



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ACÁCIA EDUARDA DE JESUS NASCIMENTO

**PERFIL DE EXPRESSÃO DOS RECEPTORES PARA
ESTEROIDES SEXUAIS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO
ÚTERO E PLACENTA DE GATAS DOMÉSTICAS CÍCLICAS,
GESTANTES E COM PIOMETRA**

ILHÉUS – BAHIA

2022

ACÁCIA EDUARDA DE JESUS NASCIMENTO

**PERFIL DE EXPRESSÃO DOS RECEPTORES PARA
ESTEROIDES SEXUAIS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO
ÚTERO E PLACENTA DE GATAS DOMÉSTICAS CÍCLICAS,
GESTANTES E COM PIOMETRA**

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

Linha de pesquisa: Clínica e Sanidade Animal

Subárea: Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Juneo Freitas Silva

ILHÉUS – BAHIA

2022

N244

Nascimento, Acácia Eduarda de Jesus.

Perfil de expressão dos receptores para esteroides sexuais e enzimas antioxidantes no útero e placenta de gatas domésticas cíclicas, gestantes e com piometra / Acácia Eduarda de Jesus Nascimento. – Ilhéus, BA: UESC, 2022.

91f. : il.

Orientador: Juneo Freitas Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA.

Inclui referências e apêndices.

1. Gatos – Doenças. 2. Endométrio. 3. Inflamação. 4. Estrógeno – Receptores. 5. Trofoblasto. I. Título.

CDD 636.80896

ACÁCIA EDUARDA DE JESUS NASCIMENTO

**PERFIL DE EXPRESSÃO DOS RECEPTORES PARA ESTEROIDES SEXUAIS E
ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO ÚTERO E PLACENTA DE GATAS
DOMÉSTICAS CÍCLICAS, GESTANTES E COM PIOMETRA**

Ilhéus – BA, 30/06/2022

Dr. Juneo Freitas Silva
UESC/DCB (Orientador)

Dr^a. Fabiana Lessa Silva
UESC/DCAA

Dr^a. Paola Pereira das Neves Snoeck
UESC/DCAA

Dr. Enrrico Bloise
UFMG/ICB

**ILHÉUS – BAHIA
2022**

Dedico a meus pais, que sempre souberam que eu estaria aqui hoje.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido viver todos esses momentos maravilhosos, por ter me segurando nas minhas duas mãos e guiado os meus pés; por todo o suporte e livramentos em todos os momentos. Muito obrigada por tudo, principalmente por me mimar com pessoas tão especiais.

A minha mainha (Antonita), minha coroa crossfiteira, por todo o suporte, paciência e apoio. A painho (Sérgio), o boyzinho que uma vez me ensinou que quando queremos muito uma coisa o universo se dobra para que possamos realizar. Realmente funciona. Agradeço por estarem sempre orando pela minha vida. Só estou hoje aqui por conta disso. Agradeço pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em meus sonhos, mesmo quando eles estão a mais de 400km de casa.

Agradeço às minhas irmãs, Safira e Laiana, pela parceria, companhia e cumplicidade em todos os momentos, mesmo quando estou insuportável. Vocês melhoram sempre o meu dia, amo vocês e nosso trio de três espãs demais (eu sou a Sam, ok?). É uma honra enorme ter crescido (e continuar crescendo) com vocês.

Agradeço a Gabi, Tita e Lari por todo carinho, compreensão e amor. Obrigada por todos os momentos de conversa, encontros relâmpagos (“gente tô indo aí em SAA só esse fim de semana”), paciência, companheirismo e amizade. Amo muito vocês e há sempre um lugar com muito carinho no meu coração.

Agradeço ao professor Juneo, por ter me orientado e me introduzido nesse novo mundo da patologia bem diferente do que eu estava acostumada, por toda a paciência do mundo e, principalmente, por acreditar na minha capacidade. Obrigada de coração.

Agradeço a todos do grupo NuRE, por terem me recebido com todo o carinho e atenção, por toda a paciência e amizade, muito obrigada Jeane, Bianca, Adriana, Luciana, Letícia, Brenda, Thayná, Erikles, Isabela, Natália, Cibele, Larissa, em especial agradeço a Emilly e Maria, por toda ajuda e suporte. Agradeço a Luciano (imagine a figurinha da galinha preta bem aqui), por toda ajuda, companheirismo e, em particular, principalmente, por toda a paciência e todo o suporte nos momentos mais difíceis.

Agradeço a Gisele, Thayná e Adriana por todo o companheirismo nas aulas de Histopatologia, por todo carinho e paciência.

Agradeço a Ivo, Dona Jaci, Jamilye, Lane e a todos os demais funcionários da UESC, pelo suporte e ajuda.

Agradeço a todos os professores que me acompanharam nesta longa jornada de formação acadêmica, obrigada pela paciência e solicitude.

Agradeço a todos da igreja PIBLN, por todo suporte em oração e por transmitirem os cultos online.

Agradeço à Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por todo apoio, suporte e infraestrutura.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço a todas as pessoas, em geral, que tive o prazer de conhecer durante essa jornada, muito obrigada. Agradeço por toda ajuda, compreensão e amizade.

“Mas Ele me disse: "Minha graça é suficiente para você, pois o meu poder se aperfeiçoa na fraqueza”

2 Coríntios 12:9

PERFIL DE EXPRESSÃO DOS RECEPTORES PARA ESTEROIDES SEXUAIS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO ÚTERO E PLACENTA DE GATAS DOMÉSTICAS CÍCLICAS, GESTANTES E COM PIOMETRA

RESUMO

Os esteroides sexuais e as enzimas antioxidantes são importantes no desenvolvimento sexual feminino e modulação adequada do ciclo estral, gestação e desenvolvimento fetal. Por isso, alterações na sua sinalização ou expressão estão associadas a disfunções reprodutivas e doenças gestacionais. Entretanto, a literatura carece de estudos sobre o perfil de expressão espaço-temporal dos receptores para esteroides sexuais e enzimas antioxidantes no sistema genital de animais domésticos em condições fisiológicas e patológicas, principalmente na gata doméstica. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de expressão de receptores para hormônios sexuais e enzimas antioxidantes no útero e placenta de gatas domésticas cíclicas, gestantes e com piometra. Foram utilizados 37 animais e após avaliação clínica, histopatológica e do perfil plasmático de progesterona (P_4) e estradiol (E_2), foram divididos nos seguintes grupos experimentais: 1) proestro/estro (N=6); 2) diestro (N=7), 3) anestro (N=6); 4) piometra (N=5); 5) Meio da gestação (N=7); 6) Final da gestação (N=6) (CEUA 029/21). Amostras de útero e placenta foram coletadas durante a ovariectomia e submetidas a avaliação proteica e gênica da expressão dos receptores para estradiol ($ER\alpha$), progesterona (PR) e androgênio (AR) e de enzimas antioxidantes (SOD1, CAT e GPX1) por imuno-histoquímica e qPCR. Os dados foram avaliados pelo teste Student–Newman–Keuls (SNK) ou teste t de Student. Em relação ao ciclo estral, o útero de gatas em diestro apresentou menor expressão gênica e proteica de $ER\alpha$ e PR comparado ao proestro/estro e anestro, diferente de catalase e SOD1 que apresentaram maior expressão no diestro ($P<0.05$). Gatas com piometra apresentaram aumento da expressão gênica e proteica uterina de $ER\alpha$, PR e GPX ($P<0.05$), enquanto ocorreu redução significativa da expressão proteica de catalase. Em gatas gestantes, houve aumento da expressão uterina de $ER\alpha$, *Pr* e *Sod1*, principalmente no meio da gestação, comparado a gatas em diestro não gestacional, enquanto houve redução da imunomarcagem endometrial de catalase ($P<0.001$). Na placenta houve maior expressão de mRNA de *Era*, *Pr*, *Ar* e *Gpx1* ao final da gestação em relação ao meio da gestação ($P<0.05$), enquanto catalase apresentou expressão fraca ou nula no meio e final da gestação. Conclui-se que a expressão uterina dos receptores para esteroides sexuais, principalmente $ER\alpha$ e PR, e enzimas antioxidantes são modulados pelo ciclo estral e pela piometra em gatas domésticas. Além disso, a gestação aumenta a expressão uterina de $ER\alpha$, *Pr* e *Sod1* em gatas, enquanto há aumento da expressão gênica placentária de *Era*, *Pr*, *Ar* e *Gpx1* no final da gestação.

Palavras-Chave: Endométrio; Estrógeno; Inflamação; Receptor; Superóxido dismutase; Trofoblasto; Gato.

EXPRESSION PROFILE OF RECEPTORS FOR SEX STEROIDS AND ANTIOXIDANT ENZYMES IN THE UTERUS AND PLACENTA OF CYCLIC DOMESTIC CATS, PREGNANT AND WITH PYOMETRA

ABSTRACT

Sex steroids and antioxidant enzymes are important in female sexual development and proper modulation of the estrous cycle, pregnancy and fetal development. Therefore, alterations in its signaling or expression are associated with reproductive dysfunctions and gestational diseases. However, the literature lacks studies on the spatiotemporal expression profile of receptors for sex steroids and antioxidant enzymes in the genital system of domestic animals under physiological and pathological conditions, especially in the domestic cat. Thus, the aim of this study was to evaluate the expression profile of receptors for sex hormones and antioxidant enzymes in the uterus and placenta of cyclic, pregnant cats and of those with pyometra. Thirty-seven animals were used and after clinical, histopathological and progesterone (P₄) and estradiol (E₂) plasma profile evaluation, they were divided into the following experimental groups: 1) proestrus/estrus (N=6); 2) diestrus (N=7); 3) anestrus (N=6); 4) pyometra (N=5); 5) mid pregnancy (N=7); 6) late pregnancy (N=6) (CEUA 029/21). Uterine and placenta samples were collected during ovariohysterectomy and subjected to protein and gene evaluation of the estradiol (ER α), progesterone (PR) and androgen (AR) receptors and of antioxidant enzymes (SOD1, CAT and GPX1) by immunohistochemistry and qPCR. Data were evaluated using the Student–Newman–Keuls (SNK) test or Student's t test. Regarding the estrous cycle, the uterus of cats in diestrus showed lower gene and protein expression of ER α and PR compared to proestrus/estrus and anestrus, different from catalase and SOD1, which showed higher expression in diestrus (P<0.05). Cats with pyometra showed increased gene and protein uterine expression of ER α , PR and GPX (P<0.05), while there was a significant reduction in catalase protein expression. In pregnant cats, there was an increase in the uterine expression of ER α , *Pr* and *Sod1*, mainly in the mid pregnancy, compared to cats in non-gestational diestrus, while there was a reduction in catalase endometrial immunostaining (P<0.001). In the placenta, there was higher expression of mRNA of *Era*, *Pr*, *Ar* and *Gpx1* in the late pregnancy in relation to the mid pregnancy (P<0.05), while catalase showed weak or null expression in the mid and late pregnancy. It is concluded that the uterine expression of sex steroid receptors, mainly ER α and PR, and antioxidant enzymes are modulated by the estrous cycle and by pyometra in domestic cats. Furthermore, pregnancy increases the uterine expression of ER α , *Pr* and *Sod1* in cats, while there is an increase in the placental gene expression of *Era*, *Pr*, *Ar* and *Gpx1* at the late pregnancy.

Key words: Endometrium; Estrogen; Inflammation; Receptor; Superoxide dismutase; Trophoblast; Cat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representativo do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em gatas. O aumento da luminosidade diminui a secreção de melatonina pela pineal e, conseqüentemente, aumenta a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). O GnRH estimula a adenohipófise a liberar os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) que estimulam a produção e secreção de estrogênio e progesterona pelos ovários.....24

Figura 2- Histologia da placenta de gatas com aproximadamente 30 dias de gestação. A-D) Organização lamelar da placenta (A) evidenciando três camadas ou zonas distintas: a zona lamelar (ZL) (B) formada por projeções uterinas revestidas pelo citotrofoblasto e sinciotrofoblasto em forma de lamelas; zona juncional (ZJ) (C) composta por células colunares e com microvilosidades; e a zona glandular (ZG) (D) composta por glândulas endometriais (Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μ m).....30

Figura 3- Esquema representativo da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e sua interação com a primeira linha de defesa antioxidante enzimática. O ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) é produzido por meio de uma interação com um único elétron, e consiste na principal etapa na formação de ROS's. A partir da catalização por meio do óxido nítrico sintase (NOS), a L-arginina produz óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), que por sua vez, interage com o $\bullet\text{O}_2^-$ resultando na formação do peroxinitrito (ONOO^-); quando há íons ferro (Fe^+) livre, o superóxido e o peróxido de hidrogênio podem interagir na reação de Haber-Weiss gerando um radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$). A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do superóxido, produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que poderá ser posteriormente convertida em moléculas de água (H_2O) e oxigênio (O_2) pela catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX). A GPX realiza na sua função por meio da oxidação da glutathiona reduzida (GSH), transformando-a em glutathiona oxidada (GSSG). A redução da GSSG é dada pela a glutathiona redutase (GSR) que utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) como agente redutor. Adaptado de AL-GUBORY e colaboradores (2012).....36

Figura 4- Expressão de $\text{ER}\alpha$ no útero de gatas hígdas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de $\text{ER}\alpha$ no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcção em pixels da expressão de $\text{ER}\alpha$ no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 6). D) Porcentagem de células imunomarcadas para $\text{ER}\alpha$ no epitélio luminal e glandular, estroma e miométrio. E) Expressão gênica relativa do *Era* no endométrio (média \pm SEM; n = 5-6). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001. P/E= proestro/estro; D= diestro; A= anestro; EL= epitélio luminal; EGS= epitélio glandular superficial; EGP= epitélio glandular profundo; CE= células estromais; CM= células miometriais.54

Figura 5- Expressão de PR no útero de gatas hígdas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de PR no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcção em pixels da expressão de PR no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 6). D) Porcentagem de células imunomarcadas para PR no epitélio luminal e glandular, estroma e miométrio. E) Expressão gênica relativa de *Pr* no endométrio (média \pm SEM; n = 5-6). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001. P/E= proestro/estro; D= diestro; A=

anestro; EL= epitélio luminal; EGS= epitélio glandular superficial; EGP= epitélio glandular profundo; CE= células estromais; CM= células miometriais.....55

Figura 6- Expressão de AR no útero de gatas híidas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de AR no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcção em pixels da expressão de AR no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 6). D) Expressão gênica relativa de *Ar* no endométrio (média \pm SEM; n = 5-6). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK; P/E= proestro/estro; D= diestro; A= anestro.....56

Figura 7- Expressão de SOD1 no útero de gatas híidas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de SOD1 no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcção em pixels da expressão de SOD1 no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 6). D) Expressão gênica relativa de *Sod1* no endométrio (média \pm SEM; n = 5-6). E-G) Correlação gênica da expressão de *Sod1* com *Pr* (E), *Era* (F) e *Ar* (G) no endométrio. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05. P/E= proestro/estro; D= diestro; A= anestro.....57

Figura 8- Expressão de catalase no útero de gatas híidas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de catalase no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcção em pixels da expressão de catalase no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 6). D) Expressão gênica relativa de *Cat* no endométrio (média \pm SEM; n = 5-6). E-G) Correlação gênica da expressão de *Cat* com *Era*, *Pr* e *Ar* no endométrio. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 ****P < 0,0001. P/E= proestro/estro; D= diestro; A= anestro.....58

Figura 9- Expressão de GPX no útero de gatas híidas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de GPX1/2 no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcção em pixels da expressão de GPX1/2 no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 6). D) Expressão gênica relativa de *Gpx1* no endométrio (média \pm SEM; n = 5-6). E-G) Correlação gênica da expressão de *Gpx1* com *Era*, *Pr* e *Ar* no endométrio. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05. P/E= proestro/estro; D= diestro; A= anestro.....59

Figura 10- Expressão de Era, PR e AR no útero de gatas híidas em diestro e com piometra. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de ER α , PR e AR no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcção em pixels da expressão de ER α , PR e AR no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 4-6). D) Expressão gênica relativa de *Era*, *Pr* e *Ar* no endométrio (média \pm SEM; n = 4-6). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.....60

Figura 11- Expressão de SOD1, catalase e GPX no útero de gatas híidas em diestro e com piometra. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de SOD1, CAT e GPX1/2 no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcção em pixels da expressão de SOD1, CAT e GPX1/2 no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 4-6). D) Expressão gênica relativa de *Sod1*,

Cat e *Gpx1* no endométrio (média±SEM; n = 4-6). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01.....61

Figura 12- Expressão de ERα, PR e AR no útero de gatas em diestro não gestacional e de gatas no meio e final da gestação. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de ERα, PR e AR no endométrio. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μm). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de ERα, PR e AR no endométrio. C) Expressão gênica relativa de *Era*, *Pr* e *Ar* no endométrio (média±SEM; n = 4-6). D-E) Porcentagem de células imunomarcadas para ERα (D) e PR (E) no epitélio luminal e glandular, estroma e miométrio. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001. EL= epitélio luminal; EGS= epitélio glandular superficial; EGP= epitélio glandular profundo; CE= células estromais; CM= células miometriais.....62

Figura 13- Expressão proteica de ERα, PR e AR no miométrio de gatas no diestro não gestacional, meio e final da gestação. A) Fotomicrografias de marcação imuno-histoquímica de ERα, PR e AR no miométrio. B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de ERα, PR e AR no miométrio (média±SEM; n = 6) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μm).....63

Figura 14- Expressão de SOD1, catalase e GPX no útero de gatas em diestro não gestacional e de gatas no meio e final da gestação. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de SOD1, catalase e GPX1/2 no endométrio. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μm). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de SOD1, catalase e GPX1/2 no endométrio. C) Expressão gênica relativa de *Sod1*, *Cat* e *Gpx1* no endométrio (média±SEM; n = 4-6). D-L) Correlação gênica da expressão de *Sod1*, *Cat* e *Gpx1* com *Era*, *Pr* e *Ar* no endométrio. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, ***P < 0,001, ****P < 0,0001.....65

Figura 15- Expressão proteica SOD, catalase e GPX1/2 no miométrio de gatas no diestro não gestacional, meio e final da gestação. A) Fotomicrografias de marcação imuno-histoquímica de SOD, catalase (CAT) e GPX1/2 no miométrio. B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de SOD, CAT e GPX1/2 no miométrio (média±SEM; n = 6) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μm).66

Figura 16- Expressão de ERα, PR e AR na placenta de gatas no meio e final da gestação. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de ERα, PR e AR na placenta. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μm). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de ERα, PR e AR na placenta. C) Expressão gênica relativa de *Era*, *Pr* e *Ar* na placenta (média±SEM; n = 6). D-E) Porcentagem de células imunomarcadas para ERα (D) e PR (E) no citotrofoblasto, sinciotrofoblasto e células gigantes decíduais. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01, ****P < 0,0001. CTB = citotrofoblasto; STB = sinciotrofoblasto; CD = células gigantes decíduais.....68

Figura 17- Expressão de SOD1, catalase e GPX na placenta de gatas no meio e final da gestação. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de SOD1, catalase e GPX1/2 na placenta. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μm). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de SOD1, catalase e GPX1/2 na placenta. C) Expressão gênica relativa de *Sod1*, *Cat* e *Gpx1* na placenta (média±SEM; n = 6). D-L) Correlação gênica da expressão de *Sod1*, *Cat* e *Gpx1* com a expressão de *Era*, *Pr* e *Ar* na

placenta. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05. CTB = citotrofoblasto; STB = sinciciotrofoblasto; CD = células gigantes deciduais.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características das fases do ciclo estral na gata doméstica.....	27
Tabela 2- Anticorpos primários utilizados com suas respectivas diluições e tempos de incubação e revelação.....	50
Tabela 3- Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qRT- PCR	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Receptor de andrógeno
CAT	Catalase
CL	Corpo lúteo
E2	Estradiol
ER	Receptor de estradiol
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio regulador de gonadotrofinas
GPX	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSR	Glutaciona redutase
GSSG	Glutaciona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEC	Hiperplasia endometrial cística
LH	Hormônio luteinizante
NO•	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
•O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH•	Hidroxila
ONOO-	Peroxinitrito
P4	Progesterona
PR	Receptor de progesterona
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
ZG	Zona glandular
ZJ	Zona juncional
ZL	Zona lamelar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	22
2.1 Geral	22
2.2 Específicos	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 Reprodução da gata doméstica	23
3.2 Ciclo estral e morfofisiologia reprodutiva da gata	24
3.3 Placenta e placentação	28
3.4 Esteroides sexuais	30
3.4.1 Estradiol.....	31
3.4.2 Progesterona.....	32
3.4.3 Andrógenos.....	33
3.5 Estresse oxidativo e estado redox na morfofisiologia reprodutiva da fêmea	35
3.5.1 Superóxido dismutase (SOD)	37
3.5.2 Catalase (CAT)	38
3.5.3 Glutationa peroxidase (GPX)	39
3.6 ROS no sistema genital feminino	40
3.6.1 ROS nos ovários	41
3.6.2 ROS no útero e placenta	42
3.7 Piometra em gatas domésticas	44
4 CAPÍTULO I	46
4.1 Introdução	46
4.2 Metodologia	47
4.2.1 Delineamento experimental.....	47
4.2.2 Ovariohisterectomia.....	48
4.2.3 Processamento dos tecidos e avaliação histopatológica.....	48
4.2.4 Dosagem hormonal.....	49
4.2.5 Imuno-histoquímica.....	49
4.2.6 PCR em tempo real (qPCR)	51
4.2.7 Análise estatística.....	52
4.3 Resultados	52
4.4 Discussão	69

4.5 Conclusão	76
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	77
APÊNDICE I	88
APÊNDICE II	89
APÊNDICE III	90

1 INTRODUÇÃO

Os hormônios são substâncias especializadas produzidas e liberadas por órgãos endócrinos e alguns neurônios, que agem como mensageiros químicos, controlando as células-alvo por meio de receptores específicos. Na célula-alvo, os hormônios atuam modulando a expressão gênica e, dessa forma, controlando a síntese de determinadas proteínas, catalisando ou retardando reações enzimáticas e/ou controlando o transporte de moléculas na camada celular (COLE; SHORT; HOOPER, 2019). Quimicamente, os hormônios podem ser classificados como esteroidais, amínicos e proteicos, sendo eles derivados do metabolismo de colesterol, da tirosina e de aminoácidos, respectivamente (WUTTKE; JARRY; SEIDLOVA-WUTTKE, 2010).

Os principais hormônios sexuais são a progesterona (P4), o estradiol (E2) e o androgênio, que são fundamentais para o desenvolvimento e função do sistema reprodutor, além de modularem o ciclo estral/menstrual (COLE; SHORT; HOOPER, 2019; DI RENZO; TOSTO; TSIBIZOVA, 2020). Eles são produzidos, em sua maioria, pelos testículos e ovários e, em menor quantidade, pelas glândulas adrenais e placenta (BRAUN *et al.*, 2012; COLE; SHORT; HOOPER, 2019). Falhas na síntese e/ou liberação dos esteroides sexuais, seja por doenças genéticas, infecciosas ou metabólicas, como também na expressão dos seus receptores, são associadas a quadros de infertilidade masculina e feminina ou problemas gestacionais (BULUN, 2014; HAMILTON *et al.*, 2017; PIETTE, 2018; FARR *et al.*, 2019). No entanto, estudos sobre o perfil de expressão dos seus receptores no trato genital de animais domésticos são ainda escassos, principalmente no gato doméstico (AMELKINA *et al.*, 2016).

Os receptores para esteroides sexuais são intracitoplasmáticos, devido à característica lipofílica desses hormônios que ultrapassam facilmente a membrana celular. Ao se ligarem em seus receptores, modulam a transcrição gênica, uma vez que os receptores estão ligados a sequências específicas do DNA (FUENTES; SILVEYRA, 2019). A expressão desses receptores é influenciada pela concentração sérica dos esteroides sexuais, sendo que a liberação destes é regulada pelo eixo hipotálamo-pituitário-gonadal (HPG). Inicialmente, ocorre a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo, que estimula a liberação do hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) pela pituitária anterior. No ovário, sob influência do FSH e LH, ocorre o desenvolvimento e maturação folicular, que envolve a produção de andrógenos e estrógenos pelas células da teca e granulosa, respectivamente. Com a ovulação e formação do corpo lúteo, há produção e manutenção de níveis elevados de progesterona, que irá realizar feedback negativo sobre a liberação das

gonadotrofinas e GnRH (PIETTE, 2018; DI RENZO; TOSTO; TSIBIZOVA, 2020). Caso ocorra a gestação, uma fonte complementar de progesterona, andrógeno e estrógeno será proveniente da placenta e será vital para a modulação do metabolismo materno e sucesso gestacional (BRAUN *et al.*, 2012; PIETTE, 2018; DI RENZO; TOSTO; TSIBIZOVA, 2020).

Estudos sobre a expressão do receptor de P4 (PR) no trato genital de mulheres e cadelas tem sido realizados, principalmente por serem fatores preditivos do câncer de mama, ovário e útero (LEE *et al.*, 2005; KNUTSON *et al.*, 2012; MAX *et al.*, 2015). A deficiência de P4 ou falha na expressão de seus receptores em ratos, camundongos e mulheres está associada à infertilidade, alterações no desenvolvimento do sistema genital, anovulação, nascimento de fetos prematuros, aborto espontâneo, além do desenvolvimento de câncer de ovário e de mama (LYDON *et al.*, 1996; CELLS *et al.*, 1999; ZHENG *et al.*, 2014; MAX *et al.*, 2015). Em gatas, em contrapartida, os estudos são ainda escassos (LI; BOOMSMA; VERHAGE, 1992). Até o momento, por imuno-histoquímica, foi demonstrado somente que a expressão de PR e ER no útero de gatas varia de acordo com a fase do ciclo estral, com o aumento da imunomarcagem na fase de estro e em animais ovariectomizados tratados com E2, enquanto a imunomarcagem reduziu no útero de animais gestantes e em gatas ovariectomizadas tratadas com P4 (LI; BOOMSMA; VERHAGE, 1992).

Em relação aos receptores para estradiol, eles podem ser classificados em ER α , ER β e ER γ ; ER α se localiza principalmente no útero e sistema neuroendócrino e sua ausência está associada à infertilidade total, diferente do ER β que está presente no ovário e animais knockout para esse receptor apresentam apenas subfertilidade (OGAWA *et al.*, 1999; BULUN, 2014). Na deficiência de E2, não somente infertilidade e sobrepeso são observados em mulheres e animais, como também osteoporose em mulheres, roedores, ovelhas e primatas não humanos (OGAWA *et al.*, 1999; MUELLER; KORACH, 2001; BULUN, 2014; KOMORI, 2015; HAMILTON *et al.*, 2017; FARR *et al.*, 2019). No entanto, mesmo a gata sendo uma espécie com ovulação induzida, o que difere de outras espécies animais domésticas e da mulher (BINDER *et al.*, 2019), estudos sobre o perfil de expressão ovariana e placentária de ER α e ER β nessa espécie animal ainda não foi realizado.

Além dos receptores para E2 e P4, os receptores androgênicos (AR) também estão presentes no ovário, tuba uterina, útero e placenta de mulheres, ratas, cadelas, vacas, ovelhas, porcas e macaco-rhesus (VENDOLA *et al.*, 1998; CÁRDENAS; POPE, 2002; VERMEIRSCH *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2013; KHATRI; HOFFMANN; SCHULER, 2013; DUAN *et al.*, 2019), sendo importantes para o desenvolvimento folicular e ovulação (CHANG *et al.*, 2013; ASTAPOVA; MINOR; HAMMES, 2019). Camundongos knockout para AR (ArKO)

apresentam maior atresia folicular e redução da foliculogênese (CHANG, *et al.*, 2013), enquanto a deleção gênica de AR em ratas causou subfertilidade, redução da foliculogênese e da taxa de nascimento (WALTERS; ALLAN; HANDELSMAN, 2008; CHANG *et al.*, 2013).

No entanto, mesmo demonstrando a importância dos esteroides sexuais e seus receptores na função reprodutiva de ratas e camundongos, estudos sobre o seu perfil de expressão no sistema genital de fêmeas domésticas são escassos, principalmente na gata doméstica. O único estudo presente na literatura, realizado por Amelkina e colaboradores em 2016, descreveu a expressão de AR, PR e ER no corpo lúteo de gatas domésticas e felinos silvestres, sugerindo a participação desses receptores na formação, manutenção e regressão luteal.

Além disso, a variação cíclica dos esteroides sexuais, tal como durante o processo de gestação, estimula mudanças no perfil oxidativo no sistema reprodutor feminino (GÓMEZ-ZUBELDIA *et al.*, 2002). A modulação do estado oxidativo e antioxidativo é minuciosamente orquestrado para que processos como a ovulação, preparo do útero para o processo de implantação, gestação e parto possam ocorrer adequadamente.

Já foi demonstrado em humanos que durante a janela de implantação e reestruturação das artérias espirais uterinas, momentos críticos para o sucesso gestacional, é requerido que o útero se apresente em estado pró inflamatório com elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS- *reactive oxygen species*). Os perfis enzimáticos são variáveis de acordo com o hormônio predominante e suas inter-relações durante as fases reprodutivas. Nesse sentido, demonstrou-se que o aumento de estradiol e andrógenos aumenta o estresse oxidativo e diminui a atividade de enzimas antioxidantes como a catalase (CAT) no útero de ratas (GÓMEZZUBELDIA *et al.*, 2002). A progesterona, por outro lado, estimula positivamente a atividade da glutathiona peroxidase (GPX) no útero de roedores (GÓMEZ-ZUBELDIA *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2014).

No entanto, até o momento, avaliação do perfil de enzimas antioxidantes no trato genital de gatas domésticas cíclicas e gestantes ainda não foi realizada. Além disso, até o momento, não há estudos sobre o perfil dos receptores de esteroides sexuais e enzimas antioxidantes em condições inflamatórias uterinas em gatas domésticas, como a piometra (STANLEY; PACCHIANA, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2017; PRAPAIWAN *et al.*, 2017). Embora a piometra seja a principal doença inflamatória do trato genital de cadelas e gatas (STANLEY; PACCHIANA, 2008; PRAPAIWAN *et al.*, 2017), estudos sobre essa condição em gatas são ainda escassos (AGUDELO, 2005; HAGMAN *et al.*, 2014). Em cadelas com piometra, há aumento da expressão de PR, enquanto não ocorre diferença na expressão de ER, sugerindo que

alteração na expressão do receptor para P4 esteja envolvido na patogênese da piometra em cadelas (PRAPAIWAN *et al.*, 2017; MARINKOVIĆ *et al.*, 2018).

Assim, considerando a importância dos receptores para esteroides sexuais e enzimas antioxidantes na fisiologia reprodutiva de fêmeas e em condições patológicas do trato genital, estudar o perfil de expressão de ER, PR, AR, SOD, CAT, GPX no útero e placenta de gatas domésticas é fundamental para conhecer melhor a morfofisiologia reprodutiva desta espécie animal. Além disso, avaliar o envolvimento desses hormônios e enzimas antioxidantes na patogênese da piometra em gatas é importante para a clínica e manejo reprodutivo dessa espécie animal, inclusive por ser modelo de estudo para felídeos silvestres.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o perfil dos receptores para esteroides sexuais e enzimas antioxidantes no útero e placenta de gatas cíclicas, gestantes e com piometra.

2.2 Específicos

- Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica dos receptores para estrógeno (ER α), progesterona (PR) e andrógeno (AR) e das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPX1) no útero de gatas nas diferentes fases do ciclo estral.

- Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica dos receptores para estrógeno (ER α), progesterona (PR) e andrógeno (AR) e das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPX1) no útero de gatas com piometra.

- Avaliar o perfil de expressão gênica e proteica dos receptores para estrógeno (ER α), progesterona (PR) e andrógeno (AR) e das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPX1) na placenta de gatas durante a gestação.

- Avaliar a correlação gênica da expressão dos receptores para esteroides sexuais com as enzimas antioxidantes no útero de gatas ao longo do ciclo estral e na placenta durante a gestação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Reprodução da gata doméstica

Os felídeos compõem uma família de 38 espécies animais, em que apenas o gato doméstico (*Felis catus*) não apresenta risco de extinção (ANDREWS *et al.*, 2019). Devido à possibilidade de comparação com essas outras espécies, a busca por mecanismos envolvidos na reprodução e patogênese das doenças reprodutivas em gatos domésticos apresenta suma importância para a preservação dessas espécies felinas e manutenção da biodiversidade (PELICAN *et al.*, 2006; ANDREWS *et al.*, 2019).

A puberdade nas gatas ocorre entre o 4^o e 12^o mês de idade, sendo essa variação dependente da raça, peso, ambiente social e fotoperíodo, uma vez que esse último afeta a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) (GRIFFIN, 2001). As gatas, semelhante às éguas, cabras e ovelhas, são poliéstricas estacionais por apresentarem fotoperíodo positivo, ou seja, apresentam maior ciclicidade em dias longos com mais de 12 horas de luminosidade natural, como observado durante a primavera e o verão (GRIFFIN, 2001; SAXENA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2006). O aumento da luminosidade diminui a produção e liberação de melatonina pela pineal, regulando positivamente a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo e, conseqüentemente, dos hormônios folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) pela adenohipófise (Figura 1) (VASETSKA; MASS, 2017). No sistema genital feminino, esses hormônios são imprescindíveis para a reprodução e agem estimulando a proliferação e maturação de oócitos durante a foliculogênese, além de induzirem a ovulação e a formação do corpo lúteo (HRYCIUK; JEWGENOW; BRAUN, 2021).

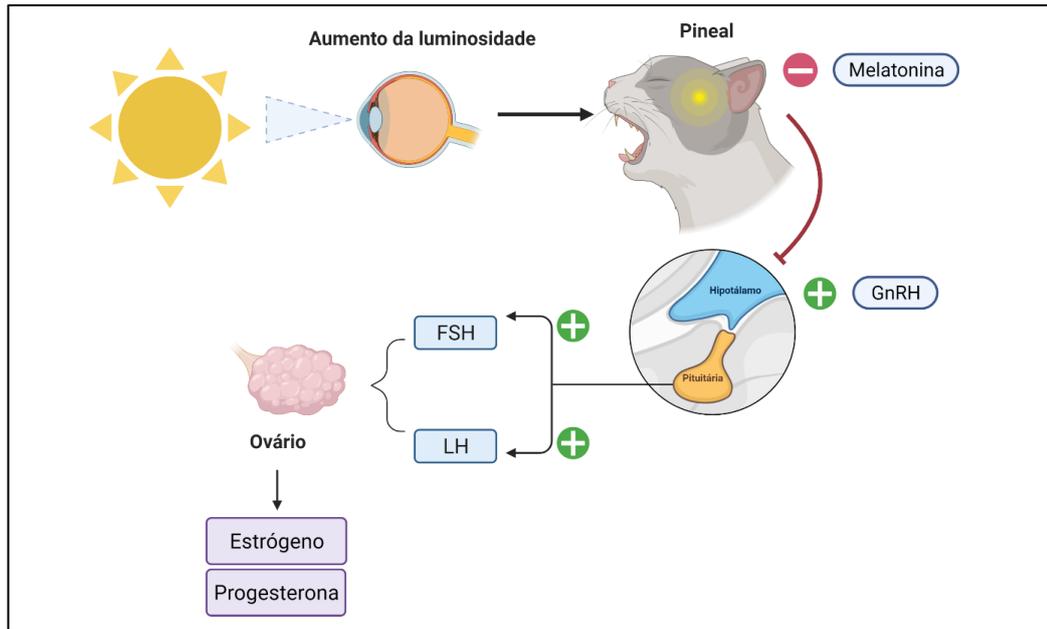


Figura 1- Esquema representativo do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em gatas. O aumento da luminosidade diminui a secreção de melatonina pela pineal e, conseqüentemente, aumenta a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). O GnRH estimula a adenohipófise a liberar os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) que estimulam a produção e secreção de estrogênio e progesterona pelos ovários.

A ovulação nas gatas, diferente do que é observado em outros animais domésticos, é geralmente dependente de estímulos tácteis na vagina e vulva, sendo induzida pelo coito e, menos frequentemente, por meio de estímulos sensoriais como feromônios e/ou estímulos visuais, embora a ovulação espontânea também possa ocorrer (GRIFFIN, 2001; PELICAN *et al.*, 2006; BINDER *et al.*, 2019). Esses estímulos induzem a liberação de GnRH pelo hipotálamo e, secundariamente, o pico pré-ovulatório de LH pela adenohipófise. Estudos demonstraram que a intensidade de liberação do LH e a velocidade do desencadeamento dessa resposta está associada ao maior número de cópulas (GRIFFIN, 2001; BINDER *et al.*, 2019).

3.2 Ciclo estral e morfofisiologia reprodutiva da gata

O ciclo estral da gata pode ser dividido em cinco momentos: proestro, estro, interestro (período sem ovulação entre os estros), diestro (fase luteal) e um período de quiescência reprodutiva (anestro). De acordo com a fase do ciclo estral, modificações estruturais, ultraestruturais e fisiológicas são observadas no útero e nos ovários, que são dependentes dos níveis séricos dos hormônios sexuais (Tabela 1) (GRIFFIN, 2001).

Durante a fase de proestro, que dura em média 1 a 2 dias, ocorre o recrutamento e desenvolvimento dos folículos primários ovarianos, sob a influência do FSH. Os níveis de estradiol (E_2) aumentam gradativamente devido à síntese desse hormônio pelas células da granulosa dos folículos em desenvolvimento. Com a proximidade da fase estral, 3 a 7 folículos tornam-se dominantes, enquanto os demais sofrem atresia. Os folículos ovarianos estão desenvolvidos e aumentados de diâmetro e podem ser observados por meio de ultrassonografia (MALANDAIN *et al.*, 2011). No útero, as glândulas endometriais apresentam epitélio cuboide ou prismático e podem ser observadas hiperplasia e hipertrofia das mesmas. Apesar de ainda não ocorrer aceitação ao macho, comportamentos como afabilidade, vocalização, lordose e esfregar a cabeça e pescoço em objetos podem ser observados devido aos níveis elevados de E_2 (GRIFFIN, 2001).

O estro possui duração média de 7 dias, podendo variar de 6 a 10 dias, e compreende a fase do cio propriamente dita. Nela ocorre receptividade ao macho, associados a comportamentos como vocalização, esfregar a cabeça e pescoço contra objetos, elevação dos quartos traseiros, agachar-se, rolamento e lordose, devido ao aumento das concentrações de E_2 (MALANDAIN *et al.*, 2011). Sob influência do E_2 , ocorre aumento da vascularização do endométrio associado ao aumento da espessura e edema uterino e cervical. Histologicamente, as características histológicas uterinas e ovarianas são semelhantes ao observado na gata durante o proestro (PRAPAIWAN *et al.*, 2017).

Quando não ocorre ovulação durante o estro, a gata entrará na fase denominada interestro, na qual ocorre a diminuição do estradiol para níveis basais, associado à diminuição da atividade ovariana e uterina. Esse período dura em média 7 dias e, após este, a gata volta ao período de proestro, reiniciando o ciclo (MALANDAIN *et al.*, 2011).

O diestro é a etapa do ciclo que ocorre após a ovulação e está associada à gestação, quando há fertilização do oócito e tem duração média de 60 dias, ou ao diestro não gestacional, com duração média de 40 dias. Essa fase ocorre quando a fêmea ovula por estímulo do pico de LH e ocorre modificação e luteinização das células da teca interna e da granulosa, com formação do corpo lúteo (CL) e subsequente produção de progesterona (P_4). As células da granulosa originam as células luteais grandes, enquanto que as células da teca originam as células luteais pequenas (AMELKINA *et al.*, 2015).

Inicialmente, as células do CL podem apresentar diferentes graus de luteinização e apresentam maior eosinofilia. Com o seu amadurecimento, as células aumentam de volume, tornam-se vacuolizadas e são intermeadas por células não luteínicas como macrófagos, leucócitos e fibroblastos (STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007; LIMAN *et al.*, 2012;

AMELKINA *et al.*, 2015). No útero, sob influência da progesterona, ocorre a diminuição da atividade imunológica, fechamento cervical e diminuição da contração miometrial, uma vez que o ambiente uterino se prepara para uma gestação (AGUDELO, 2005). Na mucosa uterina ocorre aumento do pregueamento associado a ramificação, dilatação, hipertrofia e discreta hiperplasia das glândulas endometriais. As células do epitélio luminal uterino apresentam-se com organização simples colunar ou pseudoestratificada (LIMAN *et al.*, 2012).

No final do diestro não gestacional ou no final da gestação, o CL entra em processo de luteólise devido à liberação de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) pelo útero e no próprio CL (SIEMIENIUCH *et al.*, 2014). O CL se modifica estruturalmente para formar o *corpus albicans* (CA), caracterizado por células luteínicas retraídas, vacuolizadas e com núcleos condensados, interpostas por extensa fibroplasia (AMELKINA *et al.*, 2015).

A fase de anestro é observada sazonalmente em dias curtos, em que há uma diminuição da luminosidade e aumento da secreção de melatonina pela pineal. Ela é caracterizada por diminuição da secreção de GnRH, FSH, LH e, conseqüentemente, observa-se baixos níveis basais de E₂ e P₄ (GRIFFIN, 2001). Nessa fase não se observa folículos ovarianos em desenvolvimento, maduros ou CL, e o endométrio apresenta poucas camadas de glândulas e criptas rasas, caracterizando inatividade cíclica (LIMAN *et al.*, 2012).

Tabela 1- Características das fases do ciclo estral na gata doméstica.

	Proestro	Estro	Interestro	Diestro	Anestro	Fonte
Duração (aproximadamente)	1 ou 2 dias	7 dias	7 dias	40 a 60 dias	>100 dias	
Atividade hormonal	Aumento gradual dos níveis de E ₂	Elevadas concentrações de E ₂	Concentrações basais de E ₂ e P ₄	Elevadas concentrações de P ₄ Concentrações baixas a elevadas de E ₂	Níveis basais de E ₂ e P ₄	GRIFFIN, 2001; BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006;
Alterações comportamentais	Afabilidade; Vocalização; Lordose; Esfregar a cabeça e pescoço em objetos; Não há receptividade ao macho;	Receptividade ao macho; Vocalização; Esfregar a cabeça e pescoço contra objetos; Elevação dos quartos traseiros; Agachar-se; Rolamento; Lordose;	Ausência de receptividade ao macho e de comportamento reprodutivo	Nenhuma	Nenhuma	SILVA <i>et al.</i> , 2006; MALANDAIN <i>et al.</i> , 2011
Ovário	Crescimento folicular e maturação dos folículos dominantes		Ausência de CL	Ovulação e formação do CL	Ausência de crescimento folicular e de CL.	BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; REYNAUD <i>et al.</i> , 2009; MALANDAIN <i>et al.</i> , 2011
Útero	Hiperplasia das glândulas endometriais; Aumento da vascularização endometrial		Diminuição da atividade uterina	Hipertrofia e secreção das glândulas endometriais; Vacuolização do epitélio luminal e glandular.	Poucas glândulas endometriais e restritas ao endométrio superficial.	GRIFFIN, 2001; CHATDARONG <i>et al.</i> , 2005

Adaptado de GRIFFIN (2001).

3.3 Placenta e placentação

A placenta é um órgão materno temporário cuja função básica é separar os tecidos maternos e fetais e intermediar a troca de gases, imunoglobulinas e nutrientes entre a mãe e o feto. Além disso, confere proteção ao embrião e possui função endócrina (ROA; SMOK; PRIETO, 2012; LAVANYA; JAYACHITRA; BALASUNDARAM, 2019). De acordo com as suas peculiaridades, a placenta dos mamíferos pode ser classificada de acordo com a sua macroscopia, microscopia, tipo de junção materno-fetal e o fluxo sanguíneo (LEISER; KAUFMANN, 1994; MIGLINO *et al.*, 2006; ROA; SMOK; PRIETO, 2012).

Macroscopicamente, a placenta pode ser difusa ou zonaria, sendo esta última classificada como cotiledonária, anular ou discoidal (BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012). Na placenta difusa, observada em éguas, porcas, camelas e cetáceos, os sítios de interdigitação materno-fetal apresentam-se distribuídos por toda a superfície fetal; na placenta cotiledonária, observada em ruminantes, o contato entre o tecido materno e fetal ocorre por meio dos cotilédones que se unem com as carúnculas, localizadas no endométrio, formando os placentomas; a placenta do tipo discoidal, presente em humanos, primatas e roedores, constitui-se de uma área arredondada e polarizada; a placenta anular, observada na cadela e na gata, distribui-se macroscopicamente em forma de faixa na superfície do endométrio, como um cinturão ao redor do feto (MIGLINO *et al.*, 2006; BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012; ROA; SMOK; PRIETO, 2012).

Histologicamente, a placenta pode ser caracterizada como epiteliochorial, sinepteliochorial, endoteliochorial e hemocorial, a depender da quantidade de camadas teciduais que separam o sangue materno e fetal. As camadas maternas derivam do endométrio e formam a decídua basal, sendo compostas pelos endotélios dos vasos sanguíneos maternos, estroma endometrial e epitélio luminal uterino; enquanto que as camadas de tecido fetal incluem epitélio coriônico ou trofoblástico, tecido mesenquimal fetal e o endotélio dos capilares fetais. Na gata, a placenta caracteriza-se como endoteliochorial, pois o endotélio materno está em contato direto com o epitélio coriônico fetal (MIGLINO *et al.*, 2006; PRIETO; SMOK; ROJAS, 2011; ROA; SMOK; PRIETO, 2012)

De acordo com o tipo de interdigitação materno-fetal, a placenta felina é classificada em lamelar, na qual ocorre interseção entre as dobras do epitélio endometrial e o epitélio coriônico fetal (LEISER; KOOB, 1993; MIGLINO *et al.*, 2006; BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012). O tipo de fluxo sanguíneo na placenta dos carnívoros domésticos é

contracorrente simples, o que potencializa a capacidade de trocas gasosas e depuração de resíduos produzidos pelo feto (LEISER; KOOB, 1993; MIGLINO *et al.*, 2006).

Pesquisas sobre a placenta de carnívoros e seu desenvolvimento tem sido realizadas principalmente em cães, enquanto em gatos ainda há poucos estudos (LAVANYA; JAYACHITRA; BALASUNDARAM, 2019). O desenvolvimento da placenta felina se inicia aproximadamente no vigésimo dia de gestação, a partir do qual se estabelece o contato entre os tecidos materno e fetal (MIGLINO *et al.*, 2006).

Histologicamente, a placenta dos carnívoros é composta de três zonas distintas: zona lamelar, zona juncional e zona glandular (Figura 2). A zona lamelar (ZL) apresenta lamelas que se distribuem paralelamente entre si e perpendiculares ao endométrio. Essas lamelas são formadas por células sincitiotrofoblásticas e citotrofoblásticas e separadas por tecido conjuntivo, onde estão localizados os vasos fetais (LEISER; KOOB, 1993; MIGLINO *et al.*, 2006; LAVANYA; JAYACHITRA; BALASUNDARAM, 2019).

As células trofoblásticas agem como uma interface entre as células decíduais maternas e os capilares fetais. A zona juncional (ZJ) é composta de células colunares altas com microvilosidades na sua superfície e apresenta-se como uma zona intermediária entre a zona lamelar e a glandular. A presença de grandes espaços intercelulares confere a esta camada uma aparência esponjosa. A camada mais externa da placenta é denominada zona glandular (ZG) e está em íntimo contato com o endométrio. Ela é formada por células endometriais glandulares que apresentam citoplasma abundante, núcleo grande e nucléolo proeminente (FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014; LAVANYA; JAYACHITRA; BALASUNDARAM, 2019).

A placenta é um tecido biologicamente ativo que sintetiza e metaboliza carboidratos, ácidos graxos e colesterol e os utiliza como substrato para obtenção de nutrientes e produção de hormônios (SCHROOTS *et al.*, 2018). A função endócrina da placenta é fundamental para a manutenção da gestação, sendo que os hormônios produzidos podem ser quimicamente classificados em peptídicos e esteroidais. Os hormônios esteroidais produzidos e liberados pela placenta são os andrógenos, os estrógenos e a P₄, sendo que todos provêm do metabolismo do colesterol (BRAUN *et al.*, 2012; ROA; SMOK; PRIETO, 2012; MAKIEVA; SAUNDERS; NORMAN, 2014).

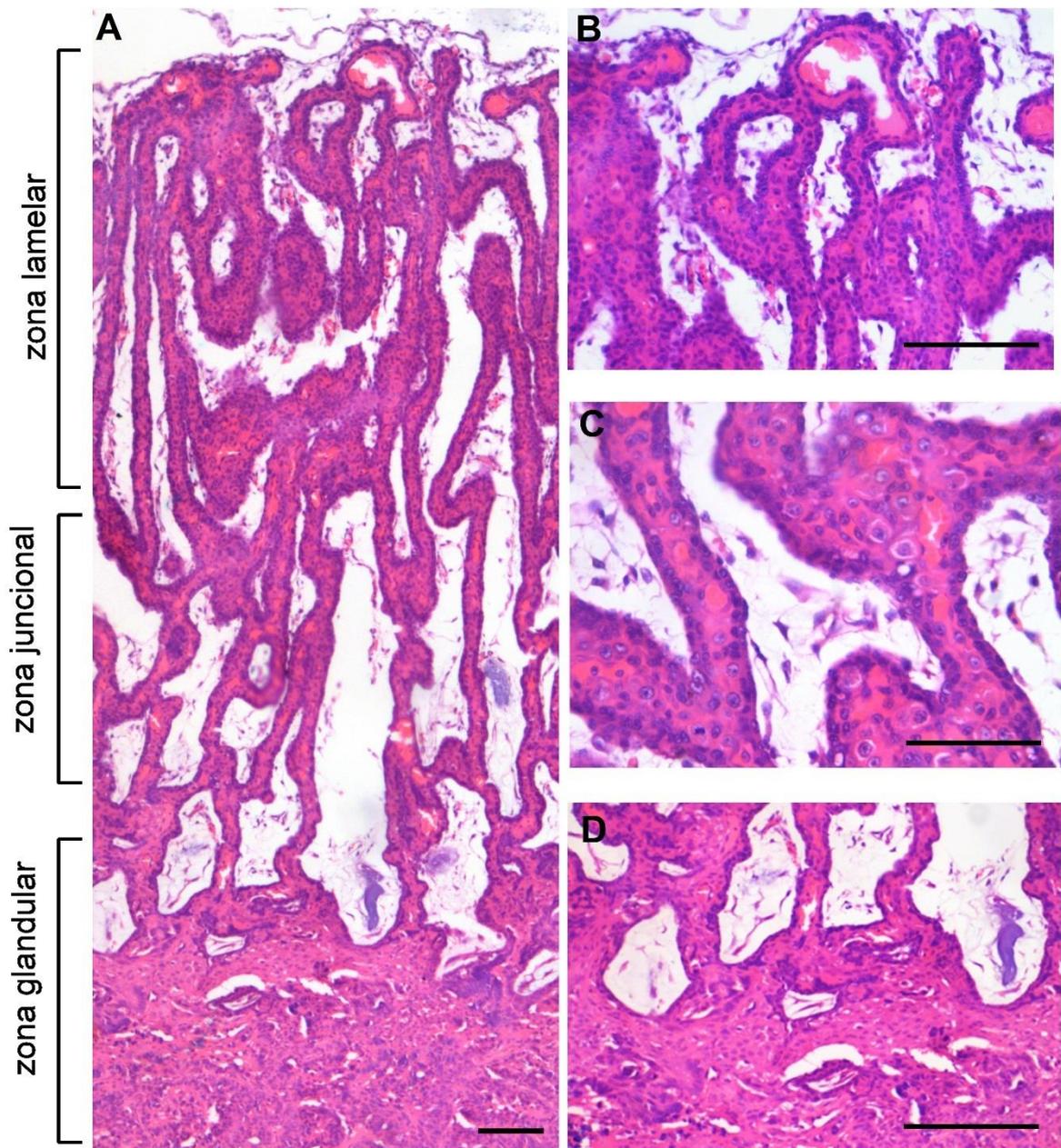


Figura 2- Histologia da placenta de gatas com aproximadamente 30 dias de gestação. A-D) Organização lamelar da placenta; (A) evidenciando três camadas ou zonas distintas: a zona lamelar (ZL); (B) formada por projeções uterinas revestidas pelo citotrofoblasto e sinciotrofoblasto em forma de lamelas; zona juncional (ZJ); (C) composta por células colunares e com microvilosidades; e a zona glandular (ZG); (D) composta por glândulas endometriais. (Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 µm).

3.4 Esteroides sexuais

O controle das alterações ocorridas durante o ciclo estral e gestação é regulado pelo sistema nervoso e endócrino por meio de estímulos neuronais e hormônios tróficos.

Quimicamente, os hormônios que atuam no sistema genital feminino podem ser classificados como esteroides sexuais e compreendem o E₂, a P₄ e o andrógeno. Eles derivam do metabolismo do colesterol e são produzidos principalmente pelas gônadas, córtex da adrenal e placenta. A ação biológica dos esteroides sexuais é nuclear, regulando a transcrição gênica, devido à característica lipofílica desses hormônios que facilmente ultrapassam a parede celular e se ligam a receptores nucleares específicos (WALTERS; ALLAN; HANDELSMAN, 2008; TSUTSUI *et al.*, 2009).

3.4.1 Estradiol

O E₂ nas fêmeas está associado ao desenvolvimento das características sexuais secundárias, regulação do ciclo estral e reprodução, regulação do metabolismo ósseo, desenvolvimento da glândula mamária e lactação e indução do comportamento de cio. No tecido ovariano, o E₂ age estimulando o desenvolvimento e maturação folicular, enquanto no útero estimula a vascularização endometrial, a proliferação e hiperplasia das glândulas endometriais e aumenta a secreção de muco uterino. Além disso, o E₂ aumenta a sensibilidade de receptores uterinos e mamários para a ação da P₄, agindo sinergicamente e potencializando o efeito da mesma (NIE *et al.*, 2002; BULUN, 2014).

O E₂ é produzido principalmente pelas células da granulosa do ovário sob o estímulo do FSH durante as fases de proestro e estro. Além disso, mesmo que em menor proporção, é produzido pela placenta por meio do metabolismo de andrógenos e do colesterol, pelo CL, pelas células da zona reticular da adrenal, além do tecido adiposo, glândula mamária, fígado e pâncreas (FUENTES; SILVEYRA, 2019). Deficiência de E₂ está associada a infertilidade, alteração do comportamento reprodutivo e sobrepeso, além de osteoporose em mulheres, roedores, ovelhas e primatas não humanos (OGAWA *et al.*, 1999; MUELLER; KORACH, 2001; BULUN, 2014; KOMORI, 2015; FARR *et al.*, 2019).

O receptor alfa de estrógeno (ER α) foi o primeiro receptor hormonal a ser descoberto e acreditava-se ser o único receptor para estrógeno até a descoberta do receptor beta (ER β). Existe também a descrição de um terceiro tipo de receptor, o ER γ , porém poucos estudos foram realizados para elucidar o seu papel no sistema genital (FUENTES; SILVEYRA, 2019; SANTEN; SIMPSON, 2019). Os receptores do tipo α são observados predominantemente nos ovários, útero, placenta e na hipófise e, em menor proporção, no fígado, osso, hipotálamo, tecido adiposo branco, glândula mamária, colo do útero e vagina. No útero, o ER α é observado nas células epiteliais luminiais e glandulares, estromais e miometriais e age induzindo ondas de

mitose no endométrio, enquanto que no ovário localizam-se nas células intersticiais e células da teca (JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015; HAMILTON *et al.*, 2017). Na placenta de mulheres são observados ER α nas células citotrofoblásticas, fibroblastos amnióticos e pericitos vasculares vilosos (BUKOVSKY *et al.*, 2003a, 2003b). A ausência ou diminuição na expressão desses receptores está associada à infertilidade total ou parcial, devido principalmente à falha na implantação embrionária e hipoplasia uterina (HAMILTON *et al.*, 2017); enquanto o aumento dos níveis hormonais de estradiol e seus receptores apresentam-se associados ao desenvolvimento de doenças no trato genital como endometriose, hiperplasia endometrial cística e neoplasias endometriais e leiomiomas (HAMILTON *et al.*, 2017; CHANTALAT *et al.*, 2020). Em gatas com piometra foi demonstrado aumento da expressão de receptores estrogênicos alfa no epitélio glandular endometrial e aumento de receptores para P₄ nas células estromais e no epitélio glandular (MISIRLIOGLU *et al.*, 2006).

Os receptores tipo β são observados nos ovários, útero, sistema nervoso central, sistema cardiovascular, pulmão, próstata, cólon, rim e sistema imunológico. Nos ovários de humanos e roedores, localizam-se nas células da granulosa dos folículos em desenvolvimento (JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015; HAMILTON *et al.*, 2017), enquanto é observado nas células epiteliais e estromais uterinas e nas células trofoblásticas vilosas e trofoblasto extraviloso na placenta humana (BUKOVSKY *et al.*, 2003b). A ausência do ER β está associada à subfertilidade devido à diminuição da resposta uterina ao E₂ (OGAWA *et al.*, 1999; BULUN, 2014).

3.4.2 Progesterona

A P₄ é um esteroide sexual que predomina na fase de diestro e é produzida e secretada pelo CL e, durante o período gestacional, pela placenta (PIETTE, 2018). De acordo com as suas características e especificidade, os receptores para progesterona (PR) podem ser classificados em três isoformas: A (RP-A), B (RP-B) ou C (RP-C) (JACOBSEN; HORWITZ, 2012; TAN *et al.*, 2012; KAYA *et al.*, 2015).

A expressão do PR está associada principalmente à presença de E₂ que age aumentando a sensibilidade dos receptores à P₄. A presença do PR já foi demonstrada na glândula mamária, hipófise, cérebro e endométrio de roedores, ovelhas, primatas não humanos, mulheres e gatas (VENDOLA *et al.*, 1998; MISIRLIOGLU *et al.*, 2006; DRESSING *et al.*, 2011). Estudos demonstraram a presença de PRs nas células da granulosa do folículo pré-ovulatório devido ao estímulo do LH, sendo que a presença deles é essencial para que ocorra a ruptura folicular e o

processo de ovulação (CONNEELY *et al.*, 2001). Em camundongos nocautes para receptores progesterônicos A (PRAKO) há diminuição da ovulação associada à presença de folículos maduros no ovário, sendo que a presença da isoforma B não é capaz de promover a ovulação. Já os animais nocautes para ambas isoformas apresentam anovulação. Isso sugere que há diferentes vias de ação da P₄ de acordo com o receptor e que o PRA é o principal envolvido no processo de ovulação, embora as isoformas A e B atuem de forma complementar (CONNEELY *et al.*, 2001). Outro estudo demonstrou que o PRB está associado ao desenvolvimento da glândula mamária, enquanto que o PRA está relacionado com o desenvolvimento uterino (MULAC-JERICEVIC *et al.*, 2000).

Os efeitos da P₄ no útero estão relacionados com o controle da proliferação endometrial por meio do PRB, o que sugere que alterações proliferativas como hiperplasia endometrial estão associadas a distúrbios nesse receptor. O PRA apresenta função crucial na implantação do embrião pelo processo de decidualização e regula outros genes associados à receptividade embrionária no endométrio como a calcitonina, histidina descarboxilase, anfiregulina e lactoferrina (CONNEELY *et al.*, 2001). A P₄ é imprescindível para o processo de implantação e, conseqüentemente, estabelecimento e sucesso da gestação. A sua diminuição é considerada um processo chave do início do parto em animais vivíparos (TAN *et al.*, 2012; KAYA *et al.*, 2015).

Deficiência na secreção de P₄ ou em seus receptores está associada à anormalidades do desenvolvimento do sistema genital, infertilidade, anovulação, aborto, hiperplasia uterina, metrite e subdesenvolvimento mamário (LYDON *et al.*, 1995, 1996; MULAC-JERICEVIC *et al.*, 2000). Além disso, estudos sobre os receptores de P₄ aumentaram, visto que alterações no perfil desses receptores estão associadas com o desenvolvimento de câncer mamário e do sistema genital em mulheres (SCARPIN *et al.*, 2009; PIETTE, 2018; TRABERT *et al.*, 2019).

3.4.3 Andrógenos

Os hormônios androgênicos são sintetizados por meio do metabolismo de colesterol ou de outro esteroide. Os principais locais de produção são a zona reticular da adrenal, células de Leydig no testículo e células da teca no ovário. Durante a gestação, a síntese de andrógenos pela placenta depende da biodisponibilidade de pregnenolona produzida nas células trofoblásticas (WALTERS; HANDELSMAN, 2018; HONG *et al.*, 2019; MEAKIN; CLIFTON, 2019).

Os receptores androgênicos (AR) na fêmea localizam-se no cérebro, ovário (células foliculares e CL), glândulas mamárias, tubas uterinas, vagina, útero e placenta (HSU *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2013). Em primatas não-humanos (*Macaca mulatta*) e roedores foi observado AR nas células da teca e da granulosa no tecido ovariano e foi demonstrado que os seus efeitos estão associados com a proliferação das células foliculares e o crescimento folicular (VENDOLA *et al.*, 1998; WALTERS; ALLAN; HANDELSMAN, 2008; WALTERS; HANDELSMAN, 2018). Além disso, a presença de andrógenos regula negativamente a atresia dos folículos ovarianos e estimula o crescimento de folículos pré-antrais em primatas não-humanos e roedores (VENDOLA *et al.*, 1998; WALTERS; ALLAN; HANDELSMAN, 2008). Em mulheres, foi demonstrada a presença de AR em células estromais e glandulares do endométrio, especialmente na camada basal, enquanto no miométrio a expressão foi baixa (HORIE *et al.*, 1992). Durante a gestação, foi demonstrado AR nas células trofoblásticas, e em condições patológicas como adenomiose, endometriose e adenocarcinoma endometrial, observou-se um aumento na expressão desses receptores (HORIE *et al.*, 1992). Em felinos domésticos, ainda não foram realizados estudos no útero, porém em felinos silvestres (*Lynx pardinus* e *Lynx lynx*) foi demonstrada grande quantidade de receptores androgênicos no CL (AMELKINA *et al.*, 2016).

Durante a gestação, a presença de andrógenos é essencial para a diferenciação sexual masculina e feminina regulando a involução dos ductos de Wolff ou de Müller, além de ser importante para o crescimento intrauterino. Caso ocorra desregulação hormonal durante a gestação, alterações como redução do crescimento fetal e diminuição do tempo gestacional podem ser observados. Em camundongos nocautes para os receptores androgênicos (ArKO) foi observada feminização dos machos, enquanto nas fêmeas ocorreu crescimento uterino aberrante associado à diminuição do desenvolvimento mamário e menor viabilidade dos oócitos. Esses dados sugerem que os andrógenos são importantes para o desenvolvimento dos ovários, útero e glândula mamária (ZHOU, 2010; MEAKIN; CLIFTON, 2019). Nesse sentido, estudos já demonstraram que alterações na concentração plasmática de andrógenos ou na expressão dos seus receptores em fêmeas está associado ao retardo ou alterações do desenvolvimento mamário, subfertilidade, anormalidade do ciclo estral/menstrual, falha ovariana precoce e hipoplasia uterina, oligo-ovulação, síndrome do ovário policístico e doenças gestacionais como pré-eclâmpsia e diabetes mellitus gestacional (CHANG *et al.*, 2013; WALTERS; HANDELSMAN, 2018; ASTAPOVA; MINOR; HAMMES, 2019).

A variação dos níveis plasmáticos dos esteroides sexuais durante o ciclo estral, assim como durante o processo de gestação, estimula mudanças no perfil oxidativo do sistema

reprodutor feminino (GÓMEZ-ZUBELDIA *et al.*, 2002). A modulação do estado oxidativo e antioxidativo é minunciosamente orquestrado para que processos como a ovulação, preparo do útero para o processo de implantação, gestação e parto possam ocorrer adequadamente. Já foi demonstrado em humanos que durante a janela de implantação e reestruturação das artérias espirais uterinas, momentos críticos para o sucesso gestacional, é requerido que o útero se apresente em estado pró-inflamatório com elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS- *reactive oxygen species*). Os perfis enzimáticos são variáveis de acordo com o hormônio predominante e suas inter-relações durante as fases reprodutivas. Nesse sentido, demonstrou-se que o aumento de E₂ e andrógenos aumenta o estresse oxidativo e diminui a atividade de enzimas antioxidantes como a catalase no útero de ratas (GÓMEZ-ZUBELDIA *et al.*, 2002). A progesterona, por outro lado, estimula positivamente a atividade da glutathione peroxidase no útero de roedores (GÓMEZ-ZUBELDIA *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2014).

3.5 Estresse oxidativo e estado redox na morfofisiologia reprodutiva da fêmea

Os radicais livres consistem em moléculas altamente instáveis e reativas que apresentam um único elétron não pareado na sua órbita externa (AGARWAL *et al.*, 2012; NANDI *et al.*, 2019). Apesar do elétron poder se ligar a diversos tipos de átomos, as duas principais categorias de radicais livres são: as espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (NOS- *reactive nitrogen species*). Quando instáveis, os radicais livres reagem em cascata e resultam em lesões celulares como peroxidação lipídica da membrana plasmática, alterações proteicas e dano ao DNA (RIZZO *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2018).

As ROS são fisiologicamente produzidas em pequenas quantidades durante o metabolismo do oxigênio, porém em situações patológicas pode ocorrer o aumento dessas substâncias (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010; AGARWAL *et al.*, 2012). Os tipos de ROS mais importantes são o superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($\text{ONOO}\bullet$) e os íons de hidroxila ($\text{OH}\bullet$) (Figura 3) (RIZZO *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2018; LUO; YAO; XU, 2021). Quando há o desequilíbrio entre a produção dessas ROS e a assimilação e depuração por meio de substâncias antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; SCHOOTS *et al.*, 2018; STELLER; ALBERTS; RONCA, 2018).

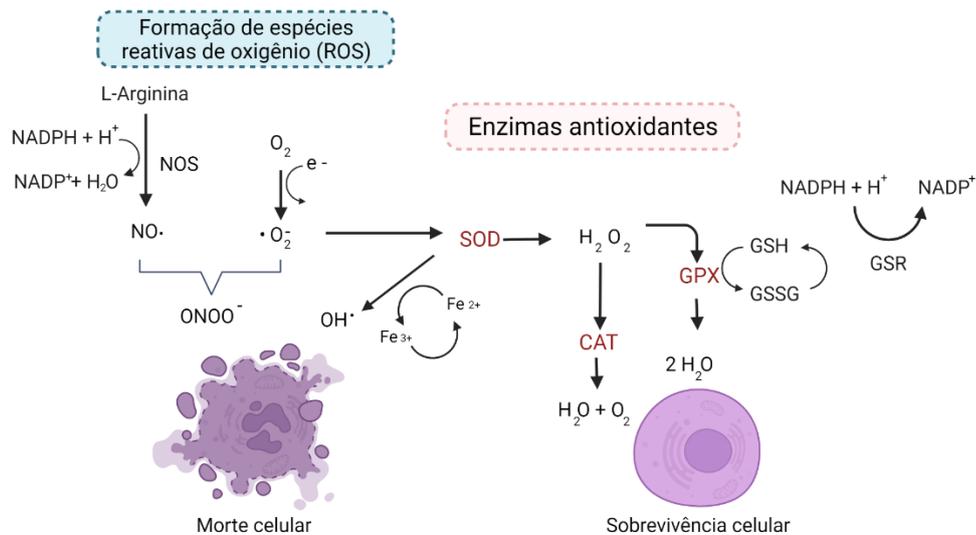


Figura 3- Esquema representativo da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e sua interação com a primeira linha de defesa antioxidante enzimática. O ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) é produzido por meio de uma interação com um único elétron, e consiste na principal etapa na formação de ROS's. A partir da catalização por meio do óxido nítrico sintase (NOS), a L-arginina produz óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), que por sua vez, interage com o $\cdot\text{O}_2^-$ resultando na formação do peroxinitrito (ONOO^-); quando há íons ferro (Fe^{2+}) livre, o superóxido e o peróxido de hidrogênio podem interagir na reação de Haber-Weiss gerando um radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$). A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do superóxido, produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que poderá ser posteriormente convertida em moléculas de água (H_2O) e oxigênio (O_2) pela catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX). A GPX realiza na sua função por meio da oxidação da glutatona reduzida (GSH), transformando-a em glutatona oxidada (GSSG). A redução da GSSG é dada pela a glutatona redutase (GSR) que utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) como agente redutor. Adaptado de AL-GUBORY e colaboradores (2012).

As principais fontes intracelulares de ROS incluem o metabolismo aeróbico, onde destaca-se a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, a cadeia de transporte de elétrons do retículo endoplasmático e o transporte de elétrons na membrana plasmática celular e nuclear. Outras fontes de ROS incluem as vias enzimáticas das lipoxigenases, cicloxigenases, citocromo P450, xantina oxidase (XO) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) (AGARWAL *et al.*, 2012; RIZZO *et al.*, 2012). A NADPH pode ser observada em neutrófilos e células vasculares durante o processo inflamatório induzido por estímulos bacterianos e citocinas. Na placenta, essa fonte de ROS pode ser observada principalmente no início da gestação (RIZZO *et al.*, 2012; STELLER; ALBERTS; RONCA, 2018). Já as fontes extracelulares de ROS incluem a hipóxia celular, a radiação ionizante, a exposição à luz ultravioleta, fontes dietéticas e determinadas drogas como nicotina, fenitoína, talidomida e metanfetamina (WELLS *et al.*, 2005; AGARWAL *et al.*, 2008, 2012).

Os antioxidantes, responsáveis pela remoção, neutralização e bloqueio das ROS, são moléculas que agem doando um elétron e impedindo a oxidação de outras moléculas. Eles podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; GUERRA *et al.*, 2014). Os antioxidantes não enzimáticos também são denominados de antioxidantes sintéticos e incluem o selênio, zinco, glutathione, ácido ascórbico (Vitamina C), taurina, tocoferol (Vitamina E), β -caroteno e caroteno. Eles podem ser adquiridos pelo organismo por meio da dieta ou suplementação (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; AGARWAL *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2018). Já os antioxidantes enzimáticos incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPX) (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005).

3.5.1 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD é uma metaloenzima e é um dos principais meios de depuração das ROS. A SOD atua catalisando a dismutação do íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que posteriormente será metabolizado pelas catalases ou peroxidases (GARREL; FOWLER; AL-GUBORY, 2010; DEL RÍO; LÓPEZ-HUERTAS, 2016).

Em mamíferos, a SOD apresenta três isoformas que se diferenciam de acordo com a sua localização intracelular e extracelular e íon metal que a compõe. A SOD1 (Cu, Zn-SOD) é uma enzima que depende da presença de cobre e zinco e é observada no citoplasma celular. A SOD2 (Mn-SOD) é dependente de manganês e está presente nas mitocôndrias. A SOD3 (EC-SOD) é uma enzima que, semelhante a SOD1, também depende da presença de cobre e zinco, porém realiza a sua função extracelularmente (AL-GUBORY *et al.*, 2005; BAFANA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2016).

A SOD está presente em todas as células aeróbicas e, em roedores, ruminantes e humanos, já foi demonstrada durante as alterações cíclicas do endométrio, no desenvolvimento folicular, na ovulação e na formação e manutenção do CL durante o ciclo estral/menstrual e gestação (SUGINO *et al.*, 2000a; AL-GUBORY *et al.*, 2005, 2012; SUGINO, 2005). A presença da SOD também foi demonstrada no endométrio canino e apresenta variações na sua expressão de acordo com as fases do ciclo estral (SANTOS *et al.*, 2016).

Em ratas nocautes para SOD1 há comprometimento da formação do CL associado ao aumento de células apoptóticas e diminuição da secreção de P_4 , com consequente incapacidade de manter a gestação (HO *et al.*, 1998; DERUBERTIS; CRAVEN; MELHEM, 2007; NODA *et al.*, 2012). Sugino *et al.* (1999) também demonstraram que durante a supressão gênica de

SOD1, houve inibição da produção de P₄ pelo ovário devido ao aumento de radicais superóxidos no CL.

Redução da atividade enzimática de SOD1 e/ou 2 e aumento da peroxidação lipídica e formação de ânions superóxidos também foi observada na decídua, sangue e/ou placenta de mulheres apresentando aborto espontâneo quando comparado a gestantes saudáveis (SUGINO *et al.*, 2000b; GHNEIM *et al.*, 2016), sugerindo que SOD é importante para a manutenção da gestação.

3.5.2 Catalase (CAT)

A CAT é um dos principais antioxidantes enzimáticos e está presente na maioria dos organismos aeróbicos (NANDI *et al.*, 2019). De acordo com as suas características bioquímicas e físicas, as catalases podem ser classificadas em quatro tipos distintos: catalases monofuncionais contendo heme (também denominada de catalase clássica), catalases-peroxidases contendo heme (catalase atípica), catalase que contém manganês (pseudocatalase) e as catalases menores (SOOCH; KAULDHAR; PURI, 2014; NANDI *et al.*, 2019).

A CAT age catalisando a inativação de peróxido de hidrogênio, resultando na produção de uma molécula de água e uma de oxigênio (SOOCH; KAULDHAR; PURI, 2014). Estudos também demonstraram a importância da catalase no processo inflamatório e apoptose em situações de estresse oxidativo (NANDI *et al.*, 2019), e que a atividade da catalase é estimulada pela presença de estradiol (BEHL; PANDEY, 2002).

Os peroxissomos, onde as catalases estão presentes, estão localizados na membrana plasmática celular e, durante os seus processos de metabolismo lipídico e oxidação de ácidos graxos, acarreta em um aumento de peróxido de hidrogênio, que posteriormente é degradado pela catalase. Isso evita que ocorra um estresse oxidativo celular (LODHI; SEMENKOVICH, 2014; DEL RÍO; LÓPEZ-HUERTAS, 2016; HWANG *et al.*, 2020). Os principais tecidos com alta atividade peroxissomal incluem aqueles com grande metabolismo lipídico como o fígado, o cérebro, o tecido adiposo e a mucosa intestinal (LODHI; SEMENKOVICH, 2014; HWANG *et al.*, 2020).

A catalase está presente em diversos sistemas e a sua deficiência pode acarretar em doenças como resistência à insulina, diabetes mellitus, anemia, hipertensão, osteoporose, câncer e distúrbios neurológicos como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, transtorno bipolar e esquizofrenia (HABIB; LEE; YANG, 2010; NANDI *et al.*, 2019). Camundongos nocautes para catalase possuem maior predisposição para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2,

além de apresentar sobrepeso e tendência à lipidose hepática, devido à interrupção do metabolismo e acúmulo de lipídio (HEIT *et al.*, 2018; HWANG *et al.*, 2020).

No sistema reprodutor de ruminantes e ratas gestantes foi demonstrada a expressão de CAT e SOD nas células luteais, sugerindo que a expressão de ambas está envolvida na regulação da função lútea durante a gestação por meio do estímulo à síntese e secreção de P₄ (SUGINO, 2005; AL-GUBORY *et al.*, 2012).

Em roedores, a administração de estradiol estimulou a expressão de catalase nos ovários e útero, enquanto houve redução da sua expressão nos animais submetidos à ovariectomia (SINGH *et al.*, 1996; REZA SALEHI *et al.*, 2020).

3.5.3 Glutathione peroxidase (GPX)

A GPX, semelhante à catalase, catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em moléculas não reativas; ademais, a GPX também catalisa a degradação de peróxidos lipídicos (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011; SANTOS *et al.*, 2016).

As isoformas conhecidas da GPX compreendem GPX1 à 8. De acordo com a sua composição e estrutura, as glutathionas são classificadas como GPX contendo selenocisteína (Sec) (GPX1, 2, 3, 4 e 6); e as que contêm resíduo de cisteína (Cys) (GPX5, 7 e 8). As Sec-GPX's realizam a degradação de H₂O₂ em H₂O e O₂, por meio de sua oxidação. A glutathione oxidada ou dissulfeto de glutathione (*Glutathione disulfide*- GSSG) é então convertida para a sua forma reduzida por meio da glutathione reductase (GSH-Rd). Já as Cys-GPX's apresentam função redutora inferior, sendo consideradas antioxidantes putativas, isto é, com falsa atividade antioxidante (JURKOVIČ; OSREDKAR; JANJA, 2007; LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011; BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013; CHEN *et al.*, 2016).

As GPX's podem ser observadas nas mitocôndrias, citoplasma e ocasionalmente nos peroxissomos (GPX1), ao longo do epitélio do trato gastrointestinal (GPX2), no plasma (GPX3), na membrana celular (GPX4), no sistema reprodutor masculino (GPX5) e no epitélio olfatório (GPX6) (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011). Dentre elas, a GPX1 é a mais abundante e a principal responsável pela proteção contra as ROS (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013; SANTOS *et al.*, 2016).

No sistema reprodutor feminino, estudos demonstraram que a presença de GPX é fundamental nos processos de desenvolvimento embrionário e manutenção da viabilidade fetal, pois é crucial na proteção contra o estresse oxidativo patológico. Ao mesmo tempo, a diminuição crítica ou ausência de GPX já foi demonstrada em casos de endometriose, síndrome

do ovário policístico, falha na implantação embrionária e aborto (HIROTAKA *et al.*, 2000; BRÜTSCH *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2020).

Camundongos nocautes para GPX4 desenvolvem fetos incompatíveis com a vida, pois os fetos apresentam falhas na gastrulação com aumento da apoptose distal e não formação da camada mesodérmica, sugerindo que as GPX's são cruciais para a manutenção do equilíbrio oxidativo no início da implantação embrionária e sobrevivência fetal (IMAI *et al.*, 2003; BRÜTSCH *et al.*, 2015). Estudos similares realizados com camundongos nocautes para GPX3 também demonstram que essa enzima é fundamental para o processo de decidualização, preparo e manutenção do ambiente uterino para o desenvolvimento embrionário adequado (XU *et al.*, 2014). Em mulheres também já foi demonstrado que o perfil plasmático de estradiol ao longo do ciclo menstrual apresenta correlação positiva com a GPX eritrocitária (MASSAFRA *et al.*, 2000), enquanto a redução da atividade de GPX no endométrio e aumento de ROS pode ser uma das causas da endometriose (HIROTAKA *et al.*, 2000). Ademais, os níveis de GPX foram sugeridos como possíveis marcadores do grau de severidade da endometriose, no qual as mulheres com a forma mais severa apresentam níveis enzimáticos uterinos inferiores às aquelas com a forma branda da doença (HUANG *et al.*, 2020).

3.6 ROS no sistema genital feminino

As ROS são necessárias para o funcionamento adequado do sistema genital feminino, sendo que alterações que cursam com aumento na sua produção ou diminuição da resposta antioxidante endógena estão envolvidas na etiopatogênese de algumas doenças como infertilidade, endometriose, síndrome dos ovários policísticos, distúrbios hipertensivos gestacionais, restrição de crescimento fetal, nascimento de crianças prematuras e aborto espontâneo (SEDEEK *et al.*, 2008; GARREL; FOWLER; AL-GUBORY, 2010; SANTOS *et al.*, 2016; STELLER; ALBERTS; RONCA, 2018).

As ROS já foram identificadas no ovário, útero, placenta e em embriões de humanos, ratos, ovinos e caprinos (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; AL-GUBORY *et al.*, 2005; AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010; RAMOS *et al.*, 2015), como também no endométrio de cães (SANTOS *et al.*, 2016). Dentre suas funções estão a sua participação no processo de esteroidogênese, proliferação celular, foliculogênese e manutenção dos folículos ovarianos, ovulação, formação do CL, luteólise, angiogênese, apoptose, implantação do embrião, gestação e durante o processo de parto (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010; RIZZO *et al.*, 2012).

3.6.1 ROS nos ovários

Nos ovários, as ROS são produzidas em condições fisiológicas e estão presentes durante a esteroidogênese e nas fases folicular, ovulatória e luteal (SUGINO, 2005). Durante a síntese dos esteroides sexuais ocorre um aumento da atividade da citocromo p450, com consequente aumento de ROS. Durante a fase ovulatória, com o pico de LH e por conseguinte, seu estímulo pró-inflamatório, estimula a formação de ROS, que age como um dos determinantes do processo de ovulação (AGARWAL *et al.*, 2012).

O aumento de ROS ocorre durante a fase de hipóxia das células da granulosa e precede a indução da angiogênese folicular e o desenvolvimento vascular ovariano, o que sugere que suas variações podem atuar como indicadores do processo de angiogênese ovariana (RIZZO *et al.*, 2012). O aumento de ROS apresenta efeito pró-apoptótico nos folículos ovarianos. No entanto, o FSH promove o aumento de E₂ e catalase que, associado à glutathione endógena, apresentam efeito antioxidante, evitando a apoptose das células foliculares (RIZZO *et al.*, 2012; JAWAD HASSAN; HASSON AL-HUSSEINI, 2019).

O E₂ modula positivamente a atividade antioxidante, sendo que ratas ovariectomizadas apresentam aumento do estresse oxidativo e peroxidação lipídica no tecido adiposo (GUERRA *et al.*, 2014). Estudo *in vitro* com células estromais uterinas humanas demonstrou que a adição de E₂ e P₄ aumentou o processo de decidualização e diminuiu a peroxidação lipídica (SUGINO *et al.*, 2000c). Além disso, em um estudo *in vitro* realizado com folículos ovarianos de caprino, foi observado um aumento da atividade enzimática de catalase nas células da granulosa durante a maturação folicular, sendo que esse aumento apresentou correlação positiva com a administração de FSH e secreção de E₂ pelos folículos (BEHL; PANDEY, 2002).

Em mulheres com síndrome do ovário policístico também já foi demonstrada redução da atividade da catalase sérica e da GPX nas células da granulosa, com aumento dos níveis séricos de malondialdeído (MDA). Isso sugere que o desbalanço hormonal com diminuição do FSH observado nessa doença e o estresse oxidativo estão envolvidos na sua patogênese (LIN *et al.*, 2014; JAWAD HASSAN; HASSON AL-HUSSEINI, 2019).

Em ratos a SOD é expressa em todas as fases do desenvolvimento folicular, sendo detectada também no fluido folicular e nas células do *cumulus oophorus*, sugerindo um papel protetor contra as ROS intrafoliculares. Além disso, já foi demonstrado que FSH e LH estimulam a expressão de Mn-SOD e EC-SOD nas células foliculares de camundongos (RIZZO *et al.*, 2012).

Em ovelhas, as ROS são produzidas pelo CL durante a esteroidogênese e secreção de P₄, sendo que elevada atividade antioxidante de GPX, SOD1 e 2 foi observada durante toda a fase luteal, principalmente na fase lútea média e início da fase tardia. Esse período coincidiu com o pico de secreção de P₄. Ao mesmo tempo, redução da atividade enzimática de GPX, SOD1 e 2 ocorreu concomitante ao aumento da secreção de prostaglandinas (PGF2 α) pelas células inflamatórias do CL (macrófagos e leucócitos) e diminuição do aporte vascular ovariano. Isso justifica o aumento de ROS observado no final da fase lútea e o aumento da peroxidação lipídica (AL-GUBORY *et al.*, 2005, 2012; RIZZO *et al.*, 2012). De forma semelhante, em ovários de mulheres também foi demonstrada correlação positiva entre a atividade de SOD1 e 2 e a secreção de P₄ pelo corpo lúteo (SUGINO *et al.*, 2000a).

3.6.2 ROS no útero e placenta

Durante o ciclo estral, o útero sofre modificações cíclicas de acordo com os hormônios predominantes e as suas inter-relações. O perfil oxidativo e de enzimas antioxidantes como GPX e SOD também sofrem variação de acordo com cada fase endometrial, visando o preparo do útero para uma possível gestação (AL-SABBAGH *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2019). Já foi observado em mulheres que a diminuição de esteroides no final do ciclo menstrual foi associada a uma diminuição da atividade de SOD e aumento do perfil oxidativo no endométrio (SUGINO *et al.*, 2000a; MENDES *et al.*, 2019). Fisiologicamente, a produção de superóxido é estimulada pelo aumento de ROS intrauterino e causa a ativação do fator nuclear kappa-B (NF- κ B). A ativação do NF- κ B no útero de mulheres está associada à secreção de prostaglandinas, regulação da angiogênese e descamação epitelial (MENDES *et al.*, 2019). Alterações associadas ao aumento de ROS podem resultar no desenvolvimento de endometriose e abortos devido à falha na implantação ou indução prematura do parto (MENDES *et al.*, 2019; WENDREMAIRE *et al.*, 2020).

Durante a gestação ocorre um aumento das ROS devido ao aumento da taxa metabólica materna causada pelo feto em crescimento e pela esteroidogênese placentária. As principais fontes de ROS na placenta são as mitocôndrias que realizam atividades como a peroxidação lipídica e resultam na produção de grande quantidade de ânions superóxidos. Os efeitos das ROS nem sempre são deletério e, durante a gestação, apresentam função primordial na placenta nos processos de diferenciação, replicação e apoptose celular, como também na remodelação arterial uterina e indução do parto (LU *et al.*, 2018; MORA AGÜERO; ZELEDÓN AGUILERA; VARGAS RUBIO, 2019; WENDREMAIRE *et al.*, 2020).

Durante o processo de placentação é necessário que ocorra a remodelação da artéria espiral uterina para o fornecimento adequado de sangue para a placenta e o feto em desenvolvimento (AL-SABBAGH *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2018; MENDES *et al.*, 2019). Com o decorrer da remodelação e dilatação das artérias espirais uterinas, secundariamente à hipóxia, ocorre um aumento da disponibilidade de oxigênio. Isso favorece o aumento das ROS e, conseqüentemente, do estresse oxidativo (AGARWAL *et al.*, 2008; STELLER; ALBERTS; RONCA, 2018). Apesar de requererem um estímulo inicial de aumento de ROS e estresse oxidativo, as células trofoblásticas apresentam alta atividade metabólica e são altamente sensíveis à alterações oxidativas que, quando em demasia, podem resultar em morte celular e alterações funcionais (MENDES *et al.*, 2019; WALKER *et al.*, 2020). O balanço adequado entre a produção das ROS e os fatores antioxidantes será vital para o desenvolvimento embrionário e fetal sadios e a manutenção da gestação até o final. Durante a gestação já foi demonstrado que P₄ estimula a expressão de SOD no estroma, sendo que camundongos com falha na expressão de GPx3 apresentam decidualização comprometida e redução da fertilidade. Isso sugere que os esteroides sexuais e enzimas antioxidantes atuam de modo sinérgico na manutenção da gestação (MENDES *et al.*, 2019).

A redução da atividade antioxidante pode resultar em alterações na invasão trofoblástica e complicações gestacionais como restrição de crescimento intrauterino, aborto espontâneo, prematuridade, pré-eclâmpsia, doença trofoblástica gestacional e placenta acreta em mulheres (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010; AGARWAL *et al.*, 2012; GHNEIM *et al.*, 2016; STELLER; ALBERTS; RONCA, 2018). Em ratas gestantes também foi demonstrado que isquemia placentária promoveu o aumento de ROS e esse aumento foi associado a hipertensão gestacional (SEDEEK *et al.*, 2008).

Aumento do estresse oxidativo e redução da atividade de catalase e SOD também já foi demonstrado no útero de cadelas com piometra, sugerindo que o ambiente pró-inflamatório no útero desses animais está associado com uma diminuição do sistema antioxidante (GOGOI *et al.*, 2018; RAUTELA; KATIYAR, 2019). Em gatas, por outro lado, ainda não há estudos que tenham caracterizado o perfil das enzimas antioxidantes nessa condição patológica.

3.7 Piometra em gatas domésticas

A piometra é considerada a doença reprodutiva inflamatória mais importante em cadelas e gatas e caracteriza-se pelo acúmulo de exsudado purulento intrauterino associado a uma

hiperplasia das glândulas endometriais induzida por desequilíbrios hormonais (HAGMAN *et al.*, 2014; VILHENA *et al.*, 2018).

A piometra é frequentemente relatada em cadelas não castradas, porém em gatas ainda há poucos estudos (HAGMAN *et al.*, 2014). Alguns autores relatam que a baixa incidência em felinos está associada ao subdiagnóstico, uma vez que as gatas geralmente não apresentam sinais clínicos tão visíveis como a cadela. Outra justificativa da menor frequência de piometra em gatas é a ovulação induzida que essa espécie apresenta, de modo que a mesma somente passa por um período de hiperprogesteroninismo caso ocorra estímulos externos como coito, feromônios e estímulos visuais durante o estro (HAGMAN *et al.*, 2014; BINDER *et al.*, 2019).

Apesar de ocorrer em qualquer idade após a puberdade, a piometra em gatas é mais comum em fêmeas com idade avançada, não castradas e na fase do diestro (HAGMAN *et al.*, 2014). Os relatos em animais jovens estão associados, na maioria das vezes, à administração exógena de esteroides sexuais visando a inibição da ciclicidade (PRAPAIWAN *et al.*, 2017).

A piometra pode ser classificada clinicamente em fechada ou aberta. Na piometra fechada há ausência de secreção vaginal devido à manutenção da cérvix fechada, enquanto na piometra aberta ocorre descarga vaginal purulenta amarelada ou amarronzada de odor pútrido. As piometras fechadas estão associadas a piores prognósticos, visto que o seu diagnóstico geralmente é tardio, com infecção bacteriana avançada e com maiores riscos de rompimento uterino e evolução para peritonite purulenta, choque séptico e óbito (AGUDELO, 2005; MISIRLIOGLU *et al.*, 2006; VILHENA *et al.*, 2018).

De acordo com as suas características histopatológicas, alguns autores classificam a piometra em quatro tipos, a depender do grau de comprometimento patológico e infiltrado inflamatório, onde: o tipo 1 apresenta hiperplasia endometrial, porém sem indícios de processo inflamatório; no tipo 2 ocorre hiperplasia endometrial acompanhada de endometrite aguda intersticial por mononucleares; no tipo 3 há exacerbação do processo inflamatório endometrial, com infiltrado de polimorfonucleares no lúmen uterino e nas glândulas endometriais; no tipo 4 há uma endometrite cônica, com hipotrofia endometrial devido ao acúmulo de células inflamatórias no lúmen uterino e, em alguns casos, metaplasia escamosa do epitélio (DOW, 1959; AGUDELO, 2005).

Apesar de ser bem estudada em cadelas, os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da piometra ainda não foram totalmente elucidados, especialmente na gata. Porém, a sua ocorrência está associada ao aumento dos níveis de progesterona e estrógenos. Sob influência do E₂, ocorre hiperplasia das glândulas endometriais e aumento da sensibilização do útero à P₄, além da abertura da cérvix, o que permite a colonização ascendente por bactérias advindas da

vagina. Sob estímulo da P₄, ocorre relaxamento uterino, diminuição das contrações miométriais, aumento da secreção das glândulas endometriais, fechamento da cérvix e diminuição da resposta imune local. Com isso, o ambiente uterino torna-se propício para proliferação bacteriana, favorecendo o desenvolvimento da piometra (AGUDELO, 2005; CHATDARONG *et al.*, 2005; HAGMAN *et al.*, 2014).

Estudos sugerem que alterações no perfil de receptores para esteroides sexuais, especialmente P₄, estão associados ao desenvolvimento da piometra (PRAPAIWAN *et al.*, 2017). Em cadelas com piometra foi demonstrado que a expressão de receptores uterinos para P₄ estava aumentada, enquanto que os receptores estrogênicos (ER) estavam diminuídos (DE BOSSCHERE *et al.*, 2002; PRAPAIWAN *et al.*, 2017). Em gatas, um estudo demonstrou que a expressão de receptores para E₂ e P₄ foi maior na superfície endometrial e epitélio glandular em casos graves de hiperplasia endometrial cística (HEC) e piometra, enquanto houve menor expressão de Er α em casos leves de HEC (MISIRLIOGLU *et al.*, 2006).

4 CAPÍTULO I

PERFIL DE EXPRESSÃO DOS RECEPTORES PARA ESTEROIDES SEXUAIS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO ÚTERO E PLACENTA DE GATAS CÍCLICAS, GESTANTES E COM PIOMETRA

4.1 Introdução

Os esteroides sexuais e as enzimas antioxidantes são importantes no desenvolvimento do sistema genital feminino e para a modulação adequada do ciclo estral/menstrual, gestação e desenvolvimento fetal (AGARWAL *et al.*, 2012; STELLER; ALBERTS; RONCA, 2018; COLE; SHORT; HOOPER, 2019). Por isso, alterações na sinalização ou expressão desses mediadores estão associadas a disfunções reprodutivas e doenças gestacionais como infertilidade, anovulação, nascimento de fetos prematuros e aborto espontâneo (BULUN, 2014; HAMILTON *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2018; PIETTE, 2018; STELLER; ALBERTS; RONCA, 2018; FARR *et al.*, 2019).

Os esteroides sexuais de maior importância para o sistema genital feminino incluem a progesterona (P_4), o estradiol (E_2) e os hormônios androgênicos (COLE; SHORT; HOOPER, 2019; DI RENZO; TOSTO; TSIBIZOVA, 2020). Eles são produzidos principalmente pelas gônadas e, em menor quantidade, pelas adrenais e, durante a gestação, pela placenta (BRAUN *et al.*, 2012; COLE; SHORT; HOOPER, 2019).

Estudos sobre a expressão do receptor de P_4 (PR) no trato genital de mulheres e cadelas têm demonstrado sua relação com o desenvolvimento do câncer de mama, ovário e útero (DIEP *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2005; KNUTSON *et al.*, 2012), enquanto que foi observado em camundongos nocautes para os receptores de estrógeno alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$) foi demonstrado infertilidade e subfertilidade, respectivamente (OGAWA *et al.*, 1999; BULUN, 2014). Já camundongos nocautes para o receptor de andrógeno (ArKO) apresentam maior atresia folicular e redução da foliculogênese (CHANG, *et al.*, 2013), enquanto a deleção gênica de receptores androgênicos (AR) em ratas causou subfertilidade, redução da foliculogênese e da taxa de nascimento (WALTERS; ALLAN; HANDELSMAN, 2008; CHANG, *et al.*, 2013).

No entanto, mesmo a gata doméstica sendo uma espécie com ovulação induzida, o que difere de outras espécies animais domésticas e da mulher (BINDER *et al.*, 2019), estudos sobre o perfil de expressão dos receptores para esteroides sexuais no sistema genital dessa espécie animal são escassos, especialmente na placenta. Os únicos estudos realizados por Amelkina et

al. (2016) e Li et al. (1992) demonstraram que a expressão de ER e PR no útero de gatas varia de acordo com a fase do ciclo estral, com maior expressão em gatas no proestro, enquanto a expressão gênica desses receptores e de AR varia de acordo com o estágio de desenvolvimento luteal (LI; BOOMSMA; VERHAGE, 1992; AMELKINA *et al.*, 2016).

Estudos com ratas já demonstraram também que os hormônios sexuais agem regulando enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) no útero e que o perfil enzimático é variável de acordo com o hormônio predominante e a fase do ciclo estral (GÓMEZ-ZUBELDIA *et al.*, 2002). O equilíbrio entre condições oxidativas e antioxidantes deve ser cuidadosamente balanceado para que processos como a esteroidogênese, foliculogênese, ovulação, luteólise, angiogênese, implantação do embrião, gestação e o parto possam ocorrer adequadamente (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; SCHOOTS *et al.*, 2018; STELLER; ALBERTS; RONCA, 2018). Nesse sentido, demonstrou-se no útero de ratas que o aumento de E₂ e andrógenos aumenta o estresse oxidativo e diminui a atividade de enzimas antioxidantes como a catalase (GÓMEZ-ZUBELDIA *et al.*, 2002). A progesterona, por outro lado, estimula a atividade da glutathione peroxidase no útero de ratas e camundongos (GÓMEZ-ZUBELDIA *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2014).

No entanto, até o momento, não há descrição do perfil de enzimas antioxidantes no sistema genital da gata doméstica e se há correlação da sua expressão com a expressão tecidual dos receptores para esteroides sexuais. Além disso, não há estudos em gatas domésticas avaliando o perfil desses mediadores em condições inflamatórias uterinas, como a piometra. Embora a piometra seja a principal doença inflamatória do trato genital de cadelas e gatas (STANLEY; PACCHIANA, 2008; PRAPAIWAN *et al.*, 2017), estudos sobre essa condição em gatas são ainda escassos (AGUDELO, 2005; HAGMAN *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2021). Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão dos receptores para esteroides sexuais e enzimas antioxidantes no útero de gatas ao longo do ciclo estral e na condição de piometra, como também no útero e placenta ao longo da gestação.

4.2 Metodologia

4.2.1 Delineamento experimental

Gatas sem raça definida, com idade variando de seis meses a dois anos, foram utilizadas no presente estudo. Amostras de útero e placenta de gatas hípidas não gestantes, gestantes e

com piometra foram obtidas de animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e que foram submetidos à ovariohisterectomia eletiva. Ovariohisterectomia terapêutica foi realizada nas gatas que apresentaram complicações gestacionais e/ou que apresentavam suspeitas clínicas de piometra. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UESC (Processo nº 029/21).

Foram coletados os tratos genitais de 37 gatas. Análise macroscópica foi realizada no sistema reprodutor e fragmentos de útero e placenta foram coletados para histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ). Fragmentos de útero e placenta foram também armazenados em criotubos com Trizol, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para avaliação da expressão gênica pela qPCR. Amostras sanguíneas foram coletadas por meio da punção da veia cefálica ou jugular e armazenados em tubos com EDTA para dosagem de progesterona (P₄) e estradiol (E₂).

Após avaliação clínica, macroscópica, histopatológica e do perfil plasmático de P₄ e E₂, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: 1) proestro/estro (N=6); 2) diestro (N=7), 3) anestro (N=6); 4) piometra (N=5); 5) meio da gestação (aproximadamente 30 dias de gestação) (N=7); 6) final da gestação (gestação a termo) (N=6).

4.2.2 Ovariohisterectomia

Para a ovariohisterectomia foi utilizado-se como medicação pré-anestésica 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 hípidos e meperidina (3mg/Kg; IM) para os animais com piometra ou gestantes. Para a indução anestésica foi utilizado propofol (6 mg/Kg; IV) (Propofol; 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 três 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 placenta foram acondicionadas em um frasco em paraformaldeído 10% durante 24 horas para fixação. Em seguida, o material foi processado pela técnica rotineira para inclusão em parafina e posterior clivagem (APÊNDICE I). Os tecidos foram desidratados de forma seriada em solução de álcool 70% até álcool absoluto (100%), com posterior diafanização em xilol e inclusão em parafina. Secções histológicas de 4µm foram obtidos em lâminas histológicas. Após esse processo, as secções foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise histopatológica (APÊNDICE II). Secções de 4µm foram também obtidas em lâminas polarizadas silanizadas (StarFrost Polycat, Germany) para realização da IHQ.

As fêmeas foram consideradas em proestro/estro quando apresentaram características endometriais proliferativas, como hiperplasia e hipertrofia glandular, além de níveis plasmáticos elevados de E₂ e baixos de P₄; em diestro, aquelas em que o útero apresentou dilatação, hipertrofia e discreta hiperplasia das glândulas endometriais associado à atividade secretória, com níveis plasmáticos aumentados de E₂ e P₄ (LIMAN *et al.*, 2012; SIEMIENIUCH *et al.*, 2014; AMELKINA *et al.*, 2015); e como anestro, as gatas que apresentaram o endométrio com poucas camadas de glândulas e criptas rasas, caracterizando inatividade cíclica, além de baixos níveis de E₂ e P₄ (LIMAN *et al.*, 2012). Para a caracterização dos animais com piometra, foram utilizados parâmetros previamente descritos (DOW, 1959; AGUDELO, 2005; GOGOI *et al.*, 2018) e foram consideradas apenas as que apresentaram piometra Graus 3 e 4, nas quais foi observado infiltrado inflamatório no lúmen uterino e nas glândulas endometriais.

A determinação da idade gestacional foi realizada de acordo com o histórico clínico, o tamanho do embrião ou feto e análise histológica da placenta considerando a altura das lamelas placentárias (LEISER; KAUFMANN, 1994; LEISER; KOOB, 1993; WOODING; BURTON, 2008).

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 °C para posterior dosagem hormonal de E₂ e P₄ por meio de ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA) utilizando Kits comerciais (Enzo Life Sciences, Inc, USA).

4.2.5 Imuno-histoquímica

Secções histológicas dos úteros e placentas foram submetidas à análise IHQ utilizando os anticorpos anti-PR (sc-130071; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-ER α (6f11; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), anti-AR (PG-21; EMD Millipore Corp, Massachusetts, EUA), anti-catalase (sc-271803, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-SOD1 (sc-101523, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-GPX1/2 (sc-133160, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (*Streptavidin Peroxidase*, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) (APÊNDICE III). A recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98°C, durante 20 minutos e, em seguida, durante 20 minutos em temperatura ambiente, utilizando a solução EnVision™ FLEX Target Retrieval (DM828), diluída na concentração de 1:50 em dH2O do Kit EnVision FLEX+, Mouse, High pH, com pH ajustado com ácido cítrico para 6,0. As lâminas foram incubadas em câmara úmida durante 5 minutos na etapa de bloqueio da peroxidase endógena (EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM801)), seguido de 30 minutos na etapa de soro de bloqueio (Ultra vision Block, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA). As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários em câmara úmida *overnight* por 18 ou 40h (Tabela 2) e durante 30 minutos na etapa de proteína estabilizante (EnVision™ FLEX + Mouse LINKER (SM804)) e, em seguida, com o anticorpo secundário (EnVision™ FLEX HRP (SM802)) durante 30 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827)). As secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário pela solução de fosfato tamponado (PBS) (SANTOS, 2021).

Tabela 2- Lista dos anticorpos primários utilizados na imuno-histoquímica e suas respectivas diluições e tempo de incubação e revelação.

Anticorpo	Espécie/clone	Diluição	Tempo de incubação	Tempo de revelação no DAB
Anti-CAT	Camundongo/monoclonal	1:200	18h	1 hora
Anti-SOD1	Camundongo/monoclonal	1:1000	18h	3 min
Anti-GPX1/2	Camundongo/monoclonal	1:1000	18h	2 min
Anti-AR	Coelho/policlonal	1:50	40h	1 hora
Anti-PR	Camundongo/monoclonal	1:2000	40h	5 min
Anti-ER α	Camundongo/monoclonal	1:100	40h	1 hora

DAB= diaminobenzidina

Foi realizada uma avaliação descritiva e quantitativa da marcação imuno-histoquímica de PR, ER α , AR, CAT, SOD1 e GPX1/2 no útero e placenta. Na análise descritiva, foram avaliadas no útero as células do epitélio luminal, do epitélio glandular, células estromais e miometriais. Na placenta foram avaliadas as células do citotrofoblasto, do sinciciotrofoblasto e deciduais uterinas.

Para a análise quantitativa, imagens de três campos aleatórios do endométrio superficial, miométrio e placenta de cada animal foram obtidas por meio do microscópio Leica DM 2500, na objetiva de 40x, utilizando a câmera digital Leica DFC 295 (Leica Microsystems, Germany). Foi determinada a área de imunomarcação utilizando o software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA). Para a análise da área marcada, *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; SANTOS *et al.*, 2021).

Foi também realizada a avaliação da porcentagem de células imunomarcadas para ER e PR em cada região do útero e placenta. Para isso, foi realizada a contagem em 500 células do epitélio luminal, 250 células do epitélio glandular superficial, 250 células do epitélio glandular profundo, 500 células do estroma endometrial, 500 células do miométrio, 500 células do citotrofoblasto, 500 núcleos do sinciciotrofoblasto e 500 células deciduais uterinas.

4.2.6 PCR em tempo real (qPCR)

Para a técnica de qPCR, a extração do RNA total do endométrio e placenta foi feita pelo uso do Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) seguindo o protocolo do Kit com algumas modificações. Foi utilizado 1 μ g de RNA para a síntese de cDNA utilizando o GoTaq® 2-Step RT-qPCR Systems (A6010, PROMEGA). Os transcritos gênicos dos genes alvo foram quantificados pela qPCR utilizando SYBR Green no equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies). Para as reações de qPCR utilizou-se 1,5 μ L de cDNA, 100nM de cada iniciador e 12,5 μ L do reagente GoTaq® qPCR Master Mix, 2X em um volume final de 20 μ L 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 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento/extensão a 60 °C por 60s.

Curvas padrão de todas as transcrições foram utilizadas para avaliar a linearidade e eficiência da amplificação, bem como a avaliação da curva de *melting* dos produtos da amplificação. Os iniciadores para *Sod1*, *Catalase*, *Gpx1*, *Ar*, *Pr* e *Era* foram delineados com base na sequência do mRNA de *Felis catus* (Tabela 3). A expressão gênica foi analisada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, em que os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de 40S *Ribossomal protein S7* (*Rps7*) *Felis catus* (JURZA; SKARZYNSKI; SIEMIENIUCH, 2014).

Tabela 3- Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qRT-PCR.

Gene	Iniciadores	Nº acesso
<i>Sod1</i>	F: ACCTTGGCAACGTAAGTCTGCT R: GTGCGGCCAATGATGGAATG	XM_023238820
<i>Gpx1</i>	F: TGCTCATCGAGAATGTGGCG R: CGAACTGGTTGCATGGGAAG	XM_004001361.6
<i>Cat</i>	F: GTGCCATCGAACATAGCAGC R: CTCACACAGGCGTTTCCTCT	XM_003993157.5
<i>Ar</i>	F: GCCCGGAAGCTGAAGAAACT R: CATAACGCCTGGCTCAAT	XM_004000575.6
<i>Era</i>	F: TCTCTTGGGACGCCTGTTTC R: CCAGTCCTTTGGTGATCGCT	NM_001024231.1
<i>Pr</i>	F: CTGCCACATCGAGGACTGTT R: TGACTTCCGTGAAAGCGAGT	XM_019450172.1
<i>Rps7</i>	F: GTCCCAGAAGCCGCACTTTGAC R: CTCTTGCCACAATCTCGCTCG	XM_023250908.2

4.2.7 Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos à identificação e exclusão de outliers através do software Graphpad Prism 8.0.2® e, para os aptos, foi realizada a apresentação como média \pm SEM. Foi realizada a 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 8.0.2®. Para análise de correlação entre a expressão gênica endometrial e placentária entre os hormônios sexuais e as enzimas antioxidantes foi utilizado o ΔCT de cada gene por meio da correlação de Pearson. As análises foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.3 Resultados

4.3.1 A expressão uterina do ER α e PR é reduzida durante o diestro em gatas domésticas

Tendo em vista que alterações nos receptores de esteroides sexuais podem resultar em alterações reprodutivas como infertilidade, anovulação e aborto (MULAC-JERICEVIC *et al.*, 2000; PRAPAIWAN *et al.*, 2017) e que o estradiol é considerado um dos principais hormônios para a fertilidade da fêmea, objetivou-se avaliar a expressão de ER α no útero de gatas durante o ciclo estral. Para isso, as gatas foram classificadas nas fases de proestro/estro, diestro e anestro de acordo com a histologia uterina e o perfil plasmático de E₂ e P₄. As gatas em proestro/estro e diestro apresentaram maiores níveis de E₂ comparado ao anestro (proestro/estro, 54,18 \pm 8,99 pg/mL; diestro, 50,47 \pm 16,20 pg/mL; anestro, 2,17 \pm 0,03 pg/mL; P < 0,05), enquanto as gatas em diestro apresentaram maiores concentrações séricas de P₄ em relação ao proestro/estro e anestro (proestro/estro, 1,19 \pm 0,33 ng/mL; diestro, 7,86 \pm 1,75 ng/mL; anestro, 0,83 \pm 0,08 ng/mL; P < 0,05).

A imunomarcção do ER α no endométrio das gatas foi maior nas fases de proestro/estro e anestro em relação ao diestro (Figura 4A-B), principalmente no epitélio luminal superficial e glandular (Figura 4C), enquanto nas células estromais uterinas houve maior marcação de ER α na fase de diestro quando comparado ao proestro/estro (Figura 4C) e no anestro em relação ao diestro e proestro/estro (Figura 4C). No miométrio, por outro lado, houve maior imunomarcção de ER α no anestro comparada ao proestro/estro e diestro (Figura 4A e 4C). Na avaliação dos transcritos gênicos, semelhante à imunomarcção, houve maior expressão de *Er α* no proestro/estro e anestro em relação ao diestro (Figura 4E).

Em relação ao PR, maior imunomarcção endometrial também foi observada no proestro/estro e anestro em relação ao diestro (Figura 5A-B), tanto no epitélio luminal e glandular quanto nas células estromais (Figura 5D). No miométrio, as fases de proestro/estro e anestro também apresentaram maior marcação de PR em relação ao diestro (Figura 4C), inclusive com maior marcação de células miometriais no anestro comparado ao proestro/estro (Figura 5C-D). Na expressão gênica, embora não tenha observado diferença significativa entre os grupos, maiores níveis de mRNA foram observados no proestro/estro e anestro comparado ao diestro (Figura 5E).

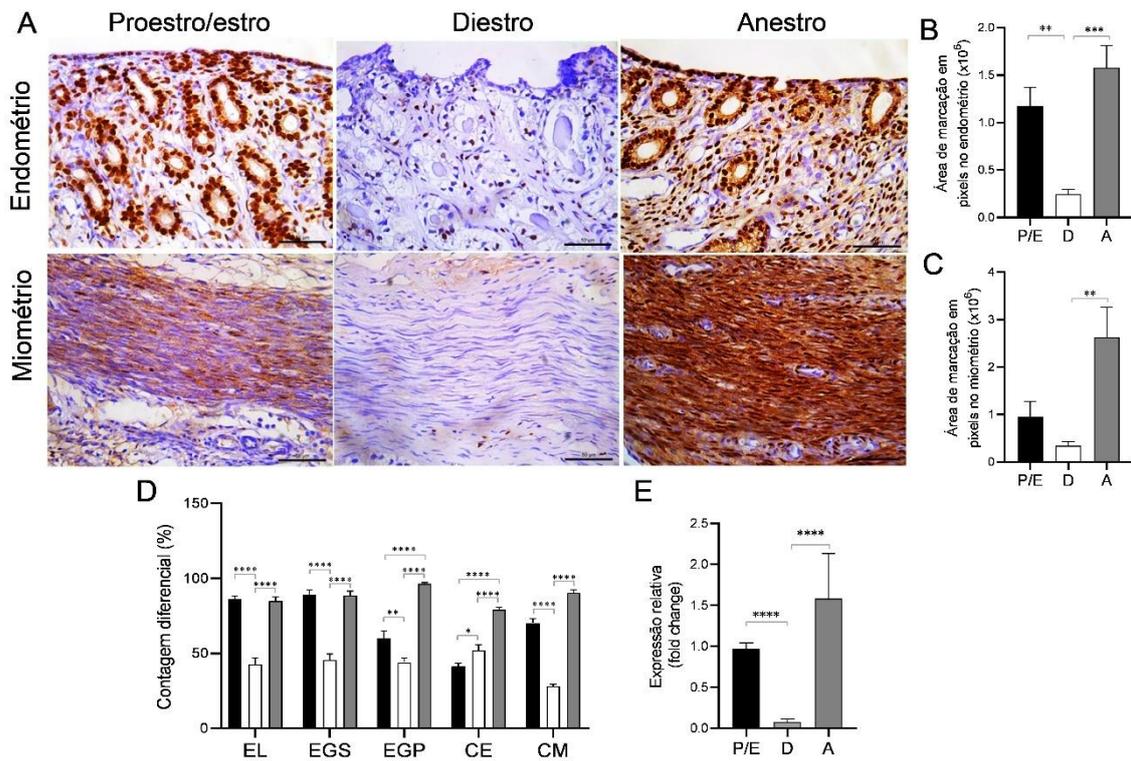


Figura 4- Expressão de ER α no útero de gatas hígdas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de ER α no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcação em pixels da expressão de ER α no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 6). D) Porcentagem de células imunomarcadas para ER α no epitélio luminal e glandular, estroma e miométrio. E) Expressão gênica relativa do *Era* no endométrio (média \pm SEM; n = 5-6). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001. P/E= proestro/estro; D= diestro; A= anestro; EL= epitélio luminal; EGS= epitélio glandular superficial; EGP= epitélio glandular profundo; CE= células estromais; CM= células miometriais.

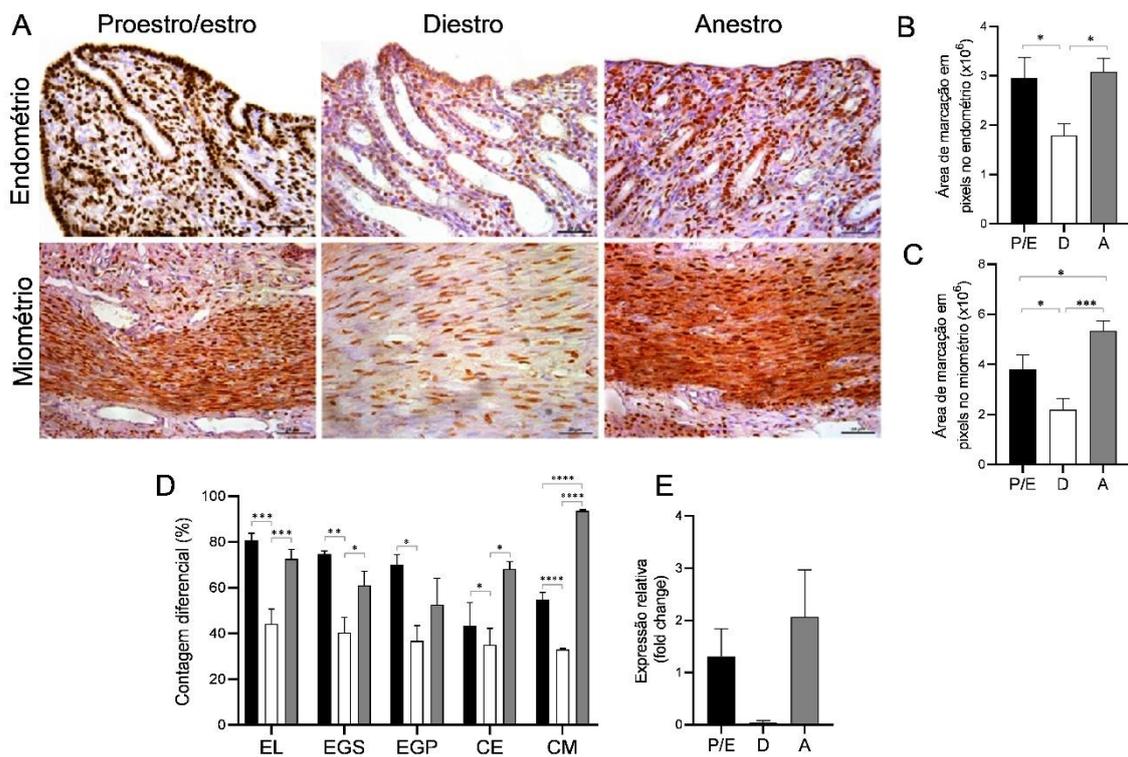


Figura 5- Expressão de PR no útero de gatas híginas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de PR no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcação em pixels da expressão de PR no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 6). D) Porcentagem de células imunomarcadas para PR no epitélio luminal e glandular, estroma e miométrio. E) Expressão gênica relativa de *Pr* no endométrio (média \pm SEM; n = 5-6). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001. P/E= proestro/estro; D= diestro; A= anestro; EL= epitélio luminal; EGS= epitélio glandular superficial; EGP= epitélio glandular profundo; CE= células estromais; CM= células miometriais.

A imunomarcação do AR no útero das gatas foi principalmente no epitélio luminal e glandular e no miométrio, independente da fase do ciclo estral (Figura 6A), e não houve diferença significativa entre os grupos tanto na imunomarcação quanto na expressão de mRNA (Figura 6B-D).

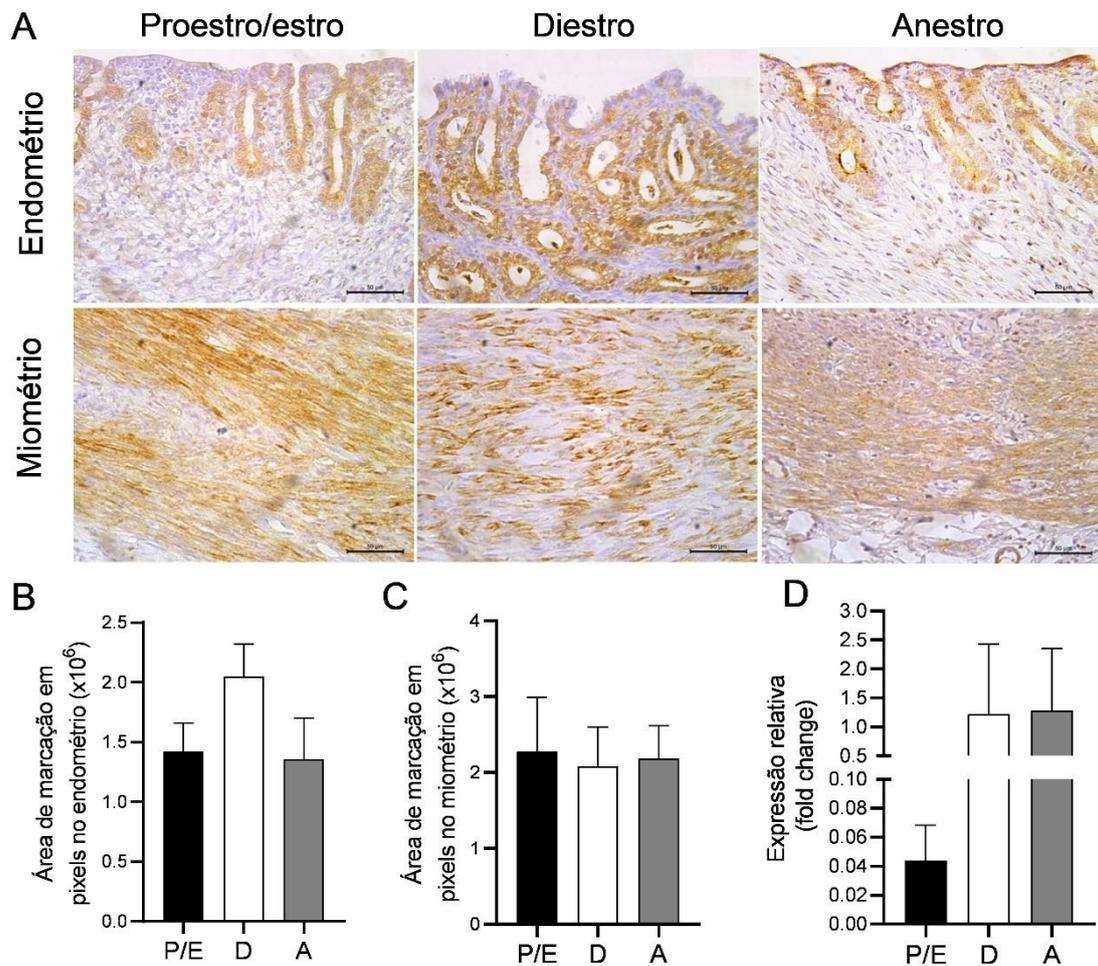


Figura 6- Expressão de AR no útero de gatas híidas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de AR no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcação em pixels da expressão de AR no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 6). D) Expressão gênica relativa de *Ar* no endométrio (média \pm SEM; n =5-6). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK; P/E= proestro/estro; D= diestro; A= anestro.

4.3.2 A expressão uterina de *SOD1*, *catalase* e *GPX* é modulada pelo ciclo estral em gatas domésticas

Considerando que as enzimas antioxidantes podem ser moduladas pelos esteroides sexuais e que *SOD1*, *catalase* e *GPX* são as principais enzimas envolvidas na manutenção do estado redox celular (GÓMEZ-ZUBELDIA *et al.*, 2002; RIZZO *et al.*, 2012), foi avaliado o perfil dessas enzimas no útero de gatas domésticas durante o ciclo estral e a sua correlação com os esteroides sexuais. A imunomarcação de *SOD1* no endométrio foi nuclear, citoplasmática e homogênea, principalmente no epitélio glandular (Figura 7A), com maior área de

imunomarcacão no diestro em relao ao proestro/estro e anestro (Figura 7B), enquanto no miomrio não houve diferença entre as fases do ciclo estral (Figura 7C). Na avaliao da expressão gênica, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 7D). No entanto, correlao gênica positiva foi observada entre a expressão endometrial de *Sod1* e *Pr* (Figura 7E), enquanto não houve correlao gênica significativa em relao a *Era* e *Ar* (Figura 7F-G).

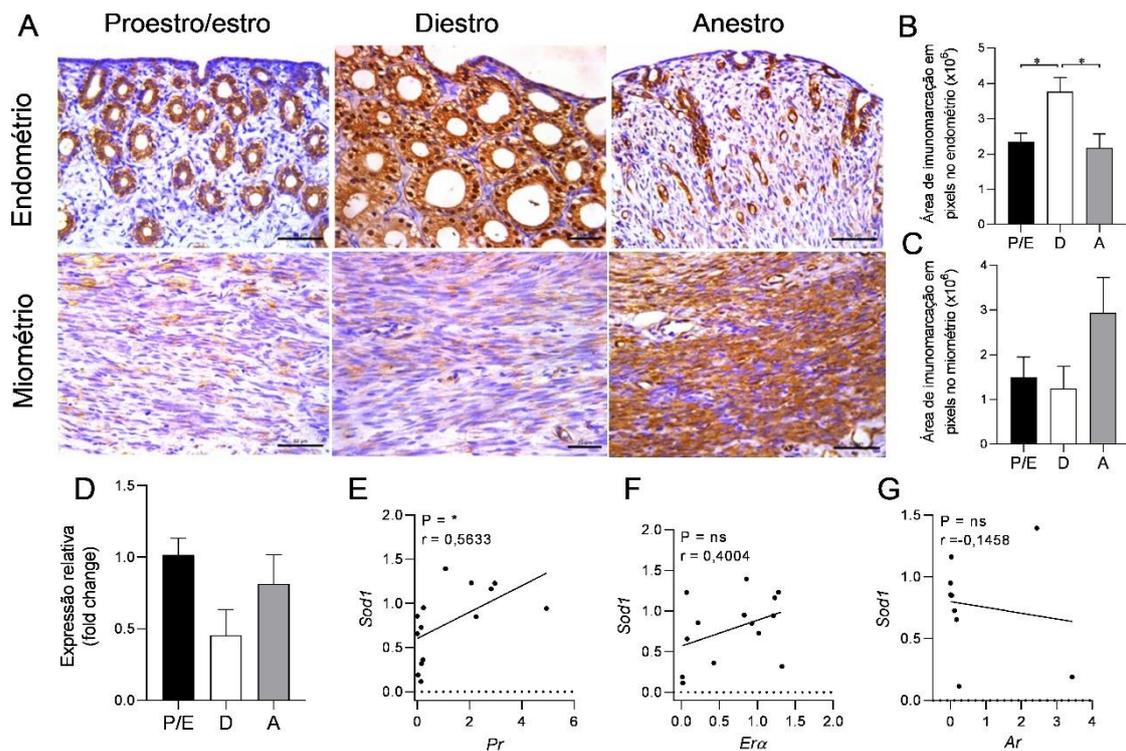


Figura 7- Expressão de SOD1 no útero de gatas hígidas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da marcao imuno-histoquímica de SOD1 no endomrio e miomrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) rea de imunomarcacão em pixels da expressão de SOD1 no endomrio (B) e miomrio (C) (média \pm SEM; n = 6). D) Expressão gênica relativa de *Sod1* no endomrio (média \pm SEM; n = 5-6). E-G) Correlao gênica da expressão de *Sod1* com *Pr* (E), *Era* (F) e *Ar* (G) no endomrio. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05. P/E= proestro/estro; D= diestro; A= anestro.

A imunomarcacão de catalase foi citoplasmática, heterognea e principalmente no epitelo luminal e glandular e nas células miometriais, com maior expressão endometrial e miometrial nas gatas em diestro em relao ao proestro/estro e anestro (Figura 8A-C). Em relao  expressão do mRNA, não houve diferença significativa na expressão de *Cat* entre os grupos (Figura 8D) e nem correlao gênica com a expressão de *Era*, *Pr* e *Ar* (Figura 8E-G)

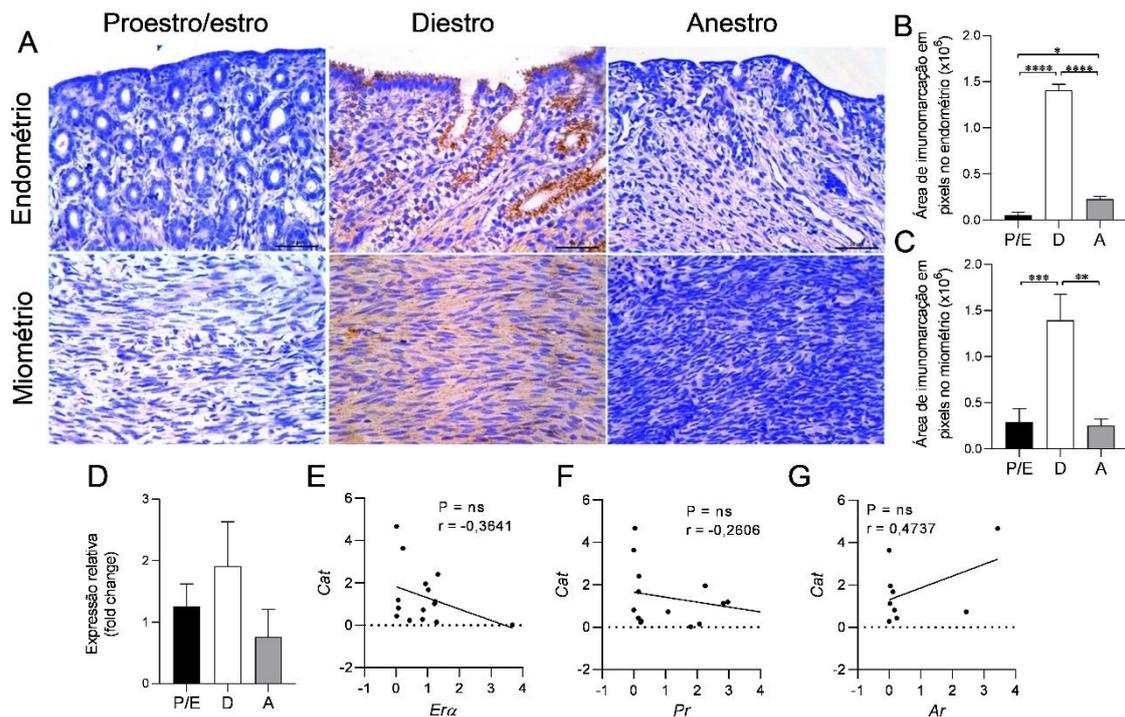


Figura 8- Expressão de catalase no útero de gatas híginas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de catalase no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcacão em pixels da expressão de catalase no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 6). D) Expressão gênica relativa de *Cat* no endométrio (média \pm SEM; n = 5-6). E-G) Correlação gênica da expressão de *Cat* com *Er α* , *Pr* e *Ar* no endométrio. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001. P/E= proestro/ estro; D= diestro; A= anestro.

Em relação a GPX1/2, a imunomarcacão foi nuclear, citoplasmática e homogênea, principalmente no epitélio luminal e glandular (Figura 9A). Não houve diferença significativa na área de imunomarcacão endometrial e miometrial entre os grupos (Figura 9B-C). No entanto, na análise gênica, menor expressão de transcritos para *Gpx1* foi observada no diestro em relação ao proestro/estro e anestro (Figura 9D). Não houve correlação gênica significativa de *Gpx1* com *Era*, *Pr* e *Ar* (Figura 9E-G).

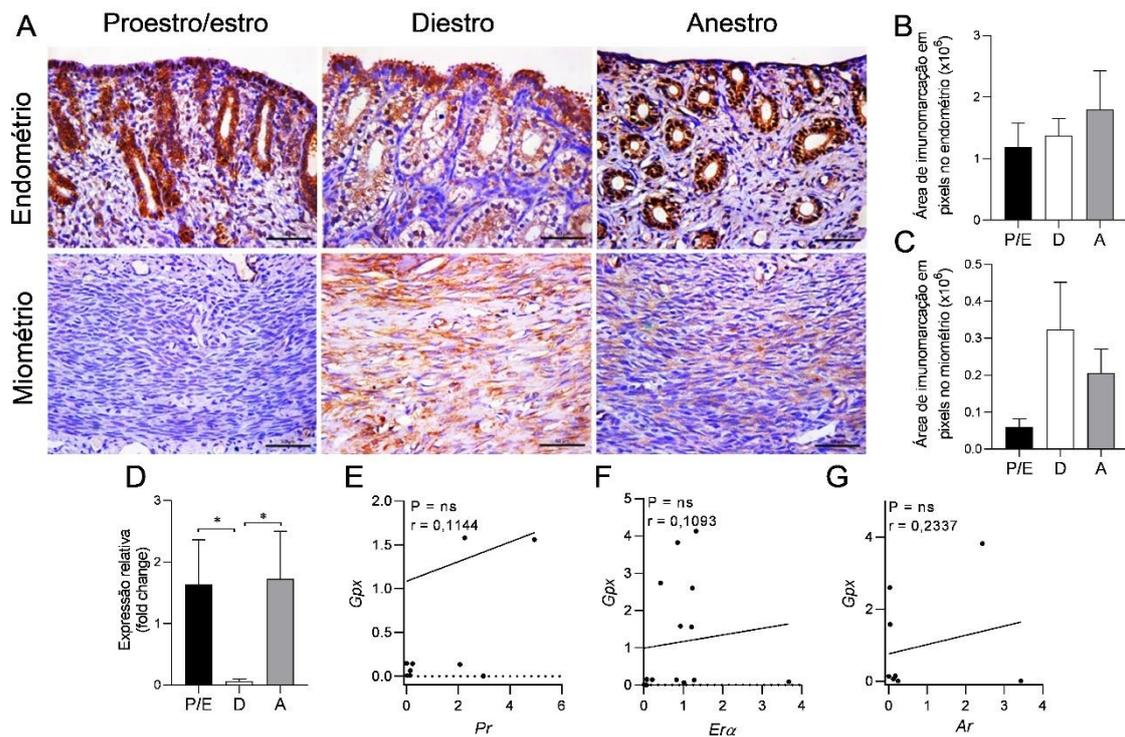


Figura 9- Expressão de GPX no útero de gatas hígdas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de GPX1/2 no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcacão em pixels da expressão de GPX1/2 no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 6). D) Expressão gênica relativa de *Gpx1* no endométrio (média \pm SEM; n = 5-6). E-G) Correlação gênica da expressão de *Gpx1* com *Era*, *Pr* e *Ar* no endométrio. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, * $P < 0,05$. P/E= proestro/estro; D= diestro; A= anestro.

4.3.3 A expressão de *ER α* e *PR* é aumentada no útero de gatas com piometra

Pelo fato de estudos terem demonstrado alterações na expressão dos receptores para esteroides sexuais no útero de cadelas com piometra (PRAPAIWAN *et al.*, 2017) e de haver poucas informações na literatura sobre gatas a esse respeito (MISIRLIOGLU *et al.*, 2006), avaliamos a expressão gênica e proteica de *ER α* , *PR* e *AR* no útero de gatas com piometra.

A imunomarcacão endometrial de *ER α* e *PR* foi maior nas gatas com piometra em relação às gatas hígdas em diestro (Figura 10A-B), enquanto no miométrio as gatas com piometra também apresentaram maior marcação de *PR* em comparação às gatas hígdas em diestro. Na análise de expressão gênica, semelhante à imunomarcacão, as gatas com piometra também apresentaram maior expressão de transcritos para *Era* e *Pr* em relação às gatas hígdas

em diestro (Figura 10C). Em relação ao AR, não houve diferença significativa na área de imunomarcacão e nem na expressão de mRNA entre os grupos (Figura 10 B-D).

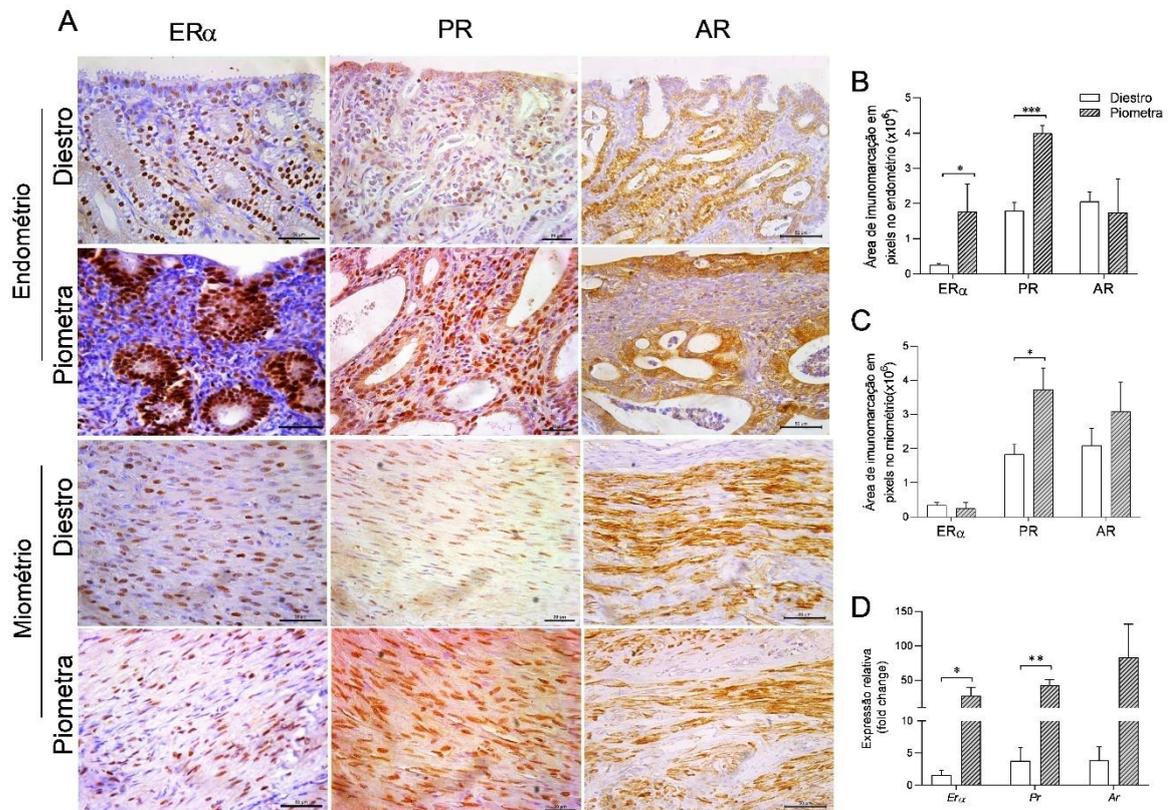


Figura 10- Expressão de *Er α* , PR e AR no útero de gatas hígdas em diestro e com piometra. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de ER α , PR e AR no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C) Área de imunomarcacão em pixels da expressão de ER α , PR e AR no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 4-6). D) Expressão gênica relativa de *Er α* , *Pr* e *Ar* no endométrio (média \pm SEM; n = 4-6). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

4.3.4 A expressão de catalase e *Gpx1* é alterada no útero de gatas com piometra

Considerando que cadelas com piometra apresentam aumento do estresse oxidativo no útero e redução da atividade de enzimas antioxidantes (GOGOI *et al.*, 2018; RAUTELA; KATIYAR, 2019), procuramos avaliar o perfil de expressão de SOD1, catalase e GPX no útero de gatas com piometra. Em relação à expressão de SOD1, não houve diferença significativa na imunomarcacão uterina entre os grupos, enquanto uma tendência de aumento de expressão no mRNA foi observada no útero das gatas com piometra em comparação às gatas hígdas em diestro (Figura 11D; P = 0,05). Em relação à expressão proteica, foi observado que a imunomarcacão endometrial de catalase reduziu nas gatas com piometra em relação às gatas

hígidas em diestro (Figura 11A-B). Por outro lado, a imunomarcação miometrial de GpX1/2 e expressão de mRNA de *Gpx1* estavam aumentados no útero das gatas com piometra em compara o às gatas hígidas em diestro (Figura 11A, C-D).

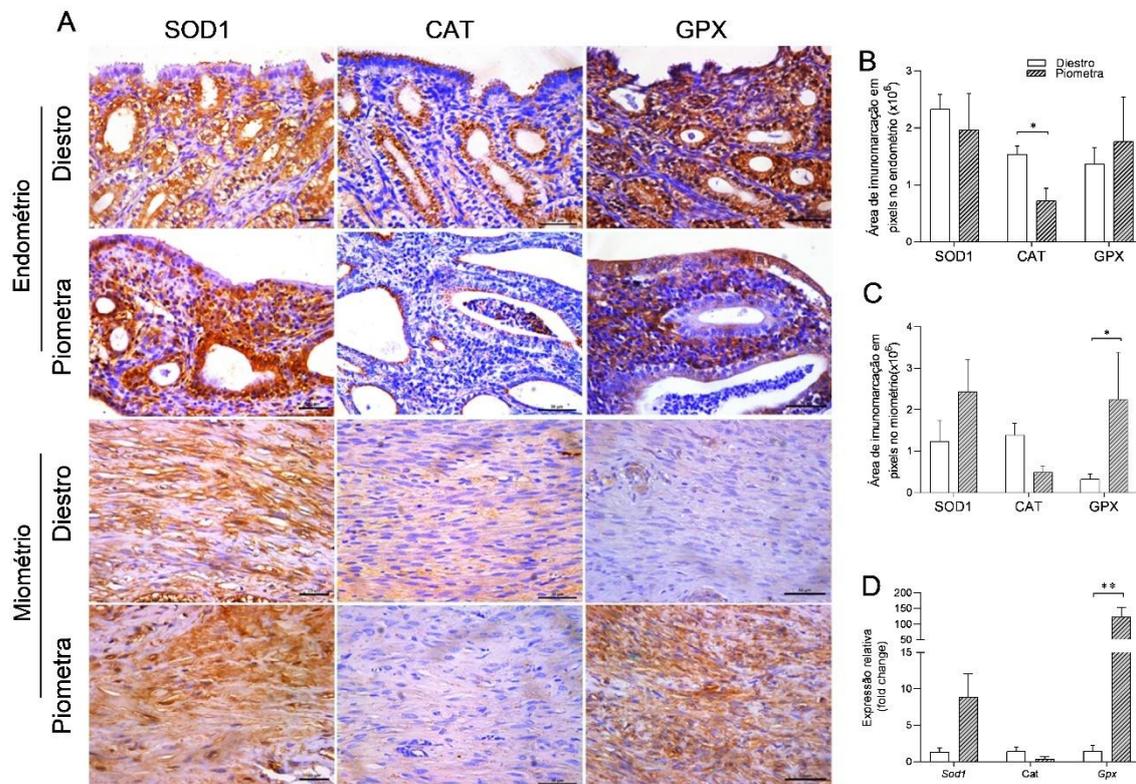


Figura 11- Expressão de SOD1, catalase e GPX no útero de gatas hígidas em diestro e com piometra. A) Fotomicrografias da marca o imuno-histoquímica de SOD1, CAT e GPX1/2 no endométrio e miométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-C).  rea de imunomarca o em pixels da expressão de SOD1, CAT e GPX1/2 no endométrio (B) e miométrio (C) (média \pm SEM; n = 4-6). D) Expressão gênica relativa de *Sod1*, *Cat* e *Gpx1* no endométrio (média \pm SEM; n = 4-6). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01.

4.3.5 A gesta o aumenta a expressão uterina de ER α e Pr em gatas domésticas

Uma vez que a modula o e sinaliza o adequada dos receptores para esteroides sexuais no útero durante a implanta o e placentaa o   vital para o sucesso gestacional (COPE *et al.*, 2022; HAMILTON *et al.*, 2017; CONNEELY *et al.*, 2001) e que não há informaçoes sobre o perfil de expressão desses mediadores na interface materno-fetal de gatas gestantes, avaliamos a expressão de ER α , PR e AR no útero de gatas no meio e final da gesta o.

Em rela o ao ER α , maior área de imunomarca o endometrial foi observada no meio da gesta o em rela o ao final da gesta o e às gatas em diestro não gestacional (Figura 12A-

B). Esse aumento da expressão no meio da gestação foi associado a maior imunomarcção de ER α no epitélio glandular superficial e profundo comparado ao final da gestação e diestro não gestacional (Figura 12D). No miométrio, maior imunomarcção de ER α também foi observada nas gatas no meio da gestação em relação ao final da gestação (Figura 13). Semelhante à expressão proteica, maior expressão de mRNA de *Era* foi observada no endométrio das gatas no meio da gestação em relação ao diestro não gestacional (Figura 12C).

Na avaliação do PR, não houve diferença significativa na área de imunomarcção endometrial e miometrial entre os grupos (Figura 12B; Figura 13). No entanto, na porcentagem de células imunomarcadas em cada região do útero, foi observada redução no epitélio glandular e células miometriais do útero gestante comparado ao útero em diestro não gestacional (Figura 12A e E), enquanto um aumento da imunomarcção em células estromais uterinas foi observado no meio da gestação em relação ao final da gestação e diestro não gestacional (Figura 12E). Redução da expressão de PR no epitélio luminal uterino também foi observada no final da gestação em relação ao meio da gestação (Figura 12E).

Em relação à imunomarcção e expressão gênica de AR, não foi observada diferença significativa entre os grupos (Figura 12A-C; Figura 13).

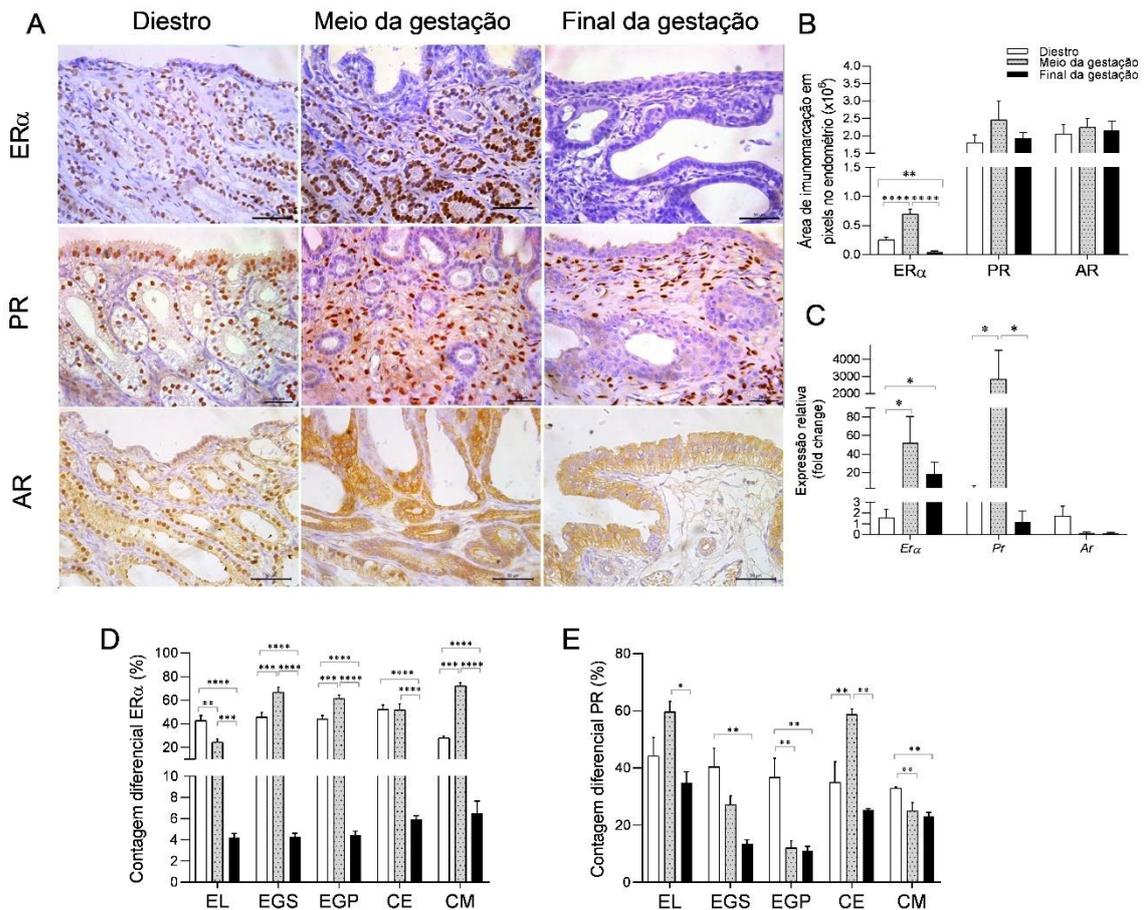


Figura 12- Expressão de ER α , PR e AR no útero de gatas em diestro não gestacional e de gatas no meio e final da gestação. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de ER α , PR e AR no endométrio (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B). Área de imunomarcacão em pixels da expressão de ER α , PR e AR no endométrio. C) Expressão gênica relativa de *Era*, *Pr* e *Ar* no endométrio (média \pm SEM; n = 4-6). D-E) Porcentagem de células imunomarcadas para ER α (D) e PR (E) no epitélio luminal e glandular, estroma e miométrio. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001. EL= epitélio luminal; EGS= epitélio glandular superficial; EGP= epitélio glandular profundo; CE= células estromais; CM= células miometriais.

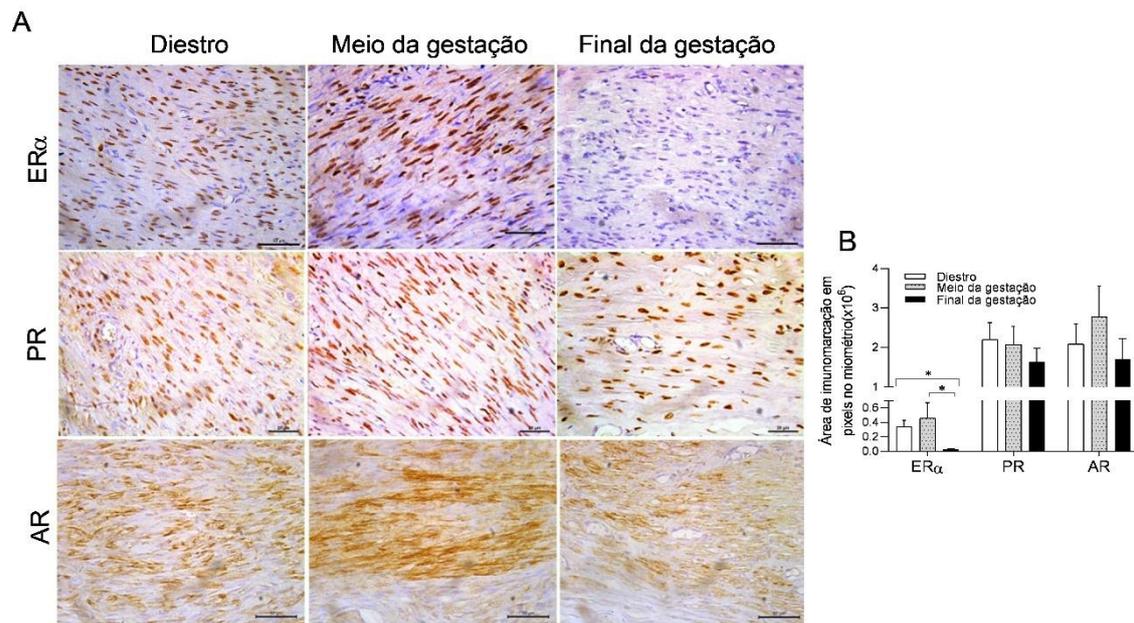


Figura 13- Expressão proteica de ER α , PR e AR no miométrio de gatas no diestro não gestacional, meio e final da gestação. A) Fotomicrografias de marcação imuno-histoquímica de ER α , PR e AR no miométrio. B) Área de imunomarcacão em pixels da expressão de ER α , PR e AR no miométrio (média \pm SEM; n = 6) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m).

4.3.6 A gestação modula a expressão uterina de enzimas antioxidantes em gatas domésticas

Uma vez que alterações na produção de ROS e expressão de enzimas antioxidantes no endométrio pode resultar em alterações reprodutivas como falhas na implantação, aborto e indução prematura do parto (MENDES *et al.*, 2019; WENDREMAIRE *et al.*, 2020) e que não há informações sobre o perfil de expressão de enzimas antioxidantes no útero de gatas gestantes, também avaliamos a expressão de SOD1, catalase e GPX no útero de gatas no meio e final da gestação.

A análise da imunomarcacão de SOD1 demonstrou que não houve diferença significativa na expressão endometrial e miometrial entre as gatas de meio e final de gestação em relação ao útero de gatas em diestro não gestacional (Figura 14A-B; Figura15), diferente da expressão do mRNA de *Sod1*, que apresentou maior expressão endometrial no meio da gestação em relação ao final da gestação e diestro não gestacional (Figura 14C).

Em relação à catalase, menor imunomarcacão endometrial foi observada no meio e final da gestação em relação ao diestro não gestacional (Figura 14A-B), enquanto um aumento na marcação ocorreu no final da gestação em relação ao meio da gestação, principalmente no estroma endometrial (Figura 14A-B). Em relação a imunomarcacão miometrial e expressão

gênica e proteica de *Cat* não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 14C; Figura 15).

A GPX1/2 demonstrou uma menor imunomarcção endometrial no final da gestação em relação ao meio da gestação e diestro não gestacional (Figura 14A-B), enquanto não houve diferença significativa na expressão miometrial entre os grupos (Figura 15). Por outro lado, na análise de expressão gênica, o endométrio do final da gestação apresentou maior expressão de transcritos para *Gpx1* em relação ao diestro não gestacional (Figura 14C).

Para uma melhor compreensão da interação entre enzimas antioxidantes e receptores de esteroides sexuais no útero de gatas gestantes, avaliou-se a correlação da expressão gênica das enzimas antioxidantes em relação à expressão de *Era*, *Pr* e *Ar*. No entanto, não houve correlação significativa entre os mediadores avaliados (Fig. 14D-L).

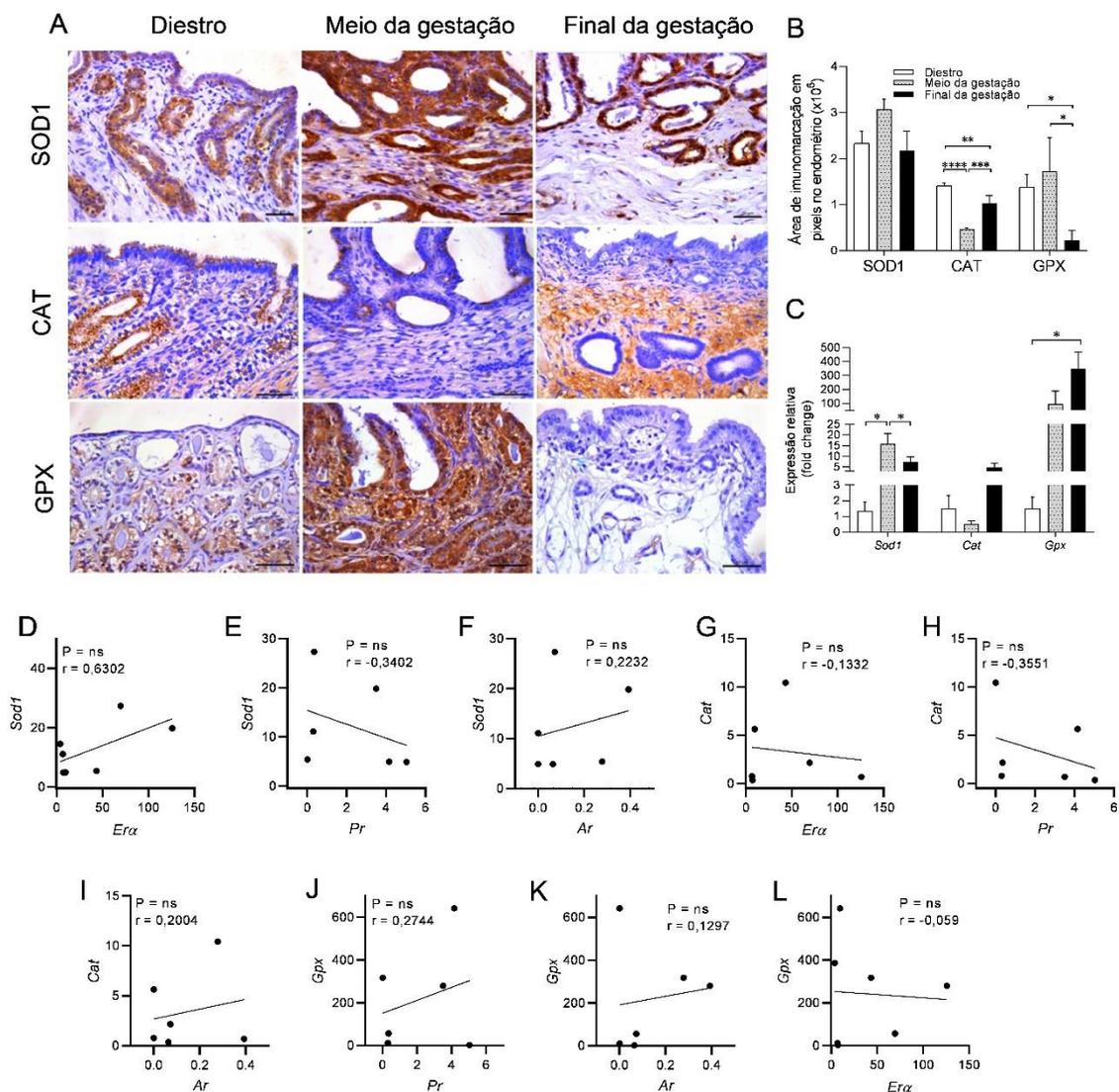


Figura 14- Expressão de SOD1, catalase e GPX no útero de gatas em diestro não gestacional e de gatas no meio e final da gestação. A) Fotomicrografias da marcação imunohistoquímica de SOD1, catalase e GPX1/2 no endométrio. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B) Área de imunomarcação em pixels da expressão de SOD1, catalase e GPX1/2 no endométrio. C) Expressão gênica relativa de *Sod1*, *Cat* e *Gpx1* no endométrio (média \pm SEM; n = 4-6). D-L) Correlação gênica da expressão de *Sod1*, *Cat* e *Gpx1* com *Era*, *Pr* e *Ar* no endométrio. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, ***P < 0,001, ****P < 0,0001.

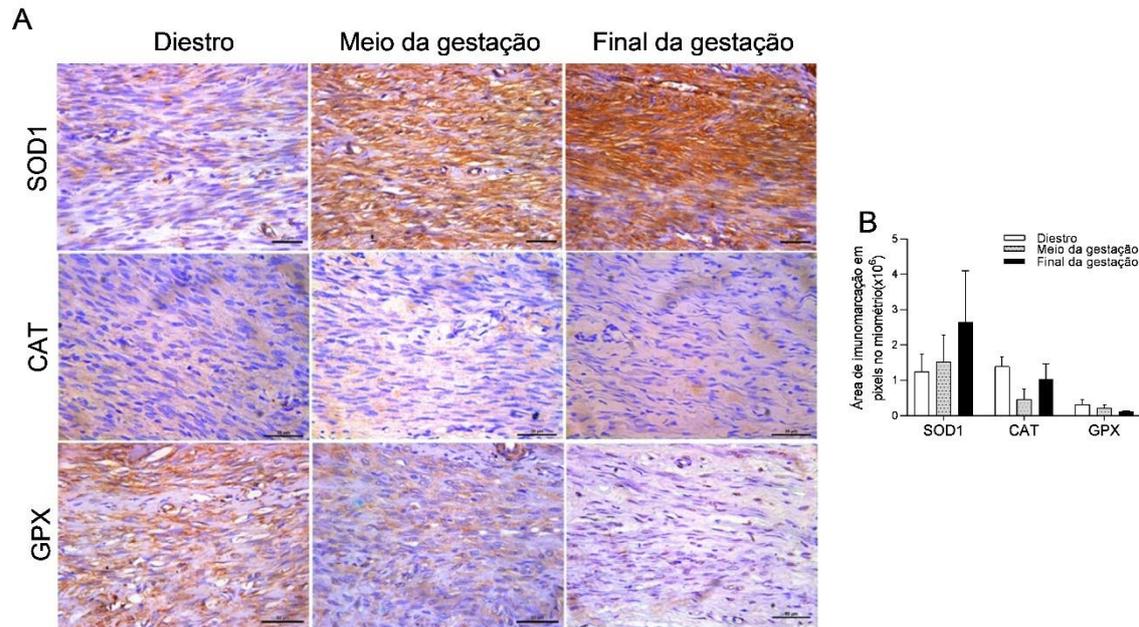


Figura 15- Expressão proteica de SOD, catalase e GPX1/2 no miométrio de gatas no diestro não gestacional, meio e final da gestação. A) Fotomicrografias de marcação imunohistoquímica de SOD, catalase (CAT) e GPX1/2 no miométrio. B) Área de imunomarcação em pixels da expressão de SOD, CAT e GPX1/2 no miométrio (média \pm SEM; n = 6) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m).

4.3.7 A expressão gênica placentária de *Era*, *Pr* e *Ar* é aumentada no final da gestação em gatas domésticas

Considerando que a placenta é uma das principais fontes de hormônios sexuais durante a gestação e que estes hormônios auto-regulam a função trofoblástica (CUI *et al.*, 2019; HE *et al.*, 2019; VONDRA *et al.*, 2019; HANEDA *et al.*, 2021; PEI *et al.*, 2022), avaliamos também o perfil de expressão de ER α , PR e AR na placenta de gatas domésticas. Na imuno-histoquímica foi observado que ER α e PR apresentaram expressão fraca ou nula na placenta de gatas tanto no meio quanto no final da gestação, diferente do AR que apresentou forte expressão citoplasmática e nuclear no citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto e células gigantes decíduais no meio da gestação em relação ao final da gestação (Figura 16A-B). Embora não tenha sido

observada diferença significativa na área de imunomarcção de ER α e PR entre o meio e final da gestação (Figura 16B), ambos apresentaram maior expressão nas células gigantes decíduais, com maior expressão no final da gestação em relação ao meio da gestação (Figura 16D-E). Não foi observada diferença significativa na imunomarcção de ER α e PR no citotrofoblasto entre o meio e final da gestação, enquanto no sinciotrofoblasto foi observado um aumento na expressão de ER α e uma redução de PR no final da gestação comparado ao meio da gestação (Figura 16D-E). Na expressão gênica, os três receptores hormonais, *Era*, *Pr* e *Ar*, apresentaram maior expressão de transcritos no final da gestação em relação ao meio da gestação (Figura 16C).

4.3.8 A expressão gênica placentária de *Gpx1* é aumentada no final da gestação em gatas domésticas

Considerando que o perfil oxidativo na placenta é variável de acordo com a fase gestacional e que a regulação adequada de enzimas antioxidantes é essencial para a ocorrência da implantação, placentação e parto (LU *et al.*, 2018; MORA AGÜERO; ZELEDÓN AGUILERA; VARGAS RUBIO, 2019; WENDREMAIRE *et al.*, 2020), foram também avaliadas a expressão de SOD1, catalase e GPX na placenta de gatas no meio e final da gestação. A imuno-histoquímica demonstrou que tanto SOD1 quanto GPX1/2 apresentaram forte expressão nuclear, citoplasmática e homogênea no citotrofoblasto, sinciotrofoblasto e células gigantes decíduais, sem diferença na área de imunomarcção entre as idades gestacionais (Figura 17A-B). A catalase, por outro lado, apresentou imunomarcção fraca ou nula em toda a placenta tanto no meio quanto no final da gestação (Figura 17A-B). Na análise da expressão dos transcritos, *Gpx1* apresentou maior expressão placentária de mRNA no final da gestação em relação ao meio da gestação, enquanto *Sod1* e *Cat* não apresentaram diferença significativa entre as idades gestacionais (Figura 17C). Também não foi observada correlação gênica significativa entre a expressão de *Sod1*, *Cat* e *Gpx1* e a expressão de *Era*, *Pr* e *Ar* (Figura 17D-L).

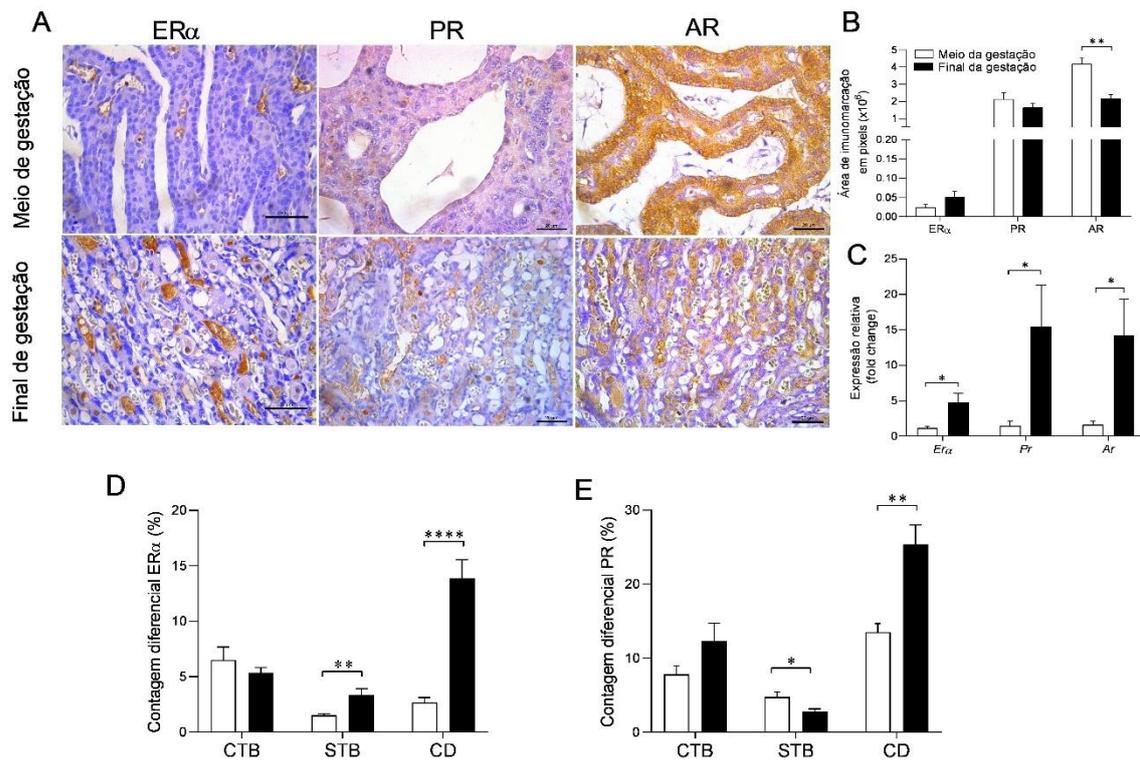


Figura 16- Expressão de ER α , PR e AR na placenta de gatas no meio e final da gestação. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de ER α , PR e AR na placenta. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B) Área de imunomarcagem em pixels da expressão de ER α , PR e AR na placenta. C) Expressão gênica relativa de *Er α* , *Pr* e *Ar* na placenta (média \pm SEM; n = 6). D-E) Porcentagem de células imunomarcadas para ER α (D) e PR (E) no citotrofoblasto, sinciotrofoblasto e células gigantes decíduais. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *P < 0,05, **P < 0,01, ****P < 0,0001. CTB = citotrofoblasto; STB = sinciotrofoblasto; CD = células gigantes decíduais.

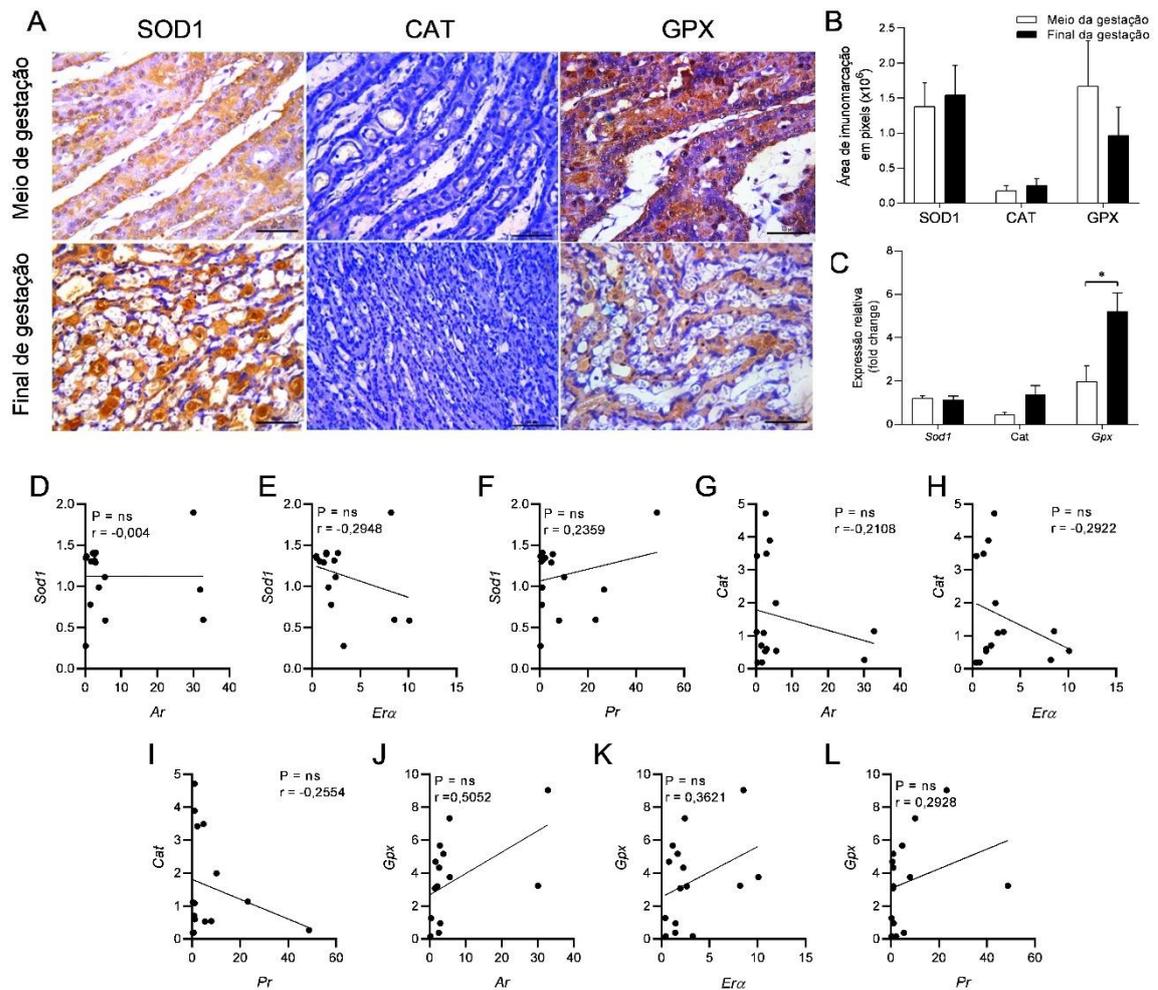


Figura 17- Expressão de SOD1, catalase e GPX na placenta de gatas no meio e final da gestação. A) Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de SOD1, catalase e GPX1/2 na placenta. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B) Área de imunomarcacão em pixels da expressão de SOD1, catalase e GPX1/2 na placenta. C) Expressão gênica relativa de *Sod1*, *Cat* e *Gpx1* na placenta (média \pm SEM; n = 6). D-L) Correlação gênica da expressão de *Sod1*, *Cat* e *Gpx1* com a expressão de *Era*, *Pr* e *Ar* na placenta. As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, * $P < 0,05$. CTB = citotrofoblasto; STB = sinciotrofoblasto; CD = células gigantes decíduais.

4.4 Discussão

O presente estudo demonstrou que a expressão uterina de receptores para esteroides sexuais e enzimas antioxidantes é modulado pelo ciclo estral em gatas domésticas, com redução da expressão de ER α e PR e aumento de SOD1 e catalase no diestro. Além disso, em gatas com piometra, há aumento da expressão gênica e proteica uterina de ER α , PR e GPX, enquanto ocorre redução de catalase. Já em gatas gestantes, há aumento da expressão uterina de ER α , *Pr* e *Sod1*, principalmente no meio da gestação, enquanto ocorre redução da expressão de catalase

na mesma idade gestacional. Por outro lado, no final da gestação, há aumento da expressão gênica placentária de *Era*, *Pr*, *Ar* e *Gpx1*.

O endométrio de gatas em diestro apresentou menor expressão de ER α e PR quando comparado a gatas no proestro/estro e anestro, principalmente no epitélio luminal e glandular, sugerindo que os elevados níveis plasmáticos de P₄ observados nesses animais durante essa fase do ciclo estral modula negativamente a expressão uterina dos receptores para esteroides sexuais. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que também demonstraram menor imunomarcagem de ER α no útero de ovelhas, éguas e cadelas na fase de diestro (VERMEIRSCH *et al.*, 1999, 2000; SILVA *et al.*, 2014; MARINKOVIĆ *et al.*, 2018; DUAN *et al.*, 2019), como também observado em gatas ovariectomizadas que apresentaram redução da expressão endometrial de ER α e PR após tratamento com P₄ (LI; BOOMSMA; VERHAGE, 1992). Curiosamente, nas gatas em anestro foi observada maior imunomarcagem de ER α e PR nas células estromais e miométrio em relação ao proestro/estro e diestro, semelhante ao observado em cadelas (VERMEIRSCH *et al.*, 1999, 2000; MARINKOVIĆ *et al.*, 2018), sugerindo que mesmo em um período de quiescência reprodutiva, o útero de cadelas e gatas se mantém responsivo aos esteroides sexuais. Em relação ao AR, um estudo em ovelhas demonstrou aumento da expressão proteica no estro (DUAN *et al.*, 2019), diferente do presente estudo de outros trabalhos que não verificaram diferença na expressão uterina ao longo do ciclo estral (VERMEIRSCH *et al.*, 2002).

Diferentemente da expressão de ER α e PR, SOD1 e catalase apresentaram maior imunomarcagem no útero das gatas em diestro, semelhante ao observado para SOD1 no útero de cadelas (SANTOS *et al.*, 2016), enquanto houve correlação gênica positiva entre *Pr* e *Sod1* no endométrio das gatas ao longo do ciclo estral. Em conjunto, esses dados sugerem que a P₄ modula positivamente a expressão dessas enzimas no útero de gatas. A manutenção adequada do estado redox é fundamental na preparação do útero para a gestação (AGARWAL *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2019), sendo que P₄ aumenta a expressão de SOD1 *in vivo* e *in vitro* durante a decidualização de células estromais uterinas de mulheres (SUGINO *et al.*, 2000c), enquanto a redução da expressão uterina de SOD1 foi associada a falha gestacional (SUGINO *et al.*, 2000b). No entanto, diferente de SOD1 e catalase, *Gpx1* apresentou menor expressão gênica endometrial nas gatas em diestro em relação ao proestro/estro e anestro, como também foi observado no útero de cadelas por Santos *et al.* (2016) que descreveram uma tendência de diminuição da imunomarcagem dessa enzima na fase lútea. Estudo em ratas demonstrou que a administração de P₄ reduz a atividade de GPX no útero (OHWADA *et al.*, 1996), corroborando

com os resultados do presente estudo. Isso sugere que a expressão das enzimas antioxidantes no útero de gatas é modulada diferentemente ao longo do ciclo estral.

Uma vez que alterações na expressão uterina de enzimas antioxidantes e receptores para esteroides sexuais estão associadas com a piometra em cadelas (PRAPAIWAN *et al.*, 2017; GOGOI *et al.*, 2018; RAUTELA; KATIYAR, 2019), também foi avaliada a expressão uterina de ER α , PR, AR, SOD1, GPX e CAT em gatas com piometra. O presente estudo demonstrou aumento da imunomarcção e expressão de mRNA de ER α , PR e GPX1 no útero com piometra em relação a gatas híginas em diestro, principalmente no endométrio, enquanto houve redução da imunomarcção de catalase. Semelhante ao presente estudo, Misirlioglu *et al.* (2006) observaram maior imunomarcção de ER α e PR no útero de gatas com piometra; estudos em cadelas com piometra também constataram aumento da imunomarcção de PR uterina (MARINKOVIĆ *et al.*, 2018). No entanto, diferente dos resultados de ER α deste estudo, Prapaiwan *et al.* (2017) observaram redução da imunomarcção endometrial de ER α em cadelas com piometra. Em conjunto, o presente trabalho sugere que a maior expressão uterina de ER α e PR em gatas com piometra esteja envolvido na patogênese dessa doença nesta espécie animal, uma vez que o desenvolvimento da piometra em cadelas e gatas depende de um estado hiperprogesterônico na fêmea e que pode ser precedido e agravado por um estado de hiperestrogenismo, uma vez que o estrógeno aumenta a responsividade uterina à P4 (RAUTELA; KATIYAR, 2019).

No entanto, a redução da imunomarcção de catalase observada no útero das gatas com piometra também pode estar envolvida na patogênese desta doença, uma vez que redução da atividade de SOD e catalase também foi demonstrada no útero de cadelas com piometra (TOYDEMIR KARABULT, 2018) e a catalase é um dos principais antioxidantes enzimáticos presentes na maioria dos organismos aeróbicos (NANDI *et al.*, 2019). Interessantemente, a redução da expressão uterina de catalase nas gatas com piometra foi acompanhada do aumento da expressão gênica e proteica de ER α e PR, ao contrário do que ocorre fisiologicamente no útero de gatas em diestro como demonstrado neste estudo. Além disso, estudos prévios demonstraram em ratas que a administração de E₂ aumenta a expressão de catalase no útero, enquanto a ovariectomia reduz a sua expressão (REZA SALEHI *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 1996), diferente do presente estudo em que gatas com piometra apresentando altos níveis plasmáticos de estradiol e maior expressão endometrial de ER α apresentaram redução da expressão uterina de catalase. Sugere-se que a catalase aumenta no útero de ratas após o tratamento com E₂ para controlar o aumento do estresse oxidativo causado por esse hormônio (GÓMEZ-ZUBELDIA *et al.*, 2001, 2002). Desse modo, a redução de catalase observada no

útero das gatas com piometra pode favorecer o desbalanço do estado redox no útero e a ocorrência dessa doença.

No entanto, diferente da imunomarcção de catalase, as gatas com piometra apresentaram aumento da expressão proteica e de mRNA de GPX1 no útero, diferente do que foi observado em cadelas com piometra que demonstraram redução da concentração uterina de dessa enzima (SZCZUBIAŁ *et al.*, 2019). É plausível que esse aumento de GPX1 no útero das gatas com piometra possa estar associado ao aumento de ER α e PR endometrial, uma vez que no presente estudo foi demonstrada redução fisiológica de *Gpx1* no endométrio de gatas em diestro concomitante à redução de ER α e PR. Além disso, correlação positiva foi observada entre os níveis plasmáticos de estradiol e uterinos de GPX em mulheres (SERVIDDIO *et al.*, 2002), como também observado na expressão uterina de GPX em ratas tratadas com estradiol (SUOJANEN; GAY; HILF, 1980), corroborando com os resultados do presente estudo. O aumento de GPX no útero das gatas com piometra também pode ser reflexo do aumento do estresse oxidativo tecidual, uma vez que o organismo aumenta a expressão de enzimas antioxidantes no intuito de controlar o aumento das ROS (MENDES *et al.*, 2019; WENDREMAIRE *et al.*, 2020). No entanto, mais estudos são necessários avaliando a ocorrência de estresse oxidativo no útero de gatas com piometra. É importante salientar que este é o primeiro estudo a avaliar concomitantemente a modulação de enzimas antioxidantes e receptores para esteroides sexuais no útero de gatas ao longo do ciclo estral e na condição de piometra.

Já em gatas gestantes, foi observado um aumento da imunomarcção uterina de ER α e da expressão gênica endometrial de *Era* e *Pr* comparado a gatas em diestro não gestacional, principalmente no meio da gestação, enquanto no final da gestação houve uma redução da imunomarcção de ER α comparado ao meio da gestação e diestro não gestacional. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram a importância do E₂ e da P₄ e seus receptores nos processos de decidualização, angiogênese e implantação embrionária (HANEDA *et al.*, 2021; PALMA *et al.*, 2020; CUI *et al.*, 2019; GEBRIL *et al.*, 2020; WU; LI; DEMAYO, 2018), sendo que falhas nessa sinalização estão associadas a aborto, problemas de implantação embrionária e no processo de decidualização (PIETTE, 2018; CUI *et al.*, 2019; HANEDA *et al.*, 2021; COPE; MONSIVAIS, 2022). Camundongos com deleção local do PR no útero apresentam falha na implantação embrionária e na receptividade uterina (GEBRIL *et al.*, 2020).

A redução da imunomarcção endometrial de ER α e da expressão gênica de *Pr* no útero das gatas ao final da gestação em relação ao meio da gestação pode ser reflexo da redução nos

níveis plasmáticos de E₂ e P₄ nessa idade gestacional, embora mais estudos sejam necessários para confirmar essa hipótese. Além disso, devido à proximidade do parto e a ação da P₄ no relaxamento uterino, há redução fisiológica dos seus receptores no final da gestação (ROBINSON *et al.*, 2001). A exposição prolongada a altos níveis de progesterona também causa sinalização negativa e diminuição da expressão de seus próprios receptores (LI; BOOMSMA; VERHAGE, 1992; VASQUEZ *et al.*, 2018; GEBRIL *et al.*, 2020), o que pode favorecer a redução da expressão endometrial de ER α e Pr nas gatas ao final da gestação.

Em relação às enzimas antioxidantes, foi observada uma redução da imunomarcção de catalase no útero gestante em relação ao diestro não gestacional, principalmente no meio da gestação, sendo que a expressão no final da gestação foi maior em relação ao meio da gestação, diferente da expressão endometrial de *Sod1* que foi maior no meio da gestação em relação ao diestro não gestacional. Esses resultados demonstram que a expressão de catalase e SOD1 são modulados diferentemente no útero de gatas durante a gestação e sugerem variação na ocorrência de estresse oxidativo uterino ao longo da gestação. Isso pode ser reflexo do perfil dos esteroides sexuais apresentado por esses animais ao longo da gestação, uma vez Sugino *et al.* (2000c) demonstraram que P₄ aumenta a expressão de SOD1 *in vivo* e *in vitro* durante a decidualização em mulheres (SUGINO *et al.*, 2000c). Além disso, foi demonstrado em ratas que o E₂ aumenta a expressão uterina de catalase como também o nível de estresse oxidativo, mas que na presença de P₄ há redução da concentração de malonaldeído (MDA) uterino e de catalase (GÓMEZ-ZUBELDIA *et al.*, 2001, 2002), reforçando a hipótese de menor estresse oxidativo no útero de gatas no meio da gestação em relação ao final da gestação.

Em relação à GPX no útero gestante, por outro lado, houve redução da imunomarcção no final da gestação em relação ao meio da gestação e diestro não gestacional, enquanto um aumento na expressão do mRNA foi observado ao final da gestação comparado ao diestro não gestacional. Esse aumento do mRNA pode ser reflexo da redução plasmática de P₄ observada nessa idade gestacional, uma vez que Ohwada *et al.* (1996) demonstraram em ratas que P₄ reduz a atividade de GPX no útero. No entanto, essa diferença observada na expressão gênica e proteica de GPX em gatas, especificamente no final da gestação, requer mais estudos.

Uma vez que o estabelecimento da interface materno-fetal depende não somente da modulação adequada dos receptores para esteroides sexuais e das enzimas antioxidantes no tecido uterino, mas também na própria placenta, uma vez que a mesma é uma fonte importante de hormônios sexuais e o processo de placentação sofre variação do estado redox tecidual ao longo da gestação, procuramos também descrever o perfil de expressão desses mediadores na placenta de gatas. Assim, demonstramos que há um aumento na expressão de mRNA de *Era*,

Pr e *Ar* na placenta de gatas ao final da gestação em relação ao meio da gestação, com aumento da imunomarcção de ER α e PR principalmente em células gigantes decíduais e de ER α no sinciciotrofoblasto. Esse aumento pode ser reflexo da redução dos níveis plasmáticos de P₄ nessa idade gestacional, uma vez que demonstramos redução da imunomarcção de ER α e PR no útero de gatas em diestro comparado ao proestro/estro e anestro e estudos anteriores também têm sugerido que P₄ modula negativamente a expressão uterina de ER α e PR (DUAN *et al.*, 2019; VERMEIRSCH, H. *et al.*, 2000; LI; BOOMSMA; VERHAGE, 1992). Curiosamente, redução da imunomarcção placentária de AR foi observada no final da gestação em relação ao meio da gestação, principalmente no sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto, diferente de bovinos em que foi demonstrado aumento da imunomarcção placentária no final da gestação (KHATRI; HOFFMANN; SCHULER, 2013). No meio da gestação, o AR apresentou forte marcação no sinciciotrofoblasto, citotrofoblasto e células gigantes decíduais, semelhante à imunomarcção descrita na placenta de cadelas (PARSONS; BOUMA, 2021). No entanto, estudos sobre o papel do AR e seu perfil de expressão durante a placentação de animais domésticos são ainda escassos, sendo o presente estudo o primeiro a descrever esse receptor hormonal na placenta de gatas. Assim, mais estudos são necessários sobre o papel do AR e a modulação da sua sinalização na placenta dessa espécie animal.

Em relação às enzimas antioxidantes, SOD1 e GPX1 apresentaram imunomarcção citoplasmática e nuclear no citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto e células gigantes decíduais, tanto no meio quanto no final da gestação, e sem diferença entre as idades gestacionais. A catalase, por outro lado, apresentou imunomarcção fraca ou ausente na placenta de gatas tanto no meio quanto no final da gestação, sugerindo que as principais enzimas antioxidantes envolvidas no controle redox placentário em gatas ao longo da gestação são a SOD e a GPX. No entanto, semelhante à expressão uterina, maiores níveis de mRNA de *Gpx1* foram observados na placenta no final da gestação em relação ao meio da gestação. Esse aumento também pode ser resultante da redução nos níveis de P₄ nessa idade gestacional, uma vez que P₄ regula negativamente a expressão de GPX (OHWADA *et al.* 1996). Isso sugere que os esteroides sexuais e as enzimas antioxidantes atuam de modo sinérgico durante a gestação, sendo que estudos já mostraram que P₄ estimula a expressão de SOD no estroma endometrial durante a gestação, enquanto camundongos com falha na expressão de GPX3 apresentam decidualização comprometida e redução da fertilidade (MENDES *et al.*, 2019).

4.5 Conclusão

Os achados deste estudo demonstraram que os receptores para esteroides sexuais, principalmente ER α e PR, e enzimas antioxidantes são modulados pelo ciclo estral e pela piometra no útero de gatas domésticas. Além disso, a gestação aumenta a expressão uterina de ER α , *Pr* e *Sod1* em gatas, enquanto há aumento da expressão gênica placentária de *Era*, *Pr*, *Ar* e *Gpx1* no final da gestação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A. et al. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: From molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 10, n. 8, p. 1375–1403, 2008.
- AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 49, n. 10, p. 1–31, 2012.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 1–21, 2005.
- AGUDELO, C. F. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in cats. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 27, n. 4, p. 173–182, 2005.
- AL-GUBORY, K. H. et al. Changes in activities of superoxide dismutase, nitric oxide synthase, glutathione-dependent enzymes and the incidence of apoptosis in sheep corpus luteum during the estrous cycle. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1725, n. 3, p. 348–357, 2005.
- AL-GUBORY, K. H. et al. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 25, n. 6, p. 551–560, 2012.
- AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, n. 10, p. 1634–1650, 2010.
- AL-SABBAGH, M. et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species mediate decidualization of human endometrial stromal cells in response to cyclic AMP signaling. **Endocrinology**, v. 152, n. 2, p. 730–740, 2011.
- 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. Progesterone, estrogen, and androgen receptors in the corpus luteum of the domestic cat, Iberian lynx (*Lynx pardinus*) and Eurasian lynx (*Lynx lynx*). **Theriogenology**, v. 86, n. 9, p. 2107–2118, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.026>>.
- ANDREWS, C. J. et al. Reproductive biology of the 38 extant felid species: a review. **Mammal Review**, v. 49, n. 1, p. 16–30, 2019.
- ASTAPOVA, O.; MINOR, B. M. N.; HAMMES, S. R. Physiological and Pathological Androgen Actions in the Ovary. **Endocrinology**, v. 160, n. 5, p. 1166–1174, 2019.
- BAFANA, A. et al. The basic and applied aspects of superoxide dismutase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 129–138, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.007>>.
- BEHL, R.; PANDEY, R. S. FSH induced stimulation of catalase activity in goat granulosa cells in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 70, n. 3–4, p. 215–221, 2002.
- BENIRSCHKE, K.; BURTON, G. J.; BAERGEN, R. N. Pathology of the human placenta, sixth edition. **Pathology of the Human Placenta**, p. 1–941, 2012.

BINDER, C. et al. Spontaneous ovulation in cats—Uterine findings and correlations with animal weight and age. **Animal Reproduction Science**, v. 209, n. July, 2019.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.07.005>>.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3289–3303, 2013.

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

BRÜTSCH, S. H. et al. Expression of inactive glutathione peroxidase 4 leads to embryonic lethality, and inactivation of the Alox15 gene does not rescue such knock-in mice. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 22, n. 4, p. 281–293, 2015.

BUKOVSKY, A. et al. Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 1–18, 2003a.

BUKOVSKY, A. et al. Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant - Comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, 2003b.

BULUN, S. E. Aromatase and estrogen receptor α deficiency. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 2, p. 323–329, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.12.022>>.

CÁRDENAS, H.; POPE, W. F. Androgen receptor and follicle-stimulating hormone receptor in the pig ovary during the follicular phase of the estrous cycle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 1, p. 92–98, 2002.

CELLS, S. et al. Expression in Differentiating Human Endometrial. v. 140, n. 10, 1999.

CHANG, C. et al. Androgen receptor (AR) physiological roles in male and female reproductive systems: Lessons learned from AR-Knockout mice lacking AR in selective cells. **Biology of Reproduction**, v. 89, n. 1, p. 1–16, 2013.

CHANTALAT, E. et al. Estrogen Receptors and Endometriosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2815, 17 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/8/2815>>.

CHATDARONG, K. et al. Hystero-graphic 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, Y. I. et al. NPGPx (GPx7): A novel oxidative stress sensor/transmitter with multiple roles in redox homeostasis. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 4, p. 1626–1640, 2016.

COLE, T. J.; SHORT, K. L.; HOOPER, S. B. The science of steroids. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 170–175, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.05.005>>.

CONNELLY, O. M. et al. Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: Lessons from knock-out mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 179, n. 1–2, p.

97–103, 2001.

COPE, D. I.; MONSIVAIS, D. **Progesterone Receptor Signaling in the Uterus Is Essential for Pregnancy Success** *Cells*, 2022. .

CUI, X. et al. Progesterone promotes embryo adhesion by upregulating c-Fos/c-Jun transcription factor-mediated poFUT1 expression†. **Biology of Reproduction**, v. 101, n. 4, p. 675–685, 25 out. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/101/4/675/5526216>>.

DA SILVA, T. F. P. et al. Sexual characteristics of domestic queens kept in a natural equatorial photoperiod. **Theriogenology**, v. 66, n. 6–7, p. 1476–1481, 2006.

DE BOSSCHERE, H. et al. Estrogen- α and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. **Animal Reproduction Science**, v. 70, n. 3–4, p. 251–259, 2002.

DEL RÍO, L. A.; LÓPEZ-HUERTAS, E. ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 7, p. 1364–1376, 2016.

DERUBERTIS, F. R.; CRAVEN, P. A.; MELHEM, M. F. Acceleration of diabetic renal injury in the superoxide dismutase knockout mouse: effects of tempol. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 56, n. 9, p. 1256–1264, 2007.

DI RENZO, G. C.; TOSTO, V.; TSIBIZOVA, V. Progesterone: History, facts, and artifacts. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 69, n. xxxx, p. 2–12, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.07.012>>.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Journal of comparative pathology**, v. 69, p. 237–250, 1959. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742\(59\)80023-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0368-1742(59)80023-0)>.

DRESSING, G. E. et al. Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: A review of regulation and physiological implications. **Steroids**, v. 76, n. 1–2, p. 11–17, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2010.09.006>>.

DUAN, H. et al. Expression of oestrogen receptor, androgen receptor and progesterone nuclear receptor in sheep uterus during the oestrous cycle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 10, p. 1305–1312, 2019.

FARR, J. N. et al. Independent Roles of Estrogen Deficiency and Cellular Senescence in the Pathogenesis of Osteoporosis: Evidence in Young Adult Mice and Older Humans. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 34, n. 8, p. 1407–1418, 2019.

FUENTES, N.; SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 116, p. 135–170, 2019.

FURUKAWA, S.; KURODA, Y.; SUGIYAMA, A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 11–18, 2014.

GARREL, C.; FOWLER, P. A.; AL-GUBORY, K. H. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. **Journal of Endocrinology**, v. 205, n. 1, p. 107–116, 2010.

GEBRIL, M. et al. Uterine Epithelial Progesterone Receptor Governs Uterine Receptivity through Epithelial Cell Differentiation. **Endocrinology (United States)**, v. 161, n. 12, p. 1–

16, 2020.

GHNEIM, H. K. et al. Superoxide dismutase activity and gene expression levels in Saudi women with recurrent miscarriage. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 3, p. 2606–2612, 2016.

GOGOI, J. et al. Effect of ovariohysterectomy on oxidative stress markers in pyometra affected bitches Effect of ovariohysterectomy on oxidative stress markers in pyometra affected bitches. n. July, 2018.

GÓMEZ-ZUBELDIA, M. A. et al. Influence of estradiol on oxidative stress in the castrated rat uterus. **Gynecologic Oncology**, v. 80, n. 2, p. 227–232, 2001.

GÓMEZ-ZUBELDIA, M. A. et al. Influence of estradiol and gestagens on oxidative stress in the rat uterus. **Gynecologic Oncology**, v. 86, n. 3, p. 250–258, 2002.

GRIFFIN, B. Prolific Cats: The Estrous Cycle. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 23, n. 12, p. 1049–1056, 2001.

GUERRA, R. C. et al. Modulation of the activities of catalase, Cu-Zn, Mn superoxide dismutase, and glutathione peroxidase in adipocyte from ovariectomised female rats with metabolic syndrome. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, 2014.

HABIB, L. K.; LEE, M. T. C.; YANG, J. Inhibitors of catalase-amyloid interactions protect cells from β -amyloid-induced oxidative stress and toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 50, p. 38933–38943, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.132860>>.

HAGMAN, R. et al. Incidence of pyometra in Swedish insured cats. **Theriogenology**, v. 82, n. 1, p. 114–120, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.03.007>>.

HAMILTON, K. J. et al. Estrogen Hormone Biology. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2017.

HANEDA, S. et al. Estrogens Regulate Placental Angiogenesis in Horses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12116, 9 nov. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/22/12116>>.

HE, W. H. et al. Estradiol promotes trophoblast viability and invasion by activating SGK1. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 117, n. May, p. 109092, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109092>>.

HEIT, C. et al. Catalase Deletion Promotes PreDiabetic Phenotype in Mice Claire. **Free Radic Biol Med**, v. 103, p. 48–56, 2018.

HIROTAKA, O. et al. Aberrant expression of glutathione peroxidase in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. **Fertility and Sterility**, v. Volume 74, n. 2, p. 313–318, 2000.

HO, Y. S. et al. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 13, p. 7765–7769, 1998.

HONG, S. H. et al. Expression of steroidogenic enzymes in human placenta according to the gestational age. **Molecular Medicine Reports**, v. 49, n. 5, p. 3903–3911, 2019.

HORIE, K. et al. Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human

endometrium, decidua, placenta and pathological conditions of the endometrium. **Human Reproduction**, v. 7, n. 10, p. 1461–1466, 1992.

HRYCIUK, M. M.; JEWGENOW, K.; BRAUN, B. C. Luteinizing hormone effect on luteal cells is dependent on the corpus luteum stage in felids. **Animals**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2021.

HSU, T. Y. et al. Expression of Androgen Receptor in Human Placentas from Normal and Preeclamptic Pregnancies. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 48, n. 3, p. 262–267, 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1028-4559\(09\)60301-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1028-4559(09)60301-6)>.

HUANG, Y. Y. et al. **Association between the genetic variants of glutathione peroxidase 4 and severity of endometriosis** **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2020. .

HWANG, I. et al. The impaired redox balance in peroxisomes of catalase knockout mice accelerates nonalcoholic fatty liver disease through endoplasmic reticulum stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 148, n. December 2019, p. 22–32, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.025>>.

IMAI, H. et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, n. 2, p. 278–286, 2003.

JACOBSEN, B. M.; HORWITZ, K. B. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 357, n. 1–2, p. 18–29, 2012.

JAWAD HASSAN, R.; HASSON AL-HUSSEINI, A. M. Estimation of catalase activity and Malondialdehyde levels in blood groups ABO of PCOS patients. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1294, n. 6, 2019.

JIA, M.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; GUSTAFSSON, J. Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 557–568, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.008>>.

JURKOVIČ, S.; OSREDKAR, J.; JANJA, M. Molecular impact of glutathione peroxidases in antioxidant processes. **Biochemia Medica**, v. 15, n. September, p. 406–420, 2007.

KAYA, H. S. et al. Roles of progesterone receptor A and B isoforms during human endometrial decidualization. **Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 6, p. 882–895, 2015.

KHATRI, P.; HOFFMANN, B.; SCHULER, G. Androgen receptor is widely expressed in bovine placentomes and up-regulated during differentiation of bovine trophoblast giant cells. **Placenta**, v. 34, n. 5, p. 416–423, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2013.01.018>>.

KNUTSON, T. P. et al. Phosphorylated and sumoylation-deficient progesterone receptors drive proliferative gene signatures during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 3, p. R95, 2012. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.com/content/14/3/R95>>.

KOMORI, T. Animal models for osteoporosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 287–294, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.028>>.

LAVANYA, C.; JAYACHITRA, S.; BALASUNDARAM, K. Histological features of

- placenta in domestic cat (*Felis catus*). v. 7, n. 1, p. 143–145, 2019.
- LEE, P. et al. Expression of progesterone receptor is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 96, n. 3, p. 671–677, 2005.
- 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.; 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.
- LI, W.; BOOMSMA, R. A.; VERHAGE, H. G. Immunocytochemical analysis of estrogen and progestin receptors in uteri of steroid-treated and pregnant cats. **Biology of Reproduction**, v. 47, n. 6, p. 1073–1081, 1992.
- 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. 33–45, 2012.
- LIN, H.-H. et al. Decreased mtDNA copy number and glutathione peroxidase in granulosa cells of polycystic ovary syndrome women. **Fertility and Sterility**, v. 102, n. 3, p. e263, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.896>>.
- LODHI, I. J.; SEMENKOVICH, C. F. Peroxisomes: A nexus for lipid metabolism and cellular signaling. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 380–392, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.002>>.
- LU, J. et al. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2018.
- LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n. 7, p. 1957–1997, 2011.
- LUO, Z.; YAO, J.; XU, J. Reactive oxygen and nitrogen species regulate porcine embryo development during pre-implantation period: A mini-review. **Animal Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 823–828, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.03.007>>.
- LYDON, J. P. et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. **Genes and Development**, v. 9, n. 18, p. 2266–2278, 1995.
- LYDON, J. P. et al. Reproductive phenotypes of the progesterone receptor null mutant mouse. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 56, n. 1–6, p. 67–77, 1996.
- MAKIEVA, S.; SAUNDERS, P. T. K.; NORMAN, J. E. Androgens in pregnancy: Roles in parturition. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 4, p. 542–559, 2014.
- MALANDAIN, E. et al. Follicular growth monitoring in the female cat during estrus. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1337–1346, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.002>>.
- MARINKOVIĆ, D. et al. Morphological characteristics and expression of estrogen and progesterone receptors in the canine endometrium during the estrus cycle, cystic endometrial hyperplasia and pyometra. **Acta Veterinaria**, v. 68, n. 3, p. 239–250, 2018.
- MASSAFRA, C. et al. Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual

cycle. **Journal of Endocrinology**, v. 167, n. 3, p. 447–452, 2000.

MAX, A. et al. Non-surgical contraception in male dogs and cats. **Acta Scientiarum Polonorum. Zootechnica**, v. 13, n. 1, p. 3–18, 2015.

MEAKIN, A. S.; CLIFTON, V. L. Review: Understanding the role of androgens and placental AR variants: Insight into steroid-dependent fetal-placental growth and development. **Placenta**, v. 84, n. November 2018, p. 63–68, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.03.006>>.

MENDES, S. et al. New insights into the process of placentation and the role of oxidative uterine microenvironment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

MIGLINO, M. A. et al. The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, v. 66, n. 6–7, p. 1699–1702, 2006.

MISIRLIOGLU, D. et al. Steroid receptor expression and HER-2/neu (c-erbB-2) oncoprotein in the uterus of cats with cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex. **Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine**, v. 53, n. 5, p. 225–229, 2006.

MORA AGÜERO, S. D. los Á.; ZELEDÓN AGUILERA, A. S.; VARGAS RUBIO, T. Estrés oxidativo y antioxidantes: efectos en el embarazo. **Revista Medica Sinergia**, v. 4, n. 5, p. 89–100, 2019.

MUELLER, S. O.; KORACH, K. S. Estrogen receptors and endocrine diseases: Lessons from estrogen receptor knockout mice. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, n. 6, p. 613–619, 2001.

MULAC-JERICEVIC, B. et al. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. **Science**, v. 289, n. 5485, p. 1751–1754, 2000.

NANDI, A. et al. Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

NIE, R. et al. Differential expression of estrogen receptors α and β in the reproductive tracts of adult male dogs and cats. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1161–1168, 2002.

NODA, Y. et al. Copper/Zinc superoxide dismutase insufficiency impairs progesterone secretion and fertility in female mice. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 1, p. 1–8, 2012.

OGAWA, S. et al. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor β gene-deficient (β ERKO) male and female mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 12887–12892, 1999.

OHWADA, M. et al. Glutathione peroxidase activity in endometrium: Effects of sex hormones and cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 60, n. 2, p. 277–282, 1996.

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. Disponível em: <<http://www.fio.edu.br/revistamv/arquivos/v5/PIOMETRA EM GATA - REVISÃO DE LITERATURA.pdf>>.

PARSONS, A. M.; BOUMA, G. J. **A potential role and contribution of androgens in placental development and pregnancy**Life, 2021. .

PEI, J. et al. Progesterone Attenuates SIRT1-Deficiency-Mediated Pre-Eclampsia.

- Biomolecules**, v. 12, n. 3, p. 422, 9 mar. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/12/3/422>>.
- PELICAN, K. M. et al. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 37–48, 2006.
- PIETTE, P. The history of natural progesterone, the never-ending story. **Climacteric**, v. 21, n. 4, p. 308–314, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/13697137.2018.1462792>>.
- 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.016>>.
- PRIETO, R.; SMOK, C.; ROJAS, M. Experiencias de blog: Placenta comparada. **International Journal of Morphology**, v. 29, n. 2, p. 432–435, 2011.
- RAMOS, R. S. et al. The periovulatory endocrine milieu affects the uterine redox environment in beef cows. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2015. Disponível em: <???.>.
- RAUTELA, R.; KATIYAR, R. Review on canine pyometra, oxidative stress and current trends in diagnostics. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 8, n. 2, p. 45–55, 2019.
- REYNAUD, K. et al. Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in the feline ovary. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 174–179, 2009.
- REZA SALEHI, O. et al. Interactive effect of aerobic training and estrogen consumption on serum levels of catalase and glutathione peroxidase enzymes in ovariectomized rats. **Jorjani Biomedicine Journal**, v. 8, n. 2, p. 38–47, 2020.
- RIZZO, A. et al. Roles of Reactive Oxygen Species in Female Reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 344–352, 2012.
- ROA, I.; SMOK, C. S.; PRIETO, R. G. Placenta : Anatomía e Histología Comparada. v. 30, n. 4, p. 1490–1496, 2012.
- ROBINSON, R. S. et al. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 965–979, 2001.
- SANTEN, R. J.; SIMPSON, E. History of estrogen: Its purification, structure, synthesis, biologic actions, and clinical implications. **Endocrinology**, v. 160, n. 3, p. 605–625, 2019.
- SANTOS, C. et al. Distribution of superoxide dismutase 1 and glutathione peroxidase 1 in the cyclic canine endometrium. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 738–748, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.027>>.
- SANTOS, L. C. et al. Pyometra and estrous cycle modulate the uterine expression of the kisspeptin system and angiogenic and immune factors in cats. **Biology of Reproduction**, v. 104, n. 3, p. 548–561, 2021.
- SAXENA, B. B. et al. Effect of immunization with bovine luteinizing hormone receptor on ovarian function in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 3, p. 292–298, 2003.
- SCARPIN, K. M. et al. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. **Nuclear**

receptor signaling, v. 7, p. 1–13, 2009.

SCHOOTS, M. H. et al. **Oxidative stress in placental pathology**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2018. v. 69

SEDEEK, M. et al. Role of reactive oxygen species in hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats. **American Journal of Hypertension**, v. 21, n. 10, p. 1152–1156, 2008.

SERVIDDIO, G. et al. Modulation of endometrial redox balance during the menstrual cycle: Relation with sex hormones. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 6, p. 2843–2848, 2002.

SIEMIENIUCH, M. J. et al. Placental origin of prostaglandin in the domestic cat. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

SILVA, E. S. M. et al. Expression of receptors for ovarian steroids and prostaglandin E2 in the endometrium and myometrium of mares during estrus, diestrus and early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 151, n. 3–4, p. 169–181, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.11.001>>.

SINGH, M. M. et al. Uterine estradiol and progesterone receptor concentration, activities of certain antioxidant enzymes and dehydrogenases and histoarchitecture in relation to time of secretion of nidatory estrogen and high endometrial sensitivity in rat. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 59, n. 2, p. 215–224, 1996.

SOOCH, B. S.; KAULDHAR, B. S.; PURI, M. Recent insights into microbial catalases: Isolation, production and purification. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1429–1447, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.09.003>>.

STANLEY, S. W.; PACCHIANA, P. D. Case Report Rapport de cas Uterine torsion and metabolic abnormalities in a cat with a pyometra. v. 49, n. April, p. 49–51, 2008.

STELLER, J. G.; ALBERTS, J. R.; RONCA, A. E. Oxidative stress as cause, consequence, or biomarker of altered female reproduction and development in the space environment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 1–26, 2018.

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.

SUGINO, N. et al. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 19–25, 2000a.

SUGINO, N. et al. Decreased superoxide dismutase expression and increased concentrations of lipid peroxide and prostaglandin F(2 α) in the decidua of failed pregnancy. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 7, p. 642–647, 2000b.

SUGINO, N. et al. Induction of superoxide dismutase by decidualization in human endometrial stromal cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 2, p. 178–184, 2000c.

SUGINO, N. **Reactive oxygen species in ovarian physiology** **Reproductive Medicine and Biology**, 2005. .

SUOJANEN, J. N.; GAY, R. J.; HILF, R. Influence of estrogen on glutathione levels and glutathione-metabolizing enzymes in uteri and R3230AC mammary tumors of rats. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 630, n. 4, p. 485–496, 1980.

SZCZUBIAŁ, M. et al. Uterine non-enzymatic antioxidant defence mechanisms (glutathione, Vitamin C, copper and zinc) in diagnosis of canine pyometra. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 22, n. 3, p. 549–555, 2019.

TAN, H. et al. Progesterone receptor-A and -B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: Implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 5, p. 719–730, 2012.

TOYDEMIR KARABULT, T. S. F. SOD, CAT, TBARS, and TNF- α Concentrations in Uterine Tissues of Bitches with Pyometra and Dioestrus Bitches. **Acta Veterinaria Eurasia**, n. November 2017, 8 out. 2018. Disponível em: <<http://actavet.org/en/sod-cat-tbars-and-tnf-concentrations-in-uterine-tissues-of-bitches-with-pyometra-and-dioestrus-bitches-1330>>.

TRABERT, B. et al. Progesterone and breast cancer. **Endocrine Reviews**, v. 41, n. 2, p. 320–344, 2019.

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.

VASETSKA, A. I.; MASS, A. A. The use of GnRH agonist for supression of cats reproductive function. **Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies**, v. 19, n. 73, p. 25–27, 2017.

VASQUEZ, Y. M. et al. FOXO1 regulates uterine epithelial integrity and progesterone receptor expression critical for embryo implantation. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 11, p. 1–27, 2018.

VENDOLA, K. A. et al. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 12, p. 2622–2629, 1998.

VERMEIRSCH, H. et al. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v. 51, n. 4, p. 729–743, jan. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X99000229>>.

VERMEIRSCH, H. et al. Immunohistochemical detection of progesterone receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 773–788, fev. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X99002733>>.

VERMEIRSCH, H. et al. Immunohistochemical detection of androgen receptors in the canine uterus throughout the estrus cycle. **Theriogenology**, v. 57, n. 9, p. 2203–2216, 2002.

VILHENA, H. et al. Acute phase proteins and antioxidant responses in queens with pyometra. **Theriogenology**, v. 115, p. 30–37, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.010>>.

VONDRA, S. et al. Metabolism of cholesterol and progesterone is differentially regulated in primary trophoblastic subtypes and might be disturbed in recurrent miscarriages. **Journal of Lipid Research**, v. 60, n. 11, p. 1922–1934, 2019.

WALKER, O. S. et al. **Reactive oxygen species from mitochondria impacts trophoblast fusion and the production of endocrine hormones by syncytiotrophoblasts** PLoS ONE, 2020. .

WALTERS, K. A.; ALLAN, C. M.; HANDELSMAN, D. J. Androgen actions and the ovary. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 3, p. 380–389, 2008.

WALTERS, K. A.; HANDELSMAN, D. J. Role of androgens in the ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 465, p. 36–47, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.06.026>>.

WELLS, P. G. et al. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, n. 2 SUPPL., p. 354–366, 2005.

WENDREMAIRE, M. et al. Macrophage-induced reactive oxygen species promote myometrial contraction and labor-associated mechanisms†. **Biology of Reproduction**, v. 102, n. 6, p. 1326–1339, 26 maio 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/102/6/1326/5804905>>.

WU, S. P.; LI, R.; DEMAYO, F. J. Progesterone Receptor Regulation of Uterine Adaptation for Pregnancy. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 7, p. 481–491, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.04.001>>.

WUTTKE, W.; JARRY, H.; SEIDLOVA-WUTTKE, D. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. **Hormones**, v. 9, n. 1, p. 9–15, 2010.

XU, X. et al. Differential expression and anti-oxidant function of glutathione peroxidase 3 in mouse uterus during decidualization. **FEBS Letters**, v. 588, n. 9, p. 1580–1589, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.043>>.

ZHENG, L. et al. A model of spontaneous mouse mammary tumor for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast cancer. **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 6, p. 2241–2249, 2014.

ZHOU, X. Roles of androgen receptor in male and female reproduction: Lessons from global and cell-specific Androgen Receptor Knockout (ARKO) mice. **Journal of Andrology**, v. 31, n. 3, p. 235–243, 2010.

APÊNDICE I

PROTOCOLO DO PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO

FIXAÇÃO

- Paraformol* 4% (24 horas)

DESIDRATAÇÃO

- Álcool 70% (pelo menos 2 horas)
- Álcool 80% (2 horas)
- Álcool 90% (2 horas)
- Álcool Absoluto I (2 horas)
- Álcool Absoluto II (2 horas)

DIAFANIZAÇÃO

- Xilol (15-20 minutos)

INCLUSÃO EM PARAFINA

- Banho de parafina (58-60° / 30 minutos);
- Emblocamento.

*Diluição de paraformol:

- 4 gramas de paraformol em 1 litro de PBS**.
- Homogenizar com auxílio de um agitador/aquecedor magnético em temperatura de 50-58 °C.

**Diluição de PBS:

- 7,2 gramas de NaCl
- 0,43 gramas de Fosfato de sódio monobásico
- 1,48 gramas de Fosfato de sódio bibásico
- 1 litro de água destilada

APÊNDICE II

PROTOCOLO DE COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA E EOSINA (H&E)

DESPARAFINIZAÇÃO

- Estufa (58-60°C /10 minutos)
- Xilol I (10 - 30 minutos)
- Xilol II (10 - 30 minutos)

HIDRATAÇÃO

- Álcool Absoluto I (1 – 5 minutos)
- Álcool Absoluto II (2 – 5 minutos)
- Álcool Absoluto III (3 – 5 minutos)
- Álcool 90% (5 minutos)
- Álcool 80% (5 minutos)
- Álcool 70% (5 minutos)
- Água destilada (3 minutos)

COLORAÇÃO

- Hematoxilina (40 segundos)
- Água corrente (10 minutos)
- Eosina (20 segundos)
- Água corrente (1-2 minutos)

DESIDRATAÇÃO

- Álcool 90% (mergulhar e retirar)
- Álcool absoluto I (5 – 15 minutos)
- Álcool absoluto II (15 - 20 minutos)
- Álcool absoluto III (15 – 20 minutos)

DIAFINIZAÇÃO E MONTAGEM DA LÂMINA

- Xilol (5 –10 minutos)
- Xilol (5 – 10 minutos)
- Montagem de lâmina com bálsamo do Canadá

APÊNDICE III

PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

1º DIA

DESPARAFINIZAÇÃO

- Estufa (58-60°C /40- 60 minutos)
- Xilol I (30 - 60 minutos)
- Xilol II (30 - 60 minutos)

HIDRATAÇÃO

- Álcool Absoluto I (5 minutos)
- Álcool Absoluto II (5 minutos)
- Álcool Absoluto III (5 minutos)
- Álcool 90% (5 minutos)
- Álcool 80% (5 minutos)
- Álcool 70% (5 minutos)
- Água corrente (5 minutos)

RECUPERAÇÃO DE EPÍTOPO (DM828)

Recomendação do Kit: Diluição em 1:50 = 7 mL de EnVision™ FLEX Target Retrieval (DM828) + 343 mL de dH2O

Ajustar pH para 6,0 (ácido cítrico)

- Incubação das amostras em banho-maria por 20 min em 95-99° C
- Incubação das amostras por 20 min em temperatura ambiente.
- Lavagem com Wash Buffer (DM831) diluído em 1:20 em dH2O (5 min)

BLOQUEIO DE PEROXIDASE

- EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM801) câmara úmida à temperatura ambiente (5 minutos).
- Lavagem com Wash Buffer (DM831) (5 min)

SORO BLOQUEIO E ANTICORPO PRIMÁRIO

- Protein block - câmara úmida à temperatura ambiente (30 minutos)

- Anticorpo Primário (overnight)- câmara úmida na geladeira

2º DIA

- Lavagem com Wash Buffer (DM831) (5 min)

PROTEÍNA ESTABILIZANTE

- EnVision™ FLEX + Mouse LINKER (SM804) - câmara úmida à temperatura ambiente (30 min)
- Lavagem com Wash Buffer (DM831) (5 min)

ANTICORPO SECUNDÁRIO

- EnVision™ FLEX HRP (SM802)- câmara úmida à temperatura ambiente (30 min)
- Lavagem com Wash Buffer (DM831) (5 min)

COLORAÇÃO

- EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827) - Diluição 1:50 em PBS diluído - câmara úmida à temperatura ambiente e protegido da luz (Tempo a depender do anticorpo)
- Água corrente (10 min)

CONTRACOLORAÇÃO

- Hematoxilina (40 segundos)
- Água corrente (15 minutos)

DESIDRATAÇÃO

- Álcool 70% (3 minutos)
- Álcool 80% (3 minutos)
- Álcool 90% (3 minutos)
- Álcool absoluto I (5 – 15 minutos)
- Álcool absoluto II (15 - 20 minutos)
- Álcool absoluto III (15 – 20 minutos)
- Álcool absoluto IV (15 – 20 minutos)

DIAFINIZAÇÃO E MONTAGEM DA LÂMINA

- Xilol (5 –10 minutos)
- Xilol (5 – 10 minutos)

- Montagem de lâmina com bálsamo do Canadá