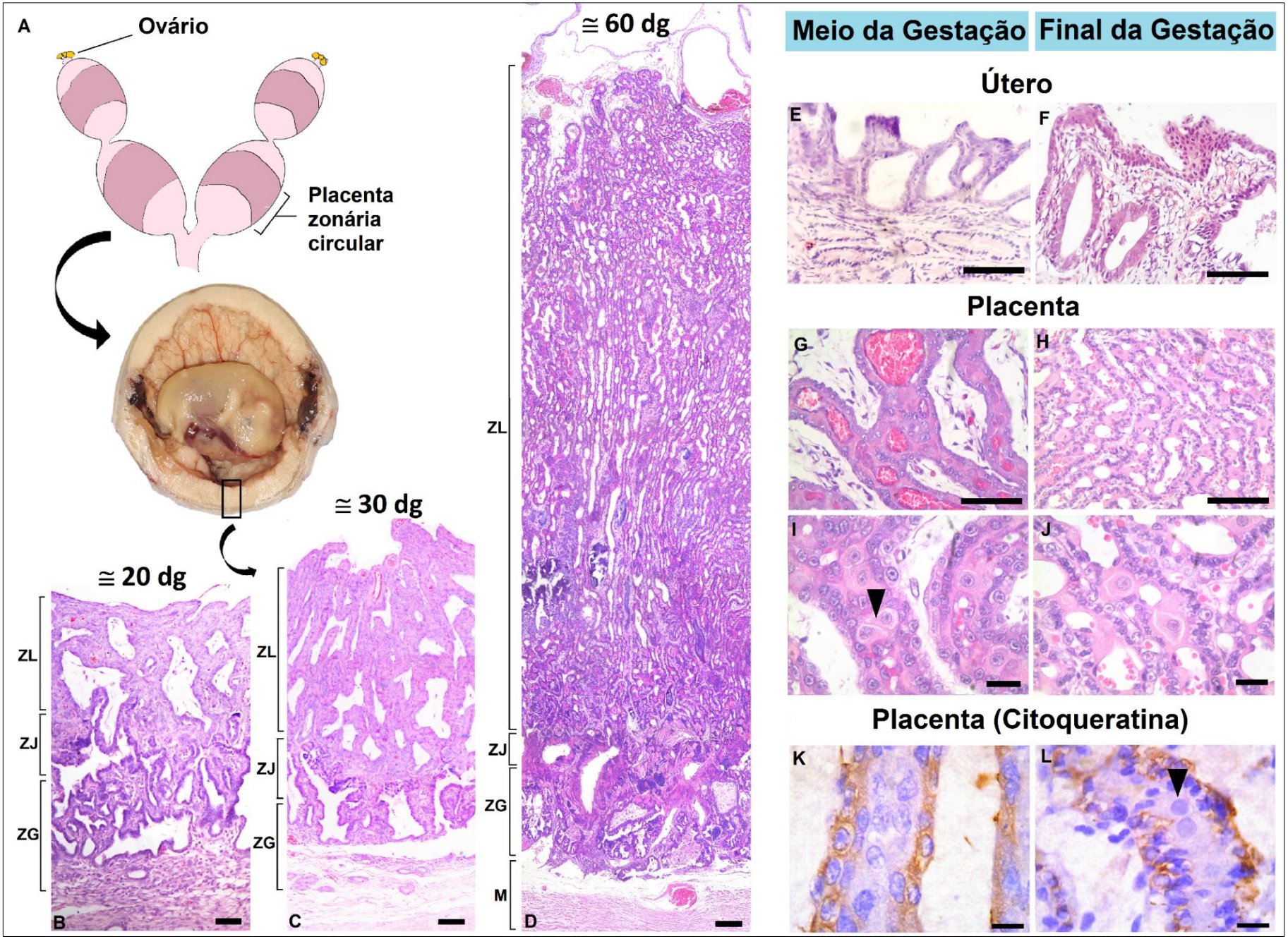
A
Ovário
Placenta
zonária
circular
≅ 20 dg
≅ 30 dg
≅ 60 dg
ZL
ZJ
ZG
M
B
C
D
Meio da Gestação
Final da Gestação
Útero
E
F
Placenta
G
H
I
J
Placenta (Citoqueratina)
K
L

Figura 3. Placenta zonária circular endoteliocorial da gata doméstica. (A) Caracterização macroscópica: região circular da placenta. (B) Histologia de placenta com aproximadamente 20 dias de gestação (20 dg). (C) Histologia de placenta com aproximadamente 30 dias de gestação (30 dg). (D) Histologia de placenta com aproximadamente 60 dias de gestação (60 dg). (E e F) Histologia endometrial no meio e final da gestação. (G e I) Organização lamelar da placenta no meio da gestação. (H e J) Organização lamelar da placenta no final da gestação. (K e L) Imunomarcação de citoqueratina básica no citotrofoblasto e sincíciotrofoblasto (Estreptavidina-biotina-peroxidase, diluição 1:400). (Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra: B, C e D = 100 µm; E e F = 50 µm; G-L = 20 µm; Siglas: ZL = Zona lamelar; ZJ = Zona juncional; ZG = Zona glandular; e M = Miométrio)). Fonte: Arquivo pessoal.

Na placentação endotéliocorial, logo após o contato celular e interdigitação entre o trofoblasto e o epitélio uterino (por volta do 13º dia de gestação), as células do trofoblasto se juntam ao endotélio materno. Porém, essa camada não é uniforme e nem contínua, permitindo que projeções citoplasmáticas do sincíciotrofoblasto fetal penetrem e estabeleçam relações de proximidade com os vasos maternos (WOODING; BURTON, 2008). Com cerca de 20 dias de gestação, a placenta corioalantoica já está estabelecida. Já o saco vitelino, que fazia parte do processo de placentação, distancia-se do córion devido ao crescimento acelerado do alantoide (WOODING; BURTON, 2008)

A última classificação para as placentas diz respeito ao arranjo dos vasos sanguíneos materno-fetais. A gata doméstica, com padrão de placentação endoteliocorial, apresenta arranjo dos vasos do tipo **contracorrente simples** (LEISER; KAUFMANN, 1994), ou seja, o fluxo sanguíneo é perpendicular. Além dessas características, as placentas apresentam regiões marginais e acessórias conhecidas como **paraplacentas**, localizadas fora da zona principal e formadas principalmente pelo córion e alantoide. Essas regiões são importantes para o desenvolvimento do concepto (CARTER; ENDERS, 2016; KING, 1992). Na gata, a zona marginal do córion, ou seja, a paraplacenta, sobrepõe uma região de epitélio uterino “preservado” onde estão localizadas pequenas **aréolas** que apresentam glândulas endometriais com funções nutritivas (CARTER; ENDERS, 2016; KING, 1992; WOODING; BURTON, 2008). Há também dobraduras e pregas na paraplacenta que atuam na captura de detritos celulares por fagocitose e pinocitose advindos do epitélio uterino, que são posteriormente absorvidos pelo trofoblasto (LEISER; ENDERS, 1980).

Além dessas estruturas, algumas partes da paraplacenta vascular na gata doméstica são formadas por **regiões hemófogas**, que ocorrem mais frequentemente na região marginal em relação ao centro da estrutura zonária (CARTER; ENDERS,

2016; LEISER; ENDERS, 1980)(WOODING; BURTON, 2008). Essas regiões têm funções metabólicas importantes como a liberação de ferro citoplasmático (BROLIO; AMBRÓSIO; FRANCIOLLI, 2010) e possuem características próprias em cada espécie (WOODING; BURTON, 2008).

Apesar das funções e morfofisiologia da placenta nos felinos não estarem profundamente esclarecidas, hoje se sabe que, diferente de outras espécies, na gata, a produção de estrógenos e progesterona pela placenta não reflete em níveis séricos, o que pode estar relacionado com a produção maior desses hormônios pelos corpos lúteos (BRAUN et al., 2012; TSUTSUI et al., 2009). Além disso, sugere-se que a elevação dos níveis séricos de progesterona durante a fase luteal esteja relacionada com a alta expressão no corpo lúteo de fatores como as enzimas 3 beta-hidroxiesteroide desidrogenase (3βHSD) e a proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR), envolvidas na síntese de progesterona (SIEMIENIUCH et al., 2012).

3.2 Mediadores angiogênicos e imunológicos na morfofisiologia reprodutiva da fêmea

Os fatores ou mediadores angiogênicos e imunológicos são fundamentais na morfofisiologia do sistema genital feminino, pois são requeridos e participam de vários processos normais do ciclo reprodutivo e gestação (SMITH, 2001). Desse modo, alterações na expressão desses mediadores estão associadas a diversas condições patológicas como aborto recorrente, a pré-eclâmpsia e o parto prematuro em mulheres (REYNOLDS; GRAZUL-BILSKA; REDMER, 2002; SHELDON; OWENS, 2017; SILVA; SERAKIDES, 2016) que podem resultar em subfertilidade ou infertilidade e, inclusive, na morte do indivíduo.

3.2.1 Angiogênese

Angiogênese é o nome dado ao crescimento de vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes, diferente de vasculogênese, que é o estabelecimento dos vasos sanguíneos no embrião e feto por diferenciação dos angioblastos (DOUGLAS et al., 2005; SMITH, 2001; WESTON; ROGERS, 2000). Antes se pensava que angiogênese era tão rara de ocorrer no adulto quanto a vasculogênese. Porém, com o avançar dos estudos, foi demonstrado que o primeiro é bem comum, sobretudo no ciclo reprodutivo

da fêmea em que praticamente todos os eventos (menstruação, foliculogênese, ovulação, implantação, placentação e outros) são dependentes da formação de novos vasos sanguíneos (SMITH, 2001; WESTON; ROGERS, 2000).

Esses eventos de formação de novos vasos sanguíneos são coordenados e dependem do envolvimento de diversos fatores de crescimento locais (PINHO, 2005; SMITH, 2001). Esses fatores vão promover a ativação, proliferação e migração das células endoteliais, a degradação de membrana basal, além de permitir a adesão e formação do novo vaso sanguíneo. Para cada componente do sistema genital feminino, vários desses fatores atuam e estão sendo descritos nas espécies domésticas. Dentre esses, um dos mais importantes e mais estudados é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), visto que é um potente estimulador da proliferação dessas células e expresso em todos os tecidos (WESTON; ROGERS, 2000). Hoje, porém, sabe-se que existem outras isoformas de VEGF atuantes nos mais diversos órgãos, a exemplo do fator de crescimento placentário (PIGF), e outros promotores da angiogênese como o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de necrose tumoral alfa (TNFα), o fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas (PD-ECGF), a leptina (WESTON; ROGERS, 2000), entre outros.

No útero são expressos todos os fatores de crescimento envolvidos na estimulação ou inibição da angiogênese (SMITH, 1998), e a fase inicial do ciclo reprodutivo requer um complexo e rápido processo angiogênico, uma vez que é nessa etapa que ocorre o espessamento do endométrio com preparação para uma possível implantação (WESTON; ROGERS, 2000). Foi demonstrado que o VEGF é produzido no endométrio ao longo do ciclo reprodutivo de mulheres e animais, com uma alta expressão na fase secretora, principalmente nas glândulas (WESTON; ROGERS, 2000).

Na gata doméstica, o útero e a placenta expressam VEGF junto ao fator 1 induzido por hipóxia (HIF1), um gene que atua na angiogênese estimulando a atividade do VEGF (AGAOGLU et al., 2015). Estudos também observaram na gata a expressão uterina do fator ativador de plaqueta (PFA) e seu receptor (PFA-R) no período de pré-implantação, implantação e ao longo da gestação, que são funcionalmente importantes no início da gestação (AĞAOĞLU et al., 2013). O fator de crescimento epidermal (EGF) também foi descrito no útero de gata gestante

(AGAOGLU et al., 2016), uma citocina multifuncional que atua estimulando a angiogênese (DEMIR; YABA; HUPPERTZ, 2010).

Em relação ao ovário, a angiogênese é também um processo essencial para o bom funcionamento desse órgão, já que uma adequada formação da rede vascular permite a disponibilização de oxigênio, nutrientes e hormônios, além da sua característica cíclica (AYRES; MINGOTI, 2012). No folículo, as células da granulosa são a principal fonte de fatores angiogênicos (AYRES; MINGOTI, 2012) e o desenvolvimento dos folículos primordiais (avasculares) dependem, a princípio, da proximidade dos vasos sanguíneos presentes no estroma para sua nutrição (DOUGLAS et al., 2005). Apesar disso, as mudanças mais drásticas que envolvem a angiogênese ovariana se concentram durante o período da ovulação (GOEDE et al. 1998).

A partir do momento da ruptura do folículo, inicia-se a formação do corpo lúteo, estrutura que requer angiogênese e reorganização dos vasos sanguíneos para o desenvolvimento de sua função endócrina (DOUGLAS et al., 2005; FRASER; LUNN, 2000), como a síntese e liberação de progesterona ao restante do corpo (SMITH, 2001). Nesse sentido, a fase luteal, pela alta proliferação de células endoteliais, está associada a um intenso processo de angiogênese ovariana (WULFF et al., 2001).

Em humanos, a expressão ovariana de VEGF é bem conhecida (FERRARA et al., 2003; WULFF et al., 2000, 2001; YAMAMOTO et al., 1997; YAN et al., 1993). Nos animais domésticos, estudos também mostraram sua expressão em ovários de equinos (AL-ZI'ABI; WATSON; FRASER, 2003), ovinos (REDMER et al., 1996, 2001), bovinos (BERISHA et al., 2000; NEUVIANS; BERISHA; SCHAMS, 2004; SCHAMS; BERISHA, 2004), búfalos (PAPA et al., 2007) e cadelas (MARIANI et al., 2006). Apesar disso, até o momento, não há dados na literatura sobre a expressão de mediadores angiogênicos ou funções esclarecidas desses fatores no ovário de gatas domésticas.

Além do útero e ovário, a angiogênese é um processo igualmente essencial nos processos de implantação e desenvolvimento placentário nos mamíferos. Dentre os fatores que regulam a angiogênese placentária estão o VEGF/PIGF, o FGF e as angiopoietinas (ANGs), sendo os primeiros com maior participação (REYNOLDS; REDMER, 2001). Tanto na parte materna como na fetal, há um extenso desenvolvimento de vasos sanguíneos que variam em intensidade ao longo da

gestação (CHEN; ZHENG, 2014; REYNOLDS; REDMER, 2001). Em humanos, VEGF, seus receptores VEGFR1 (Flt-1) e VEGFR2 (Flk-1/KDR), além do PIGF, são diferentemente expressos ao longo da gestação (AHMED et al., 2000). Enquanto a expressão de VEGF e Flk-1 é relativamente mais intensa no início da gestação (JACKSON et al., 1994; SHIRAISHI et al., 1996; VUCKOVIC et al., 1996), PIGF e Flt-1 estão elevados na placenta a termo (CLARK et al., 1996).

3.2.2 Mediadores imunológicos

O sistema imunológico tem atuação essencial no sistema genital feminino e vários processos são dependentes de seus componentes celulares. No período em que as fêmeas se encontram em diestro, há um recrutamento intenso de células leucocitárias para o útero edemaciado e preparado para uma possível gestação. Essas células são úteis, por exemplo, para diagnóstico dessa fase do ciclo a partir de citologias vaginais, onde sua proporção é predominante (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2005).

Durante a gestação, mudanças morfológicas no endométrio também são acompanhadas de alterações significativas no número de células leucocitárias, podendo estar relacionadas com a implantação (SLUKVIN; BREBURDA; GOLOS, 2004) e manutenção da gestação. Em primatas, foi visto que o número de macrófagos aumenta intensamente próximo ao sítio de implantação - decídua basal - continuando elevado ao longo da gestação (SLUKVIN; BREBURDA; GOLOS, 2004), assim como aumenta o número de eosinófilos e de Células *Natural Killer* uterinas (uNK) (HUNT; PETROFF; BURNETT, 2000). No estroma das vilosidades placentárias há também um número maior de macrófagos em comparação a outras células leucocitárias, responsáveis por secretar citocinas inflamatórias como interleucina-1 (IL1) e TNFα durante o parto (ALVES et al., 2009).

Além de modificações no número dessas células, existem outras mudanças necessárias nas funções dos leucócitos com o advento da gestação. Estas incluem a defesa contra agentes infecciosos externos, ao mesmo tempo que permitem que células e tecidos geneticamente diferentes (células fetais) residam no mesmo ambiente uterino sem que haja a destruição dessas células (HUNT; PETROFF; BURNETT, 2000). Dessa forma, um sofisticado balanço no sistema imunológico é

necessário para desenvolvimento e manutenção da gestação (para revisões, ver Arck e Hecher (2013); Förger e Villiger (2020); e Robertson; Care; Moldenhauer (2018)).

De forma geral, o sistema imunológico está sob estímulo dos hormônios ovarianos, como a progesterona e os estrógenos. Isso porque a progesterona está associada à manutenção e viabilidade celular, enquanto os estrógenos são importantes para promover a migração dessas células no tecido uterino (HUNT; PETROFF; BURNETT, 2000).

Macrófagos, linfócitos B, linfócitos T $CD8^+$ e $CD4^+$ são também encontrados no estroma endometrial e tecido conjuntivo miometrial de humanos e roedores, exibindo algumas diferenças. Enquanto agregados de linfócitos são menos frequentes no endométrio, roedores apresentam abundância de macrófagos, células uNK indiferenciadas e mastócitos (HUNT; PETROFF; BURNETT, 2000). Esses macrófagos são ativados por células que apresentam o complexo de histocompatibilidade principal do tipo II (MHC-II) e, quando ativados, produzem uma variedade de citocinas e fatores de crescimento pro e anti-inflamatórios (HUNT; PETROFF; BURNETT, 2000).

Um dos ativadores mais típicos dos macrófagos é o Interferon gamma (INFγ). É uma citocina que atua no sistema imunológico sinalizando infecções, amplificando a apresentação do antígeno às células T, ativando macrófagos e células B, alterando as células T e promovendo a apoptose (PRIYANKA; MURALIDHARAN, 2014). Além das funções no sistema de defesa do organismo, as funções dessa citocina durante a gestação e em condições patológicas como pré-eclâmpsia em modelos experimentais (roedores) e humanos, e piometra em cães e gatas estão sendo esclarecidas. Hoje se sabe que o INFγ contribui para o início do remodelamento vascular uterino, integridade decidual e maturação de uNK durante a gestação normal de camundongos (ASHKAR; SANTO; CROY, 2000). Além disso, diminui a expressão do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) no útero, ovário e sangue periférico de ratas no início da gestação, sugerindo um papel regulatório nesse período (SI et al., 2011). Estudos mostraram também que o INFγ atua em células endoteliais microvasculares uterinas humanas regulando positivamente ou negativamente diversos genes (Tabela 3) (KITAYA et al., 2007), além de estar envolvido em complicações gestacionais como na pré-eclâmpsia, no aborto espontâneo e na restrição de crescimento intrauterino (BANERJEE et al., 2005; CHEN et al., 2015).

Além do INFγ, outra citocina que tem sido associada a funções no sistema imunológico do sistema genital é o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF). O MIF é uma citocina multifuncional que faz parte da regulação da resposta imune inata e adaptativa, participando essencialmente do processo de inflamação, afetando a resposta de macrófagos e linfócitos em condições normais ou patológicas (SILVA, 2014). Ela pode ser encontrada tanto em células do sistema imunológico quanto nos tecidos periféricos como pulmões, epitélios, tratos gastrointestinal e gênito-urinário, ou seja, órgãos em contato com o meio externo (CALANDRA; ROGER, 2003).

Tabela 3. Genes regulados pelo INFγ em células endoteliais microvasculares uterinas humanas.

Regulados positivamente		**Regulados negativamente**	
CXCL9	Ligante 9 de quimiocina CXC	CSF2	Fator estimulador de crescimento de colônias de macrófagos-granulócitos 2
CXCL10	Ligante10 de quimiocina CXC		
CCL8	Ligante 8 de quimiocina CCL	IL1R2	Receptor de interleucina 1 (tipo II)
IL15RA	Subunidade alfa do receptor de interleucina 15	SPP1	Fosfoproteína Secreta 1
CCL5	Ligante 5 de quimiocina CCL	WISP2	Proteína 2 da via de sinalização indutível WNT1
GBP5	Proteína 5 de ligação ao guanilato	IGFBP3	Proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 3
TAP1	Transportador 1	CCNA1	Ciclina A1
CYP27B1	Citocromo p450 27B1		
SOD2	Superóxido dismutade 2		
MX1	Myxovirus (vírus da gripe) resistência 1		
CASP1	Caspase 1		
PTGES	Prostraglandina sintetase E		
TFAP2C	Fator de transcrição AP-2 γ		
IRF1	Fator regulador do interferon 1		
NFE2L3	Fator nuclear (derivado de eritroide 2) - 3		

Fonte: Adaptado de Kitaya et al. (2007)

Apesar do MIF não ter sido, até o momento, relatado no trato genital de gatas domésticas, pesquisas indicam sua expressão e possíveis funções na implantação e placentação de mulheres e roedores. O MIF é expresso no endométrio de mulheres em diferentes fases do ciclo menstrual e gestação (ARCURI et al., 2001), assim como

na placenta, principalmente no início da gestação (ARCURI et al., 1999, 2006; IETTA et al., 2007). A expressão dessa citocina também foi descrita na placenta de camundongos, apresentando maior expressão por volta do 10.5º dia de gestação, período no qual há o estabelecimento das três regiões características desse tipo de placenta (FARIA et al., 2010). Achados nesses órgãos sugerem a participação crucial do MIF no período de implantação e placentação, sobretudo pela sua ação moduladora no sistema imunológico e seu papel pró-angiogênico.

Além de MIF e INFγ, interleucinas (IL) também representam um grupo de mediadores importantes para o organismo na ativação ou inibição do sistema imunológico. Dentre as interleucinas que participam da resposta imunológica estão IL1, IL6, IL8, IL9, IL10 e IL17, além do TNFα. Várias dessas citocinas foram descritas e comparadas em gatos domésticos normais e com doenças alérgicas de pele (TAGLINGER et al., 2008). No trato genital, sobretudo no útero e ovário, tais mediadores imunológicos foram pobremente estudados. Até o momento, foram descritos em útero de felino gestante o fator estimulador de crescimento de colônias de macrófagos-granulócitos (GM-CSF), o fator de crescimento transformador beta (TGFβ), o fator de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF-2), o INFγ, e a metaloproteinase de matriz 2 (MMP2), demonstrando que esses mediadores são importantes e requeridos nos eventos de implantação, migração trofoblástica e vascularização (AGAOGLU et al., 2016). Além disso, o endométrio de gatas domésticas expressa TNFα e seus receptores (TNFR1 e TNFR2) no estro, diestro e na condição de piometra (JURSZA et al., 2014a).

Estudos têm mostrado também que há uma variedade de fatores que estão relacionados ao sistema imunológico. Um desses fatores que parece estabelecer relações com o sistema imunológico é a Kisspeptina (Kp). Foi demonstrado *in vitro* que Kp em células mononucleares do sangue periférico de mulheres gestantes favorece a formação de linfócitos T regulatórios (Treg) em detrimento dos linfócitos T17, com aumento da produção de IL10, uma citocina anti-inflamatória, e redução de IL17, com ação pró-inflamatória. Esses resultados sugerem que a Kp pode contribuir para a formação da tolerância imunológica na interface materno-fetal durante a gestação (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014).

3.3 O sistema Kisspeptina/Kiss1R no trato genital de fêmeas

A kisspeptina é um peptídeo pertencente ao grupo dos peptídeos codificados pelo gene *Kiss1*, tendo atuação por meio da ligação e ativação subsequente do seu receptor GPR54 acoplado à proteína G (KOTANI et al., 2001; PINILLA et al., 2012), conhecido como receptor KISS1R (KOTANI et al., 2001). Sua primeira descoberta em linhagens de células tumorais estava associada à supressão de metástases de melanoma humano, sendo por isso denominada como metastina (LEE et al., 1996) e, posteriormente, foi identificada na placenta humana (KOTANI et al., 2001). Após ser codificada pelo gene Kiss1, a Kp pode originar quatro peptídeos ativos designados como Kp54/52, Kp14, Kp13 e Kp10 (OHTAKI et al., 2001), podendo qualquer um deles ativar o receptor GPR54 (KOTANI et al., 2001).

Sabe-se que a Kisspeptina desempenha importantes papeis na reprodução animal (CAO et al., 2019; DIAS et al., 2015; HU et al., 2019a; WOLFE; HUSSAIN, 2018), porém as primeiras indicações de sua relação com a reprodução foram descobertas em humanos que apresentavam hipogonadismo hipogonadotrófico (DE ROUX et al., 2003; FUNES et al., 2003; SEMINARA et al., 2003). Nestes indivíduos, a perda de função do receptor GPR54 resultou em deficiência na secreção hipofisária de FSH e de LH, causando comprometimento da maturação puberal e da função reprodutiva (DE ROUX et al., 2003). Nesse sentido, considera-se hoje o sistema de sinalização Kiss1/Kiss1R o regulador chave da reprodução por controlar a liberação de GnRH pelo hipotálamo e, consequentemente, de LH e FSH pela adenohipófise (GOTTSCH et al., 2004; HAN et al., 2005). Em humanos e animais, a elevação das concentrações plasmáticas de Kisspeptina aumenta significativamente os níveis circulantes de LH, FSH, estrógeno e testosterona (DHILLO et al., 2005; MILLAR et al., 2017), sendo que já foi confirmado que a administração de Kisspeptina em mulheres e camundongos inférteis devido a hiperprolactinemia crônica reativou o eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano com retorno da atividade ovariana e fertilidade (MILLAR et al., 2017; SONIGO et al., 2012).

Nesse sentido, pelo fato de regular a liberação de GnRH, a localização central do gene *Kiss1* passou a ser descrita nos mamíferos, especialmente nas espécies domésticas. Em ratos, camundongos, equinos e humanos foi observada sua expressão em neurônios hipotalâmicos do núcleo arqueado (ARC) e periventricular anteroventral (AVPV) (CLARKSON et al., 2009; HRABOVSZKY et al., 2010; MAGEE

et al., 2009; SMITH et al., 2005), sendo que, em ovinos, foram identificados no ARC e área pré-ótica do hipotálamo (BACKHOLER; SMITH; CLARKE, 2009). Na gata, grupos de neurônicos kispeptinérgicos têm localização hipotalâmica também no ARC e AVPV (AMELKINA et al., 2019; AMELKINA; TANYAPANYACHON; CHATDARONG, 2017).

Além disso, a Kisspeptina e seu receptor são também expressos em órgãos periféricos de humanos e animais, especialmente no trato genital feminino (para revisões, ver CAO et al., 2019; HU et al., 2019), sugerindo que falhas na sinalização periférica do sistema Kisspeptina/Kiss1R também possa estar associada à disfunção reprodutiva, por estar envolvido na implantação embrionária, decidualização, regulação da placentação e estímulo da atividade folicular e luteal.

3.3.1 Sistema Kisspeptina/Kiss1R no ovário

O perfil e funções do sistema Kisspeptina/Kiss1R já foi descrito no ovário de muitas espécies (para revisão, ver HU et al., 2018). A expressão gênica e proteica de Kiss1 e Kiss1R foi estudada em ovários de humanos (CEJUDO ROMAN et al., 2012; GARCÍA-ORTEGA et al., 2014, 2016; GAYTÁN et al., 2009; HU et al., 2019b), ratas (CASTELLANO et al., 2006; LAOHARATCHATATHANIN et al., 2015; PENG et al., 2013; ZHOU et al., 2014), camundongos (DORFMAN et al., 2014; MERHI et al., 2016), cães (CIELESH et al., 2017), suínos (BASINI et al., 2018; SAADELDIN et al., 2012), bovinos (MONDAL; BARUAH; PRAKASH, 2015; MONDAL; KARUNAKARAN; BARUAH, 2016), frango (XIAO et al., 2011), e mais recentemente na gata doméstica (TANYAPANYACHON; AMELKINA; CHATDARONG, 2018).

Nesses estudos, kisspeptina e seu receptor apresentraram expressão nas principais estruturas ovarianas, como foliculos em desenvolvimento e pré-ovulatórios, além de corpos lúteos. Em ratas, foi observado maior expressão próximo à ovulação (CASTELLANO et al., 2006), com provável associação ao pico pré-ovulatório de LH, sendo que as células da granulosa que tiveram maior expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R, tanto em ratas quanto em suinos (BASINI et al., 2018; LAOHARATCHATATHANIN et al., 2015). Em relação a isso, já foi demonstrado também que a inibição do aumento de gonadotrofinas próximo a ovulação impede a expressão de *Kiss1* (CASTELLANO et al., 2006). Em gata, um estudo mostrou que o gene *Kiss1* apresenta maior expressão ovariana na fase folicular

(TANYAPANYACHON; AMELKINA; CHATDARONG, 2018), embora o mesmo tenha considerado a expressão gênica total no tecido ovariano e não em estruturas ovarianas isoladamente. Apesar disso, já foi confirmado que os níveis de Kisspeptina apresentam correlação positiva com os níveis de estradiol no líquido folicular e que essa concentração também apresentou correlação com o perfil sérico de E2 e a quantidade de oócitos maduros em mulheres submetidas à tecnologias de reprodução assistida, sugerindo também a participação da Kisspeptina na ovulação e maturação do oócito (TANIGUCHI et al., 2017).

Sobre essa função no desenvolvimento do oócito, já foi demonstrado que Kisspeptina estimula a maturação oocitária *in vitro* de bovinos na ausência de gonadotrofinas (OLIVEIRA, 2016), e *in vivo* de mulheres com subfertilidade que fizeram o uso de fertilização *in vitro* (ABBARA et al., 2017; JAYASENA et al., 2014a). Além disso, a incubação de oócitos em meio com Kisspeptina aumentou significamente a maturação, taxa de formação e eclosão de blastocistos, e contagem total de células oocitárias em suínos (SAADELDIN et al., 2012), enquanto a adição de de Kisspeptina em meio contendo FSH, LH e E2 também mostrou melhora na expansão de células do cumulus e extrusão do 1º corpo polar em ovinos (BYRI et al., 2017).

Outros estudos também mostraram que a Kisspeptina tem ações esteroidogênicas no ovário, em especial como estímulo na produção de progesterona. Em ratas, Kisspeptina estimula a produção de P4 em células luteais via sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio Erk1/2 (PENG et al., 2013). O tratamento *in vitro* com Kisspeptina 10 (Kp-10) também aumenta a produção de P4 em células da granulosa de suínos (BASINI et al., 2018) e frango (XIAO et al., 2011). Apesar desses ensaios, mais estudos são necessários para elucidar as ações esteroidogênicas da Kisspeptina, inclusive em humanos.

3.3.2 Kisspeptina no útero: participação nos processos de implantação e decidualização endometrial

No útero, o sistema Kisspeptina/Kiss1R é relatado em algumas espécies domésticas, assim como em humanos e roedores. Em mulheres, Kisspeptina e seu receptor são expressos nos epitélios luminal e glandular (CEJUDO ROMAN et al., 2012) e em células estromais uterinas, principalmente na fase secretória tardia (BABA

et al., 2014). De forma abrangente, esses estudos sugerem que esse sistema está envolvido na implantação do embrião, assim como na decidualização de células estromais uterinas, processos essenciais para o estabelecimento da gestação. Em ratas, Kisspeptina apresentou alta expressão gênica e proteica nas fases de proestro/estro na tuba uterina (GAYTÁN et al., 2007), sugerindo sua participação na implantação. Para confirmar essa hipótese, Calder et al. (2014) observaram que camundongos nocautes para *Kiss1* tem implantação comprometida, já que sinais de adesão e penetração, dois eventos finais da implantação, não foram gerados em fêmeas *Kiss1* $^{-}$ / $^{-}$ (CALDER et al., 2014). Vale destacar que esses animais apresentavam redução significativa no endométrio do fator inibidor da leucemia (LIF) (CALDER et al., 2014), um fator crucial para a implantação do blastocisto (STEWART, 1994; STEWART et al., 1992). Além disso, outro estudo feito por Fayazi et al. (2015) demonstrou que o útero de camundongos fêmeas expressa funcionalmente o sistema Kisspeptina/Kiss1R no dia da implantação, corroborando com Calder et al. (2014).

É importante destacar que a sinalização da Kisspeptina com seu receptor também é essencial para a função e formação das glândulas endometriais (LEÓN et al., 2016). Além disso, um estudo demonstrou recentemente, a partir de ensaios de invasão e migração, que a Kisspeptina regula a motilidade de células estromais na decídua (WU et al., 2019), reforçando sobre o papel da kisspeptina na implantação embrionária. No entanto, estudos clínicos sobre o papel da kisspeptina na implantação ainda são escassos. Até o momento, foi demonstrado que mulheres com baixos níveis séricos de Kisspeptina e submetidas à injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) tiveram falhas na implantação (JAMIL et al., 2017). Além disso, em outro estudo, esse mesmo grupo de pesquisadores sugeriu que a deficiência de Kisspeptina em mulheres com causas inexplicadas de infertilidade pode estar ligada à falhas na implantação após realização de ICSI (MUMTAZ et al., 2017).

Outro estudo também associou o sistema Kisspeptina/Kiss1R ao processo de decidualização. Em camundongos fêmeas, Kisspeptina e Kiss1R são expressos no útero e aumentam progressivavelmente no momento da decidualização *in vivo* e *in vitro*, sendo que a expressão de *Kiss1* independe da presença do embrião e o bloqueio da sinalização de *Kiss1* com siRNA inibe a decidualização *in vitro* em um modelo de células estromais uterinas (ZHANG et al., 2014). Nesse estudo foi observado também

que, após o tratamento com P4 e/ou E2 em camundongos fêmeas ovariectomizadas, há aumento da expressão do gene *Kiss1* (ZHANG et al., 2014).

3.3.3 Kisspeptina e regulação da placentação

A placenta foi o primeiro órgão do sistema reprodutor da fêmea com descrição da expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R. Primeiro, Lee et al. (1996) verificaram que o gene *Kiss1* é altamente expresso no tecido placentário de mulheres em comparação a outros órgãos como rim e pâncreas. Depois, alta expressão de Kiss1R também foi observada nesse tecido por Kotani et al. (2001), dentre outros órgãos endócrinos estudados fora do eixo central da reprodução. Esses dados sugeriram inicialmente que a Kisspeptina apresentasse um papel na regulação da função endócrina da placenta. A partir desses estudos iniciais, outros estudos têm descrito expressão em compartimentos específicos na placenta, ainda que algumas divergências sejam observadas, principalmente no que se refere a expressão ao longo da gestação.

Em humanos, foi descrito inicialmente que não existia diferenças na expressão de *Kiss1* entre início da gestação (7-9 semanas) e placenta à termo (39-41 semanas), mas com maior expressão de *Kiss1r* nesse último período (JANNEAU et al., 2002). Outros estudos, porém, relataram maior expressão de Kisspeptina e/ou Kiss1R no início da gestação em comparação ao final. Bilban et al. (2004) e Cartwright e Williams (2012) mostraram que Kiss1 e Kiss1r apresentam maior expressão em trofoblastos no primeiro trimestre de gestação, sendo que Kiss1 foi expresso principalmente em trofoblastos vilosos, enquanto Kiss1R expressou em trofoblastos extravilosos. Além disso, a partir de um estudo *in vitro* em células de linhagem trofoblástica humana HTR-8/Svneo, Taylor et al. (2014) verificaram que a Kisspeptina induz a adesão de trofoblastos extravilosos ao colágeno tipo I, um importante componente da placenta humana, sugerindo a participação do sistema Kisspeptina/Kiss1R na placentação de humanos, sobretudo por regular negativamente a invasão trofoblástica (BABWAH, 2015).

Em modelo murino, expressão de Kisspeptina/Kiss1R e variações ao longo da gestação também foram estudados. Inicialmente, Terao et al. (2004) observaram por meio de hibridização *in situ* que a expressão de *Kiss1* ocorre principalmente em células gigantes trofoblásticas e que há uma gradual redução da sua expressão no

decorrer da placentação, inclusive com níveis baixos de *Kiss1r*. Entretanto, outro estudo verificou que na placenta de ratas há aumento de *Kiss1* e *Kiss1r* no terço final da gestação (MARK et al., 2013).

Esses estudos em humanos e roedores demonstraram a papel local do sistema Kisspeptina/Kiss1R na placentação. Porém, apesar das semalhanças morfofisiológicas entre a placentação de humanos e roedores, essas espécies também guardam diferenças que limitam, em alguns pontos, a extrapolação dos conhecimentos em roedores para humanos (Revisado por BABWAH, 2015). Nesse sentido, foi demonstrado que a deleção condicional do gene *Kiss1* no tecido placentário não interferiu no desenvolvimento feto-placentário de camundongos (HERREBOUDT et al., 2015). Esses dados indicam, portanto, que apesar da Kisspeptina desempenhar ações locais importantes no tecido placentário de humanos, sua ausência nesse tecido não necessariamente leva o animal ao status de infertilidade, pelos menos em camundongos. Isso mostra também a necessidade de mais estudos sobre possíveis efeitos compensatórios por outros órgãos e a relação com o eixo HPG, visto que, durante a gestação de mulheres, os níveis circulantes de Kisspeptina aumentam significativamente até o terceiro trimestre e reduzem a níveis basais após o parto (HORIKOSHI et al., 2003).

No entanto, os estudos sobre Kisspeptina e seu receptor na interface materno-fetal ainda são escassos, especialmente na gata doméstica, que não há estudos. Apesar disso, Kisspeptina já tem sido considerada em humanos como um biomarcador importante em algumas complicações gestacionais, uma vez que alteração nos seus níveis séricos estão associados com o desenvolvimento de pre-eclâmpsia (ARMSTRONG et al., 2009; CARTWRIGHT; WILLIAMS, 2012; LOGIE et al., 2012), perda gestacional recorrente (PARK et al., 2012a) e aborto (JAYASENA et al., 2014b). Em contrapartida, nas espécies animais domésticas, ainda não há estudos sobre a kisspeptina em condições patológicas do sistema genital, particularmente da interface materno fetal, como aborto recorrente, retenção de placenta e piometra, doenças muito importantes na clínica médica veterinária.

3.4 Piometra em gatas domésticas

A piometra é o nome dado à condição patológica que envolve o acúmulo acentuado de fluido purulento no interior do útero. Sua ocorrência é mais comum em cadelas e menos frequente em gatas, devido à síntese de progesterona nesses

animais ocorrer somente após a ovulação que, na maioria das vezes, é estimulada pelo coito (AGUDELO, 2005; JURSZA-PIOTROWSKA et al., 2016; LAWLER et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2017).

Progesterona e estrógenos estão relacionados com o aparecimento da piometra, pois o primeiro causa imunossupressão local e estimula o acúmulo de secreção glandular no interior do útero promovendo um quadro de hiperplasia endometrial cística (BAITHALU; MAHARANA; MISHRA, 2010; NASCIMENTO; SANTOS, 2011; OLIVEIRA et al., 2017), enquanto o segundo permite o relaxamento da cérvix favorecendo a entrada ascendente de bactérias da microbiota normal da vagina (AGUDELO, 2005).

Assim, é comum que essa infecção se instale na fase de diestro, uma vez que os níveis de progesterona estão elevados e a mesma promove o fechamento da cérvix e redução da atividade contrátil da musculatura uterina (AGUDELO, 2005). Todo esse ambiente que, primariamente, espera uma gestação, pode ser alvo de agentes infecciosos causando a piometra (LIMA, 2009; OLIVEIRA et al., 2017). Dos fatores predisponentes para o aparecimento da piometra, os mais destacados são a idade do animal, sendo comum o desenvolvimento em animais idosos, e o tratamento com anticoncepcional à base de progestágenos (JURSZA-PIOTROWSKA et al., 2016; NASCIMENTO; SANTOS, 2011; OLIVEIRA et al., 2017)

Histologicamente, grandes alterações são observadas no útero durante uma piometra. A primeira fase da doença consiste em um espessamento da parede uterina, devido ao aumento do número e dilatação cística das glândulas (AGUDELO, 2005; OLIVEIRA et al., 2017). É característico também a infiltração de leucócitos no útero e fibrose periglandular (NASCIMENTO; SANTOS, 2011). Em relação a essas características, foi postulado inicialmente quatro tipos clínico-patológicos para o complexo hiperplasia endometrial cística (DOW, 1959): a) **tipo I**: apenas hiperplasia endometrial, sem manifestações clínicas e sem reação inflamatória; b) **tipo II**: hiperplasia do endométrio com infiltração de mononucleares no estroma endometrial; c) **tipo III**: hiperplasia endometrial com infiltração de polimorfonucleares e presença de exsudado purulento no lúmen uterino; d) **tipo IV**: grau avançado com predominância de exsudado purulento e hipotrofia do endométrio e miométrio. A gravidade da piometra se intensifica quando, geralmente no tipo IV, não há abertura da cérvix. Neste caso, é mais evidente o comprometimento sistêmico do animal e uma

resposta leucocitária mais acentuada, pois não há drenagem vaginal do conteúdo purulento (NASCIMENTO; SANTOS, 2011; OLIVEIRA et al., 2017).

Nessas condições, uma cascata de respostas imunológicas é desencadeada, na qual diversos mediadores inflamatórios podem estar envolvidos. Foi visto que os níveis de prostaglandinas, sobretudo a prostaglandina F2 alfa (PGF2α), estão elevados em gatas e cadelas com piometra (HAGMAN et al., 2006, 2009; JURSZA-PIOTROWSKA et al., 2016) e que esses valores são importantes para diferenciar em cadelas os casos de hiperplasia endometrial cística e mucometra da piometra (HAGMAN et al., 2006). Além disso, a piometra aumenta a concentração de IL8 em cadelas, uma citocina marcadora de infecções bacterianas (KARLSSON et al., 2015), diminui a expressão de mRNA de EGF e intensifica a expressão do fator de crescimento transformador alfa (TGFα) e do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), sugerindo que esses fatores estejam envolvidos no crescimento acentuado das glândulas endometriais (KIDA et al., 2010).

Todos esses achados mostram que a patogênese da piometra é ainda pobremente elucidada, sobretudo em gatas domésticas, apesar de ser bastante estudada em cadelas. Há de se considerar também a interferência de outros fatores no desenvolvimento dessa doença, como sugerido recentemente que mudanças na expressão do receptor de ocitocina (OTR) pode estar associado com a patogênese da piometra (PRAPAIWAN et al., 2017) e a participação da kisspeptina na mediação angiogênica (FRANCIS et al., 2014; GOLZAR; JAVANMARD; DANA, 2014; RAMAESH et al., 2010) e imunológica (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014).

4 CAPÍTULO I

A piometra e o ciclo estral influenciam a expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R e de fatores angiogênicos e imunológicos no útero de gatas domésticas

Resumo

Falhas na expressão central do sistema Kisspeptina/Kiss1R são associadas à infertilidade. Contudo, ainda não há estudos sobre a expressão desse sistema no trato genital de fêmeas ao longo do ciclo estral/menstrual em relação a mediadores angiogênicos e imunológicos, principalmente em gatas, inclusive na condição de piometra. Após avaliação clínica, histopatológica e perfil plasmático de progesterona e estradiol de 97 gatas, foram utilizadas amostras do útero de animais em proestro/estro (N=20), diestro (N=41), anestro (N=32) e com piometra (N=4) para avaliação da expressão de Kiss1, Kiss1R, VEGF, Flk-1, PIGF, INFγ, MIF, TNFα, IL6 e IL10 por imunohistoquimica e qPCR. O útero de gatas em diestro exibiu maior expressão gênica e proteica de Kiss1, como também de *Vegf*, *Pigf, Mif* e *Il6*. Em contrapartida, Kiss1R apresentou maior expressão no proestro/estro, semelhante ao observado para a imunomarcação de INFγ, MIF, TNFα e IL10. Para a maioria desses fatores houve correlação gênica significativa e positiva com a expressão uterina de *Kiss1* e/ou *Kiss1r*, além de ter ocorrido correlação positiva entre *Kiss1* e *Kiss1r* no útero de gatas ao longo do ciclo estral. Gatas com piometra exibiram maior imunomarcação de Kiss1 e Kiss1R, enquanto ocorreu redução significativa de *Vegf, Pigf, Mif* e *Il6*, e aumento de *Tnf* no endométrio desses animais. Conclui-se que a expressão uterina do sistema Kisspeptina/Kiss1R em gatas domésticas sofre influência do ciclo estral e piometra, inclusive a expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos, sendo que há correlação gênica da expressão uterina desses mediadores com Kisspeptina e/ou seu receptor.

Palavras-chave: Útero, kisspeptina, angiogênese, imunologia, piometra, gato doméstico.

4.1 INTRODUÇÃO

A kisspeptina é um neuropeptídeo hipotalâmico codificado pelo gene *Kiss1* que atua junto ao seu receptor Kiss1R na liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo (KOTANI et al., 2001) e gonadodrofinas pela adenohipófise (GOTTSCH et al., 2004). Por isso, o sistema Kisspeptin/Kiss1R é considerado o regulador chave da reprodução e falhas na sua sinalização central resulta em infertilidade de humanos e animais, como visto inicialmente por De Roux *et al.*, (2003) and Seminara *et al.* (2003).

No hipotálamo de ovinos, expressão de *Kiss1* foi observada em neurônios do núcleo arqueado (ARC) e área pré-ótica (BACKHOLER; SMITH; CLARKE, 2009), enquanto em camundongos, equinos e humanos foi relatada no ARC e núcleo periventricular anteroventral (AVPV) (CLARKSON et al., 2009; HRABOVSZKY et al., 2010; MAGEE et al., 2009), como foi observado no gato doméstico (AMELKINA et al., 2019). No entanto, estudos recentes indicam que independente da expressão hipotalâmica, kisspeptina também apresenta ação direta no trato genital (For review, see Cao *et al.*, 2019), e falhas na sinalização periférica também pode comprometer a reprodução dos animais.

Em humanos, Kisspeptina exibiu fraca expressão proteica nas fases proliferativa e secretória inicial, mas aumentou no diestro tardio e foi nula após a menopausa, sugerindo seu papel no endométrio decidualizado e processo de placentação(BABA et al., 2014). Camundongos nocautes para *Kiss1* ou seu receptor apresentam falhas na adenogênese e função das glândulas uterinas (LEÓN et al., 2016). Em ratas, alta expressão de Kisspeptina foi demonstrada na tuba uterina em proestro/estro, sugerindo sua participação no processo de fertilização (GAYTÁN et al., 2007). Na cadela, observou-se expressão nos períodos de pré e pós-implantação (SCHÄFER-SOMI et al., 2016) e na gata um estudo sinalizou a expressão de Kisspetina/Kiss1R ao longo do ciclo ovariano (TANYAPANYACHON; AMELKINA; CHATDARONG, 2018). Todos esses estudos comprovam sua ação periférica e sugerem a importância da sinalização local desse sistema para a reprodução de fêmeas.

Outros estudos também sugerem a participação de Kisspeptina na modulação da angiogênese (FRANCIS et al., 2014; RAMAESH et al., 2010) e resposta imune na interface materno-fetal (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014), evidenciando outras vias de ação dessa proteína. No entanto, nenhuma pesquisa foi realizada *in vivo* a respeito da expressão da Kisspeptina no trato genital feminino em associação a mediadores angiogênicos e imunológicos. Estes fatores são cruciais para a função reprodutiva e estão envolvidos na gênese de diversas condições patológicas que afetam a fertilidade. Entre essas doenças estão o aborto recorrente, a pré-eclâmpsia e o parto prematuro em mulheres (REYNOLDS; GRAZUL-BILSKA; REDMER, 2002; SHELDON; OWENS, 2017; SILVA; SERAKIDES, 2016) e a piometra em cadelas e gatas (AGUDELO, 2005). Embora a piometra seja uma importante doença inflamatória

do trato genital de gatas, existem poucos estudos sobre sua patogênese nessa espécie animal (HOLLINSHEAD; KREKELER, 2016).

Assim, considerando a importância social do gato como animal de estimação e sua utilidade como modelo experimental para espécies felinas, sobretudo pelo fato de muitas estarem vulneráveis ou ameaçadas de extinção, o objetivo deste estudo foi verificar o perfil de expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R no útero da gata doméstica ao longo do ciclo estral e na condição de piometra e sua relação com a expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Procedimento experimental

Gatas sem raça definida, com seis meses a dois anos de idade, foram utilizadas neste estudo. Todos os animais foram submetidos a exames laboratoriais de hemograma e urinálise e somente aqueles saudáveis ou apresentando piometra foram ovariohisterectomizados no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UESC (Processo nº 005/18). Análise macroscópica foi realizada no trato genital e fragmentos de útero e ovário foram coletados para histopatologia e imunohistoquímica (IHC). Fragmentos de endométrio foram armazenados em criotubos com Trizol, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 ºC para avaliação gênica pela qPCR. Sangue foi coletado para dosagem de progesterona (P4) e estradiol (E2). Após avaliação clínica, macroscópica, histopatológica e do perfil sérico de progesterona e estradiol, foram selecionados 97 animais que foram divididos nos seguintes grupos experimentais: 1) proestro/estro (N=20); 2) diestro (N=41), 3) anestro (N=32); e 4) piometra (N=4).

4.2.2 Ovariohisterectomia

Como medicação pré-anestésica foi utilizado acepromazina (0,05 mg/Kg; IM) (Acepromazine 2%; Syntec) e morfina (0,3 mg/Kg; IM) (Morphine sulfate 10 mg/mL; Hipolabor + Sanval) para os animais hígidos e meperidina (3mg/Kg; IM) para os animais com piometra. Para a indução anestésica foi utilizado propofol (6 mg/Kg; IV) (Propotil; Biochimico), com posterior infusão contínua de Ringer Lactato (6 ml/kg/h).

Após intubação endotraqueal, a anestesia foi mantida com isoflurano (Isoforine; Cristália) em 100% de oxigênio (300 ml/kg/min) em circuito aberto (Baraka) utilizando máquina de anestesia (WATO EX-65, Mindray). Antes da cirurgia, os animais receberam cefalotina sódica (30 mg/Kg; IV) como antibioticoterapia profilática. A ovariohisterectomia foi realizada pela técnica 3 pinças após laparotomia por meio de incisão mediana (CORRÊA et al., 2019).

4.2.3 Processamento dos tecidos e avaliação histopatológica

As amostras de útero e ovário foram fixadas em formol 10% por 24h e processadas seguindo o método de inclusão em parafina (APÊNDICE I) no laboratório de Histologia Animal da UESC. Os tecidos foram desidratados em solução seriada de álcool 70% até álcool absoluto, com posterior diafanização em xilol e impregnação e inclusão em parafina. Cortes de 4µm dos tecidos foram obtidos em lâminas histológicas para avaliação histopatológica. Para imunohistoquímica do útero, realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UESC, foram utilizadas lâminas polarizadas silanizadas (StarFrost Polycat, Germany).

Para avaliação histopatológica, os cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina (H&E) (APÊNDICE II). Os animais foram agrupados em cada fase do ciclo estral (proestro/estro, diestro e anestro) e piometra após avaliação histológica dos ovários e do útero, seguindo critérios de classificação descritos na literatura para gata doméstica (AMELKINA et al., 2015; BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; CHATDARONG et al., 2005; MONTEIRO; KOIVISTO; SILVA, 2006). Resumidamente, os animais em proestro/estro apresentavam o útero em atividade proliferativa, com numerosas glândulas em crescimento. Os animais em diestro possuíam o útero em atividade secretória caracterizado pelo acúmulo de secreção no lúmen glandular. Os animais em anestro apresentavam útero quiescente caracterizado pela pouca quantidade de glândulas sem atividade. Para os animais com piometra, a classificação histopatológica foi de acordo com Agudelo (2005); Nascimento; Santos, (2011); Oliveira et al., (2017). Foram utilizados apenas animais com piometra de Grau 3 ou 4, nos quais o útero apresentava infiltrado inflamatório no estroma endometrial e no lúmen glandular e uterino.

4.2.4 Dosagem hormonal

Amostras de sangue foram coletadas imediatamente após a ovariohisterectomia pela punção da veia cefálica ou jugular, entre 9:00 e 11:00h, em tubos com EDTA. O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 20 min e o plasma obtido foi armazenado à -20 ºC para posterior dosagem hormonal de E2 e P4 por meio de ELISA utilizando Kits comerciais (Enzo Life Sciences, Inc, USA).

4.2.5 Imunohistoquímica

Secções histológicas dos úteros foram submetidas à análise imunohistoquímica utilizando os anticorpos anti-Kiss1 (sc-101246, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-KISS1R (HPA071913, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), anti-INFγ (AB9657; Abcam, Cambridge, UK), anti-MIF (AB7207; Abcam, Cambridge, UK), anti-TNFα (sc-527, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-IL10 (sc-365858, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-VEGF (sc-152, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-Flk1 (sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (Tabela 4).

Tabela 4. Lista dos anticorpos utilizados na imunohistoquímica.

Anticorpo	**Espécie/clone**	**Diluição**	**Tempo de revelação no DAB**
Anti-kiss1	Camundongo/monoclonal	1:50	1 hora
Anti-kiss1R	Coelho/policlonal	1:50	1 hora
Anti-MIF	Coelho/policlonal	1:200	6 minutos
Anti-INFγ	Coelho/policlonal	1:100	14 minutos
Anti-TNFα	Camundongo/monoclonal	1:50	1 hora
Anti-IL10	Camundongo/monoclonal	1:200	1 min e 20 seg
Anti-VEGF	Coelho/policlonal	1:100	45 minutos
Anti-Flk-1	Camundongo/monoclonal	1:50	6 minutos

DAB= diaminobenzidina

Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) (APÊNDICE III) e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98 ºC utilizando solução de ácido cítrico (0,54 mol/L) com pH 6,0. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com o anticorpo primário e por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio (Ultra vision Block, Lab Vision Corp., Fremont,

CA. USA) e estreptavidina peroxidase. A incubação com o anticorpo secundário ocorreu por 45 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (DAB Substrate system, Lab Vision Corp., Fremont, CA. USA). Por último, as secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por PBS (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

Para avaliação da imunomarcação foi realizada uma análise descritiva e quantitativa da expressão imunohistoquímica de Kiss1, Kiss1R, VEGF, Flk-1, INFγ, MIF, IL10 e TNFα no útero. A avaliação foi realizada em seis animais/grupo, com exceção do grupo piometra que tinha quatro animais. A análise descritiva foi realizada considerando a intensidade de expressão (nenhuma = "-"; fraca = "+"; moderada = "++"; intensa = "+++") de cada marcador no epitélio luminal, no epitélio glandular, no estroma endometrial e no miométrio. Para análise quantitativa foi determinada a intensidade de imunomarcação (densidade integrada) utilizando o software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA). As imagens foram fotografadas em microscópio Leica DM 2500 utilizando a câmera digital Leica DFC 295 (Leica Microsytems, Germany). Para a análise, *color deconvolution* e *thresholding* das imagens foram realizadas. Os dados de cada tecido foram arquivados, analisados e expressos como densidade integrada de imunomarcação em pixels (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

4.2.6 PCR em tempo real (qPCR)

Para a técnica de qPCR, a extração do RNA total do endométrio foi feita pelo uso do Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) seguindo o protocolo do Kit com algumas modificações (APÊNDICE IV). O método consistiu de uma etapa inicial de lise e homogeneização do tecido em 1 mL de Trizol por cinco minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Logo em seguida, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio, com homogeneização por 15 segundos e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos à 4ºC. A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, com adição de 0,5 mL de álcool isopropílico e incubação por 30 minutos à -80ºC. Após, o microtubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4ºC. O pellet obtido foi lavado com 1 mL de etanol a 75%, homogeneizado e centrifugado a 10.500 rpm por 5 minutos a 4ºC. O RNA foi solubilizado em água ultrapura livre de RNAse e imediatamente estocado a -

80ºC. A concentração e qualidade das amostras de RNA de cada tecido foi analisada utilizando nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo scientific) e eletroforese em gel de agarose/formaldeído.

Foi utilizado 1 µg de RNA para a síntese de cDNA utilizando o Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Os transcritos gênicos dos genes alvo foram quantificados pela qPCR utilizando SYBR Green (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG; Invitrogen) no equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies). Para as reações de qPCR utilizou-se 1µL de cDNA, 100nM de cada iniciador e 7,5 µL do reagente syber Green em um volume final de 15 µL de reação. Como controle negativo utilizou-se o mix de amplificação de DNA, no qual a amostra de cDNA foi substituída por água. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: ativação enzimática a 95 ºC por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 ºC por 15 s, e anelamento/extensão a 60 ºC por 60 s. Para avaliar a linearidade e eficiência da amplificação da qPCR, curvas padrões de todos os transcritos foram geradas utilizando diluições seriadas do cDNA, além da avaliação da curva de *melting* dos produtos da amplificação. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA de *Felis catus* (Tabela 5). A expressão gênica foi analisada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de 40S Ribossomal protein S7 (*Rps7*) *Felis catus* (JURSZA; SKARZYNSKI; SIEMIENIUCH, 2014).

4.2.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± SEM. Realizou-se análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste t *de Student* não-pareado para comparações entre dois grupos ou *Student Newman Keuls* (SNK) para múltiplas comparações, utilizando o software GraphPad Prism®. Para análise de correlação entre a expressão gênica endometrial de *Kiss1* e *Kiss1r* com mediadores angiogênicos e imunológicos foi utilizado o ΔCT de cada gene por meio da correlação de Pearson. As análises foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Tabela 5. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qPCR.

Gene	Iniciadores	Nº acesso
Kiss1	F: 5′-TGACCTAGTCTCCCCTCCTTC-3 R: 5′-GGAAAAGCATCAGCTGCCAA-3	XM_023247458
Kiss1r	F: 5′-CCCCTCGGTACGAATTTGCT-3 R: 5′-GAACGTTCCAGAGAGTGCCA-3	XM_023242671.1
Tnf	F: 5′-GTAGCAAACCCCGAAGCTGA-3 R: 5′-ATGAGGTACAGCCCGTCTGA-3	NM_001009835.1
Il10	F: 5′-TGGGGAACGAAACATCCAGG-3 R: 5′-AGGTATGACCGGGTTCTCCA-3	NM_001009209.1
Il6	F: 5′-CTTCGAAGGCTGGAGGACTT-3 R: 5′-AGGAATGCCCGTGAACTACA-3	NM_001009211.2
Infγ	F: 5′-TGGGTCGCTTTTCGTAGACA-3 R: 5′-ATGCTCCTTTGAATGCGCTG-3	NM_001009873.1
Mif	F: 5′-TCACGTAGCTCAGGTTACCG-3 R: 5′-TTCACCACGAACATCGGCAT-3	XM_0039994984.5
Vegfa	F: 5′-AAAGAAAATCCCTGTGGGCCT-3 R: 5′-GCAACGCGAGTCTGTGTTTT-3	NM_001009854.1
Pigf	F: 5′-AGCCACTTTGTCTTGACGCT-3 R: 5′-AACAGTATTGCCGCACAGGT-3	XM_01833310.1
Rps7	F: 5′-GTCCCAGAAGCCGCACTTTGAC-3 R: 5′-CTCTTGCCCACAATCTCGCTCG-3	AY800278

F: Forward primer. **R**: Reverse primer.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Classificação dos animais nos estágios do ciclo estral e piometra

Do total de 97 animais, 20 foram agrupados em proestro/estro, com proliferação glandular, vascularização proeminente na lamina própria do endométrio (seta) e crescimento folicular evidente com folículos pré-ovulatórios (seta) (Fig. 4A and D), além de elevados níveis plasmáticos de E2 e baixos de P4 (Fig. 4H e I; **P*<0.05, ***P*<0.01); 41 gatas estavam em diestro, com alta atividade secretória das glândulas uterinas (asteríscos), elevados níveis plasmáticos de E2 e P4 (Fig. 4E, H e I; **P*<0.05, ***P*<0.01), e corpos lúteos ativos (asterísco) (Fig. 4B); e 32 animais estavam em anestro, com útero e ovário quiescentes, sem atividade glandular (seta) e folicular aparente, além de baixos níveis de E2 e P4 (Fig. 4C, F, H e I; **P*<0.05, ***P*<0.01). Desses animais, foram selecionados 6-7 por grupo para análise IHC e qPCR. Para piometra, foram utilizados animais em estágio III ou IV (Fig. 4G), que apresentavam infiltrado inflamatório linfohistiocitário e neutrofílico intersticial no interior do lúmen glandular e uterino, além de hipotrofia endometrial em alguns animais e níveis plasmáticos elevados de E2 e P4, condizente com a fase luteal (Fig. 4H e I; **P*<0.05, ***P*<0.01).

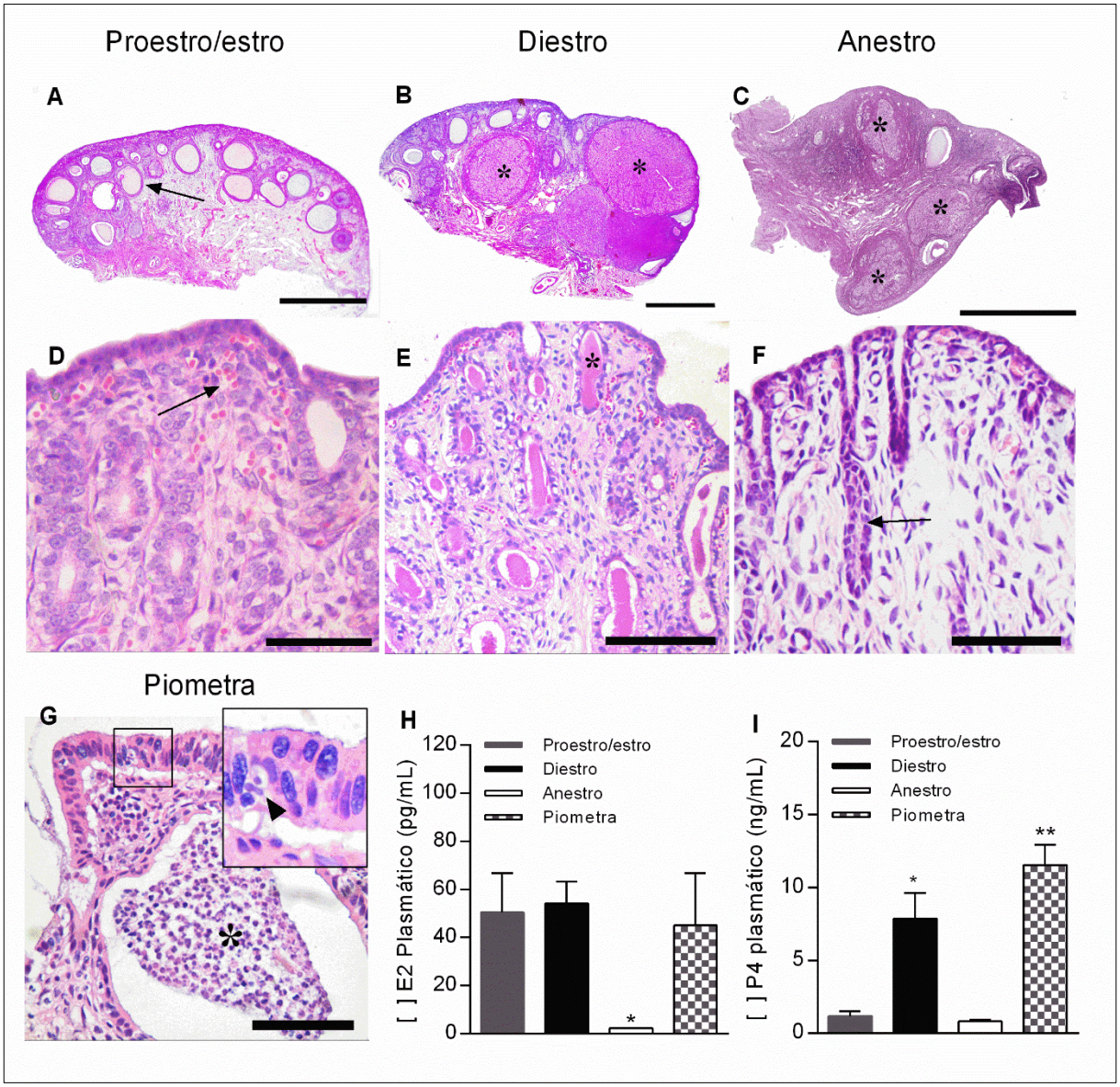

Figura 4. Confirmação das fases do ciclo estral das gatas hígidas e com piometra. A e D) Fase de proestro/estro apresentando ovário (A) com evidente crescimento folicular e folículos pré-ovulatórios (setas), e útero (D) com numerosas glândulas em crescimento e vascularização proeminente (seta); (B e E) Fase de diestro apresentando ovário (B) com corpos lúteos maduros (asteriscos), e útero (E) com glândulas endometriais em atividade secretória (lúmen com conteúdo eosinofílico) e epitélio vacuolizado; (C e F) Fase de anestro apresentando ovário (C) sem crescimento folicular e presença de corpos *albicans* (asteriscos), e útero (F) com poucas glândulas endometriais; (G) Piometra evidenciando infiltrado inflamatório no interstício e no interior do epitélio luminal uterino (imagem em realce; seta) e de glândulas endometriais (cabeça de seta). (Coloração: Hematoxilina e Eosina; Barra = 2000 µm (A-C), 50 µm (D-G)). (H e I) Dosagem plasmática de Estradiol (E2) e Progesterona (P4). (H) Níveis de E_2 nos grupos experimentais, com maiores níveis nos grupos de proestro/estro, diestro e piometra; (I) Níveis de P4 nos grupos experimentais, com maiores níveis nos grupos diestro e piometra. (*P<0.05; **P<0.01). Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.2 Perfil do sistema Kisspeptina/Kiss1R no útero de gata doméstica durante o ciclo estral

Na IHC, a Kiss1 apresentou discreta expressão proteica nas fases do ciclo, com fraca a moderada marcação citoplasmática somente em glândulas profundas no diestro (Fig. 5C), confirmada pela imunomorfometria (Fig. 5I; ****P<0.0001). Como foi observado diferença na expressão de Kiss1 entre as glândulas superficiais e profundas na fase luteal, análise da área marcada foi realizada nessas duas regiões. Kiss1R, apresentou intensa expressão citoplasmática no epitélio luminal e moderada nas glândulas em proestro/estro, diferente do diestro no qual foi fraca nas glândulas endometriais superficiais e profundas, mas ausente no epitélio luminal uterino, confirmada pela imunomorfometria (Tabela 6; Fig. 5E-G; ****P<0.0001). A expressão proteica de Kiss1 e Kiss1R foi ausente no útero das gatas em anestro (Fig. 5D e H), assim como no estroma endometrial e miométrio em todos os grupos experimentais (Tabela 6).

Em relação à expressão gênica, houve aumento de *Kiss1* no diestro (Fig. 5J; *P<0.05), enquanto *Kiss1r* teve maior expressão no proestro/estro (Fig. 5J; *P<0.05), corroborando com os resultados da IHC. Além disso, a expressão de *Kiss1* no endométrio das gatas no ciclo estral apresentou alta correlação positiva com a expressão de *Kiss1r* (Fig. 5K; ***P<0.001), sugerindo uma relação funcional de expressão de Kisspeptina com seu receptor no útero de gata.

Tabela 6. Caracterização da imunomarcação de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) no útero de gatas hígidas em proestro/estro, diestro e anestro.

Sistema Kiss/Kiss1r	Epitélio Luminal			Epitélio Glandular			Estroma endometrial			Miométrio		
	P/E	D	A	P/E	D	A	P/E	D	A	P/E	D	A
Kiss1	-	-	-	-	+*	-	-	-	-	-	-	-
Kiss1R	+++	+	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-

P/E = Proestro/Estro; D = Diestro; e A = Anestro.

Intensidade de marcação: nenhuma (-), fraca (+), moderada (++), e intensa (+++).

+* = Expressão citoplasmática fraca em glândulas profundas.

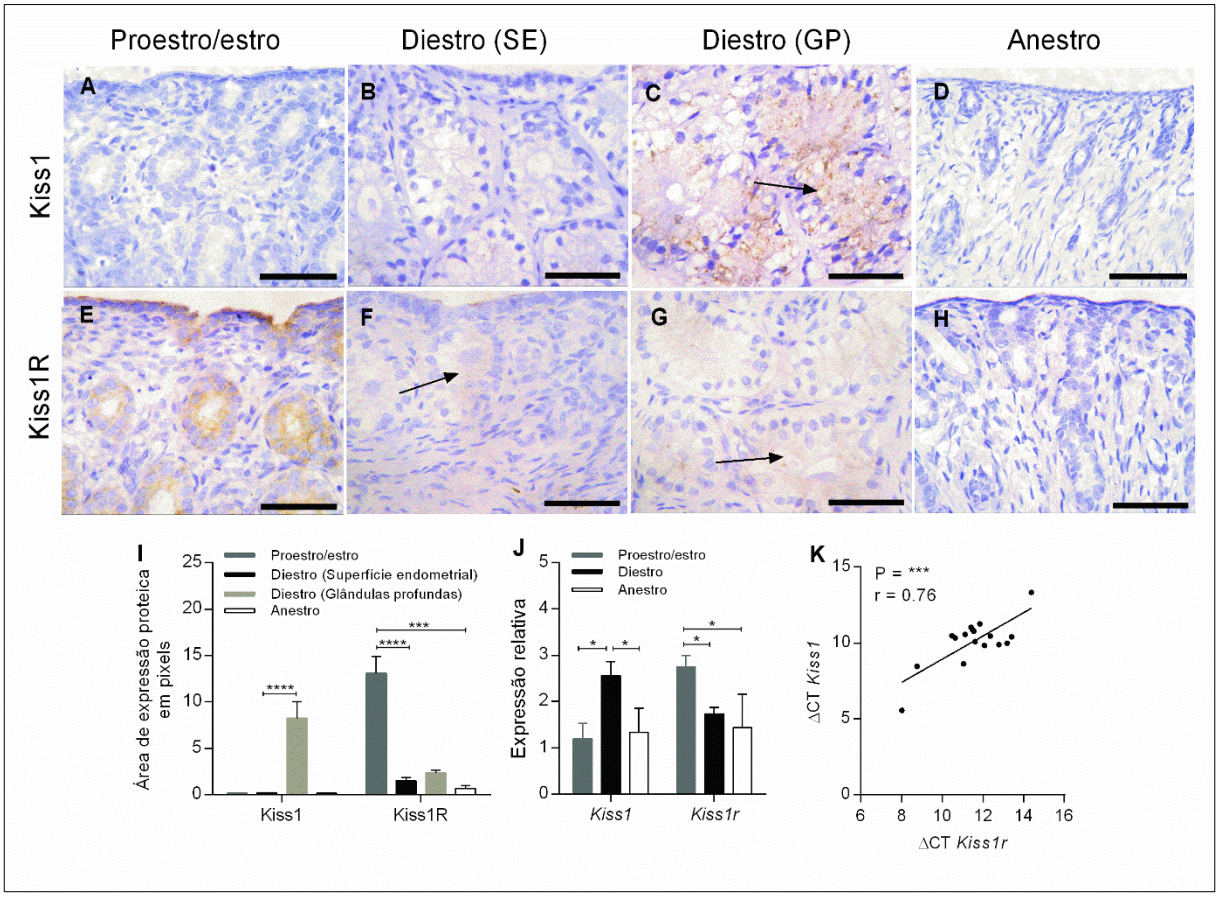

Figura 5. Expressão proteica e gênica de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) no útero de gatas hígidas em proestro/estro, diestro e anestro. A-H) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de kisspeptina (A-D) e de Kiss1R (E-H) no endométrio das gatas nas fases de proestro/estro (A e E), diestro (B, C, F e G) e anestro (D e H). (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). I) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de kisspeptina e Kiss1R nas fases de proestro/estro, diestro e anestro. (média±SEM; ***P<0.01;****P<0.0001 n=6-7). J) Expressão gênica relativa de *Kiss1* e *Kiss1r* no endométrio das gatas nas fases de proestro/estro, diestro e anestro. (média±SEM; *P<0.05; n=4-8). K) Correlação da expressão gênica de *Kiss1* com a expressão de *Kiss1r* no endométrio de gatas hígidas (***P<0.001). Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.3 Perfil de mediadores angiogênicos no útero de gata doméstica durante o ciclo estral

Foi avaliado a expressão uterina de VEGF, Flk-1 e do fator de crescimento placentário (PIGF), os principais mediadores pró-angiogênicos do organismo. Na IHC, houve expressão moderada a intensa de VEGF tanto no epitélio luminal quanto glandular nos grupos, geralmente citoplasmática e nuclear (exceto no diestro com expressão somente no citoplasma), com expressão fraca ou nula no estroma endometrial (Tabela 7; Fig. 6A-C). Em relação ao Flk-1, a imunomarcação foi intensa

no epitélio luminal e moderada nas glândulas (Tabela 7; Fig. 6D-F), além de moderada no estroma endometrial, principalmente nas fases de proestro/estro e diestro (Tabela 7). Tanto o VEGF quanto Flk-1 apresentaram imunomarcação moderada no miométrio nos três grupos experimentais (Tabela 7). A área de expressão para ambos os marcadores foi maior nas fases de proestro/estro e/ou diestro em relação ao anestro, com maior expressão de Flk-1 na fase de proestro/estro em relação ao diestro (Fig. 6G; **P*<0.05, ****P*<0.001, *****P*<0.0001). Em relação a expressão do RNAm, *Vegf* e *Pigf* apresentaram maior expressão na fase de diestro em relação ao anestro e proestro/estro (Fig. 6H; **P*<0.05, ***P*<0.01), sendo que *Vegf* teve correlação significativa e positiva com *Kiss1* no endométrio das gatas ao longo do ciclo estral (Fig. 6I; **P*<0.05).

Tabela 7. Caracterização da imunomarcação de VEGF e seu receptor (Flk1) no útero de gatas hígidas em proestro/estro, diestro e anestro.

Mediadores angiogênicos	**Epitélio Luminal**			**Epitélio Glandular**			**Estroma endometrial**			**Miométrio**		
	P/E	D	A	P/E	D	A	P/E	D	A	P/E	D	A
VEGF	+++	+++	+++	++	++	+++	+/-	+/-	-	++	++	++
Flk-1	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	+++	++	++

P/E = Proestro/Estro; D = Diestro; e A = Anestro.

Intensidade de marcação: nenhuma (-), fraca (+), moderada (++), e intensa (+++).

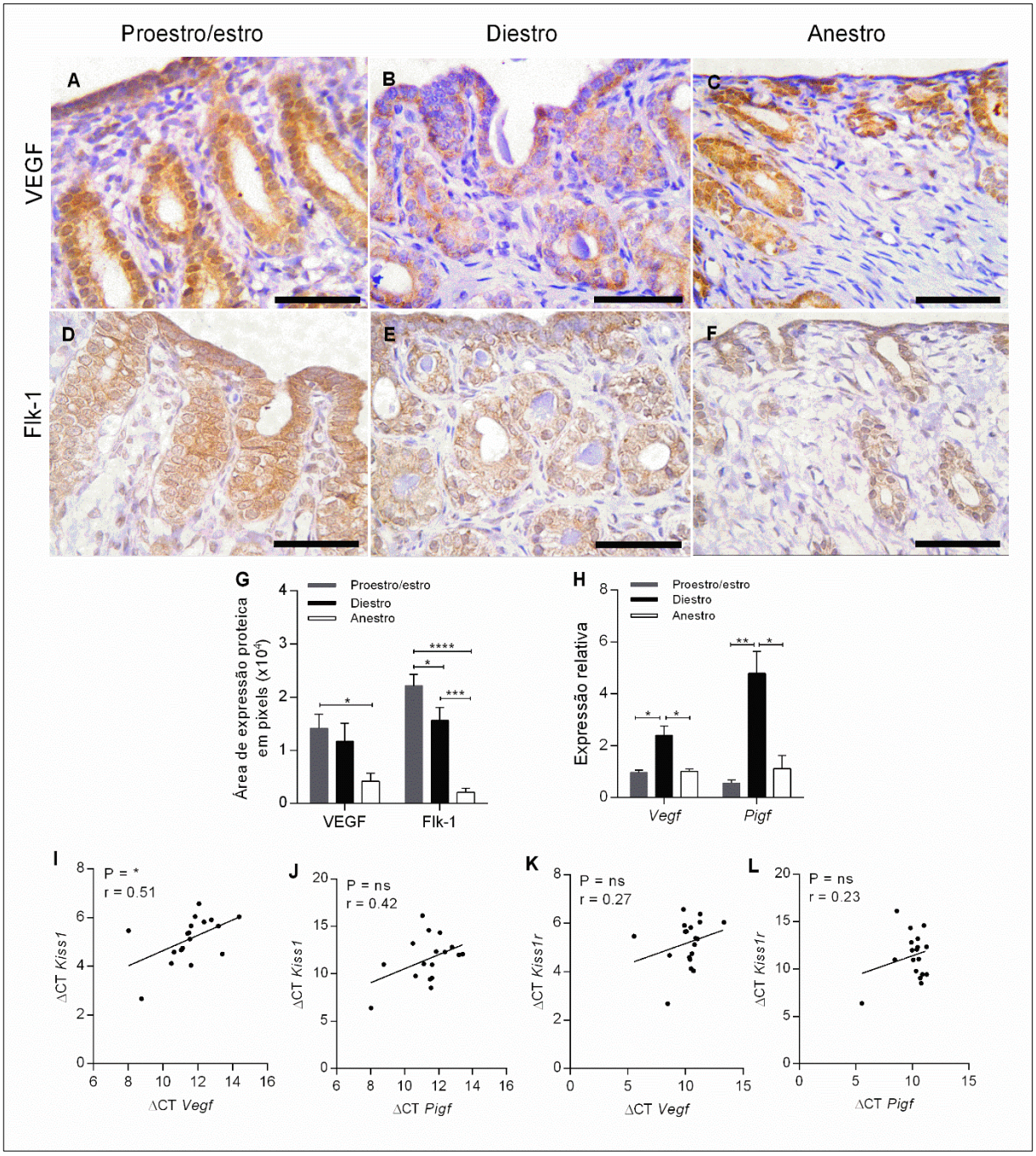

Figura 6. Expressão proteica e gênica de mediadores angiogênicos no útero de gatas hígidas em proestro/estro, diestro e anestro. A-F) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de VEGF (A-C) e seu receptor (Flk-1) (D-E) no endométrio das gatas nas fases de proestro/estro (A e D), diestro (B e E) e anestro (C e F) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). G) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de VEGF e Flk1 nas fases de proestro/estro, diestro e anestro. (média±SEM; *P<0.05; ***P<0.001; ****P<0.0001; n=6-7) H) Expressão gênica relativa de *Vegf* e *Pigf* no endométrio das gatas nas fases de proestro/estro, diestro e anestro. (média±SEM; *P<0.05; **P<0.01; n=4-8) (I-M) Correlação da expressão gênica de *Vegf* e *Pigf* com a expressão de *Kiss1* e *Kiss1r* no endométrio de gatas hígidas (*P<0.05). Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.4 Perfil de mediadores imunológicos no útero de gatas domésticas no ciclo estral

Avaliou-se a expressão gênica e proteica uterina de INFγ, MIF, TNFα, IL6, e IL10. Na IHC, INFγ apresentou expressão citoplasmática ligeiramente semelhante entre os grupos, com intensa imunomarcação nos epitélios, enquanto no miométrio a expressão foi intensa no anestro (Tabela 8; Fig. 7A-C). MIF, por sua vez, apresentou imunomarcação moderada nos epitélios nas diferentes fases do ciclo, mas com ausência de expressão no miométrio no diestro, enquanto no proestro/estro e anestro a expressão miometrial foi moderada (Tabela 8; Fig. 7D-F). TNFα e IL10 apresentaram expressão citoplasmática moderada a intensa nas fases de proestro/estro e diestro nos epitélios luminal e glandular, enquanto no anestro a expressão foi fraca. No estroma endometrial, TNFα exibiu fraca expressão no ciclo estral (Tabela 8; Fig. 7G-I), diferente de IL10 que apresentou expressão moderada a intensa na mesma região, principalmente na fase de proestro/estro (Tabela 8; Fig. 7J e L). Para ambos os marcadores, a expressão miometrial foi moderada a intensa ao longo do ciclo estral. Para todos os mediadores imunológicos estudados pela IHC, houve maior área de imunomarcação endometrial na fase de proestro/estro em relação a fase de diestro e anestro, sendo que para o INFγ também ocorreu maior área de imunomarcação na fase de diestro em relação ao anestro (Fig. 7M; **P*<0.05, ***P*<0.01, *****P*<0.0001).

Na avaliação gênica, maior expressão de *Infγ* foi observada no anestro em relação as outras fases do ciclo, enquanto *Mif* e *Il6* apresentaram aumento do RNAm no diestro em relação ao proestro/estro e/ou anestro (Fig. 7N; **P*<0.05, ***P*<0.01, *****P*<0.0001). *Tnf* e *Il10*, por sua vez, não apresentaram diferenças na expressão endometrial entre as fases do ciclo estral (Fig. 7N). Além disso, verificou-se correlação significativa positiva da expressão gênica de *Kiss1* com *Infγ*, *Mif* e *Il10* (Fig. 7O, P e S; **P*<0.05, ****P*<0.001), enquanto *Kiss1r* teve correlação positiva com *Infγ* e *Tnf* (Fig. 7T e V; **P*<0.05).

Tabela 8. Caracterização da imunomarcação de mediadores imunológicos no útero de gatas hígidas em proestro/estro, diestro e anestro.

Mediadores imunológicos	Epitélio Luminal			Epitélio Glandular			Estroma endometrial			Miométrio		
	P/E	D	A	P/E	D	A	P/E	D	A	P/E	D	A
INFγ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	++
MIF	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++
TNFα	++	++	+	++	++	+	+	+	-	++	+	++
IL10	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+++

P/E = Proestro/Estro; D = Diestro; e A = Anestro.

Intensidade de marcação: nenhuma (-), fraca (+), moderada (++), e intensa (+++).

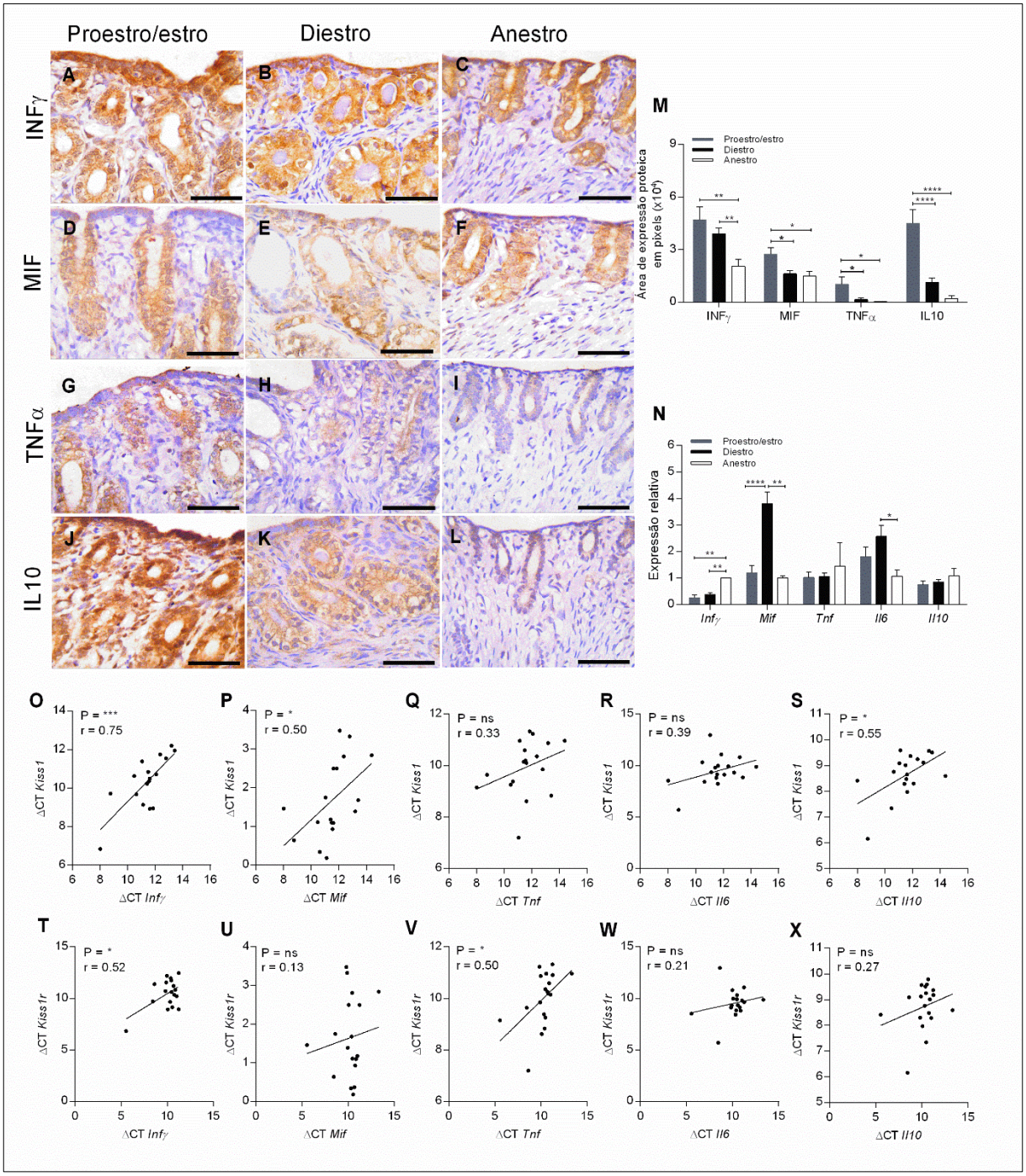

Figura 7. Expressão proteica e gênica de mediadores imunológicos no útero de gatas hígidas em proestro/estro, diestro e anestro. A-L) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de INFγ (A-C), MIF (D-F), TNFα (G-I) e IL10 (J-L) no endométrio das gatas nas fases de proestro/estro (A, D, G e J), diestro (B, E, H e K) e anestro (C, F, I e L) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Barra = 50 µm). M) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de INFγ, MIF, TNFα e IL10 nas fases de proestro/estro, diestro e anestro. (média±SEM; **P*<0.05; ***P*<0.01; *****P*<0.0001; n=6-7) N) Expressão gênica relativa de *Infγ, Mif, Tnf, Il6* e *Il10* no endométrio das gatas nas fases de proestro/estro, diestro e anestro. (média±SEM; **P*<0.05; ***P*<0.01; n=4-8) O-Z) Correlação da expressão gênica de *Infγ, Mif, Tnf, Il6* e *Il10* com a expressão de *Kiss1* e *Kiss1r* no endométrio de gatas hígidas. (**P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001). Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.5 Piometra aumenta a imunomarcação do sistema Kisspeptina/Kiss1R no útero de gata doméstica

Amostras de útero de gatas com piometra também foram coletadas para avaliação da expressão de Kiss1 e Kiss1R, utilizando como comparação o útero de gatas hígidas em diestro. Nos animais com piometra, fraca expressão de Kiss1 e Kiss1R foi observada nas glândulas endometriais profundas (Fig. 8D e H), com redução de área de marcação de Kiss1 em relação às gatas hígidas em diestro (Fig. 8I; *P<0.05). No entanto, houve marcação evidente de Kiss1 e Kiss1R no epitélio luminal e glandular superficial (Tabela 9; Fig. 8C e G), levando a um aumento de área de marcação dessas proteínas na superfície endometrial em relação à mesma região nas gatas em diestro (Fig. 8I; ****P<0.0001). Além disso, animais com piometra exibiram no endométrio maior área de expressão de Kiss1 e Kiss1R na superfície endometrial em relação a região de glândulas profundas (Fig. 8I; **P<0.01) e, não diferiram quanto à expressão de *Kiss1* e *Kiss1r* em comparação às gatas em diestro (Fig. 8J; P>0.05).

Tabela 9. Caracterização da imunomarcação de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) no útero de gatas hígidas em diestro e com piometra.

Sistema Kiss1/Kiss1R	Epitélio Luminal		Epitélio Glandular		Estroma endometrial		Miométrio	
	D	P	D	P	D	P	D	P
Kiss1	-	+	+*	+	-	-	-	-
Kiss1R	-	+	+	+	-	+	-	-

D = Diestro; e P = Piometra.

Intensidade de marcação: nenhuma (-), fraca (+), moderada (++), e intensa (+++).

+* = Expressão proteica fraca em glândulas profundas.

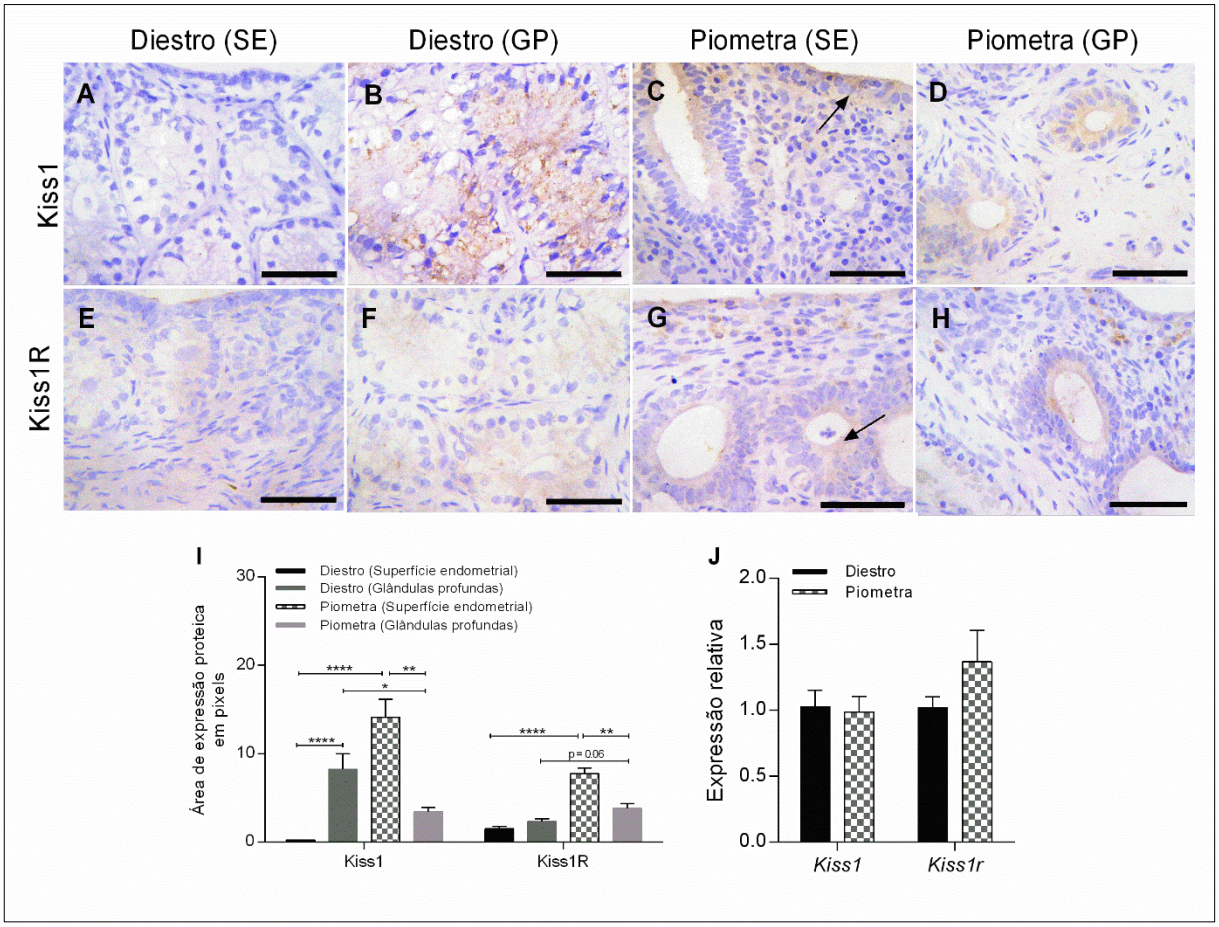

Figura 8. Expressão proteica e gênica de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) no útero de gatas hígidas em diestro e com piometra. A-H) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de kisspeptina (A-D) e de Kiss1R (E-H) na superfície endometrial das gatas em diestro (A e E) e com piometra (C e G) e nas glândulas endometriais profundas das gatas em diestro (B e F) e com piometra (D e H). (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). I) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de kisspeptina e Kiss1R nas gatas em diestro e com piometra. (média±SEM; ***P*<0.01; ****P*<0.001; *****P*<0.0001 n=6-7). J) Expressão gênica relativa de *Kiss1* e *Kiss1r* no endométrio das gatas em diestro e com piometra (média±SEM; n=4-8). Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.6 Piometra reduz a expressão gênica endometrial de Vegf e Pigf na gata doméstica

Na IHC, a expressão uterina de VEGF foi semelhante nos epitélios luminal e glandular entre gatas hígidas e com piometra, com marcação intensa apenas nos leucócitos presentes no estroma endometrial nas gatas com piometra (Tabela 10; Fig. 9A-B). Em relação ao Flk-1, sua expressão foi mais intensa no epitélio glandular das gatas com piometra em comparação às gatas hígidas, comprovado pela análise da área de imunomarcação (Tabela 10; Fig. 9E; ***P*<0.01), embora a expressão de

RNAm para *Vegf* e *Pigf* tenha sido menor nos animais com piometra em relação às gatas hígidas (Fig. 9F; **P*<0.05, ***P*<0.01).

Tabela 10. Caracterização da imunomarcação de VEGF e seu receptor (Flk1) no útero de gatas hígidas em diestro e com piometra.

Mediadores angiogênicos	Epitélio Luminal		Epitélio Glandular		Estroma endometrial		Miométrio	
	D	P	D	P	D	P	D	P
VEGF	++	++	++	++	-	+++	++	+
Flk-1	+++	+++	++	+++	++	++	++	++

D = Diestro; e P = Piometra.

Intensidade de marcação: nenhuma (-), fraca (+), moderada (++), e intensa (+++).

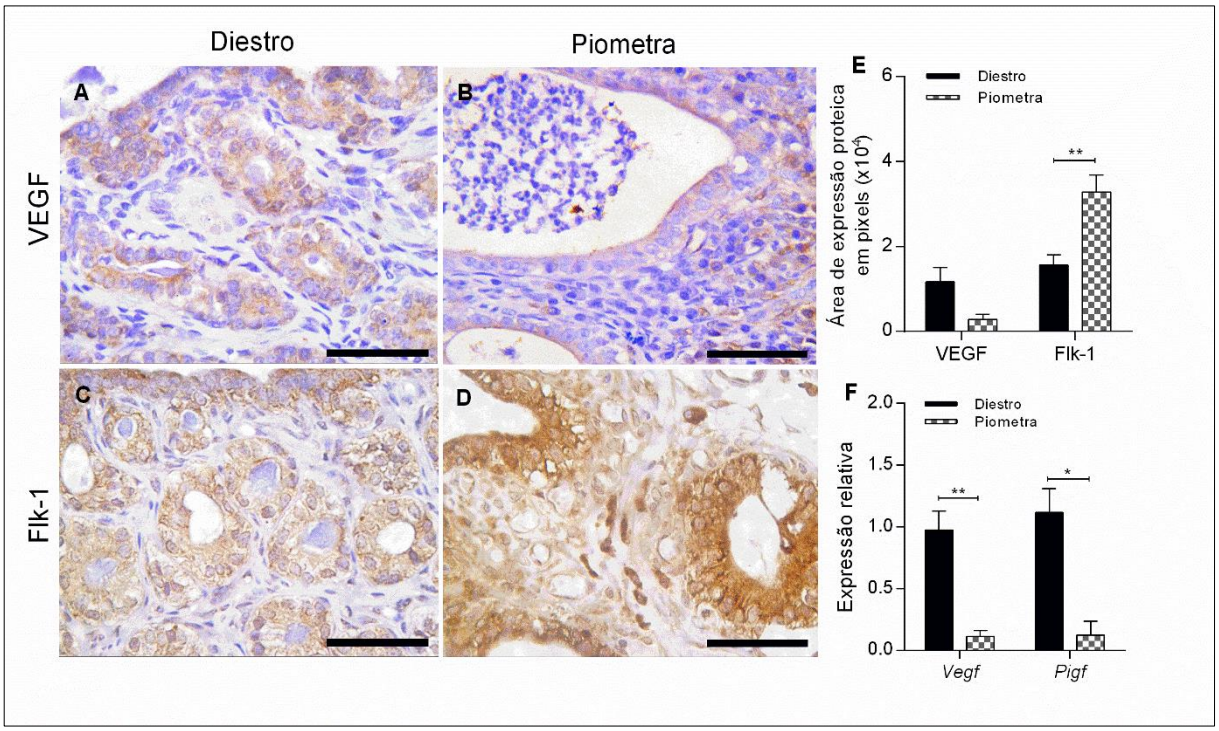

Figura 9. Expressão proteica e gênica de mediadores angiogênicos no útero de gatas hígidas em diestro e com piometra. A-D) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de VEGF (A e B) e de Flk1 (C-D) no endométrio das gatas em diestro (A e C) e com piometra (B e D) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). E) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de VEGF e Flk1 nas gatas em diestro e com piometra. (média±SEM; ***P*<0.01; n=6-7). F) Expressão gênica relativa de *Vegf* e *Pigf* no endométrio das gatas em diestro e com piometra (média±SEM; **P*<0.05; ***P*<0.01; n=4-8). Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.7 Piometra altera o perfil de mediadores imunológicos no útero da gata doméstica

Na IHC, o perfil de expressão de INFγ, MIF e TNFα foi semelhante entre as gatas com piometra e as hígidas na fase de diestro, sendo intensa no epitélio glandular e luminal para INFγ, moderada para MIF e fraca a moderada para TNFα (Tabela 11; Fig. 10A-F), diferente de IL10 que apresentou expressão intensa nos epitélios e estroma endometrial nas gatas com piometra em relação aos animais hígidos (Tabela 11; Fig. 10G-H), além de maior área de expressão proteica (Fig. 10I; ***P*<0.01), diferente de INFγ, MIF e TNFα que não diferiram entre os grupos (Fig. 10I; *P*>0.05). Em contrapartida, a piometra aumentou a expressão gênica de *Tnf* em relação aos animais hígidos, como também reduziu a expressão endometrial de *Mif* e *Il6* (Fig. 10J; **P*<0.05, ***P*<0.01). *Il10* e *Infγ*, por sua vez, não diferiram entre os grupos (Fig. 10J; *P*>0.05).

Tabela 11. Caracterização da imunomarcação de mediadores imunológicos no útero de gatas hígidas em diestro e com piometra.

Mediadores imunológicos	Epitélio Luminal		Epitélio Glandular		Estroma endometrial		Miométrio	
	D	P	D	P	D	P	D	P
INFγ	+++	+++	++	++	+	++	+	++
MIF	++	++	++	++	+	+	-	+
TNFα	+	++	+	++	+	++	+	+
IL10	++	+++	++	+++	++	+++	++	+

D = Diestro; e P = Piometra.

Intensidade de marcação: nenhuma (-), fraca (+), moderada (++), e intensa (+++).

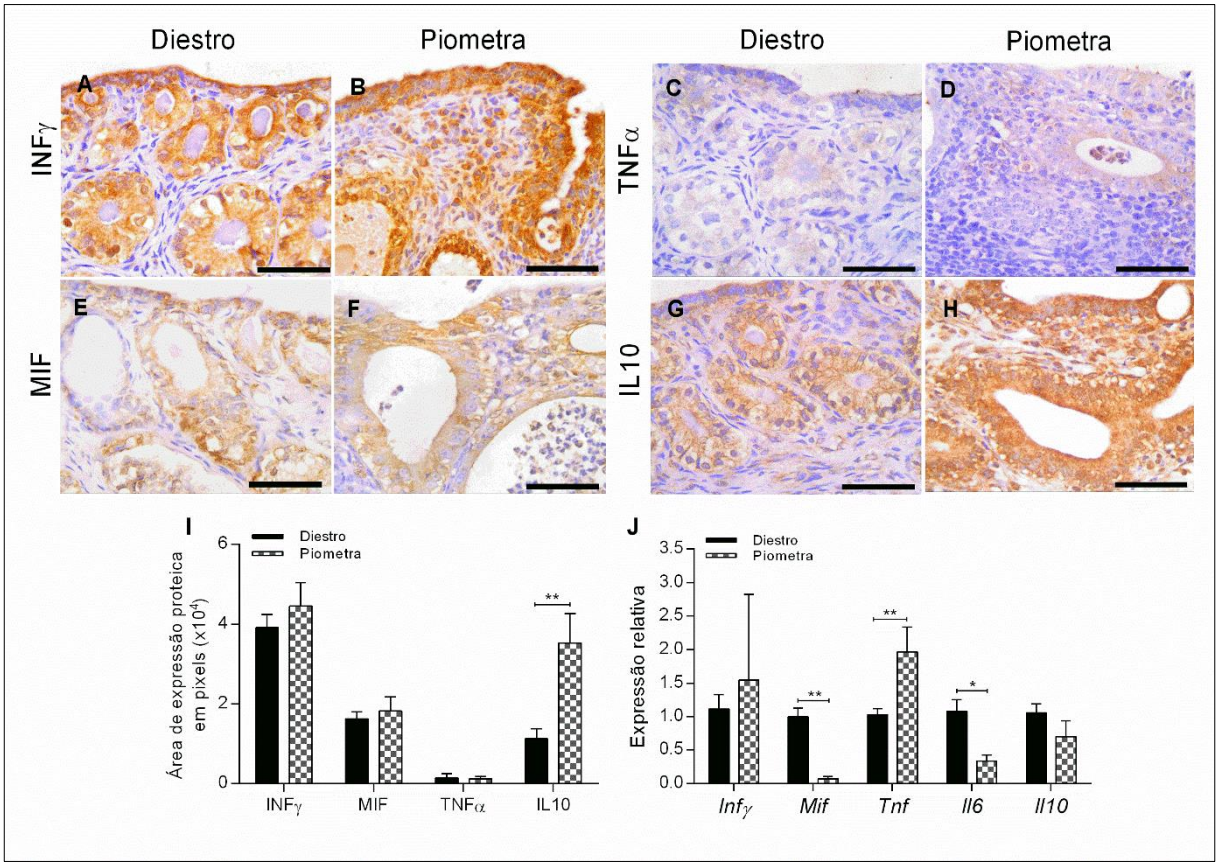

Figura 10. Expressão proteica e gênica de mediadores imunológicos no útero de gatas hígidas em diestro e com piometra. A-D) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de INFγ (A-B), TNFα (C-D), MIF (E-F) e IL10 (G-H) no endométrio das gatas em diestro (A, C, E,G) e com piometra (B, D, F, H) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). I) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de INFγ, MIF, TNFα e IL10 nas gatas em diestro e com piometra. (média±SEM; ***P*<0.01; n=6-7). J) Expressão gênica relativa de *Infγ, Mif, Tnf, Il6* e *Il10* no endométrio das gatas em diestro e com piometra (média±SEM; **P*<0.05;***P*<0.01; n=4-8). Fonte: Arquivo pessoal.

4.4 DISCUSSÃO

As ações do sistema Kisspeptina/Kiss1R vão além do controle hipotalâmico da reprodução, via modulação da pulsatilidade de GnRH e LH, de modo que falhas na expressão periférica de Kisspeptina ou Kiss1R, particularmente no sistema genital, podem comprometer a reprodução (CAO et al., 2019). No presente estudo demonstramos que a expressão do sistema Kisspepina/Kiss1R no útero da gata doméstica sofre influência do ciclo estral, com maior expressão de Kiss1 e Kiss1R no diestro e proestro/estro, respectivamente. Além disso, pela primeira vez, mostramos que há correlação entre a expressão de *Kiss1* e *Kiss1r* no útero, como também com a expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos, que também sofreram modulação no ciclo estral. Esses dados sugerem que kisspeptina influencia a expressão desses mediadores no útero, e que gatas com piometra exibiram alteração no perfil de expressão tanto de Kiss1 e Kiss1R quanto de mediadores angiogênicos e imunológicos.

Em humanos, semelhante ao nosso estudo, verificou-se expressão de Kiss1 e Kiss1R no epitélio luminal e glandular, mas não no estroma endometrial (CEJUDO ROMAN et al., 2012). Esse padrão também foi visto por outro estudo no útero de gatas, embora tenham observado também expressão no estroma endometrial e miométrio (TANYAPANYACHON; AMELKINA; CHATDARONG, 2018), diferente dos nossos resultados que não foi observado imunomarcação nessas regiões. Esses autores também não observaram diferenças na imunomarcação para Kiss1 e Kiss1R entre as fases do ciclo estral, apesar de não terem quantificado a imunoexpressão. Em contrapartida, observamos maior expressão proteica e gênica de Kisspeptina no diestro, nas glândulas endometriais profundas, condizente com os resultados de Baba et al. (2014) que relataram maior expressão de Kisspeptina no endométrio de mulheres na fase luteal. Juntos, esses dados sugerem um papel semelhante para a Kisspeptina entre mulheres e gatas na preparação do útero para implantação e decidualização (BABA et al., 2014). Sobre essa função, em camundongos nocautes para *Kiss1* e *Kiss1r* foi verificado que a sinalização periférica de Kisspeptina/Kiss1R é indispensável para a adenogênese e função das glandular (LEÓN et al., 2016), e que a implantação é comprometida em camundongos *Kiss1* $^{-/-}$ (CALDER et al., 2014). Além disso, em camundongos gestantes, a expressão de Kiss1 e Kiss1R aumenta durante a decidualização e o bloqueio de *Kiss1* inibe a decidualização *in vitro* de

células estromais uterinas (ZHANG et al., 2014). Importante ressaltar que em nossos resultados houve alta correlação entre os genes *Kiss1* e *Kiss1r* no endométrio das gatas no ciclo estral, sugerindo que a expressão endometrial de *Kiss1r* influencia a expressão do seu ligante, *Kiss1*, ao menos na gata.

Curiosamente, Kiss1R teve maior expressão gênica e proteica no proestro/estro, com forte expressão nos epitélios luminal e glandular. Isso sugere que o estrógeno pode estimular a expressão de Kiss1R no endométrio da gata, uma vez que o tratamento com E2 em ratas ovariectomizadas aumentou a expressão uterina de *Kiss1* (ZHANG et al., 2014). Em cadela também há aumento de Kiss1R no útero em pré-implantação (SCHÄFER-SOMI et al., 2016), mas não há informações se a expressão de Kiss1R nesse período está relacionado com a concentração plasmática de E2.

Além da correlação entre *Kiss1* e *Kiss1r*, também verificamos correlação gênica endometrial de *Kiss1* com *Vegf* e *Pigf*, sugerindo a modulação de mediadores angiogênicos pela kisspeptina no útero de gatas. Já foi demonstrado *in vitro* que kisspeptina regula negativamente a expressão de VEGF no tecido placentário (FRANCIS et al., 2014; RAMAESH et al., 2010). No entanto, ainda não há relatos sobre o papel da kisspeptina na vascularização uterina ao longo do ciclo menstrual/estral.

Maior expressão de transcritos para *Vegf* e *Pigf* foi observada no útero de gatas em diestro, enquanto a imunomarcação de VEGF e Flk-1 nos epitélios e estroma endometrial foi maior no diestro e proestro/estro em relação ao útero em anestro. Esses dados demonstram, pela primeira vez, a participação do VEGF, Flk-1 e PIGF no processo de angiogênese e remodelamento vascular no útero de gata doméstica ao longo do ciclo estral. Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios em outras espécies que mostraram maior expressão de mediadores angiogênicos na fase folicular ou luteal, condizendo com o estímulo que é fornecido pelos esteroides ovarianos. Ovinos na fase folicular exibem aumento de VEGF no útero (TREMAINE; FOULADI-NASHTA, 2018), como também os cães (SAĞSÖZ et al., 2013) e bovinos (TASAKI et al., 2010). Em equinos e suínos, contudo, maior expressão de VEGF e Flk-1 foi observada no diestro (ALLEN; GOWER; WILSHER, 2007; WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999). Em ratas, maior expressão uterina de VEGF foi observada após tratamento com E2 e Tamoxifeno (um agonista do receptor de estrógeno)

(HYDER et al., 1996), assim como também ocorre aumento de Flk-1 via modulação de VEGF após tratamento com E2 (HERVÉ et al., 2006). Na fase luteal, quando se observa vasos sanguíneos mais maduros e estáveis, outros fatores angiogênicos como Angiopoetina 1 e 2 também apresentam regulação positiva (TREMAINE; FOULADI-NASHTA, 2018). Isso corrobora com o aumento de *Pigf* no endométrio das gatas em diestro, uma vez que o PIGF está envolvido na maturação vascular (CARMELIET et al., 2001).

Além dos fatores angiogênicos, estudamos o perfil de expressão de mediadores pró- e antiinflamatórios no útero da gata doméstica no ciclo estral. Observamos que todos os mediadores estudados exibiram maior imunomarcação na fase de proestro/estro, como também foi observado por Jursza *et al.* (2014b) em relação ao TNFα e seus receptores no útero de gatas. Sabe-se que os esteroides ovarianos, particularmente o E2, regulam respostas imunológicas no trato genital da fêmea. Em equinos, por exemplo, foi demonstrado aumento de *Tnf* nas fases folicular e luteal média (GALVÃO et al., 2013), enquanto em humanos o tratamento de células endometriais com E2 aumentou a produção de Interleucina 13 (IL13) e Interleucina 15 (IL15) (ROBERTS, 2005).

No entanto, observamos maior expressão de transcritos para *Mif* e *Il6* no diestro, sugerindo uma modulação positiva desses mediadores na presença de P4. Corroborando com nossos resultados, Houdeau et al. (2007) demonstraram aumento da concentração tecidual de MIF no colon de ratas na fase luteal em relação a fase folicular, além de um aumento na produção de MIF após tratamento com P4 em modelo de colite experimental. Além disso, em humanos, camundongos, ovinos e bovinos se sugere que MIF seja um mediador da receptividade uterina e placentação devido a sua alta expressão na interface materno-fetal (FARIA et al., 2010; LOPES et al., 2011; PAULESU et al., 2012; ZENG et al., 1993). MIF promove angiogênese e remodelamento tecidual, processos importantes no endométrio durante a fase luteal (KATS et al., 2005).

Neste estudo também verificamos correlação significativa entre *Kiss1* com alguns mediadores imunológicos no útero, sugerindo a modulação desses mediadores pelo sistema Kisspeptina/Kiss1R na gata doméstica. Neste ponto, Shirshev et al. (2015) demonstraram *in vitro* que kisspeptina estimula a diferenciação de células *natural killers* (NKs) tipo 1 isoladas do sangue periférico de mulheres não-gestantes

em células NKs tipo 3, além de suprimir a expressão de IL4, IL10 e IFNγ e aumentar a produção de TGF-β, um facilitador da transformação de células NKs periféricas em células NKs deciduais. Também foi demonstrado *in vitro* que kisspeptina em células mononucleares do sangue periférico de mulheres hígidas favorece a formação de linfócitos T regulatórios (Treg) em detrimento dos linfócitos T17, com aumento da produção de IL10 e redução de IL17, sugerindo que a kisspeptina possa contribuir para a formação da tolerância imune na interface materno-fetal durante a gestação (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014). No entanto, ainda não há estudos sobre o papel imunomodulatório da kisspeptina no sistema genital. Isso demonstra a necessidade de pesquisas nessa área, particularmente pelo fato de disfunções reprodutivas que cursam com inflamação, como pré-eclâmpsia e aborto precoce recorrente, apresentarem alteração no perfil sérico de kisspeptina (PARK et al., 2012b; WU et al., 2014). Por esse motivo, após avaliar o perfil de expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R e de mediadores imunológicos e angiogênicos no útero de gatas domésticas hígidas ao longo do ciclo estral, avaliamos o perfil desses mediadores no útero de gatas com piometra, importante doença inflamatória do trato genital desses animais e que ainda é pouco estudada nesta espécie animal (HOLLINSHEAD; KREKELER, 2016).

Nossos resultados demonstraram que o útero de gatas com piometra exibe maior imunomarcação de Kisspeptina e Kiss1R, principalmente na superfície endometrial. Apesar do papel fisiológico do sistema Kisspeptina/Kiss1R ser muito bem documentado no eixo gonadotrófico dos mamíferos, outros estudos, principalmente em humanos, também o associaram em alguns distúrbios reprodutivos (CLARKE; DHILLO; JAYASENA, 2015). Aumento de proteína Kiss1 foi observado no endométrio de mulheres com endometriose (TIMOLOGOU et al., 2016), assim como de transcriptos para *Kiss1r* (MAKRI et al., 2012). Além disso, já foi documentado aumento de Kiss1R no tecido placentário de mulheres com doença trofoblástica gestacional (JANNEAU et al., 2002). Ainda assim, mais estudos são necessários sobre o papel do sistema Kisspeptina/Kiss1R na patogênese de doenças inflamatórias do trato genital.

De forma interessante, as gatas com piometra apresentaram maior imunomarcação endometrial de Flk-1, enquanto apresentaram menor expressão de transcritos gênicos para *Vegf* e *Pigf* em relação aos animais hígidos em diestro.

Estudos sobre a expressão de VEGF em condições patológicas uterinas são controversos, uma vez que já foi descrito regulação positiva ou negativa (FUJIMOTO et al., 1998; SOUFLA et al., 2005), mas se sabe também que progestinas inibem a expressão de metaloproteinases e fatores angiogênicos em lesões ectópicasem camundongos (MÖNCKEDIECK et al., 2009), podendo contribuir para o entendimento de como a piometra compromete a função vascular endometrial, já que o útero nessa condição está sob influência contínua de progesterona.

O útero das gatas com piometra também exibiu aumento do gene *Tnf*, além de maior imunomarcação para IL10. O TNFα é um dos principais fatores imunológicos com atividade pró-inflamatória no combate de infecções teciduais. Aumento sérico de TNFα foi observado em equinos com piometra (EL-BAHR; EL-DEEB, 2016), como também observado em bovinos (BRODZKI et al., 2015) e cães com infecção uterina (FRANSSON et al., 2007), e nessas duas últimas espécies também foi observado regulação positiva para IL10 (BRODZKI et al., 2015; KARLSSON et al., 2012) e negativa para IL6 (KARLSSON et al., 2012). Em nosso estudo, também observamos redução de transcritos para *Il6* no útero das gatas com piometra, como também de *Mif*, mediadores pró-inflamatórios que apresentam maior expressão gênica no endométrio de gatas hígidas em diestro em relação às outras fases do ciclo, como demonstrado neste trabalho. Mulheres com aborto recorrente apresentam menores níveis séricos e uterinos de MIF em relação a mulheres hígidas e férteis, além do aumento de IL12, IL18 e IFNγ (COMBA et al., 2015). No entanto, ainda não se sabe como processos inflamatórios do útero podem modular negativamente a expressão de MIF e IL6.

4.5 CONCLUSÃO

Por meio deste estudo, demonstramos que a expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R nos sistema genital de gatas domésticas hígidas é modulada pelas variações cíclicas do ciclo estral, com maior expressão de Kiss1 e Kiss1R nas fases lutea e folicular, respectivamente. Além disso, mostramos que a expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos no sistema genital de gatas sofre influencia do ciclo estral e apresentam correlação gênica com o sistema Kiss1/Kiss1R, e que gatas com piometra possuem maior expressão de Kiss1 e seu receptor na superficie

endometrial, além de redução de fatores angiogênicos e mudança no perfil de mediadores inflamatórios.

5 CAPÍTULO II

O Sistema Kisspeptina/Kiss1R e mediadores angiogênicos e imunológicos na interface materno-fetal da gata doméstica

Resumo

O sistema Kisspeptina/Kiss1R é o regulador central da reprodução por estimular a liberação de GnRH e gonadotrofinas, mas também é expresso no trato genital de mamíferos e falhas nessa sinalização têm sido associadas à disfunção reprodutiva. Além disso, estudos in vitro já apontaram ações da Kisspeptina na angiogênese e imunomodulação, fatores que também são essenciais para reprodução. Entretanto, não existem estudos do perfil de expressão de Kisspeptina/Kiss1R na interface materno-fetal da gata e sua relação com mediadores angiogênicos e imunológicos. Nessa investigação, coletamos amostras de útero e placenta de gatas no meio (N=6) e final da gestação (N=6), além do útero de gatas não gestantes em diestro (N=7), para avaliação histológica e da expressão proteica e gênica de Kiss, Kiss1R, VEGF, Flk-1, PIGF, INFγ, MIF, TNFα, IL6 e IL10 por imunohistoquimica e qPCR. A gestação em gatas aumenta a expressão uterina de *Kiss1* e *Kiss1r*, principalmente no final da gestação, além de aumentar a expressão de MIF, *Vegf, Il10* e *Tnf*, e reduzir *Pigf*. Já na placenta, observamos maior expressão de *Kiss1r* e *Pigf* ao final da gestação, enquanto VEGF, Flk-1, INFγ, TNFα, *Il6* e IL10 foi maior no meio da gestação. Além disso, na placenta houve correlação gênica positiva entre *Kiss1* e *Tnf*, e negativa entre *Kiss1r* e *Infγ*, *Il6* e *Il10*, embora não tenha ocorrido correlação significativa entre *Kiss1* e seu receptor. Esses dados mostram pela primeira vez a participação de Kisspeptina/Kiss1R na gestação da gata doméstica e possíveis links funcionais desse sistema na angiogênese e imunologia placentária.

Palavras-chave: Gestação, kisspeptina, placenta, angiogênese, immunologia, gato doméstico.

5.1 INTRODUÇÃO

A kisspeptina, codificada pelo gene *Kiss1*, foi inicialmente identificada como um supressor de metástases em células de melanoma (LEE et al., 1996), embora tenha sido purificada primeiramente na placenta humana (KOTANI et al., 2001). Logo após a sua descoberta, seu papel fisiológico na fertilidade foi revelado, regulando a produção hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) por meio do receptor acoplado à proteína G GPR54 (Kiss1R). Por isso, a sinalização do sistema Kisspeptina/Kiss1R é hoje reconhecida como essencial para a ocorrência da puberdade e manutenção das funções reprodutivas em diferentes espécies animais (DE ROUX et al., 2003; SEMINARA et al., 2003), e falhas na expressão hipotalâmica

de Kisspeptina ou Kiss1R resultam em hipogonadismo hipogonadotrófico (DE ROUX et al., 2003; SEMINARA et al., 2003). No entanto, além de suas ações hipotalâmicas, o sistema Kisspeptina/Kiss1R é expresso em uma variedade de tecidos, incluindo o trato genital (CAO et al., 2019). Apesar disso, estudos sobre o seu papel nesses órgãos ainda são escassos.

Em humanos, os níveis circulantes de kisspeptina são baixos na maioria das condições fisiológicas, mas aumentam quase 10.000 vezes em mulheres gestantes até terço final da gestação, caindo para o nível basal após o parto (HORIKOSHI et al., 2003). Esses dados mostraram que sua origem é principalmente placentária. Isso fez com que pesquisas fossem realizadas avaliando a expressão de Kisspeptina e seu receptor na interface materno-fetal de humanos e animais, sendo que recentemente foi demonstrado que menor expressão placentária de kisspeptina em mulheres está associada com a ocorrência de aborto (SULLIVAN-PYKE et al., 2018). Em mulheres, *Kiss1* é expresso no sinciciotrofoblasto, enquanto Kiss1R é expressa tanto no cito e sinciciotrofoblasto quanto no trofoblasto extraviloso, principalmente no terço inicial da gestação (BILBAN et al., 2004; JANNEAU et al., 2002). Em ratas, sua expressão ocorre nas células gigantes trofoblásticas, principalmente no terço médio da gestação (12º dia) (TERAO et al., 2004), enquanto na cadela tanto Kisspeptina quanto Kiss1R são expressos no sinciciotrofoblasto, com maior expressão de Kiss1R no meio da gestação (SCHÄFER-SOMI et al., 2016).

Na gata, porém, ainda não há estudos sobre a expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R na interface materno-fetal. Os poucos estudos nessa espécie evidenciaram que *Kiss1* é expresso em neurônios Kisspeptinérgicos do núcleo arqueado (ARC) e periventricular anteroventral (AVPV) do hipotálamo, semelhante ao observado em ratos e camundongos (AMELKINA et al., 2019), e que Kisspeptina e seu receptor são expressos no útero e ovário ao longo do ciclo ovariano (TANYAPANYACHON; AMELKINA; CHATDARONG, 2018). No entanto, o papel do sistema Kisspeptina/Kiss1R no trato genital da gata é pouco conhecido, principalmente durante a gestação, período este que depende da modulação adequada de mediadores angiogênicos e imunológicos para o seu sucesso.

Neste sentido, estudos in vitro já demonstraram que kisspeptina influencia o processo de angiogênese placentária, via modulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (FRANCIS et al., 2014; GOLZAR; JAVANMARD; DANA,

2014; RAMAESH et al., 2010), e o processo de migração e invasão trofoblástica (FRANCIS et al., 2014; HIDEN et al., 2007; ROSEWEIR; KATZ; MILLAR, 2012). Gorbunova e Shirshev (2014) também sugerem a participação de Kisspeptina na formação da tolerância imunológica durante a gestação, uma vez que estimulou in vitro a formação de linfócitos T regulatórios (Treg) em detrimento dos linfócitos T17, com aumento da produção de IL10 e redução de IL17. Apesar disso, ainda não há pesquisas in vivo em mulheres ou animais avaliando a relação do sistema Kisspeptina/Kiss1R com a imunologia e angiogênese da interface materno-fetal.

Com o aumento de gatos criados como animais de estimação, estima-se que esses animais possam superar a população de cães nos próximos anos, e sendo a gata doméstica um modelo experimental útil para o estudo da reprodução de felinos, sobretudo para muitos que estão vulneráveis ou ameaçados de extinção e apresentam dificuldades reprodutivas em cativeiro, o objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R na interface materno-fetal da gata doméstica e sua relação com mediadores angiogênicos e imunológicos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Procedimento experimental

Um total de 12 gatas gestantes, sem raça definida, com um a dois anos de idade, foram utilizadas neste estudo. A coleta do trato genital foi realizada em animais submetidos a ovariohisterectomia no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz devido a complicações pré-parto ou outras complicações no meio da gestação. Todos os animais foram submetidos a exames laboratoriais de hemograma e urinálise e somente os animais com exames normais foram utilizados neste estudo. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) (Processo nº 005/18).

Análise macroscópica do útero contendo a placenta foi realizada e fragmentos dos tecidos foram coletados para análise histológica e imunohistoquímica. Fragmentos do endométrio da região inter-placentária e da placenta também foram armazenados em criotubos com Trizol e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 ºC para análise de expressão gênica pela qPCR.

Fragmentos do endométrio da região inter-placentária foram escolhidos ao invés da decidua para evitar contaminação com material genético de tecido placentário. Após avaliação clínica, macroscópica e histopatológica os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: 1) Meio da gestação (N=6); e 2) Final de gestação (placenta a termo) (N=6). Para avaliação do útero dos animais gestantes, foi utilizado como referência o útero de animais não-gestantes em diestro, com procedimentos pré-cirúrgicos e cirúrgicos semelhantes aos dos animais gestantes.

5.2.2 Ovariohisterectomia

Como medicação pré-anestésica foi utilizado acepromazina (0,05 mg/Kg; IM) (Acepromazine 2%; Syntec) e morfina (0,3 mg/Kg; IM) (Morphine sulfate 10 mg/mL; Hipolabor + Sanval). Já para os animais com complicações pré-parto de rotina clínica e emergência do Hospital Veterinário foi utilizado meperidina (3 mg/Kg; IM). Para a indução anestésica foi utilizado propofol (6 mg/Kg; IV) (Propotil; Biochimico), com posterior infusão contínua de Ringer Lactato (6 ml/kg/h). Após intubação endotraqueal, a anestesia foi mantida com isoflurano (Isoforine; Cristália) em 100% de oxigênio (300 ml/kg/min) em circuito aberto (Baraka) utilizando máquina de anestesia (WATO EX-65, Mindray). Antes da cirurgia, os animais receberam cefalotina sódica (30 mg/Kg; IV) como antibioticoterapia profilática. A ovariohisterectomia foi realizada pela técnica 3 pinças após laparotomia por meio de incisão mediana (CORRÊA et al., 2019).

5.2.3 Processamento dos tecidos e avaliação histopatológica

Fragmentos da placenta com decídua e fragmentos do útero da região inter-placentária dos animais gestantes e útero dos animais não-gestantes em diestro foram fixadas em formol 10% por 24h e processadas seguindo o método de inclusão em parafina (APÊNDICE I). Os tecidos foram desidratados em solução seriada de álcool 70% até álcool absoluto, com posterior diafanização em xilol e impregnação e inclusão em parafina. Cortes de 4µm dos tecidos foram obtidos pela microtomia em lâminas histológicas para avaliação histopatológica. Para imunohistoquímica foram utilizadas lâminas polarizadas silanizadas (StarFrost Polycat, Germany).

Para avaliação histopatológica, os cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina (H&E) (APÊNDICE II). A avaliação histológica da placenta e sua relação com a idade gestacional foi realizada de acordo com (LEISER; KAUFMANN, 1994; LEISER; KOOB, 1993; WOODING; BURTON, 2008). Resumidamente, a idade gestacional foi estimada com base na altura das lamelas placentárias e tamanho do embrião ou feto, além do histórico clínico.

5.2.4 Imunohistoquímica

Secções histológicas da placenta com decídua e do útero da região inter-placentária dos animais gestantes e do útero dos animais não-gestantes em diestro foram submetidas à análise imunoistoquímica utilizando os anticorpos anti-Kiss1(sc-101246, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-KISS1R (HPA071913, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), anti-INFγ (AB9657; Abcam, Cambridge, UK), anti-MIF (AB7207; Abcam, Cambridge, UK), anti-TNFα (sc-527, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-IL10 (sc-365858, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-VEGF (sc-152, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-Flk-1 (sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (Tabela 12).

Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) (APÊNDICE III) e a recuperação antigênica para amostras de útero foi realizada pelo calor em banho-maria a 98 ^{o}C utilizando solução de ácido cítrico (0,54 mol/L) com pH 6,0 e, para amostras de placenta, utilizando solução Trilogy (Sigma-Aldrich; diluição 1:100). As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com o anticorpo primário e por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio (Ultra vision Block, Lab Vision Corp., Fremont, CA. USA) e estreptavidina peroxidase. A incubação com o anticorpo secundário ocorreu por 45 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (DAB Substrate system, Lab Vision Corp., Fremont, CA. USA). Por último, as secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por PBS (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

Tabela 12. Anticorpos usados na imunohistoquímica.

Tecido	Anticorpo	Espécie/clone	Diluição	Tempo de revelação no DAB
Útero	Anti-kiss1	Camundongo/monoclonal	1:50	1 hora
	Anti-kiss1R	Coelho/policlonal	1:50	1 hora
	Anti-MIF	Coelho/policlonal	1:300	8 minutos
	Anti-INFγ	Coelho/policlonal	1:100	14 minutos
	Anti-TNFα	Camundongo/Monoclonal	1:50	1 hora
	Anti-IL10	Camundongo/Monoclonal	1:200	1 min e 20 seg
	Anti-VEGF	Coelho/policlonal	1:100	45 minutos
	Anti-Flk-1	Camundongo/monoclonal	1:50	5 minutos
Placenta + decidua	Anti-kiss1	Camundongo/monoclonal	1:50	20 minutos
	Anti-kiss1R	Coelho/policlonal	1:50	20 minutos
	Anti-MIF	Coelho/policlonal	1:300	6 minutos
	Anti-INFγ	Coelho/policlonal	1:100	6 minutos
	Anti-TNFα	Camundongo/Monoclonal	1:50	5 minutos
	Anti-IL10	Camundongo/Monoclonal	1:200	1 min e 20 seg
	Anti-VEGF	Coelho/policlonal	1: 50	2 minutos
	Anti-Flk-1	Camundongo/monoclonal	1:50	5 minutos

Uma avaliação descritiva e quantitativa da imunomarcação de Kiss, Kiss1R, VEGF, Flk-1, INFγ, MIF, IL10 e TNFα foi realizada no útero e placenta. No útero, a análise descritiva foi realizada considerando a intensidade de expressão (nenhuma = "-"; fraca = "+"; moderada = "++"; intensa = "+++") de cada marcador no epitélio luminal, no epitélio glandular, no estroma endometrial e no miométrio. Na placenta foi considerada a mesma análise nas regiões das lamelas placentárias e na membrana corioalantoidea. Para análise quantitativa foi determinada a área de imunomarcação utilizando o software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA). Imagens do endométrio e das lamelas placentárias foram fotografadas em microscópio Leica DM 2500 utilizando a câmera digital Leica DFC 295 (Leica Microsytems, Germany). Para a análise, *color deconvolution* e *thresholding* das imagens foram realizadas. Os dados de cada tecido foram arquivados, analisados e expressos como área de imunomarcação em pixels (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

5.2.5 PCR em tempo real (qPCR)

Para a técnica de qPCR, a extração do RNA total do endométrio dos animais gestantes e não-gestantes e da placenta foi feita pelo uso do Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) seguindo o protocolo do Kit com algumas modificações (APÊNDICE IV). O método consistiu de uma etapa inicial de lise e homogeneização do tecido em 1 mL de Trizol por cinco minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Logo em seguida, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio, com homogeneização por 15 segundos e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos à 4ºC. A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, com adição de 0,5 mL de álcool isopropílico e incubação por 30 minutos à -80ºC. Após, o microtubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4ºC. O pellet obtido foi lavado com 1 mL de etanol a 75%, homogeneizado e centrifugado a 10.500 rpm por 5 minutos a 4ºC. O RNA foi solubilizado em água ultrapura livre de RNAse e imediatamente estocado a -80ºC. A concentração e qualidade das amostras de RNA de cada tecido foi analisada utilizando nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo scientific) e eletroforese em gel de agarose/formaldeído.

Foi utilizado 1 µg de RNA para a síntese de cDNA utilizando o Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Os transcritos gênicos dos genes alvo foram quantificados pela qPCR utilizando SYBR Green (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG; Invitrogen) no equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies). Para as reações de qPCR utilizou-se 1µL de cDNA, 100nM de cada iniciador e 7,5 µL do reagente syber Green em um volume final de 15 µL de reação. Como controle negativo utilizou-se o mix de amplificação de DNA, no qual a amostra de cDNA foi substituída por água. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: ativação enzimática a 95 ºC por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 ºC por 15 s, e anelamento/extensão a 60 ºC por 60 s. Para avaliar a linearidade e eficiência da amplificação da qPCR, curvas padrões de todos os transcritos foram geradas utilizando diluições seriadas do cDNA, além da avaliação da curva de *melting* dos produtos da amplificação. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA de *Felis catus* (Tabela 5). A expressão gênica foi analisada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na

expressão de 40S Ribossomal protein S7 (RPS7) *Felis catus* (JURSZA; SKARZYNSKI; SIEMIENIUCH, 2014).

Tabela 13. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qPCR.

Gene	Iniciadores	Nº acesso
Kiss1	F: 5′-TGACCTAGTCTCCCCTCCTTC-3 R: 5′-GGAAAAGCATCAGCTGCCAA-3	XM_023247458
Kiss1r	F: 5′-CCCCTCGGTACGAATTTGCT-3 R: 5′-GAACGTTCCAGAGAGTGCCA-3	XM_023242671.1
Tnf	F: 5′-GTAGCAAACCCCGAAGCTGA-3 R: 5′-ATGAGGTACAGCCCGTCTGA-3	NM_001009835.1
Il10	F: 5′-TGGGGAACGAAACATCCAGG-3 R: 5′-AGGTATGACCGGGTTCTCCA-3	NM_001009209.1
Il6	F: 5′-CTTCGAAGGCTGGAGGACTT-3 R: 5′-AGGAATGCCCGTGAACTACA-3	NM_001009211.2
Infγ	F: 5′-TGGGTCGCTTTTCGTAGACA-3 R: 5′-ATGCTCCTTTGAATGCGCTG-3	NM_001009873.1
Mif	F: 5′-TCACGTAGCTCAGGTTACCG-3 R: 5′-TTCACCACGAACATCGGCAT-3	XM_0039994984.5
Vegfa	F: 5′-AAAGAAAATCCCTGTGGGCCT-3 R: 5′-GCAACGCGAGTCTGTGTTTT-3	NM_001009854.1
Pigf	F: 5′-AGCCACTTTGTCTTGACGCT-3 R: 5′-AACAGTATTGCCGCACAGGT-3	XM_01833310.1
Rps7	F: 5′-GTCCCAGAAGCCGCACTTTGAC-3 R: 5′-CTCTTGCCCACAATCTCGCTCG-3	AY800278

F: Forward primer. **R**: Reverse primer.

5.2.6 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± SEM. Os valores médios foram obtidos para a realização da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste *t* de *Student* não-pareado para comparações entre médias de dois grupos ou *Student Newman Keuls* (SNK) para múltiplas comparações, utilizando o software GraphPad Prism®. Para a análise de relação entre a expressão gênica de *Kiss1* e *Kiss1r* com

mediadores angiogênicos e imunológicos na placenta, foi realizada a correlação de Pearson utilizando o ΔCT de cada gene. Para todas as análises as diferenças foram consideradas significativas quando $P<0.05$.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Perfil de expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R na interface materno-fetal de gatas hígidas gestantes

Para análise do sistema Kisspeptina/Kiss1R na interface materno-fetal da gata, fragmentos do útero da região interplacentária foram obtidos de animais no meio e final da gestação, sendo que fragmentos de útero de animais em diestro não-gestantes foram utilizados como controle. A fase de diestro foi confirmada pela observação histológica de corpos lúteos maduros nos ovários e glândulas endometriais hiperplásicas com secreção intra-luminal, além da concentração plasmática de estradiol (54.18±8.99 pg/mL) e progesterona (7.86±1.76 ng/mL). No útero, no final da gestação, houve maior expressão de Kisspeptina e do seu receptor tanto nos epitélios luminal e glandular quanto no estroma endometrial (Fig. 11C e F; Tabela 14) em relação ao útero de animais não-gestantes e útero no meio da gestação, que apresentaram nenhuma expressão nessas estruturas (Fig. 11A, B, D e E; Tabela). Esses resultados foram confirmados pela análise morfométrica da imunomarcação, que demonstrou maior área de expressão endometrial tanto de Kisspeptina quanto de Kiss1R no útero de final de gestação quando comparado ao útero de meio de gestação e útero não-gestante (****$P<0.0001$) (Fig. 11G). De forma semelhante, a análise de expressão gênica mostrou maior expressão gênica de *Kiss1* e *Kiss1r* no útero gestante em comparação ao útero não-gestante (*$P<0.05$) (Fig. 11H).

Em relação à placenta, amostras também foram coletadas dos dois períodos gestacionais – meio e final de gestação para avaliação gênica e proteica do sistema Kisspeptina/Kiss1R. Na análise imunohistoquimica, a Kisspeptina apresentou expressão moderada no sincíciotrofoblasto (setas) e fraca no citotrofoblasto (asterísco) no meio da gestação (Fig. 12A), enquanto no final da gestação não marcou em ambas estruturas placentárias (Fig. 12B; Tabela 15). Entretanto, as células gigantes deciduais (setas) mantiveram alta expressão de Kisspeptina no final da gestação (Fig. 12B; Tabela 15), como também o endoderme alantoico (Tabela 15).

Em relação ao Kiss1R, a expressão proteica no meio e final da gestação foi semelhante, com intensa expressão na camada do sinciciotrofoblasto (setas) (Fig. 12C e D; Tabela 15). No entanto, ao final da gestação, um aumento da intensidade de expressão de Kiss1R nas células gigantes deciduais (setas) (Fig. 12D; Tabela 15) e no endoderme alantoico também foi observado (Tabela 15). Em relação a área de marcação, não houve diferença significativa entre os períodos gestacionais para Kisspeptina e Kiss1R ($P>0.05$) (Fig. 12E). Em contrapartida, houve maior expressão placentária de *Kiss1r* no final da gestação quando comparado ao meio da gestação (***$P<0.001$) (Fig. 12F), diferente da expressão de *Kiss1* que não diferiu entre os períodos gestacionais ($P>0.05$) (Fig. 12F). Além disso, expressão gênica de *Kiss1* na placenta de gatas domésticas não apresenta correlação com a expressão do seu receptor *Kiss1r* (Fig. 12G).

Tabela 14. Caracterização da imunomarcação de Kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) no útero de gatas hígidas em diestro e na região interplacentária de gatas hígidas no meio e final da gestação.

Sistema Kiss1/Kiss1R	Epitélio Luminal			Epitélio Glandular			Estroma endometrial			Miométrio		
	D	MG	FG	D	MG	FG	D	MG	FG	D	MG	FG
Kiss1	-	-	++	+*	+*	++	-	-	++	-	-	-
Kiss1R	-	+	++	+*	+*	++	-	-	+	-	-	-

D = Diestro; MG = Meio da gestação; e FG = Final da gestação.

Intensidade de marcação: nenhuma (-), fraca (+), moderada (++), e intensa (+++).

+* = Expressão proteica fraca em glândulas profundas.

Tabela 15. Caracterização da imunomarcação de Kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) na placenta e decídua de gatas hígidas no meio e final da gestação.

Estruturas		Kiss1		Kiss1R	
		MG	FG	MG	FG
Placenta	**Endoderme alantoico**	+	++	+	+++
	Sincíciotrofoblasto	++	-	+++	+++
	Citotrofoblasto	+	-	+	+
	Células gigantes	+++	+++	++	+++
Decídua	**Epitélio glandular**	++	++	+	+
	Estroma decidual	+	+	+	-

MG = Meio da gestação; e FG = Final da gestação.

Intensidade de marcação: nenhuma (-), fraca (+), moderada (++), e intensa (+++).

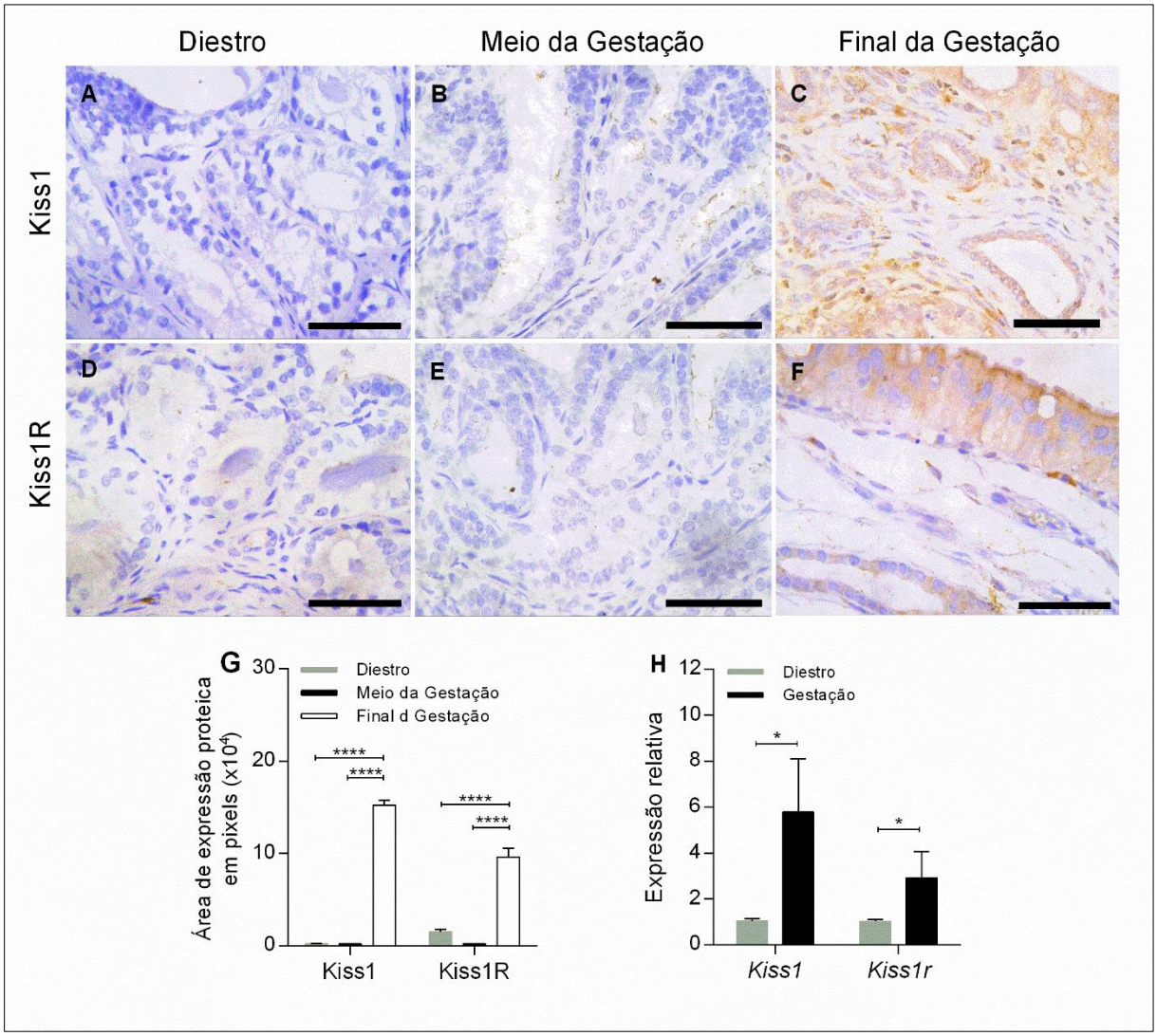

Figura 11. Expressão proteica e gênica de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) no útero de gatas hígidas em diestro e de gatas hígidas no meio e final da gestação. A-F) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de kisspeptina (A-C) e de Kiss1R (D-F) no endométrio das gatas em diestro (A e C) e no endométrio da região inter-placentária de gatas no meio (B e E) e final (C e F) da gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm).G) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de kisspeptina e Kiss1R nas gatas em diestro e na região interplacentária de gatas no meio e final da gestação. (média±SEM; ****P<0.0001; n=6). F) Expressão gênica relativa de *Kiss1* e *Kiss1r* no endométrio de gatas em diestro e na região inter-placentária de gatas gestantes (média±SEM; *P<0.05; n=6). Fonte: Arquivo pessoal.

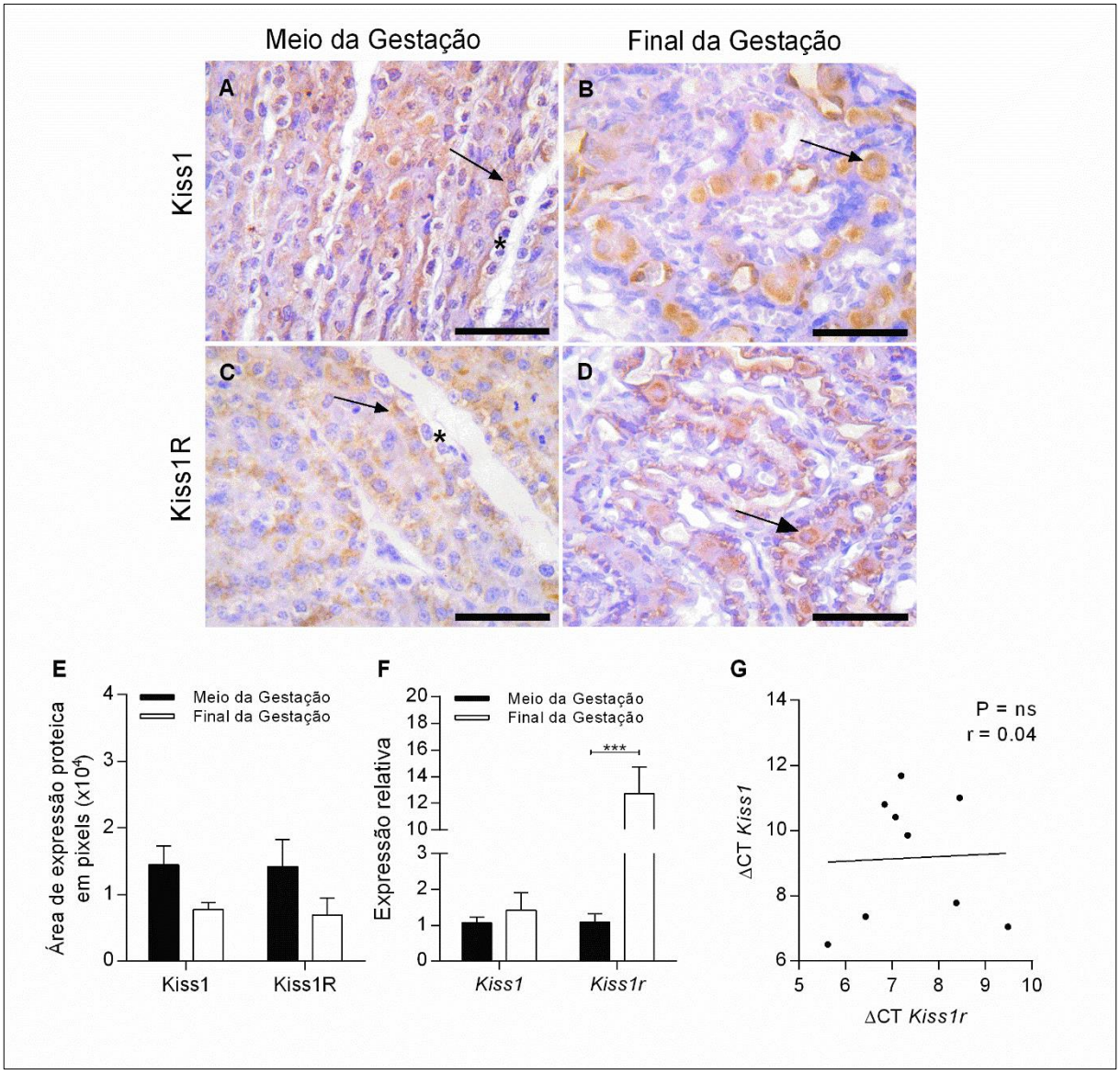

Figura 12. Expressão proteica e gênica de Kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) na placenta de gatas no meio e final da gestação. A-F) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de kisspeptina (A-B) e de Kiss1R (C-D) na placenta de gatas no meio (A e D) e final (B e D) da gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Barra = 50 µm). E) Área de imunomarcação em pixels da expressão placentária de kisspeptina e Kiss1R em gatas no meio e final da gestação. (média±SEM; n=6). F) Expressão gênica relativa de *Kiss1* e *Kiss1r* na placenta de gatas no meio e final da gestação (média±SEM; ****P*<0.001; n=6). G) Correlação da expressão gênica de *Kiss1* com a expressão de *Kiss1r* na placenta de gatas hígidas. Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.2 Perfil de expressão de mediadores angiogênicos na interface materno-fetal de gatas hígidas gestantes

Em relação a expressão dos mediadores angiogênicos no útero gestante, a imunoistoquímica mostrou que a expressão de VEGF e Flk-1 no meio da gestação foi semelhante ao útero de gatas em diestro, enquanto houve redução da

imunomarcação no epitélio luminal e glandular no final da gestação, principalmente para o VEGF (Tabela 16; Fig. 13A-F). A análise da área de imunomarcação reforçou esses resultados, com redução na área de marcação de VEGF e Flk-1 no final da gestação em relação ao útero em diestro e meio da gestação (*P<0.05) (Fig. 13G). Além disso, o útero gestante apresentou maior expressão de *Vegf* em relação ao útero em diestro (*P<0.05) (Fig. 13H), diferente de *Pigf* que teve expressão reduzida no útero gestante (*P<0.05) (Fig. 13H).

Na placenta, o perfil de expressão tanto de VEGF quanto de Flk-1 foi semelhante ao do útero gestante, com redução da área de expressão no final da gestação (**P<0.01) (Fig. 14A-D). A expressão placentária de VEGF foi citoplasmática e nuclear, com redução da intensidade no sinciciotrofoblasto e endoderme alantoico no final da gestação (Fig. 14B; Tabela 17). Já o Flk-1 apresentou marcação somente citoplasmática, com redução da intensidade nos trofoblastos no final da gestação (Fig. 14D; Tabela 17). A expressão em células gigantes deciduais (setas) (Fig. 14B e D) e no endoderme alantoico se manteve semelhante entre os tempos gestacionais, como também foi observado na decídua (Tabela 17). Na expressão gênica, redução da expressão placentária de *Vegf* no final da gestação foi observada em relação ao meio da gestação (***P<0.001) (Fig. 14F), enquanto *Pigf* teve maior expressão no final da gestação (*P<0.05) (Fig. 14F).

Em relação a expressão gênica dos mediadores angiogênicos com o sistema Kisspeptina/Kiss1R, verificou-se correlação significativa e negativa da expressão de *Kiss1r* com a expressão de *Vegf* (***P<0.001) (Fig. 14I), enquanto o mesmo receptor apresentou correlação positiva para a expressão de *Pigf* (*P<0.05) (Fig. 14J). Não houve correlação entre a expressão gênica de *Kiss1* e os mediadores angiogênicos estudados (P>0.05) (Fig. 14G e H).

Tabela 16. Caracterização da imunomarcação de VEGF e seu receptor (Flk1) no útero de gatas hígidas em diestro e na região interplacentária de gatas hígidas no meio e final da gestação.

Mediadores angiogênicos	Epitélio Luminal			Epitélio Glandular			Estroma endometrial			Miométrio		
	D	MG	FG	D	MG	FG	D	MG	FG	D	MG	FG
VEGF	+++	++	+	++	++	+	-	-	-	++	+	+++
Flk-1	+++	+++	+++	++	+++	++	++	-	-	++	+	+++

D = Diestro; MG = Meio da gestação; e FG = Final da gestação.

Intensidade de marcação: nenhuma (-), fraca (+), moderada (++), e intensa (+++).

Tabela 17. Caracterização da imunomarcação de VEGF e seu receptor (Flk1) na placenta e decídua de gatas hígidas no meio e final da gestação.

Estruturas		VEGF		Flk-1	
		MG	FG	MG	FG
Placenta	Endoderme alantóico	++	+	+++	+++
	Sincíciotrofoblasto	++	+	+++	+
	Citotrofoblasto	+	+++	+++	++
	Células gigantes	++	++	+++	+++
Decídua	Epitélio glandular	+++	+++	+++	+++
	Estroma decidual	+++	++	++	++

MG = Meio da gestação; e FG = Final da gestação.

Intensidade de marcação: nenhuma (-), fraca (+), moderada (++), e intensa (+++).

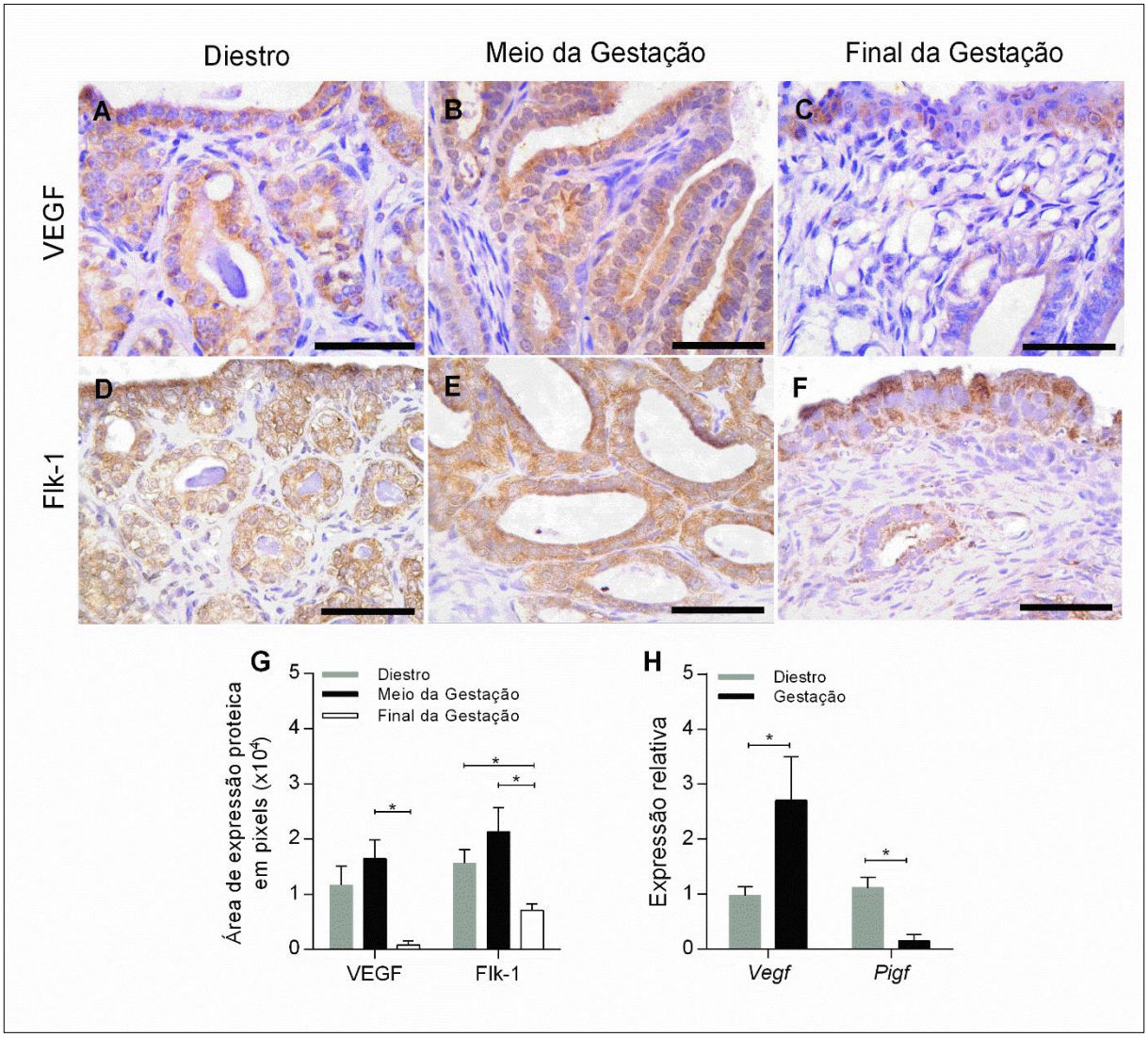

Figura 13. Expressão proteica e gênica de mediadores angiogênicos no útero de gatas hígidas em diestro e de gatas hígidas no meio e final da gestação. A-F) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de VEGF (A-C) e Flk1 (D-F) no endométrio de gatas em diestro (A e D) e no endométrio da região inter-placentária de gatas no meio (B e E) e final (C e F) da gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). G) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de VEGF e Flk1 de gatas em diestro e na região inter-placentária de gatas no meio e final da gestação. (média±SEM; **P*<0.05; n=6). F) Expressão gênica relativa de *Vegf* e *Pigf* no endométrio de gatas em diestro e na região interplacentária de gatas gestantes (média±SEM; **P*<0.05.; n=6). Fonte: Arquivo pessoal.

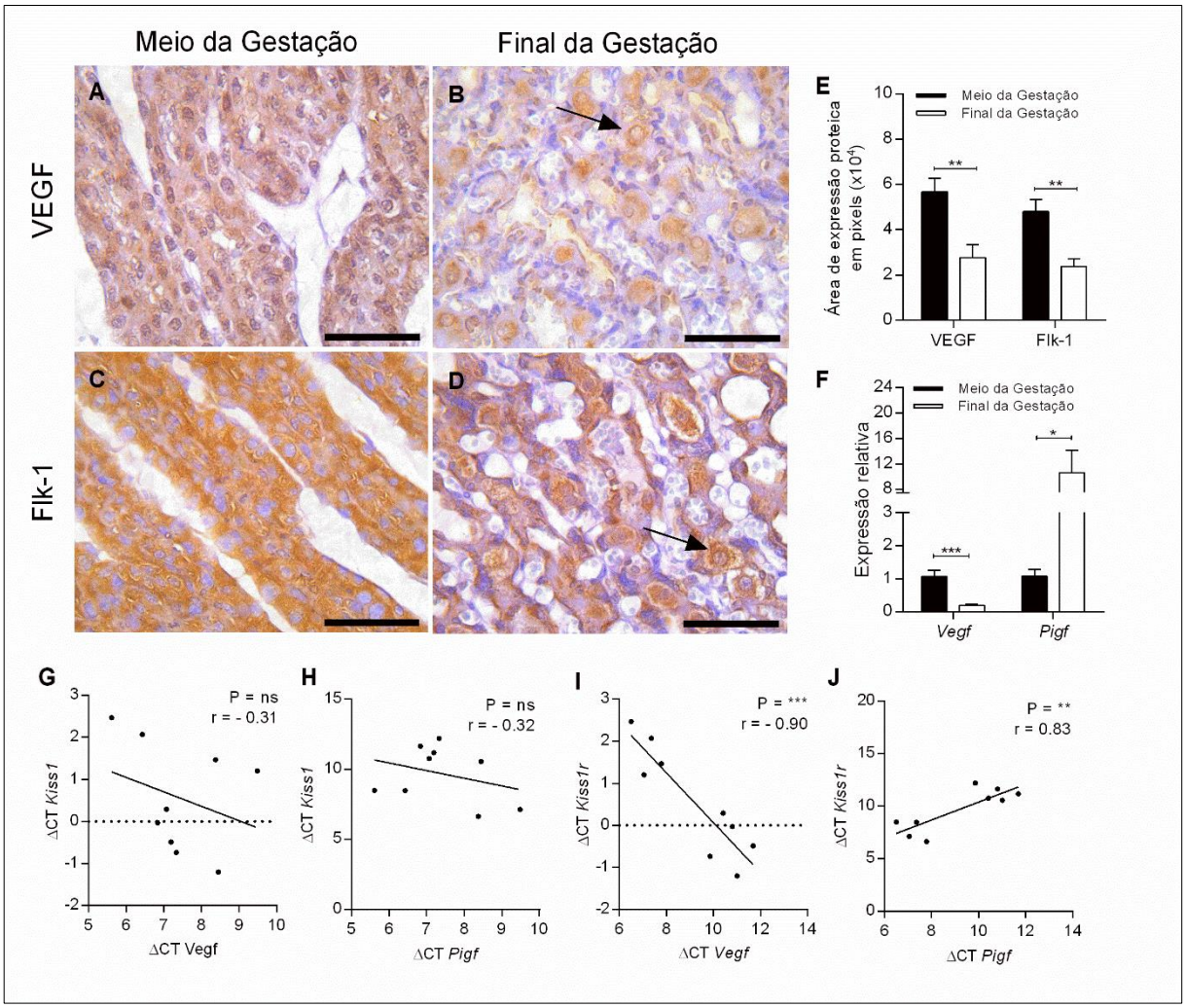

Figura 14. Expressão proteica e gênica de mediadores angiogênicos na placenta de gatas no meio e final da gestação. A-F) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de VEGF (A-B) e Flk1 (C-D) na placenta de gatas no meio (A e C) e final (B e D) da gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). E) Área de imunomarcação em pixels da expressão placentária de VEGF e Flk1 em gatas no meio e final da gestação. (média±SEM; **P<0,01; n=6). F) Expressão gênica relativa de *Vegf* e *Pigf* na placenta de gatas no meio e final da gestação (média±SEM; *P<0.05; ***P<0.001; n=6). G-J) Correlação da expressão gênica de *Vegf e Flk1* com a expressão de *Kiss* e *Kiss1r* na placenta de gatas hígidas. (**P<0.01; ***P<0.001). Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.3 Perfil de expressão de mediadores imunológicos na interface materno-fetal de gatas hígidas gestantes

Em relação aos mediadores imunológicos no útero gestante, INFγ, MIF e IL10 apresentaram expressão proteica semelhante entre os grupos experimentais, com marcação citoplasmática e nuclear na maioria das células dos epitélios luminal e glandular e do estroma endometrial (Fig. 15A-F e J-L). No entanto, foi evidente uma intensa expressão para esses marcadores no estroma endometrial no final da

gestação, enquanto foi ausente ou fraca no meio da gestação (Tabela 18). O TNFα, diferente dos outros mediadores, apresentou expressão fraca ou nula no estroma endometrial tanto no meio quanto no final da gestação (Fig. 15H e I; Tabela 18), embora aumento na intensidade de expressão nos epitélios luminal e glandular no meio e final da gestação foi observado em relação ao útero em diestro (Tabela 18). Além disso, houve maior área de expressão endometrial de MIF e TNFα no meio da gestação em relação ao final da gestação (**P*<0.05) e útero não-gestante (***P*<0.01) (Fig. 15M), diferente dos outros mediadores que não apresentaram diferença entre os grupos experimentais (*P*>0.05) (Fig. 15M). Em relação a expressão gênica, maior expressão de *Il10* e *Tnf* no útero gestante em comparação ao útero em diestro foi observada (**P*<0.05) (Fig. 15N).

Na placenta, para todos os mediadores imunológicos avaliados, houve redução na intensidade de expressão nos trofoblastos no final da gestação em relação ao meio da gestação (Fig. 16A-H; Tabela 19). Em contrapartida, maior expressão desses mediadores nas células gigantes deciduais (setas) ao final da gestação foi observada (Fig. 16B, D, F e H; Tabela 19). Análise da área de imunomarcação também mostrou maior expressão de INFγ, TNFα e IL10 no meio da gestação em relação ao final da gestação (**P*<0.05) (Fig. 16I), como também foi observada maior expressão gênica de *Infγ, Il6* e *Il10* no meio da gestação em comparação ao final da gestação (**P*<0.05) (Fig. 16J). Na análise de correlação, relação significativa e positiva da expressão de *Kiss1* com *Tnf* foi observada (***P*<0.01) (Fig. 16M), enquanto *Kiss1r* teve correlação significativa e negativa com *Infγ*, *Il6* e *Il10* (****P*<0.001) (Fig. 16P, S e T).

Tabela 18. Caracterização da imunomarcação de mediadores imunológicos no útero de gatas hígidas em diestro e na região interplacentária de gatas hígidas no meio e final da gestação.

Mediadores imunológicos	Epitélio Luminal			Epitélio Glandular			Estroma endometrial			Miométrio		
	D	MG	FG	D	MG	FG	D	MG	FG	D	MG	FG
INFγ	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	-	++	+	+	+++
Mif	++	++	++	++	++	+++	++	-	++	-	-	-
Tnfα	+	++	+++	+	++	++	+	-	-	+	-	+
Il10	+++	+++	+++	++	++	+++	++	-	+++	++	+++	++

D = Diestro; MG = Meio da gestação; e FG = Final da gestação.

Intensidade de marcação: nenhuma (-), fraca (+), moderada (++), e intensa (+++).

Tabela 19. Caracterização da imunomarcação de mediadores imunológicos na placenta e decídua de gatas hígidas no meio e final da gestação.

Estruturas		Infγ		Mif		Tnfα		Il10	
		MG	FG	MG	FG	MG	FG	MG	FG
Placenta	Endoderme alantóico	++	+++	++	+	+	++	+++	+
	Sincíciotrofoblasto	++	+	++	+	++	-	+++	-
	Citotrofoblasto	++	+	++	+	++	+	++	+
	Células gigantes	+	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
Decídua	Epitélio glandular	++	+++	+++	++	++	+	+	+++
	Estroma decidual	++	++	+++	++	+	+	+	+++

MG = Meio da gestação; e FG = Final da gestação.

Intensidade de marcação: nenhuma (-), fraca (+), moderada (++), e intensa (+++).

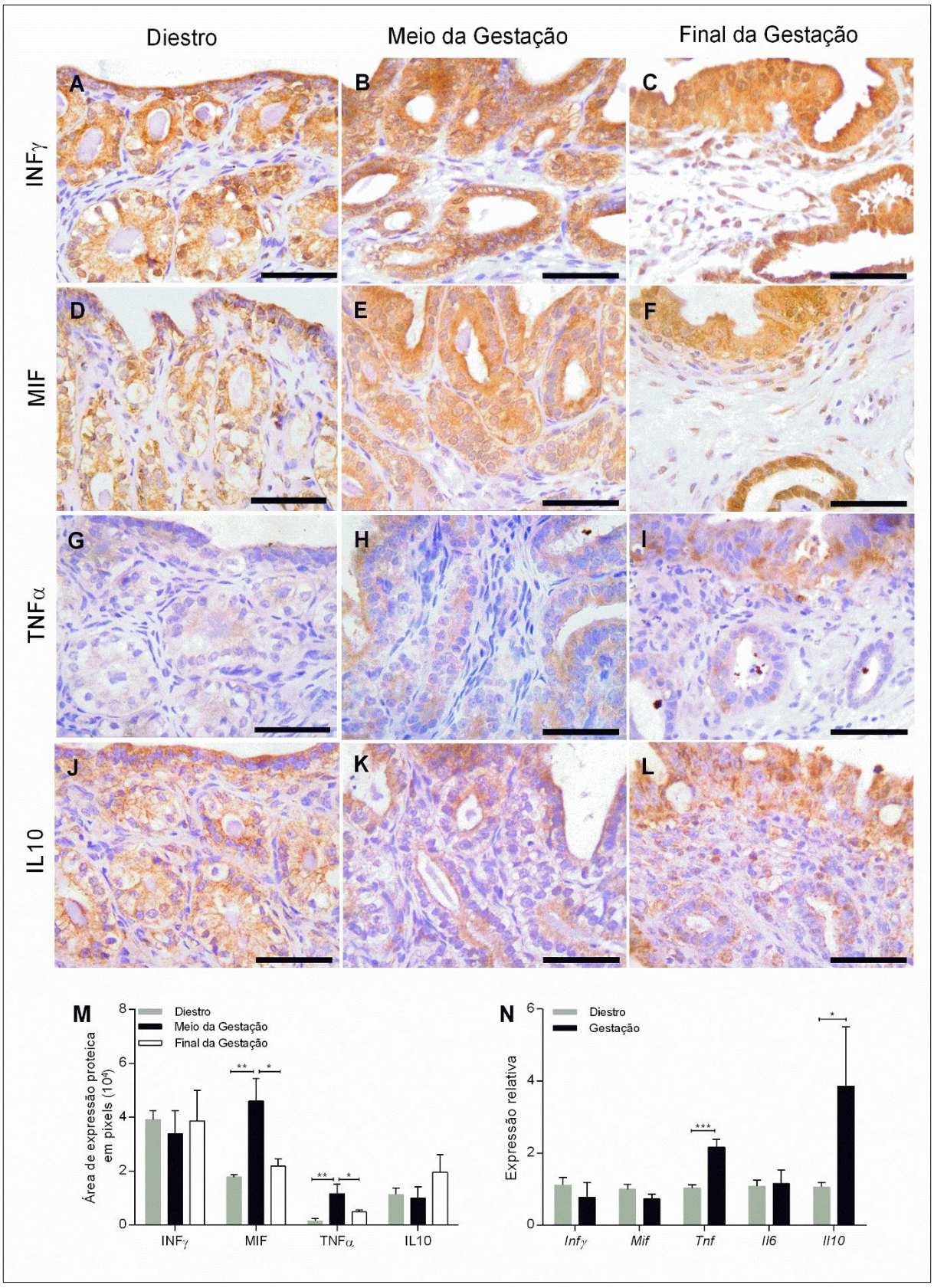
Diestro
Meio da Gestação
Final da Gestação
INFγ
MIF
TNFα
IL10
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
Área de expressão proteica em pixels (10⁴)
Diestro
Meio da Gestação
Final da Gestação
INFγ
MIF
TNFα
IL10
N
Expressão relativa
Diestro
Gestação
Infγ
Mif
Tnf
Il6
Il10

Figura 15. Expressão proteica e gênica de mediadores imunológicos no útero de gatas hígidas em diestro e de gatas hígidas no meio e final da gestação. A-L) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de INFγ (A-C), MIF (D-F), TNFα (G-I) e IL10 (J-L) no endométrio das gatas em diestro (A, D,G e J) e no endométrio da região interplacentária de gatas no meio (B,E,H e K) e final (C, F, I e L) da gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Barra = 50 µm). M) Área de imunomarcação em pixels da expressão endometrial de INFγ, MIF, TNFα e IL10 nas gatas em diestro e na região inter-placentária de gatas no meio e final da gestação. (média±SEM; **P*<0.05; ***P*<0.01; n=6). F) Expressão gênica relativa de *Infγ, Mif, Tnf, Il6* e *Il10* no endométrio das gatas em diestro e na região interplacentária de gatas gestantes (média±SEM; **P*<0.05; ****P*<0.001 n=6). Fonte: Arquivo pessoal.

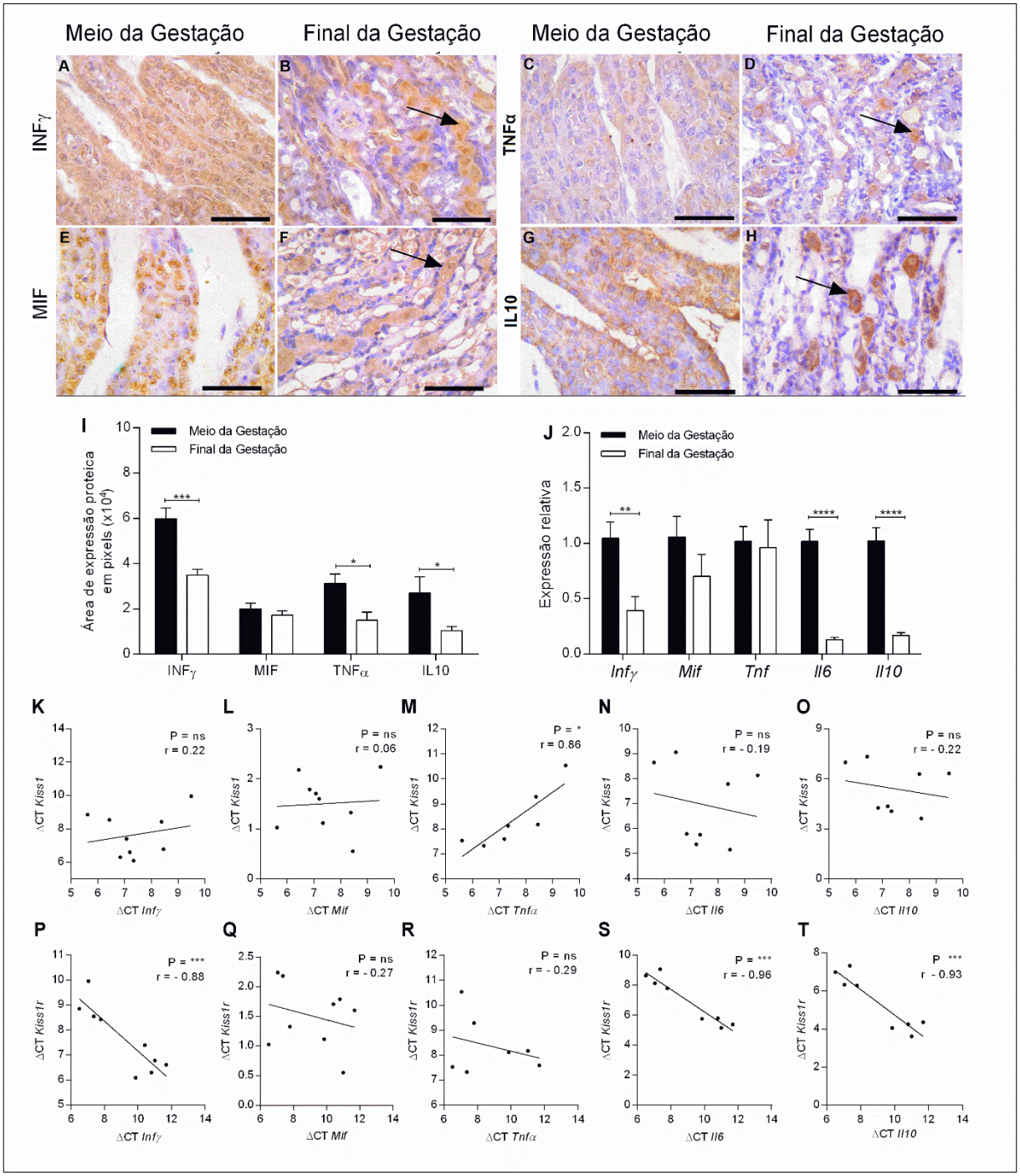

Figura 16. Expressão proteica e gênica de mediadores imunológicos na placenta de gatas no meio e final da gestação. A-F) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de INFγ (A-B), TNFα (C-D), MIF (E-F) e IL10 (G-H) na placenta de gatas no meio (A, C, E, G) e final (B, D, F, H) da gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Barra = 50 µm). I) Área de imunomarcação em pixels da expressão placentária de INFγ, MIF, TNFα e IL10 em gatas no meio e final da gestação. (média±SEM;*$P<0.05$; ***$P<0.001$; n=6). F) Expressão gênica relativa de *Infγ, Mif, Tnf, Il6* e *Il10* na placenta de gatas no meio e final da gestação (média±SEM; **$P<0.01$;****$P<0.0001$; n=6). G) Correlação da expressão gênica de *Infγ, Mif, Tnfα, Il6* e *Il10* com a expressão de *Kiss* e *Kiss1r* na placenta de gatas hígidas (**$P<0.01$; ***$P<0.001$). Fonte: Arquivo pessoal.

5.4 DISCUSSÃO

A interface materno-fetal é vital para a comunicação entre a mãe e feto durante a gestação (SILVA; SERAKIDES, 2016). Na placenta e decídua, diversos fatores de crescimento e reguladores do sistema imune são diferentemente expressos afim de garantir o sucesso do desenvolvimento fetal, sendo que falhas na expressão desses mediadores podem resultar em aborto, parto prematuro e restrição de crescimento fetal (COULAM, 2000; TODER et al., 2003). Nossos estudos mostraram pela primeira vez que a gestação estimula a expressão uterina do sistema Kisspeptina/Kiss1R na gata doméstica. Também identificamos a presença de Kisspeptina e seu receptor na placenta desses animais, e que a expressão não somente apresentou uma distribuição espaço-temporal diferente ao longo da gestação, como também há maior expressão placentária de *Kiss1r* no final da gestação. Além disso, a expressão de *Kiss1* e *Kiss1r* apresentou correlação significativa com a expressão de alguns mediadores angiogênicos e imunológicos placentários, sugerindo que nesses animais a fisiologia placentária é modulada pelo sistema Kisspeptina/Kiss1R.

Em humanos e roedores, Kisspeptina e Kiss1R tem sido caracterizados como importantes moduladores da fisiologia de órgãos periféricos, incluindo a interface materno-fetal (para revisão, ver Cao et al., (2019); Hu et al., (2019)). Neste estudo, mostramos que o endométrio de gatas gestantes exibe maior expressão gênica de *Kiss1* e *Kiss1r* quando comparado ao endométrio de gatas não-gestantes em diestro. Esses dados sugerem a importância do sistema Kisspeptina/Kiss1R no útero gestante de gatas domésticas, que está de acordo com estudos prévios que sugerem o papel da Kisspeptina na implantação e decidualização, sobretudo pela sua maior expressão na fase luteal (CALDER et al., 2014; ZHANG et al., 2014). Zhang et al. (2014), por exemplo, verificaram que o sistema Kisspeptina/Kiss1R estimula a decidualização de células estromais uterinas de camundongo. Camundongos nocautes para *Kiss1* também apresentam menor expressão uterina de fator inibidor da leucemia (LIF). O LIF é secretado pelas glândulas uterinas e é necessário para implantação embrionária e decidualização (CALDER et al., 2014). Além disso, na cadela, a expressão uterina de kisspeptina parece exercer funções antes da implantação embrionária, visto que há maior expressão no período de pré-implantação quando comparado ao pós-implantação e meio da gestação (SCHÄFER-SOMI et al., 2016).

No entanto, a expressão proteica uterina do sistema Kisspeptina/Kiss1R ocorreu principalmente no final da gestação. Forte imunomarcação de Kisspeptina e seu receptor foi observada não somente no epitélio luminal e glandular no final da gestação, como também no estroma endometrial, diferente das gatas em diestro não gestantes onde a expressão era discreta e principalmente nas glândulas endometriais profundas. Além disso, as células gigantes deciduais, que estão presentes na placenta, também apresentaram forte expressão de Kisspeptina e Kiss1R no final da gestação quando comparado ao meio da gestação. Esses dados sugerem que o útero no final da gestação modula a fisiologia placentária via sinalização Kisspeptina/Kiss1R, pelo menos na gata doméstica, particularmente pelo fato de ter ocorrido maior expressão placentária de *Kiss1r* ao final da gestação. Além disso, é possível que o sistema Kisspeptina/Kiss1R uterino esteja envolvido na ocorrência do parto. Estudos em ratas demonstraram que a administração de kisspeptina aumenta os níveis plasmáticos de oxitocina (KOTANI et al., 2001), enquanto que em ratas gestantes e não-gestantes a administração de Kisspeptina aumenta a taxa de disparo dos neurônios oxitocinérgicos (SCOTT; BROWN, 2011, 2013). Como no final da gestação há aumento de receptores para oxitoxina no miométrio para a ocorrência do parto (KIMURA et al., 1996), nossos dados sugerem, pelo menos na gata doméstica, que a Kisspeptina de origem uterina possa modular de forma parácrina este processo, corroborando com os resultados de maior expressão uterina do sistema Kisspeptina/Kiss1R ao final da gestação. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Semelhante ao nosso estudo, Janneau et al. (2002) não verificaram diferenças na expressão de *Kiss1* na placenta de mulheres de início e final da gestação, mas observaram maior expressão de *Kiss1r* na placenta de início de gestação, especialmente nas células trofoblásticas. Em contrapartida, redução da expressão gênica de *Kiss1* foi observada na placenta de mulheres do início para o final da gestação (BILBAN et al., 2004; TORRICELLI et al., 2008), como também foi observado por Terao et al. (2004) em ratas. Mark et al. (2013), ao contrário, observaram na rata maior expressão placentária de Kisspeptina no 22º dia de gestação em relação ao 16º dia. Curiosamente, na cadela, houve maior expressão de Kiss1R no sinciciotrofoblasto no meio da gestação em relação ao período de pós-

implantação (SCHÄFER-SOMI et al., 2016), mostrando que, nessa espécie, assim como na gata, há um aumento de Kiss1R com o avanço da gestação.

Como o estabelecimento da interface materno-fetal e a realização das trocas de nutrientes e metabólitos entre a mãe e feto dependem de um remodelamento vascular adequado (SILVA et al., 2012), também avaliamos o perfil de expressão de VEGF, Flk-1 e PIGF no útero e placenta da gata doméstica no meio e final da gestação, que são os principais mediadores pró-angiogênicos envolvidos na vascularização útero-placentária (CARMELIET et al., 2001; PIIA et al., 1997). A gestação aumentou a expressão gênica de *Vegf* no endométrio, havendo maior imunomarcação de VEGF e Flk-1 no meio da gestação em relação ao final da gestação, com forte expressão no epitélio luminal e glandular. Padrão semelhante também foi observado na placenta, onde houve maior expressão de VEGF e Flk-1 no meio da gestação em relação ao final. Curiosamente, a expressão de *Pigf* foi menor no útero gestante em relação ao útero de gatas não-gestantes, enquanto na placenta houve um aumento na expressão gênica do meio para o final da gestação. Nossos resultados são semelhantes aos descritos na literatura para ratas (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2017) e mulheres (CLARK et al., 1996; JACKSON et al., 1994) que demonstraram maior expressão de VEGF e Flk-1 no meio da gestação em relação ao final, enquanto a expressão de PIGF aumenta no decorrer da gestação. Isso demonstra que o perfil desses mediadores na interface materno-fetal se mantem semelhante entre gatas, ratas e mulheres.

VEGF e seus ligantes atuam principalmente no processo inicial de formação e remodelamento vascular, permitindo a formação de vasos sanguíneos além do aumento da permeabilidade vascular, processos que ocorrem principalmente no início e meio da gestação. O PIGF, em contrapartida, atua na maturação vascular, ao promover maior estabilidade dos vasos sanguíneos já formados (CARMELIET et al., 2001). Isso explica sua maior expressão na placenta ao final da gestação, uma vez que a placenta está completamente formada e o remodelamento vascular é menos intenso. O mesmo pode se sugerir para o útero gestante que teve menor expressão de *Pigf* comparado ao útero de gatas não gestantes, uma vez que no útero gestante está ocorrendo intensa angiogênese para permitir o estabelecimento da junção materno-fetal e a troca de nutrientes entre a mãe e o feto (DEMIR; YABA; HUPPERTZ, 2010; TORRY et al., 2007). De forma interessante, na placenta da gata, também

observamos correlação gênica significativa e negativa da expressão do *Kiss1r* com *Vegf*, enquanto o mesmo receptor apresentou correlação positiva com *Pigf*, sugerindo que a sinalização do receptor de Kisspeptina pode modular a expressão de *Vegf* e *Pigf* na placenta desses animais. Esse resultado ainda não foi demonstrado em nenhuma outra espécie animal e nem na mulher, sugerindo um possível link funcional entre a expressão do sistema Kisspeptina/KissR com a angiogênese placentária. A expressão de VEGF e Flk-1 no tecido uterino e placentário também já foi descrita em equinos (Allen *et al.*, 2007), suinos (WINTHER; AHMED; DANTZER, 1999), ovinos (BOGIC; BRACE; CHEUNG, 2001) e mustelídeos (WINTHER; DANTZER, 2001).

Em relação aos mediadores imunológicos estudados, padrão semelhante aos angiogênicos também foi observado. A gestação estimulou a expressão gênica endometrial de *Tnf* e *IL10* na gata, como também aumentou a expressão proteica de MIF e TNFα no meio da gestação em relação ao útero de gatas não-gestantes, e a expressão de ambos os marcadores ocorreu principalmente nos epitélios luminal e glandular. Na placenta, por sua vez, *Infγ*, *Il6* e *Il10* apresentaram maior expressão gênica no meio da gestação, como também foi observado maior imunomarcação para INFγ, TNFα e IL10. Em outras espécies animais e na mulher já foi demonstrado que fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios são requeridos no início e meio da gestação para formação da tolerância imunológica fetal como também para o intenso remodelamento tecidual que ocorre durante esses períodos gestacionais (COULAM, 2000; FÖRGER; VILLIGER, 2020; TODER et al., 2003). Isso justifica a maior expressão de mediadores imunológicos no útero e placenta de gatas no meio da gestação. Além disso, o MIF, que teve maior expressão uterina no meio da gestação, quando comparado ao útero de gatas não-gestantes, apresenta não somente ação pró-inflamatória, como também tem importante função pró-angiogênica e no remodelamento tecidual, além de estimular a sobrevivência de células deciduais e trofoblásticas (BEVILACQUA et al., 2014; COSTA et al., 2016; IETTA et al., 2018; KATS et al., 2005), processos importantes no endométrio no início e meio da gestação. A expressão de MIF no tecido uterino e placentário foi descrita também em outras espécies, incluindo humanos (COMBA et al., 2015; KATS et al., 2005; ZENG et al., 1993), roedores (FARIA et al., 2010); suínos (PAULESU et al., 2005), bovinos (PAULESU et al., 2012) e ovinos (LOPES et al., 2011).

É importante ressaltar que na placenta da gata ao final da gestação, embora tenha sido observada uma redução da imunomarcação nos trofoblastos de todos os medidores estudados, inclusive do sistema Kisspeptina/Kiss1R, as células gigantes deciduais mantiveram forte expressão de todos eles. Até o momento não havia sido relatado possíveis funções para essas células e esses resultados sugerem que elas possam desempenhar importantes funções na modulação de mediadores angiogênicos e imunológicos na placenta ao final da gestação, especialmente na gata.

Em relação aos mediadores inflamatórios, também verificamos que *Kiss1 e Tnf* apresentaram correlação significativa e positiva, enquanto *Kiss1r* teve correlação significativa e negativa com *Infy*, *Il6* e *Il10*. Esses dados sugerem, pela primeira vez na literatura, que alterações no sistema Kisspeptina/Kiss1R placentário podem alterar o perfil de mediadores imunológicos placentários e, consequentemente, o sucesso gestacional. Ressalta-se que alterações nesses mediadores na placenta estão associadas a casos recorrentes de aborto, restrição de crescimento intrauterino e outras complicações gestacionais, como falha na invasão trofoblástica (COULAM, 2000; HAMMER, 2011; TODER et al., 2003; ZHANG et al., 2007). Desse modo, baseado nos nossos resultados, é possível que haja um link entre esses distúrbios gestacionais resultantes de alterações inflamatórias com falhas na expressão de kisspeptina, uma vez que outros estudos já confirmaram menor expressão placentária de kisspeptina em disfunções gestacionais (ARMSTRONG et al., 2009; SULLIVAN-PYKE et al., 2018).

5.5 CONCLUSÃO

Por meio deste estudo mostramos que a gestação na gata doméstica estimula a expressão uterina do sistema Kisspeptina/Kiss1R, principalmente no final da gestação. Além disso, Kisspeptina e seu receptor são expressos na placenta de gata, com maior expressão de *Kiss1r* no final da gestação, sendo que há correlação gênica significativa da expressão desse sistema com mediadores angiogênicos e imunológicos placentários, com maior expressão deles no meio da gestação.

6 CAPÍTULO III

Expressão do sistema Kiss1/Kiss1R e mediadores angiogênicos e imunológicos no ovário de gatas cíclicas e gestantes

Resumo

O sistema Kisspeptina/Kiss1R regula a reprodução e tem sido estudado em ovários de mamíferos, com ações reportadas no desenvolvimento folicular, ovulação e função luteal. Contudo, ainda não há estudos sobre a modulação desse sistema no ovário de gatas domésticas, principalmente gestantes, bem como sua relação com mediadores angiogênicos e imunológicos, que também são importantes para a função ovariana adequada. Após avaliação clínica, histopatológica e perfil plasmático de progesterona e estradiol de 105 gatas, foram utilizados ovários de animais em proestro/estro (N=20), diestro (N=41), anestro (N=32) e gestantes (N=12) para avaliação da expressão de Kiss1, Kiss1R, VEGF, Flk-1, PIGF, INFγ e MIF durante a foliculogênese (proestro/estro), luteogênese (diestro e gestantes) e regressão luteal (anestro) por imunohistoquimica e/ou qPCR. O ovário exibiu expressão moderada a intensa de Kiss1, VEGF, Flk-1, INFγ e MIF em ovócitos e parede folicular, com aumento da expressão na camada da teca para INFy e MIF em folículos antrais, enquanto Kiss1R expressou fracamente apenas em folículos primordiais. Na luteogênese, Kiss1 exibiu maior área de expressão em corpos lúteos (CLs) maduros de gatas gestantes e não-gestantes, quando comparado a CLs vacuolizados e corpos albicans, sendo que a gestação aumentou a expressão gênica luteal de *Kiss1,* assim como a imunomarcação para Kiss1R em CLs maduros, em relação a gatas não gestantes em diestro. A imunomarcação de MIF foi também maior em CLs maduros de gatas gestantes e não-gestantes em relação aos CLs vacuolizados e corpos *albicans*, enquanto a gestação reduziu a expressão gênica luteal de *Mif*. Além disso, corpos *albicans* apresentaram menor expressão de *Kiss1*, *Kiss1r*, *Vegf* e *Mif* em relação aos CLs de animais gestantes e não-gestantes e houve correlação gênica positiva da expressão de *Kiss1r* com *Mif* nos CLs. Conclui-se que o perfil de expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R e mediadores angiogênicos e imunológicos no ovário de gatas depende do estágio folicular e luteal, sendo que a expressão luteal desses mediadores sofre influência da gestação.

Palavras-chave: Foliculogênese, luteogênese, Kisspeptina, angiogênese, imumologia, gato doméstico.

6.1 INTRODUÇÃO

A Kisspeptina é um neuropeptídeo codificado pelo gente *Kiss1* que, por meio do seu receptor Kiss1R, sinaliza e controla a liberação pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo (KOTANI et al., 2001) e, consequentemente, de hormônio luteinizante (LH) e hormônio foliculo estimulante

(FSH) pela adenohipófise (GOTTSCH et al., 2004). Por isso, o sistema Kiss/Kiss1R controla o eixo Hipotálamo-Hipofisário-Gonadal (HPG) e falhas na sinalização de *Kiss1* ou *Kiss1r* causam hipogonadismo hipogonadotrófico em humanos e roedores (DE ROUX et al., 2003; FUNES et al., 2003). No entanto, além da função central no eixo HPG, a Kisspeptina e seu receptor possuem ações locais em órgãos periféricos, especialmente no ovário durante o desenvolvimento folicular e luteal (para revisão, ver Hu *et al.*, 2018), sugerindo que falha na sinalização ovariana do sistema Kiss/Kiss1R também possa resultar em infertilidade.

O ovário é uma órgão endócrino responsável pela produção dos oócitos e esteroidogênese, sendo que Kisspeptina e seu receptor já foram descritos nas células foliculares, intersticiais e luteais de mulheres (Cejudo Roman *et al.*, 2012), camundongos (Dorfman *et al.*, 2014), ratas (Castellano *et al.*, 2006), cães (CIELESH et al., 2017) e suínos (Basini et al., 2018), embora a sua função local seja ainda pobremente conhecida. Em ratas, foi observado aumento da expressão nas células da granulosa durante o pico pré-ovulatório de LH (Castellano *et al.*, 2006; Laoharatchatathanin *et al.*, 2015), sugerindo seu papel na ovulação e luteinização das células da granulosa, uma vez que seu aumento no tecido ovarino na tarde do proestro não ocorreu após o bloqueio do pico de LH (CASTELLANO et al., 2006), enquanto a produção *in vitro* de progesterona por células da granulosa foi inibida com um antagonista de kisspeptina (p234) (Laoharatchatathanin *et al.*, 2015). Resultados semelhantes foram descritos por outros estudos que demonstraram aumento da produção *in vitro* de P4 por células da granulosa de ratas (Peng et al., 2013), suinos (Basini et al., 2018) e frangos (Xiao *et al.*, 2011) após tratamento com kisspeptina, enquanto seu uso *in vitro* também estimulou a maturação oocitária de suínos, com aumento da taxa de formação e eclosão de blastocistos (SAADELDIN et al., 2012), além de melhorar a expansão de células do cumulus de ovinos e a extrusão do 1º corpúsculo polar (BYRI et al., 2017). Em contrapartida, condições patológicas também sugerem alterações na expressão ovariana de kisspeptina, uma vez que camundongos *knockout* para *Kiss1* apresentaram falha ovariana prematura, mesmo recebendo reposição de gonadotrofinas (GAYTAN et al., 2014), enquanto mulheres com síndrome do ovário policístico apresentam aumento dos níveis plasmáticos de kisspeptina (IBRAHIM; OMER; FATTAH, 2020), reforçando a participação de Kisspeptina na regulação da foliculogênese e ovulação.

Entretanto, os estudos sobre Kisspeptina e seu receptor em gatas são ainda escassos. Sua expressão hipotalâmica e no sistema genital foi descrita recentemente por Amelkina et al. (2019) e Tanyapanyachon et al. (2018) em gatas cíclicas, com maior expressão de *Kiss1* na fase folicular (TANYAPANYACHON; AMELKINA; CHATDARONG, 2018). No entanto, os autores não avaliaram o perfil de espressão de kisspeptina e seu receptor durante a luteogênese e regressão luteal, sobretudo em gatas gestantes. Como o processo de gestação resulta em diversas alterações metabólicas e fisiológicas na mãe no intuito de manter o sucesso gestacional (NEWBERN; FREEMARK, 2011), é salutar a necessidade de avaliar a expressão ovariana do sistema Kiss/Kiss1R durante a gestação, inclusive a sua relação com a expressão local de mediadores angiogênicos e imunológicos, que também são vitais para a atividade ovariana normal (DOUGLAS et al., 2005; VINATIER et al., 1995).

Estudos *in vitro* já demonstraram que Kisspeptina pode modular a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células endoteliais e trofoblásticas e a formação de linfócitos T regulatórios (Treg) com produção de IL10 e redução de IL17 (Ramaesh *et al.*, 2010; Francis *et al.*, 2014, Gorbunova and Shirshev, 2014). Contudo, ainda não há estudos no ovário avaliando a relação espaçotemporal do sistema Kiss/Kiss1R com a expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos durante a foliculogênese e luteogênese, inclusive durante a gestação.

O gato doméstico é um modelo importante nas pesquisas que envolvem reprodução de felinos, visto que muitas espécies da família Felidae estão vulneráveis ou ameaçadas de extinção, além de apresentar importância social relevante. Por isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de expressão de Kisspeptina e seu receptor no desenvolvimento folicular e luteal de gatas domésticas cíclicas e gestantes, e sua relação com a expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Procedimento experimental

Gatas cíclicas e gestantes sem raça definida, com seis meses a dois anos de idade, foram utilizadas neste estudo. Todos os animais foram submetidos a exames laboratoriais de hemograma e urinálise e somente os animais cíclicos clinicamente saudáveis e os gestantes com complicações pré-parto ou no meio da gestação foram

encaminhados para ovariohisterectomia no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UESC (Processo nº 005/18). Análise macroscópica foi realizada no trato genital e os ovários foram coletados para histologia e imunohistoquímica (IHC) e fragmentos de corpo lúteo (animais em diestro e gestantes) e corpo *albicans* (animais em anestro) foram armazenados em Trizol, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 ºC para análise de expressão gênica pela qPCR Avaliação histológica do útero e dosagem plasmática de estradiol (E2) e progesterona (P4) foram também realizados para confimação da fase do ciclo estral. Após avaliação clínica, macroscópica, histológica e dosagem hormonal de 105 gatas, os animais foram selecionados para as análises de imunohistoquimica e qPCR: 1) proestro/estro (N=20); 2) diestro (N=41), 3) anestro (N=32); e 4) gestante (N=12; 6 no meio da gestação e 6 no final da gestação).

6.2.2 Ovariohisterectomia

Como medicação pré-anestésica foi utilizado acepromazina (0,05 mg/Kg; IM) (Acepromazine 2%; Syntec) e morfina (0,3 mg/Kg; IM) (Morphine sulfate 10 mg/mL; Hipolabor + Sanval) para os animais hígidos e meperidina (3mg/Kg; IM) para os animais gestantes. Para a indução anestésica foi utilizado propofol (6 mg/Kg; IV) (Propotil; Biochimico), com posterior infusão contínua de Ringer Lactato (6 ml/kg/h). Após intubação endotraqueal, a anestesia foi mantida com isoflurano (Isoforine; Cristália) em 100% de oxigênio (300 ml/kg/min) em circuito aberto (Baraka) utilizando máquina de anestesia (WATO EX-65, Mindray). Antes da cirurgia, os animais receberam cefalotina sódica (30 mg/Kg; IV) como antibioticoterapia profilática. A ovariohisterectomia foi realizada pela técnica 3 pinças após laparotomia por meio de incisão mediana (CORRÊA et al., 2019).

6.2.3 Processamento dos tecidos e avaliação histopatológica

As amostras de útero e ovário foram fixadas em formol 10% por 24h e processadas seguindo o método de inclusão em parafina (APÊNDICE I) no laboratório de Histologia Animal da UESC. Os tecidos foram desidratados em solução seriada de álcool 70% até álcool absoluto, com posterior diafanização em xilol e impregnação e

inclusão em parafina. Cortes de 4µm dos tecidos foram obtidos em lâminas histológicas para avaliação histopatológica. Para imunohistoquímica dos ovários foram utilizadas lâminas polarizadas silanizadas (StarFrost Polycat, Germany).

Para avaliação histopatológica, os cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina (H&E) (APÊNDICE II). Os animais foram agrupados em relação a cada fase do ciclo estral (Proestro/estro, diestro e anestro) após avaliação histológica dos ovários e do útero que seguiu os critérios de classificação descritos na literatura para gata doméstica (AMELKINA et al., 2015; BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; CHATDARONG et al., 2005; MONTEIRO; KOIVISTO; SILVA, 2006). Resumidamente, os animais em diestro e gestantes apresentavam corpos lúteos maduros e vacuolizados e animais em proestro/estro ou anestro apresentavam corpos *albicans*, sendo que os primeiros apresentam desenvolvimento folicular evidente com foliculos pré-ovulatórios. Os ovários dos animais do grupo proestro/estro foram utilizados para avaliar o perfil do mediadores avaliados durante o processo de foliculogênese. Os animais em diestro e gestantes foram utilizados para avaliar o perfil dos mediadores no processo de luteogênese, utilizando como comparação o corpo *albicans* presente nos ovários dos animais em anestro.

6.2.4 Dosagem hormonal

Amostras de sangue foram coletadas imediatamente após a ovariohisterectomia pela punção da veia cefálica ou jugular, entre 9:00 e 11:00h, em tubos com EDTA. O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 20 min e o plasma obtido foi armazenado à -20 ºC para posterior dosagem hormonal de E2 e P4 por meio de ELISA utilizando Kits comerciais (Enzo Life Sciences, Inc, USA).

6.2.5 Imunohistoquímica

Secções histológicas dos ovários foram submetidas à análise imunohistoquímica utilizando os anticorpos anti-Kiss1(sc-101246, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-KISS1R (HPA071913, Sigma, Missouri, EUA), anti-INFγ (AB9657; Abcam, Cambridge, UK), anti-MIF (AB7207; Abcam, Cambridge, UK), anti-VEGF (sc-152, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-Flk1 (sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (Tabela 20).

Tabela 20. Anticorpos usados na imunohistoquímica.

Anticorpo	Espécie/clone	Diluição	Tempo de revelação no DAB
Anti-kiss1	Camundongo/monoclonal	1:100	50 minutos
Anti-kiss1R	Coelho/policlonal	1:50	60 minutos
Anti-MIF	Coelho/policlonal	1:200	6 minutos
Anti-INFγ	Coelho/policlonal	1:100	14 minutos
Anti-VEGF	Coelho/policlonal	1:50	20 minutos
Anti-Flk-1	Camundongo/monoclonal	1:50	6 minutos

Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) (APÊNDICE III) e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98 ^{o}C utilizando solução de ácido cítrico (0,54 mol/L) com pH 6,0. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com o anticorpo primário e por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio (Ultra vision Block, Lab Vision Corp., Fremont, CA. USA) e estreptavidina peroxidase. A incubação com o anticorpo secundário ocorreu por 45 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (DAB Substrate system, Lab Vision Corp., Fremont, CA. USA). Por último, as secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por PBS (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

Foi realizada uma avaliação descritiva e quantitativa da expressão imunohistoquímica de Kiss, Kiss1R, VEGF, Flk-1, INFγ e MIF no ovário. Para a avaliação descritiva foi considerada o perfil de expressão desses marcadores em folículos primordiais, primários, secundários, pré-ovulatórios, estroma ovariano, corpo lúteo maduro, corpo lúteo vacuolizado e corpo *albicans*, de acordo com a fase do ciclo estral nos animais não-gestantes e nos animais gestantes. A avaliação quantitativa foi realizada em seis animais/grupo e somente nos corpos lúteos maduro e vacuolizado e corpo *albicans*. Para análise quantitativa foi determinada a intensidade de imunomarcação (densidade integrada) utilizando o software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA). Imagens dos corpos lúteos maduro e vacuolizado e corpo *albicans* foram fotografadas em microscópio Leica DM 2500 utilizando a câmera digital Leica DFC 295 (Leica Microsytems, Germany). Para a

análise, *color deconvolution* e *thresholding* das imagens foram realizadas. Os dados foram arquivados, analisados e expressos como densidade integrada de imunomarcação em pixels (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

6.2.6 PCR em tempo real (qPCR)

Para a técnica de qPCR, a extração do RNA total dos corpos lúteos de animais não-gestantes (animais em diestro) e gestantes e dos corpos *albicans* (animais em proestro/estro ou anestro) foi feita pelo uso do Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) seguindo o protocolo do Kit com algumas modificações (APÊNDICE IV). O método consistiu de uma etapa inicial de lise e homogeneização do tecido em 1 mL de Trizol por cinco minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Logo em seguida, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio, com homogeneização por 15 segundos e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos à 4ºC. A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, com adição de 0,5 mL de álcool isopropílico e incubação por 30 minutos à -80ºC. Após, o microtubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4ºC. O pellet obtido foi lavado com 1 mL de etanol a 75%, homogeneizado e centrifugado a 10.500 rpm por 5 minutos a 4ºC. O RNA foi solubilizado em água ultrapura livre de RNAse e imediatamente estocado a -80ºC. A concentração e qualidade das amostras de RNA de cada tecido foi analisada utilizando nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo scientific) e eletroforese em gel de agarose/formaldeído.

Foi utilizado 1 µg de RNA para a síntese de cDNA utilizando o Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Os transcritos gênicos dos genes alvo foram quantificados pela qPCR utilizando SYBR Green (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG; Invitrogen) no equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies). Para as reações de qPCR utilizou-se 1µL de cDNA, 100nM de cada iniciador e 7,5 µL do reagente syber Green em um volume final de 15 µL de reação. Como controle negativo utilizou-se o mix de amplificação de DNA, no qual a amostra de cDNA foi substituída por água. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: ativação enzimática a 95 ºC por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 ºC por 15 s, e anelamento/extensão a 60 ºC por 60 s. Para avaliar a linearidade e eficiência da amplificação da qPCR, curvas padrões de todos os transcritos foram geradas utilizando diluições seriadas do cDNA,

além da avaliação da curva de *melting* dos produtos da amplificação. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA de *Felis catus* (Tabela 5). A expressão gênica foi analisada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de 40S Ribossomal protein S7 (RPS7) *Felis catus* (JURSZA; SKARZYNSKI; SIEMIENIUCH, 2014).

Tabela 21. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qPCR.

Gene	**Iniciadores**	**Nº acesso**
Kiss1	F: 5′-TGACCTAGTCTCCCCTCCTTC-3 R: 5′-GGAAAAGCATCAGCTGCCAA-3	XM_023247458
Kiss1r	F: 5′-CCCCTCGGTACGAATTTGCT-3 R: 5′-GAACGTTCCAGAGAGTGCCA-3	XM_023242671.1
Infγ	F: 5′-TGGGTCGCTTTTCGTAGACA-3 R: 5′-ATGCTCCTTTGAATGCGCTG-3	NM_001009873.1
Mif	F: 5′-TCACGTAGCTCAGGTTACCG-3 R: 5′-TTCACCACGAACATCGGCAT-3	XM_0039994984.5
Vegfa	F: 5′-AAAGAAAATCCCTGTGGGCCT-3 R: 5′-GCAACGCGAGTCTGTGTTTT-3	NM_001009854.1
Pigf	F: 5′-AGCCACTTTGTCTTGACGCT-3 R: 5′-AACAGTATTGCCGCACAGGT-3	XM_01833310.1
Rps7	F: 5′-GTCCCAGAAGCCGCACTTTGAC-3 R: 5′-CTCTTGCCCACAATCTCGCTCG-3	AY800278

F: Forward primer. **R**: Reverse primer.

6.2.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± SEM. Realizou-se análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste t *de Student* não-pareado para comparações entre dois grupos ou *Student Newman Keuls* (SNK) para múltiplas comparações, utilizando o software GraphPad Prism®. Para análise de correlação entre a expressão gênica nos CLs de *Kiss1* e *Kiss1r* com mediadores angiogênicos e imunológicos foi utilizado o ΔCT de cada gene por meio da correlação de Pearson. As análises foram consideradas significativas quando $P<0.05$.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Classificação dos animais nos estágios do ciclo estral

Para confirmação dos estágios do ciclo estral das gatas utilizadas neste estudo, foram realizadas análises histológicas do útero e dos ovários, além da dosagem plasmática de estradiol (E2) e progesterona (P4). Das 105 gatas avaliadas, foram selecionadas sete que exibiam crescimento folicular em todos os estágios de desenvolvimento (proestro/estro); sete em fase luteal, com pelo menos dois corpos lúteos ativos nos ovários (diestro); e seis que exibiam poucos folículos em crescimento e presença de corpos *albicans* nos ovários (anestro). Além disso, a dosagem hormonal de P4 (proestro/estro, 1.19 ± 0.33 ng/mL *vs* diestro, 7.86 ± 1.75 ng/mL *vs* anestro, 0.83 ± 0.08 ng/mL) foi significamente maior no animais em diestro (**P*<0.05), enquanto animais em anestro exibiram menor concentração plasmática de E2 (**P*<0.05) (proestro/estro, 54.18 ± 8.99 pg/mL *vs* diestro, 50.47 ± 16.20 pg/mL *vs* anestro, 2.17 ± 0.03 pg/mL), confirmando a caracterização dos animais nas fases do ciclo estral.

6.3.2 Perfil de expressão do sistema Kiss1/Kiss1R na foliculogênese e luteogênese de gatas hígidas cíclicas e gestantes

Para avaliação da imunoexpressão de Kiss1 e Kiss1R na foliculogênese e luteogênese, foram utilizados ovários de gatas em proestro/estro para a avaliação folicular e de gatas em diestro e gestantes para a avaliação luteal. Para comparar com o processo de luteogênese, foram utilizados corpos *albicans* de gatas em anestro. Nos folículos, Kiss1 apresentou expressão moderada a intensa em todos os estágios de crescimento folicular, principalmente nos oócitos dos folículos primordiais e nas células da granulosa de folículos primários até pré-ovulatórios (Fig. 17A-E), enquanto expressão fraca a moderada foi observada nas tecas interna e externa dos folículos secundários e antrais (Fig.17A-E). Seu receptor, Kiss1R, apresentou expressão fraca em folículos primordiais e ausência de expressão nos demais estágios foliculares (Fig. 17F-J).

Em relação ao diestro, em gatas não-gestantes, houve expressão moderada a intensa e heterogênea de Kiss1 nas células luteínicas de CLs maduros e vacuolizados (Fig. 17K e L), enquanto em gatas gestantes os CLs maduros exibiram expressão

intensa e homogênea em relação ao CL vacuolizado deste grupo e o corpo *albicans* de gatas em anestro (Fig. 17M-O). Além disso, nos corpos *albicans,* algumas células luteínicas retraídas apresentaram expressão intensa de Kiss1 (Fig. 17O). Na análise da área de imunomarcação, maior expressão foi observada em CLs maduros de animais em diestro e gestantes em relação aos seus respectivos CLs vacuolizados (Fig. 17U; $P<0.05$; $P<0.0001$). Os CLs maduros de animais gestantes também apresentaram maior área de imunomarcação em relação ao corpo *albicans* de animais em anestro (Fig. 17U; $P<0.01$). Além disso, houve maior expressão de transcritos de RNAm para *Kiss1* nos CLs de gatas gestantes e em diestro em relação ao corpo *albicans* de gatas em anestro (Fig. 17V; $P<0.05$), assim como maior expressão de *Kiss1* nos CLs das gatas gestantes em relação aos animais em diestro (Fig. 17V; $P<0.01$).

Em relação a imunomarcação de Kiss1R, sua expressão foi fraca a moderada e heterogênea nas células luteínicas dos CLs maduros e vacuolizados em gatas em diestro (Fig. 17P e Q), enquanto expressão foi mais intensa e homogênea nos CLs maduros de gatas gestantes em relação ao seu respectivo CL vacuolizado e os corpos *albicans* (Fig. 17R-T). A análise da área de imunomarcação confirmou os resultados anteriores, com maior área de expressão em CLs maduros de gatas gestantes em relação aos outros grupos (Fig. 17U; $P<0.05$, $P<0.01$), incluindo CLs maduros de gatas em diestro não-gestantes (Fig. 17U; $P<0.01$). Além disso, houve maior expressão do gene *Kiss1r* nos CLs de animais em diestro comparado ao corpo *albicans* (Fig. 17V; $P<0.05$), mas não houve correlação de expressão gênica entre *Kiss1* e *Kiss1r* nos CLs de gatas em diestro e gestantes (Fig. 17W; $P>0.05$).

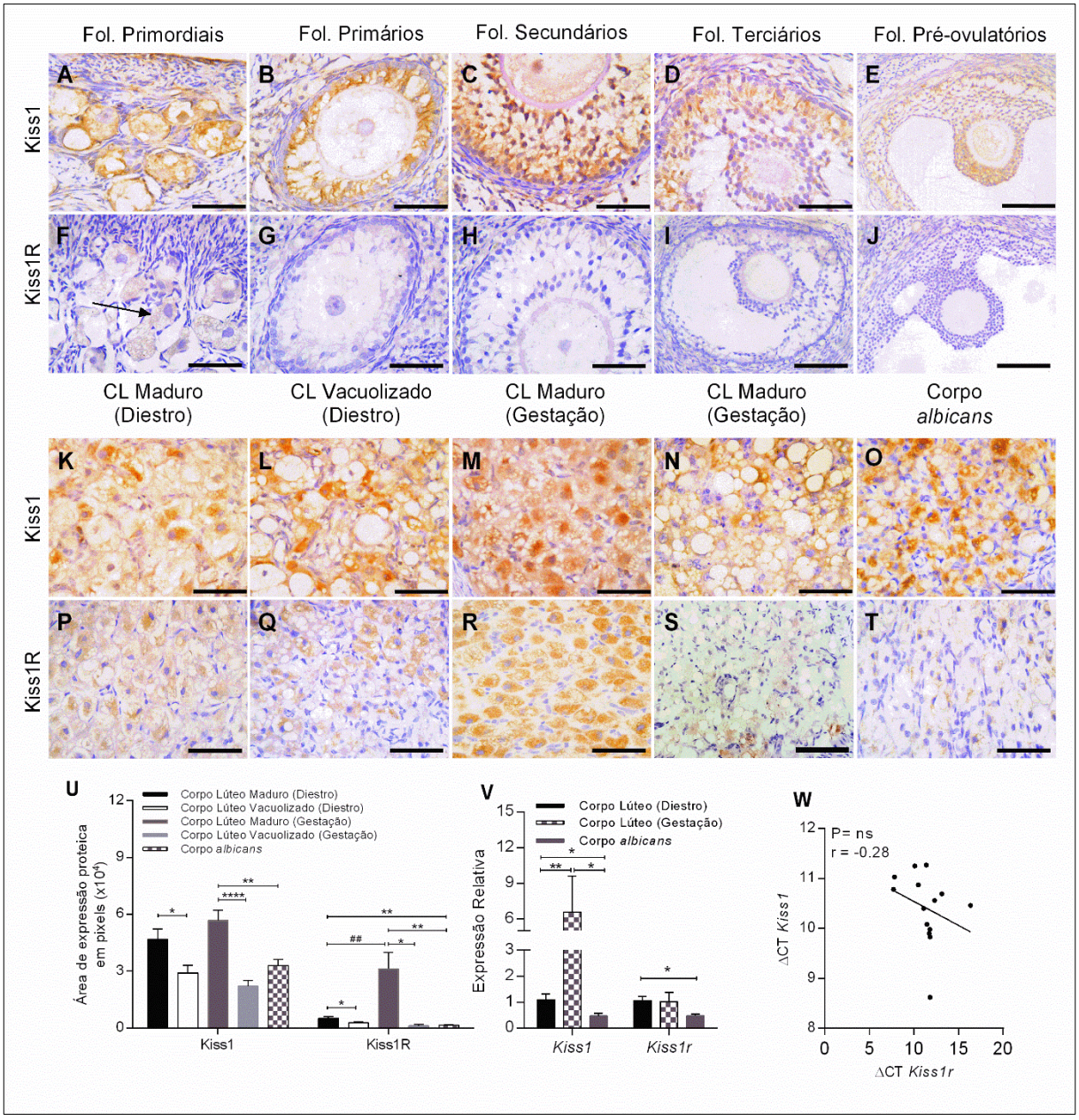

Figura 17. Perfil de expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R no desenvolvimento folicular de gatas domésticas em proestro/estro, no corpo lúteo de gatas gestantes e não-gestantes em diestro, e corpo *albicans* de gatas em anestro. A-J) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de Kiss1 (A-E) e Kiss1R (F-J) em folículos primordiais (A e F), primários (B e G), secundários (C e H), terciários (D e I) e pré-ovulatórios (E e J) de ovários de gatas em proestro/estro. K-T) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de Kiss1 (K-O) e Kiss1R (P-T) no corpo lúteo (CL) de gatas não-gestantes em diestro e gestantes e no corpo albicans de gatas em anestro (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Barra = 50 µm (A-C; F-H; K-T), Barra = 100 µm (D-E; I-J)). U) Área de imunomarcação em pixels da expressão de Kiss1 e Kiss1R no CL de gatas em diestro e gestantes e no corpo albicans de gatas em anestro (média ± SEM; **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001; *****P*<0.0001; ##*P*<0.01, n=6-7). V) Expressão gênica relativa de Kiss1 e Kiss1r no CL de gatas em diestro e gestantes e no corpo albicans de gatas em anestro. (média ± SEM; **P*<0.05; ***P*<0.01; n=6-7). W) Correlação da expressão gênica de Kiss1 com Kiss1r no CL de gatas hígidas em diestro e gestantes (*P*>0.05; r = -0.28). Fonte: Arquivo pessoal.

6.3.3 Perfil de expressão de mediadores angiogênicos na foliculogênese e luteogênese de gatas cíclicas e gestantes

Nos folículos, VEGF exibiu marcação citoplasmática e nuclear intensa nos ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento folicular, além de uma expressão moderada a intensa nas células da granulosa e da teca, com uma expressão mais intensa nos folículos terciários e pré-ovulatórios em relação aos folículos não-antrais (Fig. 18A-E). Já o Flk-1 apresentou expressão moderada nos folículos primordiais, com leve redução da intensidade de expressão nos demais estágios de desenvolvimento folicular, tanto nos ovócitos quanto nas células da granulosa e tecas (Fig. 18F-J). Diferente de VEGF, oócitos exibiram fraca marcação para Flk-1 na maioria dos estágios de crescimento folicular (Fig.182F-J).

Em relação à luteogênese, VEGF exibiu expressão moderada a intensa nas células luteínicas, sendo geralmente citoplasmática, nuclear e heterogênea, exceto em CLs vacuolizados de gatas não-gestantes em diestro que era apenas citoplasmática (Fig.182K-O). Além disso, CLs vacuolizados de gatas gestantes apresentaram menor área de expressão proteica de VEGF comparado ao corpo *albicans* e CLs vacuolizados de gatas não-gestantes em diestro (Fig. 18U; $P<0.05$). Em contrapartida, houve maior expressão de transcritos gênicos para *Vegf* nos CLs de gatas em diestro e gestantes em relação ao corpo *albicans* de gatas em anestro (Fig. 18V; $*P<0.05$), mas não houve diferenças na expressão gênica de *Pigf* entre os grupos (Fig. 18V; $P>0.05$), nem correlação gênica da expressão de *Kiss1* e *Kiss1r* com *Vegf* e/ou *Pigf* (Fig. 18W-Z; $P>0,05$).

Para o Flk-1, a expressão foi citoplasmática, heterogênea, e moderada a intensa nas células luteínicas dos CLs maduros e vacuolizados das gatas em diestro e gestantes e nos corpos *albicans* de gatas em anestro (Fig. 18P-T). Na análise da imunomarcação, CLs vacuolizados de gatas não-gestantes em diestro exibiram maior área de expressão em relação ao respectivo CL maduro e os corpos *albicans* de gatas em anestro, e também quando comparado aos CLs vacuolizados de gatas gestantes (Fig. 18U; $P<0.05$; $P<0.0001$). Além disso, CLs maduros de gatas em diestro exibiram maior área de expressão de Flk-1 em relação ao corpo *albicans* (Fig. 18U; $*P<0.05$).

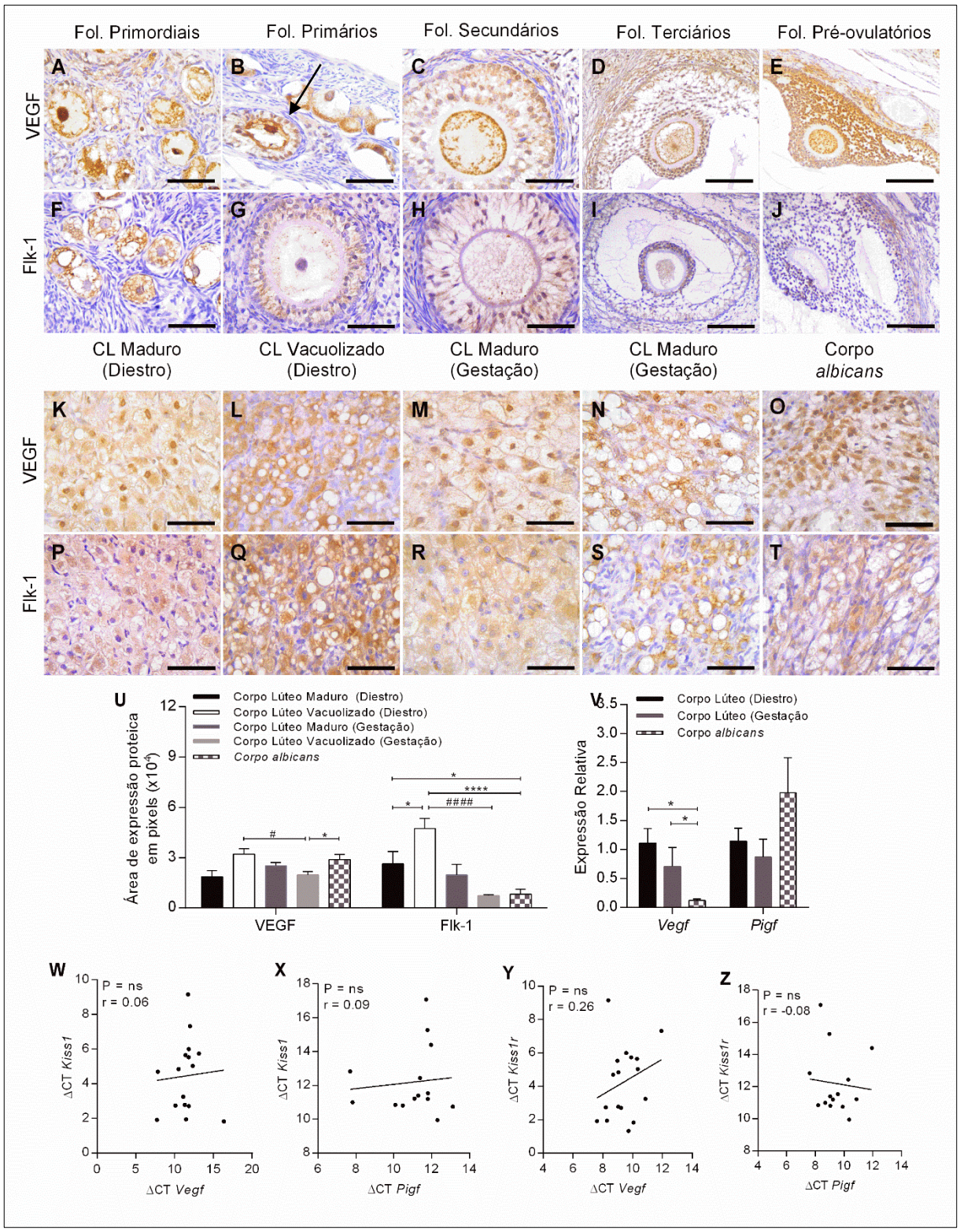
Fol. Primordiais
Fol. Primários
Fol. Secundários
Fol. Terciários
Fol. Pré-ovulatórios
VEGF
Flk-1
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
CL Maduro (Diestro)
CL Vacuolizado (Diestro)
CL Maduro (Gestação)
CL Maduro (Gestação)
Corpo albicans
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T
U
Corpo Lúteo Maduro (Diestro)
Corpo Lúteo Vacuolizado (Diestro)
Corpo Lúteo Maduro (Gestação)
Corpo Lúteo Vacuolizado (Gestação)
Corpo albicans
Área de expressão proteica em pixels (x10⁴)
VEGF
Flk-1
V
Corpo Lúteo (Diestro)
Corpo Lúteo (Gestação)
Corpo albicans
Expressão Relativa
Vegf
Pigf
W
P = ns
r = 0.06
ΔCT Kiss1
ΔCT Vegf
X
P = ns
r = 0.09
ΔCT Kiss1
ΔCT Pigf
Y
P = ns
r = 0.26
ΔCT Kiss1r
ΔCT Vegf
Z
P = ns
r = -0.08
ΔCT Kiss1r
ΔCT Pigf

Figura 18. Perfil de expressão de mediadores angiogênicos no desenvolvimento folicular de gatas domésticas em proestro/estro, no corpo lúteo de gatas gestantes e não-gestantes em diestro, e corpo *albicans* de gatas em anestro. A-J) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de VEGF (A-E) e Flk-1 (F-J) em folículos primordiais (A e F), primários (B e G), secundários (C e H), terciários (D e I) e pré-ovulatórios (E e J) de ovários de gatas em proestro/estro. K-T) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de VEGF (K-O) e Flk-1 (P-T) no corpo lúteo (CL) de gatas em diestro e gestantes e no corpo *albicans* de gatas em anestro (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Barra = 50 µm (A-C; F-H; K-T), Barra = 100 µm (D-E; I-J)). U) Área de imunomarcação em pixels da expressão de VEGF e Flk-1 no CL de gatas em diestro e gestantes e no corpo *albicans* de gatas em anestro. (média ± SEM; **P*<0.05; *****P*<0.0001; #P<0.05; ####P<0.0001n=6-7). V). Expressão gênica relativa de *Vegf* e *Pigf* no CL de gatas em diestro e gestantes e no corpo *albicans* de gatas em anestro. (média ± SEM; **P*<0.05; n=6-7). W-Z) Correlação da expressão gênica de *Vegf* e *Pigf* com a expressão de *Kiss1* (W-X; *P*>0.05; r = 0.06; r = 0.09) e *Kiss1r* (Y-Z; *P*>0.05; r = 0.26; r = -0.08) no CL de gatas hígidas em diestro e gestantes. Fonte: Arquivo pessoal.

6.3.4 Perfil de expressão de mediadores imunológicos na foliculogênese e luteogênese de gatas cíclicas e gestantes

Na imunohistoquimica foi observada expressão citoplasmática e nuclear tanto de INFγ quanto de MIF em todos os estágios de desenvolvimento folicular de gatas em proestro/estro (Fig. 19A-J). Além disso, para esses mediadores, oócitos exibiram expressão intensa em todos os estágios de desenvolvimento folicular, enquanto a expressão foi moderada a intensa nas células da granulosa (Fig. 19A-J). Curiosamente, células da teca interna exibiram maior expressão proteica de INFγ em folículos terciários e pré-ovulatórios quando comparado aos folículos secundários (Fig. 19D-E). Além disso, em folículos terciários e pré-ovulatórios, populações celulares da corona radiata tiveram imunomarcação fraca ou nula para MIF e INFγ (Fig. 19D-E, I-J).

Na luteogênese, INFγ apresentou expressão citoplasmática e nuclear, heterogênea e moderada a intensa nas células luteínicas dos CLs maduros, vacuolizados e corpos *albicans* (Fig. 19K-O). A área de imunomarcação de INFγ foi maior nos CLs maduros das gatas em diestro em relação ao respectivo CL vacuolizado, enquanto a expressão no corpo *albicans* foi maior em relação a este último (Fig. 19U; ***P*<0.01). Na análise de expressão gênica, não houve diferença para *Infγ* entre os CLs de gatas gestantes e não-gestantes e os corpos *albicans* de animais em anestro (Fig. 19V; *P*>0.05).

Em relação ao MIF, a expressão também foi citoplasmática e nuclear para a maioria das células e a área de imunomarcação foi maior nos CLs maduros das gatas em diestro e gestantes em relação aos respectivos CLs vacuolizados (Fig. 19U; $P<0.01$, $P<0.0001$). Além disso, os CLs maduros desses animais também exibiram maior área de expressão em relação aos corpos *albicans* das gatas em anestro (Fig. 19U; $P<0.01$, $P<0.0001$), enquanto os CLs vacuolizados de gatas gestantes apresentaram menor expressão de MIF em relação aos corpos *albicans* das gatas em anestro (Fig. 19U; $^{\#}P<0.05$). A análise gênica demonstrou menor expressão de RNAm para *Mif* nos CLs de gatas gestantes e corpo *albicans* de gatas em anestro em relação aos CLs de gatas em diestro (Fig. 19V; $P<0.01$). Além disso, houve correlação significativa e positiva da expressão gênica de *Mif* com a expressão de *Kiss1r* nos corpos lúteos de gatas em diestro e gestantes (Fig. 19Z $P<0.05$).

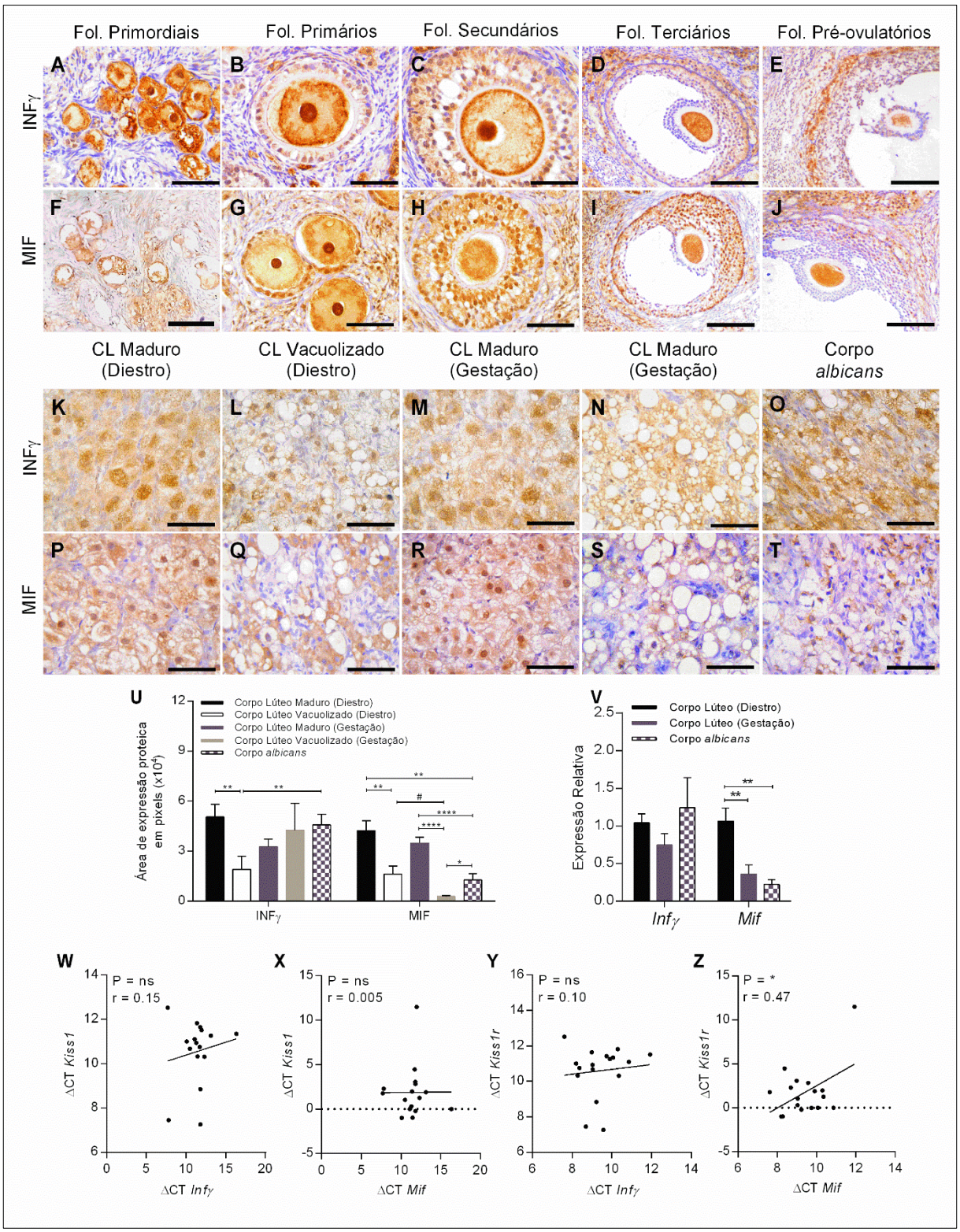
Fol. Primordiais
Fol. Primários
Fol. Secundários
Fol. Terciários
Fol. Pré-ovulatórios
INFγ
MIF
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
CL Maduro (Diestro)
CL Vacuolizado (Diestro)
CL Maduro (Gestação)
CL Maduro (Gestação)
Corpo albicans
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T
U
Área de expressão proteica em pixels (x10⁴)
Corpo Lúteo Maduro (Diestro)
Corpo Lúteo Vacuolizado (Diestro)
Corpo Lúteo Maduro (Gestação)
Corpo Lúteo Vacuolizado (Gestação)
Corpo albicans
INFγ
MIF
V
Expressão Relativa
Corpo Lúteo (Diestro)
Corpo Lúteo (Gestação)
Corpo albicans
Infγ
Mif
W
P = ns
r = 0.15
ΔCT Kiss1
ΔCT Infγ
X
P = ns
r = 0.005
ΔCT Kiss1
ΔCT Mif
Y
P = ns
r = 0.10
ΔCT Kiss1r
ΔCT Infγ
Z
P = *
r = 0.47
ΔCT Kiss1r
ΔCT Mif

Figura 19. Perfil de expressão de mediadores imunológicos no desenvolvimento folicular de gatas domésticas em proestro/estro, no corpo lúteo de gatas gestantes e não-gestantes em diestro, e corpo albicans de gatas em anestro. A-J) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de INFγ (A-E) e MIF (F-J) em folículos primordiais (A e F), primários (B e G), secundários (C e H), terciários (D e I) e pré-ovulatórios (E e J) de ovários de gatas em proestro/estro. K-T) Fotomicrografias da expressão imunohistoquimica de INFγ (K-O) e MIF (P-T) no corpo lúteo (CL) de gatas em diestro e gestantes e no corpo *albicans* de gatas em anestro (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris, Barra = 50 µm (A-C; F-H; K-T), Barra = 100 µm (D-E; I-J)). U) Área de imunomarcação em pixels da expressão de INFγ e MIF no CL de gatas em diestro e gestantes e no corpo *albicans* de gatas em anestro. (média ± SEM; **P*<0.05; ***P*<0.01; *****P*<0.0001; $^{\#}$*P*<0.05; n=6-7). V) Expressão gênica relativa de *Infγ* e *Mif* no CL de gatas em diestro e gestantes e no corpo *albicans* de gatas em anestro. (média ± SEM; ***P*<0.01; n=6-7). W-Z) Correlação da expressão gênica de *Infγ* e *Mif* com a expressão de *Kiss1* (W-Y; *P*>0.05; r = 0.15; r = 0.005) e *Kiss1r* (X-Z; **P*<0.05; r = 0.47) no CL de gatas hígidas em diestro e gestantes. Fonte: Arquivo pessoal.

6.4 DISCUSSÃO

Pesquisas anteriores mostraram que o sistema Kisspeptina/Kiss1R tem ações além do eixo HPG, particularmente no ovário (HU et al., 2018). Neste estudo, observamos que no ovário de gatas domésticas a Kiss1 é expressa principalmente em células da granulosa de folículos em crescimento, enquanto Kiss1R tem discreta expressão no ciclo ovariano. Pela primeira vez na literatura, mostramos que esse sistema tem regulação positiva na luteogênese de gatas gestantes e não-gestantes, sendo que a gestação estimulou a expressão luteal de Kiss1 e seu receptor. Além disso, observamos variação espaço-temporal no perfil de mediadores angiogênicos e imunológicos durante a foliculogênese, luteogênese e regressão luteal de gatas cíclicas, sendo que a gestação, para alguns marcadores, influenciou a expressão luteal.

Durante a foliculogênese das gatas em proestro/estro, a Kisspeptina, diferente do seu receptor, apresentou imunomarcação moderada a intensa em todos os estágios de desenvolvimento folicular. Nos folículos primordiais, a expressão de Kiss1 se concentrou nos oócitos, enquanto nos demais folículos houve expressão mais intensa na camada da granulosa e menor na camada da teca. Esses resultados estão de acordo com o observado anteriormente por Tanyapanyachon *et al.* (2018), embora eles tenham visto também expressão de Kiss1 no fluido folicular. Nossos resultados também corroboram com Ricu *et al.* (2012) que observaram maior expressão de *Kiss1* nas células da granulosa de ratas em proestro, sugerindo esse o principal local de síntese de Kisspeptina nos folículos. Além disso, ainda em ratas, aumento nas concentrações de LH no proestro estimulou a expressão de Kisspeptina em células da granulosa (LAOHARATCHATATHANIN et al., 2015), enquanto o bloqueio do pico pré-ovulatório de LH inibiu o aumento de RNAm para *Kiss1* no ovário durante o proestro (CASTELLANO et al., 2006). Outro estudo também mostrou que a Kisspeptina atua na dinâmica folicular ovariana durante o envelhecimento de ratas, sendo que a administração intra-ovariana da mesma aumentou o número de folículos pré-ovulatórios e corpos lúteos (FERNANDOIS et al., 2016). No mesmo sentido, em um modelo de dieta obesogênica no qual as ratas apresentavam disfunção ovulatória, baixa expressão gênica e proteica de Kiss1 no ovário foi observada (ZHOU et al.,

2014). Assim, em conjunto, nossos dados sugerem que a Kisspeptina também seja importante para o desenvolvimento folicular e ovulação na gata doméstica.

Além disso, houve fraca expressão de Kiss1R em folículos primordiais, enquanto nos outros folículos não foi observada expressão. Na rata, de forma semelhante, pouca expressão de Kiss1R ao longo do ciclo ovariano foi observada (LAOHARATCHATATHANIN et al., 2015; RICU et al., 2012). Esses dados sugerem que outros receptores possam estar envolvidos na sinalização local da Kisspeptina, pelo menos na gata e na rata, como os receptores RF-amida (Npffr1 e Npffr2). A Kisspeptina pertence à família dos peptídeos RF-amida e possui afinidade por esses receptores (ELHABAZI et al., 2013). No entanto, mais pesquisas são necessárias para elucidar esta questão.

Além dos folículos, observamos expressão de Kiss1 e Kiss1R nos CLs e corpos *albicans*. Para Kiss1, CLs maduros de gatas gestantes e não-gestantes exibiram maior imunomarcação, enquanto houve também maior expressão gênica de *Kiss1* em CLs de gatas gestantes. Esses dados demonstram, pela primeira vez, que a gestação estimula a expressão de Kisspeptina no CL e que a expressão da mesma é maior em CLs mais jovens. O mesmo foi observado para o receptor Kiss1R, que apesar de ter apresentado expressão fraca a moderada nos diferentes estágios de CLs e nos corpos *albicans*, os CLs maduros de gatas gestantes apresentaram maior imunomarcação que o seu respectivo CL vacuolizado e o corpo *albicans*. Além disso, maior expressão foi também observada em relação ao CL maduro de gatas não-gestantes, demonstrando que a gestação também estimulou a expressão luteal de Kiss1R. Tanyapanyachon *et al.* (2018) também observaram em gatas maior expressão de Kiss1 e seu receptor em CLs jovens. No entanto, esses autores não avaliaram o perfil do sistema Kisspeptina/Kiss1R na regressão luteal, sendo que no presente estudo foi também observado menor expressão gênica de *Kiss1r* nos corpos *albicans* em relação aos CLs de gatas não-gestantes.

Em conjunto, nossos resultados mostram que a gestação estimula a expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R no CL de gatas, sendo que a expressão do mesmo reduz com a regressão luteal. Isso sugere, pelo menos nessa espécie, que a manutenção da atividade luteal durante a gestação depende do sistema Kisspeptina/Kiss1R. Nesse sentido, alguns estudos também sugerem que esse sistema é necessário para a manutenção do CL. Foi demonstrado que a Kisspeptina

estimula *in vitro* a produção de P4 em células luteais de ratas (PENG et al., 2013), como também foi observado em células da granulosa de galinhas (XIAO et al., 2011). Em granulosa de coelho, kisspeptina não somente aumentou a produção de progesterona e prostaglandina E2, como reduziu a produção de prostaglandina F2α (MARANESI et al., 2019). Os mesmos autores também demonstraram maior expressão de Kiss1 e Kiss1R em CL jovens de coelho, semelhante ao que observamos na gata.

Como o desenvolvimento folicular e a atividade e regressão luteal também dependem da ação de mediadores angiogênicos, nos ovários das gatas cíclicas e gestantes avaliamos o perfil de expressão de VEGF, seu receptor Flk-1 e PIGF. O VEGF apresentou moderada a intensa expressão nas estruturas foliculares, com destaque para intensa expressão em folículos pré-ovulatórios. Flk-1, por sua vez, apresentou expressão fraca na maioria dos folículos, exceto por uma expressão moderada a intensa em oócitos de folículos primordiais. Esses dados demonstram, pela primeira vez na literatura, a participação do sistema VEGF/Flk-1 na foliculogênese da gata doméstica.

O VEGF e Flk-1 são conhecidos como importantes fatores de crescimento na angiogênese ovariana. Para o início desse processo é importante que folículos primordiais sejam estimulados a crescer. De fato, estudos em bovinos confirmaram que fatores locais são expressos para ativar o crescimento de folículos pré-antrais, como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (GUTIERREZ et al., 2000; SAHA et al., 2000). Esses folículos não possuem rede vascular própria, necessitam de oxigenação via vasos sanguíneos presentes no estroma, e requerem a formação de pequenos vasos para o desenvolvimento desses folículos (AYRES; MINGOTI, 2012). Assim, nossos resultados sugerem que a intensa expressão de VEGF e moderada de Flk-1 em folículos primordiais e primários na gata doméstica pode ser importante para o estímulo à angiogênese em torno desses folículos.

Ainda que os fatores locais sejam importantes para o desenvolvimento folicular, os folículos antrais também estão sob controle hormonal, de modo que a maturação e seleção folicular até a ovulação é dependente de FSH e, principalmente, de LH (ROBINSON et al., 2009). Nesse sentido, é possível que, em muitas espécies, fatores angiogênicos sejam controlados por LH próximo à ovulação (ROBINSON et al., 2009).

Assim, é provável que o aumento de fatores de crescimento como o VEGF em folículos pré-ovulatórios seja essencial para a ovulação e o processo de angiogênese pós-ovulação (ROBINSON et al., 2009), o que condiz com nossas observações na gata.

Em relação à luteogênese, apesar de não ter sido observado correlação gênica entre a expressão de *Kiss1* e *Kiss1r* com *Vegf* e *Pigf* nos CLs das gatas gestantes e não-gestantes, VEGF apresentou imunomarcação semelhante nos estágios luteais, exceto pela maior imunomarcação em CLs vacuolizados de gatas não-gestantes e corpos *albicans*, o que também foi observado para Flk-1 nos CLs vacuolizados de gatas não-gestantes. A análise dos transcritos gênicos também revelou maior expressão de RNAm para *Vegf* nos CLs de gatas em diestro e gestantes em relação ao corpo *albicans* de gatas em anestro. Esses resultados indicam que VEGF e seu receptor são também necessários para a função luteal da gata doméstica, que está de acordo com estudos prévios em outras espécies mostrando a importância do VEGF na manutenção da angiogênese luteal e produção de P4 (GALVÃO et al., 2012a; KASHIDA et al., 2001). Em contrapartida, a imunomarcação de VEGF e Flk-1 se manteve intensa em corpos *albicans* das gatas em anestro. Esse nosso resultado pode ser justificado por estudos prévios que demonstraram que o processo de regressão luteal ocorre em ambiente de hipóxia, de modo que a baixa tensão de oxigênio estimula a expressão de VEGF e/ou seu receptor via fator 1 induzido pela hipóxia (HIF-1) (FORSYTHE et al., 1996). No entanto, a variação observada na expressão de Flk-1 entre CLs de gatas gestantes e não-gestantes requer mais estudos.

Além dos fatores angiogênicos, mediadores imunológicos foram também avaliados no ciclo ovariano de gatas domésticas cíclicas e gestantes. Tanto INFγ quanto MIF apresentaram imunomarcação moderada a intensa nos folículos, com destaque para intensa expressão no oócito em todos os estágios de desenvolvimento folicular. De forma interessante, células da teca interna, principalmente para INFγ, exibiram maior expressão em folículos terciários e pré-ovulatórios comparado aos folículos secundários e, curiosamente, populações celulares da corona radiata nesses folículos tiveram imunomarcação fraca ou nula para lNFγ e MIF.

Até o momento, são poucos os trabalhos que avaliaram a presença e função de mediadores imunológicos na foliculogênese ovariana e, pela primeira vez na

literatura, o perfil desses mediadores são avaliados no ovário da gata. Apesar disso, sabe-se que o sistema imunológico é indispensável para a foliculogênese (VINATIER et al., 1995). Estudos iniciais mostraram que citocinas como Interleucinas 1 (IL1), Interleucina 6 (IL6) e TNFα participam do desenvolvimento folicular (BRÄNNSTRÖM; NORMAN, 1993), sendo que IL6 é necessária para iniciar a angiogênese (MOTRO et al., 1990), enquanto IL1 inibe a esteroidogênese e promove proliferação das células da granulosa (FUKUOKA et al., 1988; VINATIER et al., 1995). Além disso, durante a ovulação, IL1 participa do remodelamento tecidual e morte celular, enquanto IL6 aumenta a síntese de prostaglandinas (VINATIER et al., 1995).

Estudos em humanos mostraram maior concentração de MIF no fluido folicular de folículos jovens (WADA et al., 1997). Além disso, o tratamento *in vivo* e *in vitro* com gonadotrofina coriônica humana (hCG) estimulou a produção intrafolicular de MIF pelas células da granulosa de humano, principalmente próximo à ovulação (WADA et al., 1999). Em ratas submetidas à ovulação induzida por injeção intraperitoneal de gonadotropina sérica de égua gestante (PMSG) e tratadas com anticorpo para MIF apresentaram redução de folículos em crescimento e no número de óvulos coletados (MATSUURA et al., 2002). Assim, baseado nesses trabalhos e nos resultados do presente estudo, sugerimos que MIF seja importante para a maturação folicular e viabilidade do ovócito na gata, uma vez que apresentou intensa expressão durante todo o desenvolvimento folicular. Além disso, a intensa expressão de INFγ na camada da teca de folículos pré-ovulatórios sugere sua influência na atividade esteroidogênica dessa camada e, principalmente, modulação pelo LH, uma vez que há um aumento da expressão de receptores para LH nas células da teca neste estágio folicular (BURNS et al., 2001). No entanto, o papel das gonadotrofinas na expressão de INFγ durante o desenvolvimento folicular requer mais estudos. Curiosamente, estudos sobre imunologia ovariana têm se concentrado em situações patológicas no ovário, sobretudo porque MIF é um importante biomarcador de tumores ovarianos (GRIEB et al., 2010) e da síndrome dos ovários policísticos em mulheres magras ou obesas (GONZÁLEZ et al., 2010).

Diferente da foliculogênese, estudos já avaliaram o papel de mediadores imunológicos na luteogênese (GADSBY et al., 2017; GALVÃO et al., 2012b; GAO et al., 2005; VINATIER et al., 1995; WANG et al., 1992). No entanto, estudos na gata doméstica ainda não tinham sido realizados. Em relação à expressão de INFγ, houve

redução da imunomarcação no CL vacuolizado das gatas não-gestantes em relação ao seu respectivo CL maduro, enquanto na gata gestante a expressão se manteve alta independente do estágio luteal, como também foi observado no corpo *albicans* das gatas em anestro. Esses dados de alta expressão de INFγ nos corpos *albicans* corroboram com estudos prévios que evidenciam o papel do INFγ na regressão luteal. Em CLs ou células luteais de humanos, macaco *Rhesus*, bovino e equino foi observado que INFγ estimula a luteólise ao inibir enzimas como StAR, além de aumentar PGF2α e reduzir a síntese de PGE2 e progesterona (GADSBY et al., 2017; GALVÃO et al., 2012a; GAO et al., 2005; WANG et al., 1992). No entanto, diferente desses trabalhos, no presente estudo também foi observado alta expressão de INFγ nos CL maduros, tanto de gatas gestantes quanto não-gestantes. Embora não tenha informações na literatura sobre o possível papel do INFγ neste estágio luteal de gatas, Galvão et al. (2012) verificou *in vitro* em corpos lúteos jovens de equino que TNFα, uma citocina com ação luteolítica semelhante ao INFγ, estimulou a produção de progesterona e PGE2 e reduziu PGF2α nas células luteais. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar o papel do INFγ na luteogênese de gatas domésticas.

Já em relação ao MIF, houve um padrão semelhante de redução da área de expressão proteica em CLs vacuolizados em relação aos respectivos CLs maduros em gatas gestantes e não-gestantes, se mantendo baixa nos corpos *albicans* de gatas em anestro. Esses dados sugerem que nos ovários de gatas gestantes e não-gestantes o MIF é importante na manutenção da atividade dos CLs mais jovens. Nossos dados estão de acordo com o trabalho de Bove et al. (2000), que também observaram em bovinos maior expressão de MIF nos CLs mais jovens. Galvão et al. (2014) também demostraram *in vitro* que o efeito luteotrópico de leptina foi acompanhado do aumento de MIF nas células luteais, além do aumento de progesterona e prostaglandina E2.

No entanto, houve redução de transcritos para *Mif* nos CLs das gatas gestantes em relação às gatas não-gestantes, sugerindo que a gestação faz modulação negativa na expressão luteal de MIF, pelo menos na gata doméstica. No entanto, como os CLs foram obtidos de gatas do meio e final da gestação, isso pode ter influenciado no resultado, uma vez que demostramos que maior expressão de MIF ocorre nos CLs mais jovens. *Mif* também apresentou correlação gênica positiva com *Kiss1r* nos CLs da gata doméstica, sugerindo que o sistema Kisspeptina/Kiss1R pode modular a

expressão luteal de MIF. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar se a gestação e o sistema Kisspeptina/Kiss1R influenciam a expressão luteal de MIF.

6.5 CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou que o sistema Kisspeptina/Kiss1R é expresso durante a foliculogênese e luteogênese da gata doméstica, sendo que a gestação estimula a expressão luteal de Kiss1 e seu receptor. Além disso, há variação espaço-temporal no perfil de mediadores angiogênicos e imunológicos durante a foliculogênese, luteogênese e regressão luteal de gatas cíclicas, sendo que a gestação influencia a expressão desses mediadores no corpo lúteo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse foi o primeiro trabalho na literatura que avaliou o sistema Kisspeptina/Kiss1R no trato genital e sua relação com mediadores angiogênicos e imunológicos, inclusive na gata doméstica onde os estudos são escassos. Até então era conhecido sua expressão no útero e ovário durante o ciclo estral, mas não se tinham dados na literatura sobre sua expressão na interface materno-fetal de animais gestantes, na luteogênese e em condições patológicas como a piometra. Nosso trabalho também verificou a expressão nesses órgãos de diversos fatores angiogênicos e imunonóligos que são importantes para morfofisiologia reprodutiva, bem como a existência de relação *in vivo* entre a expressão desses mediadores e o sistema Kisspeptina/Kiss1r, até então desconhecida em espécies animais ou humanos.

Nossa primeira dificuldade foi caracterizar e agrupar os animais nos estágios do ciclo estral, em vista do alto volume de amostras e nos diferentes parâmetros utilizados, como os dados do histórico clínico, análise macroscópica e microscópica do trato genital e dosagem hormonal. Além disso, para avaliação dos animais gestantes houve também dificuldades em relação à pouca literatura na área que estabelece critérios para isso e os dados não estão atualizados.

Nossos esforços foram grandes também para adequar os protocolos de análise imunohistoquímica (IHC) para essa espécie. O principal empecilho foi conseguir um protocolo eficaz de fixação do tecido na lâmina histológica, sendo que o método

comumente utilizado de gelatinização não foi eficiente. Portanto, tivemos que adiquirir lâminas silanizadas que pudessem suprir essa dificuldade durante o desenvolvimento do trabalho. Além disso, ainda para IHC, testes de padronização para cada anticorpo utilizado e tecido tiveram que ser previamente realizados, demandando tempo para isso.

Como principais resultados, demonstramos que a Kisspeptina e seu receptor Kiss1R são expressos no útero e ovário de gatas cíclicas e sofrem influência do ciclo estral. A expressão desse sistema também foi observada na interface materno-fetal, sendo que a gestaão estimulou tanto a expressão no útero gestante quanto na placenta. Vale ressaltar que a gestação também influenciou positivamente a expressão luteal de Kiss1 e KissR, e que os mediadores angiogênicos e imunológicos estudados são também expressos nos trê tecidos avaliados. A expressão dos mesmos no sistema genital da gata também sofre influência do ciclo estral e da gestação, além de apresentarem, para alguns marcadores, correlação significativa com a expressão de *Kiss1* e/ou *Kiss1r*. Esse foi o primeiro trabalho da literatura a mostrar *in vivo* a correlação do sistema Kisspeptina/Kiss1R com mediadores angiogênicos e imunológicos no sistema genital.

Os resultados do presente trabalho serão úteis para melhor compreensão da morfofisiologia da reprodução da gata doméstica e felinos em geral que compartilham características fisiológicas. São dados relevantes também para o estudo da patogênese da piometra, condição pobremente estudada nesses animais. Assim, por meio deste trabalho, será possível estudar novos alvos moleculares na busca por tratamentos eficazes de disfunções reprodutivas ou melhoria e/ou substituição dos atuais métodos contraceptivos que são, em sua maioria, à base de progesterona e que favorecem o desenvolvimento da piometra.

REFERÊNCIAS

ABBARA, A. et al. A second dose of kisspeptin-54 improves oocyte maturation in women at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome: A Phase 2 randomized controlled trial. **Human Reproduction**, v. 32, n. 9, p. 1915–1924, 2017.

ACHERMANN, J. C.; JAMESON, J. L. Fertility and Infertility: Genetic Contributions from the Hypothalamic-Pituitary- Gonadal Axis. **Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 812–818, 1999.

AĞAOĞLU, A. R. et al. Expression of platelet activating factors and its receptor in cat uterus during early pregnancy. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 60, p. 47–52, 2013.

AGAOGLU, O. K. et al. Expression of hypoxia-inducible factors and vascular endothelial growth factor during pregnancy in the feline uterus. **Theriogenology**, v. 84, n. 1, p. 24–33, 2015.

AGAOGLU, O. K. et al. Gene expression profiles of some cytokines, growth factors, receptors, and enzymes (GM-CSF, IFNγ, MMP-2, IGF-II, EGF, TGF-β, IGF-IIR) during pregnancy in the cat uterus. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 638–644, 2016.

AGUDELO, C. F. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in cats. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 27, n. 4, p. 173–182, 2005.

AHMED, A. et al. Regulation of Placental Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Placenta Growth Factor (PlGF) and Soluble Flt-1 by Oxygen— A Review. **Placenta**, v. 21, p. S16–S24, 2000.

AL-ZI'ABI, M. O.; WATSON, E. D.; FRASER, H. M. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. **Reproduction**, v. 125, n. 2, p. 259–270, 2003.

ALLEN, W. R.; GOWER, S.; WILSHER, S. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (Flt-I and KDR) in the endometrium and placenta of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 516–526, 2007.

ALVES, J. A. G. et al. Os macrófagos na placenta durante o trabalho de parto. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 2, 2009.

AMELKINA, O. et al. The corpus luteum of the domestic cat: Histologic classification and intraluteal hormone profile. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 711–720, 2015.

AMELKINA, O. et al. Identification of feline Kiss1 and distribution of immunoreactive kisspeptin in the hypothalamus of the domestic cat. **Journal of Reproduction and Development**, v. 65, n. 4, p. 335–343, 2019.

AMELKINA, O.; TANYAPANYACHON, P.; CHATDARONG, K. Kisspeptin in the domestic cat : expression and protein distribution in the hypothalamus. **Thai Journal of Veterinary Medicine Suppl**, v. 47, n. 2, p. 133–134, 2017.

ARCK, P. C.; HECHER, K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. **Nature Medicine**, v. 19, n. 5, p. 548–556, 2013.

ARCURI, F. et al. Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor Transcript and Protein by First-Trimester Human Trophoblasts1. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 6, p. 1299–1303, 1999.

ARCURI, F. et al. Macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium: expression and localization during the menstrual cycle and early pregnancy. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 4, p. 1200–5, 2001.

ARCURI, F. et al. Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor. **Reproduction**, v. 131, n. 1, p. 175–182, 2006.

ARMSTRONG, R. A. et al. Decreased serum levels of kisspeptin in early pregnancy are associated with intra-uterine growth restriction and pre-eclampsia. **Prenatal Diagnosis**, v. 29, n. 10, p. 982–985, 2009.

ASHKAR, B. A. A.; SANTO, J. P. DI; CROY, B. A. Interferon γ Contributes to Initiation of Uterine Vascular Modification , Decidual Integrity , and Uterine Natural Killer Cell Maturation during Normal Murine Pregnancy. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 2, p. 259–269, 2000.

ASLAN, M. et al. The effect of oxytocin and Kisspeptin-10 in ovary and uterus of ischemia-reperfusion injured rats. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 4, p. 456–462, 2017.

AYRES, H.; MINGOTI, G. Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p. 174–180, 2012.

BABA, T. et al. Menstrual cyclic change of metastin/GPR54 in endometrium. **Medical Molecular Morphology**, v. 48, n. 2, p. 76–84, 2014.

BABWAH, A. V. Uterine and placental KISS1 regulate pregnancy: What we know and the challenges that lie ahead. **Reproduction**, v. 150, n. 4, p. R121–R128, 2015.

BACKHOLER, K.; SMITH, J.; CLARKE, I. J. Melanocortins may stimulate reproduction by activating orexin neurons in the dorsomedial hypothalamus and kisspeptin neurons in the preoptic area of the ewe. **Endocrinology**, v. 150, n. 12, p. 5488–5497, 2009.

BAITHALU, R.; MAHARANA, B. R.; MISHRA, C. Canine Pyometra. **Veterinary World**, v. 3, n. 7, p. 340–342, 2010.

BANERJEE, S. et al. Placental expression of interferon-γ (IFN-γ) and its receptor IFN-γR2 fail to switch from early hypoxic to late normotensive development in preeclampsia. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 2, p. 944–952, 2005.

BASINI, G. et al. Presence and function of kisspeptin/KISS1R system in swine ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 115, p. 1–8, 15 jul. 2018.

BERISHA, B. et al. Expression and Tissue Concentration of Vascular Endothelial Growth Factor, Its Receptors, and Localization in the Bovine Corpus Luteum During Estrous Cycle and Pregnancy1. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 4, p. 1106–1114, 2000.

BEVILACQUA, E. et al. Review: Putative roles for the macrophage migratory inhibitory factor at the maternal fetal interface. **Placenta**, v. 28, n. SUPPL, p. 51–56, 2014.

BILBAN, M. et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1319–1328, 15 mar. 2004.

BOGIC, L. V.; BRACE, R. A.; CHEUNG, C. Y. Developmental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and VEGF binding in ovine placenta and fetal membranes. **Placenta**, v. 22, n. 4, p. 265–275, 2001.

BOVE, S. E. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Bovine Corpus Luteum: Characterization of Steady-State Messenger Ribonucleic Acid and Immunohistochemical Localization1. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 4, p. 879–885, 1 abr. 2000.

BRÄNNSTRÖM, M.; NORMAN, R. J. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. **Human Reproduction**, v. 8, n. 10, p. 1762–1775, 1993.

BRAUN, B. C. et al. Progesterone and estradiol in cat placenta - Biosynthesis and tissue concentration. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 132, n. 3–5, p. 295–302, 2012.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (Felis catus). **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 5–13, 2006.

BRODZKI, P. et al. The Concentrations of Inflammatory Cytokines and Acute-Phase Proteins in the Peripheral Blood and Uterine Washings in Cows with Pyometra. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 3, p. 417–422, 2015.

BROLIO, M.; AMBRÓSIO, C.; FRANCIOLLI, A. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 222–232, 2010.

BURNS, K. H. et al. Analysis of Ovarian Gene Expression in Follicle-Stimulating Hormone β Knockout Mice 1. **Endocrinology**, v. 142, n. 7, p. 2742–2751, 2001.

BYRI, P. et al. Effect of kisspeptin on in vitro maturation of sheep oocytes. **Veterinary World**, v. 10, n. 3, p. 276–280, 2017.

CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: A regulator of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 10, p. 791–800, 2003.

CALDER, M. et al. Implantation failure in female Kiss1-/- mice is independent of their hypogonadic state and can be partially rescued by leukemia inhibitory factor. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 3065–3078, 2014.

CAO, Y. et al. Reproductive functions of Kisspeptin/KISS1R Systems in the Periphery. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2019.

CARMELIET, P. et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nature Medicine**, v. 7, n. 5, p. 575–583, 2001.

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 1–15, 2004.

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C. Placentation in mammals: Definitive placenta, yolk sac, and paraplacenta. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 278–287, 2016.

CARTER, A. M.; MESS, A. M. MammaLian Placentation: Implications for Animal Models. **Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms**, p. 2423–2442, 2014.

CARTWRIGHT, J. E.; WILLIAMS, P. J. Altered placental expression of kisspeptin and its receptor in pre-eclampsia. **Journal of Endocrinology**, v. 214, n. 1, p. 79–85, 2012.

CASTELLANO, J. M. et al. Expression of KiSS-1 in rat ovary: Putative local regulator of ovulation? **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4852–4862, 2006.

CEJUDO ROMAN, A. et al. Analysis of the expression of neurokinin B, kisspeptin, and their cognate receptors NK3R and KISS1R in the human female genital tract. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 5, p. 1213–1219, 2012.

CHATDARONG, K. **Reproductive Physiology of the Female Cat**. Upssala: Thesis (Doctoral) - Uppsala University, 2003.

CHATDARONG, K. et al. Hysterographic appearance and uterine histology at different stages of the reproductive cycle and after progestagen treatment in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 64, n. 1, p. 12–29, 2005.

CHEN, C. P. et al. Expression of Interferon γ by Decidual Cells and Natural Killer Cells at the Human Implantation Site. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 11, p. 1461–1467, 2015.

CHEN, D. B.; ZHENG, J. Regulation of Placental Angiogenesis. **Microcirculation**, v. 21, n. 1, p. 15–25, 2014.

CIELESH, M. et al. The localization of kisspeptin and kisspeptin receptor in the canine ovary during different stages of the reproductive cycle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 24–28, 2017.

CLARK, D. E. et al. Localization of VEGF and expression of its receptors flit and KDR in human placenta throughout pregnancy. **Human Reproduction**, v. 11, n. 5, p. 1090–1098, 1996.

CLARKE, H.; DHILLO, W. S.; JAYASENA, C. N. Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. **Endocrinology and Metabolism**, v. 30, n. 2, 2015.

CLARKSON, J. et al. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 8, p. 673–682, 2009.

COMBA, C. et al. Role of inflammatory mediators in patients with recurrent pregnancy loss. **Fertility and Sterility**, v. 104, n. 6, p. 1467- 1474.e1, 2015.

CORRÊA, J. M. X. et al. Evaluation of the Antinociceptive Effect of Maropitant, a Neurokinin-1 Receptor Antagonist, in Cats Undergoing Ovariohysterectomy. **Veterinary Medicine International**, v. 2019, p. 1–7, 2019.

COSTA, A. F. et al. Macrophage migration inhibitory factor induces phosphorylation of Mdm2 mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase: Role of this pathway in decidual cell survival. **Placenta**, v. 41, p. 27–38, 2016.

COULAM, C. B. Understanding the immunobiology of pregnancy and applying it to treatment of recurrent pregnancy loss. **Early pregnancy (Online)**, v. 4, n. 1, p. 19–29, 2000.

DE ROUX, N. et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 19, p. 10972–10976, 2003.

DEMIR, R.; YABA, A.; HUPPERTZ, B. Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. **Acta Histochemica**, v. 112, n. 3, p. 203–214, 2010.

DHILLO, W. S. et al. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 12, p. 6609–6615, 2005.

DIAS, J. C. O. et al. O neuropeptídeo kisspeptina e a reprodução animal: uma revisão. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 2, p. 96–110, 2015.

DORFMAN, M. D. et al. Loss of *Ntrk2/Kiss1r* Signaling in Oocytes Causes Premature Ovarian Failure. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 3098–3111, 1 ago. 2014.

DOUGLAS, N. et al. Angiogenesis and Ovarian Function. **JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION**, v. 13, n. 4, p. 7–15, 2005.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal of comparative pathology**, v. 69, p. 237–50, jul. 1959.

EL-BAHR, S. M.; EL-DEEB, W. M. Acute-phase proteins, oxidative stress biomarkers, proinflammatory cytokines, and cardiac troponin in Arabian mares affected with pyometra. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 1132–1136, 2016.

ELHABAZI, K. et al. Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPFF receptors. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 164–171, 2013.

ENDERS, A. C. Reasons for Diversity of Placental Structure. **Placenta**, v. 30, n. SUPPL., p. 15–18, 2009.

ENDERS, A. C.; CARTER, A. M. The evolving placenta: Convergent evolution of variations in the endotheliochorial relationship. **Placenta**, v. 33, n. 5, p. 319–326, 2012.

FARIA, M. R. et al. Spatiotemporal patterns of macrophage migration inhibitory factor (Mif) expression in the mouse placenta. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, p. 1–9, 2010.

FAYAZI, M. et al. The pregnant mouse uterus exhibits a functional kisspeptin/KISS1R signaling system on the day of embryo implantation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1–6, 2015.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and Feline Endocrinology and**

Reproduction. 2ª ed. Philadelphia: Saunders, 1996.

FERNANDOIS, D. et al. Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats. **Journal of Endocrinology**, v. 228, n. 3, p. 161–170, 2016.

FERRARA, N. et al. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. **American Journal of Pathology**, v. 162, n. 6, p. 1881–1893, 2003.

FERRÉ-DOLCET, L. et al. Placental and uterine expression of GLUT3, but not GLUT1, is related with serum progesterone levels during the first stages of pregnancy in queens. **Theriogenology**, v. 121, n. August, p. 82–90, 2018.

FÖRGER, F.; VILLIGER, P. M. Immunological adaptations in pregnancy that modulate rheumatoid arthritis disease activity. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 16, n. 2, p. 113–122, 2020.

FORSYTHE, J. A. et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 9, p. 4604–4613, 1996.

FRANCIS, V. A. et al. Kisspeptin regulation of genes involved in cell invasion and angiogenesis in first trimester human trophoblast cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–10, 2014.

FRANSSON, B. A. et al. C-reactive protein, tumor necrosis factor α, and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS: Original Study. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 17, n. 4, p. 373–381, 2007.

FRASER, H. M.; LUNN, S. F. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 3, p. 787–797, 2000.

FUJIMOTO, J. et al. Expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its mRNA in uterine endometrial cancers. **Cancer Letters**, v. 134, n. 1, p. 15–22, 1998.

FUKUOKA, M. et al. Interleukin-1 Inhibits Luteinization of Porcine Granulosa Cells in Culture. **Endocrinology**, v. 122, n. 1, p. 367–369, 1988.

FUNES, S. et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, n. 4, p. 1357–1363, 2003.

GADSBY, J. E. et al. Toll-like receptor and related cytokine mRNA expression in bovine corpora lutea during the oestrous cycle and pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 3, p. 495–504, 2017.

GALVÃO, A. et al. Equine Luteal Function Regulation May Depend on the Interaction Between Cytokines and Vascular Endothelial Growth Factor: An In Vitro Study1. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 6, p. 1–9, 2012a.

GALVÃO, A. et al. Cytokines tumor necrosis factor-α and interferon-γ participate in modulation of the equine corpus luteum as autocrine and paracrine factors. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 93, n. 1, p. 28–37, 2012b.

GALVÃO, A. et al. Effect of cytokines and ovarian steroids on equine endometrial

function: An in vitro study. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 7, p. 985–997, 2013.

GALVÃO, A. et al. Opposing roles of leptin and Ghrelin in the equine corpus luteum regulation: An in vitro study. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

GAO, H. et al. IFN-Gamma and TNF-alpha inhibit expression of TGB-beta-1, its receptors TBETAR-1 and TBETAR-II in the corpus luteum of PMSG/HCG treatment Rhesus Monkey. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, n. 3, p. 2496–2503, 2005.

GARCÍA-ORTEGA, J. et al. Expression of neurokinin B/NK3 receptor and kisspeptin/KISS1 receptor in human granulosa cells. **Human Reproduction**, v. 29, n. 12, p. 2736–2746, 2014.

GARCÍA-ORTEGA, J. et al. Expression of Tachykinins and Tachykinin Receptors and Interaction with Kisspeptin in Human Granulosa and Cumulus Cells1. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 6, 1 jun. 2016.

GAYTAN, F. et al. Kisspeptin receptor haplo-insufficiency causes premature ovarian failure despite preserved gonadotropin secretion. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 3088–3097, 2014.

GAYTÁN, F. et al. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 3, p. E520–E531, 2009.

GAYTÁN, M. et al. Expression of KiSS-1 in rat oviduct: Possible involvement in prevention of ectopic implantation? **Cell and Tissue Research**, v. 329, n. 3, p. 571–579, 2007.

GIMÉNEZ, F. et al. Fisiología reproductiva y control de ciclos Estrales en la Gata Doméstica. **Analecta Veterinaris**, v. 26, n. 1, p. 38–43, 2006.

GINTHER, O. J. et al. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 1997, n. 48, p. 75–87, 1997.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Reproduction**, v. 87, n. 1, p. 223–230, 1989.

GINTHER, O. J.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**, v. 42, n. 6, p. 987–1001, 1994.

GOBELLO, C. et al. A study of two protocols combining aglepristone and cloprostenol to treat open cervix pyometra in the bitch. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 901–908, 2003.

GOLZAR, F.; JAVANMARD, S. H.; DANA, N. The effect of kisspeptin-10 on angiogenesis and tumor growth. **International Journal of Clinical and Experimental Physiology**, v. 1, n. 2, p. 101, 2014.

GONZÁLEZ, F. et al. Elevated circulating levels of macrophage migration inhibitory factor in polycystic ovary syndrome. **Cytokine**, v. 51, n. 3, p. 240–244, 2010.

GORBUNOVA, O. L.; SHIRSHEV, S. V. The role of kisspeptin in immune tolerance

formation during pregnancy. **Doklady Biological Sciences**, v. 457, n. 1, p. 258–260, 2014.

GOTTSCH, M. L. et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. **Endocrinology**, v. 145, n. 9, p. 4073–7, 2004.

GRIEB, G. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): A promising biomarker. **Drug News and Perspectives**, v. 23, n. 4, p. 257–264, 2010.

GRIFFIN, B. Prolific Cats : The Estrous Cycle. **Compendium**, v. 23, n. 12, p. 1049–1057, 2001.

GUDERMUTH, D. F. et al. Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 51, p. 177–84, 1997.

GUTIERREZ, C. G. et al. Growth and Antrum Formation of Bovine Preantral Follicles in Long-Term Culture In Vitro1. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1322–1328, 1 maio 2000.

HAGMAN, R. et al. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2α metabolite analysis. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 198–206, 2006.

HAGMAN, R. et al. Plasma PGF2α metabolite levels in cats with uterine disease. **Theriogenology**, v. 72, n. 9, p. 1180–1187, 2009.

HAMMER, A. Immunological regulation of trophoblast invasion. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 90, n. 1, p. 21–28, jun. 2011.

HAN, S.-K. et al. Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Kisspeptin as a Neuroendocrine Switch for the Onset of Puberty. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 49, p. 11349–11356, 2005.

HERREBOUDT, A. M. et al. Kiss1 mutant placentas show normal structure and function in the mouse. **Placenta**, v. 36, n. 1, p. 52–58, 1 jan. 2015.

HERVÉ, M. A. J. et al. Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. **Journal of Endocrinology**, v. 188, n. 1, p. 91–99, 2006.

HIDEN, U. et al. Kisspeptins and the placenta: Regulation of trophoblast invasion. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 8, n. 1, p. 31–39, 2007.

HOLLINSHEAD, F.; KREKELER, N. Pyometra in the queen: To spay or not to spay? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 1, p. 21–33, 2016.

HORIKOSHI, Y. et al. Dramatic Elevation of Plasma Metastin Concentrations in Human Pregnancy: Metastin as a Novel Placenta-Derived Hormone in Humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 2, p. 914–919, 1 fev. 2003.

HOUDEAU, E. et al. Sex Steroid Regulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Normal and Inflamed Colon in the Female Rat. **Gastroenterology**, v. 132, n. 3, p. 982–993, 2007.

HRABOVSZKY, E. et al. The kisspeptin system of the human hypothalamus: Sexual

dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 11, p. 1984–1998, 2010.

HU, K. L. et al. Kisspeptin/kisspeptin receptor system in the ovary. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. JAN, 2018.

HU, K. L. et al. Potential roles for the kisspeptin/kisspeptin receptor system in implantation and placentation. **Human reproduction update**, v. 25, n. 3, p. 326–343, 2019a.

HU, K. L. et al. Increased Expression of KISS1 and KISS1 Receptor in Human Granulosa Lutein Cells—Potential Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome. **Reproductive Sciences**, v. 26, n. 11, p. 1429–1438, 1 nov. 2019b.

HUNT, J. S.; PETROFF, M. G.; BURNETT, T. G. Uterine leukocytes: Key players in pregnancy. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 11, n. 2, p. 127–137, 2000.

HYDER, S. M. et al. Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen. **Cancer research**, v. 56, n. 17, p. 3954–60, 1996.

IBRAHIM, R. O.; OMER, S. H.; FATTAH, C. N. The Correlation between Hormonal Disturbance in PCOS Women and Serum Level of Kisspeptin. 2020.

IETTA, F. et al. Oxygen regulation of macrophage migration inhibitory factor in human placenta. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 1, p. E272–E280, 2007.

IETTA, F. et al. Role of the Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in the survival of first trimester human placenta under induced stress conditions. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

JACKSON, M. R. et al. Localization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placentae throughout gestation. **Placenta**, v. 15, n. 4, p. 341–353, 1994.

JAMIL, Z. et al. Kisspeptin and embryo implantation after ICSI. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 34, n. 2, p. 147–153, 1 fev. 2017.

JANNEAU, J. L. et al. Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by norn and tumoral trophoblast cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 11, p. 5336–5339, 2002.

JAYASENA, C. N. et al. Kisspeptin-54 triggers egg maturation in women undergoing in vitro fertilization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 8, p. 3667–3677, 2014a.

JAYASENA, C. N. et al. Reduced Levels of Plasma Kisspeptin During the Antenatal Booking Visit Are Associated With Increased Risk of Miscarriage. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 12, p. E2652–E2660, 1 dez. 2014b.

JURSZA-PIOTROWSKA, E. et al. Prostaglandin release by cultured endometrial tissues after challenge with lipopolysaccharide and tumor necrosis factor α, in relation to the estrous cycle, treatment with medroxyprogesterone acetate, and pyometra. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1177–1185, 2016.

JURSZA, E. et al. LPS-challenged TNF α production, prostaglandin secretion, and TNF α /TNFRs expression in the endometrium of domestic cats in estrus or diestrus, and in cats with pyometra or receiving medroxyprogesterone acetate. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014a.

JURSZA, E. et al. LPS-Challenged TNF α Production, Prostaglandin Secretion, and TNF α /TNFRs Expression in the Endometrium of Domestic Cats in Estrus or Diestrus, and in Cats with Pyometra or Receiving Medroxyprogesterone Acetate. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–12, 2014b.

JURSZA, E. et al. The role of toll-like receptors 2 and 4 in the pathogenesis of feline pyometra. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 596–603, 2015.

JURSZA, E.; SKARZYNSKI, D. J.; SIEMIENIUCH, M. J. Validation of reference genes in the feline endometrium. **Reproductive Biology**, v. 14, n. 4, p. 302–306, 2014.

KARLSSON, I. et al. Cytokines as Immunological Markers for Systemic Inflammation in Dogs with Pyometra. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 337–341, 2012.

KARLSSON, I. et al. Multiplex cytokine analyses in dogs with pyometra suggest involvement of KC-like chemokine in canine bacterial sepsis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 170, p. 41–46, 2015.

KASHIDA, S. et al. Regulation and Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Corpus Luteum During Mid-Pregnancy in Rats1. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 1, p. 317–323, 2001.

KATICA, A.; MLAĆO, N.; KATICA, M. Determining the Level of Estradiol Concentration in Serum of the Domestic Cats (Felis Catus) Over the Period of One Year. **Veterinary Journal of Republic of Srpska**, v. 14, n. 1, p. 26–31, 2014.

KATS, R. et al. Cycle-dependent expression of macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium. **Human Reproduction**, v. 20, n. 12, p. 3518–3525, 2005.

KIDA, K. et al. Epidermal growth factor, transforming growth factor-α, and epidermal growth factor receptor expression and localization in the canine endometrium during the estrous cycle and in bitches with pyometra. **Theriogenology**, v. 73, n. 1, p. 36–47, 2010.

KIMURA, T. et al. Expression of oxytocin receptor in human pregnant myometrium. **Endocrinology**, v. 137, n. 2, p. 780–785, 1996.

KING, B. F. Comparative studies of structure and function in mammalian placentas with special reference to maternal-fetal transfer of iron. **Integrative and Comparative Biology**, v. 32, n. 2, p. 331–342, 1992.

KITAYA, K. et al. Genes regulated by interferon-γ in human uterine microvascular endothelial cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 20, p. 689–697, 2007.

KOTANI, M. et al. The metastasis-suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. **Journal of**

Biological Chemistry, v. 16, p. 1–26, 2001.

LAOHARATCHATATHANIN, T. et al. Augmentation of Metastin/Kisspeptin mRNA Expression by the Proestrous Luteinizing Hormone Surge in Granulosa Cells of Rats: Implications for Luteinization. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 1, 1 jul. 2015.

LAWLER, D. F. et al. Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 47, p. 57–61, 1993.

LEE, J. et al. KiSS-1 , a Novel Human Malignant Melanoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 23, p. 1731–1737, 1996.

LEISER, R.; ENDERS, A. C. Light- and electron-microscopic study of the near-term paraplacenta of the domestic cat: II. Paraplacental hematoma. **Acta Anatomica**, v. 106, n. 3, p. 312–326, 1980.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: In a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 102, n. 3, p. 122–134, 1994.

LEISER, R.; KOHLER, T. The blood vessels of the cat girdle placenta. Observations on corosion casts, scanning electron microscopical and histological studies - II. Fetal vasculature. **Anatomy and Embryology**, v. 170, n. 2, p. 209–216, 1984.

LEISER, R.; KOOB, B. Development and characteristics of placentation in a carnivore, the domestic cat. **Journal of Experimental Zoology**, v. 266, n. 6, p. 642–656, 1993.

LEÓN, S. et al. Beyond the brain-Peripheral kisspeptin signaling is essential for promoting endometrial gland development and function. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–16, 2016.

LIMA, L. R. S. **Piometra em cadelas**. [s.l.] Trabalho de conclusão de curso (Medicina Veterinária) - Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo, 2009.

LIMAN, N. et al. Expression of Survivin, Bcl-2 and bax proteins in the domestic cat (Felis catus) endometrium during the oestrus cycle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 1, p. 1–13, 2012.

LOGIE, J. J. et al. Evaluation of kisspeptin levels in obese pregnancy as a biomarker for pre-eclampsia. **Clinical Endocrinology**, v. 76, n. 6, p. 887–893, 1 jun. 2012.

LOPES, F. et al. Sheep (Ovis aries) Macrophage Migration Inhibitory Factor: Molecular cloning, characterization, tissue distribution and expression in the ewe reproductive tract and in the placenta. **Cytokine**, v. 54, n. 3, p. 315–323, 2011.

LOPEZ MERLO, M. et al. Failure of a single dose of medroxyprogesterone acetate to induce uterine infertility in postnatally treated domestic cats. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 718–723, 2016.

MAGEE, C. et al. Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. **Endocrinology**, v. 150, n. 6, p. 2813–2821, 2009.

MAKRI, A. et al. KISS1/KISS1R expression in eutopic and ectopic endometrium of women suffering from endometriosis. **In Vivo**, v. 26, n. 1, p. 119–128, 2012.

MARANESI, M. et al. Kisspeptin/kisspeptin receptor system in pseudopregnant rabbit corpora lutea: presence and function. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4a, p. 609–614, 2005.

MARIANI, T. C. et al. Immunohistochemical localization of VEGF and its receptors in the corpus luteum of the bitch during diestrus and anestrus. **Theriogenology**, v. 66, n. 6–7, p. 1715–1720, 2006.

MARK, P. J. et al. Kiss1 and Kiss1r mRNA expression in the rat placenta: Changes with gestational age and regulation by glucocorticoids. **Placenta**, v. 34, n. 8, p. 657–662, ago. 2013.

MATSUURA, T. et al. Anti-macrophage inhibitory factor antibody inhibits PMSG-hCG-induced follicular growth and ovulation in mice. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 19, n. 12, p. 591–595, 2002.

MERHI, Z. et al. Ovarian kisspeptin expression is related to age and to monocyte chemoattractant protein-1. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 33, n. 4, p. 535–543, 2016.

MILLAR, R. P. et al. Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis Reactivation by Kisspeptin-10 in Hyperprolactinemic Women With Chronic Amenorrhea. **Journal of the Endocrine Society**, v. 1, n. 11, p. 1362–1371, 2017.

MITACEK, M. C. G. Ciclo estral felino. In: STORNELLI, M. A.; SOTA, R. L. D. LA (Eds.). . **Manual de reproducción de animales de producción y compañía**. La plata: Edulp, 2016. p. 70–76, 2016.

MÖNCKEDIECK, V. et al. Progestins inhibit expression of MMPs and of angiogenic factors in human ectopic endometrial lesions in a mouse model. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 10, p. 633–643, 2009.

MONDAL, M.; BARUAH, K. K.; PRAKASH, B. S. Determination of plasma kisspeptin concentrations during reproductive cycle and different phases of pregnancy in crossbred cows using bovine specific enzyme immunoassay. **General and Comparative Endocrinology**, v. 224, p. 168–175, 1 dez. 2015.

MONDAL, M.; KARUNAKARAN, M.; BARUAH, K. K. Development and Validation of a Sensitive Enzymeimmunoassay for Determination of Plasma Metastin in Mithun (Bos frontalis). **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 37, n. 2, p. 201–216, 3 mar. 2016.

MONTEIRO, C. M. R.; KOIVISTO, M. B. DE K.; SILVA, A. PERFIL HISTOLÓGICO DO ÚTERO E OVÁRIOS DE GATAS SUBMETIDAS À. **Ars Veterinaria**, v. 22, n. 0102–6380, p. 236–241, 2006.

MOTRO, B. et al. Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 8, p. 3092–3096, 1990.

MUMTAZ, A. et al. Kisspeptin: A potential factor for unexplained infertility and impaired embryo implantation. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 11,

n. 2, p. 99–104, 1 jul. 2017.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 3ª ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2011.

NEUVIANS, T. P.; BERISHA, B.; SCHAMS, D. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Fibroblast Growth Factor (FGF) Expression during Induced Luteolysis in the Bovine Corpus Luteum. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, n. 4, p. 389–395, 2004.

NEWBERN, D.; FREEMARK, M. Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 18, n. 6, p. 409–416, 2011.

OHTAKI, T. et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 613–617, 2001.

OLIVEIRA, I. R. DE C. et al. Piometra em gata - Revisão de Literatura. **Almanaque de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 3, n. 1, p. 1–13, 2017.

OLIVEIRA, M. **KISSPEPTINA : Efeito na maturação in vitro de ovócitos bovinos KISSPEPTINA : Efeito na maturação in vitro de ovócitos bovinos**. 2016. 52f: Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

PAPA, P. C. et al. VEGF system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 33, n. 4, p. 379–389, 2007.

PARK, D.-W. et al. Expression of Kisspeptin and its Receptor GPR54 in the First Trimester Trophoblast of Women with Recurrent Pregnancy Loss. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 2, p. 132–139, 1 fev. 2012a.

PARK, D. W. et al. Expression of Kisspeptin and its Receptor GPR54 in the First Trimester Trophoblast of Women with Recurrent Pregnancy Loss. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 2, p. 132–139, 2012b.

PAULESU, L. et al. Variation in Macrophage-Migration-Inhibitory-Factor Immunoreactivity During Porcine Gestation. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 4, p. 949–953, 2005.

PAULESU, L. et al. Variation in Macrophage Migration Inhibitory Factor [MIF] immunoreactivity during bovine gestation. **Placenta**, v. 33, n. 3, p. 157–163, 2012.

PENG, J. et al. Kisspeptin stimulates progesterone secretion via the Erk1/2 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in rat luteal cells. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 5, 2013.

PIIA, V. et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Placenta Growth Factor in Human Placenta. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 489–494, 1997.

PINHO, M. DE S. L. Angiogênese: O gatilho proliferativo. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 25, n. c, p. 396–402, 2005.

PINILLA, L. et al. Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory

Mechanisms. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 3, p. 1235–1316, 2012.

PRAPAIWAN, N. et al. Expression of oxytocin, progesterone, and estrogen receptors in the reproductive tract of bitches with pyometra. **Theriogenology**, v. 89, p. 131–139, 2017.

PRIYANKA, R.; MURALIDHARAN. Interferons and interferon therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 12, p. 400–403, 2014.

RAMAESH, T. et al. Kisspeptin-10 inhibits angiogenesis in human placental vessels ex vivo and endothelial cells in vitro. **Endocrinology**, v. 151, n. 12, p. 5927–5934, 2010.

REDMER, D. A. et al. Characterization and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine corpus luteum. **Journal of reproduction and fertility**, v. 108, n. 1, p. 157–65, 1996.

REDMER, D. A. et al. Evidence for a Role of Capillary Pericytes in Vascular Growth of the Developing Ovine Corpus Luteum1. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 879–889, 2001.

REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the female reproductive organs: Pathological implications. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 83, n. 4, p. 151–163, 2002.

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the Placenta. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1033–1040, 2001.

RICU, M. A. et al. Evidence for a celiac ganglion-ovarian kisspeptin neural network in the rat: Intraovarian anti-kisspeptin delays vaginal opening and alters estrous cyclicity. **Endocrinology**, v. 153, n. 10, p. 4966–4977, 2012.

ROBERTS, M. Differential regulation of interleukins IL-13 and IL-15 by ovarian steroids, TNF- and TGF- in human endometrial epithelial and stromal cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, n. 10, p. 751–760, 2005.

ROBERTSON, S. A.; CARE, A. S.; MOLDENHAUER, L. M. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 10, p. 4224–4235, 2018.

ROBINSON, R. S. et al. Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Reproduction**, v. 138, n. 6, p. 869–881, 2009.

ROSEWEIR, A. K.; KATZ, A. A.; MILLAR, R. P. Kisspeptin-10 inhibits cell migration in vitro via a receptor-GSK3 beta-FAK feedback loop in HTR8SVneo cells. **Placenta**, v. 33, n. 5, p. 408–415, 2012.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 271–287, 2003.

SAADELDIN, I. M. et al. Paradoxical effects of kisspeptin: It enhances oocyte in vitro maturation but has an adverse impact on hatched blastocysts during in vitro culture. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 5, p. 656–668, 22 jun. 2012.

SAĞSÖZ, H. et al. Immunolocalization of vascular endothelial growth factor, its receptors (flt1/fms, flk1/KDR, flt4) and vascular endothelial growth inhibitor in the

bitch uterus during the sexual cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 140, n. 3–4, p. 241–254, 2013.

SAHA, S. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 63, n. 1–2, p. 27–39, 2000.

SARTORI, R. et al. Metabolic and endocrine differences between Bos taurus and Bos indicus females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 32–40, 2016.

SCHÄFER-SOMI, S. et al. Kisspeptin-10 and the G protein-coupled receptor 54 are differentially expressed in the canine pregnant uterus and trophoblast cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 123–129, 2016.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of Corpus Luteum Function in Cattle - an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 4, p. 241–251, 2004.

SCHEER, F. A. J. L.; CZEISLER, C. A. Melatonin, sleep, and circadian rhythms. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 5–9, 2005.

SCOTT, V.; BROWN, C. H. Kisspeptin Activation of Supraoptic Nucleus Neurons in Vivo. **Endocrinology**, v. 152, n. 10, p. 3862–3870, 2011.

SCOTT, V.; BROWN, C. H. Beyond the GnRH axis: Kisspeptin regulation of the oxytocin system in pregnancy and lactation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 784, p. 201–218, 2013.

SEMINARA, S. B. et al. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 17, p. 1614–1627, 2003.

SHELDON, I. M.; OWENS, S. E. Postpartum uterine infection and endometritis in dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 622–629, 2017.

SHILLE, V. M.; LUNDSTROM, K. E.; STABENFELDT, G. H. Follicular Function in the Domestic Cat as Determined by in Plasma : Relation to Estrous Behavior and Cornification of the days. **Biology of Reproduction**, p. 953–963, 1979.

SHIRAISHI, S. et al. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the human placenta. **Placenta**, v. 17, n. 2–3, p. 111–121, 1996.

SHIRSHEV, S. V. et al. The effect of kisspeptin on the functional characteristics of isolated NK cells. **Doklady Biological Sciences**, v. 464, n. 1, p. 267–269, 2015.

SI, L. et al. The effects of interferon-gamma (INF-γ) on the expression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in uterus, ovaries and peripheral blood of rats in early pregnancy. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 66, p. 15011–15016, 2011.

SIEMIENIUCH, M. J. et al. Steroidogenic capacity of the placenta as a supplemental source of progesterone during pregnancy in domestic cats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, p. 1–10, 2012.

SILVA, J. F. et al. Fetal growth restriction in hypothyroidism is associated with changes in proliferative activity, apoptosis and vascularisation of the placenta. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 7, p. 923–931, 2012.

SILVA, J. F. **Efeitos dos hormônios tireoidianos na cinética de migração das células trofoblásticas e no perfil endócrino, angiogênico e imune da placenta**

de ratas e na expressão gênica das células trofoblásticas de camundongo. Belo Horizonte: Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Maternal thyroid dysfunction affects placental profile of inflammatory mediators and the intrauterine trophoblast migration kinetics. **Reproduction**, v. 147, n. 6, p. 803–816, 2014.

SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Spatiotemporal expression profile of proteases and immunological, angiogenic, hormonal and apoptotic mediators in rat placenta before and during intrauterine trophoblast migration. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 9, p. 1774, 2017.

SILVA, J. F.; SERAKIDES, R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. **Cell Adhesion and Migration**, v. 10, n. 1–2, p. 88–110, 2016.

SILVA, S. C. B. et al. Indução de ovulação com swab vaginal em gatas domésticas e seus efeitos sobre a morfologia uterina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, n. 0, p. 1–10, 2017.

SLUKVIN, I. I.; BREBURDA, E. E.; GOLOS, T. G. Dynamic changes in primate endometrial leukocyte populations: Differential distribution of macrophages and natural killer cells at the rhesus monkey implantation site and in early pregnancy. **Placenta**, v. 25, n. 4, p. 297–307, 2004.

SMITH, J. T. et al. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. **Endocrinology**, v. 146, n. 9, p. 3686–3692, 2005.

SMITH, S. K. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 5, p. 509–519, 1998.

SMITH, S. K. Angiogenesis and reproduction. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 108, n. 8, p. 777–783, 2001.

SONIGO, C. et al. Hyperprolactinemia-induced ovarian acyclicity is reversed by kisspeptin administration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 10, p. 3791–3795, 2012.

SOUFLA, G. et al. VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix. **Cancer Letters**, v. 221, n. 1, p. 105–118, 2005.

STEWART, C. L. et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. **Nature**, v. 359, n. 6390, p. 76–79, 1992.

STEWART, C. L. Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, n. 2, p. 233–238, out. 1994.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 1, p. 117–149, 2007.

SULLIVAN-PYKE, C. et al. Kisspeptin as a new serum biomarker to discriminate miscarriage from viable intrauterine pregnancy. **Fertility and Sterility**, v. 109, n. 1, p.

137- 141.e2, 2018.

TAGLINGER, K. et al. Quantitative real-time RT-PCR measurement of cytokine mRNA expression in the skin of normal cats and cats with allergic skin disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 122, n. 3–4, p. 216–230, 2008.

TANIGUCHI, Y. et al. Intra-follicular kisspeptin levels are related to oocyte maturation and gonadal hormones in patients who are undergoing assisted reproductive technology. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 16, n. 4, p. 380–385, 1 out. 2017.

TANYAPANYACHON, P. et al. Validation of commercially available EIA kit for measurement of feline plasma kisspeptin. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, n. 3, p. 209–215, 2019.

TANYAPANYACHON, P.; AMELKINA, O.; CHATDARONG, K. The expression of kisspeptin and its receptor in the domestic cat ovary and uterus in different stages of the ovarian cycle. **Theriogenology**, v. 117, p. 40–48, 2018.

TASAKI, Y. et al. Expression of VEGF and Its Receptors in the Bovine Endometrium Throughout the Estrous Cycle: Effects of VEGF on Prostaglandin Production in Endometrial Cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, p. 223–229, 2010.

TAYLOR, J. et al. Kisspeptin/KISS1R signaling potentiates extravillous trophoblast adhesion to type-I collagen in a PKC- and ERK1/2-dependent manner. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 1, p. 42–54, 1 jan. 2014.

TERAO, Y. et al. Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1678, n. 2–3, p. 102–110, 2004.

TIMOLOGOU, A. et al. Immunohistochemical expression pattern of metastasis suppressors KAI1 and KISS1 in endometriosis and normal endometrium. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 199, p. 110–115, 2016.

TODER, V. et al. TNF-α in pregnancy loss and embryo maldevelopment: A mediator of detrimental stimuli or a protector of the fetoplacental unit? **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 20, n. 2, p. 73–81, 2003.

TORRICELLI, M. et al. Changes of placental kiss-1 mRNA expression and maternal/cord kisspeptin levels at preterm delivery. **Reproductive Sciences**, v. 15, n. 8, p. 779–784, 2008.

TORRY, D. S. et al. Angiogenesis in implantation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 24, n. 7, p. 303–315, 2007.

TREMAINE, T. D.; FOULADI-NASHTA, A. A. Immunolocalization of angiogenic growth factors in the ovine uterus during the oestrus cycle and in response to Steroids. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 3, p. 667–679, 2018.

TSUTSUI, T. et al. The role of the ovary for the maintenance of pregnancy in cats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. SUPPL. 2, p. 120–124, 2009.

URIBE-VELÁSQUEZ, L. F. et al. Respostas Endócrinas e Ovarianas Associadas

com o Folículo Dominante da Primeira Endocrine and Ovarian Response Associated with the First-Wave Follicle Dominant in Sheep Synchronized either CIDR or PGF 2α. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 944–953, 2002.

VERHAGE, H. G. et al. The postovulatory cat oviduct and uterus: Correlation of morphological features with progesterone receptor levels. **The Anatomical Record**, v. 208, n. 4, p. 521–531, 1984.

VERHAGE, H. G.; BEAMER, N. B.; BRENNER, R. M. Plasma Levels of Estradiol and Progesterone in the Cat During Polyestrus, Pregnancy and Pseudopregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 14, n. 5, p. 579–585, 1976.

VINATIER, D. et al. Immunological aspects of ovarian function: role of the cytokines. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 63, p. 155–168, 1995.

VUCKOVIC, M. et al. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor, KDR, in human placenta. **Journal of Anatomy**, v. 188, n. Pt 2, p. 361–366, 1996.

WADA, S. et al. Macrophage migration inhibitory factor in the human ovary: Presence in the follicular fluids and production by granulosa cells. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 41, n. 4, p. 805–814, 1997.

WADA, S. I. et al. Induction of macrophage migration inhibitory factor in human ovary by human chorionic gonadotrophin. **Human Reproduction**, v. 14, n. 2, p. 395–399, 1999.

WANG, H. Z. et al. Inhibitory effect of interferon and tumor necrosis factor on human luteal function in vitro. **Fertility and Sterility**, v. 58, n. 5, p. 941–945, 1992.

WEST, B.; VERHAGE, G.; BRENNER, M. Changes in Nuclear Estradiol Receptor and Cell Structure During Estrous Cycles and Pregnancy in the Oviduct and Uterus of Cats. **Biology of Reproduction**, v. 17, p. 138–143, 1977.

WESTON, G.; ROGERS, P. A. W. Endometrial angiogenesis. **Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 14, n. 6, p. 919–936, 2000.

WILDT, D. E.; SEAGER, S. W. J.; CHAKRABORTY, P. K. Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. **Endocrinology**, v. 107, n. 4, p. 1212–1217, 1980.

WINTHER, H.; AHMED, A.; DANTZER, V. Immunohistochemical Localization of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its Two Specific Receptors, Flt-1 and KDR, in the Porcine Placenta and Non-pregnant Uterus. **Placenta**, v. 20, n. 1, p. 35–43, 1999.

WINTHER, H.; DANTZER, V. Co-localization of vascular endothelial growth factor and its two receptors Flt-1 and KDR in the mink placenta. **Placenta**, v. 22, n. 5, p. 457–465, 2001.

WOLFE, A.; HUSSAIN, M. A. The emerging role(s) for kisspeptin in metabolism in mammals. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. APR, p. 1–10, 2018.

WOODING, P.; BURTON, G. Endotheliochorial Placentation :Cat, Dog, Bat. In: WOODING, P.; BURTON, G. (Eds.). . **Comparative Placentation**. 1ª ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. p. 169–183.

WU, H. M. et al. Kisspeptin regulation of human decidual stromal cells motility via FAK-Src intracellular tyrosine kinases. **Human Reproduction**, v. 34, n. 7, p. 1291–1301, 2019.

WU, S. et al. Expression of kisspeptin/GPR54 and PIBF/PR in the first trimester trophoblast and decidua of women with recurrent spontaneous abortion. **Pathology Research and Practice**, v. 210, n. 1, p. 47–54, 2014.

WULFF, C. et al. Angiogenesis in the human corpus luteum: Localization and changes in angiopoietins, Tie-2, stud vascular endothelial growth factor messenger ribonuclelc acid. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 11, p. 4302–4309, 2000.

WULFF, C. et al. Angiogenesis in the human corpus luteum: Simulated early pregnancy by HCG treatment is associated with both angiogenesis and vessel stabilization. **Human Reproduction**, v. 16, n. 12, p. 2515–2524, 2001.

XIAO, Y. et al. Effects of kisspeptin-10 on progesterone secretion in cultured chicken ovarian granulosa cells from preovulatory (F 1-F 3) follicles. **Peptides**, v. 32, n. 10, p. 2091–2097, 2011.

YAMAMOTO, S. et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. **Gynecological Endocrinology**, v. 11, n. 6, p. 371–381, 1997.

YAN, Z. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in luteinized human granulosa cells in vitro. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 77, n. 6, p. 1723–1726, 1993.

ZENG, F. Y. et al. The Major Binding Protein of the Interferon Antagonist Sarcolectin in Human Placenta is a Macrophage Migration Inhibitory Factor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 1, p. 74–80, 1993.

ZHANG, J. et al. Toll-like receptor 3 agonist enhances IFN-γ and TNF-α production by murine uterine NK cells. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 5, p. 588–596, 2007.

ZHANG, P. et al. Expression and function of kisspeptin during mouse decidualization. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–8, 2014.

ZHOU, Q. et al. High-fat diet decreases the expression of Kiss1 mRNA and kisspeptin in the ovary, and increases ovulatory dysfunction in postpubertal female rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 127, 2014.

ZSCHOCKELT, L. et al. Corpora lutea of pregnant and pseudopregnant domestic cats reveal similar steroidogenic capacities during the luteal life span. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 144, n. PART B, p. 373–381, 2014.

APÊNDICE I

Processamento histológico – Inclusão em parafina

- Álcool 70% (pelo menos 2 horas)
- Álcool 80% (2 horas);
- Álcool 90% (2 horas);
- Álcool Absoluto I (2 horas);
- Álcool Absoluto II (2 horas);
- Xileno (20 minutos);
- Banho de parafina (30 minutos);
- Emblocamento.

APÊNDICE II

Protocolo - Coloração por Hematoxilina e Eosina

- Xileno I (20 min);
- Xileno II (20 min);
- Álcool Absoluto I (5 min);
- Álcool Absoluto II (5 min);
- Álcool Absoluto III (5 min);
- Álcool 90% (5 min);
- Álcool 80% (5 min);
- Álcool 70% (5 min);
- Água destilada (3 min);
- Hematoxilina (40 seg);
- Água corrente (10 min);
- Eosina (20 seg);
- Água corrente (1 min);
- Álcool 90% (5 min);
- Álcool Absoluto I (10 min);
- Álcool Absoluto II (10 min);
- Álcool Absoluto III (10 min);
- Xileno I (10 min);
- Xileno II (10 min);
- Montagem da lâmina.

APÊNDICE III

Imunohistoquímica

1º DIA

- Xileno I (60 min);
- Xileno II (60 min);
- Álcool Absoluto I (5 min);
- Álcool Absoluto II (5 min);
- Álcool Absoluto III (5 min);
- Álcool 90% (5 min);
- Álcool 80% (5 min);
- Álcool 70% (5 min);
- Água corrente (5 min);

- Banho-maria a 98º C (tampão citrato pH 6,0) (20 min dentro e 20 min na temperatura ambiente);

Tampão Citrado:
1,05 g de ácido cítrico + 500 mL de dH_2O (água destilada)
Obs.: ajustar o pH para 6,0

- PBS (5 min);
- PBS (5 min);
- PBS (5 min);

PBS:
1 L de dH_2O + 7,2 g de NaCL + 0,43 g de fosfáto de sódio monobásico + 1,48 g de fosfato de sódio dibásico
Obs.: ajustar o pH para 7,2

- Bloqueio da peroxidase (30 min - no escuro);

Bloqueio peroxidase
6 mL de H_2O_2 + 194 mL de metanol
Obs.: preparo de solução deve ser no momento do uso

- PBS (5 min);
- PBS (5 min);
- Soro bloqueio (30 min) – câmara úmida à temperatura ambiente;
- Anticorpo primário (*overnight*) – câmara úmida na geladeira;

2º DIA

- PBS (5 min);

- PBS (5 min);
- PBS (5 min);

- Anticorpo secundário (45 min) – câmara úmida à temperatura ambiente;

- PBS (5 min);
- PBS (5 min);
- PBS (5 min);

- Estreptovidina-peroxidase (30 min) - (câmara úmida à temperatura ambiente);

- PBS (5 min);
- PBS (5 min);
- PBS (5 min);

- **DAB**;

Diluição:
500 µL de diluente para 25 µL de DAB (1:20).
Obs.: O tempo do DAB varia de acordo com o anticorpo

- Água corrente (10 min);
- Hematoxilina (60 seg);
- Água corrente (10 min);
- Álcool 70% (3 min);
- Álcool 80% (3 min);
- Álcool 90% (3 min);
- Álcool Absoluto I (15 min);
- Álcool Absoluto II (15 min);
- Álcool Absoluto III (15 min);
- Xileno I (10 min);
- Xileno I (10 min);
- Montagem da lâmina.

APÊNDICE IV

Extração de RNA com Trizol

- Homogeneizar o fragmento de tecido em eppendorfe de 1,5 ml com 500 µL de Trizol com o uso de um homogeinizador;
- Adicionar mais 500 µL de Trizol no eppendorfe e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente;
- Adicionar 200 µL de clorofórmio/eppendorfe, agitar vigorosamente, incubar por 3 minutos no gelo;
- Centrifugar por 15 minutos a 12000g (4ºC);
- Transferir a fase aquosa para outro eppendorfe;
- Adicionar 500 µL de isopropanol e incubar por 30 minutos a - 80ºC;
- Descongelar no gelo e centrifugar por 10 minutos a 12000g (4ºC);
- Retirar o sobrenadante e colocar em outro eppendorfe. Acondicionar o pellet no gelo e centrifugar o sobrenadante por 10 min a 12000g (4ºC);
- Descartar o sobrenadante e lavar os pellets com 1 ml de etanol 75%;
- Centrifugar por 5 minutos a 10500g (4ºC);
- Secar o pellet por 5 minutos;
- Dissolver o pellet em água DEPC (20 µl);
- Colocar todos os tubos no termobloco a 56ºC durante 10 minutos (para solubilizar o RNA);
- Dosar o RNA em Nanodrop.

Obs.: Estocar o RNA a -80ºC.