

CAROLINA FILIPA ROSA CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO FOLICULAR AO LONGO
DO CICLO ÉSTRICO NA CADELA E GATA**

Orientador: Professor Doutor Daniel Murta

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2017

CAROLINA FILIPA ROSA CARDOSO

**DESENVOLVIMENTO FOLICULAR AO LONGO
DO CICLO ÉSTRICO NA CADELA E GATA**

Dissertação para obtenção do Grau de
Mestre em Medicina Veterinária no curso de
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
conferido pela Universidade Lusófona de
Humanidades e Tecnologia

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Michelle Serafim

Orientador: Professor Doutor Daniel Murta

Vogal: Professora Doutora Margarida Alves

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2017

Aos meus Pais e irmãs, Patrícia e Catarina.

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, na pessoa da sua Diretora, Professora Doutora Laurentina Pedroso, pela possibilidade de realização desta Dissertação de Mestrado.

Ao meu orientador, Professor Doutor Daniel Murta, por todos os ensinamentos, compreensão, paciência e disponibilidade ao longo deste percurso.

À equipa responsável pelo Núcleo de Investigação Científica da FMV-ULHT, em especial à Professora Doutora Margarida Alves e Professor Doutor Pedro Faísca.

À Professora Doutora Inês Viegas pelo apoio prestado no âmbito da análise estatística, obrigado por toda a disponibilidade.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa um especial agradecimento pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

Aos meus amigos que durante 6 anos sempre me apoiaram, obrigada por todas as horas de estudo e diversão que passamos juntos. Um especial agradecimento à Rita Pina e à Inês Figueiredo por todos os momentos vividos.

Ao Pedro Vinagre pela ajuda na execução das ilustrações desta dissertação, sem os seus ensinamentos não era possível.

Ao Diogo, que todos os dias me motivou e me ajudou a ser melhor. Obrigada por toda a paciência e apoio.

Por último, um especial agradecimento aos meus pais e à minha irmã, eles que tornaram este sonho possível, que sempre me apoiaram incondicionalmente. Obrigado por estarem sempre comigo, sem eles não era possível.

Resumo

Ao longo do ciclo éstrico estão presentes folículos ováricos em todas as fases de desenvolvimento, isto é, em quiescência, crescimento e atresia. No entanto, cada espécie tem a sua própria escala temporal de desenvolvimento, envolvendo processos como a proliferação e diferenciação das células foliculares. Contudo, o conhecimento sobre os mecanismos que regulam o desenvolvimento folicular é ainda fragmentário. O desvendar destes processos poderá contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de controlo da fertilidade.

O objetivo do presente estudo consiste em determinar se a proliferação celular nos folículos ovários está relacionado com o recrutamento e desenvolvimento folicular, acompanhando a sua ocorrência ao longo do ciclo éstrico. Este trabalho foca-se ainda na comparação do desenvolvimento e recrutamento folicular entre cadelas e gatas, espécies que embora filogeneticamente afastadas, concentram forte interesse veterinário.

Foram recolhidos ovários de 13 cadelas e 11 gatas com idades compreendidas entre os 5 meses e 2 anos de idade, os quais foram agrupados de acordo com a fase do ciclo éstrico. A fase do ciclo éstrico foi determinada através da citologia vaginal, concentração plasmática de progesterona (P4) e observação histológica dos ovários. O estudo foi desenhado no sentido de utilizar a expressão do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) como marcador de proliferação celular nos folículos ováricos.

Este estudo apresenta uma descrição detalhada do padrão de expressão de PCNA durante o desenvolvimento folicular nestas duas espécies, os resultados obtidos permitiram concluir que a proliferação celular varia consoante o desenvolvimento folicular e a fase do ciclo éstrico, tanto em cadelas como em gatas, havendo uma interação significativa entre estas duas variáveis. Neste contexto, a regulação da proliferação celular no folículo poderá ser uma via terapêutica para o controlo da fertilidade (estimulação ou contraceção). Contudo, este trabalho servirá essencialmente como base para estudos subsequentes que permitam desvendar melhor os processos fisiológicos que regulam a foliculogénese. Além disso, o presente trabalho e estágio contribuirão ainda para estabelecer e otimizar o protocolo de imunohistoquímica no laboratório de investigação da FMV-ULHT.

Palavras-chave: Foliculogénese, PCNA, cadela, gata

Abstract

Throughout the cycle, ovarian follicles are present at all stages of development, in quiescence, growth, and atresia. However, each species has its own development timeline, involving processes such as proliferation and differentiation of follicular cells. However, the knowledge regarding the mechanisms that regulate follicular development is still fragmented and controversial. Thus, in order to develop novel fertility control therapeutic methods, it is fundamental to unfold the regulatory mechanisms behind follicle selection and growth.

The aim of this study was to determine if ovarian follicles cell proliferation is related with follicle recruitment and development along the estrous cycle. This study also focuses on the folliculogenesis comparison between bitches and queen, species that although phylogenetically distant, concentrate strong veterinary interest.

Ovaries were collected from 13 bitches and 11 queens with ages ranging from 5 months to 2 years old. Ovaries were grouped according to the animal estrous cycle phase. Estrous cycle phase was determined by vaginal cytology, plasma progesterone concentration (P4) and histological observation of the ovaries. The study was designed to use the expression of Proliferative Cell Nuclear Antigen (PCNA) as a marker of cell proliferation in ovarian follicles.

This study presents a detailed description of PCNA expression pattern during follicular development in these two species, the results obtained allowed to conclude that cell proliferation varies according to follicular development and estrous cycle phase, both in bitches and queens, with both this variables having a significative interaction. In this context, the regulation of cell proliferation in the follicle may be a therapeutic route for fertility control (stimulation or contraception). However, this work will essentially serve as a basis for subsequent studies to better uncover the physiological processes that regulate folliculogenesis. In addition, the present work contributed to establish and optimize the immunohistochemical protocol in the FMV-ULHT research laboratory.

Keywords: Folliculogenesis, PCNA, bitch, queen

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE GERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE GRÁFICOS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II – ESTÁGIO CURRICULAR.....	2
1. HOSPITAL VETERINÁRIO TUTIVETE.....	2
Atividades desenvolvidas no Hospital Veterinário Tutivete	2
2. UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADE E TECNOLOGIAS – FACULDADE DE MEDICINA	
VETERINÁRIA	6
Atividades desenvolvidas na Faculdade de Medicina Veterinária	6
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO FOLICULAR AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO NA	
CADELA E GATA	7
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. O ESTUDO DA FISIOLOGIA REPRODUTIVA EM CADELAS E GATAS.....	7
1.1.1. Gatas	Erro! Marcador não definido.
1.1.2. Cadelas.....	Erro! Marcador não definido.
1.2. CICLO ÉSTRICO	9
1.2.1. Gatas	Erro! Marcador não definido.
1.2.2. Cadelas.....	Erro! Marcador não definido.
1.3. CITOLOGIA VAGINAL	12
1.4. OOGÉNESE	15
1.5. FOLICULOGÉNESE.....	16
1.5.1. Classificação Folicular.....	19
1.5.2. Gatas	Erro! Marcador não definido.
1.5.3. Cadelas.....	Erro! Marcador não definido.
1.6. FOLÍCULOS COM MÚLTIPLOS OÓCITOS	23
1.7. ANTIGÉNIO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	24
CAPITULO IV – ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR AO LONGO DO CICLO	
ÉSTRICO NA CADELA E GATA	25
1. OBJETIVOS.....	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	25
2.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	25

2.3.	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	26
2.4.	MÉTODOS DE MONITORIZAÇÃO DO CICLO REPRODUTIVO.....	26
2.4.1.	Citologia Vaginal	26
2.4.2.	Progesterona.....	26
2.5.	RECOLHA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE TECIDO.....	27
2.6.	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	27
2.7.	ANÁLISE DE AMOSTRAS	28
2.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
2.8.1.	Contagem de Folículos.....	29
3.	RESULTADOS	30
3.1.	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	30
3.2.	MÉTODOS DE MONITORIZAÇÃO DO CICLO REPRODUTIVO	31
3.2.1.	Concentrações Plasmáticas de Progesterona.....	31
3.2.2.	Citologia Vaginal	31
3.3.	EXPRESSÃO DE PCNA.....	33
3.3.1.	Gatas	Erro! Marcador não definido.
3.3.2.	Cadelas.....	Erro! Marcador não definido.
3.3.3.	Folículos com Múltiplos Oócitos	48
4.	DISCUSSÃO.....	50
5.	CONCLUSÃO.....	54
6.	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	55
7.	BIBLIOGRAFIA.....	56
APÊNDICES.....		I
APÊNDICE I – PROTOCOLO DE RECOLHA DE AMOSTRAS.....		II
APÊNDICE II – PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO		II
APÊNDICE III – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DA CITOLOGIA VAGINAL.....		III
APÊNDICE IV – PROTOCOLO DE IMUNOHISTOQUÍMICA DE CORTES DE PARAFINA		III
APÊNDICE V – SOLUÇÕES.....		IV
APÊNDICE VI – TRABALHOS PUBLICADOS		VI

Índice de Figuras

FIGURA 1. IMAGEM ILUSTRATIVA DE OVARIOHISTERECTOMIA ELETIVA REALIZADA EM GATA NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA FMV-ULHT	6
FIGURA 2. CÉLULAS PRESENTES NA CITOLOGIA VAGINAL.	13
FIGURA 3. ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO FOLICULAR.	20
FIGURA 4. DESENVOLVIMENTO FOLICULAR NA GATA.....	22
FIGURA 5. DESENVOLVIMENTO FOLICULAR NA CADELA.....	23
FIGURA 6. CITOLOGIA VAGINAL DE CADELA E GATA AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO.	32
FIGURA 7. PADRÕES DE EXPRESSÃO DE PCNA DURANTE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM GATA.....	35
FIGURA 8. DETECÇÃO DE PCNA EM FOLÍCULOS PRIMORDIAIS DE GATA EM PROESTRO.	36
FIGURA 9. DETECÇÃO DE PCNA EM FOLÍCULO SECUNDÁRIO (A,B)	36
FIGURA 10. PADRÃO DE EXPRESSÃO DE PCNA AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO EM FOLÍCULOS PRÉ ANTRAIS (A-H) E ANTRAIS (I-P) DE GATA.....	39
FIGURA 11. DETECÇÃO DE PCNA EM FOLÍCULOS ANTRAIS DE GATA DURANTE AS FASES DO CICLO ÉSTRICO.....	39
FIGURA 12. PADRÃO DE EXPRESSÃO DE PCNA NO CORPO LÚTEO (CL) DE GATA EM DIESTRO.	41
FIGURA 13. PADRÕES DE EXPRESSÃO DE PCNA DURANTE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM CADELA.	43
FIGURA 14. PADRÃO DE EXPRESSÃO DE PCNA AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO EM FOLÍCULOS PRÉ ANTRAIS (A-H) E ANTRAIS (I-P) DE CADELA.	46
FIGURA 15. DETECÇÃO DE PCNA EM FOLÍCULOS ANTRAIS DE CADELA DURANTE AS FASES DO CICLO ÉSTRICO.....	46
FIGURA 16. PADRÃO DE EXPRESSÃO DE PCNA NO CORPO LÚTEO (CL) DE CADELA EM DIESTRO..	48
FIGURA 17. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE PCNA EM MOFS DE GATA (C,D) E CADELA (A,B).	48
FIGURA 18. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE PCNA EM MOFS DE CADELA.	49

Índice de Gráficos

GRÁFICO 1. DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS OBSERVADOS POR ESPÉCIE ANIMAL.....	3
GRÁFICO 2. DISTRIBUIÇÃO DA CASUÍSTICA EM FUNÇÃO DAS DIFERENTES ÁREAS DE ESPECIALIDADE MÉDICA (N=131).....	5
GRÁFICO 3. DISTRIBUIÇÃO DA CASUÍSTICA EM FUNÇÃO DAS DIFERENTES ÁREAS CIRÚRGICAS (N=48).	5
GRÁFICO 4. DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE FOLÍCULOS OBSERVADOS EM CADELA E GATA POR FASE FOLICULAR E FASE DO CICLO ÉSTRICO.	29
GRÁFICO 5. CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO EM CADELA E GATA.	31
GRÁFICO 6. MÉDIA DA PERCENTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS NAS DIFERENTES FASES FOLICULARES AO LONGO DO CE DA GATA.....	36
GRÁFICO 7. MÉDIA DA PERCENTAGEM DE CÉLULAS MUITO MARCADAS NAS DIFERENTES FASES FOLICULARES AO LONGO DO CE DA GATA.	37
GRÁFICO 8. MÉDIA DA PERCENTAGEM DE CÉLULAS NÃO MARCADAS NAS DIFERENTES FASES FOLICULARES AO LONGO DO CE DA CADELA..	44
GRÁFICO 9. MÉDIA DA PERCENTAGEM DE CÉLULAS MUITO MARCADAS NAS DIFERENTES FASES FOLICULARES AO LONGO DO CE DA CADELA..	44

Índice de Tabelas

TABELA 1. DISTRIBUIÇÃO DA CASUÍSTICA EM FUNÇÃO DAS DIFERENTES ÁREAS MÉDICAS (N=316).	3
TABELA 2. DISTRIBUIÇÃO DOS DIVERSOS PROCEDIMENTOS OBSERVADOS NO ÂMBITO DA MEDICINA PREVENTIVA (N=135)	4
TABELA 3. PROTOCOLO VACINAL CANINO NO TUTIVETE (ADAPTADA DO HOSPITAL TUTIVETE)	4
TABELA 4. PROTOCOLO VACINAL FELINO NO TUTIVETE (ADAPTADA DO HOSPITAL TUTIVETE)	4
TABELA 5. CRONOLOGIA DE EVENTOS DURANTE A DIFERENCIAÇÃO GONADAL NA CADELA E GATA (ADAPTADO DE (HYTTTEL ET AL., 2010))	15
TABELA 6. CARACTERÍSTICAS E DILUIÇÕES DO ANTICORPO UTILIZADO NO PRESENTE ESTUDO	28
TABELA 7. NÚMERO TOTAL DE ANIMAIS OBSERVADOS POR FASE DO CICLO ÉSTRICO POR ESPÉCIE.	30
TABELA 8. NÚMERO TOTAL DE FOLÍCULOS POR FASE DO CICLO ÉSTRICO POR ESPÉCIE (N=581).....	30
TABELA 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EXPRESSÃO DE PCNA NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO NA GATA.....	40
TABELA 10. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EXPRESSÃO DE PCNA NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO NA CADELA.....	47

Lista de Abreviaturas

δ – Delta

μm – Micrómetro

% – Percentagem

Ac – Anticorpo

BSA – Albumina sérica bovina (do Inglês: “*Bovine serum albumin*”)

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celcius

CG – Células da granulosa

CL – Corpo Lúteo

CO – *corona oophorus*

CR – *corona radiata*

DAB – Diaminobenzidina

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

E2 – Estradiol- 17 β

et al. – E outros, da locução latina et alli

Fr – Frequência relativa

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

FSHr – Recetor da hormona folículo-estimulante (do Inglês: *follicle-stimulating hormone receptor*)

g – grama

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

h – Hora

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IgG – Imunoglobulina G

IHQ – imunohistoquímica

IUCN – União Internacional para Conservação da Natureza (do Inglês: *International Union for Conservation of Nature*)

Kg – Quilograma

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

LHr - Recetor da hormona luteinizante (do Inglês: *luteinizing hormone receptor*)

M – Concentração molar

MOFs – Folículos com múltiplos oócitos (do Inglês: “*multi-oocyte follicles*”)

mL – Mililitro

Na⁺ – Ião sódio

ng/mL – nanograma por mililitro

Nº – Número

OVH – Ovariohisterectomia

P4 - Progesterona

PBS – Tampão fosfato (do Inglês: “*Phosphate Buffered Saline*”)

PCNA – Antigénio nuclear de proliferação celular (do Inglês: “*Proliferating cell nuclear antigen*”)

pg/mL – pictograma por mililitro

TA – Temperatura ambiente

W – Watts

ZP – Zona pelúcida

Capítulo I – Introdução

A presente dissertação é o culminar do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Com o termo da realização do estágio no Hospital Veterinário e no Núcleo de Investigação da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV-ULHT) e no Hospital Veterinário Tutivete, Centro Cirúrgico de Santarém, surge a oportunidade, sob a orientação do Professor Doutor Daniel Murta, de desenvolver uma dissertação cujo tema contemple uma das várias áreas de ação médico-veterinária, devendo esta, todavia, estar em sintonia com a natureza do estágio curricular.

A realização deste trabalho versa sobre duas temáticas diferentes. Em primeiro lugar proceder-se-á a uma breve descrição dos locais onde os estágios foram realizados, suas instalações e atividades desenvolvidas bem como um relatório descritivo e estatístico, no qual se encontra resumida a casuística observada.

Em segundo lugar, no seguimento deste trabalho surge então a exposição do tema “Desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na cadela e gata”, onde se procede a uma breve revisão bibliográfica e posterior trabalho experimental. O estudo apresentado e do qual se pretende obter informação relevante, incide sobre os animais que se apresentaram ao Hospital Veterinário da FMV-ULHT com o propósito de realizar ováriohisterectomia (OVH) eletiva durante o período de estágio.

Capítulo II – Estágio Curricular

1. Hospital Veterinário Tutivete

Este capítulo refere-se às atividades desenvolvidas no decorrer do primeiro estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária na área de clínica médica e cirúrgica de animais de companhia que teve lugar no Hospital Veterinário Tutivete. Este teve a duração de 3 meses, compreendido entre 1 de outubro de 2015 a 30 de dezembro de 2015. O Hospital Veterinário Tutivete – Centro Cirúrgico opera desde 1991, fundado pelo Médico Veterinário Emídio Almeida, estando sediado na Praceta Manuel Santos Cruz, na localidade de S. Domingos em Santarém. Munido dos mais avançados meios de diagnóstico, o hospital garante serviços de qualidade e profissionalismo nas mais variadas áreas de especialidade médica e cirúrgica.

Atividades desenvolvidas no Hospital Veterinário Tutivete

Durante o decorrer do estágio curricular, o estagiário teve a possibilidade de contactar com diferentes áreas, sendo estas, a medicina preventiva, medicina interna, anestesia e cirurgia, permitindo-lhe aprofundar conhecimento nestas diferentes vertentes da prática veterinária.

Em todas as áreas, o estagiário teve a possibilidade de ter uma intervenção ativa ou de observação, dependendo do caso clínico a acompanhar. Em consulta, o estagiário, na sua maioria, simplesmente observou, realizando pontuais anamneses, exames de estado geral e aguardando o fim da mesma para discutir quaisquer dúvidas que tenham surgido.

Na vertente de medicina interna, o estagiário, foi responsável por realizar os exames de estado geral, administrar a medicação calendarizada, avaliar a fluidoterapia instituída e monitorizar os animais internados. Pôde também proceder à recolha de amostras para análises sanguíneas e urianálise, auxiliar ou realizar exames imagiológicos de diagnóstico e discutir com o Médico Veterinário os casos, os diagnósticos e as terapias a instituir.

Na área da anestesia, teve a função de realizar o protocolo anestésico específico para a situação, discutindo com o Médico Veterinário a sua eficácia. Posteriormente realizou a cateterização, entubando e preparando o animal, acompanhando-o até ao fim da cirurgia, realizando as administrações de fármacos necessárias durante a mesma.

Por fim, quando se encontrou na área de cirurgia, o estagiário pôde auxiliar em qualquer procedimento cirúrgico, inclusive realizou, sob observação do Médico Veterinário, cirurgias eletivas com mínimas complicações possíveis.

A distribuição da casuística pelas diferentes áreas clínicas está representada na Tabela 1, onde se verificou que a medicina preventiva apresentou maior expressão, com 42,7%, seguida da clínica médica (42,1%) e por último a clínica cirúrgica (15,2%).

Tabela 1. Distribuição da casuística em função das diferentes áreas médicas (n=316).

Área	Número de animais	(%)	Caninos	Felinos	Exóticos
Medicina Preventiva	135	42,7	98	37	-
Clinica Médica	133	42,1	76	53	4
Clinica Cirúrgica	48	15,2	33	15	-
Total	316	100,0	207	105	4

Relativamente à distribuição dos casos observados em função da espécie, aquela com maior representatividade foi a canina com 66%, seguida pela felina com 33% e por último os exóticos com 1% (Gráfico 1).

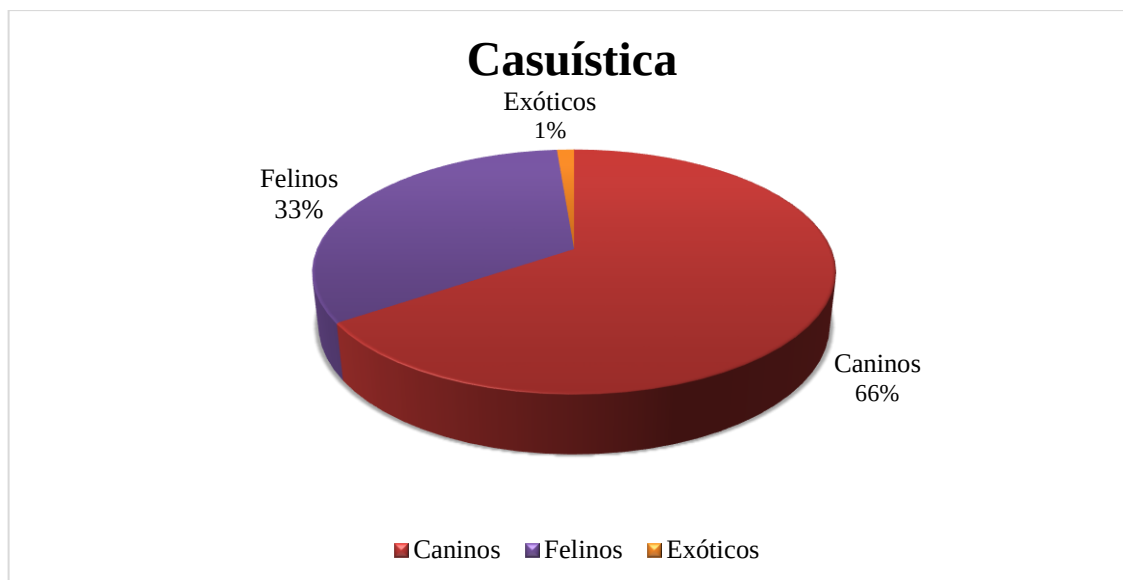


Gráfico 1. Distribuição dos casos observados por espécie animal (Frequência Relativa – Fr (%)) (n=316), sendo n, o número total de animais observados

Medicina Preventiva

A prevenção é um dos pilares da medicina veterinária atual e assenta nos princípios de proteção de patologias específicas, em contraste com a abordagem à doença após o seu desenvolvimento sintomatológico. A vacinação e a desparasitação são a base da medicina preventiva, com um impacto inquestionável na saúde animal e humana. Na análise da Tabela 2 observa-se que a vacinação (58,52%), desparasitação (37,78%) e a identificação eletrónica (3,7%) foram os principais motivos de consulta dentro da área da medicina preventiva. As Tabelas 3 e 4 são adaptadas do Hospital Tutivete e são representativas dos seus protocolos vacinais.

Tabela 2. Distribuição dos diversos procedimentos observados no âmbito da medicina preventiva (n=135)

Procedimento	Número de animais	(%)	Caninos	Felinos
Vacinação	79	58,52	59	20
Desparasitação	51	37,78	34	17
Identificação Eletrónica	5	3,70	5	-
Total	135	100	98	37

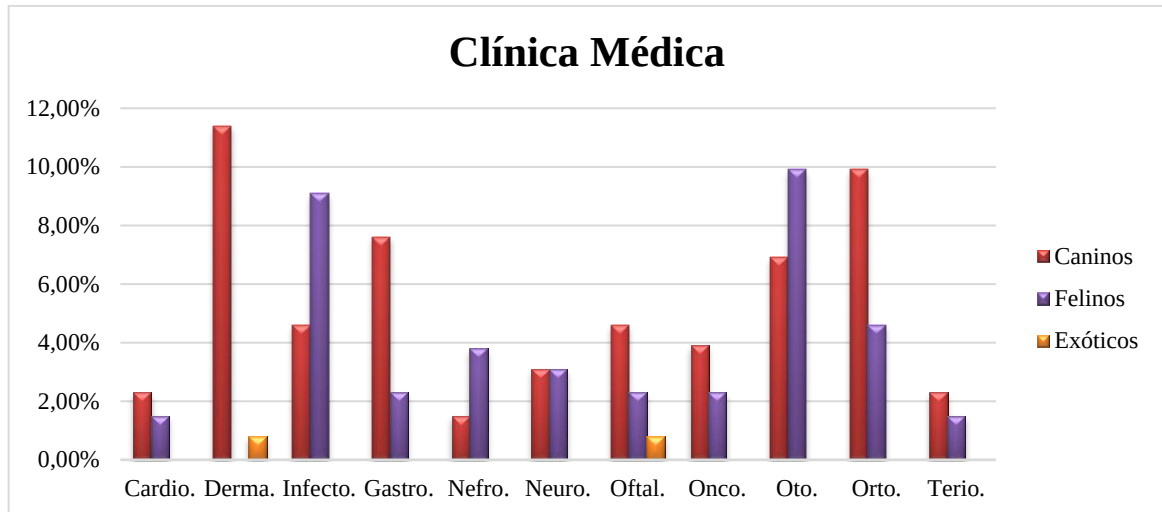
Tabela 3. Protocolo vacinal canino no Tutivete (adaptada do Hospital Tutivete)

Vacina \ Meses	1,5	2	3	3,5	4,5	5	6	6,5	7	8	
Parvovirose	•	•	•								Reforço Anual
Tetra		•	•								
Tosse Canil			•	•							
D. Lyme				•	•						
Piroplasmose						•	•				
Leishmaniose								•	•	•	
Raiva					•						

Tabela 4. Protocolo vacinal felino no Tutivete (adaptada do Hospital Tutivete)

Vacina \ Meses	2	3,5	3	3,5		2	3	
Leucemia Felina		•		•				Reforço Anual
Herpesvírus								
Rinotraqueíte								
Panleucopénia	•		•		ou	•	•	
Clamidiose								
Raiva				•			•	

Relativamente à distribuição da casuística em função das diferentes áreas de especialidade médica e espécie, a dermatologia canina foi a mais representada (11,4%), seguida da otorrinolaringologia (9,9%) e da ortopedia com 9,9% (Gráfico 2).



Legenda. (Cardio) Cardiologia e Pneumologia; (Derma) Dermatologia; (Infecto) Doenças Infectocontagiosas e Parasitárias; (Gastro) Gastroenterologia, Glândulas Anexas, Estomatologia e Odontologia; (Nefro) Nefrologia e Urologia; (Neuro) Neurologia; (Oftal) Oftalmologia; (Onco) Oncologia; (Oto) Otorrinolaringologia; (Orto) Ortopedia; (Terio) Teriogenologia.

Gráfico 2. Distribuição da casuística em função das diferentes áreas de especialidade médica (n=131).

Em relação à distribuição da casuística em função das diferentes áreas cirúrgicas e espécie, a que apresentou maior notabilidade foi a cirurgia de tecidos moles em caninos (43,8%) e felinos (29,2%) (Gráfico 3).

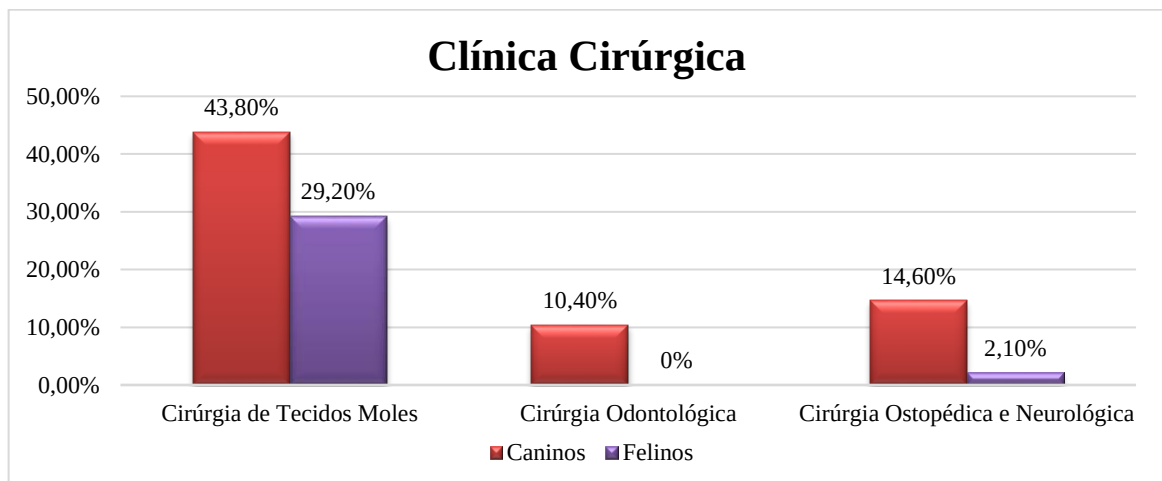


Gráfico 3. Distribuição da casuística em função das diferentes áreas cirúrgicas (n=48).

2. Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias – Faculdade de Medicina Veterinária

Atividades desenvolvidas na Faculdade de Medicina Veterinária

O seguinte relatório de estágio refere-se às atividades desenvolvidas no decorrer da segunda parte do estágio curricular. Este decorreu no Núcleo de Investigação Científica e no Hospital Veterinário da FMV-ULHT, durante um período de 7 meses, compreendido entre 4 de janeiro de 2016 a 29 de julho de 2016 sob a orientação do Professor Doutor Daniel Murta. O Hospital Veterinário da ULHT encontra-se aberto 24 horas por dia, todos os dias do ano e presta serviços nas diversas áreas da medicina, cirurgia de animais de companhia e animais exóticos.

Durante o período de estágio no Hospital Veterinário da ULHT foi possível o acompanhamento de um elevado número de OVH em pequenos animais (cerca de 100), permitindo a aplicação prática de conhecimentos adquiridos ao longo do curso nas áreas de anestesia e cirurgia, assim como a recolha de materiais biológicos, necessários para a realização do estudo posteriormente descrito nesta dissertação (Figura 1).

No Núcleo de Investigação da FMV-ULHT foi possível desenvolver um grande número de conhecimentos e técnicas, na medida em que a aprendizagem da técnica de imunohistoquímica necessária para o estudo realizado, engloba conhecimentos de várias disciplinas, desde a biologia celular, histologia e a imunologia.

Foi também possível colaborar com os Professores da Faculdade na montagem e preparação de amostras para análise histopatológica, permitindo o aprofundamento de conhecimentos e técnicas aprendidas durante o curso.

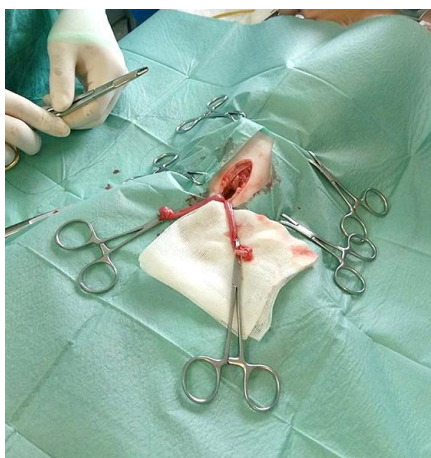


Figura 1. Imagem ilustrativa de ovariohisterectomia eletiva realizada em gata no Hospital Veterinário da FMV-ULHT (gentilmente cedida pela FMV-ULHT)

Capítulo III – Desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na cadela e gata

1. Introdução

1.1. O Estudo da Fisiologia Reprodutiva em Cadelas e Gatas.

O estudo da foliculogénese em animais de companhia, um processo contínuo de ativação, crescimento e maturação folicular, consiste numa área de elevado interesse, existindo subgrupos que podem beneficiar do seu progresso (Carrijo et al., 2010). Contudo, a informação disponível sobre os detalhes da fisiologia reprodutiva nas duas espécies estudadas nesta dissertação, é ainda bastante reduzida e ambas pertencem a famílias com um elevado número de espécies em vias de extinção (Songsasen, Nagashima, & Thongkittidilok, 2017). A família *Canidea*, à qual pertence o cão (*Canis familiaris*), é constituída por 36 espécies, das quais 14 ameaçadas de extinção (IUCN 2017), enquanto a família *Felidae*, à qual pertence o gato doméstico (*Felis catus*), é composta por um total de 37 espécies (IUCN 2017), as quais, à exceção do gato doméstico, estão todas em perigo ou ameaçados de extinção. Desta forma, tanto a cadela como a gata constituem um modelo experimental importante e necessário para a produção de tecnologias reprodutivas assistidas, não só com vista a estas duas espécies com interesse veterinário, mas também por poderem contribuir para a salvaguarda das restantes espécies das famílias a que pertencem (Bristol, 2003).

Neste contexto o estudo da foliculogénese ovárica de cães e gatos domésticos, proporciona a melhor compreensão dos princípios básicos da reprodução (Carrijo et al., 2010) e a possibilidade de reduzir o potencial de extinção de diversas espécies selvagens (Sambasivarao, 2012; Songsasen, Comizzoli, Nagashima, Fujihara, & Wildt, 2012).

1.1.1. Gatas

A gata doméstica, é uma espécie poliéstrica sazonal, à semelhança de outros mamíferos domésticos como a égua, a cabra e a ovelha (Johnston, Root Kustritz, & Olson, 2001), e uma espécie de ovulação induzida, como o coelho, o furão e o esquilo (Dawson & Friedgood, 1940; Shille, Lundström, & Stabenfeldt, 1979). A sua ciclicidade é profundamente influenciada pela quantidade de luz a que são expostos (Johnston et al., 2001). A perceção da alteração de luz no dia é mediada pela glândula pineal que, através da síntese de melatonina, a principal hormona moduladora do eixo hipotálamo-hipófise-ovário na gata (Graham, Swanson, Wildt, & Brown, 2004), influencia a

libertação de GnRH (hormona libertadora de gonadotrofinas) no hipotálamo (Hyttel, Sinowatz, & Vejlsted, 2010) que por sua vez, estimula a libertação de FSH (hormona folículo estimulante) e LH (hormona luteinizante) pela hipófise anterior (Hyttel et al., 2010). A secreção de GnRHs e, portanto, de FSH e LH, é influenciada por estímulos visuais, olfativos, auditivos e tácteis do ambiente e também por sistemas de feedback homeostático do animal (Hyttel et al., 2010).

A fêmea felina atinge a puberdade com 4 a 12 meses de idade (Johnston et al., 2001), existindo condições que determinam a precocidade ou o atraso da puberdade, como a raça, o fotoperíodo e o mês de nascimento (Jemmett & Evans, 1977). Assim, animais que se encontrem em localizações que os permitam expressar sazonalidade reprodutiva tendem a ser mais precoces se nasceram no inverno e no outono do que aqueles que nascem no verão ou primavera (Jemmett & Evans, 1977). A puberdade pode também ser relacionada com o peso do animal, ocorrendo quando atingem de 2,3 Kg a 2,5 Kg (Johnston et al., 2001).

Em condições fisiológicas normais, a sua ovulação é induzida por estimulação mecânica da vagina durante a cópula (Shille et al., 1979), contudo, ocasionalmente esta pode ocorrer sem que exista qualquer contacto, devido a estímulos visuais, auditivos e olfativos. Outra explicação para este acontecimento é o facto de existirem recetores similares aos encontrados na vulva na área lombar (Rose, 1979), estes podem ser estimulados pela monta de outras fêmeas, machos castrados ou acariciando esta área. Foram ainda descritos fenómenos de ovulações espontâneas por Kutzler (2007). Se não acasalar, a gata irá apresentar sucessivos períodos de estro, em média cada 2 a 3 semanas, com duração aproximada de 1 semana (Johnston et al., 2001).

1.1.2. Cadelas

A fêmea canina é classificada como monoéstrica, ou seja, exibe um estro por época reprodutiva, com intervalos interestrals em média de 6-7 meses (Johnston et al., 2001). É uma espécie que exibe ovulação espontânea e fase lútea espontânea, semelhantes em comprimento da fase lútea gestante, seguida de um anestro obrigatório que antecede o proestro seguinte (Concannon, 2011). É uma espécie tipicamente não sazonal, contudo, algumas raças demonstram sazonalidade reprodutiva (Johnston et al., 2001).

A puberdade tem início com o desenvolvimento do primeiro proestro, estando esta definida como o período em que a capacidade de reprodução é alcançada e ocorre entre os 6 e 10 meses de idade, variando consoante a raça e peso do animal (Johnston et al., 2001; Concannon, 2009; 2011; 2012).

1.2. Ciclo Éstrico

1.2.1. Gatas

O ciclo éstrico refere-se às alterações cíclicas fisiológicas, tanto orgânicas quanto comportamental, induzidas por diferentes perfis hormonais.

A gata doméstica divide o ciclo éstrico em cinco fases, o proestro, o estro, o interestro, o diestro e anestro (Johnston et al., 2001). O proestro, com duração aproximada de 1 a 2 dias (Bristol-Gould & Woodruff, 2006), é dificilmente detetado, devido ao seu comportamento inespecífico. Este caracteriza-se comportamentalmente por um aumento da atividade motora e apesar de não existir aceitação do macho, a fêmea reage de forma menos hostil quando abordada (Michael, 1961; Brown, 2011). Neste período, observa-se crescimento folicular e aumento da síntese de estradiol (E2) pelas células da granulosa dos folículos ovários (Shille et al., 1979; Johnston et al., 2001).

O estro é o período de completa receptividade sexual, com duração média de 7 dias mas que pode ir de 1-21 dias (Johnston et al., 2001), é caracterizado por vários comportamentos como flexão dos membros posteriores, hiperextensão do dorso com lordose, apresentação da região vulvar para copula, desvio da cauda e vocalização (Shille et al., 1979; Johnston et al., 2001; Kustritz, 2005). O comportamento está relacionado com as concentrações séricas de E2, nesta fase ocorre o pico de atividade folicular e secreção de E2, com concentrações plasmáticas a alcançar 70pg/mL (Shille et al., 1979). O aumento da concentração de E2 secretado nas células da granulosa, provoca o aumento dos folículos, e estimula a queratinização do epitélio vaginal (Shille et al., 1979).

A capacidade de produção de LH está dependente do tempo de exposição que o hipotálamo e a hipófise tiveram aos estrogénios (Johnston et al., 2001) e, subsequentemente, durante a cópula, a estimulação mecânica modula a secreção de GnRH, determinando a libertação pulsátil de LH e sequente ovulação 29 a 40 horas depois (Robinson & Sawyer, 1987), sendo a magnitude do pico de LH libertado tanto maior quanto o número de cópulas (Wildt, Seager, & Chakraborty, 1980), pois apenas ¼ das fêmeas liberta LH suficiente com uma cópula que lhe permita ovular. Por último, a LH promove a produção de androgénios pela teca que é posteriormente necessária para a produção de estrogénio pelas células da granulosa do folículo (YoungLai, Belbeck, Dimond, & Singh, 1976).

Caso a ovulação não ocorra, assim que o período de estro termine a gata entra na fase de interestro (Johnston et al., 2001; Peterson, 2015). Este é um período de inatividade reprodutiva que compreende o período entre um estro e o proestro seguinte, hormonalmente similar ao anestro (Brown, 2011), sendo exclusiva de espécies de ovulação induzida (Johnston et al., 2001). Com

duração média de 9 dias, caracteriza-se pela regressão dos folículos pré-ovulatórios e o aparecimento de uma nova onda folicular (Shille et al., 1979; Kutzler, 2007).

O diestro é definido como a fase lútea, durante este período há a formação do corpo lúteo (CL), acompanhado pela predominância de progesterona (P4) no soro. É o período que sucede o caso a ovulação seja induzida, tem a duração aproximada de 60 dias em gatas gestantes (Feldman & Nelson, 2004; Bristol-Gould & Woodruff, 2006). Caso a fêmea ovule e a fertilização não ocorra, surge a pseudogestação com duração aproximada de 40 dias (Bristol-Gould & Woodruff, 2006; Johnston et al., 2001; Peterson, 2015). O CL desenvolve-se 1-2 dias após a ovulação e inicia a síntese e secreção de P4, que inibe a secreção da GnRH do hipotálamo e por sua vez a LH e FSH da hipófise (Dawson, 1941; Feldman & Nelson, 2004).

Por último, ocorre o anestro, fase caracterizada como o período de inatividade ovárica e valores basais de E2 e P4 (Bristol-Gould & Woodruff, 2006), ocorre durante os dias de pouca luz “*short daylight*” (Johnston et al., 2001; Feldman & Nelson, 2004). A sua duração está diretamente relacionada com o número de horas de luz por dia, sendo os dias de luminosidade decrescente característicos dos períodos de anestro. Neste período, as fêmeas felinas não expressão qualquer comportamento sexual (Peterson, 2015).

1.2.2. Cadelas

O ciclo reprodutivo da cadela, assim como a fêmea felina, é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Concannon 2009; 2011) é caracterizado segundo alterações fisiológicas, endócrinas e comportamentais observadas no animal. Este pode ser dividido em quatro fases: o proestro, o estro, o diestro ou metaestro e o anestro (Concannon 2009; 2011; 2012).

O proestro, definido como o início do período de atividade sexual, tem uma duração média de 9 dias (5-20 dias)(Concannon, 2009). Clinicamente, observa-se o aparecimento de corrimento vulvar sanguinolento, edema e turgidez vulvar (Concannon, Hansel, & Visek, 1975), sem receptividade da fêmea ao macho (Johnston et al., 2001).

Endocrinologicamente, previamente ao início do proestro, há um aumento nos impulsos da GnRH do hipotálamo que, por sua vez, estimula a libertação da FSH e da LH da hipófise anterior. O aumento dos níveis de hormonas hipofisárias inicia o crescimento folicular e estimula a esteroidogénese gonadal (E2 e P4) as concentrações séricas de E2 aumentam para níveis que resultam nos sinais clínicos observados (England, Russo, & Freeman, 2009; Concannon, 2011). No final do proestro, o aumento contínuo de E2 estimula a libertação de LH que ativa o rápido crescimento folicular e a luteinização pré-ovulatória que leva à ovulação 40 a 50 horas após o pico de LH (Concannon et al., 1975; Songsasen & Wildt, 2007; Concannon, 2011). As concentrações

séricas de testosterona aumentam no final do proestro, atingindo valores de 0,3 a 1,0 ng/mL na altura do pico da LH.

O estro é o estadio caracterizado pela recetividade da fêmeas ao macho (Johnston et al., 2001). Apresenta uma duração variável de 5 a 15 dias (Concannon, 2011), tendo início tipicamente 0-1 dias após o pico da LH (Concannon, 2009), que ocorre em resposta ao declínio do E2 (10 – 20pg/ml) que é facilitado sinergicamente pelo rápido aumento da P4 e identificado por valores acima de 1 – 3ng/ml (Wright, 1990; Johnston et al., 2001). O pico pré ovulatório de LH dura entre 24-72h (Concannon, 2009; Reynaud, Lesegno, Chebrout, Thoumire, & Chastant-Maillard, 2009), e é seguido pela ovulação aproximadamente 2 dias depois (Phemister, Holst, Spano, & Hopwood, 1973). A cadela tem a particularidade de ovular oócitos primários, que terminam a sua maturação no oviduto, 2 dias após ovulação (Concannon, 2011). Clinicamente a fêmea canina apresenta menor intumescimento e corrimento vulvar durante o estro do que no proestro e esta fase permanece até que a anatomia vaginal e a citologia não reflitam a cornificação máxima, mas sim uma descamação regional de células não cornificadas, mudança que ocorre tipicamente entre 6 e 11 dias após o aumento da LH (Concannon, 2011).

A fêmea canina apresenta uma fase lútea espontânea semelhante em comprimento 64 ± 1 dia da fase lútea gestante 65 ± 1 dia (Concannon, 2011), com níveis de P4 sérica similares durante o diestro em cadelas gestantes e não gestantes.

O início do diestro é definido pelas alterações observadas na citologia vaginal com a mudança abrupta no número de células epiteliais, principalmente superficial versus parabasal/células intermediárias (Johnston et al., 2001). As concentrações séricas de P4 aumentam para picos de 15 – 80ng/ml e diminui lentamente depois (Concannon, 2009). A P4 é unicamente de origem lútea, e é dependente tanto da LH quanto da prolactina. O E2 é variável de 15-30 pg/ml com perfis paralelos aos da P4, mais elevados na fase lútea média e depois em declínio (Concannon, 2011).

Clinicamente as fêmeas não exibem recetividade na presença do macho, ocorre desenvolvimento mamário, a vulva diminui de tamanho e apresenta descarga vaginal variável (limpa, purulenta, hemorrágica) (Johnston et al., 2001).

O fim do diestro ocorre quando o endométrio uterino sofreu total reparação histológica, o desenvolvimento mamário termina e os níveis de P4 são inferiores a 1 ou 2ng/ml (Concannon, 2011; Johnston et al., 2001).

O anestro é considerado um intervalo prolongado de quiescência ovária entre ciclos reprodutivos, com duração de 80 – 240 dias (Concannon, 2011) e é caracterizado por ausência de sinais clínicos de atividade ovária. Contudo, não é uma fase de repouso hormonal, apresentando valores basais de concentrações de P4 sanguínea abaixo de 1 ng/mL, os valores de E2 são variáveis,

mas geralmente reportados abaixo dos 5 – 10pg/ml. Os valores basais de LH são variáveis, de baixos (<1 – 2 ng/ml) a impulsos esporádicos (3 – 30ng/ml) em intervalos de 7–18h. A FSH é normalmente alta (50 – 400ng/ml) entre impulsos esporádicos ligeiramente acima da linha base, que quando detetados são normalmente concomitantes com os impulsos da LH (Concannon, 2011).

Os mecanismos subjacentes à transição do anestro para o proestro seguinte não estão completamente elucidados, ainda assim Songsasen et al. (2017) sugerem que a FSH desempenha um papel fundamental no recrutamento folicular da cadela e consequentemente na terminação do anestro.

1.3. Citologia Vaginal

A citologia vaginal é um método simples, rápido e não invasivo, utilizado em Gatas e Cadelas (Groppetti, Pecile, Barbero, & Martino, 2012). É uma avaliação subjetiva da morfologia das células epiteliais, que utiliza critérios para avaliar a resposta da mucosa vaginal à ação hormonal (Schutte, 1967) que permitam identificar a fase do ciclo reprodutivo (Moxon, Copley, & England, 2010) assim como a presença de patologias endócrinas e reprodutivas (Kanca, Karakas, Dalgic, Salar, & Izgur, 2014). Contudo, embora seja útil no reconhecimento da fase do ciclo éstrico, não delimita com precisão os estadios (Andersen & Simpson, 1973).

O epitélio da mucosa vaginal responde a estímulos hormonais, ocorrendo um processo cíclico de maturação e diferenciação celular (Schutte, 1967). O aumento dos níveis de estrogénio durante as fases do ciclo éstrico originam proliferação e aumenta do número de células epiteliais nos fluidos vaginais (Johnston et al., 2001). As células epiteliais observadas são classificadas consoante a sua morfologia em basais, parabasais, intermédias pequenas/ médias ou grandes e superficiais nucleadas/ anucleadas. É também possível a observação de neutrófilos e eritrócitos, dependendo da fase folicular (Figura 2).

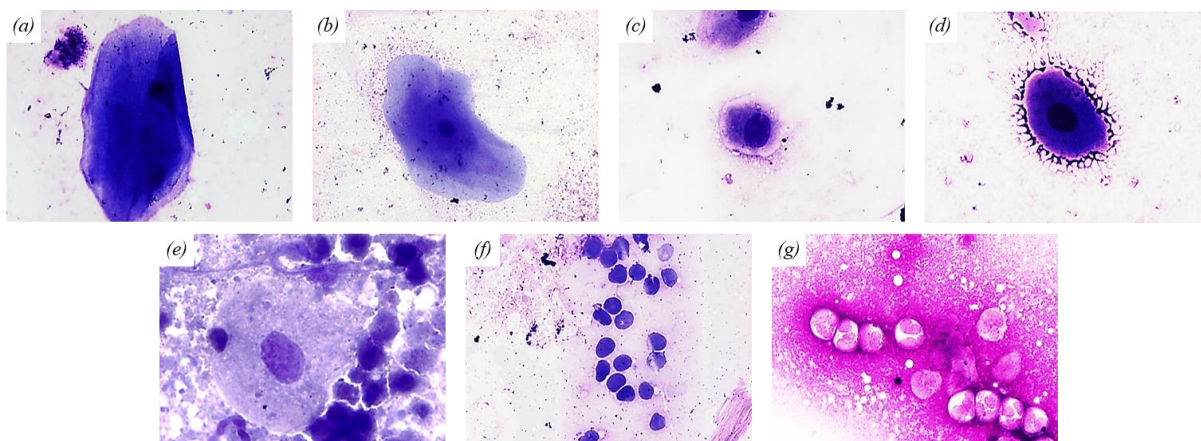


Figura 2. Células presentes na citologia vaginal. (a) Célula superficial anucleada; (b) célula superficial nucleada; (c) célula parabasal em cadela pré púbere; (d) célula intermédia pequenas; (e) célula intermédia grande; (f) eritrócitos; (g) neutrófilo. Coloração giemsa. Ampliação 600x.

As células basais, pequenas e redondas, são as precursoras das restantes células epiteliais e como constituem a membrada basal, raramente são exfoliadas, sendo assim pouco observadas em citologias vaginais. As células parabasais são as mais pequenas encontradas nas citologias vaginais, sendo redondas a ovais, com elevado ratio núcleo/ citoplasma (Figura 2c). As células intermédias variam em tamanho de pequenas, médias a grandes, o ratio núcleo/ citoplasma é menor, com bordos de redondos a irregulares (Figura 2d,e). Já as células superficiais (Figura 2a,b) são grandes, o seu nome refere-se à posição que ocupam na camada mais superficial do epitélio vaginal, quando este atinge o espessamento máximo, o núcleo é pequeno, redondo, picnótico, margens angulares e dobradas, normalmente escura, porque são células degeneradas ou cornificadas (Johnston et al., 2001).

Segundo Groppetti (2012) em cadelas os neutrófilos são observados em 83,7% dos esfregaços vaginais realizados em proestro, além do que, durante esta fase, o aumento da concentração de estrogénio origina hiperémia da mucosa uterina e aumento da permeabilidade vascular que resulta no extravasamento de neutrófilos e eritrócitos (Feldman & Nelson, 2004). Desta forma os eritrócitos podem estar presentes em esfregaços vaginais de cadelas em proestro, estro e início de diestro (Johnston et al., 2001).

Durante o proestro, as células epiteliais presentes na citologia vaginal da cadela sofrem algumas alterações, desde inicialmente pequenas a grandes células intermédias com baixo número de células parabasais e queratinizadas, para um elevado número de células intermedias grandes e queratinizadas (Johnston et al., 2001; Schutte, 1967)

O estro pode ser facilmente definido com base na citologia, quando mais de 90 por cento das células epiteliais vaginais presentes no esfregaço são células superficiais queratinizadas

(Johnston et al., 2001; Reddy, Raju, Rao, & Rao, 2011). Geralmente não se observam eritrócitos ou neutrófilos (Schutte, 1967).

O início do diestro é caracterizado pela observação de neutrófilos, evidente após a fase folicular, juntamente com a redução abrupta de células superficiais queratinizadas e o aparecimento de células intermediárias e parabasais (Schutte, 1967; Post, 1985; Johnston et al., 2001; Groppetti et al., 2012).

Durante o anestro, o epitélio vaginal da cadela é constituído apenas por algumas camadas de células e consiste principalmente em células intermédias parabasais pequenas (Post, 1985; Johnston et al., 2001).

Comparativamente com a cadela a citologia vaginal é menos utilizada na gata. Isto deve-se à ambiguidade das alterações celulares na vagina da gata e à utilização específica para deteção do tempo ideal de cobertura na cadela. Está também descrito o risco de induzir ovulação, associado ao procedimento de colheita (Kanca et al., 2014). Foi em 1939 um estudo de Liche & Wodzicki que permitiu afirmar a possibilidade de identificar a fase do ciclo éstrico na gata e na leoa com base na citologia vaginal.

A citologia vaginal da fêmea felina durante o proestro é constituída por células parabasais, células intermédias, células superficiais nucleadas, células superficiais anucleadas e neutrófilos (Johnston et al., 2001)

Ao longo do estro, o número de células superficiais é bastante consistente, quanto que durante o proestro e o estro, dificilmente são observados eritrócitos ou neutrófilos no esfregaço vaginal da fêmea felina (Johnston et al., 2001). Nesta espécie as células superficiais não mudam muito durante o ciclo, exceto por um ligeiro aumento durante a fase folicular (Kanca et al., 2014). Na gata e na cadela o pico de cornificação vaginal ocorre durante o estro, contudo, ao contrário da cadela, na gata este momento corresponde a uma concentração plasmática de E2 é máxima (Johnston et al., 2001), enquanto que na cadela o pico de cornificação coincide com concentrações plasmáticas de P4 necessárias para a ovulação (Moxon et al., 2010).

A predominância de células intermédias na citologia vaginal de felinos está relacionada com a baixa concentração de E2. Durante os intervalos entre ciclos éstricos as células superficiais e intermédias são o tipo predominante (Kanca et al., 2014).

O diestro caracteriza-se pelo aumento da proporção de células intermédias e por uma diminuição das células superficiais, assim como observado na fêmea canina (Kanca et al., 2014).

Assim como na cadela, a citologia vaginal obtida durante o anestro da gata tende a ser pouco celular, possuindo células intermédias, predominantemente médias, geralmente agrupadas e algumas células parabasais (Mills, Valli, & Lumsden, 1979).

1.4. Oogénese

A oogénese culmina com a formação do oócito haploide que após maturação pode ser fecundado, é o processo de desenvolvimento e diferenciação das células primordiais germinativas (CPG) que após múltiplas mitoses originam as oogónias. Estas podem ser identificadas em diferentes períodos fetais de desenvolvimento de acordo com a espécie (Tabela 5)(Hyttel et al., 2010). A maioria das oogónias continua a sua proliferação mitótica diferenciando-se em oócitos primários, que posteriormente entram na fase S do ciclo celular e na prófase I da meiose. Contudo um elevado número de oogónias e oócitos primários não termina o seu desenvolvimento devido a uma elevada taxa de apoptose celular observada nesta fase. Todos os oócitos primários sobreviventes estão em prófase I da meiose e assim ficam retidos no estadio diploteno até ao seu recrutamento (Smitz et al., 2002; Hyttel et al., 2010).

A formação do oócito primário tem início no período fetal, em períodos diferentes na cadela e na gata (Tabela 5) (Hyttel et al., 2010), após o nascimento são rodeados por células achatadas pré-granulosas (originárias do epitélio ovárico) dando origem aos folículos primordiais (Bristol-Gould & Woodruff, 2006). Esta observação indica o fim da prófase da meiose (Andersen & Simpson, 1973). Os folículos primordiais são considerados o reservatório (*pool*) quiescente de oócitos, retidos em prófase I da meiose rodeados por uma única camada de células da pré-granulosas achatadas (Andersen & Simpson, 1973; Paulini, Silva, Rôlo, & Lucci, 2014) dos quais a fêmea recrutará folículos para crescimento e ovulação durante a sua vida reprodutiva. Estes folículos representam 90% da população de folículos ováricos em mamíferos adultos (McLaughlin & McIver, 2009). Na maioria dos mamíferos o oócito primário não retoma a meiose nem progride a sua maturação nuclear para metáfase II da meiose até a puberdade, pouco antes da ovulação (Hyttel et al., 2010).

Tabela 5. Cronologia de eventos durante a diferenciação gonadal na cadela e gata (adaptado de (Hyttel et al., 2010))

Espécie	Cadela	Gata
CPGs ¹	28 Dias	10 mm
Início da meiose	Ao nascimento	40-50 Dias
1º Folículo primordial	3 Semanas após nascimento	11 Dias após nascimento
Última mitose de oogónia	15-17 Dias após o nascimento	8 Dias após o nascimento
Nascimento	62 Dias	63 Dias
Nº de oogónias/oócitos ao nascimento	700 000	-
Nº de oogónias/oócitos 5 anos	35 000	-
Nº de oogónias/oócitos 10 anos	500	-

¹Células primordiais germinativas

1.5. Foliculogénese

Em mamíferos, a foliculogénese é um processo altamente organizado de desenvolvimento folicular, que envolve processos de proliferação, diferenciação e atresia celular, responsáveis pelo crescimento e maturação folicular, eventualmente culminando na ovulação (Eppig, 2001; Smitz et al., 2002; Songsasen, Fickes, Pukazhenth, & Wildt, 2009b). No entanto, cada espécie tem a sua própria escala temporal de desenvolvimento folicular. Ao longo do ciclo éstrico estão presentes folículos ovários nas diferentes fases de desenvolvimento, incluindo folículos primordiais, primários, secundários, pré-antrais e antrais (Pedersen & Peters, 1968; Alain Gougeon, 1996; Bristol, 2003; Bristol-Gould & Woodruff, 2006).

Na mulher, a duração do período fértil é determinado pela *pool* de folículos primordiais formados durante o período fetal e o rácio de depleção da mesma após o nascimento (Smitz et al., 2002). Na cadela e gata a *pool* de folículos primordiais terminam a sua formação após o nascimento, na cadela ocorre entre os dias 15 a 54 (Andersen & Simpson, 1973; Hyttel et al., 2010) e na gata ocorre 8 dias após o nascimento (Bristol-Gould & Woodruff, 2006; Hyttel et al., 2010).

Os mecanismos, fatores de crescimento e hormonas que desencadeiam o recrutamento e início do crescimento folicular, interrompendo a latência do desenvolvimento são ainda pouco compreendidos, embora estejam atualmente a ser foco de estudo (Smitz et al., 2002; Bristol-Gould & Woodruff, 2006). Além disso, a informação disponível relativamente à *Ordem Carnívora* mais especificamente da família *Canidae* e *Felidae*, sobre a regulação da ativação é extrapolada de roedores (Oktay, Schenken, & Nelson, 1995; Edson, Nagaraja, & Matzuk, 2009; Thuwanut, Comizzoli, Wildt, Keefer, & Songsasen, 2016).

A foliculogénese tem início com o recrutamento de folículos primordiais da *pool* quiescente de folículos primordiais estabelecida no período neonatal (Edson et al., 2009). Uma vez estabelecida, a reserva de folículos primordiais diminui à medida que os folículos iniciam o crescimento de forma cíclica, ovulam ou entram em atresia (Oktay et al., 1995; Evans, 2003; Monniaux, 2016). O crescimento folicular ocorre num pequeno número de folículos de cada vez (Hage, Groen-Klevant, & Welschen, 1978). É de referir que a maioria dos folículos que entram nesta fase de crescimento não consegue completá-la sofrendo apoptose celular e atresia folicular, mecanismos importantes na formação da *pool* de folículos primordiais e ao longo da foliculogénese (Edson et al., 2009; Hyttel et al., 2010).

O recrutamento folicular e consequente início do crescimento é marcado pela transição do folículo primordial para primário (McLaughlin & McIver, 2009), e é caracterizado por uma alteração histológica da morfologia das células da pré-granulosas de achatadas para cubóides, agora

referidas como células da granulosa (CG) (Hyttel et al., 2010), e aumento do oócito (Smitz et al., 2002; Edson et al., 2009; Monniaux, 2016). A proliferação de CG em folículos quiescentes é um indicador precoce de ativação folicular (Gougeon & Busso, 2000).

Durante o desenvolvimento folicular até a formação do antro, o crescimento folicular ocorre através do aumento do tamanho do oócito concomitante com a proliferação das células da granulosa, e é independente de gonadotrofinas (Cortvrindt & Smitz, 2001). O equilíbrio deste desenvolvimento pode ser afetado por mutações nos genes que codificam tanto as conexinas que formam canais de membrana intercelular entre as células do oócito e a granulosa, como em fatores envolvidos no crescimento molecular existente (Eppig, 2001; Reynaud et al., 2012; Monniaux, 2016).

No folículo primário é possível identificar a zona pelúcida (ZP), uma membrana basal que separa a camada circundante de células da granulosa do oócito (Barber, Lee, Steffens, Ard, & Fayrer-Hosken, 2001). A ZP é uma matriz extracelular que envolve o oócito, constituída por três glicoproteínas extracelulares (ZP1, ZP2 e ZP3) é uma estrutura com múltiplas funções, sendo essencial para o desenvolvimento normal do folículo (Barber et al., 2001; Shrestha et al., 2015). A espessura da ZP num oócito desenvolvido é de aproximadamente 10 µm na cadela, dois terços da espessura observada na gata (Barber et al., 2001; Hyttel et al., 2010).

A contínua proliferação de células da granulosa dá origem a múltiplas camadas de células em redor do oócito, originando o folículo secundário (Fortune, 2003). Durante esta fase há um recrutamento de células somáticas do compartimento intersticial originando a teca (Cortvrindt & Smitz, 2001; Edson et al., 2009). Esta diferencia-se em teca interna, uma camada de células produtoras de esteroides e fatores de crescimento, necessários para suportar o crescimento folicular nos estadios subsequentes ao secundário (Wandji, Sršēn, Nathanielsz, Eppig, & Fortune, 1997). E teca externa, formada por camadas concêntricas de células que possuem funções de suporte (Hyttel et al., 2010). As células da teca interna e as células da granulosa são, em conjunto, responsáveis pela síntese de E2 no folículo (Monniaux, 2016). Como referido, o crescimento do folículo secundário é independente de gonadotrofinas, mas depende de fatores reguladores autócrinos e parácrinos (Edson et al., 2009).

A evolução do folículo secundário para pré-antral e antral marca a transição dos reguladores da foliculogénese, principalmente de intraováricos para extraováricos (Edson et al., 2009). Durante este período, alguns folículos no início do estadio antral são recrutados para continuar o seu crescimento, este processo é coordenado por gonadotrofinas hipofisárias, a FSH e a LH (Alain Gougeon, 1996; Fortune, 2003; Mehlmann, 2005). Os recetores da hormona folículo estimulante (FSHr) são expressos pelas células da granulosa e as células da teca expressão o recetor

da hormona luteinizante (LHR) (McGee & Hsueh, 2000), a FSH torna-se essencial, não só para prevenir a apoptose celular da granulosa e a atresia folicular, mas também para a proliferação de células da granulosa.

Em resposta à FSH e à LH, observa-se nos folículos em crescimento a formação de um antro, uma cavidade de líquido folicular acumulado entre as células da granulosa (Cortvrindt & Smitz, 2001). Durante o desenvolvimento folicular final, as células da granulosa diferem na sua expressão génica e funcionam de acordo com a localização dentro do folículo. As células da granulosa que revestem a parede folicular são referidas como células da granulosa mural, e aquelas que se encontram adjacentes ao oócito são diferenciadas em *cumulus oophorus* e *corona radiata*, células essenciais para a regulação da diferenciação e maturação meiótica no crescimento final do oócito (Eppig, Wigglesworth, & Pendola, 2002; Edson et al., 2009; Jagarlamudi & Rajkovic, 2012).

Na maioria dos mamíferos o desenvolvimento folicular terminal e a aquisição da competência meiótica, ou maturação nuclear do oócito e possível fecundação, ocorre durante a formação do antro (Mehlmann, 2005; Monniaux, 2016). A maturação nuclear do oócito refere-se ao processo de meiose que é retomado no estadio diploteno da prófase I da meiose e continua na metáfase II da meiose quando o oócito é ovulado (Hyttel et al., 2010), este processo é diferente na cadela.

O processo de ovulação é desencadeado pelo aumento da LH, que resulta do aumento de E2 sérico, suprime a secreção de FSH hipofisária e consequentemente aumenta a produção de E2 folicular que aumenta a produção de LH hipofisária resultando no aumento de LH (Edson et al., 2009). Este aumento inicia a cascata de eventos que levam à retoma da meiose no oócito, maturação oocitária (Picton, Harris, Muruvi, & Chambers, 2008), expansão do cumulus, ovulação do folículo e, finalmente, a diferenciação terminal das células da granulosa e células da teca no corpo lúteo (CL) (Edson et al., 2009). O período desde o início do aumento da LH até a ovulação é específico de cada espécie (Hyttel et al., 2010).

Após ovulação do folículo e libertação do complexo cumulus-oócito, o destino das demais células da granulosa e da teca é a diferenciação terminal para formar o CL (Concannon, Hodgson, & Lein, 1980), uma estrutura endócrina altamente diferenciada responsável pela secreção de P4, estimular o útero e manter a gestação (Edson et al., 2009). As células da granulosa e da teca sofrem luteinização e dão origem a células lúteas grandes e pequenas, ambas com capacidade de secretar P4. Considera-se que as células esteroideogénicas pequenas derivam da teca interna, e as células grandes derivam das células da granulosa que revestem a parede do folículo (McCracken, Custer, & Lamsa, 1999). O CL é uma glândula endócrina transitória que suporta uma série de modificações

estruturais e funcionais durante a sua vida útil (Stocco, Telleria, & Gibori, 2007; Amelkina, Braun, Dehnhard, & Jewgenow, 2015).

1.5.1. Classificação Folicular

O folículo ovárico é constituído por vários tipos celulares diferenciados, durante a foliculogénese, a morfologia folicular é alterada à medida que o oócito cresce e as células circundantes se diferenciam.

Referente à classificação folicular, estes podem ser classificados de acordo com o tamanho, tipo e número de células da granulosa, ou se dependem ou não de hormonas gonadotróficas (Paulini et al., 2014). Não existem estudos que classifiquem os folículos ováricos da gata e da cadela ao longo do seu desenvolvimento (Bristol, 2003), recorrendo-se a uma adaptação do sistema de classificação proposto por Pedersen & Peters (1968), Alain Gougeon (1996) e Bristol (2003). Assim, os folículos foram classificados em folículos primordiais, folículos primário, folículos secundários, folículos pré-antrais e folículos antrais, de acordo com os critérios aplicados a roedores e a humanos.

Os folículos primordiais são geralmente os mais pequenos, constituídos por um oócito que varia de 20 a 30 μm de diâmetro tanto na gata (Bristol-Gould & Woodruff, 2006) como na cadela (Andersen & Simpson, 1973; Reynaud et al., 2012), e encontram-se rodeados por células da pré-granulosa achatadas diretamente adjacentes ao oócito.

Os folículos primários contêm oócitos com diâmetro que varia de 30 a 50 μm , na gata (Bristol-Gould & Woodruff, 2006), e 30-70 μm na cadela, (Andersen & Simpson, 1973; Reynaud et al., 2012) apresentando uma única camada de células da granulosa cubóides. Nesta fase, a zona pelúcida é facilmente detetada nas duas espécies (Barber et al., 2001; Diagone, Vicente, Pacheco, & Mateus, 2008; Carrijo et al., 2010).

Os folículos secundários alteram o seu tamanho devido às múltiplas camadas de células da granulosa, geralmente o oócito varia de 40 a 75 μm de tamanho na gata (Bristol-Gould & Woodruff, 2006) e $60.5 \pm 2.7 \mu\text{m}$ na cadela (Songsasen et al., 2017). Nesta fase, surge uma camada de células de teca, depositada no lado oposto à membrana basal a partir das células da granulosa.

Seguem-se os folículos pré-antrais, que podem ser semelhantes em diâmetro aos folículos secundários, mas aumentam o seu tamanho à medida que o líquido folicular se acumula na cavidade antral. A sua característica principal é o aparecimento de um antro com líquido folicular, geralmente em torno do oócito que tem aproximadamente 75-90 μm de diâmetro na gata (Bristol-Gould & Woodruff, 2006) e 90 – 110 μm na cadela (Reynaud et al., 2012). É possível observar em gatas (Reynaud, Gicquel, et al., 2009) e cadelas (Songsasen, Fickes, Pukazhenth, & Wildt, 2009a) dois

padrões distintos de desenvolvimento, antes da formação do antro, em que o crescimento do oócito ocorre em paralelo com o restante folículo, e após o seu aparecimento, em que o crescimento do oócito é inferior ao do folículo.

Por último, durante a fase antral o oócito alcança um tamanho aproximado de 85-100 μm na gata (Bristol-Gould & Woodruff, 2006) e 80-120 μm na cadela (Songsasen et al., 2017), este encontra-se encapsulado por duas camadas de células da granulosa cubóides o *cúmulos oophorus*, contêm duas camadas de células da teca (interna e externa) na cadela (England et al., 2009) e múltiplas camadas de células da teca na gata (Bristol-Gould & Woodruff, 2006). Possuem uma grande cavidade antral e o folículo está posicionado no córtex perto da periferia do ovário (Bristol, 2003) (Figura 3).

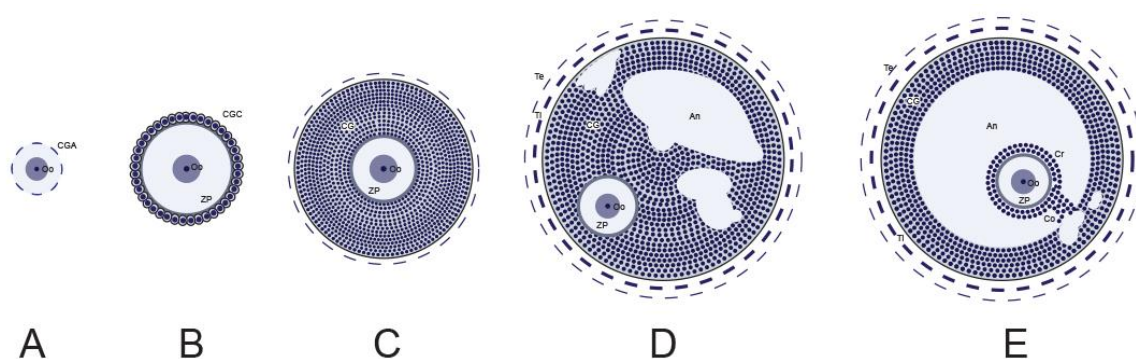


Figura 3. Ilustração esquemática dos estádios de desenvolvimento folicular. (A) folículo primordial; (B) folículo primário; (C) folículo secundário; (D) folículo pré-antral; (E) folículo antral; (Oo) Oócito; (CG) Células da granulosa; (CGA) Células da pré-granulosa achatadas; (CGC) Células da granulosa cubóides; (An) Antrum; (ZP) zona pelúcida; (Co) cumulus oophorus; (Cr) corona radiata; (Ti) teca interna; (Te) teca externa. (Original do autor)

1.5.2. Gatas

A gata doméstica representa um modelo ideal para o estudo do desenvolvimento folicular, devido à constante disponibilidade de todos os estádios foliculares, particularmente dos folículos primordiais (Bristol-Gould & Woodruff, 2006). Um estudo de Carrijo (2010) revelou que a população folicular nos ovários de gatas é composta por 87% de folículos primordiais, 10,4% de folículos primários e 2,3% de folículo secundários (Figura 4).

Além disto, a fêmea felina oferece um modelo único para o estudo dos processos moleculares dentro do folículo pré-ovulatório e do complexo cumulus-oócito (COCs), uma vez que cada animal apresenta entre 3 a 7 folículos pré-ovulatórios, naturalmente selecionados, no córtex perto da periferia ovárica, à espera do estímulo da LH (desencadeado pela cópula) durante o estro. Esta fase tem a duração de cerca de 7 dias, oferecendo uma ampla janela para recolha de amostras (Rojo, Linari, Musse, & Peluffo, 2015).

O seu desenvolvimento folicular tem início aproximadamente entre os 40-50 dias de desenvolvimento fetal, com a formação do oócito primário, terminando o seu desenvolvimento 8 dias após o nascimento (Bristol-Gould & Woodruff, 2006; Hyttel et al., 2010). É neste período de crescimento fetal que surge também a típica morfologia ovárica, com região medular e cortical diferenciadas (Kingsbury, 1913).

Como referido anteriormente, é no proestro que se observa o início do recrutamento e crescimento folicular (Dawson & Friedgood, 1940; Shille et al., 1979). É durante esta fase que a hormona folículo estimulante (FSH) produzida na hipófise induz o desenvolvimento folicular ovárico (Bristol-Gould & Woodruff, 2006), com o crescimento folicular é observado o aumento das concentrações séricas de E2 segregadas pelas células da granulosa dos folículos ováricos (Shille et al., 1979). O E2 estimula a cornificação vaginal e causa o comportamento de estro (Shille et al., 1979).

A cinética das ondas foliculares no estro varia muito entre animais (Malandain et al., 2011). A gata é conhecida por produzir ciclos reprodutivos distintos e ondas de desenvolvimento folicular em intervalos de 12 a 21 dias (Wildt, 1978). Com o aproximar do estro, uma média de cinco folículos tornam-se dominantes (Wildt, Chan, Seager, & Chakraborty, 1981; Malandain et al., 2011) enquanto outros em desenvolvimento entram em atresia.

Existe uma estimulação neuronal do hipotálamo induzida pela cópula, que provoca a libertação reflexa da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) e subsequente aumento da hormona luteinizante (LH) da hipófise (Banks & Stabenfeldt, 1982; Malandain et al., 2011). São necessários, como referidos anteriormente, acasalamentos sucessivos para que a libertação de LH seja suficiente para causar a maturação folicular final e a ovulação, que ocorre 24-48 horas pós-cópula (Shille et al., 1979). O aumento de LH inicia-se poucos minutos após a cópula, ocorrendo o seu pico em poucas horas (Johnson & Gay, 1981; Shille, Munrot, Farmer, Papkoff, & Stabenfeldt, 1983), o output de P4 não é observado até 24 a 48h após a ovulação, com a formação do corpo lúteo (Paape, Suille, Seto, & Stabenfeldt, 1975; Shille et al., 1979).

A capacidade do oócito da fêmea felina para alcançar a meiose e sustentar o desenvolvimento embrionário e pré-implantação é adquirida progressivamente através do crescimento folicular (Comizzoli, Pukazhenth, & Wildt, 2011). Em 2009 Reynaud observou que o início da competência meiótica do oócito ocorreu durante o estadio pré-antral, após a formação do antro (Reynaud, Gicquel, et al., 2009). No momento da formação do antro o oócito felino atingiu 90% do seu diâmetro final (Reynaud, Gicquel, et al., 2009).

O CL desenvolve-se a partir de células foliculares residuais após o aumento da LH posterior à ovulação como referido anteriormente nos restantes mamíferos (Concannon et al., 1980).

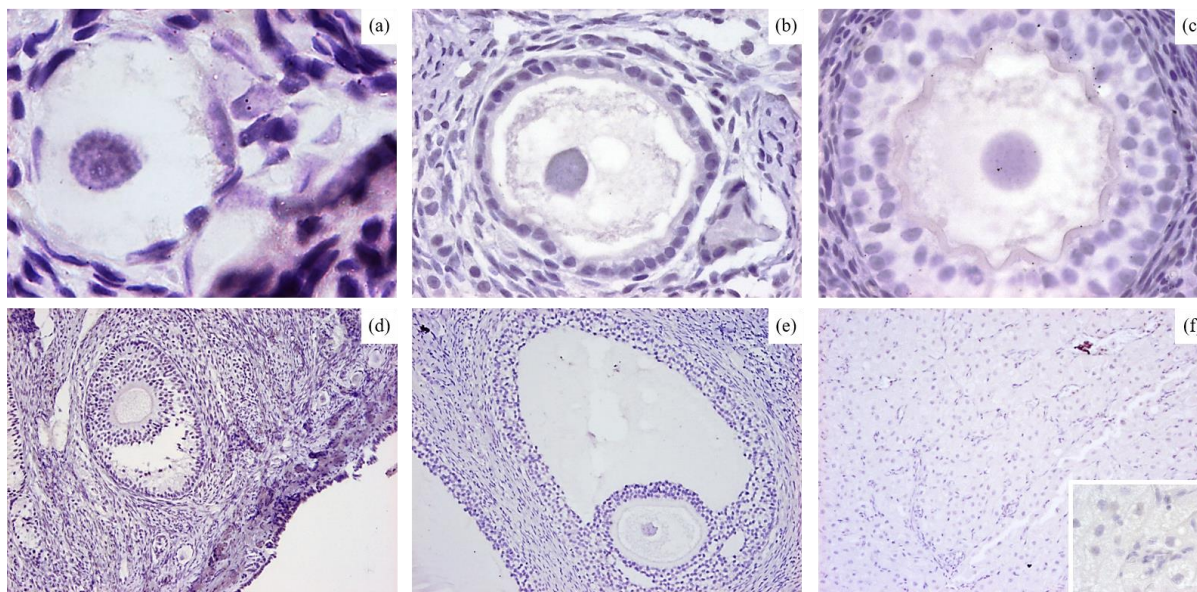


Figura 4. Desenvolvimento folicular na gata. (a) Folículo primordial; (b) Folículo primário; (c) Folículo secundário; (d) Folículo pré-antral; (e) Folículo antral; (f) Corpo lúteo. Coloração com hematoxilina. (a) 1000x; (b,c) 100x; (d,e,f) 40x.

1.5.3. Cadelas

A informação relativa ao desenvolvimento folicular específico da cadela é rudimentar (Songsasen et al., 2009b). Todavia, como na gata, o início do desenvolvimento ovárico canino ocorre durante a vida fetal. Com a formação da oogônia observada no feto 42 dias pós-cópula (Andersen & Simpson, 1973).

A foliculogênese, ou seja, a formação e desenvolvimento folicular não começa até o nascimento com a formação do folículo primordial (Andersen & Simpson, 1973), observado aproximadamente 2 – 3 semanas após o nascimento (Andersen & Simpson, 1973).

Durante o segundo mês de vida, a formação de folículos primordiais é acompanhada por um elevado processo de degeneração de células germinais (Reynaud et al., 2012; Songsasen & Wildt, 2007). De 120 a 160 dias após o nascimento, os folículos primordiais, primários, secundários e pré-antrais podem ser observados no córtex ovárico da cadela (Andersen & Simpson, 1973) (Figura 5). O aparecimento do primeiro folículo com antro pode ser observado na cadela a partir dos 6 meses de idade, pouco antes do proestro (Wildt, Levinson, & Seager, 1977). Assim, o tempo necessário desde o recrutamento do folículo primordial até ao desenvolvimento do folículo antral é cerca de 70 a 160 dias em cadelas pré-púberes (Andersen & Simpson, 1973) e cerca de 110 dias em cadelas adultas (Spaniel-Borowski & Calvo, 1982).

Na maioria das espécies de mamíferos, o aumento de LH pré-ovulatório, durante o fim do proestro inico do estro, representa o sinal estimulador e indutor da ovulação, ocorrendo a retomada da meiose ovárica (da prófase I à metáfase II), a mucificação das células *cumulus oophorus* devido

à acumulação de ácido hialurónico (Reynaud et al., 2006) e a posterior ovulação mas na fêmea canina, a endocrinologia do período pré-ovulatório é diferente.

Apesar da ovulação ocorrer após o pico de LH, mais precisamente após 36 a 50 horas (Phemister et al., 1973), na cadela os oócitos são ovulados no estadio diploteno (prófase I) e só completam a sua maturação meiótica no oviduto distal, onde permanece por vários dias (Reynaud et al., 2012) e alcançam a metáfase II (Reynaud et al., 2006), 2 dias após ovulação (Concannon, 2011).

O período pré-ovulatório é acompanhado por um aumento das concentrações séricas de P4 no soro, devida à pré-luteinização das células da granulosa nos folículos (Andersen & Simpson, 1973; Reynaud, Lesegno, et al., 2009; Chastant-Maillard et al., 2011). As concentrações pré-ovulatórias de P4 sanguínea fornecem uma estimativa indireta da ovulação e do pico de LH (Phemister et al., 1973; Concannon, 2009).

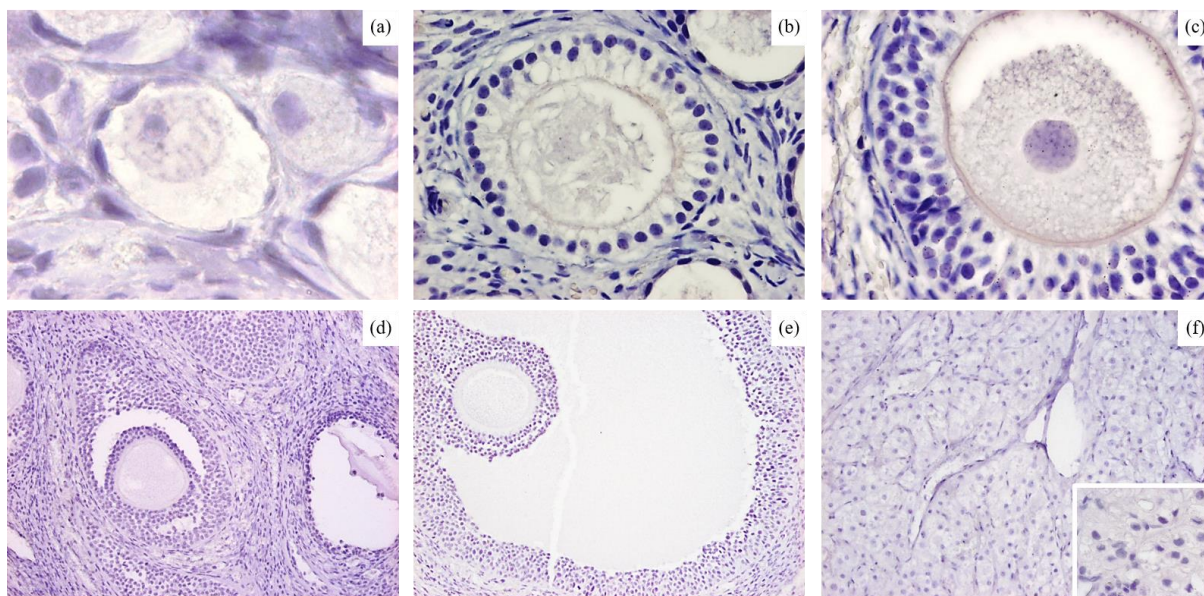


Figura 5. Desenvolvimento folicular na cadela. (a) Folículo primordial; (b) Folículo primário; (c) Folículo secundário; (d) Folículo pré-antral; (e) Folículo antral; (f) Corpo lúteo. Coloração com hematoxilina. (a) 1000x; (b,c) 100x; (d,e,f) 40x.

1.6. Folículos com múltiplos oócitos

Tradicionalmente, os mamíferos possuem folículos ovários que contêm uma célula germinativa por folículo, rodeada por uma ou mais camadas de células somáticas, de acordo com a fase de desenvolvimento folicular (Payan-Carreira & Pires, 2008).

Os folículos com múltiplos oócitos (MOFs) são como o nome sugere, folículos que apresentam mais do que uma célula germinativa por folículo, 2-17 no caso da cadela (Payan-Carreira & Pires, 2008). Estas estruturas, são comumente encontradas em gatas e cadelas recém-

nascidas e jovens, mas também são frequentemente encontrados no coelho, gambá, macaco rhesus (Hartman, 1926; Telfer & Gosden, 1987) e em humanos associado a fertilização *in vitro* (Ron-El et al., 1990). De acordo com Shehata (1974), Payan-Carreira & Pires (2008) e recentemente reforçado por Lunardon (2015) a prevalência de MOFs diminui com a idade.

1.7. Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

A proliferação celular pode ser estimada utilizando métodos imunohistoquímicos (IHQ), por detecção de proteínas nucleares relacionadas com a replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA). No presente estudo, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é utilizado com essa finalidade. Este, desempenha um papel essencial no metabolismo dos ácidos nucleicos (Kelman, 1997), interagindo com várias proteínas envolvidas na replicação e reparação do DNA, sendo também necessário para excisão de DNA durante a mitose e meiose (Mailand, Gibbs-Seymour, & Bekker-Jensen, 2013).

O PCNA é uma proteína nuclear com peso molecular de 35kDa, que funciona como co-factor da DNA-polimerase δ (Bravo & Macdonald-Bravo, 1987) este tem um papel fundamental na regulação do ciclo celular (Oktay et al., 1995). O aparecimento da proteína correlacionado com a proliferação da célula está presente em todas as fases do ciclo celular, começando a acumular-se na fase G1, alcançando maior expressão durante a fase S (Oktay et al., 1995), diminuindo durante a fase G2/ M do ciclo celular.

A expressão de PCNA foi localizada no ovário *in vivo* em ratos (Oktay et al., 1995; Muskhelishvili, Wingard, & Latendresse, 2005), em porcas (Tománek & Chronowska, 2006), em macacos (Gougeon & Busso, 2000) e mais recentemente em ovelhas (Oliveira et al., 2017).

De acordo com Oktay et al. (1995), em ratos a imunorreação coincide com os primeiros sinais de crescimento folicular, aparecendo nas células da pré-granulosa de folículos primários, estes resultados coincidem com os dados recolhidos por Wandji et al. (1996) num estudo *in vitro* em bovinos. Ambos os estudos sugerem que a expressão de PCNA em células da granulosa e oócitos coincide com o início do crescimento folicular.

Capítulo IV – Estudo do desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na cadela e gata

1. Objetivos

O presente estudo compreendeu os seguintes objetivos:

1. Determinar se o aumento da proliferação de células nos folículos ovários está relacionado com o recrutamento e desenvolvimento folicular.
2. Comparar o desenvolvimento e recrutamento folicular entre cadelas e gatas.
3. Desenvolver e estabelecer o protocolo de imunohistoquímica no laboratório da FMV-ULHT e um protocolo ótimo de utilização de PCNA em tecido ovário de cadela e gata.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização da Amostra

Este trabalho consistiu num estudo descritivo. Os animais incluídos no presente estudo deram entrada no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia a fim de realizar ovariectomia (OVH) eletiva solicitada pelos proprietários, tendo sido analisados ovários de 13 cadelas e 11 gatas com idades compreendidas entre os 5 meses e 2 anos, no período compreendido entre 1 de Fevereiro e 29 de Julho de 2016. Foi obtido o consentimento informado dos donos e os animais foram categorizados de acordo com a fase do ciclo éstrico.

2.2. Critérios de Inclusão

No estudo foram incluídos todos os animais presentes a cirurgia eletiva no Hospital Escolar da FMV-ULHT que não apresentavam história de problemas reprodutivos.

2.3. Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo todos os animais com história de afeções e alterações reprodutivas, ou outras doenças que potencialmente afetem a normal ciclicidade do animal.

Foi ainda excluído qualquer animal que não tenha realizado a recolha da citologia vaginal e sangue, não sendo possível a determinação precisa da fase do ciclo éstrico.

2.4. Métodos de Monitorização do ciclo reprodutivo

O ciclo éstrico (CE) foi determinado com recurso a medições de concentração plasmática de P4, citologia vaginal e avaliação histológica do ovário por forma a permitir a inclusão dos animais nas diferentes fases do CE com o melhor nível possível de confiança.

2.4.1. Citologia Vaginal

A realização da citologia vaginal teve a finalidade de caracterizar a fase do ciclo éstrico em que estes animais se encontravam.

A citologia vaginal foi realizada utilizando zaragatoa estéril, sendo a mesma inserida na comissura dorsal da vulva, evitando a fossa do clitóris, num angulo de 45° e executando movimentos de rotação gentis na zona caudo-dorsal da vagina. As células recolhidas na zaragatoa foram transferidas para lâminas de microscopia de canto fosco (VWR, Radnor, Pensilvânia) e, em seguida, fixadas ao ar. Após fixação as lâminas foram coradas com Wright Giemsa modificado (VWR, Radnor, Pensilvânia) (Apêndice III).

Os esfregaços corados foram examinados em microscopia ótica (Olympus CX21) em ampliação de 40x para avaliação geral e de 100x ou 400x para identificar os diferentes tipos celulares.

2.4.2. Progesterona

A dosagem hormonal de P4 foi utilizada como teste confirmatório.

Foram adicionadas amostras de sangue (1mL), a tubos Eppendorf contendo heparina, em seguida centrifugou-se a 1500g durante 10 min a 48°C e armazenou-se o plasma a -20°C para análise posterior.

As concentrações plasmáticas de P4 foram medidas, sem recorrer a extração, através de um ensaio competitivo quimioluminescente imunoenzimático (utilizando instrumentos Immulite

1000 e Imulite 2000, respetivamente, Siemens Healthcare Diagnostics, Amadora, Portugal) e de kits disponíveis comercialmente (Immulite 1000 Progesterone kit; Siemens Healthcare Diagnostics). Todas as medições foram efetuadas de uma só vez.

2.5. Recolha e processamento de amostras de tecido

Após a exérese dos órgãos genitais femininos recorrendo à técnica cirúrgica de OVH as amostras foram fixadas em formol tamponado a 10%, durante 24 horas a temperatura ambiente (TA), sendo posteriormente transferidos para álcool 70% (v/v) (Apêndice I). Posteriormente as amostras foram submetidas a processamento histológico, sendo embebidas em parafina (Apêndice II) e seccionadas em cortes seriados a 5 μ m (Thermo Scientific Mircrom HM325). As secções efetuadas foram transferidas para lâminas de microscopia SuperFrost (VWR, Radnor, Pensilvânia) e colocadas a 37°C durante a noite, para posteriormente se efetuar a técnica de imunohistoquímica.

2.6. Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi realizada em grupos de secções, com duas lâminas gêmeas selecionadas para cada animal, com secções de 5 μ m, de ovários de cadelas e gatas, em anestro e cíclicas. O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é utilizado para identificar marcação celular (Oktay et al., 1995; Zheng, Fricke, Reynolds, & Redmer, 1994)

Todos os passos de imunohistoquímica foram conduzidos a TA, a menos que indicado de outro modo. Procedeu-se à desparafinização em xilol, e re-hidratação em concentrações decrescentes de etanol, seguida de lavagem em água destilada. De seguida as lâminas foram incubadas no escuro numa solução de 3% de H₂O₂, a 37°C, durante 15 minutos.

Procedeu-se à recuperação antigénica em 10 mM de tampão citrato pH6 (citrato 0.1M pH 1.8 + Na citrato 0.1M pH8.8), em solução aquecida no microondas (700W) cinco vezes por períodos de 3 minutos. As lâminas foram arrefecidas a TA. Após este passo as amostras foram lavadas em PBS-Triton-X 0,3%, duas vezes durante 5 minutos. Foi distribuída seguidamente a solução de bloqueio (PBS com 2% BSA - A7906, Sigma-Aldrich, Inc., St Louis, MO, USA) num volume de 100 μ l por cada lâmina durante 1 hora em câmara húmida à TA. Posteriormente incubou-se o anticorpo primário (α -1^{ario}) (ab18197; Abcam, Cambridge, UK) (Tabela 6), a 4°C em câmara húmida durante a noite. No controlo negativo foi utilizado solução de bloqueio em vez do anticorpo primário (Apêndice II).

Tabela 6. Características e diluições do anticorpo utilizado no presente estudo

	Molécula	Péptido	Anticorpo	Diluição
CADELAS	PCNA	Proteína 35kDa	Ac 1 ^{ario} Policlonal coelho anti-PCNA	1:800
			Ac 2 ^{ario} Policlonal cabra-anti coelho	1:100
GATAS	PCNA	Proteína 35kDa	Ac 1 ^{ario} Policlonal coelho anti-PCNA	1:1200
			Ac 2 ^{ario} Policlonal cabra-anti coelho	1:100

Depois de lavar as lâminas 4 vezes em PBS durante 10 minutos, incubou-se com o anticorpo secundário (α -2^{ario}) (Tabela 6), anticorpo policlonal cabra anti-coelho IgG conjugado com peroxidase (410972, Dako, Carpinteria, CA, USA) durante 1 hora a uma diluição de 1:100 após o que se voltou a lavar-se 2 vezes em PBS durante 10 minutos.

Procedeu-se à incubação do cromogénio 3'-diaminobenzidine (DAB) (ImmPACT DAB, SK-4105, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), até observar reação, aproximadamente 8 segundos, após o que se coloca em água destilada para sessar a reação duas vezes durante 5 minutos. Por fim as lâminas foram coladas com hematoxilina de Mayer (VWR, Radnor, Pensilvânia) por 10 segundos.

As secções foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, colocadas em xilol, durante 10 minutos e montadas em entellan.

2.7. Análise de Amostras

As secções foram observadas num microscópio Olympus (BX61) a 40x de aumento por um único observador. Os folículos foram classificados em cinco categorias como descrito anteriormente (folículos primordiais, folículos primários, folículos secundários, folículos pré-antrais, folículos antrais), foram também examinados os seguintes tipos celulares: células da granulosa/ pré-granulosa, células da teca, células do *cúmulos oophorus* e *corona radiata*, oócitos e corpos lúteos. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio (U-LH100HG, Olympus Optical Co.,Ltd., Japan).

A avaliação da imunorreação foi realizada, através da evidência de coloração castanha-dourada nas estruturas anteriormente descritas. A avaliação da imunorreatividade de PCNA foi registada numa avaliação semi-quantitativa categórica consoante os níveis de expressão, este foram quantificados como, células não marcada, células marcadas, e células muito marcadas.

2.8. Análise Estatística

Os dados obtidos durante este estudo foram organizados através do programa Microsoft Office Excel® 2016 e posteriormente a estatística descritiva e inferencial foi realizada recorrendo ao programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 24.0.

Apesar de não ter sido possível cumprir todos os pressupostos da análise (ausência de distribuição normal e de homogeneidade de variâncias), as médias de percentagem de células da granulosa/pré-granulosa com expressão de PCNA nas diferentes fases foliculares e fases dos CE foram analisadas por ANOVA multifatorial.

O número de oócitos marcados nos folículos primordiais de gatas foi analisado pelo teste de Chi-quadrado de Pearson.

Foi considerado o nível de significância igual ou menor que 0,05.

2.8.1. Contagem de Folículos

A análise e processamento das imagens foi realizada utilizando o ImageJ®. As células foliculares foram consideradas como positivamente marcadas quando se evidencia imunomarcção por PCNA. Apesar de se terem utilizado amostras de ovários de vários animais diferentes a unidade experimental da análise foi o folículo, tendo sido analisados 238 folículos de gata e 343 de cadela (Gráfico 4).

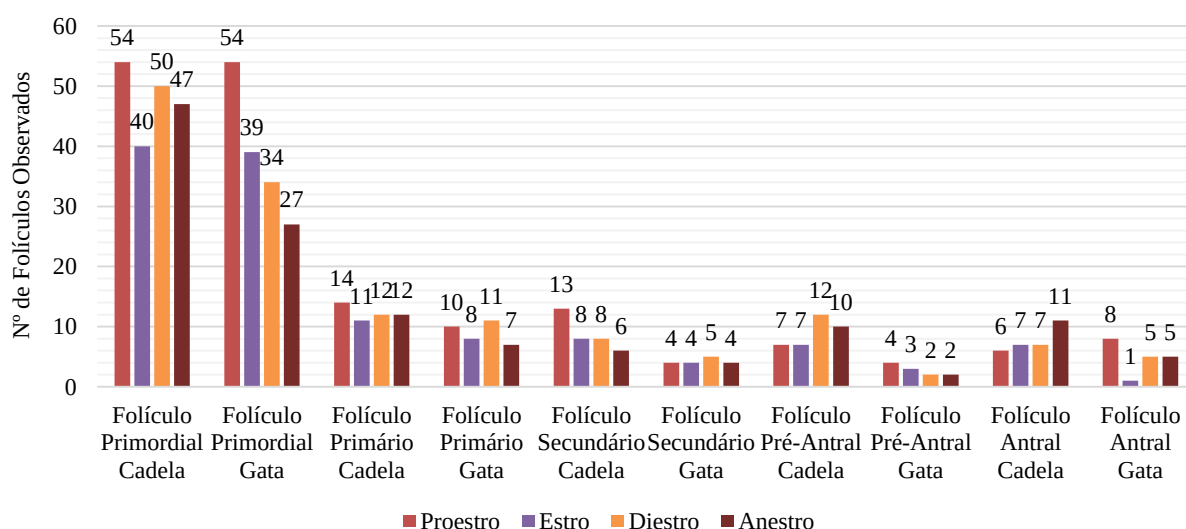


Gráfico 4. Distribuição do número total de folículos observados em cadela e gata por fase folicular e fase do ciclo éstrico

Foram realizadas duas lâminas gêmeas por ovário e por animal com duas secções e foram recolhidas duas a cinco fotografias por cada fase folicular em cada ovário.

3. Resultados

3.1. Caracterização da Amostra

Os resultados do presente estudo foram obtidos de uma amostra de 13 cadelas e 11 gatas, sendo estas categorizadas de acordo com a fase do ciclo éstrico (Tabela 7).

Tabela 7. Número total de animais observados por fase do ciclo éstrico por espécie.

	CADELA	GATA
Proestro	3	3
Estro	3	3
Diestro	3	2
Anestro	4	3

Seguidamente ao seu processamento as secções de imagens foram analisadas resultando na contagem de folículos resumida na tabela 8.

Em cadelas contou-se um total de 343 folículos com uma média de 44,99 células, com erro padrão de 27,59, em gatas contou-se um total de 238 folículos com uma média de 31,44 células, com erro padrão de 21,09, num total de 581 folículos analisados.

Foram avaliados, em cadela, 191 folículos primordiais, 49 folículos primários, 36 folículos secundários, 36 folículos pré-antrais e 31 folículos antrais. Nas gatas avaliou-se um total de 154 folículos primordiais, 37 folículos primários, 17 folículos secundários, 11 folículos pré antrais e 19 folículos antrais.

Tabela 8. Número total de folículos por fase do ciclo éstrico por espécie (N=581)

	CADELA						GATA					
	Fol. Primordial	Fol 1º	Fol. 2º	Fol. Pré- antral	Fol. Antral	Total	Fol. Primordial	Fol 1º	Fol. 2º	Fol. Pré- antral	Fol. Antral	Total
Proestro	54	14	13	7	6	94	54	10	4	4	8	80
Estro	40	11	9	7	7	74	39	9	4	3	1	56
Diestro	50	12	8	12	7	89	34	11	5	2	5	57
Antero	47	12	6	10	11	86	27	7	4	2	5	45

3.2. Métodos de Monitorização do Ciclo Reprodutivo

3.2.1. Concentrações Plasmáticas de Progesterona

As mensurações das concentrações plasmáticas de P4, em ambas as espécies, apresentaram os valores expostos no gráfico 5.

A gata apresentou concentrações séricas de P4 de $\pm 0,45$ ng/mL na fase de proestro, com uma ligeira diminuição na fase de estro para $\pm 0,25$ ng/mL. A P4 sérica aumentou para ± 15 ng/mL na fase de diestro e atinge valores basais <1 ng/mL na fase de anestro.

Na cadela as concentrações séricas de P4 aumentam para valores acima 3ng/mL no fim da fase de proestro ou início do estro. A P4 continua a aumentar ao longo do CE atingindo 4ng/mL no diestro. No anestro a P4 declina para valores basais <1 ng/mL.

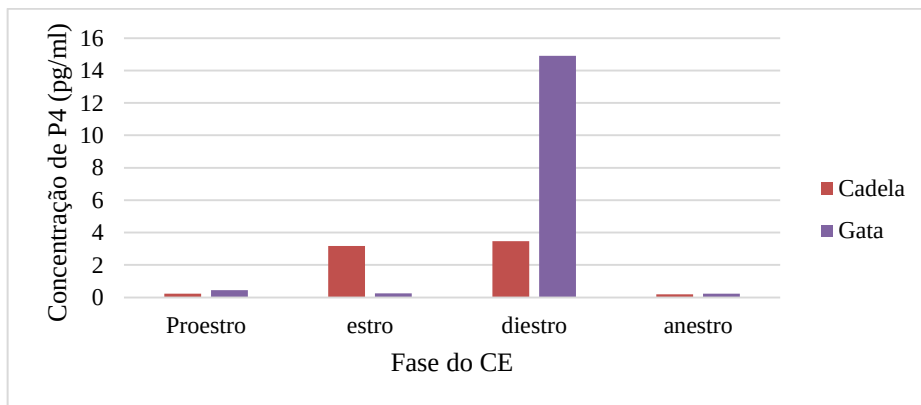


Gráfico 5. Concentrações de P4 ao longo do ciclo éstrico em cadela e gata.

3.2.2. Citologia Vaginal

Os resultados obtidos permitiram a diferenciação das fases do CE (estro, proestro, diestro, e anestro) nas duas espécies estudadas através da observação e identificação dos diversos tipos celulares. A identificação foi posteriormente confirmada com outras técnicas de determinação da fase do CE. A Figura 6 apresenta imagens representativas de citologias vaginais de animais das duas espécies nas diferentes fases do CE.

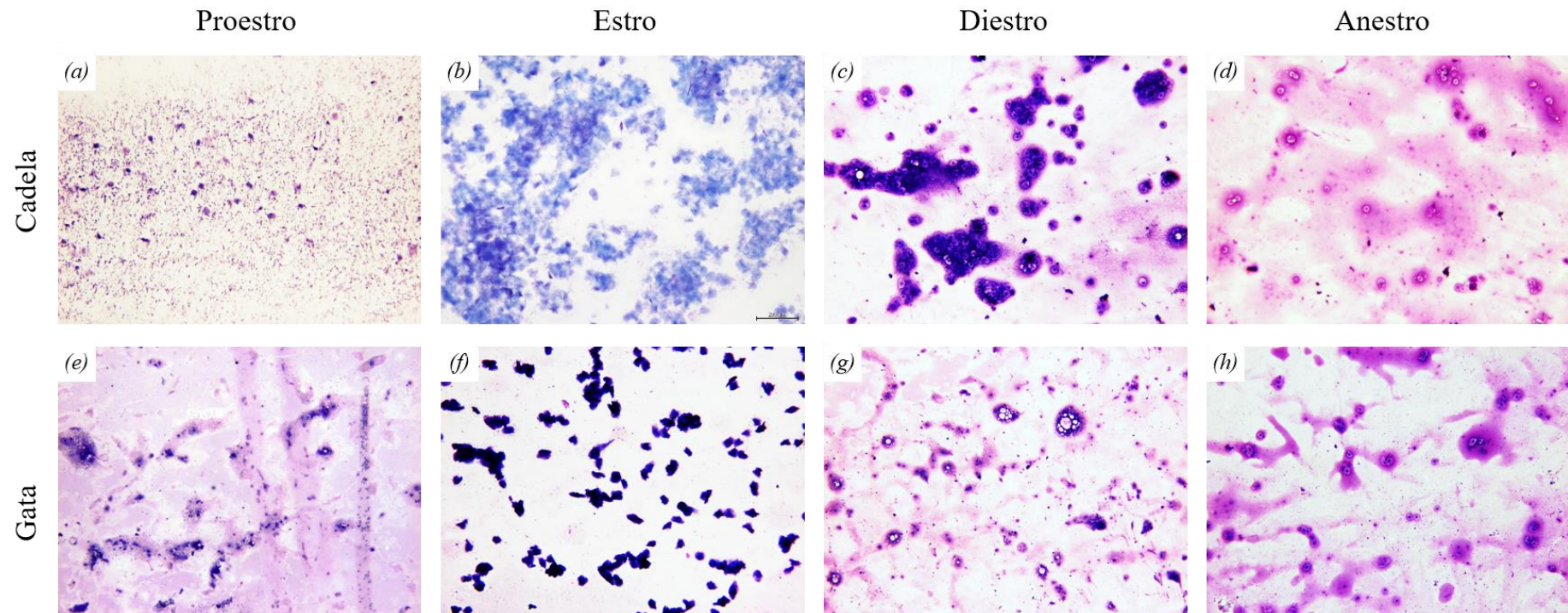


Figura 6. Citologia vaginal de cadela e gata ao longo do ciclo éstrico. Ampliação 40x

3.3. Expressão de PCNA

A utilização de imunohistoquímica em cortes de parafina (IHC-P) permitiu observar a expressão de PCNA nos diferentes tipos celulares descritos anteriormente nos folículos ovários da cadela e da gata, ao longo do CE, como demonstrado nas figuras 7, 10, 13 e 14. A imunorreatividade de PCNA foi identificada pela presença da coloração castanha. Foi possível observar marcação específica em todas as amostras avaliadas.

3.3.1. Gatas

A análise dos resultados de IHC-P e a contagem de células da granulosa permitiram avaliar quais as fases foliculares e do CE nas quais existia maior proliferação destas células. Assim, a análise por ANOVA multifatorial determinou uma interação significativa entre as fases do CE e as fases foliculares na determinação da percentagem de células marcadas e muito marcadas ($p=0.002$ e $p=0.032$, respetivamente). Assim, as diferenças observadas na média da percentagem de células da granulosa marcadas e muito marcadas é determinada tanto pela fase folicular como pela fase do CE. Contudo, esta interação não foi significativa quando analisada a média da percentagem de células não marcadas ($p=0.959$). Desta forma, a análise realizada cingiu-se à contagem de células da granulosa/pré-granulosa marcadas e muito marcadas, ou seja, com expressão de PCNA ou com uma elevada expressão de PCNA.

Na fêmea felina, nos primeiros estádios de desenvolvimento folicular, os folículos primordiais exibiram expressão de PCNA em todas as fases do CE. Esta expressão foi detetada mais especificamente nas células achatadas pré-granulosas e nos oócitos (Figura 7 *a-d* e Figura 8). É possível observar na Figura 8, folículos primordiais adjacentes de um ovário de gata em proestro com diferentes expressões de PCNA. Observam-se folículos primordiais com o oócito intensamente marcado e com células achatadas pré-granulosas com marcação e sem qualquer marcação (Figura 8a), folículos primordiais em que a expressão no oócito é fraca mas as suas células da pré-granulosa apresentam-se marcadas (Figura 8b) e folículos que exibem forte expressão de PCNA no oócito e as suas células da pré-granulosa com marcação negativa (Figura 8c). Contudo, o número de oócitos não marcados nos folículos primordiais não varia consoante a fase do CE ($p=0.30$).

No entanto, apesar de nem todas as células da pré-granulosa dos folículos primordiais expressarem PCNA com a mesma intensidade, as diferenças significativas na média da percentagem de células marcadas ao longo do CE cingiram-se ao proestro e anestro, sendo a percentagem de células marcadas superior no anestro ($p=0.024$) (Gráfico 6). Não se verificaram diferenças

significativas na média da percentagem de células muito marcadas ao longo do CE nos folículos primordiais (Gráfico 7).

Nos folículos primários foi possível evidenciar intensidades de marcação variáveis nas células da granulosa cubóides, existindo em todos os folículos a presença de células marcadas e não marcadas. É possível verificar marcação positiva no oócito em todas as fases do ciclo éstrico (Figura 7 i-l). A média da percentagem das células da granulosa dos folículos primários que apresentam marcação é significativamente superior no anestro face ao proestro e diestro (proestro, $p=0.005$ e diestro $p=0.000$) e no estro face ao diestro ($p=0.001$) (Gráfico 6). Já a média da percentagem de células muito marcadas nos folículos primários é significativamente superior no diestro (proestro $p=0.045$, estro $p=0.004$ e anestro $p=0.000$) (Gráfico 7).

A expressão de PCNA nos folículos secundários foi semelhante nas diferentes fases do CE, com uma ligeira diminuição na intensidade da marcação na fase de anestro. Verificou-se marcação positiva nos oócitos em todas as fases do CE, assim como nas várias camadas de células da granulosa cubóides. Estes folículos apresentam elevada imunorreatividade nas células da granulosa (Figura 7 q-t), com todo o folículo marcado (à exceção da teca) nas diferentes fases do CE. Nestes folículos, a percentagem de células da granulosa que apresentaram marcação e muita marcação não é significativamente diferente entre as várias fases do CE (Gráfico 6 e 7).

Em folículos secundários na fase de estro observou-se uma particularidade na expressão de PCNA em todos os folículos, com uma linha de células com ausência de marcação junto à zona pelúcida (Figura 9 a,b).

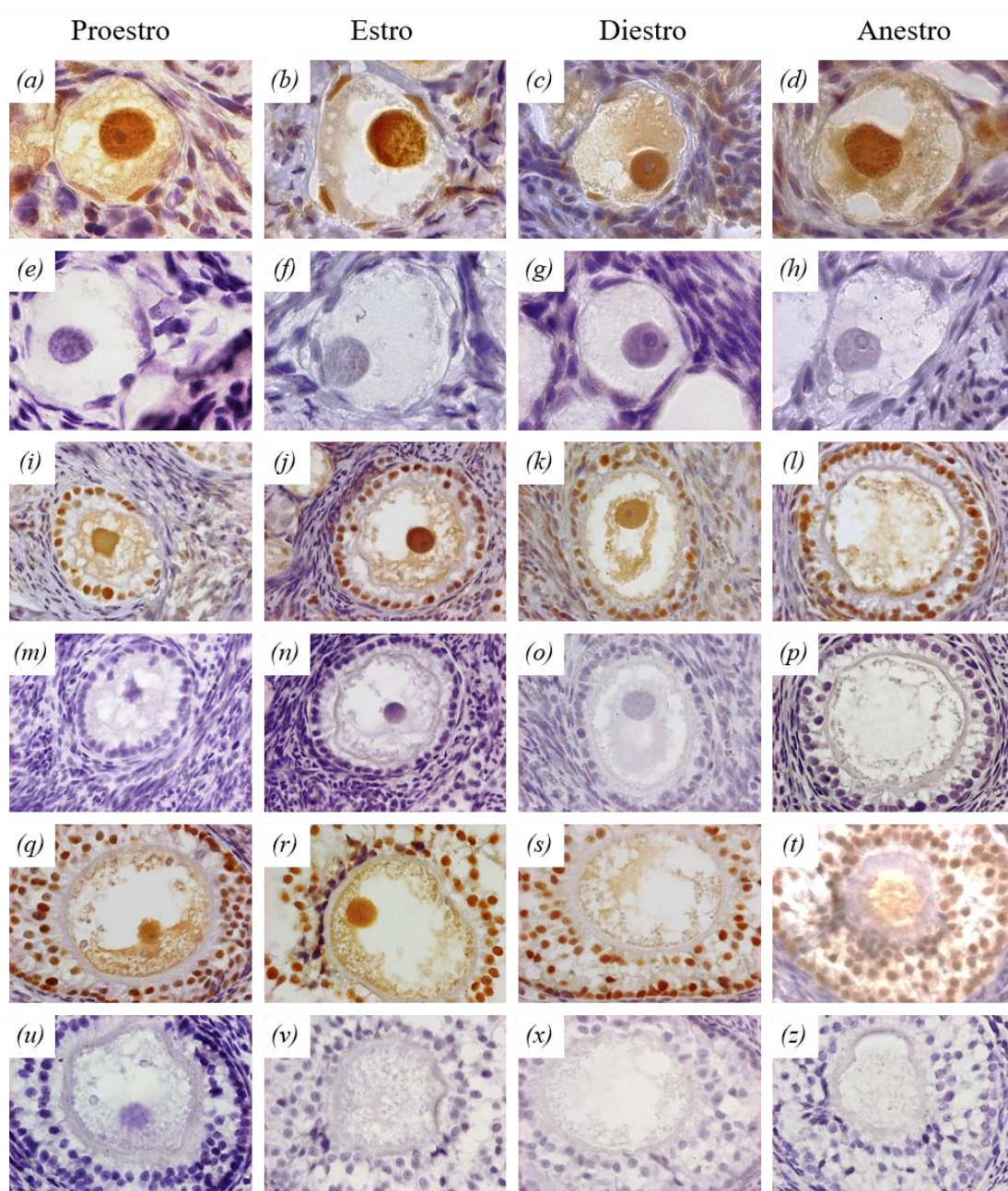


Figura 7. Padrões de expressão de PCNA durante o desenvolvimento folicular em gata. (a-h) folículos primordiais a ampliação 1000x; (i-p) folículos primários a ampliação 400x; (q-z) folículos secundários a ampliação 100x. Coloração positiva em castanho, contra coloração com hematoxilina. Controles negativos (e-h; m-p; u-z)

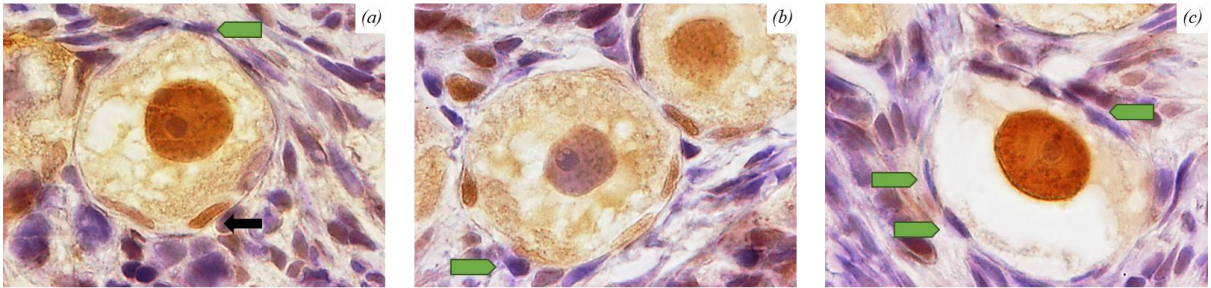


Figura 8. Detecção de PCNA em folículos primordiais de gata em proestro. Coloração positiva em castanho, contra coloração com hematoxilina. (*) Oócito com fraca marcação; (seta preta) células achatadas da granulosa marcada; (seta verde) células achatadas da granulosa não marcada. Ampliação 1000x.

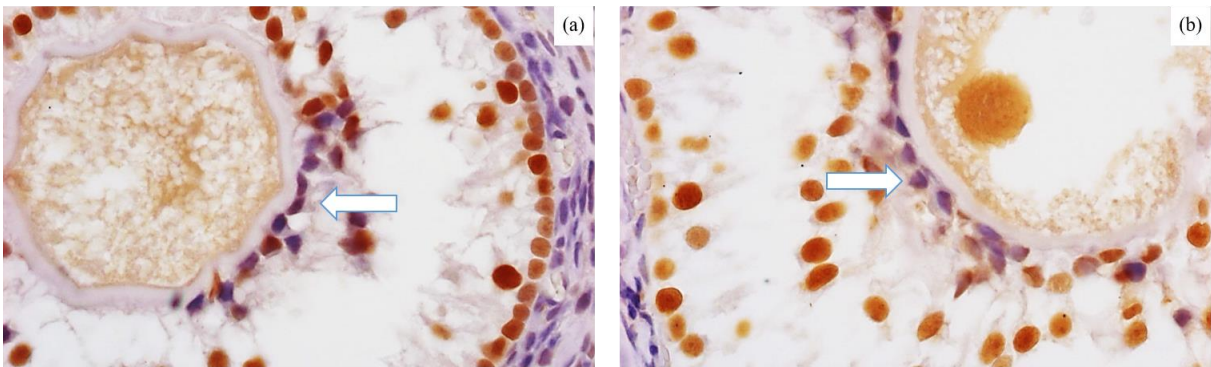


Figura 9. Detecção de PCNA em folículo secundário (A,B) durante a fase de estro em gata. Coloração positiva em castanho, contra coloração com hematoxilina. (Oo) oócitos de folículos em estadio avançado; (seta branca) linha de células da granulosa não marcada. Ampliação 400x

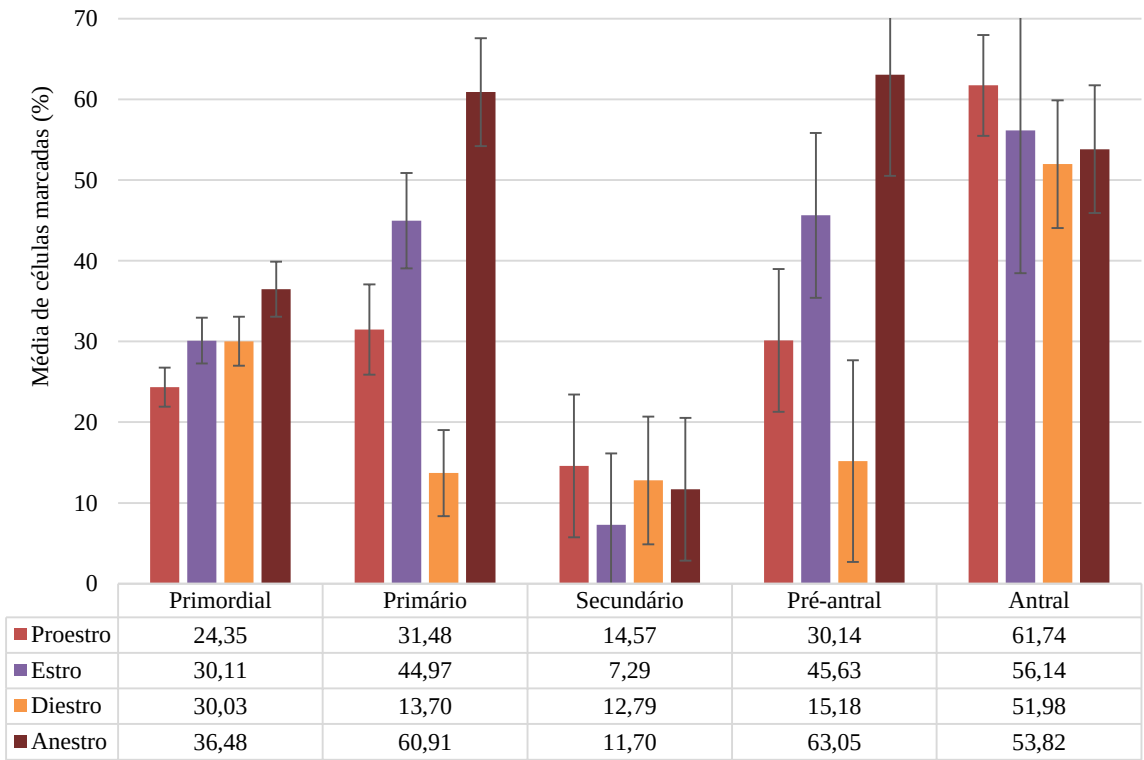


Gráfico 6. Média da percentagem de células marcadas nas diferentes fases foliculares ao longo do CE da gata. Barras de erro representam o erro padrão da média.

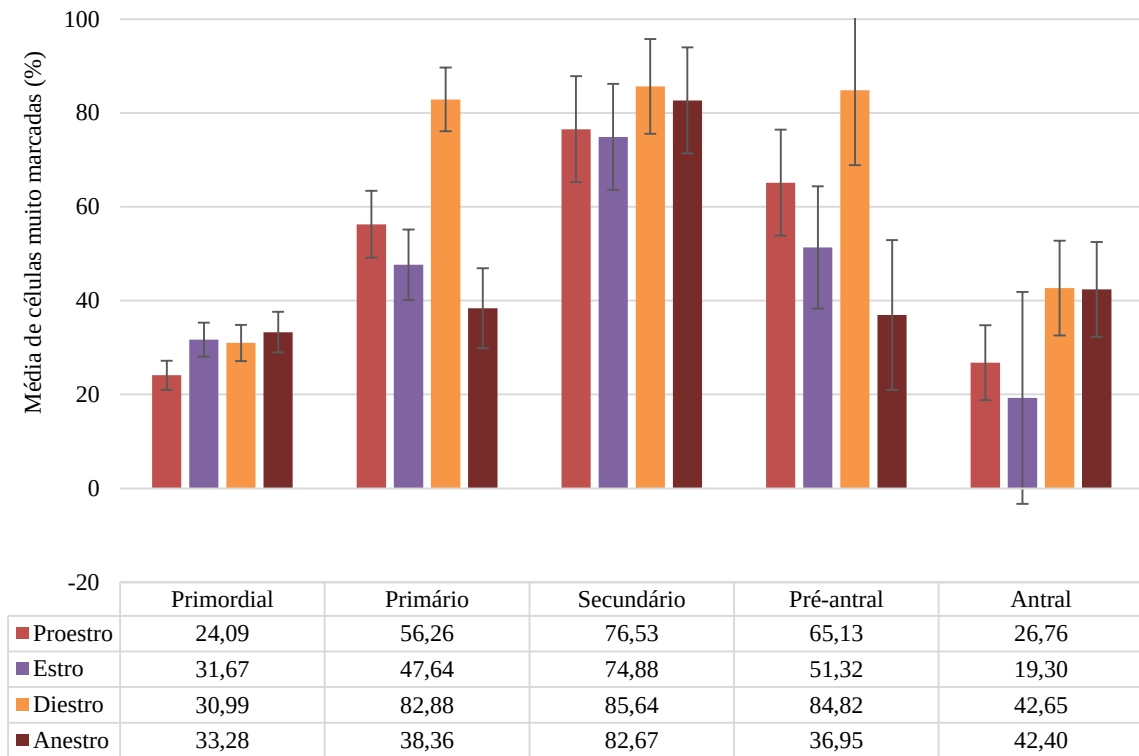


Gráfico 7. Média da percentagem de células muito marcadas nas diferentes fases foliculares ao longo do CE da gata. Barras de erro representam o erro padrão da média.

É possível evidenciar-se a expressão de PCNA nos folículos pré-antrais e antrais da fêmea felina em todas as fases do CE, tanto nos oócitos como nas células da granulosa (Figura 10 e 11). Porém, comparativamente com outras fases foliculares, a intensidade da marcação é menor nestes folículos.

Assim, a expressão de PCNA nas células da granulosa dos folículos pré-antrais e antrais não exhibe variações significativas na média da percentagem de células marcadas e muito marcadas ao longo do CE. Todavia, nos folículos antrais e nos pré-antrais observa-se uma maior percentagem de células marcadas no anestro face ao diestro. (Figura 10) (Gráfico 6 e 7).

Relativamente às células da granulosa dos folículos antrais é de referir que a zona da *corona radiata* (CR) e *cumulus oophorus* (CO) apresentam marcação diferente consoante a fase do CE (Figura 11), sendo possível observar que a fase de proestro possui maior número de células com imunorreação positiva do que negativa (Figura 11a). No estro, é possível verificar que a zona da CR e CO apresentam tantas células marcadas como não marcadas (Figura 11b). A fase de diestro expressa-se de forma semelhante ao observado na fase de estro. As diferenças são facilmente

observadas na fase de anestro, em que é possível verificar a fraca marcação na zona da CO e CR (Figura 11d).

As células da teca interna foram morfológicamente diferenciadas e apresentaram células com expressão de PCNA. Estas observações foram sumarizadas na ilustração esquemática na Tabela 9 e na Figura 7 e 10.

De todas as fases foliculares, os folículos antrais são os que apresentam a maior percentagem de células da granulosa/pré-granulosa com marcação de PCNA no proestro (primordiais $p=0.001$, primários $p=0.004$, secundários $p=0.000$, antrais $p=0.039$) (Gráfico 6). Por outro lado, à exceção dos folículos antrais, os folículos primordiais são os que apresentam menor média de células muito marcadas nesta fase (primários $p=0.000$, secundários $p=0.000$, pré-antrais $p=0.005$) (Gráfico 7).

À exceção dos folículos primordiais e antrais, durante o estro, a percentagem de células da granulosa/pré-granulosa com marcação de PCNA é significativamente inferior nos folículos secundários (primários $p=0.005$, pré-antrais $p=0.050$) (Gráfico 6). Já a variação da percentagem de células muito marcadas nesta fase do CE é apenas significativamente diferente entre os primordiais e secundários ($p=0.003$) (Gráfico 7).

Tal como no proestro, durante o diestro, os folículos antrais são os que apresentam maior percentagem de células marcadas, diferença significativa quando comparada com a dos folículos primários e secundários (primários $p=0.001$, secundários $p=0.006$) (Gráfico 6). Tal como no proestro, à exceção dos folículos antrais, os folículos primordiais são os que apresentam menor percentagem de células muito marcadas nesta fase (primários $p=0.000$, secundários $p=0.000$, pré-antrais $p=0.012$) (Gráfico 7).

Durante o anestro, e tal como no estro, os folículos secundários são os que apresentam uma menor percentagem de células marcadas, diferença significativa em todas as comparações exceto face aos folículos primordiais (primários $p=0.000$, pré-antrais $p=0.009$, antrais $p=0.005$) (Gráfico 6). Contudo esta fase folicular apresenta uma percentagem de células muito marcadas significativamente superior face aos primordiais e primários e com uma tendência face aos antrais (primordiais $p=0.001$, primários $p=0.020$, antrais $p=0.084$) (Gráfico 7).

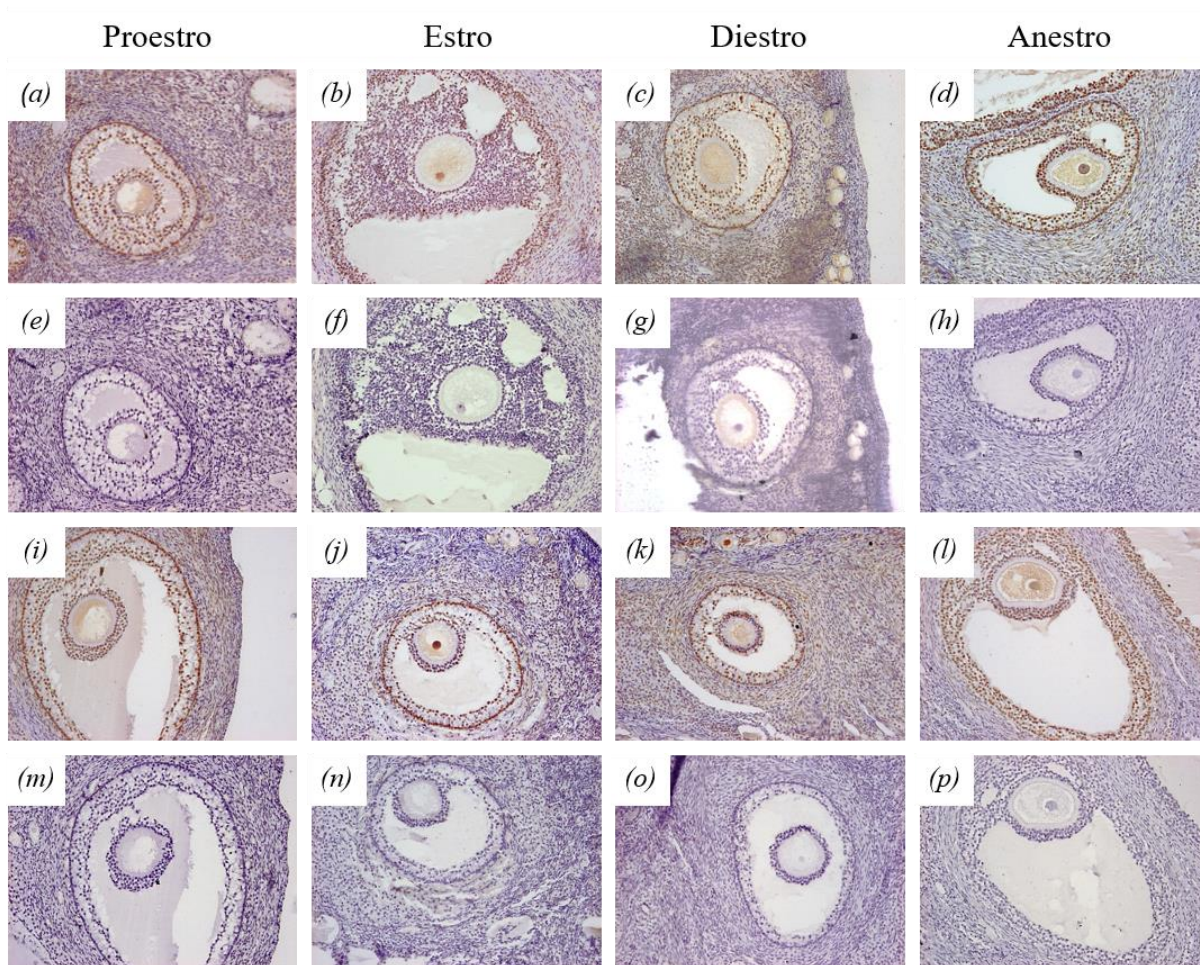


Figura 10. Padrão de expressão de PCNA ao longo do ciclo éstrico em folículos pré antrais (a-h) e antrais (i-p) de gata. Coloração positiva em castanho, contra coloração com hematoxilina. Controlos negativos (e-h; m-p). Ampliação 100x.

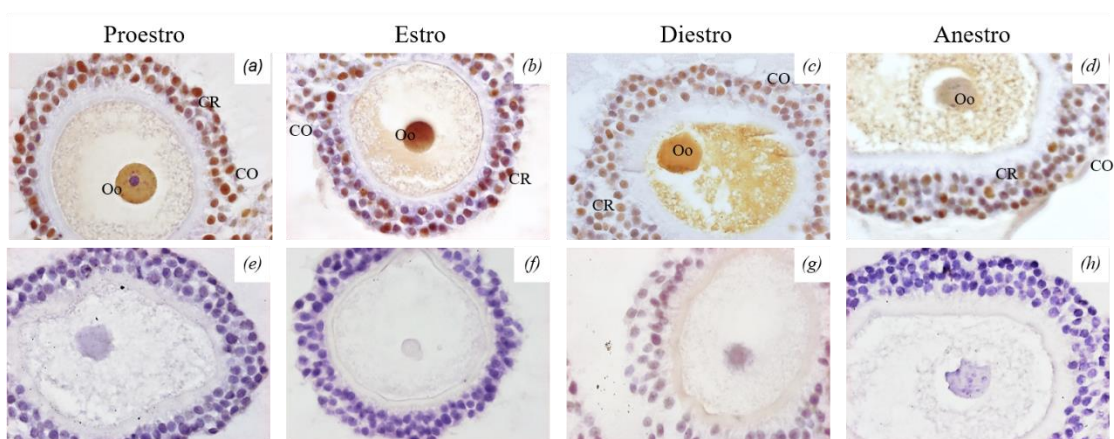
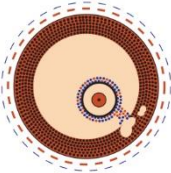
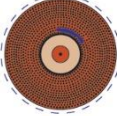
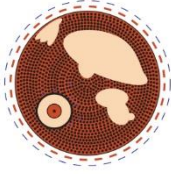
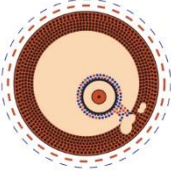
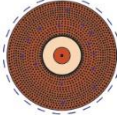
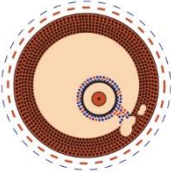
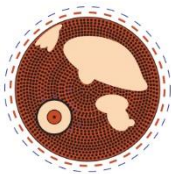
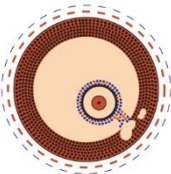


Figura 11. Detecção de PCNA em folículos antrais de gata durante as fases do ciclo éstrico. Coloração positiva em castanho, contra coloração com hematoxilina. Controlos negativos (e-h). (Oo) oócitos de folículos em estadio avançado; (Cr) Corona radiata; (Co) cumulus oophorus. Ampliação 400x.

Tabela 9. Representação esquemática da expressão de PCNA no desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na gata. (Original do autor)

	Primordial	Primário	Secundário	Pré Antral	Antral
<i>Proestro</i>					
<i>Estro</i>					
<i>Diestro</i>					
<i>Anestro</i>					

O CL da fêmea felina apresenta variação na intensidade de marcação consoante o tipo de célula lútea analisado e a fase do CE.

É possível evidenciar a intensidade da expressão nas células lúteas grandes, exibindo uma coloração castanho, em contraste com as células lúteas pequenas que não apresentam marcação para este Ac.. O PCNA é expresso em células lúteas grandes em todas as fases do CE, mas com maior intensidade durante a fase de diestro.

A Figura 12 apresenta o padrão de expressão de PCNA nas células lúteas do CL durante a fase de diestro, onde é possível observar a presença de vacuolizações.

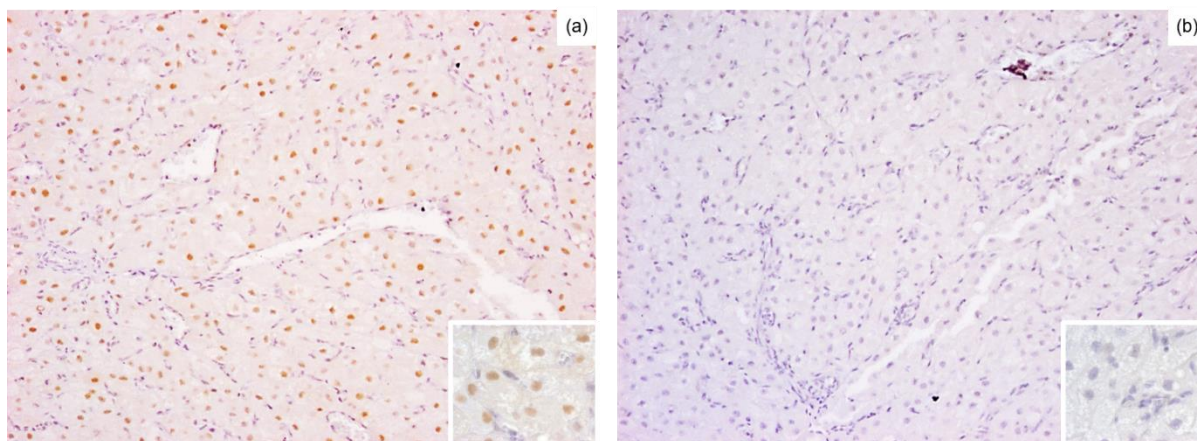


Figura 12. Padrão de expressão de PCNA no corpo lúteo (CL) de gata em diestro. Coloração positiva em castanho, contra coloração com hematoxilina. Controlos negativos (b). Escala 100x com ampliação 600x.

3.3.2. Cadela

A análise dos resultados de IHC-P e a contagem de células da granulosa permitiu avaliar quais as fases foliculares e do CE nas quais existia maior proliferação destas células. Assim, a análise por ANOVA multifatorial determinou uma interação significativa entre as fases do CE e as fases foliculares na determinação da percentagem de células muito marcadas e não marcadas ($p=0.003$ e $p=0.000$, respetivamente). Assim, as diferenças observadas na média da percentagem de células da granulosa muito marcadas e não marcadas é determinadas tanto pela fase folicular como pela fase do CE. Contudo, esta interação não foi significativa quando analisada a média de células marcadas ($p=0.208$). Desta forma, a análise realizada cingiu-se à contagem de células da granulosa/pré-granulosa muito marcadas e não marcadas, ou seja, com elevada expressão de PCNA ou com ausência de expressão.

Apesar de nem todas as células da pré-granulosa dos folículos primordiais expressarem PCNA, não existe uma diferença significativa na percentagem de células muito marcadas ao longo do CE (Figura 13 *a-d*) (Gráfico 8). Contudo, há uma percentagem significativamente inferior de células da pré-granulosa não marcadas no estro face às restantes fases ($p=0.000$), em todas as três comparações) (Gráfico 9).

Já a expressão de PCNA nas células cubóides da granulosa dos folículos primários varia ao longo do CE (Figura 13 *i-l*). Nos folículos primários a intensidades da imunorreatividade nas células cubóides da granulosa varia consoante a fase do CE (Figura 13 *i-l*), sendo evidente a intensidade no proestro (Figura 13 *i*). A média da percentagem destas células da granulosa dos folículos primários que apresentam uma marcação muito intensa é significativamente superior no proestro do que nas restantes fases do CE (estro, $p=0.000$, diestro $p=0.006$ e anestro $p=0.007$)

(Gráfico 8). Já a percentagem de células não marcadas é superior no anestro face às restantes fases (proestro $p=0.001$, estro, $p=0.023$, diestro $p=0.007$) (Gráfico 9).

Os folículos secundários apresentam elevada imunorreatividade nas células da granulosa (Figura 13 q-t), com todo o folículo marcado (à exceção da teca) nas diferentes fases do CE. Nestes folículos, a percentagem de células da granulosa que apresentaram uma marcação muito intensa é apenas significativamente diferente entre o proestro e o estro ($p=0.042$), sendo superior no proestro (Gráfico 8). A percentagem de células não marcadas nos folículos secundários foi praticamente nula ao longo do CE (Gráfico 9).

De todas as fases foliculares, os folículos secundários são os que apresentam a maior percentagem de células da granulosa/pré-granulosa com expressão muito intensa de PCNA. No proestro, a percentagem de células da granulosa/pré-granulosa com marcação muito intensa é significativamente superior nos folículos secundários do que nos restantes folículos, à exceção dos pré-antrais (primordiais $p=0.000$, primários $p=0.018$, pré-antrais $p=0.001$, antrais $p=0.049$) (Gráfico 8). Por outro lado, os folículos primordiais são os que apresentam maior percentagem de células não marcadas nesta fase, no entanto, esta diferença é apenas significativa quando comparada com o a percentagem nos folículos primários e secundários e existe uma tendência na comparação com a percentagem de células não marcadas dos folículos antrais (primários $p=0.000$, secundários $p=0.000$, antrais $p=0.058$) (Gráfico 9).

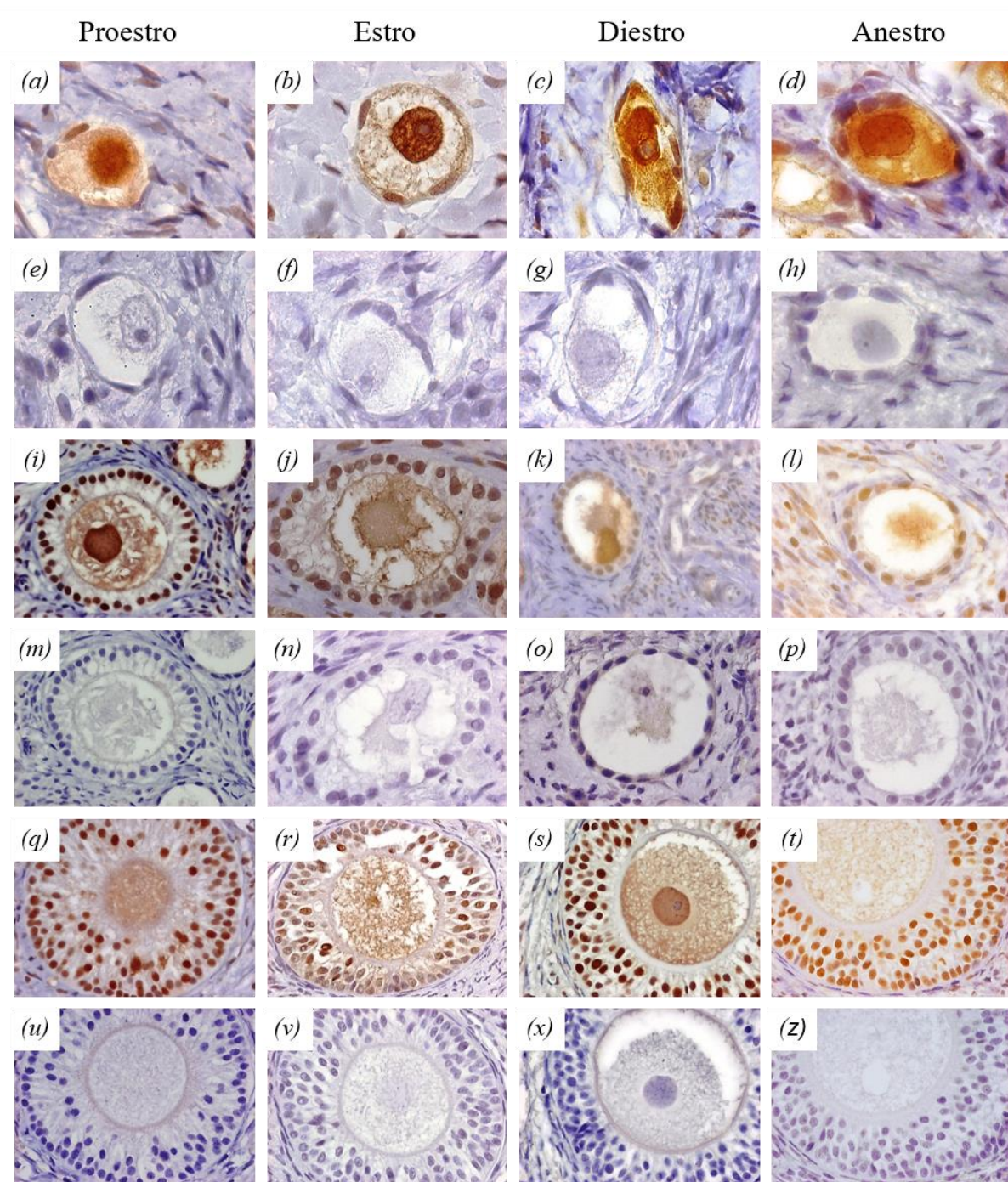


Figura 13. Padrões de expressão de PCNA durante o desenvolvimento folicular em cadela. (a-h) folículos primordiais a ampliação 1000x; (i-p) folículos primários a ampliação 400x; (q-z) folículos secundários a ampliação 100x. Coloração positiva em castanho, contra coloração com hematoxilina. Controlos negativos (e-h; m-p; u-z).

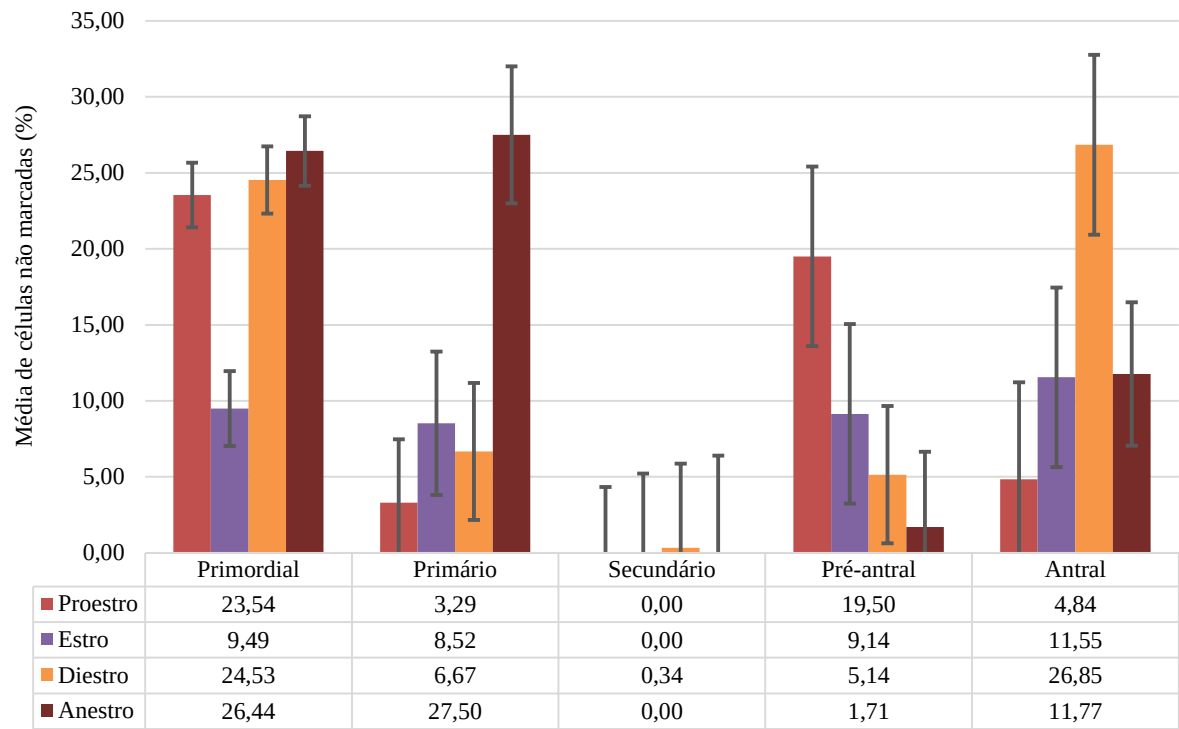


Gráfico 8. Média da percentagem de células não marcadas nas diferentes fases foliculares ao longo do CE da cadela. Barras de erro representam o erro padrão da média.

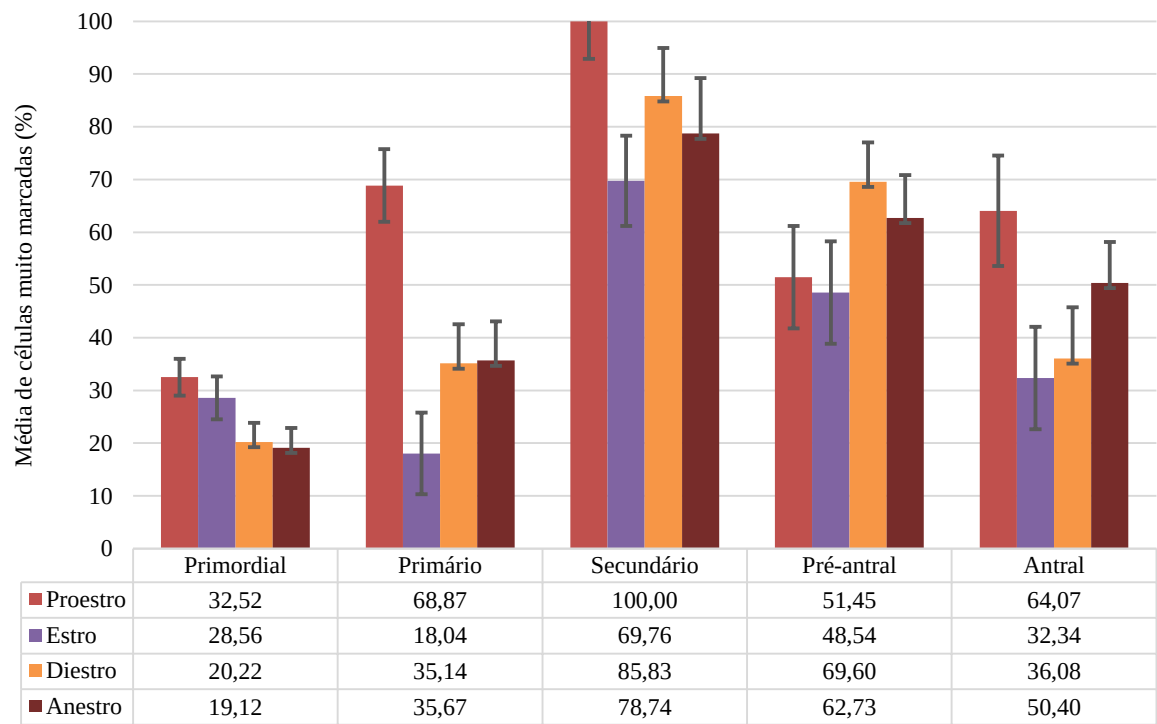


Gráfico 9. Média da percentagem de células muito marcadas nas diferentes fases foliculares ao longo do CE da cadela. Barras de erro representam o erro padrão da média.

As células da granulosa dos folículos pré-antrais e antrais também expressão PCNA, porém não existem variações significativas na intensidade de expressão ao longo do CE (Figura 14) (Gráfico 8 e 9).

À exceção dos folículos pré-antrais, tanto durante o estro como durante o diestro, a percentagem de células da granulosa/pré-granulosa com marcação de PCNA muito intensa é também significativamente superior nos folículos secundários (estro, primordiais $p=0.000$, primários $p=0.000$, antrais $p=0.041$, e diestro, primordiais $p=0.000$, primários $p=0.000$, pré-antrais $p=0.001$, antrais $p=0.001$) (Gráfico 8). A percentagem de células não marcadas não é diferente entre as diferentes fases foliculares durante o estro, contudo, durante o diestro os folículos primordiais têm uma percentagem de células não marcadas significativamente maior do que as restantes fases foliculares, à exceção dos folículos pré-antrais (primários $p=0.004$, secundários $p=0.001$, antrais $p=0.001$). Nesta fase, os folículos antrais apresentam uma percentagem de células não marcadas significativamente inferior do que os secundários e os pré-antrais (secundários $p=0.012$, pré-antrais $p=0.038$) (Gráfico 9).

Durante o anestro os folículos secundários têm apenas uma percentagem de células da granulosa muito marcada significativamente superior face aos folículos primordiais e primários ($p=0.000$ e $p=0.009$, respetivamente) (Gráfico 8), apresentando também uma percentagem de células não marcadas significativamente inferior face às mesmas fases foliculares ($p=0.001$ e $p=0.005$, respetivamente) (Gráfico 9).

Os oócitos dos folículos primordiais da cadela expressão PCNA ao longo de todo o CE (Figura 13a-d). Tal como no caso dos folículos primordiais, os oócitos dos folículos primários e secundários também apresentaram marcação com PCNA ao longo de todas as fases do CE (Figuras 13 i-l e q-t).

Nos folículos pré-antrais e antrais, é possível observar em todas as fases do CE oócitos com expressão de PCNA (Figura 14 e 15). Relativamente às células da granulosa dos folículos antrais é de referir que a zona da *corona radiata* (CR) e *cumulus oophorus* (CO) expressa imunorreatividade diferente consoante a fase do CE (Figura 14), sendo possível observar que a fase do proestro exhibe maior número de células marcadas que não marcadas (Figura 15a). No estro é possível verificar que a zona da CR e CO apresentam tantas células marcadas como não marcadas (Figura 15b). A fase de diestro expressa-se de forma semelhante ao observado na fase de estro. As diferenças são facilmente observadas na fase de anestro, em que é possível verificar um maior número de células não marcadas na zona da CO e CR em relação às restantes fases (Figura 15d).

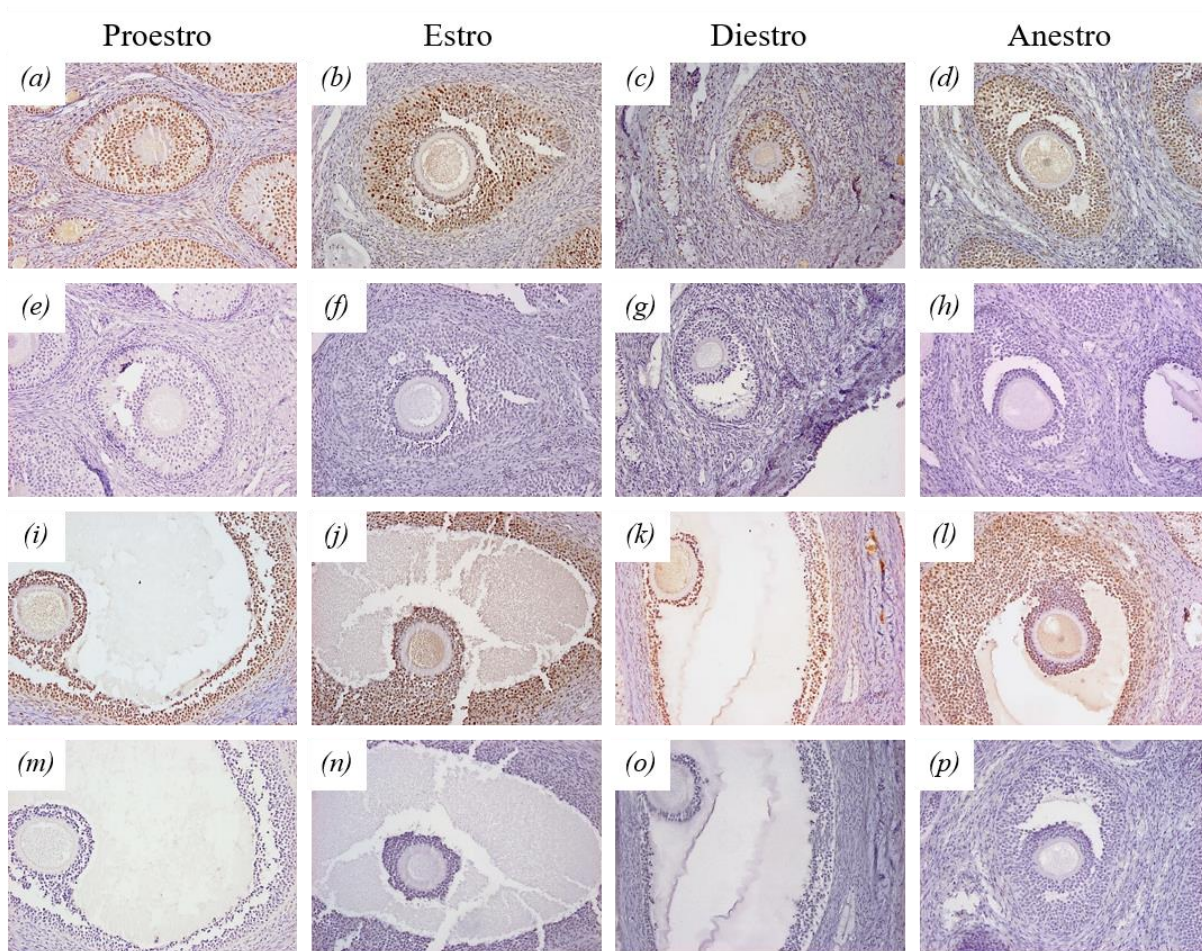


Figura 14. Padrão de expressão de PCNA ao longo do ciclo éstrico em folículos pré antrais (a-h) e antrais (i-p) de cadela. Coloração positiva em castanho, contra coloração com hematoxilina. Controlos negativos (e-h; m-p). Ampliação 100x.

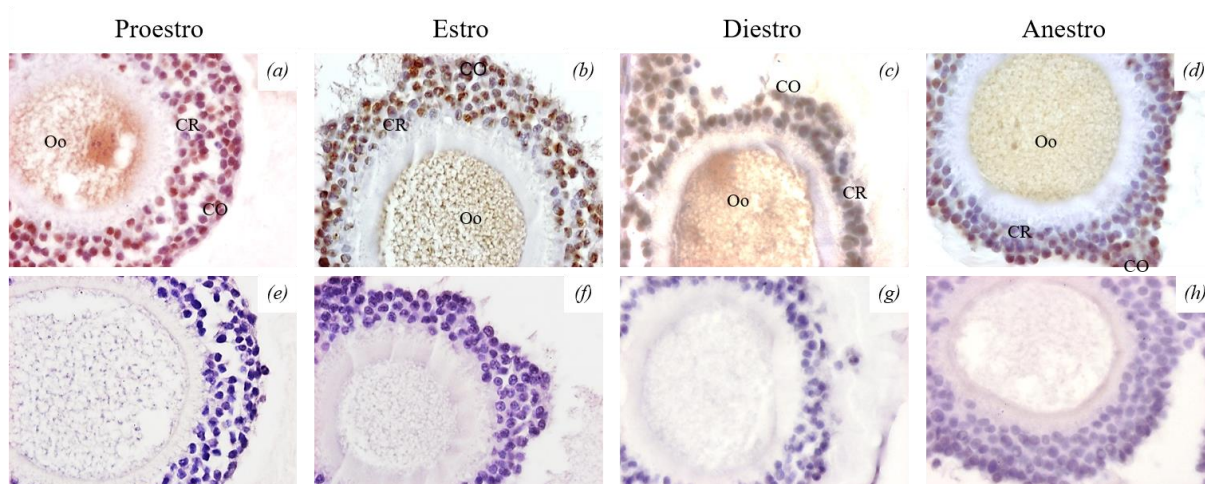
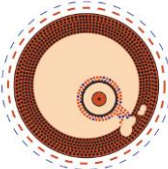
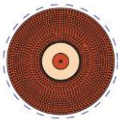
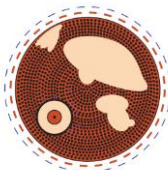
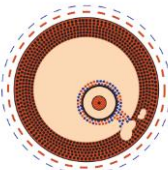
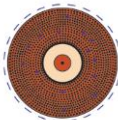
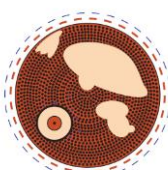
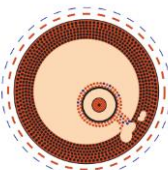
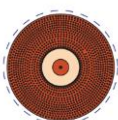
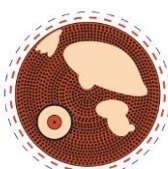
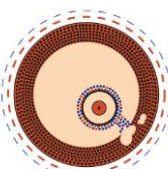


Figura 15. Detecção de PCNA em folículos antrais de cadela durante as fases do ciclo éstrico. Coloração positiva em castanho, contra coloração com hematoxilina. Controlos negativos (e-h). (Oo) oócitos; (Cr) Corona radiata; (Co) cumulus oophorus. Ampliação 400x

As observações averiguadas nesta espécie foram sumarizadas na ilustração esquemática na seguinte (Tabela 10). (Original do autor)

Tabela 10. Representação esquemática da expressão de PCNA no desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na cadela

	Primordial	Primário	Secundário	Pré Antral	Antral
<i>Proestro</i>					
<i>Estro</i>					
<i>Diestro</i>					
<i>Anestro</i>					

Tal como referido anteriormente no caso da fêmea felina, no CL existem dois tipos de células lúteas, as quais apresentam marcações distinta, nas células lúteas grandes, é possível observar intensa expressão de PCNA, exibindo uma coloração castanha, em contraste com as células lúteas pequenas que não apresentam marcação para este Ac., mantendo-se não marcadas. A imunorreatividade de PCNA é expressa em células lúteas grandes em todas as fases do CE, com maior expressão durante o diestro. Esta fase exibe imunorreação com maior intensidade, sendo possível observar células lúteas grandes e redondas fortemente marcadas de castanho. Todas as fases de diestro selecionadas em fêmeas caninas apresentam células vacuolizadas (Figura 16).

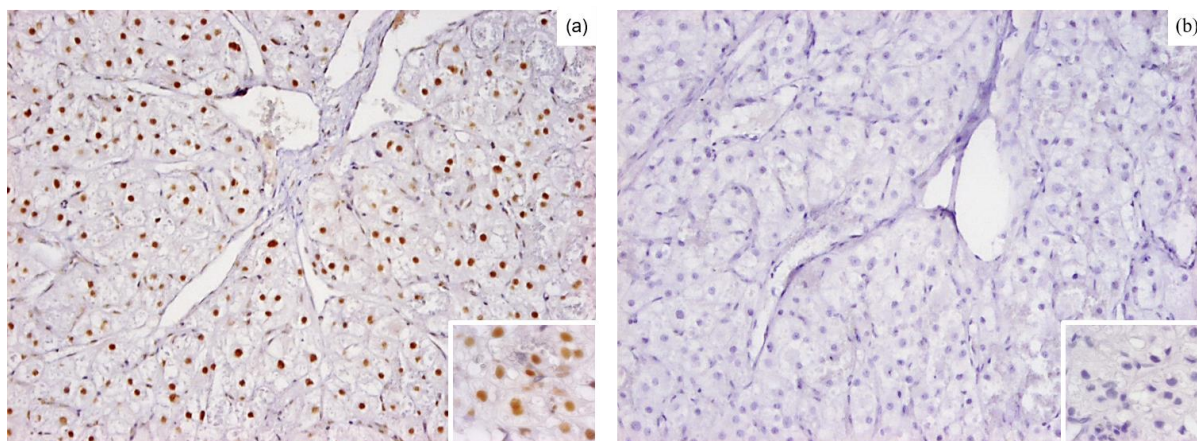


Figura 16. Padrão de expressão de PCNA no corpo lúteo (CL) de cadela em diestro. Coloração positiva em castanho, contra coloração com hematoxilina. Controle negativo (b). Escala 100x com ampliação 600x.

3.3.3. Folículos com Múltiplos Oócitos

A presença de folículos com múltiplos oócitos MOFs foi observada em animais jovens. As estruturas foliculares de múltiplos oócitos variaram de dois a três oócitos por folículo (Figura 17 e 18), com a maioria dos folículos com dois oócitos.

A coloração positiva foi observada em 100% dos folículos com múltiplos oócitos, sendo só observados MOFs no estadios secundário, pré-antral e antral (Figura 17 e 18).

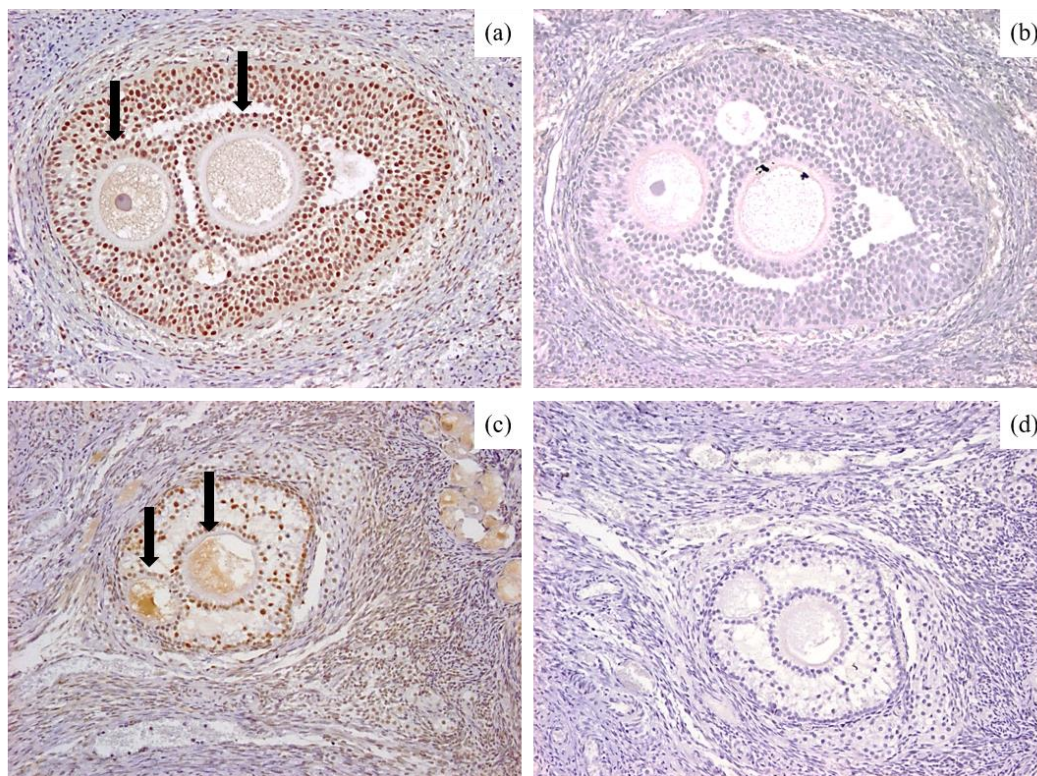


Figura 17. Análise imunohistoquímica de PCNA em MOFs de gata (c,d) e cadela (a,b). A marcação positiva é castanha e a contra coloração com hematoxilina. Controle Negativo (c) e (d). Setas, Oócitos múltiplos em folículos secundários (a,c) e pré antrais (b,d). (a,c) 100x e (b,d) 40x.

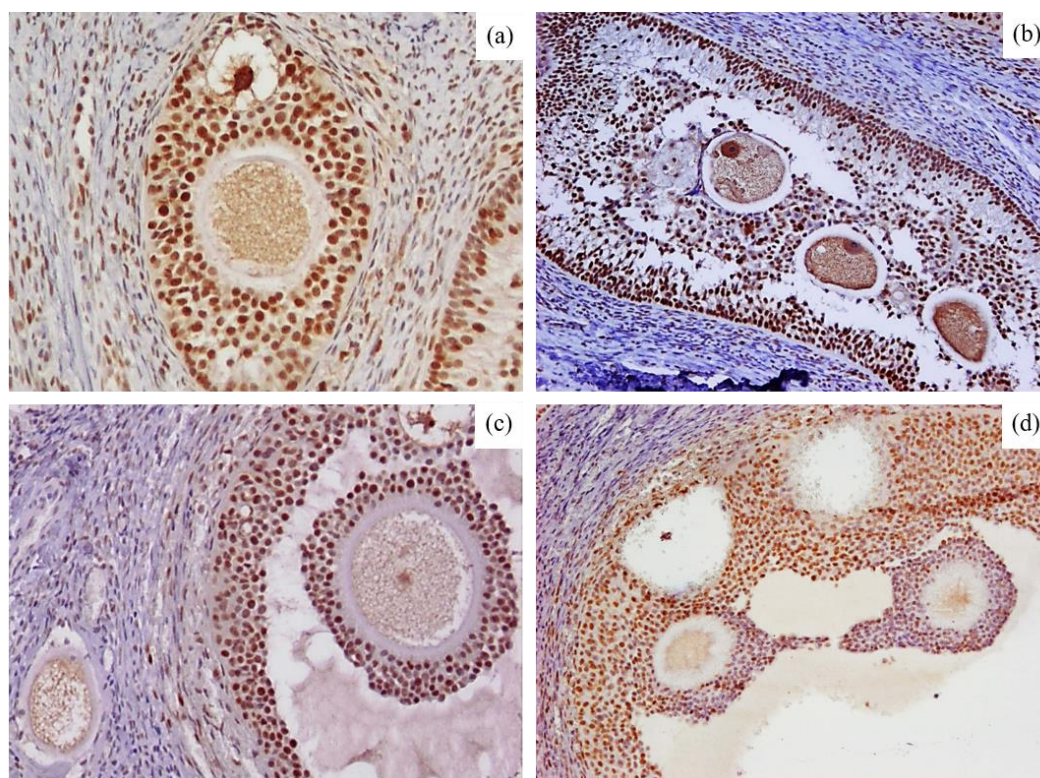


Figura 18. Análise imunohistoquímica de PCNA em MOFs de cadela. A marcação positiva é castanha e a contra coloração com hematoxilina. (a) Folículo secundário, (b) folículo pré-antral, (c,d) folículo antral. Ampliação 100x

4. Discussão

Os resultados do presente estudo suportam o anteriormente descrito noutras espécies (Oktay et al., 1995; Gougeon & Busso, 2000; Muskhelishvili et al., 2005; Tománek & Chronowska, 2006; Phoophitphong, Wangnaitham, Srisuwatanasagul, & Tummaruk, 2012; Sun S.Y., Zhang W., Han X., 2014; Oliveira et al., 2017), indicando agora que o PCNA é um marcador sensível de proliferação celular no ovário da cadela e da gata. Que seja do meu conhecimento, este é o primeiro estudo descritivo que relata os padrões de desenvolvimento e expressão do PCNA ao longo das fases de desenvolvimento folicular e do CE em folículos ováricos de cadela e gata. Assim, não havendo referências ao padrão de expressão para este marcador nestas espécies, no presente estudo recorre-se a literatura disponível noutras espécies animais.

A utilização de PCNA como marcador de proliferação celular por imunohistoquímica foi anteriormente estudada *in vivo* em ratinhos (Oktay et al., 1995; Muskhelishvili et al., 2005), porcas (Tománek & Chronowska, 2006; Phoophitphong et al., 2012), macacos (Gougeon & Busso, 2000), porquinho-da-índia (Sun S.Y., Zhang W., Han X., 2014) e mais recentemente em ovelhas (Oliveira et al., 2017).

Nas duas espécies presentes neste estudo, é possível observar a expressão de PCNA em oócitos de todos os estadios de desenvolvimento folicular e nas diferentes fases do CE, iniciando a sua expressão no folículo primordial e seguindo-se nos restantes (primário, secundário, pré-antral e antral). A expressão de PCNA precedeu o início do crescimento do folículo morfológicamente detetável pela marcação no oócito de folículos primordiais (Oktay et al., 1995). Previamente observado por Sun S.Y., Zhang W., Han X. (2014) em porquinhos-da-índia, Phoophitphong et al. (2012) em porcas e Muskhelishvili et al. (2005) em ratinhos. À exceção de Sun S.Y. et al. (2014) que utilizou um anticorpo semelhante ao usado no presente estudo, os outros autores realizaram protocolos diferentes, utilizando anticorpos monoclonais.

As observações realizadas no presente estudo e referidas anteriormente não são concordantes com os resultados aferidos por Oktay et al. (1995) e Tománek & Chronowska (2006) (em ratinho e porcas respetivamente), onde não foram observada qualquer expressão de PCNA em oócitos e células pré-granulosas de folículos primordiais, no entanto, segundo Muskhelishvili et al. (2005) este facto pode ser devido ao à realização de técnicas diferentes da realizada no presente estudo, no qual se usou a combinação da técnica de recuperação antigénica induzida pelo calor.

Na fêmea felina, é possível observar diferentes expressões de PCNA em oócitos de folículos primordiais adjacentes, em todas as fases do CE. Apesar de não existir relação estatisticamente significativa entre a proporção de oócitos de folículos primordiais com expressão

de PCNA e a fase do CE, tal como descrito por Hage, Groen-Klevant, & Welschen, (1978) e Malandain et al. (2011), é possível supor que os folículos primordiais com forte expressão de PCNA representam folículos dominantes presentes em cada onda folicular. Já na fêmea canina a expressão de PCNA nos oócitos dos folículos primordiais é constante ao longo de todo o CE.

Contudo, é de referir que de acordo com Wandji et al. (1996) e Muskhelishvili et al. (2005), a expressão de PCNA em oócitos de folículos primordiais poderá não estar relacionada com proliferação celular ou recrutamento, uma vez que os oócitos estão meioticamente estagnados e pode não existir replicação nuclear de DNA. Estando estas observações relacionadas com o papel específico de PCNA como proteína auxiliar do DNA polimerase delta, envolvido nos mecanismos de reparação de material genético durante o processo de transcrição (Wandji et al., 1996; Wandji et al., 1997).

É possível observar expressão de PCNA nas células pré-granulosas de folículos primordiais em ambas as espécies. Esta expressão correlaciona-se com os primeiros sinais de crescimento celular das células pré-granulosas, precedendo o início do crescimento do folículo morfológicamente detetável com a expressão de PCNA em células de folículos primordiais, sugerindo que a atividade metabólica tem início nos estádios iniciais da foliculogénese. Observações que coincidiram com as de Wandji et al. (1996) e Wandji et al. (1997) em folículos de bovino e babuínos respetivamente, em que a expressão de PCNA foi primeiro observada em células pré-granulosas de folículos primordiais antes de iniciarem a sua diferenciação em células da granulosa cubóides.

Na cadela e na gata, não são detetadas diferenças significativas na percentagem de células pré-granulosas com forte expressão de PCNA ao longo do CE. Estas observações sugerem que nestas duas espécies o aumento da expressão de PCNA em células pré-granulosas é coincidente com a ativação e recrutamento folicular (Muskhelishvili et al., 2005), contudo, não é possível identificar relações evidentes entre a expressão de PCNA e a fase do CE em que se encontram, resultado em concordância com Jewgenow & Paris (2006) que refere que na gata a *pool* de folículos primordiais e a percentagem de folículos que iniciam o crescimento são independentes da fase do CE.

Nos folículos primários da fêmea felina e canina, é possível evidenciar intensidades de marcação variáveis nas células da granulosa, assim como variações consoante a fase do CE. É possível observar a presença de células com e sem expressão do marcador, a ausência de PCNA nas células da granulosa cubóides pode dever-se à fase celular em que se encontram, uma vez que na fase M a expressão de PCNA é reduzida drasticamente (Oktay et al., 1995). Os folículos primários da fêmea canina apresentam distante expressão de PCNA em relação às fases do CE, com forte

expressão de PCNA no proestro e fraca no anestro. Em ambas as espécies é possível verificar marcação positiva no oócito de folículos primários em todas as fases do CE. Esta marcação é observada pelos autores referidos anteriormente, no entanto, não há diferenciação ao longo do CE.

Na fêmea felina é possível identificar a fase de diestro como a que mais expressa PCNA em folículos primários, diferente do que acontece na fêmea canina na qual a intensidade de marcação é significativamente superior no proestro face às restantes fases do CE.

Diversos autores (Dawson & Friedgood, 1940; Shille et al., 1979) referem o proestro com a fase onde é iniciado o recrutamento e crescimento folicular, observações que podem justificar os resultados observados na fêmea canina, onde se observa uma relação significativa entre esta fase do CE e a fase de desenvolvimento folicular. Por outro lado, estas observações não foram corroboradas com o presentemente descrito na fêmea felina.

A imunorreatividade de PCNA das células da granulosa e oócitos dos folículos secundários da fêmea felina é elevada e semelhante nas diferentes fases do CE, com uma ligeira diminuição na intensidade da marcação no anestro. Relativamente aos folículos secundários da fêmea canina observa-se imunorreatividade elevada de PCNA nas células da granulosa e oócito em todas as fases do CE, mas com maior expressão no proestro. As observações relativamente à expressão de PCNA, sem ter em conta as alterações relativas à fase do CE, estão em concordância com os resultados obtidos por Oktay et al. (1995) e Wandji et al. (1997).

Segundo Songsasen, Fickes, Pukazhenth, & Wildt (2009) em cadela e Reynaud et al. (2009) em gatas, existe um aumento substancial da taxa de crescimento dos folículos após a formação do antro, com um padrão de crescimento divergente, onde o crescimento do folículo é predominante ao do oócito. O antro separa as células cumulus oophorus que cingem o oócito das células da granulosa que revestem a parede do folículo (Paulini et al., 2014). Neste estadio de desenvolvimento, o rápido crescimento provoca extensa expressão de PCNA. Paralelamente ao rápido crescimento existe também uma elevada taxa de atresia folicular. Segundo Oktay et al. (1995) e Tománek & Chronowska (2006) a expressão de PCNA varia em paralelo com a extensão da atresia, diminuindo à medida que está a aumentar.

No presente estudo, na fêmea felina e canina, é possível evidenciar-se a expressão de PCNA nos folículos pré-antrais e antrais em todas as fases do CE, nos oócitos e células da granulosa, resultados igualmente observados por Tománek & Chronowska (2006) em porcas. Não são exibidas variações significativas na percentagem de células da granulosa destes folículos que são marcadas e muito marcadas ao longo do CE. No entanto, na fêmea felina, os folículos antrais são os que apresentam a maior percentagem de células da granulosa com marcação de PCNA no proestro, fato que se pode dever a uma maior proliferação celular na fêmea felina aquando a formação do antro.

É de referir que a zona da *corona radiata* (CR) e *cumulus oophorus* (CO) têm um padrão de expressão diferente consoante a fase do CE, em que a expressão de PCNA é menor na fase de anestro. A diferente marcação nesta fase do CE pode ser justificada pelo progresso nas alterações atéticas a que estes folículos são sujeitos.

No CL é possível observar uma expressão de PCNA mais evidente em células lúteas grandes (de origem granulosa) do que nas células lúteas pequenas (originárias da teca) embora ambas tenham a capacidade de produzir P4. Quando presente, é possível observar imunorreação de PCNA nesta estrutura em todas as fases do CE em ambas as espécies. A presença de vacuolizações, apesar de não serem significativas para os resultados deste estudo, são representativas do final do diestro, resultados em concordância com as observações de Kowalewski (2014) em cadelas e Amelkina, Braun, Dehnhard, & Jewgenow (2015) em gatas. A expressão de PCNA no CL é superior na fase de diestro em ambas as espécies.

Relativamente aos MOFs, estes foram observados em ambas as espécies abordadas neste estudo, porém, com uma maior frequência em fêmeas caninas do que em fêmeas felinas. No entanto, a sua importância, funcionalidade e origem permanece pouco compreendida (Bristol-Gould & Woodruff, 2006). Todavia, considerando o PCNA como um marcador relacionado à atividade do metabolismo, Oliveira et al. (2017) sugere que os MOFs apresentam sinais claros de viabilidade, com um possível papel na função ovariana.

No presente estudo a expressão positiva por PCNA é observada na mesma proporção em folículos MOFs e nos folículos com uma célula germinativa. Os oócitos incluídos no mesmo folículo mostraram um padrão de expressão de PCNA similar e parecem estar no mesmo estágio de desenvolvimento. Observações concordantes com os resultados de Oliveira et al. (2017) em ovário de ovelha.

5. Conclusão

Em suma este trabalho descreve o padrão de expressão de PCNA na foliculogénese da gata e cadela, apresentando uma descrição detalhada e comparativa por fase folicular e fase do CE. Além disso, o presente estudo consiste ainda no relato das alterações morfológicas que ocorrem nos folículos de gata e cadela no momento de recrutamento e ao longo do seu desenvolvimento folicular, assim como as suas variações dependentes da fase do CE em que se encontram.

Os resultados aqui apresentados permitem confirmar, no caso da gata e cadela, o anteriormente descrito noutras espécies, que o PCNA pode servir como um marcador confiável dos processos de proliferação que ocorrem no ovário e no recrutamento e crescimento folicular. Desta forma o PCNA poderá ser utilizado como ferramenta no acompanhamento do desenvolvimento folicular e como coadjuvante na identificação da fase de crescimento em trabalhos posteriores que tenham como objetivo a descrição detalhada dos processos envolvidos neste processo fisiológico. Assim, com o presente estudo, e em concordância com Bristol-Gould & Woodruff (2006) e Songsasen et al. (2017), deve ser considerado que apesar dos progressos realizados ainda existe uma grande lacuna de conhecimento sobre o desenvolvimento folicular, especialmente sobre os principais reguladores da ativação primordial.

São assim necessários mais estudos para identificar os fatores que estimulam ou inibem o início do crescimento do folículo primordial, a capacidade dos folículos primordiais de entrar na fase de crescimento, os fatores responsáveis pelo crescimento nos estadios subsequentes e os mecanismos de seleção e crescimento dos folículos pré-ovulatórios. Tais conhecimentos poderão permitir o desenvolvimento de terapias de controlo de fertilidade, tanto em animais como em humanos.

6. Limitações do estudo

Apesar do período de 6 meses de recolha de amostras, a elevada dificuldade em obter estadios de proestro e estro em ambas as espécies origina uma amostra total de animais analisados inferior ao que seria desejado.

Os resultados das concentrações sanguíneas de progesterona apresentaram resultados inferiores ao esperado, é possível suspeitar de mau manuseamento ou acondicionamento das amostras. Esta limitação veio dificultar a determinação precisa do estadio da fase do CE, que porém, foi esclarecida com o recurso à citologia. Outra possível explicação para as baixas concentrações de P4 prende-se com o facto dos diestros analisados serem de animais na fase final desta fase do CE.

Relativamente à análise de dados, esta revela falta de normalidade verificada no teste de shapiro wilk, observa-se também a existência de outliers em número não desprezável, existindo quebra dos pressupostos da ANOVA multifatorial, havendo ainda violação da homogeneidade de variâncias. No entanto, decidiu-se assumir a quebra destes pressupostos e realizar a análise assumindo as suas limitações.

Por último, é de referir que a utilização de um marcador de apoptose celular e do receptor da FSH (documentada estar envolvida no início do crescimento folicular) seria bastante vantajoso e enriquecedor para o trabalho em questão. Estes trabalhos foram iniciados por outros colegas no âmbito dos seus trabalhos de mestrado integrado em Medicina Veterinária na FMV-ULHT, assegurando a continuação da linha de investigação iniciada com o presente trabalho e a prossecução de conclusões mais esclarecedoras no que concerne a regulação da foliculogénese da cadela e da gata.

7. Bibliografia

- Amelkina, O., Braun, B. C., Dehnhard, M., & Jewgenow, K. (2015). The corpus luteum of the domestic cat: Histologic classification and intraluteal hormone profile. *Theriogenology*, 83(4), 711–720.
- Andersen, A. C., & Simpson, M. E. (1973). *The ovary and reproductive cycle of the dog (beagle)*. *Theriogenology* (Vol. 1).
- Banks, D. H., & Stabenfeldt, G. (1982). Luteinizing hormone release in the cat in response to coitus on consecutive days of estrus. *Biology of Reproduction*, 26(4), 603–11.
- Barber, M. R., Lee, S. M., Steffens, W. L., Ard, M., & Fayrer-Hosken, R. A. (2001). Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. *Theriogenology*, 55(8), 1705–1717.
- Bravo, R., & Macdonald-Bravo, H. (1987). Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: Association with DNA replication sites. *Journal of Cell Biology*, 105(4), 1549–1554.
- Bristol-Gould, S., & Woodruff, T. K. (2006). Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, 66(1), 5–13.
- Bristol, S. K. (2003). Follicle-Restricted Compartmentalization of Transforming Growth Factor Superfamily Ligands in the Feline Ovary. *Biology of Reproduction*, 70(3), 846–859.
- Brown, J. L. (2011). Female reproductive cycles of wild female felids. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 155–162.
- Carrijo, O. A., Marinho, A. P. S., Campos, A. A., Amorim, C. A., Bão, S. N., & Lucci, C. M. (2010). Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. *Cells Tissues Organs*, 191(2), 152–160.
- Chastant-Maillard, S., Viaris De Lesegno, C., Chebrou, M., Thoumire, S., Meylheuc, T., Fontbonne, A., ... Reynaud, K. (2011). The canine oocyte: Uncommon features of in vivo and in vitro maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(3), 391–402. h
- Comizzoli, P., Pukazhenth, B. S., & Wildt, D. E. (2011). The competence of germinal vesicle oocytes is unrelated to nuclear chromatin configuration and strictly depends on cytoplasmic quantity and quality in the cat model. *Human Reproduction*, 26(8), 2165–2177.
- Concannon, P., Hodgson, B., & Lein, D. (1980). Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. *Biology of Reproduction*, 23(1), 111–7.

- Concannon, P. W. (2009). Endocrinologic control of normal canine ovarian function. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 44, pp. 3–15). <http://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01414.x>
- Concannon, P. W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 200–210.
- Concannon, P. W. (2012). Research Challenges in Endocrine Aspects of Canine Ovarian Cycles. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL. 6), 6–12.
- Concannon, P. W., Hansel, W., & Vissek, W. J. (1975). The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biology of Reproduction*, 13(1), 112–121.
- Cortvrindt, R., & Smitz, J. (2001). In vitro follicle growth: Achievements in mammalian species. *Reproduction in Domestic Animals*, 36(1), 3–9.
- Dawson, A. B. (1941). The development and morphology of the corpus luteum of the cat. *The Anatomical Record*, 79(2), 155–177.
- Dawson, A. B., & Friedgood, H. B. (1940). The time and sequence of preovulatory changes in the cat ovary after mating or mechanical stimulation of the cervix uteri. *The Anatomical Record*, 76(4), 411–429.
- Diagone, K. V., Vicente, W. R. R., Pacheco, M. R., & Mateus, O. (2008). Oocyte morphometry in female dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 37(2), 81–85.
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009, October). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*.
- England, G. C. W., Russo, M., & Freeman, S. L. (2009). Follicular dynamics, ovulation and conception rates in bitches. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 44, pp. 53–58).
- Eppig, J. J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*.
- Eppig, J. J., Wigglesworth, K., & Pendola, F. L. (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 2890–4.
- Evans, a. C. O. (2003). Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4), 240–246.
- Fortune, J. E. (2003, October). The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*.
- Gougeon, A. (1996, April). Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and

- hypotheses. *Endocrine Reviews*.
- Gougeon, A., & Busso, D. (2000). Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163(1–2), 33–41.
- Graham, L. H., Swanson, W. F., Wildt, D. E., & Brown, J. L. (2004). Influence of oral melatonin on natural and gonadotropin-induced ovarian function in the domestic cat. *Theriogenology*, 61(6), 1061–1076.
- Groppetti, D., Pecile, A., Barbero, C., & Martino, P. A. (2012). Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: Role on fertility. *Theriogenology*, 77(8), 1549–1556.
- Hage, A. J., Groen-Klevant, A. C., & Welschen, R. (1978). FOLLICLE GROWTH IN THE IMMATURE RAT OVARY. *European Journal of Endocrinology*, 88(2), 375–382.
- Hartman, C. G. (1926). Polynuclear ova and polyovular follicles in the opossum and other mammals, with special reference to the problem of fecundity. *American Journal of Anatomy*, 37(1), 1–51.
- Hyttel, P., Sinowatz, F., & Vejlsted, M. (2010). *Essentials of Domestic Animal Embryology*. *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis*.
- Jagarlamudi, K., & Rajkovic, A. (2012). Oogenesis: Transcriptional regulators and mouse models. *Molecular and Cellular Endocrinology*.
- Jemmett, J. E., & Evans, J. M. (1977). Survey of Sexual-Behavior and Reproduction of Female Cats. *Journal of Small Animal Practice*, 18(1), 31–37.
- Jewgenow, K., & Paris, M. C. J. (2006). Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. *Theriogenology*, 66(1), 93–100.
- Johnson, L. M., & Gay, V. L. (1981). Luteinizing hormone in the cat. I. tonic secretion. *Endocrinology*, 109(1), 247–252.
- Johnston, S. D., Root Kustritz, M. V, & Olson, P. N. S. (2001). *Canine and feline theriogenology*. WB Saunders.
- Kanca, H., Karakas, K., Dalgic, M. A., Salar, S., & Izgur, H. (2014). Vaginal cytology after induction of ovulation in the queen: Comparison of postoestrus and dioestrus. *Australian Veterinary Journal*, 92(3), 65–70.
- Kelman, Z. (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14(6), 629–640.
- Kingsbury, B. F. (1913). The morphogenesis of the mammalian ovary: *Felis domestica*. *American Journal of Anatomy*, 15(3), 345–387.
- Kowalewski, M. P. (2014). Luteal regression vs. prepartum luteolysis: Regulatory mechanisms

- governing canine corpus luteum function. *Reproductive Biology*.
- Kustritz, M. V. R. (2005). Reproductive behavior of small animals. *Theriogenology*, 64(3), 734–746.
- Kutzler, M. A. (2007). Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology*, 68(3), 354–374.
- Liche, H., & Wodzicki, K. (1939). Vaginal smears and the oestrous cycle of the cat and the lioness. *Nature*, 144(3640), 245–246.
- Lunardon, N. T., Silva-Santos, K. C., Justino, R. C., Dessunti, G. T., Seneda, M. M., & Martins, M. I. M. (2015). Population estimate of the preantral follicles and frequency of multioocyte follicles in prepubertal and adult bitches. *Theriogenology*, 83(6), 1015–1020.
- Mailand, N., Gibbs-Seymour, I., & Bekker-Jensen, S. (2013). Regulation of PCNA–protein interactions for genome stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(5), 269–282.
- Malandain, 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*, 76(7), 1337–1346.
- McCracken, J. a, Custer, E. E., & Lamsa, J. C. (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews*, 79(2), 263–323. Retrieved from
- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*.
- McLaughlin, E. A., & McIver, S. C. (2009). Awakening the oocyte: Controlling primordial follicle development. *Reproduction*, 137(1), 1–11. <http://doi.org/10.1530/REP-08-0118>
- Mehlmann, L. M. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130(6), 791–799.
- Michael, R. P. (1961). Observations upon the sexual behaviour of the domestic cat (*Felis catus* L.) under laboratory conditions. *Behaviour*, 18(1–2), 1–24.
- Mills, J. N., Valli, V. E., & Lumsden, J. H. (1979). Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *Canadian Veterinary Journal*, 20(4), 95–101.
- Monniaux, D. (2016). Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology*, 86(1), 41–53.
- Moxon, R., Copley, D., & England, G. C. W. (2010). Quality assurance of canine vaginal cytology: A preliminary study. *Theriogenology*, 74(3), 479–485.

- Muskhelishvili, L., Wingard, S. K., & Latendresse, J. R. (2005). Proliferating Cell Nuclear Antigen — A Marker for Ovarian Follicle Counts. *Toxicologic Pathology*, 33, 365–368.
- Oktay, K., Schenken, R. S., & Nelson, J. F. (1995). Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biology of Reproduction*, 53(2), 295–301.
- Oliveira, R. L., Silva, C. B., Silva, E. O., Gerez, J. R., Santos, M. M., Sarapião, F. D., ... Seneda, M. M. (2017). Proliferative activity of multi-oocyte follicles in sheep ovaries. *Small Ruminant Research*, 146, 58–60.
- Paape, S. R., Suille, V. M., Seto, H., & Stabenfeldt, G. U. (1975). Luteal Activity in the Pseudopregnant Cat. *Biology of Reproduction*, 13, 470–474.
- Paulini, F., Silva, R. C., Rôlo, J. L. J. de P., & Lucci, C. M. (2014). Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *Journal of Ovarian Research*, 7(1), 1–10.
- Payan-Carreira, R., & Pires, M. A. (2008). Multioocyte follicles in domestic dogs: A survey of frequency of occurrence. *Theriogenology*, 69(8), 977–982.
- Pedersen, T., & Peters, H. (1968). Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17(c), 555–557.
- Peterson, A. (2015). Reproductive Physiology of the Female Cat.
- Phemister, R. D., Holst, P. a, Spano, J. S., & Hopwood, M. L. (1973). Time of ovulation in the beagle bitch. *Biology of Reproduction*, 8(1), 74–82.
- Phoophitphong, D., Wangnaitham, S., Srisuwatanasagul, S., & Tummaruk, P. (2012). The use of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immuno-staining technique to determine number and type of follicles in the gilt ovary. *Livestock Science*, 150(1–3), 425–431.
- Picton, H. M., Harris, S. E., Muruvi, W., & Chambers, E. L. (2008). The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction (Cambridge, England)*, 136(6), 703–15.
- Post, K. (1985). Canine vaginal cytology during the estrous cycle. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne*, 26(3), 101–4.
- Reddy, K. C. S., Raju, K. G. S., Rao, K. S., & Rao, K. B. R. (2011). Vaginal cytology, vaginoscopy and progesterone profile: Breeding tools in bitches. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 25(2), 51–54.
- Reynaud, K., de Lesegno, C. V., Chebrou, M., Thoumire, S., & Chastant-Maillard, S. (2009). Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology*, 72(8), 1120–1131.
- Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., Viaris de Lesegno, C., Saint-Dizier, M., & Chastant-Maillard, S. (2006). In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early

- embryogenesis: A review. *Theriogenology*, 66(6–7), 1685–1693.
- 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*, 47(SUPPL. 6), 66–69.
- Reynaud, K., Gicquel, C., Thoumire, S., Chebrout, M., Ficheux, C., Bestandji, M., & Chastant-Maillard, S. (2009). Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in the feline ovary. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), 174–179.
- Robinson, B. L., & Sawyer, C. H. (1987). Hypothalamic control of ovulation and behavioral estrus in the cat. *Brain Research*, 418(1), 41–51.
- Rojo, J. L., Linari, M., Musse, M. P., & Peluffo, M. C. (2015). Felis catus ovary as a model to study follicle biology in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(7), 1105–1111.
- Ron-El, R., Nachum, H., Golan, A., Herman, A., Yigal, S., & Caspi, E. (1990). Binovular human ovarian follicles associated with in vitro fertilization: incidence and outcome. *Fertility and Sterility*, 54(5), 869–872.
- Rose, D. (1979). Mechanisms underlying the receptive field properties of neurons in cat visual cortex. *Vision Research*, 19(5), 533–544.
- S.Y. Sun, W. Zhang, X. Han, R. H. H. and F. X. S. (2014). Cell proliferation and apoptosis in the fetal and neonatal ovary of guinea pigs. *Genetics and Molecular Research*, 11(113), 1949–1957.
- Sambasivarao, S. V. (2012). The domestic dog and cat as models for understanding the regulation of ovarian follicle development in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*.
- Schutte, A. P. (1967). Canine Vaginal Cytology - II. Cyclic Changes. *The Journal of Small Animal Practice*, 8(6), 307–311.
- Shehata, R. (1974). Polyovular Graafian follicles in a newborn kitten with a study of polyovuly in the cat. *Cells Tissues Organs*, 89(1), 21–30.
- Shille, V. M., Lundström, K. E., & Stabenfeldt, G. H. (1979). Follicular function in the domestic cat as determined by Estradiol -17 β Concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of the exfoliated vaginal epithelium. *Biology of Reproduction*, 21(4), 953–963.
- Shille, V. M., Munrot, C., Farmer, S. W., Papkoff, H., & Stabenfeld, G. H. (1983). Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. *Reproduction*, 69(1), 29–39.
- Shrestha, A., Srichandan, S., Minhas, V., Panda, A. K., & Gupta, S. K. (2015). Canine zona

- pellucida glycoprotein-3: Up-scaled production, immunization strategy and its outcome on fertility. *Vaccine*, 33(1), 133–140.
- Smitz, J. E. J., Cortvrindt, R. G., Fujihara, M., Comizzoli, P., Keefer, C. L., Wildt, D. E., ... Mcneilly, A. S. (2002). The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*, 90(4), 185–202.
- Songsasen, N., Comizzoli, P., Nagashima, J., Fujihara, M., & Wildt, D. E. (2012). The domestic dog and cat as models for understanding the regulation of ovarian follicle development in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 Suppl 6, 13–8.
- Songsasen, N., Fickes, A., Pukazhenth, B. S., & Wildt, D. E. (2009a). Follicular morphology, oocyte diameter and localisation of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(SUPPL. 2), 65–70.
- Songsasen, N., Fickes, a, Pukazhenth, B. S., & Wildt, D. E. (2009b). Follicular morphologp, oocyte diameter and localization of fibroblast growth factors in the dog ovary, 44(Suppl 2), 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.
- Songsasen, N., & Wildt, D. E. (2007). Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science*, 98(1–2), 2–22.
- Spaniel-Borowski, K., & Calvo, W. (1982). Short- and long-term response of the adult dog ovary after 1200 R whole-body X-irradiation and transfusion of mononuclear leukocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 41(6), 657–670.
- Stocco, C., Telleria, C., & Gibori, G. (2007, February). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews*.
- Telfer, E., & Gosden, R. G. (1987). A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 81(1), 137–147.
- Tománek, M., & Chronowska, E. (2006). Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary. *Folia Histochemica et Cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 44(4), 269–74.
- Wandji, S. A., Sršen, V., Nathanielsz, P. W., Eppig, J. J., & Fortune, J. E. (1997). Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. *Human Reproduction*, 12(9), 1993–2001.
- Wandji, S. a, Srsen, V., Voss, a K., Eppig, J. J., & Fortune, J. E. (1996). Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biology of Reproduction*, 55(5), 942–948.

- Wildt, D. (1978). Ovarian and behavioral cyclicity of the laboratory maintained cat. *Hormones and Behavior*, 10(3), 251–257.
- Wildt, D. E., Chan, S. Y., Seager, S. W., & Chakraborty, P. K. (1981). Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biology of Reproduction*, 25(1), 15–28.
- Wildt, D. E., Levinson, C. J., & Seager, S. W. J. (1977). Laparoscopic exposure and sequential observation of the ovary of the cycling bitch. *The Anatomical Record*, 189(3), 443–449.
- Wildt, D. E., Seager, S. W. J., & Chakraborty, P. K. (1980). Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. *Endocrinology*, 107(4), 1212–1217.
- Wright, P. J. (1990). Application of vaginal cytology and plasma Progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. *Journal of Small Animal Practice*, 31(7), 335–340.
- YoungLai, E. V., Belbeck, L. W., Dimond, P., & Singh, P. (1976). Testosterone Production by Ovarian Follicles of the Domestic Cat (*Felis catus*). *Hormone Research*, 7(2), 91–98.
- Zheng, J., Fricke, P. M., Reynolds, L. P., & Redmer, D. a. (1994). Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 51(4), 623–32. Retrieved from

APÊNDICES

APÊNDICE I – Protocolo de recolha de amostras

Por forma a desenvolver os trabalhos de mestrado da aluna Carolina Cardoso solicitamos a vossa colaboração na recolha das seguintes amostras:

Produtos Biológicos (cadelas e gatas):

- Ovários (isolados)
- Zaragatoa de citologia Vaginal
- Amostra de sangue (Mínimo 400 µl)

Procedimento:

1. Citologia vaginal pré-cirúrgica. Deixar secar. A coloração será feita posteriormente.
2. Amostra de sangue recolhida da amostra para análises pré-anestésicas. Sangue recolhido para tubo seco. Conservar o soro a -20°C.
3. A recolha dos produtos biológicos, ovários (sem útero), realizada durante a cirurgia. Colocar diretamente no recipiente estéril com aproximadamente 4x o seu volume em formol.

Material necessário:

- Amostras para histologia: Formol; Recipiente;
- Citologia: Zaragatoa; Lâmina com bordo fosco
- Sangue: Tubo seco (soro)

Agradecemos que todas as amostras sejam identificadas com o nº da ficha do animal para que seja possível recolher todas as informações.

APÊNDICE II – Protocolo de processamento histológico

1. Etanol a 70% - 30 minutos
2. Etanol a 70% - 1h20 minutos
3. Etanol a 96% - 30 minutos
4. Etanol a 96% - 1h20 minutos
5. Etanol a 100% - 30 minutos
6. Etanol a 100% - 1h20 minutos

7. Etanol a 100% - 2 horas
8. Clear-Rite®- 30 minutos
9. Clear-Rite®- 1h30 minutos
10. Clear-Rite®- 2horas
11. Parafina (60-65°C) – 1h30 minutos
12. Parafina (60-65°C) – 2 horas

APÊNDICE III – Protocolo de coloração da citologia vaginal

1. Cobria a lâmina com corante de Giemsa durante 8 minutos;
2. Sem remover o corante, aplicar gotas de água destilada;
3. Lavar a lâmina em água corrente e deixá-la secar em posição horizontal
4. Montar em entellan

APÊNDICE IV – Protocolo de imunohistoquímica de cortes de parafina

Dia 1

2. As lâminas devem ser postas na estufa a 37°C, 15 minutos antes de começar a desparafinização.
3. Proceder à desparafinização das lâminas em xilol, e re-hidratação em concentrações decrescentes de etanol da seguinte forma:
 1. Xilol _____ 10'
 2. Xilol _____ 5'
 3. Álcool 100% ____ 2x2'
 4. Álcool 95% ____ 2x2'
 5. Álcool 75% ____ 2x2'
4. Lavar em água destilada durante 5 minutos.
5. Incubar em água com 3% de H₂O₂
 - No escuro, durante **15 min** a **37°C**.
6. Proceder à recuperação antigénica em 10 mM de tampão citrato pH6
 1. Aquecer a solução durante 3 minutos a 700W sem as lâminas
 2. Incubar durante 5'x 3 a 700W
 3. Após as 3 lavagens, as lâminas devem ser arrefecidas à T.A. durante cerca de 20-30 minutos.

7. Lavar em PBS-Triton 0,3 (2× 5 min)
8. Bloqueio em solução de 2% BSA
 - Distribuir 200µl da solução de bloqueio por cada lâmina.
 - Incubar durante **1 hora** em câmara húmida
9. Incubar com o anticorpo primário (α -1^{ario}), coelho anti-PCNA (ab18197; Abcam, Cambridge, UK)
 - Distribuir 100µl/lâmina e cobrir com lamela.
 - Incubar a 4 °C, em câmara húmida, **overnight**.

Dia 2

1. Lavar em PBS (4 × 10 min)
2. Incubar com o anticorpo secundário (α -2^{ario}), anticorpo policlonal cabra anti-coelho IgG conjugado com peroxidase (410972, Dako, Carpinteria, CA, USA)
 - Distribuir 100µl/lâmina e cobrir com lamela.
 - Incubar à T.A, em câmara húmida, durante **1 hora**.
3. Lavar em PBS (2× 10 min)
4. Incubar no cromogénio DAB até observar reação
5. Lavar em H₂O destilada (2× 5 min)
6. Corar com hematoxilina de Mayers durante 10''
7. Lavar em água corrente para remover o excesso de hematoxilina.
8. Desidratar em concentrações crescentes de álcool da seguinte forma:
 - a. Álcool 95% _____ 2'
 - b. Álcool 100% _____ 2'
 - c. Xilol _____ 5'
 - d. Xilol _____ 5'
9. Montar em entellan.

APÊNDICE V – Soluções

Phosphate Buffered Saline (PBS) 10%

- Volume final de solução (Vf) 1000ml = 100ml PSB 1% + 900ml H₂O

Peroxido de Hidrogénio 3% (H₂O₂)

- H₂O₂ a 30%, Vf 60ml = 54 ml H₂O + 6 ml H₂O₂

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

PBS - Triton 0,3%

- Vf 1000 ml = 1000 ml PBS 1% + 3 ml Triton-X

APÊNDICE VI – Trabalhos Publicados

XIII Congresso Medicina do Hospital Montenegro

DESENVOLVIMENTO FOLICULAR AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO NA CADELA E NA GATA

Cardoso, C.¹, Mateus, L.², Lopes-da-Costa, L.², Murta, D.^{1,2}

1. CBIOS, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal
2. Reprodução e Desenvolvimento, CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal



INTRODUÇÃO

- Ao longo do ciclo éstrico estão presentes folículos ovários em todas as fases de desenvolvimento, isto é em quiescência, crescimento e atresia¹. No entanto, cada espécie tem a sua própria escala temporal de desenvolvimento, envolvendo processos como a proliferação e diferenciação das células foliculares^{2,3}. Contudo, o conhecimento sobre os mecanismos que regulam o desenvolvimento folicular é ainda fragmentário, sendo, no entanto, fundamental para o desenvolvimento de novos métodos de controlo da fertilidade.
- Este estudo preliminar consistiu na avaliação da proliferação celular nos folículos ovários de cadelas e gatas e a sua relação com o seu recrutamento e desenvolvimento ao longo das diferentes fases do ciclo éstrico (proestro, estro, diestro, anestro). Além disso, foi também realizado uma comparação entre estas duas espécies que, embora filogeneticamente afastadas, concentram forte interesse veterinário.

MATERIAL E MÉTODOS

- Foram recolhidos ovários de 19 cadelas e 16 gatas com idades compreendidas entre os 5 meses e 2 anos de idade, os quais foram agrupados de acordo com a fase do ciclo éstrico. A fase do ciclo éstrico foi determinada através da citologia vaginal, concentração plasmática de progesterona (P4) e observação histológica dos ovários.
- Os ovários foram processados para imunohistoquímica e a proliferação celular nos folículos e corpos lúteos foi avaliada através do marcador Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (ab18197, Abcam) na concentração de 1/800, nas cadelas, e de 1/1200 nas gatas. O anticorpo policlonal (410972, 1: 100; Dako, Carpinteria, CA, USA) foi utilizado como anticorpo secundário. A intensidade de marcação foi classificada numa escala categórica (ausente -, fraca ±, média +, forte ++). Nos componentes foliculares (oócito, cumulus oophorus e corona radiata, granulosa, teca interna e externa). No controlo negativo foi utilizado solução de bloqueio em vez do anticorpo primário.

RESULTADOS

- Os folículos primordiais apresentaram algumas células da granulosa marcadas (Figura 1). Esta observação foi mais frequente em gatas e poderá estar relacionada com o início do recrutamento folicular.
- As células da granulosa foram marcadas de forma diferente, consoante a fase do ciclo éstrico e a fase de desenvolvimento folicular (Figura 2). Além disso, observou-se uma alteração na marcação das células da corona radiata e cumulus oophorus, que apresentavam marcação fraca e em menor número de células (Figura 3).
- Os oócitos foram marcados em todas as fases foliculares em ambas as espécies. As células da teca interna e externa não apresentaram marcação em folículos pré-antrais, exibindo marcação fraca em folículos antrais.
- Em ambas as espécies, foi detetada marcação forte nas células do corpo lúteo, contudo, mais evidente no diestro.
- As diferenças de intensidade encontradas nas células da teca e da granulosa ao longo do desenvolvimento folicular foram mais evidentes nas cadelas do que nas gatas.

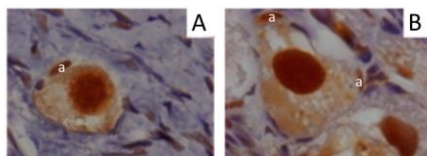


Figura 1 – Proliferação celular em folículos primordiais (PCNA). Na cadela (A) e na gata (B) com células da granulosa marcadas (a). Ampliação 100x

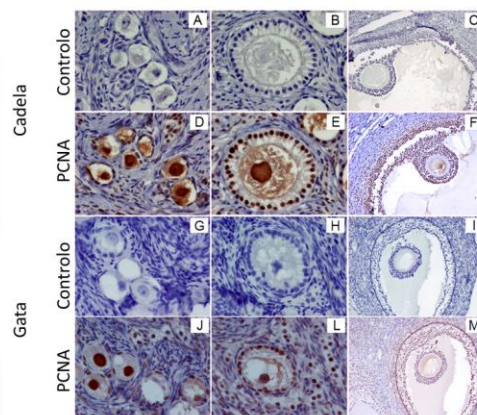


Figura 2 – Proliferação celular em folículos (PCNA). Folículos primordiais (A,D,G,I), primários (B,E,H,L) e antrais (C,F,J,M) na cadela e na gata durante o proestro. Imuno marcação positiva em castanho (D,E,F,I,L,M), controlos (A,B,C,G,H,J). (A,B,D,E,G,H,I,L ampliação 40x e C,F,I,M ampliação 10x)

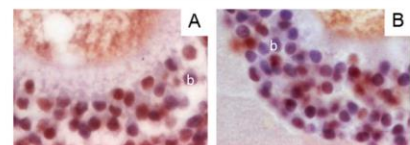


Figura 3 – Proliferação celular em folículos antrais (PCNA). Corona radiata com marcação fraca (b) na cadela (A) e na gata (B). Ampliação 40x

CONCLUSÃO

- Estes resultados, permitem concluir que a proliferação celular varia consoante o desenvolvimento folicular e a fase do ciclo éstrico tanto em cadelas como em gatas. Neste contexto, a regulação da proliferação celular no folículo poderá ser uma via terapêutica para o controlo da fertilidade (estimulação ou contraceção).

REFERÊNCIAS

1. Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*. 2006;66(1):5-13.
2. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 2001;122(6):829-838.
3. Smits JEI, Cortvrindt RG, Fujihara M, et al. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*. 2002;90(4):185-202.

XXII Encontro da Sociedade Portuguesa de Patologia Animal

FOLICULOGÉNESE DA CADELA E DA GATA AO LONGO DO CICLO ÉSTRICO

Cardoso, C.¹, Mateus, L.², Lopes-da-Costa, L.², Murta, D.^{1,2}

1. CBIOS, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal

2. Reprodução e Desenvolvimento, CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal



INTRODUÇÃO

- Ao longo do ciclo éstrico estão presentes folículos ovários em todas as fases de desenvolvimento, isto é em quiescência, crescimento e atresia¹. No entanto, cada espécie tem a sua própria escala temporal de desenvolvimento, envolvendo processos como a proliferação e diferenciação das células foliculares^{2,3}. Contudo, o conhecimento sobre os mecanismos que regulam o desenvolvimento folicular é ainda fragmentário, sendo fundamental para o desenvolvimento de novos métodos de controlo da fertilidade.
- Este estudo preliminar consistiu na avaliação da proliferação celular nos folículos ovários de cadelas e gatas e na sua relação com o recrutamento e desenvolvimento folicular ao longo das fases do ciclo éstrico (CE).

MATERIAL E MÉTODOS

- No decurso de ovariectomia electiva, foram recolhidos ovários de 19 cadelas e 16 gatas, os quais foram agrupados de acordo com a fase do CE, determinada através de citologia vaginal, concentração plasmática de progesterona e observação histológica dos ovários.
- Os ovários foram processados para imunohistoquímica e a proliferação celular nos folículos e corpos lúteos foi avaliada através do anticorpo coelho anti- *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) (ab18197, Abcam, Cambridge, UK) na concentração de 1/800, nas cadelas, e de 1/1200 nas gatas. O anticorpo conjugado com peroxidase cabra anti-coelho (410972, 1: 100; Dako, Carpinteria, CA, USA) foi utilizado como anticorpo secundário. A revelação foi feita com o cromogénio 3'-diaminobenzidine (DAB) (ImmPACT DAB, SK-4105, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).
- A intensidade de marcação foi classificada numa escala categórica (ausente -, fraca ±, média +, forte ++ nos componentes foliculares (oócito, *cumulus oophorus* e *corona radiata*, granulosa, teca interna e externa). No controlo negativo foi utilizado solução de bloqueio em vez do anticorpo primário.

RESULTADOS

- Em ambas as espécies, os ovários apresentam folículos primordiais com oócitos e células da granulosa com forte expressão de PCNA (Figura 1).
- Esta forte expressão de PCNA é idêntica nos folículos primários e secundários, não havendo diferenças entre espécies (Figura 2).
- A marcação do oócito está presente em todas as fases foliculares, diminuindo a sua expressão em folículos pre-antrais e antrais, mais evidente nas fases de diestro e anestro (Figura 3).
- Consoante a fase do CE, e a fase de desenvolvimento folicular, é possível observar marcação diferente nas células da granulosa, nomeadamente na marcação das células da *corona radiata* e *cumulus oophorus*, que apresentam marcação fraca e em menor número de células (Figura 3).
- Em ambas as espécies, foi detetada marcação forte nas células do corpo lúteo, mais evidente no diestro.

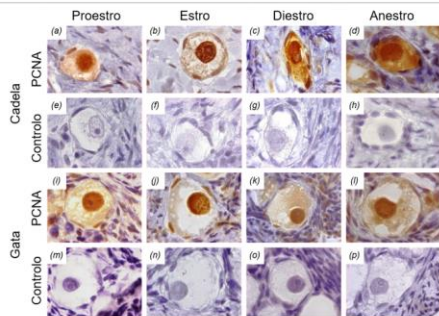


Figura 1. Padrões de expressão de PCNA em folículos primordiais em cadela e gata. Marcação positiva em castanho. Coloração com hematoxilina. Controlos negativos (e-h; m-p). Ampliação 1000x

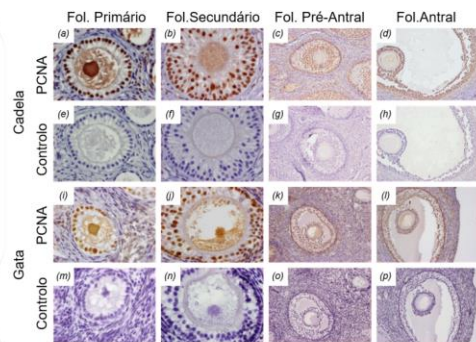


Figura 2. Padrões de expressão de PCNA durante a fase de proestro em cadela e gata. Coloração positiva em castanho. Coloração com hematoxilina. Controlos negativos (e-h; m-p) folículo primário (a,e,i,m) 400x, folículo secundário (b,f,j,n), pré-antral (c,g,k,o) e antral (d,h,l,p) Ampliação 100x

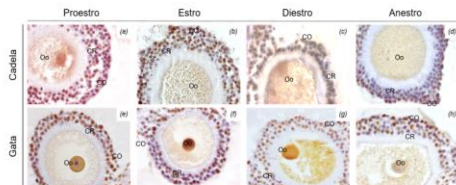


Figura 3. Detecção de PCNA em folículos antrais de cadela e gata durante as fases do ciclo éstrico. Marcação positiva em castanho. Coloração com hematoxilina. (Oo) oócitos; (Cr) Corona radiata; (Co) cumulus oophorus. Ampliação 400x

CONCLUSÃO

- Estes resultados, permitem concluir que a proliferação celular varia consoante o desenvolvimento folicular e a fase do ciclo éstrico tanto em cadelas como em gatas.
- Neste contexto, a regulação da proliferação celular no folículo poderá ser uma via terapêutica para o controlo da fertilidade (estimulação ou contraceção).

REFERÊNCIAS

1. Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*. 2006;66(1):5-13.
2. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 2001;122(6):829-838.
3. Smits JEJ, Cortvrindt RG, Fujihara M, et al. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*. 2002;90(4):185-202.

ABSTARCT PUBLISHED IN SPCV JOURNAL

Folliculogenesis in the bitch and queen throughout the estrous cycle

Carolina Cardoso¹, Luísa Mateus², Luís Lopes-da-Costa,² Daniel Murta^{1, 2}

1. CBIOS - Research Centre for Biosciences and Health Technologies, Faculty of Veterinary Medicine, Lusófona University of Humanities and Technologies, Lisbon, Portugal;
2. Reproduction and Development, CIISA, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Lisbon, Portugal; Email: danieljmcdmurta@gmail.com

This preliminary study consisted in the evaluation of cell proliferation in the ovarian follicles of bitches and queens and their relationship with recruitment and follicular development throughout the phases of the estrous cycle (EC).

In the course of elective ovariohysterectomy, ovaries were collected from 19 bitches and 16 female cats, which were grouped according to the EC phase, determined by vaginal cytology, progesterone plasma concentration and ovarian histological observation.

The ovaries were processed for immunohistochemistry and cell proliferation in follicles and corpus luteum was evaluated through the use of the rabbit anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) antibody (ab18197, Abcam) at the concentration of 1/800 in bitches and 1/1200 in queens. Goat anti-rabbit peroxidase conjugated antibody (410972, 1: 100; Dako) was used as the secondary antibody. The revelation was made with chromogen 3'-diaminobenzidine (DAB) (ImmPACT DAB, SK-4105, Vector Laboratories). In the negative control a blocking solution was used instead of the primary antibody.

Both species exhibit primordial follicles with oocytes and granulosa cells with strong expression of PCNA. This strong expression of PCNA is identical in primary and secondary follicles, with no differences between species. Oocyte marking is present in all follicular phases, decreasing its expression in preantral and antral follicles more evident in the diestrous and anoestrous phases. Depending on the EC phase and the follicular development stage, it is possible to observe different marking in the granulosa cells, mainly in *corona radiata* and *cumulus oophorus* cells staining, which have weaker staining and fewer cells. In both species, strong staining was detected in the cells of the corpus luteum, more evident in diestrus.

These results allow to conclude that cell proliferation varies according to the follicular development and the EC phase, both in bitches and in cats.