

FILIPA MANUELA DA SILVA LÚCIO

**APOPTOSE FOLICULAR EM CADELAS E GATAS
AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO**

Orientador: Professor Doutor Daniel Murta

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2018

FILIPA MANUELA DA SILVA LÚCIO

**APOPTOSE FOLICULAR EM CADELAS E GATAS
AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 12 de Abril de 2018, segundo o Despacho Reitoral nº114/2018, perante a seguinte composição de Júri:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professor Doutor Rui Pedro Faísca

Orientador: Professor Doutor Daniel Murta

Vogal: Professor Doutor Manuel Pequito

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2018

Agradecimentos

Tenho a agradecer em primeiro lugar, aos meus pais, irmã e avós porque sem o apoio deles, nunca poderia ter iniciado este percurso.

A todos os professores que me acompanharam durante os seis anos de curso, em especial à professora Andreia Santos, ao professor João Requicha, ao professor Rui Onça, ao professor António Martinho, à professora Margarida Alves e à professora Ângela Martins.

Ao professor Daniel Murta pelo seguimento do meu trabalho e pela ajuda que me sempre disponibilizou.

A todos os médicos e enfermeiros veterinários que me ajudaram a nível de conhecimento e a nível pessoal durante o estágio no HV do Restelo, em especial ao Dr. Rui Rodrigues, Dra. Patrícia Lopes, Dra. Ana Eiras e ao Dr. Martinho Capelão.

A todas as médicas veterinárias do laboratório de parasitologia e patologia animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Università di Napoli.

À Carolina Cardoso pela ajuda na realização do trabalho laboratorial e a disponibilidade que me sempre prestou que tornou possível a concretização deste projecto.

A todos os colegas e amigos que me acompanharam durante todo este percurso, em especial à Joana Martins, Ana Santos, Beatriz Vítor, Carolina Dias, Catarina Oliveira, Sara Sousa, Soraia Alqueidão, Madalena Reis, Andreia Afonso, Beatrice Tadeu, Filipa Lyseight, ao Afonso Moura e ao João Campos.

Ao José Catarino pela grande ajuda que sempre me proporcionou durante todos estes anos e por ter sido a pessoa que mais me apoiou durante todo este percurso.

Resumo

O estudo da fisiologia reprodutiva dos animais de companhia tem uma grande importância tanto a nível da sua própria espécie, como também para estudos científicos de patologias do homem. O estudo da atresia folicular na cadela e na gata ainda é muito rudimentar. No entanto, a atresia folicular pode estar presente em qualquer fase folicular e em qualquer fase do ciclo éstrico em mamíferos.

Este trabalho teve como objectivo descrever o processo de atresia folicular ao longo da foliculogénese e nas fases do ciclo éstrico em cadelas e gatas, com a utilização da técnica laboratorial TUNEL.

Para a realização deste trabalho, foram analisados ovários de 7 cadelas e 8 gatas com idades compreendidas entre os 5 meses e os 2 anos, distribuídos por fase de ciclo éstrico.

Neste trabalho foi possível a observação de marcação de folículos em qualquer fase do ciclo éstrico e da foliculogénese. No entanto, as cadelas e as gatas em fases de diestro e anestro apresentaram uma maior evidência de marcação nas várias fases da foliculogénese.

As células com maior marcação em todas as amostras foram as células da granulosa nas várias fases de foliculogénese. Contudo, foi também possível observar marcação em oócitos em folículos primordiais em gatas e em folículos pré-antrais nas cadelas. Também se observou marcação em algumas células da teca interna em folículos pré-antrais e antrais em cadelas e em folículos antrais em gatas. Em alguns folículos antrais, a marcação era evidente nas células da granulosa e nas zonas de *cumulus oophorus* e *corona radiata*.

Com a realização deste estudo, foi possível concluir que a apoptose está presente em todas as fases da foliculogénese na cadela e na gata e em qualquer fase do ciclo éstrico, como referido em estudos anteriores de outras diferentes espécies.

Palavras-chave: Apoptose, atresia, foliculogénese, TUNEL, ovário, folículo

Abstract

The study of the reproductive physiology of companion animals is of great importance both at the level of their own species and for scientific studies of human pathologies. The study of follicular atresia in the female dog and cat is still very rudimentary. However, follicular atresia may be present at any follicular stage and at any stage of the mammalian oestrus cycle.

The aim of this study was to describe the follicular atresia along the folliculogenesis and in the stages of the oestrus cycle in female dogs and queens, using the TUNEL laboratory technique.

For the accomplishment of this work, ovaries of 7 female dogs and 8 queens with ages between 5 months and 2 years, distributed by phase of the cycle were analysed.

In this work it was possible to detect the positive labeling on follicles at any stage of the oestrus cycle and folliculogenesis. However, both species during diestrus and anestrus phases presented greater evidence of positive labeling in the various phases of folliculogenesis.

The cells with the highest positive labeling in all samples were the granulosa cells in the various phases of folliculogenesis. However, it was also possible to observe positive labeling in oocytes in primordial follicles in queens and in preantral follicles in female dogs. Positive labeling was also observed in some theca interna cells in preantral and antral follicles in female dogs and in antral follicles in queens. In some antral follicles, positive labeling was evident in granulosa cells and in the areas of *cumulus oophorus* and *corona radiata*.

With the realization of this study, it was possible to conclude that apoptosis is present in all phases of folliculogenesis in both species and in any phase of the cycle, as reported in previous studies of others different species.

Keywords: Apoptosis, atresia, folliculogenesis, TUNEL, ovary, follicle

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Introdução.....	1
Capítulo I - Relatório de estágio.....	2
1. Hospital Veterinário do Restelo	2
1.1. Actividades desenvolvidas no HVR	2
2. Faculdade de Medicina Veterinária da Università degli Studi di Napoli ...	5
2.1. Actividades desenvolvidas	5
Capítulo II – Introdução à Parte Experimental – Apoptose folicular em cadelas e gatas ao longo do ciclo éstrico	7
1. Introdução – Fisiologia da reprodução na cadela e na gata.....	7
1.1. Ciclo éstrico	7
1.1.1. Ciclo éstrico da cadela	8

1.1.2.	Ciclo éstrico da gata.....	11
1.2.	Citologia Vaginal.....	13
1.2.1.	Células epiteliais vaginais	14
1.2.2.	Determinar a fase do ciclo éstrico na cadela	15
1.2.3.	Determinar a fase do ciclo éstrico na gata.....	16
1.3.	Foliculogénese	17
1.4.	Ovulação	20
1.5.	Corpo Lúteo	21
2.	Apoptose celular.....	21
2.1.	Apoptose Folicular	23
3.	Tunel.....	25
Capítulo III – Apoptose folicular em cadelas e gatas ao longo do ciclo éstrico		26
1.	Objetivos	26
2.	Materiais e Métodos	26
2.1.	Critérios de inclusão	27
2.2.	Critérios de exclusão	27
2.3.	Recolha e processamento das amostras.....	27
2.4.	Métodos de monitorização do ciclo éstrico.....	27
2.4.1.	Citologia Vaginal	27
2.4.2.	Progesterona	28

2.5. TUNEL	28
2.6. Análise de Amostras	29
2.7. Contagem de Folículos	30
3. Resultados	31
3.1. Caracterização da amostra	31
4.1. Descrição da marcação TUNEL	32
4.1.1. Cadelas.....	32
4.1.2. Gatas	36
5. Discussão	39
6. Conclusão.....	41
7. Limitações de estudo	42
Bibliografia.....	43
ANEXOS.....	I
ANEXO I – Protocolo de Imunohistoquímica de cortes de parafina	II
ANEXO II – Soluções.....	IV

Índice de Figuras

Figura 1. Distribuição das actividades realizadas durante as rotações de cirurgia no HV do Restelo	4
Figura 2. Distribuição de horas em cada rotação durante o estágio curricular no HV do Restelo	4
Figura 3. Tempo nas rotações durante o estágio na Facoltà di Medicina Veterinária di Napoli (Unina).....	6
Figura 4. Fisiologia do ciclo éstrico da cadela.....	10
Figura 5. Fases do ciclo éstrico da gata.....	12
Figura 6. Gata com postura agachada. Comportamento normal observado na fase folicular (proestro ou estro) do ciclo	13
Figura 7. Desenvolvimento folicular na gata	18
Figura 8. Esquema representativo do desenvolvimento folicular.....	18
Figura 9. Folículo Antral de gata e a sua constituição	20
Figura 10. Citologia vaginal de cadela e de gata ao longo do ciclo éstrico realizadas para a dissertação “Desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na cadela e na gata” por Carolina Cardoso.....	28
Figura 11. Expressão de TUNEL ao longo do desenvolvimento folicular na cadela	34
Figura 12. Expressão do TUNEL ao longo do desenvolvimento folicular na gata.....	37

Índice de Tabelas

Tabela 1. Actividades desenvolvidas durante as várias rotações na área de cirurgias..	4
Tabela 2. Actividades realizadas durante a rotação de parasitologia veterinária na Unina	6
Tabela 3. Alterações citológicas em esfregaços vaginais da cadela durante o CE	16
Tabela 4. Diferenças morfológicas entre tipos de morte celular	22
Tabela 5. Número total de folículos observados em amostras de ovário de cadela	30
Tabela 6. Número total de folículos observados em amostras de ovário de gatas	30
Tabela 7. Número total de folículos marcados com TUNEL nas amostras de ovário de cadela.....	31
Tabela 8. Número total de folículos marcados com TUNEL nas amostras de ovário de gata	32
Tabela 9. Representação esquemática da marcação com TUNEL no desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na cadela	35
Tabela 10. Representação esquemática da marcação com TUNEL no desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na gata.....	38

Lista de Abreviaturas

% - Percentagem

°C – Graus Celcius

µm – Micrómetros

CE – Ciclo Éstrico

CG – Células da granulosa

CL – Corpo Lúteo

CO – *Cumulus oophorus*

CR – *Corona radiata*

DAB – Diaminobenzidina

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do Inglês: “*Deoxyribonucleic acid*”)

FSH – Hormona folículo-estimulante (do Inglês: “*Follicle-stimulating hormone*”)

GnRH – Hormona libertadora de gonadotropinas (do Inglês: “*Gonadotropin-releasing hormone*”)

h – Hora

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

HV – Hospital Veterinário

IHQ - Imunohistoquímica

Kg – Quilograma

LH – Hormona luteinizante (do Inglês: “*Luteinizing hormone*”)

ml – Mililitro

ng/ml – nanograma por mililitro

OVH – Ovariohisterectomia

P4 - Progesterona

PBS – Tampão Fosfato Salino (do Inglês: “Phosphate Buffered Saline”)

TA – Temperatura ambiente

TdT – Terminal deoxynucleotidyl transferase

TUNEL – TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling

W – Watts

ZP – Zona Pelúcida

Introdução

O estágio curricular que foi desenvolvido no final do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária decorreu unicamente sobre a área clínica médica e cirurgia de animais de companhia e exóticos, tendo sido possível estagiar em duas unidades diferentes de cuidados médico veterinários de países diferentes. A realização de um estágio dividido por dois períodos em unidades de países diferentes permitiu conhecer diferentes abordagens e práticas, assim como compreender a sua aplicação a realidades diferentes, tendo sido inegavelmente uma valorização do estágio.

Contudo, aceitei o desafio de, no final do estágio, me debruçar sobre um tema diferente do que foi desenvolvido durante o estágio. Assim, tive ainda oportunidade de passar alguns meses no Laboratório de Medicina Veterinária da FMV-ULHT onde me foi possível seguir uma linha de investigação já iniciada, mas focando-me num tema ainda não focado, a atresia folicular.

Este trabalho permitiu-me enfrentar desafios diferentes dos que normalmente surgem na clínica, mas cuja resolução me permitiu desenvolver competências pessoais e profissionais transversais às diferentes áreas do saber. Além disso, a realização deste trabalho partiu ainda do desejo de contribuir de forma activa para o aumento do conhecimento na reprodução de animais domésticos.

Assim, por forma a abordar todo o trabalho realizado durante o estágio, esta dissertação encontra-se dividida em três capítulos, versando o primeiro sobre o estágio em clínica médica e cirurgia de animais de companhia e exóticos, e os seguintes na introdução teórica ao tema desenvolvido no trabalho experimental e ao trabalho experimental propriamente dito e que foi conduzido no Laboratório de Medicina Veterinária da FMV-ULHT.

Capítulo I - Relatório de estágio

O estágio curricular na área clínica médica e cirurgia de animais de companhia e exóticos foi dividido em dois períodos, tendo decorrido um primeiro período de estágio no Hospital Veterinário do Restelo, em Lisboa, e um segundo período na Faculdade de Medicina Veterinária da Università degli Studi di Napoli, em Nápoles, Itália.

1. Hospital Veterinário do Restelo

O primeiro período do estágio, no Hospital Veterinário do Restelo teve a duração de 5 meses, desde o dia 1 de Setembro de 2016 até dia 27 de Janeiro de 2017, e decorreu sob a supervisão do Doutor Diogo Magno.

Este hospital foi inaugurado em Agosto de 2002 pelo Médico Veterinário Jorge Cid, na Rua Gregório Lopes no Restelo, em Lisboa. Emprega mais de 50 funcionários, dos quais 26 são médicos veterinários de grande profissionalismo distribuídos pelas diversas áreas de especialização. Este hospital está aberto 24 horas durante 365 dias por ano e oferece uma vasta gama de meios de diagnóstico e serviços de qualidade.

1.1. Actividades desenvolvidas no HVR

Durante o decorrer do estágio, foi possível acompanhar diversas áreas, tais como, medicina interna, medicina preventiva, imagiologia, internamento, oftalmologia, oncologia, anestesia e cirurgia, neurologia, ortopedia, odontologia, cardiologia e medicina do comportamento. O estágio esteve organizado por rotações, onde foi possível acompanhar um médico por rotação durante 15 dias com horário de 8 horas por dia. Como estagiária, pude observar consultas médicas, realizar exames de estado geral, discussão de casos clínicos, preparar medicação e realizar alguns tratamentos médicos sob a supervisão do médico responsável pela rotação.

Durante a rotação de internamento, o turno iniciava-se com passagem e discussão de casos clínicos entre médicos veterinários responsáveis pelo internamento com a participação dos estagiários. Posteriormente, eram realizados os exames físicos e administração de medicações aos internados, sob a supervisão da Dra. Sheila Pedrosa e o

Dr. Luís Lagoa. Foi possível o seguimento de todo o processo de comunicação de estado clínico aos donos dos animais e as suas altas.

Na rotação de medicina geral e interna assisti às primeiras consultas, onde se abordavam assuntos como a vacinação, desparasitação, castração/esterilização, higiene oral e todos outros cuidados a ter com um animais jovens, adultos e geriátricos. Também durante esta rotação tive a oportunidade de assistir a muitas ecografias abdominais.

Em oncologia, acompanhei durante cinco semanas, duas médicas veterinárias responsáveis pelo serviço de oncologia e ecografia do hospital: Dra. Ana Eiras e Dra. Patrícia Lopes. Segui casos oncológicos, desde de admissão do caso pela medicina interna até ao tratamento médico. Tive oportunidade de acompanhar várias sessões de quimioterapia, tendo conhecimento de todos os componentes a utilizar e as suas regras de segurança. Durante esta rotação, assisti a numerosas ecografias abdominais, punções de agulha fina e avaliações radiográficas.

Em oftalmologia, acompanhei o Dr. Diogo Magno especialista em oftalmologia do hospital. Segui vários casos oftalmológicos, observei exames de diagnóstico, cirurgias oftalmológicas e ecografias oculares.

Durante três semanas estive na rotação de cardiologia sob a supervisão da Dra. Susana Chaves. Acompanhei casos clínicos desde a admissão pela medicina interna, realização de ecocardiografias, radiografias e tratamento, participando em discussões de casos clínicos.

Nas várias rotações de cirurgia, acompanhei durante dois meses, três médicos veterinários diferentes: Dr. Rui Rodrigues, Dr. Miguel Ramos e Dr. Martinho Capelão. Nesta rotação tive a oportunidade de participar e ajudar em cirurgias de tecidos moles, ortopédicas e neurológicas, endoscopias e rinoscopias, incluindo todo o processo de anestesia. Assisti também a consultas do foro neurológico, ortopédico, onde nas quais, se realizaram exames neurológicos, radiográficos e ortopédicos. Acompanhei também todo o processo de exame de tomografia computadorizada, desde a anestesia até ao diagnóstico e tratamento.

Durante esta última rotação, as cirurgias de tecidos moles foram a actividade mais predominante, apresentando 61% das actividades realizadas, seguidas pelas cirurgias ortopédicas (23%), cirurgias neurológicas (11%) e cirurgias oftalmológicas (3%). (Tabela 1 e Figura 1)

Tabela 1. Actividades desenvolvidas durante as várias rotações na área de cirurgias

Cirurgias	Nº cirurgias	Percentagem	Cães	Gatos
Tecidos moles	35	61%	25	10
Ortopédicas	13	23%	11	2
Neurológicas	6	11%	6	0
Oftalmológicas	3	5%	3	0
Total	57	100%	45	12

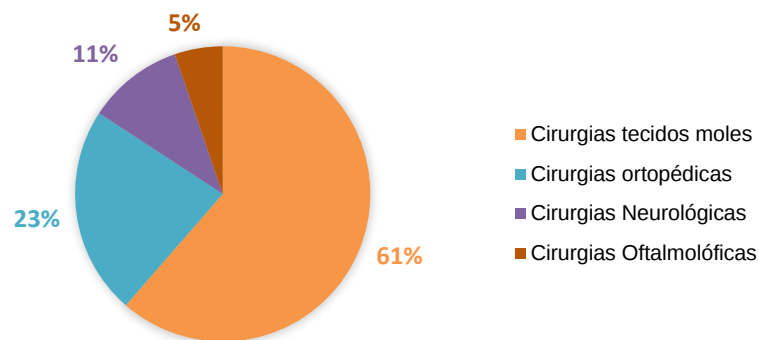


Figura 1. Distribuição das actividades realizadas durante as rotações de cirurgia no HV do Restelo

Durante o estágio curricular no Hospital Veterinário do Restelo, a rotação de Cirurgia, Neurologia e Ortopedia foi a mais realizada, representando 41% do número de horas de estágio, seguida pela rotação de oncologia (25%), cardiologia (12%), medicina interna (9%), internamento (9%) e oftalmologia (4%). (Figura 2)

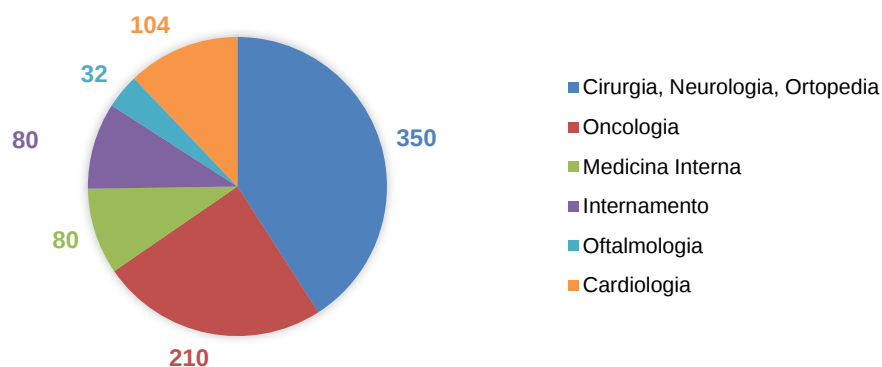


Figura 2. Distribuição de horas em cada rotação durante o estágio curricular no HV do Restelo

2. Faculdade de Medicina Veterinária da Università degli Studi di Napoli

O segundo período de estágio curricular foi realizado em Itália, na Università degli Studi di Napoli Federico II (Unina), no departamento de medicina veterinária, na área de clínica médica e cirúrgica de animais de companhia. A Universidade de Nápoles pertence ao grupo das universidades mais antigas do mundo, tendo sido fundada pelo Imperador Federico em 1224, localizada no Corso Umberto. O departamento de veterinária localiza-se na Via Federico Delpino em Nápoles, inserido num mosteiro do século XVI. Este estágio teve a duração de 2 meses e meio, desde o dia 13 de Fevereiro de 2017 até ao dia 21 de Abril de 2017, sob a supervisão da Professora Doutora Laura Rinaldi.

2.1. Actividades desenvolvidas

Como aluno estagiário, tive a oportunidade de acompanhar diversas áreas, tais como, a medicina interna, anestesia e cirurgia, imagiologia, parasitologia e patologia.

Durante uma semana estive integrada na rotação de cirurgia e medicina interna, tive a oportunidade de acompanhar médicos durante as consultas médicas, execução de exames de diagnóstico e posteriormente observar cirurgias de tecidos moles, cirurgias ortopédicas e oftalmológicas.

As actividades realizadas durante a rotação de patologia animal basearam-se na montagem de blocos de parafina e cortes em micrótopo para histologia, montagem de lâminas em etellan, observação de lâminas e a sua descrição.

Durante um mês e meio na rotação de parasitologia, tive oportunidade de realizar todo o tipo de procedimentos de diagnóstico parasitológico, tais como: esfregaços fecais (1%), esfregaços de sangue, teste de Knot para diagnóstico de microfilárias de *Dirofilaria immitis* e *repens* (12%), teste de pesquisa de *Babesia spp.* em amostras de sangue (7%), teste de diagnóstico coprológico criado na instituição: FLOTAC (72%) e Mini-FLOTAC (5%) para pesquisa de oocistos e larvas nas fezes de animais de companhia, animais de produção e exóticos, testes ELISA para pesquisa de *Giardia spp.* (1%), imunofluorescência para pesquisa de *Leishmania spp.* (1%), teste de Baermann para pesquisa de larvas intestinais (1%), entre outros. Tive também a oportunidade de participar em discussões de casos clínicos.

Tabela 2. Actividades realizadas durante a rotação de parasitologia veterinária na Unina

Procedimentos	Número	Percentagem
<i>FLOTAC</i>	150	72%
<i>Mini-Flotac</i>	10	5%
<i>Teste Knot</i>	25	12%
<i>Esfregaço sanguíneo</i>	14	7%
<i>Esfregaço fecal</i>	2	1%
<i>Baermann</i>	2	1%
<i>ELISA Giardia</i>	3	1%
<i>Imunofluorescência</i>	2	1%
<i>Total</i>	208	100%

No decorrer do estágio curricular na Università di Medicina Veterinária di Napoli, a rotação de Parasitologia Animal foi onde permaneci mais tempo (60%), seguindo das restantes rotações com tempos iguais de 10%, conforme se confirma na tabela 3.

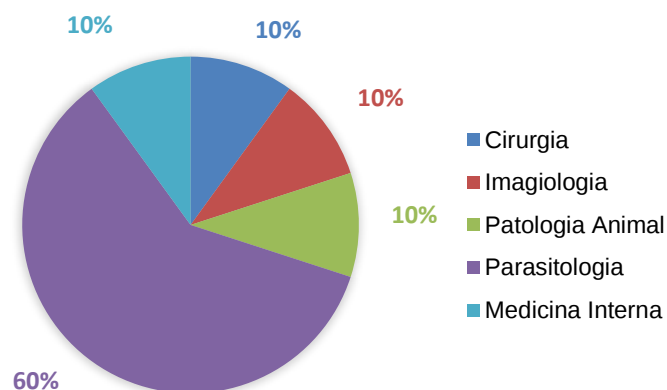


Figura 3. Tempo nas rotações durante o estágio na Facoltà di Medicina Veterinária di Napoli (Unina)

Capítulo II – Introdução à Parte Experimental – Apoptose folicular em cadelas e gatas ao longo do ciclo éstrico

1. Introdução – Fisiologia da reprodução na cadela e na gata

O estudo da fisiologia reprodutiva dos animais de companhia tem uma grande importância, não só no que concerne ao conhecimento e manipulação da reprodução destas espécies como também como estudos comparativos para a própria espécie humana. Durante séculos, o cão e o gato foram alvos de estudos fisiológicos e metabólicos, sendo considerados modelos de estudo de fisiologia e patologias no Homem (Songsasen, Fickes, Pukazhenth, & Wildt, 2009) (Tsai, Clark, & Murphy, 2007). Para além da utilização de animais de estimação como modelo de estudo em medicina humana, estes são também utilizados, muitas vezes, para o entendimento da fisiologia e reprodução de animais selvagens e reprodução de animais em vias de extinção (Durrant, Ravida, Spady, & Cheng, 2006), devido à facilidade de obtenção de informação das suas várias fases do desenvolvimento folicular (Bristol-Gould & Woodruff, 2006).

Apesar dos animais de companhia serem alvo de estudos científicos, estes continuam a reproduzir-se descontroladamente devido à pouca informação da sua biologia reprodutiva (Songsasen, Fickes, Pukazhenth, & Wildt, 2009). Por essa razão, é importante proceder-se ao estudo de forma mais abrangente sobre esta temática. Ao estudarmos a fisiologia reprodutiva dos gatos domésticos, estamos a estudar um modelo que representa a família *Felidae* composta por 37 espécies (Carrijo Jr., et al., 2010) e o cão doméstico, pertencendo à família *Canidae*, representa 37 espécies de animais. Dentro de cada família referida, o cão e o gato doméstico são as espécies que não se encontram em perigo ou em vias de extinção. (Songsasen, Nagashima, & Thongkittidilok, 2017) (Bristol & Woodruff, 2004)

1.1. Ciclo éstrico

O ciclo éstrico (CE) da cadela e da gata são constituídas pelas fase folicular e fase lútea. A fase folicular é constituída pela fase do proestro e estro enquanto que a fase lútea é

constituída pela fase do diestro. O interestro e o anestro são fases do ciclo em que o sistema reprodutor se encontra inactivo (Noakes, Parkinson, & England, 2009).

Proestro é a primeira fase do ciclo éstrico. É uma fase em que acontece o desenvolvimento folicular e, no caso de ciclos poliéstricos, a regressão do corpo lúteo (CL) do ciclo éstrico anterior. Em termos de alterações físicas, o útero aumenta de tamanho, o endométrio torna-se congestionado e edematoso e ocorre o aumento de secreções provenientes das glândulas secretoras do endométrio. A mucosa vaginal torna-se hiperémica, com maior número de camadas celulares e cornificação das suas últimas camadas. Nesta fase, podem-se observar algumas alterações na cadela como: edema vulvar, hiperémia e descargas sanguinolentas. (Noakes, Parkinson, & England, 2009). Trata-se da fase de preparação para o estro (Christie & Bell, 1971).

A seguir ao proestro, sucede-se outra fase folicular: o estro. Durante esta fase, a fêmea procura e aceita o macho. Ocorre também o aumento de secreção das glândulas uterinas, cervicais e vaginais e o cérvix torna-se relaxado. A ovulação acontece nesta fase e é um processo espontâneo na cadela. Na gata, este acontecimento é estimulado pelo coito (Noakes, Parkinson, & England, 2009).

A fase seguinte é o diestro. Trata-se de uma fase lútea, onde o corpo lúteo torna-se funcional, secretando progesterona para a manutenção de uma possível gravidez. As glândulas uterinas hipertrofiam, o cérvix contrai-se e a mucosa vaginal torna-se pálida. Após a fase de diestro, segue-se o anestro, fase em que o sistema reprodutor entra em repouso e o corpo lúteo regride (Noakes, Parkinson, & England, 2009).

1.1.1. Ciclo éstrico da cadela

O ciclo éstrico da cadela trata-se de um ciclo monoéstrico, tipicamente não sazonal (Concannon, 2011), constituído por quatro fases: o proestro, o estro, diestro e anestro, considerando o proestro como o início do ciclo. A fase de proestro em conjunto com a fase de estro, constituem a fase folicular do ciclo reprodutivo (Johnson, 2009). É um ciclo monoestrico por apresentar apenas uma fase de estro em cada ciclo e não sazonal porque a cadela pode apresentar estro em qualquer altura do ano. No entanto, alguns autores referem-se à ocorrência de sazonalidade, como acontece noutras espécies caninas. Christie e Bell (1971) fizeram um estudo em Inglaterra e em Gales, sobre a actividade reprodutiva em 20 raças de

cães, onde se confirmou que o proestro inicia-se entre Fevereiro e Maio com mais frequência do que noutra altura do ano. Normalmente ocorrem duas fases de estro por ano, que pode variar de um a quatro ciclos éstricos em algumas raças. O intervalo entre ciclos é variável entre cadelas e entre raças. Contudo, raças pequenas podem ter mais ciclos éstricos por ano do que raças grandes (Johnston, Kustritz, & Olson, 2001). Normalmente, o intervalo entre estros varia entre 5 a 12 meses (Concannon, 2011).

A puberdade acontece quando a cadela adquire a capacidade reprodutiva. Esta fase começa com o primeiro proestro e está associada ao momento em que a cadela atinge o tamanho adulto. Em raças pequenas, a puberdade normalmente acontece por volta dos seis a dez meses de idade, enquanto que em raças grandes, acontece perto dos dois anos de idade (Johnston, Kustritz, & Olson, 2001) (Concannon, 2011). As cadelas pré-púberes apresentam uma variabilidade maior de duração e características do ciclo éstrico. Muitas vezes, é normal não apresentarem comportamentos normais que caracterizam a fase de estro mesmo ocorrendo ovulação, ou então acontecer um cio silencioso (Johnston, Kustritz, & Olson, 2001).

O proestro é a primeira fase com duração variável entre 5 a 20 dias (Concannon, 2011). Em termos fisiológicos, a cadela entra em fase de proestro quando a secreção de hormona folículo-estimulante (FSH) e hormona luteinizante (LH) aumentam para dar início ao desenvolvimento folicular. Numa fase mais avançada do proestro, as concentrações de FSH vão diminuindo por feedback negativo pelo aumento da produção de estrogénio proveniente dos folículos. O estrogénio é a hormona responsável pelas características físicas presentes nesta fase do ciclo: descargas vulvares sanguinolentas, inchaço e edema vulvar. Entretanto, também é responsável pela proliferação e maturação das células do epitélio vaginal, ocorrendo a sua cornificação (Johnson, 2009). Através da vaginoscopia, pode-se observar uma mucosa edematosa com uma cor variável entre rosada e pálida com a presença de fluido sanguinolento e maior proeminência das pregas vaginais (Concannon, 2011). Nesta fase, a cadela atrai o macho através da libertação de feromonas na urina, na descarga vaginal ou pelos sacos anais. No entanto, a cadela não aceita o macho e por vezes, tem comportamentos de modo a evitar a monta, sentando-se no chão (Johnston, Kustritz, & Olson, 2001). Esta fase termina após o pico de estrogénio e o pico de LH. (Concannon, 2011)

A fase seguinte chama-se estro, tem a duração variável entre 5 a 15 dias. É nesta altura que a fêmea procura o macho e torna-se receptiva para a monta (Concannon, 2011). Em termos de características físicas, a vulva mantém-se ligeiramente edematosa, a descarga

vaginal diminui (Johnston, Kustritz, & Olson, 2001) e a mucosa apresenta-se mais enrugada do que na fase anterior (Concannon, 2011). Alguns dos reflexos podem ser observados, como a contração vulvar, o afastamento da cauda e a curvatura da coluna (Johnston, Kustritz, & Olson, 2001). Nesta fase, os folículos atingem os 8mm de diâmetro e a secreção de estrogénio aumenta, estimulando assim o pico de secreção de LH por feedback positivo, que por sua vez estimula a ovulação. Após a ovulação, as células restantes provenientes do folículo pré-ovulatório que permanecem no ovário, transformam-se em corpo lúteo e iniciam a secreção progesterona para a manutenção de uma possível gestação. Em algumas cadelas, a ovulação ocorre entre as 48 e 60 horas (Schaefers-Okkens, 2010) após o pico de LH (Johnson, 2009).

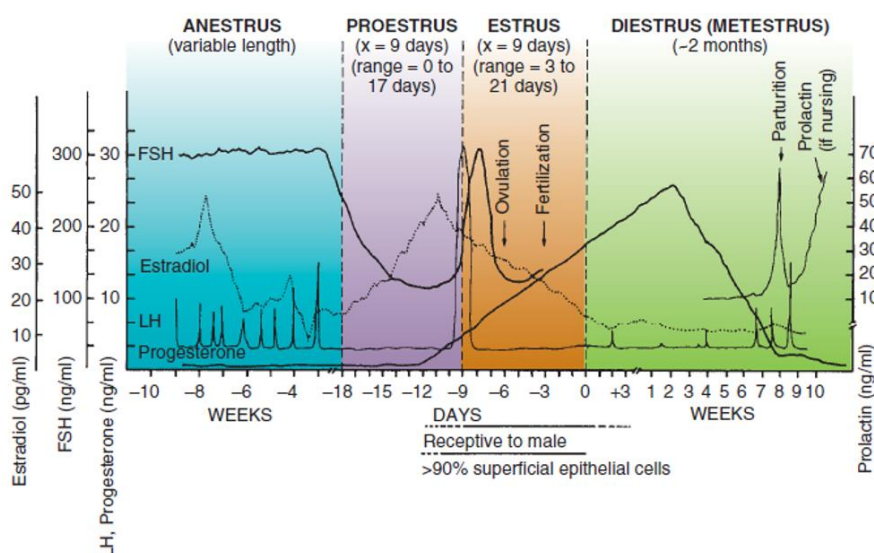


Figura 4. Fisiologia do ciclo éstrico da cadela. Retirado de Small Animal Internal Medicine, 4ª edição. Durante o anestro, as concentrações de FSH mantêm-se constantes e surgem picos de LH de curta duração. O aumento de secreção de FSH é importante para o início do desenvolvimento folicular e o arranque para a outra fase do CE, o proestro. Nesta fase, os folículos secretam estrogénio, com aumento gradual até ao momento da ovulação, diminuindo as suas concentrações posteriormente. O aumento das concentrações de estrogénio estimula o pico de LH através do feedback positivo no hipotálamo, ocorrendo a ovulação num espaço de 48 horas. Após a ovulação, as células restantes que faziam parte da constituição folicular, transformam-se em corpo lúteo e iniciam a secreção de progesterona para a manutenção de uma possível gestação. Se o ócito não é fertilizado, as concentrações de progesterona diminuem gradualmente e inicia-se a fase de diestro. (Johnson, 2009)

Após a ovulação, inicia-se uma fase lútea do ciclo éstrico: o diestro, com uma duração normal de 50 a 80 dias (Concannon, 2011). Nesta fase, os sinais e comportamentos demonstrados na fase anterior, diminuem. Uma citologia vaginal pode confirmar o início de diestro (ver “Determinar a fase do ciclo éstrico na cadela”). Em termos fisiológicos, a

progesterona produzida pelo CL aumenta nas primeiras semanas após ovulação e a sua diminuição é gradual ao longo da fase de diestro (Johnson, 2009).

A seguir ao diestro, segue-se a fase de anestro. Nesta fase, as hormonas LH e FSH continuam a ser secretadas, mesmo que esta fase seja considerada a fase do ciclo de repouso reprodutivo. Ocorre também a reparação do epitélio do endométrio (Johnson, 2009) até à próxima fase de proestro (Jöchle & Andersen, 1976).

1.1.2. Ciclo éstrico da gata

A gata entra em puberdade entre os 4 a 12 meses de idade, dependendo na raça, no peso e no fotoperíodo (Bristol-Gould & Woodruff, 2006). Em gatas com raça indefinida, um dos factores para atingir a puberdade é o peso. Normalmente o estro aparece quando as fêmeas atingem os 2,5kg, acontecendo por volta dos 7 meses de idade. Outro factor influenciador no aparecimento da puberdade é a altura do nascimento. Quando as fêmeas nascem no início do ano, é provável que atinjam a puberdade na altura do outono do mesmo ano e quando nascem na segunda metade do ano, a puberdade pode acontecer só na primavera do ano a seguir. Em gatas de raça pura, a altura da puberdade varia conforme a raça. Gatas de raça de pêlo comprido, normalmente atingem após um ano de idade, enquanto que raças orientais atingem aos cinco meses (Noakes, Parkinson, & England, 2009).

O CE da gata é constituído por seis fases: o proestro, estro, interestro, diestro e anestro. Trata-se de um ciclo poliestrico sazonal, controlado pelo número de horas de luz por dia e pelo aumento da secreção de melatonina. Gatas com exposição à luz natural deixam de ciclar durante os dias curtos do ano. No entanto, gatas que estão constantemente expostas a luz artificial ou que vivem em zonas equatoriais, mantém a ciclicidade (Johnson, 2009).

A fase folicular do CE é caracterizada pelo aumento das concentrações de estrogénio. Durante esta fase, a gata não apresenta alterações como a cadela (vulva edematosa, descargas vaginais, etc.) e por isso, só é detectada através das alterações de comportamento. O proestro é detectado quando a gata adopta comportamentos como vocalizações, esfregar-se com maior frequência em objectos e pessoas, apresentar postura agachada (Figura 6) e docilidade para com o macho. No entanto, a gata não aceita a monta. Normalmente esta fase tem duração de 1 a 2 dias e pode passar despercebida (Bristol-Gould

& Woodruff, 2006), (Johnson, 2009). Durante esta fase, o desenvolvimento folicular é induzido devido à libertação de FSH através da pituitária (Bristol-Gould & Woodruff, 2006).

É no estro que os comportamentos se tornam mais evidentes como a vocalização, o afastamento lateral da cauda, posição lordose, rolar no chão e receptividade para com o macho para a cópula (Bristol-Gould & Woodruff, 2006). Esta fase tem uma duração normal de 5 a 8 dias. Na gata, a ovulação acontece por estimulação mecânica dos receptores sensoriais localizados na vagina e no cérvix. Para uma correcta estimulação, recomenda-se que ocorra mais de 3 montas por dia durante os primeiros 3 dias do estro. Esta estimulação provoca uma secreção de LH pela glândula pituitária e 48 horas depois ocorre a ovulação. Contudo, existe uma percentagem de 35% a 60% de gatas que ovulam espontaneamente sem a presença de estímulo através do coito ou contacto com outros gatos (Johnson, 2009). No caso de ocorrer ovulação sem posterior gestação, a gata pode entrar em estro após um período de 45 dias (Solano-Gallego & Masserdotti, 2016).

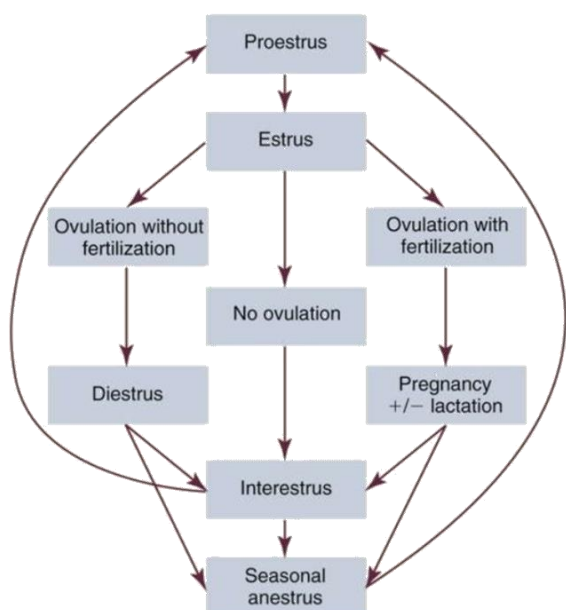


Figura 5. Fases do ciclo éstrico da gata. Retirado de Textbook of Veterinary Internal Medicine, 7ª edição. O ciclo começa com a fase de proestro que muitas vezes passa despercebida. Na fase de estro, a gata toma comportamentos mais evidentes e aceita o macho para cópula, estimulando a ovulação após 48 horas. Quando ovula sem resultar em gestação, a gata pode entrar em estro após um período de 45 dias. Quando a gata não é induzida a ovular, entra em fase de interestro quando as concentrações de progesterona e estrogénio são baixas. Por vezes, algumas gatas não entram em interestro e iniciam outra fase de estro quando as concentrações de estrogénio se mantêm altas. Após a ovulação, a gata entra em fase de diestro ocorrendo ou não a fertilização/gestação. Em seguida, a gata pode entrar em fase de proestro ou anestro sazonal ou lactacional.

Quando a gata não é induzida para ovular, entra em fase de interestro quando as concentrações de progesterona e de estrogénio são baixas. Esta fase normalmente dura entre 13 a 18 dias. Por vezes, algumas gatas não entram em interestro e iniciam outra fase de estro devido à permanência de concentrações altas de estrogénio. (Trass, 2009)

Após a ovulação, ocorre a fase lútea: o diestro, quando as células do folículo ovulatório se transformam em corpo lúteo. Este tem como função, a secreção de progesterona para manter uma possível gestação. Quando há fertilização, a progesterona continua a ser

secretada até ao 65º dia de gestação. No caso de ausência de fertilização, pode ocorrer uma pseudogestação e o corpo lúteo mantém-se por 30 a 40 dias (Johnson, 2009) (Bristol-Gould & Woodruff, 2006). Após esta fase, a gata pode entrar em fase de proestro ou em anestro sazonal ou lactacional (ver Figura 5). (Trass, 2009)

O anestro sazonal ocorre após a fase de diestro ou interestro quando o número de horas de luz por dia é menor que 8. No hemisfério norte, esta fase normalmente inicia-se no fim de Outubro e termina no início de Janeiro, quando o número de horas de luz aumenta. O anestro lactacional ocorre depois da gestação e pode permanecer até 3 semanas após o desmame das crias (Trass, 2009). Durante a fase de anestro, as concentrações de estrogénio e progesterona estão em níveis basais e a gata encontra-se sexualmente inactiva (Bristol-Gould & Woodruff, 2006).



Figura 6. Gata com postura agachada. Comportamento normal observado na fase folicular (proestro ou estro) do ciclo. Retirado de <http://anaquevedodicasvet.blogspot.pt/2011/09/cio-dos-gatos.html>

1.2. Citologia Vaginal

A citologia mais frequente em medicina veterinária é o exame citológico vaginal para estadiamento do ciclo éstrico da cadela e da gata (Solano-Gallego & Masserdotti, 2016) e determinar a melhor altura para reproduzir (Holst & Phemister, 2001). É um meio de diagnóstico importante porque o epitélio vaginal sofre alterações conforme a secreção das hormonas ovárias que varia ao longo do ciclo éstrico (Holst & Phemister, 2001). Trata-se de um procedimento fácil, utilizando uma zaragatoa embebida em solução salina que é introduzida na vagina com uma inclinação cranio-dorsal. Durante a inserção, deve-se afastar a vulva com luvas e evitar o contacto com o vestíbulo e a fossa do clitóris devido à presença de grande população de células superficiais queratinizadas que podem interferir com a interpretação verdadeira da citologia. Após a inserção da zaragatoa, devem ser realizados movimentos rotativos para a colheita de células do epitélio e efectuar um esfregaço em lâminas de microscópio. Para a visualização através do microscópio, deve ser realizada a coloração das lâminas (Solano-Gallego & Masserdotti, 2016).

Existem diversas colorações que podem ser utilizadas. A coloração Diff-Quik é rápida, apresenta bons resultados e é fácil de usar na prática clínica. As amostras devem ser secas ao ar e ser submersas nas duas soluções que constituem este tipo de coloração. É uma boa coloração, pois permite um armazenamento prolongado das amostras (Holst & Phemister, 2001).

1.2.1. Células epiteliais vaginais

Numa citologia vaginal normal, é possível encontrar vários tipos de células: as células basais, parabasais, intermediárias, superficiais e metaestrícas (Solano-Gallego & Masserdotti, 2016).

As células basais encontram-se na lâmina basal do epitélio vaginal e são estas que dão origem a todas as outras células mencionadas anteriormente. São células redondas de pequeno tamanho caracterizadas por núcleo redondo e por citoplasma basófilo reduzido. Raramente são observadas nas citologias devido à sua localização profunda (Solano-Gallego & Masserdotti, 2016).

As células parabasais são as células mais pequenas que constituem o epitélio vaginal, podendo ter um diâmetro compreendido entre 10µm a 20µm. A sua forma pode variar entre o redondo e a oval e tem o maior rácio de núcleo/citoplasma de todas as células epiteliais vaginais (Holst & Phemister, 2001). O núcleo é redondo e o citoplasma é basófilo. Quando estas células contêm vacúolos citoplasmáticos, dominam-se por “células espumosas” (Solano-Gallego & Masserdotti, 2016).

As células intermédias podem ter tamanhos variados, mas são sempre maiores que as células parabasais. Podem ser células intermédias pequenas de transição com formato redondo ou células intermédias grandes superficiais com forma poligonal e escamosa. As células intermédias grandes são por vezes confundidas com as células superficiais devido ao seu tamanho similar (Holst & Phemister, 2001). O rácio núcleo/citoplasma é reduzido, com grande citoplasma de cor azul. As bordas da célula podem ser redondas, pregueadas ou irregulares (Solano-Gallego & Masserdotti, 2016).

As células superficiais são as maiores células desta categoria, tendo diâmetros compreendidos entre os 30µm e os 75µm. Como o nome indica, estas células situam-se na camada mais superficial do epitélio vaginal durante o pico de estrogénio (Holst & Phemister, 2001). São caracterizadas por pequenos núcleos redondos, citoplasma abundante

queratinizado de cor azul a esverdeado e bordas celulares anguladas ou pregueadas. Por vezes, podem ser observados núcleos picnóticos ou ausentes. Isto acontece quando as células entram em processo degenerativo e passam a ser denominadas por células superficiais anucleadas (Solano-Gallego & Masserdotti, 2016).

1.2.2. Determinar a fase do ciclo éstrico na cadela

Durante a fase do proestro, é normal encontrar neutrófilos e uma mistura de células parabasais, intermédias e superficiais na citologia vaginal. Isto deve-se à grande proliferação do epitélio vaginal provocado por aumento do estrogénio em circulação. À medida que a fase do proestro vai avançando, o número de neutrófilos regride e as células superficiais predominam (ver tabela 3) (Solano-Gallego & Masserdotti, 2016).

Na fase do estro, as células predominantes na citologia são as células superficiais e células superficiais anucleadas, representando 90% das células. No entanto, o número de eritrócitos diminui e os neutrófilos tornam-se ausentes. Normalmente, é possível observar grande número de bactérias (Holst & Phemister, 2001). Contudo, a citologia não é um meio mais significativo para identificar o dia de ovulação ou o momento certo para fertilização (Feldman & Nelson, 2004), mas é o método mais preciso para identificar esta fase do CE. Quando é identificada, a fêmea deve receber espermatozoides a cada 2 a 3 dias para uma maior taxa de sucesso de fecundação dos oócitos. Para uma melhor precisão a determinar o momento de ovulação, deve-se combinar citologias vaginais com medição da concentração de progesterona no sangue (Solano-Gallego & Masserdotti, 2016).

Na fase de diestro, a citologia é caracterizada por um declínio do número de células superficiais, um aumento das células parabasais e células intermediárias e neutrófilos são novamente encontrados (Holst & Phemister, 2001). Devido a estas características muito semelhantes à citologia do início da fase do proestro, por vezes é difícil distinguir ambas as fases. Quando a fase de diestro é confirmada, a possibilidade de gestação é afastada (Solano-Gallego & Masserdotti, 2016).

Na citologia da fase de anestro, existe predominância das células parabasais e células intermediárias pequenas. Este tipo de citologia é muito semelhante a citologias de proestro e diestro. Para uma determinação mais correcta das fases do ciclo, é aconselhado a realização de várias citologias ao longo do CE. (Holst & Phemister, 2001)

Tabela 3. Alterações citológicas em esfregaços vaginais da cadela durante o CE. Adaptado de Veterinary Reproduction and Obstetrics, 9ª edição

Tipo de Célula	Proestro		Estro		Diestro	Anestro
	Inicial	Tardio	Inicial	Tardio		
Parabasais	+++	+	-	-	++	++
Intermediárias Pequenas	+++	++	-	-	+	+
Intermediárias Grandes	±	++	+++	+++	-	-
Superficiais Anucleadas	-	++	++++	+++	±	-
Eritrócitos	+	+++	++	-	-	±
Neutrófilos	+	-	-	+	++	+

1.2.3. Determinar a fase do ciclo éstrico na gata

As citologias vaginais são consideradas importantes para determinar a fase do CE da gata e raramente induzem a ovulação nas mesmas. As alterações citológicas que podem ser visualizadas ao longo do CE são muito semelhantes às citologias da cadela. (Solano-Gallego & Masserdotti, 2016)

No início da fase de proestro, as células parabasais e as células intermédias são as células predominantes devido à grande proliferação do epitélio vaginal provocada pelas altas concentrações de estrogénio. À medida que esta fase progride, as células epiteliais sofrem maturação e tornam-se superficiais. No final do proestro, podem ser observadas um grande número de células superficiais e anucleadas (Johnson, 2009). Nesta fase, os neutrófilos e os eritrócitos não são visíveis comparativamente a uma citologia vaginal da cadela. (Solano-Gallego & Masserdotti, 2016)

Uma citologia com predominância das células superficiais (constituindo 40% a 88%), ausência de neutrófilos e com um fundo transparente, é uma citologia característica da fase de estro. Nesta fase, 90% das células presentes, são células superficiais e células escamosas anucleadas e podem estar presentes eritrócitos e bactérias (Johnson, 2009).

O início da fase de diestro pode ser reconhecido quando numa citologia se encontra uma redução significativa do número de células superficiais, eritrócitos e bactérias, e o

reaparecimento das células intermédias, detritos celulares e aumento do número significativo de neutrófilos (Johnson, 2009).

A citologia da fase de anestro é bastante acelular, no entanto, pode ser constituída por células parabasais e pequenas células intermediárias (Johnson, 2009).

1.3. Foliculogénese

A foliculogénese é um processo de proliferação e de diferenciação dos folículos e atresia folicular (Songsasen, Fickes, Pukazhenth, & Wildt, 2009) e é constituída por várias fases: recrutamento, selecção e dominância. O recrutamento começa no proestro com a estimulação de gonadotropinas para iniciar o desenvolvimento folicular. A selecção é o processo de eleição de um ou mais folículos que foram recrutados, para progredir com o seu desenvolvimento e na fase da dominância, o folículo dominante e outros folículos sofrem uma rápida evolução, enquanto que os restantes folículos entram em fase de atresia. (Noakes, Parkinson, & England, 2009). Na gata, a onda de desenvolvimento folicular inicia-se na fase de proestro e cada fase folicular é constituída por 5 folículos dominantes e os restantes entram em processo de atresia (Maladain, et al., 2011)

Os folículos são categorizados em 5 tipos baseados na sua morfologia, tamanho, tipo e número de camadas células e a presença de fluído folicular: folículos primordiais, primários, secundários, pré-antrais e antrais (ver Figura 7 e 8) (Songsasen, Fickes, Pukazhenth, & Wildt, 2009).

Como todos os mamíferos, o desenvolvimento folicular das cadelas e das gatas começa durante o desenvolvimento fetal, quando os folículos são recrutados dos ninhos de células germinativas primordiais. Contudo, os primeiros folículos primordiais aparecem 3 semanas após o nascimento na cadela e 11 dias depois do nascimento na gata (Hyttel, 2010). Foi estimado que cada ovário pode conter aproximadamente mais de 100 000 folículos primordiais (Songsasen, Nagashima, & Thongkittidilok, 2017), sendo constituídos por um pequeno oócito e uma camada de células da granulosa achatadas. Estes folículos têm oócitos com diâmetros compreendidos entre os 20 e os 30µm na cadela e na gata (Bristol-Gould & Woodruff, 2006) e são encontrados no córtex do ovário (Songsasen, Nagashima, & Thongkittidilok, 2017).

Ao 120º dia, desenvolvem-se os folículos primários constituídos por um oócito, zona pelúcida (zona entre o oócito e a camada de células da granulosa achatadas) (Junqueira & Carneiro, 2007), uma única camada de células da granulosa e revestidos por uma camada de teca (Songsasen, Fickes, Pukazhenth, & Wildt, 2009). Estes folículos contém um oócito com diâmetros entre os 30 e os 50µm na gata (Bristol-Gould & Woodruff, 2006) e entre os 30 µm e 70µm na cadela (Reynaud, et al., 2012).

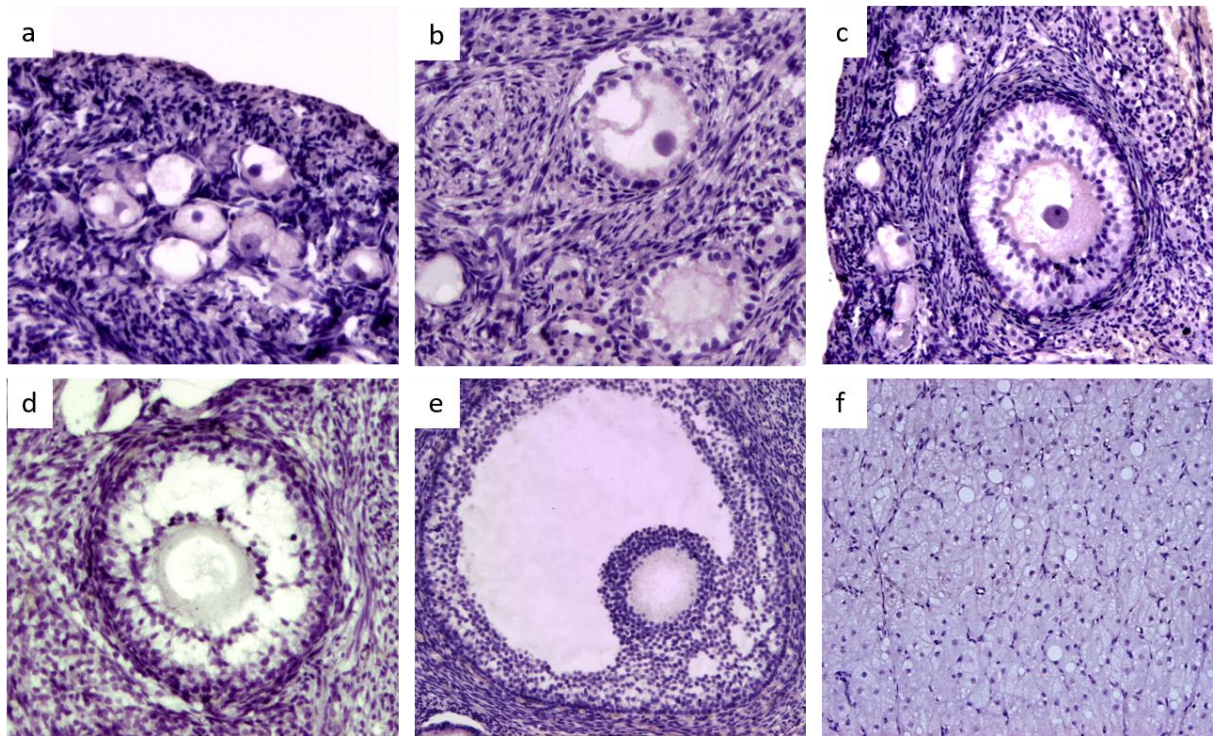


Figura 7. Desenvolvimento folicular na gata. a) folículos primordiais; b) folículos primários; c) folículo secundário; d) folículo pré-antral; e) folículo antral e f) corpo lúteo. Coloração com hematoxilina. Ampliação de 40x. Imagem original do autor.

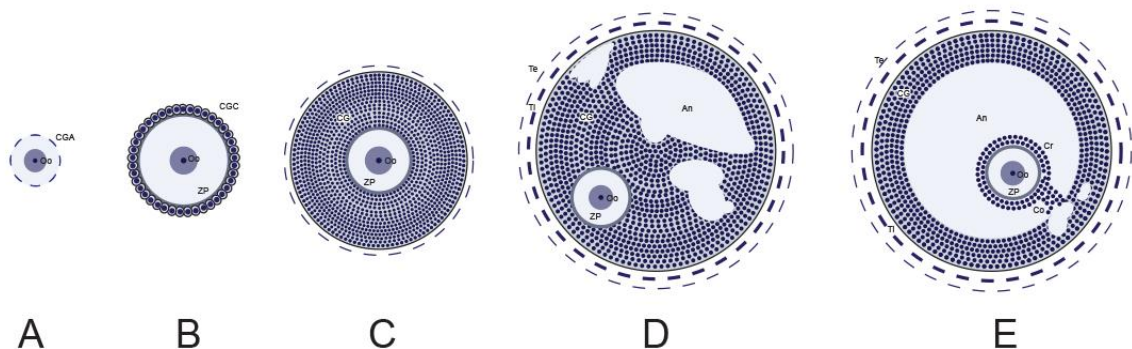


Figura 8. Esquema representativo do desenvolvimento folicular. Imagem (A): folículo primordial; imagem (B): folículo primário; imagem (C): folículo secundário; imagem (D): folículo pré-antral; imagem (E): folículo antral. (Oo): oócito; (CG): células da granulosa; (CGA): células da pré-granulosa achatadas; (CGC): células da granulosa cuboides; (An): antrum; (ZP): zona pelúcida; (Co): *cumulus oophorus*; (Cr): *corona radiata*; (Ti): teca interna; (Te): teca externa (Cardoso, 2017).

Os folículos secundários são constituídos por duas ou mais camadas de células da granulosa e revestidos por duas camadas de teca: a teca interna e teca externa. Normalmente os folículos secundários tem tamanhos entre os 100 a 400µm e com um oócito com 40 a 75µm de diâmetro nas gatas (Bristol-Gould & Woodruff, 2006) e $60.5 \pm 2.7\mu\text{m}$ na cadela (Songsasen, Nagashima, & Thongkittidilok, 2017)

Ao longo da foliculogénese, os folículos secundários podem ter um tamanho semelhante aos folículos pré-antrais. Contudo, os folículos pré-antrais aumentam de tamanho devido à formação do antro folicular, sendo constituído por glicosaminoglicanos, proteínas e altas concentrações de esteroides (Junqueira & Carneiro, 2007). Para além de aumentarem de tamanho, o oócito (de diâmetros entre os 75 e os 90µm na gata (Bristol-Gould & Woodruff, 2006) e 90 a 110µm na cadela (Reynaud, et al., 2012)) mantém-se junto ao córtex do folículo, as células da granulosa dispersam-se para a região cortical (Junqueira & Carneiro, 2007).

Nos folículos antrais, sucede-se a formação de uma camada maior de células da granulosa entre o oócito e a parede do folículo, denominada por *cumulus oophorus* (ver Figura 9). Estes folículos são rodeados por duas ou três camadas de células teca e podem atingir tamanhos de 2 a 3mm na gata (Bristol-Gould & Woodruff, 2006) e 5 a 7mm na cadela (Reynaud, et al., 2012), contendo oócitos de tamanho superior a 120µm nas cadelas (Songsasen, Nagashima, & Thongkittidilok, 2017) e 85 a 100µm nas gatas (Bristol-Gould & Woodruff, 2006). No entanto, algumas células da granulosa formam outra camada em redor do oócito, denominada por *corona radiata*, que o acompanha após a ovulação. As células da granulosa que se encontram na parede do folículo denominam-se por células da granulosa mural (Bristol & Woodruff, 2004). Os folículos pré-antrais e os folículos antrais podem estar presentes entre o 120º dia e o 160º após o nascimento da fêmea (Songsasen, Fickes, Pukazhenth, & Wildt, 2009) (Bristol-Gould & Woodruff, 2006).

À medida que o folículo se desenvolve, o estroma que o rodeia diferencia-se e forma as camadas tecas foliculares: a teca interna e teca externa. A teca interna é constituída por células desorganizadas, produtoras de esteroides que sintetizam a androstenediona e, esta é conduzida para as células da camada da granulosa. Quando a hormona FSH estimula as células da granulosa, estas secretam uma enzima que transforma a androstenediona em estrogénio, entrando posteriormente em circulação sistémica (Junqueira & Carneiro, 2007).

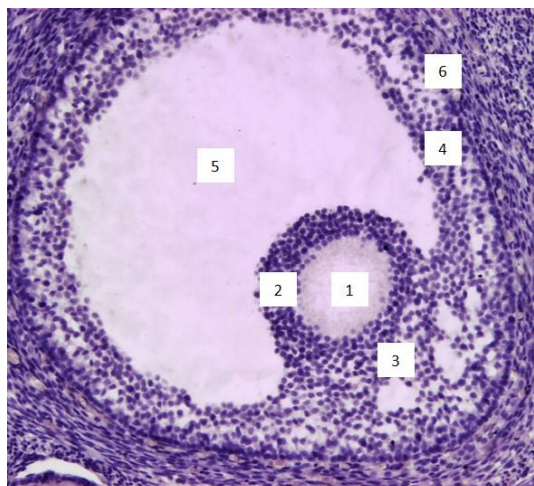


Figura 9. Folículo Antral de gata e a sua constituição. 1) oócito; 2) *corona radiata*; 3) *cumulus oophorus*; 4) camada de células da granulosa; 5) antro folicular; 6) teca interna. Coloração com hematoxilina. Ampliação 40x. Imagem original de autor.

Durante o desenvolvimento folicular, existe sempre um folículo que se desenvolve mais do que os restantes, atingindo a maturidade. Este folículo denomina-se por folículo maduro ou folículo de Graff ou folículo pré-ovulatório. Os restantes folículos entram em processo de atresia (Junqueira & Carneiro, 2007).

1.4. Ovulação

A ovulação é um processo que ocorre durante o desenvolvimento folicular, onde o folículo é rupturado e o ovócito é exteriorizado do seu interior para o corno uterino (Junqueira & Carneiro, 2007). Na cadela, este processo ocorre devido à estimulação pelos picos de LH secretada pela hipófise. Isto acontece devido ao feedback positivo com o aumento dos níveis de estrogénio provenientes dos folículos durante o seu desenvolvimento (Schaeffers-Okkens, 2010). Na gata, a ovulação ocorre através de estimulação através da cópula, que por sua vez provoca a secreção de GnRH, induzindo o pico de LH (Trass, 2009).

A ovulação pode acontecer após 48 a 60 horas após o pico de LH (Concannon, 2011). Este processo pode demorar até 24 horas. Durante a ovulação, o oócito é acompanhado pelas células da zona pelúcida, da *corona radiata* e um pouco de fluído folicular com o objectivo de manter a sua nutrição, de modo a que a maturação do oócito aconteça para permitir eventual fertilização (Schaeffers-Okkens, 2010).

1.5. Corpo Lúteo

Depois de ocorrer a ovulação, as células da granulosa e as células da teca interna formam o corpo lúteo, transformando-se numa glândula endócrina na camada cortical do ovário. As células da granulosa aumentam de tamanho, tornando-se o tipo de células predominantes do parênquima do CL e passam a ser denominadas por células granulosa-luteínicas secretoras de progesterona e estrogénios (Junqueira & Carneiro, 2007). Esta transformação não é observada até 4 a 5 horas após a ovulação (Jöchle & Andersen, 1976).

Na cadela, a formação do corpo lúteo sucede-se desde a ovulação até ao 21º dia de gestação, enquanto que o desenvolvimento acontece a partir do 22º dia até ao 43º e a retrogressão acontece do 44º até ao 63º dia. No entanto, o corpo lúteo começa a diminuir de tamanho a partir do 37º dia de gestação, mas só no 45º dia é que a regressão é evidente. Contudo, esta última fase pode prolongar-se até 2 a 3 ciclos éstricos posteriores (Jöchle & Andersen, 1976).

Após o pico de LH que provoca a ovulação, o corpo lúteo consegue-se manter activo durante 10 a 12 dias. No entanto, se não ocorrer fecundação do oócito, o CL regride e entra em processo de apoptose. Quando isto acontece, os níveis de progesterona diminuem e as concentrações de FSH aumentam para dar início ao desenvolvimento folicular, começando assim, um novo ciclo éstrico (Junqueira & Carneiro, 2007).

Após a degeneração do corpo lúteo, os fibroblastos ocupam a sua área e produzem uma cicatriz de tecido conjuntivo denso denominada por *corpo albicans* (Junqueira & Carneiro, 2007).

2. Apoptose celular

A morte celular é um dos temas mais estudados pelos cientistas biológicos e é importante conhecer o seu mecanismo para perceber diversas patologias e conseguir descobrir o seu tipo de tratamento. O termo de apoptose é derivado da língua grega com significado de “queda” relacionado com a queda de folhas das árvores durante o Outono (Wong, 2011).

A morte celular pode ser classificada por duas categorias diferentes: necrose e apoptose (ver diferenças na tabela 4). A apoptose é uma morte celular que requer transcrição específica de genes e síntese de proteínas nas células afectadas (Bursch, Kleine, & Tenniswood, 1990). Este processo é iniciado por um estímulo entre células que varia de tecido para tecido e pode demorar algumas horas dependendo sempre do tipo de célula, do estímulo e do processo apoptótico (Wong, 2011). Normalmente, uma célula pode ser fagocitada num espaço temporal de 3 horas (Thompson, Strange, & Schedin, 1992). Quando o processo de apoptose é activado, as células não apresentam alterações histológicas de imediato (Bursch, Kleine, & Tenniswood, 1990).

Tabela 4. Diferenças morfológicas entre tipos de morte celular. Adaptado de *Apoptosis in the Genesis and Prevention of Cancer* (Thompson, Strange, & Schedin, 1992).

Apoptose	Necrose
Deleção de células singulares	Morte de grupo de células
Sem perda de integridade	Perda de integridade de membrana
Redução de volume e formação de corpos apoptóticos	Inchaço e lise celular
Sem resposta inflamatória	Resposta inflamatória significativa
Fagocitose por células vizinhas normais e macrófagos	Fagocitose por macrófagos
Lisozimas intactas	Derrame de organelos para a circulação sanguínea e espaço extracelular
Compactação de cromatinas em massas densas	Cromatina descompactada

A primeira fase deste processo caracteriza-se pela condensação de cromatina no núcleo da célula e a quebra de interações entre as células do tecido. Para que tal aconteça, é preciso a activação de Ca^{2+} e magnésio dependente de endonuclease que degrade o DNA de modo a produzir corpos apoptóticos (Bursch, Kleine, & Tenniswood, 1990). Por vezes, as células em apoptose são fagocitadas antes da formação de corpos apoptóticos, o que explica a descoberta tão recente da apoptose celular no ano 1972 (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972) (Wong, 2011). Outra alteração que pode acontecer durante esta fase denomina-se por condensação citoplasmática, onde o contacto desmossomal entre células e do citoesqueleto é interrompida, resultando assim uma condensação dos filamentos intermediários ao redor do

núcleo e a superfície da célula torna-se enrugada, formando os tais “blebs” (Bursch, Kleine, & Tenniswood, 1990).

A segunda fase é caracterizada pela sua fragmentação da célula em pequenos corpos apoptóticos que contém pequenas partículas do núcleo fragmentado e uma matriz de organelos – mitocôndrias e lisossomas. Durante este processo de fragmentação, não ocorre libertação ou vazamento de componentes celulares e enzimas para o espaço extracelular ou para a circulação sanguínea, o que acontece durante processo de necrose. Após a fragmentação, é possível identificar novos determinantes antigénicos na superfície da célula, o que facilita a identificação pelas células vizinhas e pelos macrófagos, dando início ao processo de fagocitose dos corpos apoptóticos (Bursch, Kleine, & Tenniswood, 1990). No entanto, quando a fagocitose não é eficaz na eliminação de todos os corpos apoptóticos, os restantes iniciam um processo de degradação semelhante ao processo de necrose, sendo caracterizado como necrose secundária (Wong, 2011).

2.1. Apoptose Folicular

A apoptose está presente em vários processos fisiológicos da reprodução: na foliculogénese, na atresia folicular, na ovulação e na luteínização. Todos estes processos são regulados através de hormonas, tais como gonadotropinas, factores de crescimento epidermais (EGF), factor de crescimento de transformação (TGF α), factor de crescimento de fibroblastos (bFGF), factor de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e estrogénio, sendo estes considerados factores de sobrevivência folicular, enquanto que os androgénios, interleucina 6 (IL-6) e a hormona libertadora de gonadotropinas (GnRH) são considerados indutores de atresia (Carou, et al., 2017). O equilíbrio na expressão e na acção de cada um destes factores determinam o crescimento, proliferação, diferenciação e processo de morte celular programada (Depalo, et al., 2003). A privação dos factores de sobrevivência folicular ou a estimulação de factores indutores de atresia, é a principal causa de apoptose folicular (Tsang, Jiang, Cheung, & Wang, 1995).

A apoptose folicular é um processo que envolve a regressão de folículos e do corpo lúteo. A atresia folicular traduz-se na eliminação de folículos que não são seleccionados para a ovulação (D'haeseleer, Cocquyt, Cruchten, Simoens, & Broeck, 2006). Em cada CE e em qualquer fase de desenvolvimento folicular, a maioria dos folículos (99%) (Hsueh, Billing, & Tsafiriri, 1994) (Tsang, Jiang, Cheung, & Wang, 1995) entra em processo de atresia devido à

interrupção de mitoses nas células da granulosa da lâmina basal e a morte dos oócitos, sendo fagocitados por macrófagos. Numa fase mais avançada no processo de atresia, o folículo é invadido por fibroblastos que produzem uma cicatriz de colagénio (Junqueira & Carneiro, 2007). Durante a fase de desenvolvimento de um folículo antral, este torna-se dependente das concentrações FSH. Quando estas estão aumentadas, os folículos são recrutados para a continuação do seu desenvolvimento, evitando que estes sofram apoptose (Markström, Svensson, Shao, Svanberg, & Bilig, 2002).

Segundo Borowski (1981), existe dois tipos de padrões de regressão folicular que podem ser visíveis em folículos secundários. O tipo A refere-se às alterações de necrose no oócito e na zona pelúcida, enquanto que as células da granulosa se aparentam saudáveis. Por outro lado, o tipo B descreve a presença de sinais de degeneração e necrose nas células da granulosa. Pode ser difícil de distinguir qual o tipo de regressão no início do processo de atresia. O tipo de regressão mais frequente é o tipo A, mas em folículos pré-antrais e antrais só é observado o tipo B, afectando as células da granulosa (Spaniel-Borowski, 1981).

No estudo de Matsuda (2012), as células de granulosa foram as primeiras células a entrar em processo de apoptose antecedentemente das células da teca e oócitos, sugerindo o seu papel iniciador do processo de atresia folicular. Este processo tem início na face interior da camada de células da granulosa. As células da granulosa em apoptose hipertrofiam no processo inicial de atresia, enquanto que em folículos em processo de atresia mais avançado, apresentam células da granulosa em apoptose com indícios de picnose, linha de células de granulosa danificada (Matsuda, Inoue, Manabe, & Ohkura, 2012) e desorganizada, e invasão das mesmas para o antro folicular. Outro indício de atresia folicular é a expansão da zona pelúcida e a perda de limites foliculares (Bristol & Woodruff, 2004).

Por vezes, um episódio de hipoxia celular pode provocar atresia folicular precoce. Isto acontece quando existe uma maior necessidade de fluxo sanguíneo folicular ou uma deficiente oxigenação nas células da granulosa mais profundas (Alonso-Pozos, Rosales-Torres, Ávalos-Rodríguez, Vergara-Onofre, & Rosado-García, 2003).

O processo de atresia folicular está documentado em várias espécies como em humanos (Depalo, et al., 2003) (Hurst, Mora, & Fenwick, 2006); em suínos (Berardinelli, et al., 2004); bovinos (D'haeseleer, Cocquyt, Cruchten, Simoens, & Broeck, 2006) (Carou, et al., 2017); búfalos (Feranil, Isobe, & Nakao, 2005); rato (Fenwick & Hurst, 2002) (Oakberg, 1979); murganho (Gondos, 1982); ovelhas (Jolly, et al., 1997), cabras (Lin, et al., 2012) e em babuínos (Kugu, et al., 1998).

3. Tunel

A detecção de células foliculares que se encontrem em processo de apoptose pode ser realizada através de técnicas laboratoriais para a detecção de fragmentação de ácido desoxirribonucleico (DNA) através do terminal dos ácidos nucleicos. Para a realização deste estudo, recorreu-se ao método TUNEL (Gavrieli, Sherman, & Ben-Sasson, 1992).

O TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) trata-se de um método utilizado para identificação e quantificação de células em apoptose. É caracterizado pela marcação de terminações 3'OH livres do DNA fragmentado presente nos corpos apoptóticos e nos núcleos das células. A marcação é feita através de nucleótidos que por sua vez, são ligados aos fragmentos de DNA através da utilização da enzima TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) (Gavrieli, Sherman, & Ben-Sasson, 1992).

Este método já foi anteriormente testado em vários tecidos e admitido como uma boa ferramenta para identificação de células em processo de morte programada, permitindo a sua quantificação em populações celulares (Gavrieli, Sherman, & Ben-Sasson, 1992).

No entanto, vários estudos mostraram que a identificação através deste método não era exclusivamente em células em processo de apoptose, como também em processo de necrose, aconselhando que a técnica de TUNEL fosse acompanhada por outros métodos laboratoriais (Kyrylkova, Kyryachenko, Leid, & Kioussi, 2012).

Capítulo III – Apoptose folicular em cadelas e gatas ao longo do ciclo éstrico

1. Objetivos

O presente estudo compreendeu os seguintes objetivos:

1. Descrever a atresia folicular durante o desenvolvimento folicular na cadela e na gata
2. Comparar a atresia folicular entre fases do ciclo éstrico na cadela e na gata
3. Desenvolver e estabelecer o protocolo óptimo de imunohistoquímica com a utilização de TUNEL em tecido ovário de cadela e gata no laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária da ULHT

2. Materiais e Métodos

Para este estudo foram utilizadas amostras colhidas para o estudo “Desenvolvimento Folicular ao Longo do Ciclo Éstrico na Cadela e Gata” realizado por Carolina Cardoso sob a aprovação do Comité de Ética e Bem-Estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona (Cardoso, 2017), constituindo assim uma continuação deste trabalho.

Os dados foram obtidos no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e na Câmara Municipal de Almada com o objectivo de serem submetidos a ovariectomia electiva a pedido dos donos no período compreendido entre 1 de Fevereiro e 29 de Julho de 2016.

Foram analisados ovários de 7 cadelas e 8 gatas com idades compreendidas entre os 5 meses e os 2 anos.

2.1. Critérios de inclusão

No estudo foram incluídos as cadelas e gatas submetidas a cirurgia electiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da ULHT, ausentes de história clínica de problemas reprodutivos.

2.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos todos os animais com história clínica de alterações e patologias reprodutivas que inferem no normal funcionamento do aparelho reprodutor. Foram também excluídos todos os animais que não tenham sido submetidos a citologia vaginal e análises de sangue, impedindo a determinação da fase do ciclo éstrico.

2.3. Recolha e processamento das amostras

A recolha de amostras foi realizada pela Dra. Carolina Cardoso, aquando do seu trabalho experimental no final do mestrado integrado em Medicina Veterinária. As amostras foram recolhidas por excisão cirúrgica dos órgãos genitais femininos através da técnica ovariohisterectomia. Após excisão, as amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% durante 24 horas a temperatura ambiente. Após este passo, as amostras foram transferidas para a solução de álcool 70% e posteriormente foram embebidas em parafina para se realizarem os cortes histológicos de 5 µm (Thermo Scientific Microm HM325). Os cortes histológicos foram posicionados em lâminas de microscopia SuperFrost (VWR, Radnor, Pensilvânia) e inseridas em estufa a 37°C durante a noite. (Cardoso, 2017)

2.4. Métodos de monitorização do ciclo éstrico

Para a monitorização do ciclo reprodutivo dos animais procedeu-se à colheita de sangue para mensuração das concentrações de progesterona e a realização de esfregaços de citologia vaginal (Cardoso, 2017).

2.4.1. Citologia Vaginal

Para diferenciação de fases de ciclo éstrico, procedeu-se à realização de citologia vaginal. Foram identificados os vários tipos de células normais presentes neste tipo de citologia (Cardoso, 2017).

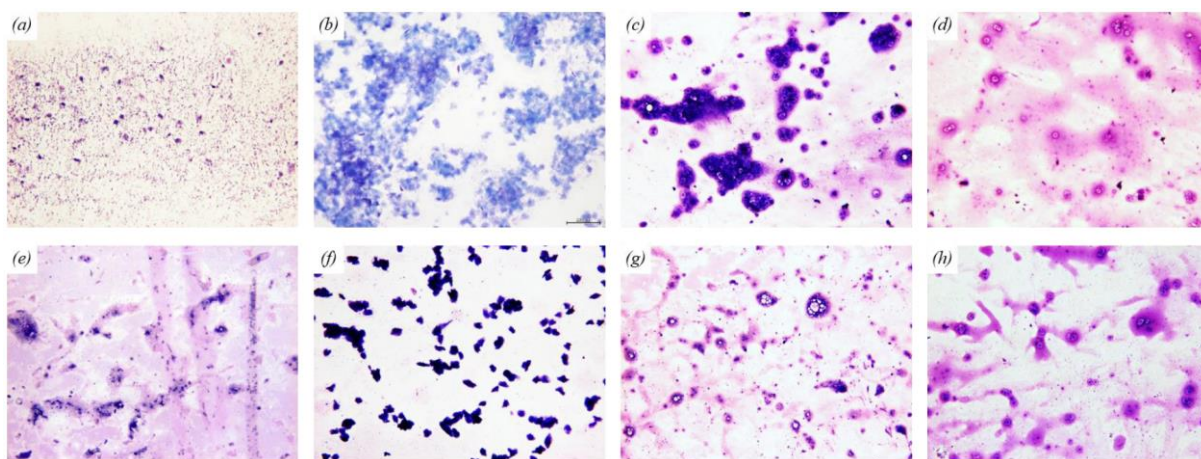


Figura 10. Citologia vaginal de cadela e de gata ao longo do ciclo éstrico realizadas para a dissertação “Desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na cadela e na gata” por Carolina Cardoso. Ampliação 40x. Primeira linha representa citologias em cadelas, sendo (a) na fase do proestro; (b) na fase de estro; (c) na fase de diestro e (d) na fase de anestro. A segunda linha representa citologias em gatas, sendo (e) proestro; (f) estro; (g) diestro e (h) em anestro (Cardoso, 2017).

2.4.2. Progesterona

Para monitorização do ciclo reprodutivo das cadelas e das gatas, procedeu-se à medição de concentrações plasmáticas de progesterona. As gatas apresentaram concentrações sérias de progesterona (P4) de 0,45ng/ml na fase de proestro, 0,25ng/ml na fase de estro, aumentando para 15ng/ml na fase de diestro e valores basais de 1ng/ml na fase de anestro. Nas cadelas, a concentração sérica de P4 aumentara no fim da fase de proestro ou no início da fase de estro para cima de 3ng/ml e continuara a aumentar ao longo do ciclo éstrico até atingir o valor de 4ng/ml na fase de diestro. Na fase de anestro, as concentrações baixaram para <1ng/ml (Cardoso, 2017).

2.5. TUNEL

Para a realização da técnica TUNEL, foram selecionadas duas lâminas de ovários de cada amostra de cadela e de gata com cortes de 5µm. Foi utilizado o Kit ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection (EMD Millipore Corporation, USA) conforme o anexo I.

Procedeu-se à desparafinização das amostras com a lavagem em xilol e reidratação em etanol com concentrações decrescentes e lavagem em PBS. De seguida, as lâminas foram incubadas com tampão citrato, aquecendo a solução no micro-ondas 3 vezes durante 5 minutos a 700W. Deixou-se as lâminas submersas na solução, até arrefecer à temperatura

ambiente (TA), durante 20 a 30 minutos. Após o arrefecimento das lâminas, procedeu-se à incubação em peróxido de hidrogénio durante 5 minutos à TA. De seguida, procedeu-se à lavagem com PBS duas vezes durante 5 minutos à TA.

Aplicou-se o equilibration buffer (90416) directamente nas lâminas e incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. De seguida procedeu-se à incubação da solução Working Strenght TdT Enzyme com diluição de 1:10 nas lâminas de controlo positivo e PBS nas lâminas de controlo negativo. As lâminas foram incubadas em câmara húmida a 37°C durante 1 hora.

Após incubação, as lâminas foram incubadas com working strength stop/wash buffer (90419) por 10 minutos à TA. As lâminas foram lavadas em PBS 3 vezes durante 1 minuto. Aplicou-se o Anti-Digoxigenin Conjugate (90420) e incubou-se em câmara húmida por 30 minutos à TA.

De seguida lavou-se em PBS e procedeu-se à incubação do cromogénio 3'-*diaminobenzidine* (DAB) (ImmPACT DAB, SK-4105, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 2 minutos. Procedeu-se à lavagem com dH₂O e incubou-se com a mesma solução à TA durante 5 minutos.

As lâminas foram coradas com hematoxilina de Mayers e de seguida foram lavadas de modo a remover o excesso de corante e procedeu-se à desidratação em concentrações crescentes de álcool e xilol. Por fim, as lâminas foram montadas em entellan.

2.6. Análise de Amostras

As amostras foram observadas através de um microscópio Olympus (CX21) a com a objectiva de 40x por único observador. Em cada lâmina, os folículos foram classificados por folículos primordiais, folículos primários, folículos secundários, folículos pré-antrais e folículos antrais. Foram também identificadas células da granulosa, células teca, células do *cumulus oophorus* e *corona radiata*, oócitos e corpos lúteos.

As imagens foram capturadas pelo microscópio ULH100HG, Olympus Optical Co., Ltd., Japan. Ao observar as lâminas, era evidente uma reacção de cor acastanha.

2.7. Contagem de Folículos

A contagem e processamento das imagens foi realizada através de microscópio óptico. As células foliculares marcadas eram observadas com uma coloração acastanhada, o que significa que se encontravam com imunoreacção positiva ao TdT. Foram observados ovários de diferentes animais e o folículo foi considerado a unidade experimental deste trabalho.

No total foram observados 4 812 folículos em 15 lâminas de ovário de cadelas e gatas. Dentro da população de cadelas, foram identificados 1792 folículos, entre os quais, 1141 folículos primordiais, 311 folículos primários, 210 folículos secundários, 70 folículos pré-antrais, 52 folículos antrais e 8 corpos lúteos, enquanto que na população de gatas foram identificados 2993 folículos no total, sendo 2659 folículos primordiais, 161 folículos primários, 51 de folículos secundários, 18 folículos pré-antrais, 99 folículos antrais e 5 corpos lúteos (ver tabela 5 e 6)

Tabela 5. Número total de folículos observados em amostras de ovário de cadela

Cadela							
	Folículo Primordial	Folículo Primário	Folículo Secundário	Folículo Pré-Antral	Folículo Antral	Corpo Lúteo	Total nº folículos
<i>Proestro</i>	410	77	47	3	9	0	546
<i>Estro</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diestro</i>	530	200	119	53	28	8	938
<i>Anestro</i>	201	34	44	14	15	0	308
<i>Total</i>	1141	311	210	70	52	8	1792

Tabela 6. Número total de folículos observados em amostras de ovário de gatas

Gata							
	Folículo Primordial	Folículo Primário	Folículo Secundário	Folículo Pré-Antral	Folículo Antral	Corpo Lúteo	Total nº folículos
<i>Proestro</i>	1192	99	11	4	36	2	1344
<i>Estro</i>	557	20	10	5	23	1	616
<i>Diestro</i>	122	11	5	3	17	2	160
<i>Anestro</i>	788	31	25	6	23	0	873
<i>Total</i>	2659	161	51	18	99	5	2993

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra

A amostra para este estudo é constituída por 7 ovários de cadelas e 8 ovários de gatas, divididas por fase de ciclo éstrico. No grupo de cadelas, obtiveram-se 2 amostras de fêmeas em fase de anestro, 2 amostras em fase de proestro e 3 amostras em fase de diestro. No entanto, não se obtiveram amostras de cadelas em fase de estro (Tabela 7). No grupo das gatas, obtiveram-se 2 amostras na fase de anestro, 3 amostras na fase de proestro, 2 amostras na fase de estro e 1 amostra na fase de diestro (Tabela 8).

Na população de cadelas, foram identificados 14 folículos primários, 37 folículos secundários, 24 folículos pré-antrais, 21 folículos antrais e 1 corpo lúteo com marcação TUNEL.

Na população de gatas, foram identificados 26 folículo primordiais, 3 folículos primários, 11 folículos secundários, 7 folículos pré-antrais, 40 folículos antrais e 0 corpos lúteos (ver tabela 7 e 8) com marcação TUNEL.

Tabela 7. Número total de folículos marcados com TUNEL nas amostras de ovário de cadela

	Cadela						Total nº fol. marcados
	Folículo Primordial	Folículo Primário	Folículo Secundário	Folículo Pré-Antral	Folículo Antral	Corpo Lúteo	
<i>Proestro</i>	0	0	0	0	4	0	4
<i>Estro</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diestro</i>	0	10	16	15	10	1	52
<i>Anestro</i>	0	4	21	9	7	0	41
<i>Total</i>	0	14	37	24	21	1	97

Tabela 8. Número total de folículos marcados com TUNEL nas amostras de ovário de gata

	Gata						Total nº fol. marcados
	Folículo Primordial	Folículo Primário	Folículo Secundário	Folículo Pré- Antral	Folículo Antral	Corpo Lúteo	
<i>Proestro</i>	0	0	0	2	9	0	11
<i>Estro</i>	2	0	3	0	6	0	11
<i>Diestro</i>	0	0	0	0	4	0	4
<i>Anestro</i>	24	3	8	5	21	0	61
<i>Total</i>	26	3	11	7	40	0	87

4.1. Descrição da marcação TUNEL

Com a utilização da técnica de TUNEL em cortes de parafina, foi possível a observação da expressão de TdT nas amostras de ovário de cadelas e gatas. Todas as células que se encontravam marcadas demonstravam uma coloração acastanhada, diferenciando-se das células apresentadas no controlo negativo. Tanto em cadelas, como em gatas, foi possível observar marcação em várias estruturas integrantes de um folículo.

4.1.1. Cadelas

Nas amostras de cadela em fase de proestro, diestro e anestro existe uma predominância de marcação das células da granulosa.

Nas amostras da fase de proestro (n=2), foi possível a visualização de marcação das células da granulosa (CG) em dois folículos antrais e um folículo secundário. No entanto, um dos folículos antrais encontrava-se também com marcação na zona do *cumulus oophorus*.

Nas amostras da fase de diestro (n=3), vários foram os tipos de folículos observados com evidência de marcação. Numa amostra, a marcação esteve presente em vários folículos primários, secundários e pré-antrais com marcação das células granulosa. Nesta mesma amostra, observou-se um corpo lúteo com marcação nas células granulosa-luteínicas. Noutra amostra, foram observados vários folículos secundários, folículos pré-antrais e antrais com marcação das células da granulosa. Contudo, a terceira amostra, evidenciou a marcação apenas de um folículo pré-antral e um folículo antral com marcação de células da granulosa e algumas células da teca interna.

Nas amostras da fase de anestro (n=2), foi possível a observação de marcação em todas as fases de foliculogénese, à excepção de folículos primordiais e corpos lúteos. Nos folículos primários, secundários e pré-antrais a marcação esteve presente nas células da granulosa, à excepção de um folículo pré-antral que além da marcação das CG, apresentava também marcação no oócito. Foi possível também a observação de folículos antrais com marcação das células da granulosa. No entanto, um dos folículos antrais evidenciou células marcadas na zona da *corona radiata* e teca interna.

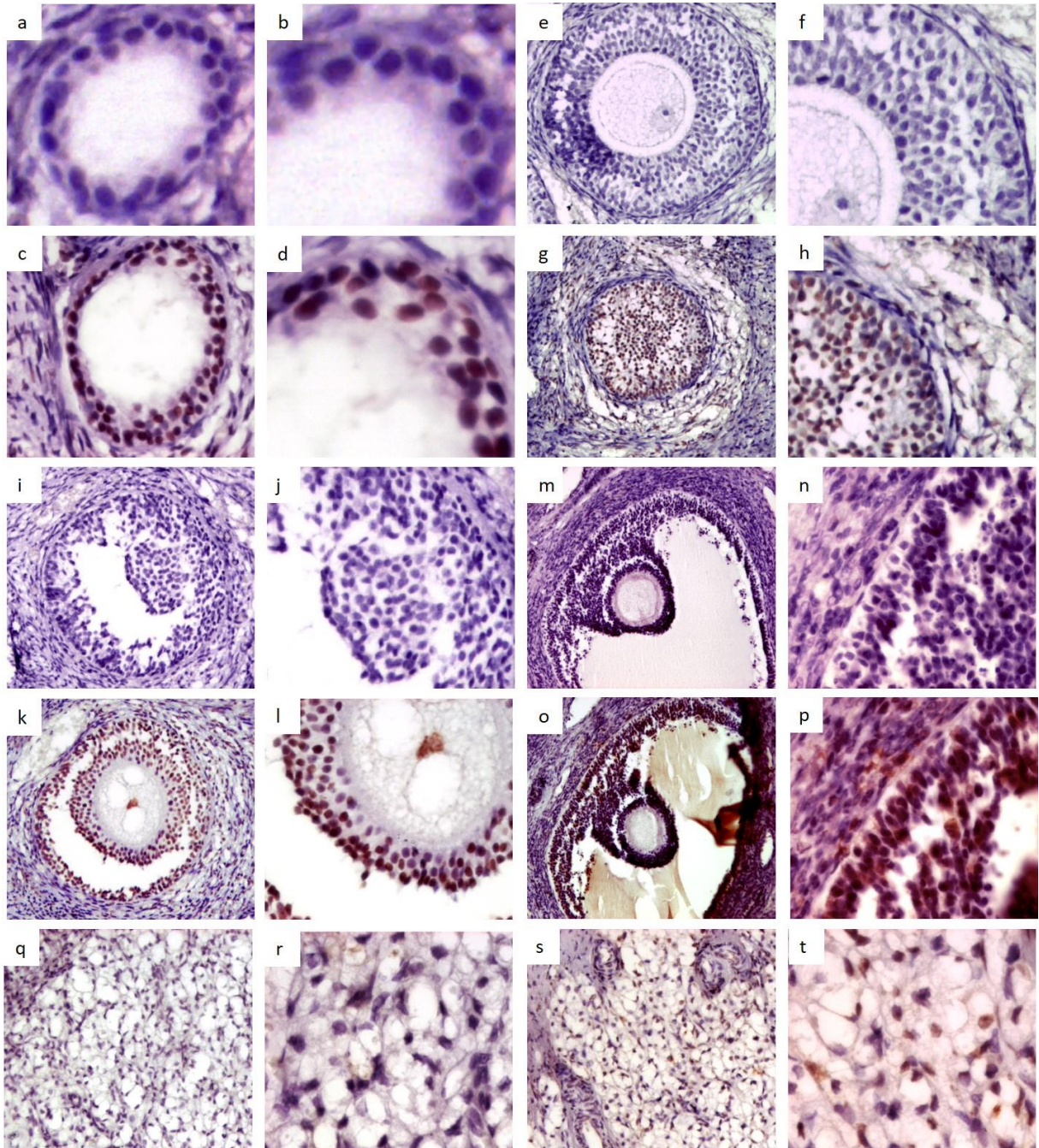
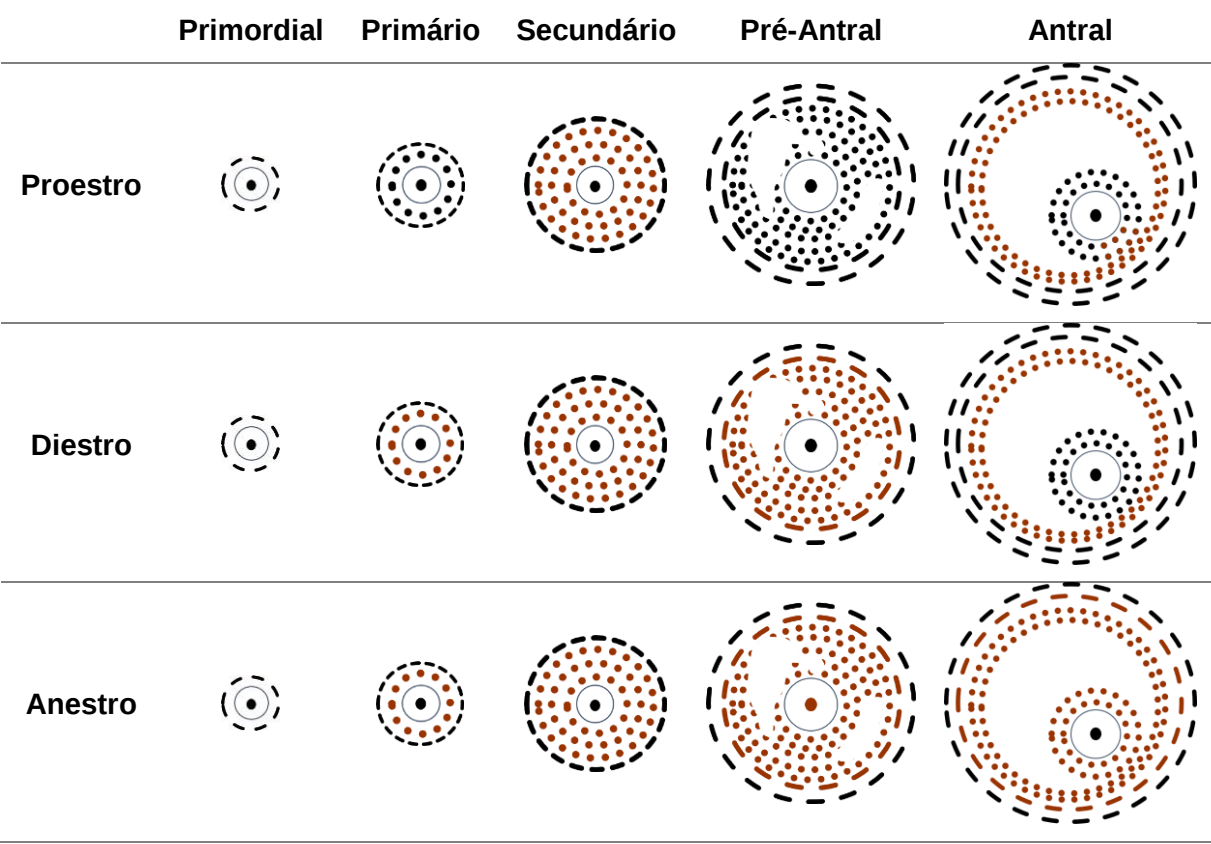


Figura 11. Expressão de TUNEL ao longo do desenvolvimento folicular na cadela. Folículos primários nas imagens de a) a d); folículos secundários de e) a h); folículos pré-antrais nas imagens de i) a l); folículo antral nas imagens de m) a p) e corpos lúteos nas imagens de q) a t). Controlos negativos: a), b), e), f), i), j), m), n), q) e r). É possível observar a marcação nas células da granulosa dos folículos primários (c-d), nos folículos secundários (g-h), nos folículos pré-antrais (k-l) e em folículos antrais (o-p). Nos folículos pré-antrais também é possível observar marcação nas células na zona da *corona radiata* e *cumulus oophorus*, bem como no oócito (k-l). Nos folículos antrais, a marcação está presente nas células da granulosa, nas células da granulosa da *corona radiata* e *cumulus oophorus* e teca interna (o-p). Em corpos lúteos também houve marcação nas células granulosa-luteínicas (s-t).

Tabela 9. Representação esquemática da marcação com TUNEL no desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na cadela. Esquema adaptado da Tese “Desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na cadela e na gata” de Carolina Cardoso.



4.1.2. Gatas

Tal como acontece nas amostras de cadela, as células da granulosa são as células mais marcadas nas amostras de gata. Alguns folículos demonstram marcação nas células da granulosa na face mais interior do folículo.

Nas amostras da fase de proestro (n=3), foi possível a observação de marcação em folículos secundários, pré-antrais e principalmente em folículos antrais, marcando sempre células da granulosa. No entanto, um dos folículos antrais marcados numa das amostras, encontrava-se com marcação das CG, incluindo a zona da *corona radiata*.

Nas amostras da fase de estro (n=2), a marcação estava presente nas células granulosa de folículos secundários e folículos antrais. No entanto, foi possível a observação de folículos primordiais com marcação de oócitos.

Na amostra de fase de diestro (n=1), observou-se apenas marcação em folículos antrais nas células da granulosa e algumas células da teca interna.

Por fim, nas amostras da fase de anestro (n=2), a marcação estava presente em todas as fases de foliculogénese. Nos folículos primordiais, foi possível a observação de marcação das células da granulosa achatadas e no oócito. Nos folículos primários, secundários, pré-antrais e antrais, a marcação estava presente nas células da granulosa. No entanto, alguns dos folículos antrais apresentavam marcação na zona da *corona radiata*.

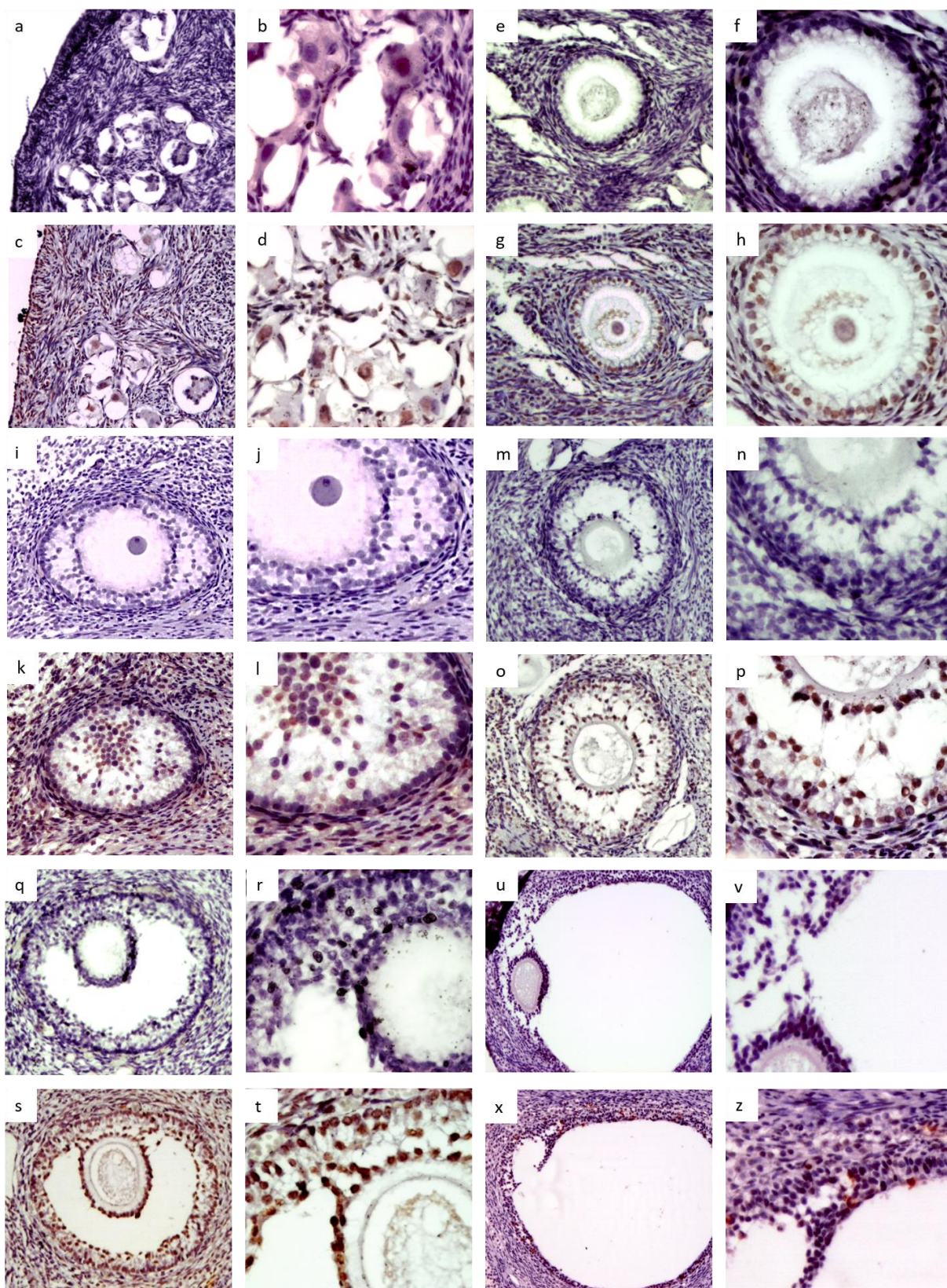


Figura 12. Expressão do TUNEL ao longo do desenvolvimento folicular na gata. Folículos primordiais nas imagens de a) a d); folículos primários de e) a h); folículos secundários de i) a l); folículos pré-antrais de m) a p) e folículos antrais de q) a z). Controlos negativos: a), b), e), f), i), j), m), n), q), r), u) e v). A marcação está presente nos oócitos

dos folículos primordiais (c-d), nas células da granulosa em folículos primários (g-h), secundários (k-l), pré-antrais (o-p) e antrais (s-t, x-z). Nos folículos pré-antrais (o-p) também é possível observar a marcação ao redor do oócito. Nos folículos antrais (s-t, x-z) é possível a observação das células da granulosa, na zona da *corona radiata* e na *cumulus oophorus* e na teca interna. (Fotografias originais da autora).

Tabela 10. Representação esquemática da marcação com TUNEL no desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na gata. Esquema adaptado da Tese “Desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na cadela e na gata” de Carolina Cardoso.

	Primordial	Primário	Secundário	Pré-Antral	Antral
Proestro					
Estro					
Diestro					
Anestro					

5. Discussão

Que seja do meu conhecimento este foi o primeiro trabalho a fazer a avaliação da apoptose de células foliculares por TUNEL nas diferentes fases foliculares e ao longo do CE tanto na cadela como na gata.

De acordo com os resultados deste trabalho, o processo de apoptose de células foliculares está presente em todas as fases do desenvolvimento folicular e nas diferentes fases do ciclo éstrico. Contudo, a presença de apoptose é mais evidente nas fases foliculares mais avançadas, como foi descrito anteriormente em bovinos por D'haeseleer (2006), sugerindo que o processo de atresia folicular seja mais provável de acontecer nas últimas fases do desenvolvimento folicular para um melhor controlo da população folicular (D'haeseleer, Cocquyt, Cruchten, Simoens, & Broeck, 2006).

Na fase de diestro e anestro nas gatas e cadelas, existe evidência de atresia folicular em quase todos os tipos de folículos, comparativamente com as outras fases do ciclo éstrico, podendo ser justificada pelo processo de eliminação dos restantes folículos após a ovulação que foram recrutados nas ondas foliculares (Noakes, Parkinson, & England, 2009) (Maladain, et al., 2011).

A utilização da técnica de TUNEL para marcação de atresia folicular foi estudada anteriormente noutras espécies, tal como em humanos, onde a marcação estava presente em folículos primordiais e primários nas células da granulosa e em oócitos e não esteve presente em folículos secundários (Depalo, et al., 2003) e noutro estudo em humanos onde a marcação era evidente em folículos antrais nas células da granulosa e células da teca interna (Hurst, Mora, & Fenwick, 2006); No estudo em búfalos, poucos folículos apresentaram marcação, no entanto, nos folículos primários e secundários, a marcação estava presente principalmente nas células da granulosa, mas nos folículos pré-antrais e antrais, a marcação estava presente nas células da granulosa, na zona do *cumulus oophorus* e nas células da teca interna (Sreejalekshmi, et al., 2011) (Feranil, Isobe, & Nakao, 2005). Em ovelhas, foi detectada marcação em folículos antrais nas células da granulosa e células da teca interna (Jolly, et al., 1997). Já em peixes, a marcação estava presente nas células foliculares e raramente em células da teca interna (Morais, Thomé, Lemos, Bazzoli, & Rizzo, 2012) (Santos, et al., 2008).

No presente estudo, as células com maior marcação em todas as amostras foram as células da granulosa. No entanto, na gata, foi possível a observação de marcação por TUNEL

em alguns oócitos nas fases iniciais do desenvolvimento folicular, mas nas fases posteriores, a marcação está presente principalmente nas células da granulosa, estando de acordo com o que está descrito em humanos por Depalo *et al* (2003), onde refere que o processo de apoptose em folículos primordiais e primários tem início no oócito por indução intrínseca, enquanto que os folículos mais desenvolvidos, sejam mais sensíveis a sinais provenientes do estroma folicular, começando o processo de atresia na camada das células da granulosa e posteriormente expandir-se para o oócito. (Depalo, et al., 2003).

Em alguns folículos secundários, pré-antrais e antrais, a marcação das células da granulosa esteve presente na face mais interior do folículo, suportando o que foi descrito em humanos por Vaskivuo *et al* (2001) e recentemente por Matsuda *et al* (2012), reportando que o processo de atresia folicular tem início na face interior da camada das células. Alonso-Pozos *et al* (2003) refere que este achado pode ser derivado a episódios de hipoxia celular.

Em folículos antrais, foi possível a observação de marcação de células da *corona radiata* e do *cumulus oophorus*. No entanto, foi possível observar que a marcação de células da teca interna em alguns folículos pré-antrais e antrais, como também foi descrito em humanos por Hurst *et al* (2006) e em ovelhas por Jolly P.D. *et al* (1997).

Contudo, a marcação de TUNEL pode também marcar células em processo de necrose, sendo considerada por isso uma técnica não específica de marcação de apoptose, sendo necessário a realização de outros métodos de detecção de apoptose celular, referidos anteriormente (Berardinelli, et al., 2004).

No decorrer deste estudo, era esperado encontrar um número maior de células marcadas em folículos em atresia comparativamente aos resultados obtidos. A falta de marcação pode ser justificada pelo facto do TUNEL ser uma técnica de detecção de fragmentação de DNA, sendo detectada na fase mais terminal do processo de apoptose (D'haeseleer, Cocquyt, Cruchten, Simoens, & Broeck, 2006), havendo assim a possibilidade da existência de células em fase de apoptose inicial que não foram detectadas. Portanto, é necessária a realização de outros métodos, tais como, eletroforese para a confirmação da presença de fragmentação do DNA e activação da caspase-3 por imunohistoquímica (Berardinelli, et al., 2004) e marcação de DNA por imunofluorescência para uma detecção mais completa de atresia folicular.

6. Conclusão

Que seja do meu conhecimento, este foi o primeiro trabalho a permitir descrever a presença de células em apoptose utilizando a técnica de TUNEL durante a foliculogénese da cadela e da gata. De acordo com os resultados apresentados, foi possível afirmar que a apoptose pode estar presente em todas as fases foliculares e em todas as fases do ciclo éstrico. No entanto, a apoptose folicular está mais presente em fases foliculares mais avançadas e nas últimas fases do ciclo éstrico, sendo a sua detecção mais evidente e em maior número nas células da granulosa, tal como está descrito na bibliografia em outras espécies. No entanto, há que referir que a técnica TUNEL ao marcar apenas a última fase do processo de apoptose, poderá não ter marcado células que se encontravam no início deste processo.

Um dos objectivos deste trabalho não foi totalmente concluído devido à pequena amostra populacional e ausência de amostras de uma fase do ciclo éstrico em cadelas, o que não permitiu a comparação detalhada de atresia folicular entre cadela e gata, nem entre fases do ciclo éstrico. No entanto, foi possível estabelecer um protocolo optimizado para a elaboração da técnica de TUNEL no laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

7. Limitações de estudo

Durante o processo de desenvolvimento deste trabalho, ocorreram várias limitações. A primeira limitação traduziu-se no melhoramento da técnica de imunohistoquímica que implicou vários meses de aperfeiçoamento, procurando implementar a utilização de novos anticorpos no laboratório. Ao mesmo tempo que esta técnica era aperfeiçoada, realizaram-se várias tentativas com uma técnica diferente de imunohistoquímica.

Após a obtenção de resultados positivos na realização de imunohistoquímica com o TUNEL, um dos reagentes constituintes do kit chegou ao fim, impossibilitando a continuação dos trabalhos laboratoriais realizados para esta dissertação. Com o terminar do reagente, não foi possível a sua aplicação em amostras de cadelas na fase estro do CE.

Os resultados obtidos neste trabalho são limitados pela possível degradação de algumas amostras contidas nos blocos de parafina e devido também ao tamanho reduzido da amostra, impossibilitando assim a obtenção de resultados mais representativos das duas espécies.

Caso o seguimento deste trabalho for possível, a obtenção de um maior número de amostras seria importante e o acompanhamento com outras técnicas laboratoriais para a avaliação de expressão do receptor de FSH com o objectivo de um estudo mais completo da foliculogénese da cadela e da gata.

Bibliografia

- Alonso-Pozos, I., Rosales-Torres, A. M., Ávalos-Rodríguez, A., Vergara-Onofre, M., & Rosado-García, A. (2003). Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size. *Theriogenology*, 60, 1071-1081.
- Berardinelli, P., Russo, V., Martelli, A., Nardinocchi, D., Di Giancinto, O., Barboni, B., & Mattioli, M. (2004). Colocalization of DNA Fragmentation and Caspases-3 Activation During Atresia in Pig Antral Follicles. *Anatomy Histology And Embryology*, 23-27.
- Bristol, S. K., & Woodruff, T. K. (2004). Follicle-Restricted Compartmentalization of Transforming Growth Factor β Superfamily Ligands in the Feline Ovary. *Biology of Reproduction*, 846-859.
- Bristol-Gould, S., & Woodruff, T. K. (2006). Folliculogenesis in the domestic cat. *Theriogenology*, 5-13.
- Bursch, W., Kleine, L., & Tenniswood, M. (1990). The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochemistry and Cell Biology*, 1071-1074.
- Cardoso, C. F. (2017). *Desenvolvimento Folicular ao Longo do Ciclo Éstrico na Cadela e Gata*. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal.
- Carou, M. C., Lombardo, D. M., Cruzans, P. R., Maruri, A., Farina, M. G., Fiorito, C. D., & Olea, G. (2017). Apoptosis of bovine granulosa cells: Intercellular pathways and differentiation. *Acta Histochemica*, 462-470.
- Carrijo Jr., O. A., Marinho, A. P., Campos, A. A., Amorim, C. A., Báó, S. N., & Lucci, C. M. (2010). Morphometry, Estimation and Ultrastructure of Ovarian Preantral Follicle Population in Queens. *Cell Tissues Organs*, 152-160.
- Christie, D., & Bell, E. T. (1971). Endocrinology of the oestrous cycle in the bitch. *Journal of Small Animal Medicine*, 383-389.
- Clark, P., Ryan, G. E., & Czappon, A. B. (1975). Biochemical Genetic Markers in the Family Canidae. *Australian Journal of Zoology*, 411-417.

- Concannon, P. W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 200-210.
- Depalo, R., Nappi, L., Loverro, G., Bettocchi, S., Caruso, M. L., Valentini, A. M., & Selvaggi, L. (2003). Evidence of apoptosis in Human primordial and primary follicles. *Human Reproduction*, 2678-2682.
- D'haeseleer, M., Cocquyt, G., Cruchten, S. V., Simoens, P., & Broeck, W. V. (2006). Cell-specific localisation of apoptosis in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle. *Theriogenology*, 757-772.
- Durrant, B. S., Ravida, N., Spady, T., & Cheng, A. (2006). New technologies for the study of carnivore reproduction. *Theriogenology*, 1729-1736.
- Feldman, E. C., & Nelson, R. W. (2004). *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Philadelphia: Saunders.
- Fenwick, M. A., & Hurst, P. R. (2002). Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. *Reproduction*, 659-665.
- Feranil, J. B., Isobe, N., & Nakao, T. (2005). Apoptosis in the antral follicles of swamp buffalo and cattle ovary: TUNEL and Caspase-3 Histochemistry. *Reproduction in Domestic Animals*, 111-116.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 493-501.
- Gondos, B. (1982). Ultrastructure of Follicular Atresia in the Rat. *Alan R. Liss, Inc*, 199-206.
- Holst, P. A., & Phemister, R. D. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: Saunders.
- Hsueh, A. J., Billing, H., & Tsafriri, A. (1994). Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocrine Reviews*, 707-724.

- Hurst, P. R., Mora, J. M., & Fenwick, M. A. (2006). Caspase-3, TUNEL and ultrastructural studies of small follicles in adult human ovarian follicles. *Human Reproduction*, 1974-1980.
- Hyttel, P. (2010). Essentials of Domestic Animals Embryology. Em P. Hyttel, F. Sinowatz, & M. Vejlsted, *Essentials of Domestic Animal Embryology* (p. 32). Toronto: Saunders Elsevier.
- Jöchle, W., & Andersen, A. C. (1976). The Estrous Cycle in the Dog: A review. *Theriogenology*, 113-140.
- Johnson, C. A. (2009). Disorders of the Estrous Cycle. Em R. W. Nelson, & C. G. Couto, *Small Animal Internal Medicine* (p. 885). Missouri: Elsevier.
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V., & Olson, P. N. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: Saunders.
- Jolly, P. D., Smith, P. R., Heath, D. A., Hudson, N. L., Lun, S., Still, L. A., . . . McNatty, K. P. (1997). Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptosis versus mitotic cells in the membrana granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes. *Biology of Reproduction*, 837-846.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2007). *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 239-257.
- Kugu, K., Ratts, V. S., Piquette, G. N., Tilly, K. I., Tao, X.-J., Martimbeau, S., . . . Tilly, J. L. (1998). Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. *Cell Death and Differentiation*, 67-76.
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., & Kioussi, C. (2012). Detection of Apoptosis by TUNEL assay. *Odontogenesis*, 41-47.
- Lin, P., Yang, Y., Li, X., Chen, F., Cui, C., Hu, L., . . . Jin, Y. (2012). Endoplasmatic Reticulum Stress is involved in Granulosa Cell Apoptosis during follicular Atresia in Goat Ovaries. *Molecular Reproduction* , 423-432.

- Maladain, E., Rault, D., Froment, E., Baudon, S., Desquilbet, L., Begon, D., & Chastant-Maillard, S. (2011). Follicular growth monitoring in the female cat during estrus. *Theriogenology*, 1337-1346.
- Markström, E., Svensson, E. C., Shao, R., Svanberg, B., & Bilig, H. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation. *Society for Reproduction and Fertilization*, 23-30.
- Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., & Ohkura, S. (2012). Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. *Journal of Reproduction and Development*, 58.
- Morais, R. V., Thomé, R. G., Lemos, F. S., Bazzoli, N., & Rizzo, E. (2012). Autophagy and Apoptosis Interplay During Follicular Atresia in Fish Ovary: a morphology and immunocytochemical study. *Cell Tissue Research*, 467-478.
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., & England, G. C. (2009). *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Saunders.
- Oakberg, E. F. (1979). Follicular Growth and Atresia in the Mouse. 1979, 41-50.
- Reynaud, K., Fontbonne, A., Saint-Dizier, M., Thoumire, S., Marnier, C., Tahir, M. Z., . . . Chastant-Maillard, S. (2012). Folliculogenesis, Ovulation and Endocrine Control of Oocytes and Embryos in the Dog. *Reproduction in Domestic Animals*, 66-69.
- Rodgers, R. J., & Irving-Rodgers, H. F. (2010). Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Society for Reproduction and Fertility*, 309-318.
- Santos, H. B., Thomé, R. G., Arantes, F. P., Sato, Y., Bazzoli, N., & Rizzo, E. (2008). Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus*. *Theriogenology*, 1449-1460.
- Schaefer-Okkens, A. C. (2010). Estrous Cycle and Breeding Management of the Healthy Bitch. Em S. J. Ettinger, & E. C. Feldman, *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Saunders.
- Solano-Gallego, L., & Masserdotti, C. (2016). *Canine and Feline Cytology, A Color Atlas and Interpretation Guide*. Missouri: Elsevier.

- Songsasen, N., Fickes, A., Pukazhenth, B. S., & Wildt, D. E. (2009). Follicular Morphology, Oocyte Diameter and Localisation of Fibroblast Growth Factors in the Domestic Dog Ovary. *Reproduction in Domestic Animals*, 65-70.
- Songsasen, N., Nagashima, J., & Thongkittidilok, C. (2017). Endocrine and paracrine controls of canine follicular development and function. *Reproduction in Domestic Animals*, 1-6.
- Spaniel-Borowski, K. (1981). Morphological Investigations on Follicular Atresia in Canine Ovaries. *Cell Tissue Research*, 155-168.
- Sreejalekshmi, P., Raghavendra, B. S., Subramani, T. S., Murthy, V. C., Jamuna, K. V., & Selvaraju, S. (2011). Detection of Follicular Apoptosis in Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) Ovary by Histology and Nick End Labelling Technique. *Reproduction in Domestic Animals*, 59-65.
- Thompson, H. J., Strange, R., & Schedin, P. J. (1992). Apoptosis in the Genesis and Prevention of Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 597-602.
- Trass, A. M. (2009). Feline Reproduction. Em S. J. Ettinger, & E. C. Feldman, *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Saunders.
- Tsai, K. L., Clark, L. A., & Murphy, K. E. (2007). Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. *Mammalian Genome*, 444-451.
- Tsang, B. K., Jiang, J.-Y., Cheung, C. K., & Wang, Y. (1995). Regulation of Cell Death and Cell Survival Gene Expression During Ovarian Follicular Development and Atresia. *Frontiers in Bioscience*, 222-237.
- Vaskivuo, T. E., Anttonen, M., Herva, R., Billig, H., Dorland, M., Velde, E. R., . . . Tapanainen, J. S. (2001). Survival of Human Ovarian Follicle from Fetal to Adult Life: Apoptosis, Apoptosis-Related Proteins, and Transcription Factor GATA-4. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 3421-3429.
- Wong, R. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*.

ANEXOS

ANEXO I – Protocolo de Imunohistoquímica de cortes de parafina

1. As lâminas devem ser submetidas à desparafinação das lâminas em xilol e reidratar em concentrações decrescentes de etanol:
 - a. Xilol (3x5 minutos)
 - b. Álcool 100% (2x5 minutos)
 - c. Álcool 95% (3 minutos)
 - d. Álcool 70% (3 minutos)
2. Lavar em PBS (tampão fosfato salino) durante 5 minutos
3. Proceder à recuperação antigénica em 10 mM de tampão citrato pH6
 - a) Aquecer a solução durante 3 minutos a 700W sem as lâminas
 - b) Incubar durante 5'x 3 a 700W
 - c) Após as 3 lavagens, as lâminas devem ser arrefecidas à T.A. durante cerca de 20-30 minutos.
4. Lavar em água destilada (2x2 minutos)
5. Emergir em peróxido de hidrogénio 3.0% durante 5 minutos
6. Lavar em PBS (2x5 minutos)
7. Retirar excesso
8. Aplicar 75µL de Equilibration Buffer nas lâminas e incubar pelo menos 10 segundos a temperatura ambiente.
9. Retirar o excesso
10. Pipetar 20µL de Working Strength TdT Enzyme para cada lâmina
11. Incubar em câmara húmida a 37°C durante 1 hora.
12. Colocar as lâminas num coplin jar com Working Strenght Stop/Wash Buffer
13. Agitar e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente
14. Lavar em PBS (3x1 minuto)
15. Retirar o excesso
16. Aplicar a temperatura ambiente, 65 µL de Anti-Digoxigenin Conjugate em cada lâmina
17. Incubar em câmara húmida durante 30 minutos a temperatura ambiente.
18. Lavar em PBS num coplin jar (4x2 minutos)
19. Retirar o excesso
20. Aplicar peroxidase substrate (75µL)
21. Deixar corar de 3 a 6 minutos a temperatura ambiente
22. Lavar em água destilada (3x1 minuto)

23. Incubar em água destilada por 5 minutos a temperatura ambiente.
24. Retirar o excesso
25. Fazer coloração com hematoxilina de Mayers durante 10 segundos.
26. Lavar em água corrente para remover o excesso de corante
27. Desidratar em concentrações crescentes de álcool:
 - a. Álcool 95% (2 minutos)
 - b. Álcool 100% (2 minutos)
 - c. Xilol (5 minutos)
 - d. Xilol (5 minutos)
28. Montar em etellan

ANEXO II – Soluções

1. Phosphate Buffered Saline (PBS) 1%
 - PBS 10%
 - Água destilada
 - Volume final de solução (Vf) 1000ml = 100ml PBS 10% + 900ml de dH₂O
2. Peróxido de Hidrogénio 3% (H₂O₂)
3. Água destilada (dH₂O)
4. Tampão Citrato 10 mM
 - Solução de Citrato de sódio 0.1M
 - Solução de Ácido Cítrico 0.1M
 - 450mL de H₂O + 9mL citrato 0.1M pH 1.8+ 41mL Na citrato 0.1M pH8.8
5. Working Strength TdT Enzyme
 - Reaction Buffer (90417)
 - TdT enzyme (90418)
 - Volume final (Vf) 110µL = 77 µL Reaction Buffer + 33 µL de TdT enzyme
6. Working Strength Stop Wash Buffer
 - Stop/Wash Buffer (90416)
 - Água destilada (dH₂O)
 - Volume final (Vf) 35ml = 0,5ml Stop/Wash Buffer + 14ml de água destilada (dH₂O)
7. Working Strength Peroxidase Substrate
 - Volume final = 1mL