

**Fernando Vissani Fernandes**

**Avaliação da apoptose em tecido ovariano em gatas.**

**Araçatuba**

**2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de Araçatuba

**Avaliação da apoptose em tecido ovariano em gatas.**

Trabalho Científico, parte do  
Trabalho de Conclusão de Curso de  
Graduação apresentado à  
Faculdade de Medicina Veterinária  
da Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus  
de Araçatuba, para obtenção de  
grau de Médico Veterinário.

**Aluno: Fernando Vissani Fernandes**

**Supervisor: Prof.<sup>a</sup> Adjunto Marion Burkhardt de Koivisto**

**Araçatuba**

2014

## ENCAMINHAMENTO

Encaminhamos o presente Trabalho Científico, como parte do Trabalho de Conclusão de Curso, para que o Conselho de Estágios Curriculares tome as providências cabíveis.

---

**Fernando Vissani Fernandes**

---

**Prof.<sup>a</sup> Adj. Marion Burkhardt de Koivisto**

**ARAÇATUBA**

**Novembro de 2014**

## **Agradecimentos**

Acredito na teoria de que gratidão gera gratidão. Logo a minha primeira manifestação se direciona a Deus. Sem sua permissão parte alguma deste sonho teria chegado às minhas mãos. Sou o que sou e estou onde estou devido à Sua vontade.

Agradeço eternamente aos meus pais, José e Santa, que desde o primeiro momento apoiaram a minha decisão de ingressar nesta profissão e nesta instituição de nome Unesp, a qual me proporcionou os melhores momentos da minha vida. Sem eles, eu nem mesmo estaria aqui neste mundo, mas mais do que isso, eles abdicaram de tempo, dinheiro e outras mil prioridades para realizar o sonho de vida deste filho.

Agradeço a minha irmã Valquíria, que sempre me serviu de espelho e base de uma pessoa competente e dedicada, cheia de determinação, me inspirando a ser alguém de quem me orgulhar. Não deve ser esquecidas também as inúmeras vezes em que me ofereceu seu ombro amigo em situações onde me achei perdido e desconsolado pela dureza com a qual a vida nos trata.

Tem também minha eterna gratidão Luís Fernando, homem de fibra, companheiro e ouvinte, Dividiu comigo os momentos mais amargos destes anos, ouviu desabafos, me auxiliou quando mais precisei e se fez presente constantemente, estendendo sua mão cada vez que meus joelhos se dobraram diante das adversidades.

E jamais deixaria de mencionar o meu muito obrigado aos melhores amigos que alguém pode ter. Sem vocês,, Guilherme, Letícia, Débora, Giuliana, Bruno, Narian e Cadu, eu não sei se preservaria da forma como fiz, com o mesmo brilho nos olhos e esperança de dias melhores. Obrigado pela compreensão e pelos sorrisos que tivemos por todo este tempo. Ainda quero me lembrar inúmeras vezes de cada momento nosso.

Por fim, e não menos importante, quero agradecer a professora Marion que acreditou em mim, depositou sua confiança, puxou minhas orelhas, aconselhou constantemente e insistiu em que tudo daria certo. Que Deus a abençoe sempre.

**“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”**

## Sumário

1. RESUMO.....	7
2. INTRODUÇÃO.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4. RESULTADOS .....	18
5. DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÃO.....	23
7. REFERÊNCIAS.....	24

## 1. RESUMO

Há um crescente interesse nas técnicas reprodutivas, por agilizar a procriação de populações animais de interesse econômico, a preservação de espécies em extinção ou a utilização como modelo experimental em outras espécies. A reprodução de felinos em cativeiro é dificultada devido ao ambiente estranho, o que os leva a apresentarem alterações na própria fisiologia. Torna-se importante o estudo de fenômenos reprodutivos destes animais com a finalidade de melhor compreensão e, posteriormente, adaptação adequada das biotécnicas reprodutivas. A atuação da apoptose na fisiologia ovariana ainda não é bem compreendida, havendo a necessidade da comunidade científica elucidá-la melhor. O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de que os índices de apoptose no tecido ovariano são diferentes em gatas jovens, adultas e idosas. Foram utilizadas 18 gatas distribuídas em 3 grupos contendo 6 animais cada, de acordo com a idade (jovens, adultos e idosos). As amostras do tecido ovariano destinadas a avaliação de apoptose, foram submetidas ao método *terminal deoxynucleotidyltransferase-biotin nick end-labelling* (TUNEL). Os dados referentes aos diferentes grupos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey. Não houve diferença significativa quanto ao número de folículos e número de células positivas das gatas jovens, adultas e idosas, sendo  $P < 0,05$ . O resultado do trabalho sugere que o fenômeno da apoptose em tecido ovariano em gatas não possui relação com a faixa etária, ou seja, a apoptose ocorre de forma contínua nos folículos não-dominantes envolvidos em cada ciclo estral apresentado.

**Palavras-chave:** ovário, felinos, TUNEL.

## 2. INTRODUÇÃO

Pertencentes a família dos mamíferos, os felinos possuem hábitos alimentares carnívoros, predando outros mamíferos menores, como roedores, e aves. Habitam naturalmente a todos os continentes, com exceção da Antártida e da Oceania, como gatos doméstico até leões. Dotados de garras longas e poderosas que podem ficar expostas ou não, faz destes mamíferos grandes caçadores. Os sentidos de olfato, visão e audição aguçados são ferramentas essenciais na prática de predação, predominantemente noturna, e certamente a chave do sucesso para tal (FIOCRUZ, 2014).

Com o avanço da tecnologia agrícola e de edificações, inúmeros desmatamentos ocorrem constantemente no Brasil. Esta condição põe as espécies felinas de vida selvagem em situação de risco por serem extremamente sensíveis às alterações do seu habitat, deixando-as próximas, ou de fato, em extinção. A estratégia que os ambientalistas, biólogos, zootecnistas e médicos veterinários julgam mais viável é a de criação em cativeiros e a associação da utilização de biotécnicas de reprodução para preservação das espécies em risco (FIOCRUZ, 2014).

Há um crescente interesse nas técnicas reprodutivas de maneira geral, por agilizar a procriação de populações animais de interesse econômico, a preservação de espécies em extinção ou a utilização como modelo experimental em outras espécies (Mattos, 2001).

A reprodução de felinos em cativeiro é interferida por fatores que a tornam dificultosa. O ambiente diferente é o principal deles e faz com que o animal altere seu comportamento. Tais mudanças geram um desequilíbrio de ordem fisiológica no organismo do animal, afetando primeiramente o sistema reprodutor. Com tantos problemas, compreender o funcionamento destes fenômenos e adaptá-lo às biotécnicas é a grande ferramenta para a luta de preservação de espécies (Micheletti et al., 2012).

O sistema reprodutor feminino é composto por dois ovários, nos quais os gametas femininos (óvulos) são produzidos; tubas uterinas, responsáveis pelo transporte dos óvulos para que ocorra o encontro com os espermatozoides;



útero que tem como tarefa abrigar o embrião ao longo de seu desenvolvimento; vagina, estrutura do aparelho reprodutor feminino; vestíbulo vaginal, trata-se da parte final do trato genital, que culmina no óstio uretral externo; a vulva, representando o limite caudal; o clitóris, de formato alongado e erétil, possui origem embrionária semelhante à do pênis; e as glândulas mamárias, que se enquadram como parte do sistema tegumentar, mas possuem estreita relação com o sistema reprodutivo (ELLENPORT, 1986).

Ligados à cavidade abdominal pelo ligamento largo, o ovário, a tuba uterina e o útero estão conectados individualmente por mesovário, mesosalpinge e mesométrio, respectivamente. Quanto aos ovários, são estruturas ovaladas, com mensuração aproximada de 1,0 x 0,3 x 0,5cm, e pesando mais ou menos 220 mg, localizados caudalmente ao rim (JOHNSTON et al, 2001).

As tubas uterinas das gatas medem aproximadamente de 5 a 6 cm de comprimento com diâmetro de 1 a 1,5 mm, e são delicadamente curvadas (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

O útero é composto por dois cornos, cada qual com 9 a 11 cm de comprimento e 3 a 4 mm de diâmetro, do corpo do útero, medindo 3 cm de comprimento e de 4 a 8 mm de diâmetro e também da cérvix. A vagina possui comprimento de 20 a 30 mm, chegando a ser até duas vezes maior que o vestíbulo, que tem de 10 a 25 mm. As glândulas vestibulares, também chamadas de glândulas de Bartholin, medem aproximadamente 5 mm e estão situadas na face lateral do vestíbulo e têm como principal função a secreção de muco. O epitélio vulvar é pigmentado e sua parte externa é recoberta por pelos. O clitóris é uma das menores estruturas deste sistema, medindo não mais que 10 mm, o que o torna de difícil visualização ou mesmo localização (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

Segundo JOHNSTON et al. (2001), as gatas apresentam 4 pares de glândulas mamárias e cada glândula consiste de 4 a 8 ductos que desembocam na extremidade de cada teto.

O início do desenvolvimento ovariano em mamíferos ocorre a partir das células germinativas primordiais, oriundas do saco vitelínico, movendo-se até a gônada ainda em estágio embrionário. A célula germinativa primordial já presente na gônada, promove sua replicação tornando-se dominante neste

órgão. A partir deste ponto, deixa de realizar migrações e inicia o processo da gametogênese. A formação do oócito primário na gata doméstica tem início, aproximadamente aos 40 a 50 dias do desenvolvimento fetal e torna-se completo por volta de 8 dias após o nascimento. A organização tecidual característica do ovário, sendo composto por região cortical e medular primitiva, é concluída em cerca de 40 dias de desenvolvimento fetal (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006).

O folículo caracteriza-se por ser a unidade morfofuncional do ovário, abrangendo ações intrínseca e extrínsecas. Tem como constituição básica a presença de um oócito margeado por células somáticas (granulosas e tecais). A sua principal tarefa é fornecer condições ambientais ideais para o desenvolvimento e maturação do oócito (FIGUEIREDO et al., 1999).

Na fisiologia do aparelho reprodutor feminino dos felinos, a cada ciclo ocorre um fenômeno regulatório chamado atresia folicular. Este é caracterizado por regredir os folículos que não se tornaram dominantes e, por meio da apoptose, induzir sua eliminação de forma a não prejudicar o indivíduo. A atuação da apoptose em tecido ovariano ainda não está bem compreendida, havendo a necessidade da comunidade científica aprofundar seus estudos para elucidá-la melhor (FRANCO et al., 2010).

A atresia ou morte folicular é um fenômeno fisiológico que pode ocorrer por apoptose (IRELAND, 1987) ou por degeneração celular (SAUMANDE, 1991).

A fase atrésica de folículos humanos menores que 1 mm de diâmetro é iniciada pelo rompimento do oócito e seguida por retração das células da granulosa e hipertrofia das células da teca. Em grandes folículos o processo atrésico pode ser observado por meio da presença de corpos picnóticos (material nuclear condensado), fazendo inferência ao estágio em que a atresia se encontra. A fase final da atresia folicular é representada pela entrada de fibroblastos na cavidade folicular e conseqüente reorganização do tecido intersticial. Já nesse estágio final da atresia folicular, as únicas estruturas passíveis de visualização são o oócito degenerado e a zona pelúcida (GOUGEON & LEFEVRE, 1983).

A idade da gata, o seu ciclo reprodutivo, características gestacionais, o período de lactação, intervenções como hipofisectomia e ovariectomia

unilateral, ambiente hormonal, nutrição e isquemia do ovário são fatores que influenciam drasticamente o processo de atresia folicular (IRELAND ,1987). Mesmo sabendo que alguns vírus, possuem habilidade de hospedar e causar danos em células da granulosa *in vitro*, a influência de agentes infecciosos em relação a atresia ainda não está bem esclarecida (LAMARA et al., 2001).

Em meados de 1972 a apoptose foi descoberta, e por sua forma um tanto quanto singular, recebeu nome derivado do termo grego “caia fora”. Classificada como um dos tipos de morte celular tendo ação destinada a retirar células indesejáveis do hospedeiro por meio da ativação de manobras gênicas sequenciais, organizadas e programadas pelo próprio organismo. Possui ocorrência comum em casos como: (1) o desenvolvimento; (2) como mecanismo homeostático para manutenção das populações celulares nos tecidos; (3) como mecanismo de defesa; (4) em caso de lesão celular; e (5) no envelhecimento (Robbins et al, 1999).

O fenômeno celular da apoptose caracteriza-se por um processo de ordem ativa que ocorre em resposta a uma variedade de estímulos fisiológicos ou patológicos, nos quais por meio de atos pré-estabelecidos, a célula executa a sua própria remoção. Todo este processo é ordenado por eventos gênicos e visa a retirada de células danificadas, que expressam alterações do padrão em seu genótipo. Prevenindo, desta forma, que esta mesma informação gênica, produzida erroneamente, seja repassada. A apoptose diferencia-se das outras formas de morte celular, privando o tecido de resposta inflamatória (KERR et al., 1972).

Mais precisamente, o que ocorre é um reconhecimento por parte das células fagocíticas, como os macrófagos, de alterações da conformação externa na bicamada lipídica, como modificações em sua simetria ou a exposição da fosfatidilserina condenando-a como célula apoptótica (HOORNAERT et al., 1997). A apoptose pode ocorrer também por modificações nos carboidratos da superfície celular, que seriam reconhecidos a partir de moléculas similares à lectinas, presentes na superfície externa dos macrófagos (DUVALL et al., 1985).

A caspase-3 ativa endonucleases endógenas responsáveis pela fragmentação do DNA (Thornberry e Lazebnik, 1998) e foi detectada por meio de sua expressão em células da granulosa de folículos atrésicos de suínos

(Berardinelli et al., 2004). As células da granulosa de folículos saudáveis são compostas na maior parte pela forma inativa (não processada) de caspase-3, enquanto, que as células da granulosa provenientes de folículos atresícos apresentam aumento das concentrações da forma ativada da caspase-3 (Johnson e Bridgham, 2002).

A reação do método de TUNEL foi observada com maior frequência na granulosa e teca de folículos em processo de atresia progressiva (Isobe e Yoshimura, 2000). Portanto, a presença de células positivas para o método na granulosa ou camada da teca foi considerada como indicador de folículo em atresia (Feranil, 2005).

A apoptose ocorre nas células da granulosa de rato quando postas em cultura, e pode ser evitada pela adição de determinados fatores de crescimento específicos (Tilly et al., 1993).

O intuito deste trabalho foi demonstrar a relação entre a ocorrência da apoptose em gatas de diferentes faixas etárias e correlacionar os eventos, a fim de demonstrar se a idade influencia no processo de apoptose dos folículos ovarianos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram selecionadas 18 gatas, sem raça definida, sem quaisquer alterações notadas aos exames físico e clínico, não prenhes, ausentes de complicações reprodutivas. Os animais inclusos no experimento foram provenientes do setor de Obstetrícia Veterinária, do Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, campus de Araçatuba – Unesp.

#### 3.2 Seleção dos animais

Os animais foram agrupados de acordo com a idade e distribuídos em três grupos, sendo: Grupo 1- jovens (0-12 meses), com 6 animais, Grupo 2- adultas (1-6 anos), com 6 animais e Grupo 3- idosas (> 6 anos), com 6 animais. A faixa etária foi estimada por meio da análise da arcada dentária (ISHIZAKI et al, 2006).

**Tabela 1.** Grupos experimentais determinados pela idade (anos) das gatas, média, erro padrão da média e idade máxima e mínima dos animais para morfometria.

Grupo	n° animais	Idade (anos)		
		Média	Mínima	Máxima
<b>Jovens (G1)</b>	6	0,78±0,1	0,4	1
<b>Adultas (G2)</b>	6	2,81±0,5	1,4	5
<b>Idosas (G3)</b>	6	8,00±0,9	6	11

#### 3.3 Citologia vaginal e dosagem hormonal

A realização de citologia vaginal teve finalidade de caracterizar a fase do ciclo estral em que estes animais se encontravam, seguido de dosagem hormonal como teste confirmatório (P4).

Os dois métodos de avaliação reprodutiva foram executados ao longo do procedimento de ovariosalpingo-histerectomia (OSH), com os animais monitorados e anestesiados de acordo com o protocolo proposto pelo Projeto de Esterilização de Cães e Gatos (PROEX) da Unesp, campus de Araçatuba

A colheita de material destinado à citologia vaginal foi realizada através do uso de “swab” vaginal estéril previamente embebido em solução fisiológica. Com o material obtido deste procedimento foi realizado o esfregaço em lâminas e, por fim, corado com panótico rápido e analisado por microscopia de luz (Olympus BX61).

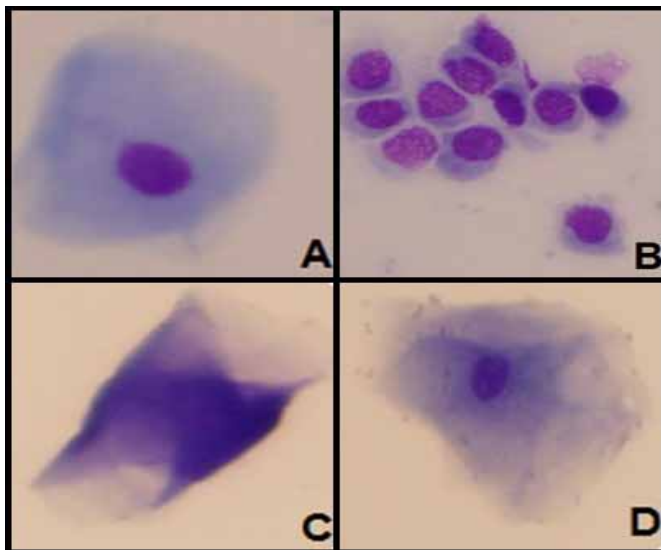
Os cortes histológicos foram avaliados de acordo com a porcentagem e morfologia das células do epitélio vaginal (TONIOLLO et al, 1995). Foi avaliado um total de 100 células por lâmina em aumentos de (100X, 200X e 400X). As células observadas foram: superficiais nucleadas, superficiais anucleadas, intermediárias e parabasais. De acordo com os resultados da citologia as gatas foram classificadas em dois grupos: não-estro e estro.

A dosagem hormonal foi realizada no Laboratório de Endocrinologia da UNESP, campus de Araçatuba pelo teste “Coat-A-Count progesterone”. A progesterona Coat-A-Count é um radioimunoensaio de fase sólida marcado com I125 designado para a dosagem quantitativa direta da progesterona em soro ou plasma.

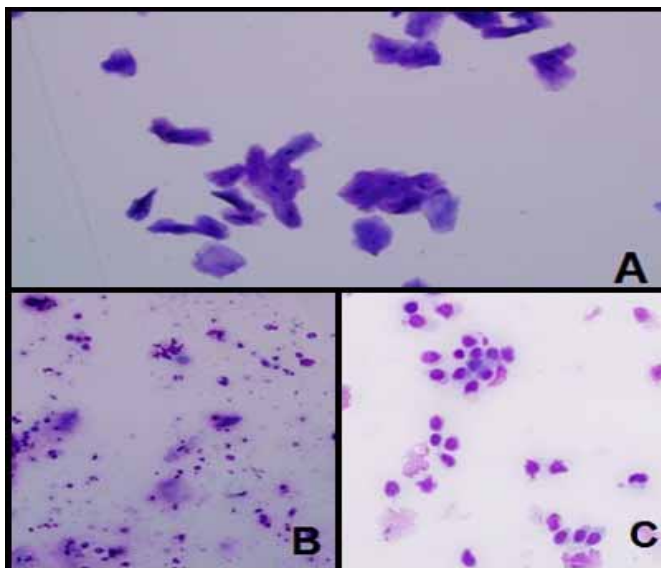
O procedimento de colheita do sangue foi executado por punção venosa ainda no transoperatório. As amostras de  $\pm 3$  mL foram submetidas à centrifugação e depois armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$ . No momento da execução do teste de dosagem, o material ficou exposto a temperatura ambiente ( $15-28^{\circ}\text{C}$ ) e foi levemente agitado. Os tubos lisos de polipropileno, os com anticorpos de anti-progesterona e os revestidos adicionais para os controles, foram rotulados em duplicata. Posteriormente os calibradores, os controles e as amostras dos animais foram pipetados nos tubos pré-preparados. Foi adicionada progesterona nos tubos e misturados em vórtex. As amostras foram incubadas por um período de 3 horas em temperatura ambiente ( $15-28^{\circ}\text{C}$ ), sofreram decantação vigorosamente e contadas por contador gama durante 1 minuto.

De acordo com as concentrações hormonais de progesterona (P4) (JOHNSTON et al, 2001) (Anexo 2) e por meio da citologia vaginal

(TONIOLLO et al, 1995), os animais arrolados neste experimento foram classificados no período de não-estro.



**Figura1.** Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 de células do epitélio vaginal observadas na citologia vaginal de gatas domésticas. (A) Célula intermediária, aumento de 400X, (B) células parabasais, aumento 200X, (C) célula superficial anucleada, aumento de 400X e (D) célula superficial nucleada, aumento de 400X.



**Figura 2.** Fotomicrografias capturadas em microscópio Olympus BX61 da citologia vaginal de gatas domésticas classificadas em fases do ciclo estral. (A) estro, aumento de 200X, (B e C) não-estro, sendo (B) diestro, aumento de 100X e (C) anestro, aumento de 200X.

### 3.4 TUNEL

As amostras do tecido ovariano destinadas à avaliação de apoptose, foram fixadas em formalina tamponada 10% e processadas para inclusão em parafina, segundo procedimento padrão. As células em apoptose foram detectadas pelo método *terminal deoxynucleotidyltransferase-biotin nick end-labelling* (TUNEL), com o Kit comercial para a detecção da apoptose *in situ* (FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Colorimetric – TdT Enzyme, Calbiochem, Germany).

A técnica de coloração do TUNEL detecta a fragmentação da fita de DNA que surge em consequência da apoptose. Secções de 5µm montadas em lâminas sinalizadas foram desparafinizadas e lavadas em TBS (tris- buffered saline). Os cortes foram tratados com Proteinase K por 8 minutos e lavados novamente em TBS. Após a lavagem, a peroxidase endógena foi inativada utilizando o peróxido de hidrogênio a 9% e então lavadas em TBS e incubadas em solução tampão de equilíbrio por 20 minutos em temperatura ambiente.

Posteriormente, as secções foram incubadas com a enzima TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) à 37°C por 1 hora e meia em câmara úmida. A reação foi interrompida e as secções incubadas com anticorpo conjugado em câmara úmida por 1 hora. Após a lavagem com TBS, a reação foi detectada utilizando o DAB (diaminobenzidine) por 30 minutos. As secções foram contracoloradas com Methylgreen por 10 minutos.

As imagens foram digitalizadas pelo software Image-Proplus 7.0, e obtidas através da câmara [Q Color 5 Olympus America, Canada], acoplada a microscópio da marca Olympus e modelo BX43. **As células foram consideradas positivas quando a marcação de TUNEL estivesse presente.**

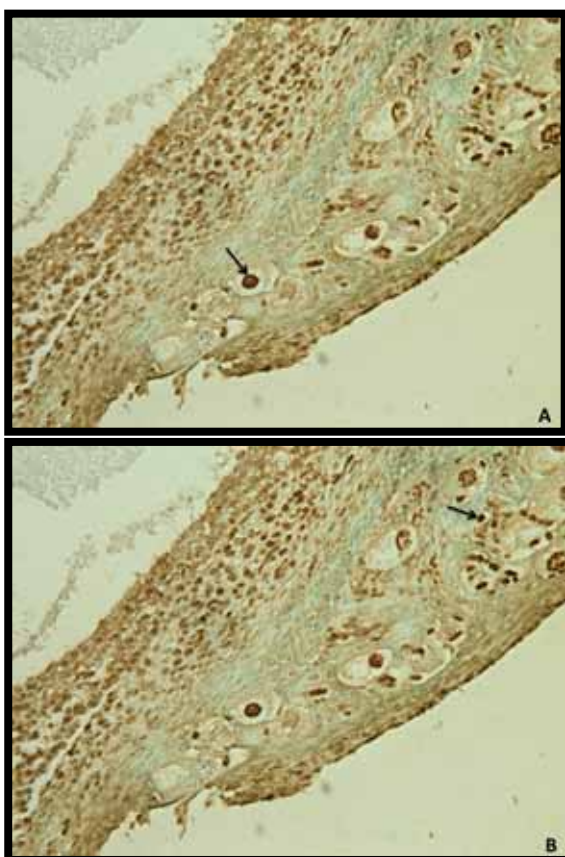


### **3.5 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância para comparar os grupos, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias, pré-requisitos necessários para a análise de variância. A análise estatística das variáveis que não apresentaram distribuição normal, foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. O coeficiente de correlação ( $r$ ), de determinação ( $r^2$ ) e a equação da regressão foram calculados para as variáveis selecionadas (ZAR, 1999). Os valores considerados significativos apresentaram diferença quando  $P < 0,05$ . A análise estatística foi realizada utilizando o programa "GraphPad InStat version 3.10".

#### 4. RESULTADOS

Ao todo foram 1975 folículos histologicamente preparados e avaliados quanto aos índices de apoptose no tecido ovariano utilizando a coloração de túnel. Sendo 1664 folículos primordiais (P), 120 primários unilaminares (PU), 134 primários multilaminares (PM), 41 secundários (SE) e 16 pré-ovulatórios (PO). A figura abaixo demonstra as marcações positivas para apoptose em diferentes classes de folículos e grupos de idade. Foram identificadas marcações positivas para o Tunel nos oócitos e nas células da pré-granulosa em folículos primordiais, já nas demais classes de folículos foram encontradas nas células da granulosa e nas células da teca. E somente nas gatas idosas foram identificadas marcações positivas para apoptose em núcleos de folículos primordiais.



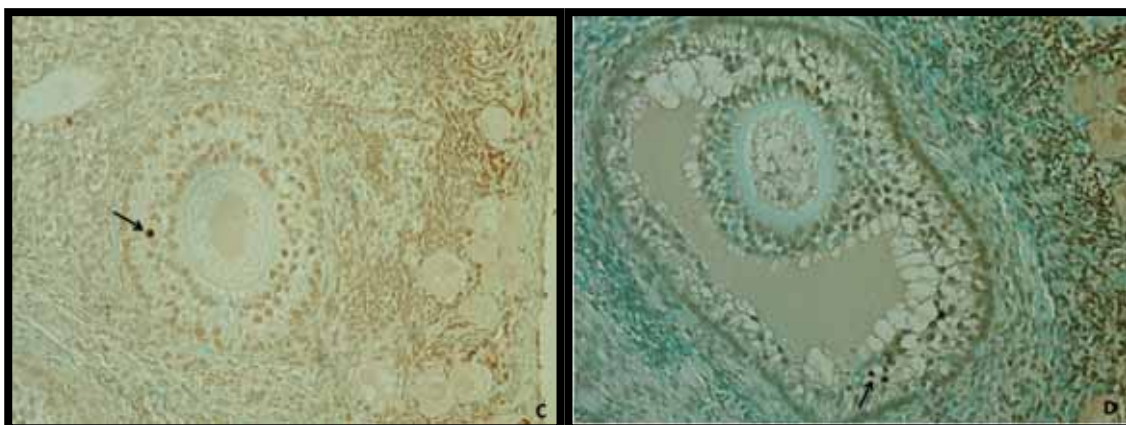


Figura 15. Fotomicrografias observadas em microscópio Olympus BX43 com aumento de 200X, de cortes longitudinais de ovário de gata doméstica, onde se observaram células positivas para o túnel em folículos primordiais em gata idosa (oócito- A e células da pré-granulosa-B), em folículos primários multilaminares em gata jovem (células da granulosa-C) e folículos secundários ou antrais em gata jovem (células da granulosa-D).

Os dados referentes aos diferentes grupos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey. Não houve diferença significativa quanto ao número de folículos e número de células positivas das gatas jovens, adultas e idosas, sendo o  $P < 0,05$  (Tabela 1).

**Tabela 2.** Valores médios ( $\bar{x}$ ), erro padrão da média (SEM) e mediana (Md) do número de folículos e número de células positivas para o túnel de folículos primordiais (P,  $n= 1664$ ), primários unilaminares (PU,  $n= 120$ ), primários multilaminares (PM,  $n= 134$ ), secundários (SE,  $n= 41$ ) e pré-ovulatórios (PO,  $n= 16$ ), de gatas classificadas em grupos de acordo com a faixa etária, Grupo 1 (4-12 meses), Grupo 2 (>1-6 anos) e Grupo 3 (> de 6 anos).

Estrutura	Classificação	G1 (Jovens)		G2 (Adultas)		G3 (Idosas)	
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Md	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Md	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Md
Nº de Folículos	P	100,17±12,4 4	95	89,5±16,48	95,5	87,66±11,52	87
	PU	8,66±1,38	8,0	5,33±1,97	3,0	6,00±2,04	4,5
	PM	1,32±0,54	7,0	3,86±1,57	8,5	5,92±2,41	7,0

	<b>SE</b>	2,66±0,49	2,5	2,16±0,30	2,0	2,00±0,57	2,0
	<b>PO</b>	0,83±0,30	1,0	1,33±0,33	1,0	0,50±0,34	0,0
	<b>P</b>	2,00±1,26	0,0	0,00±0,00	0,0	5,16±3,68	1,0
<b>Nº de células positivas</b>	<b>PU</b>	2,16±1,64	0,0	0,00±0,00	0,0	0,33±0,33	0,0
	<b>PM</b>	4,00±2,11	2,0	0,66±0,66	0,0	0,66±0,42	0,0
	<b>SE</b>	2,83±1,81	0,5	2,16±0,47	2,0	1,16±1,16	0,0
	<b>PO</b>	4,16±2,56	1,5	13,16±5,88	8,5	2,50±1,58	0,0

## 5. DISCUSSÃO

O processo de atresia folicular é caracterizado pela ocorrência de apoptose. A apoptose é um mecanismo de morte celular programada que o organismo inicia com intuito de eliminar células sem que hajam danos no processo. (Robbins et al., 1999)

A técnica de coloração de TUNEL é amplamente utilizada para detecção de fragmentação de DNA, fator indicativo de apoptose. Há muito a técnica é bem sucedida. White et al. (1994) demonstraram o uso do método de TUNEL com sucesso em moscas do gênero *Drosophila*, investigando ações de genes que induzem a apoptose. O método de coloração de TUNEL indicou a presença de DNA fragmentado, permitindo a detecção da expressão gênica ocorrida nestas amostras positivas.

Juriscova et al. (1996) diferiram células que estavam em apoptose em embriões humanos fragmentados usando o estado de condensação da cromatina e a fragmentação do DNA confirmada pelo TUNEL como indicadores.

Labat-Moleur et al. (1998), alertaram quanto a sensibilidade e especificidade do método de coloração de TUNEL em relação aos resultados obtidos em seu trabalho e recomendam a necessidade de fixação do tecido avaliado e o pré-tratamento com proteinase K e o uso de micro-ondas a fim de assegurar precisão nos resultados. Hurst et al. (2006) indicam tratamento com proteinase K como uma das medidas que mais asseguram a especificidade e sensibilidade da técnica, tal como foi utilizado neste experimento.

No entanto, o mesmo grupo relata que em seu estudo o uso de paraformaldeído preparado às vésperas da fixação das amostras, a incorporação de dUTP para a fluorescência e tratamento dos solventes com dietilpírocarbonato para redução da atividade de nuclease são também fundamentais para o sucesso da técnica. Segundo Hurst et al. (2006), todos estes fatores corroboraram para que houvesse alta sensibilidade e eliminação de marcações não-específicas, como células do estroma e núcleos vasculares que foram positivas para o TUNEL em experimentos anteriores, obtendo resultado indesejável .

No tecido ovariano, a apoptose ocorre de forma cíclica a cada período estral. De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, o método de TUNEL se mostrou eficiente marcando em folículos primordiais nos oócitos e células da pré-granulosa em gata idosa e em folículos primários multilaminares e folículos secundários ou antrais nas células da granulosa em gata jovem, Estes resultados conferem com os trabalhos de Gungeon (1996) e Hussein (2005), onde esta metodologia foi usada com a finalidade de indicar processo de apoptose.

Gungeon (1996) e Hussein (2005), também descrevem a ocorrência de apoptose, em primatas e humanos, respectivamente, principalmente em folículos antrais com morfologia bem definida, como a presença de núcleos picnóticos.

No entanto, os resultados obtidos por Depalo et al. (2003) não demonstram marcação pelo TUNEL em folículos antrais. O estudo sugere que a ocorrência de apoptose se torna mais susceptível em folículos primordiais e primários devido a sua independência a alterações hormonais no meio.

O presente estudo objetivou-se a demonstrar a relação entre a frequência do fenômeno da apoptose no ovário de acordo com a idade da gata.

A cada ciclo estral, os folículos não dominantes regridem e se tornam atresícos, até que sejam eliminados. Logo, o número de folículos no ovário da gata torna-se reduzido ao longo do tempo, gerando menor número de folículos que chegam a maturidade.

A oferta de folículos maduros é que rege a fertilidade do animal. Se ao longo do tempo, a fêmea deixa de possuir tantos folículos por ciclo, proporcionalmente, também serão menores os folículos dominantes e os não-dominantes, e por sua vez, menores também seriam os processos de apoptose.

Fujino et al. (1996) constataram em seus estudos, que o número de oócitos ovulados em camundongos idosos foram significativamente menor que em camundongos jovens, bem como sua taxa de fertilização, diferente do nosso estudo onde o número de folículos não difere entre as diferentes faixas etárias..

No entanto, Wu et al. (2000) afirmam que as taxas de maturação de ovócitos eram maiores entre mulheres com idades entre 21 a 30 anos, consideradas jovens e as mais baixas no grupo etário de 41 a 50 anos, consideradas idosas. O mesmo grupo de pesquisadores evidenciou que a taxa de apoptose de oócitos imaturos humanos cultivados *in vitro* foi significativamente maior no grupo de mulheres mais velhas, de 41 a 50 anos do que nas mulheres de 21 a 40 anos de idade (grupo de jovens). No presente estudo que testou hipótese de ocorrência de apoptose variável em faixas etárias distintas não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

. Ou seja, não houve maior ou menor ocorrência de apoptose em gatas idosas, adultas ou jovens. como também não houve diferença significativa entre os três grupos quanto ao número de folículos.

## 6. CONCLUSÃO

O resultado do trabalho sugere que o fenômeno da apoptose em tecido ovariano em gatas não possui relação com a faixa etária, ou seja, a apoptose ocorre de forma contínua e proporcional ao número de folículos não-dominantes envolvidos em cada ciclo estral apresentado.

## 7. REFERÊNCIAS

- BEARDEN, H. J. & FUQUAY, J. W. Applied Animal Reproduction. 4<sup>a</sup> ed. Prentice Hall. 351p. 1997.
- BERARDINELLI, P.; MARTELLI, A.; RUSSO, V.; NARDINOCCHI, D.; TURRIANI, M.; BARBONI, B.; MATTIOLI, M.; SCAPOLO, P.A.; CLAVENZANI, P.; Correlation between VEGF production and blood vessels density in steroidogenic activated pig antral follicles. **Italian Journal of Anatomy and Embryol**, v.107, n.3, 115–126, 2002
- BEZERRA, M. B., RONDINA, D., OLIVEIRA, L. C., LIMA, A. K. F., CECCHI, R., LUCCI, C. M., GIOGERTTI, A., FIGUEIREDO, J. R. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese na fase pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**, v. 8 p. 47-56, 1998.
- BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 5-13, 2006.
- CORTVRINDT, R; SMITZ, J. E. J. In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. *Reproduction Domestic Animals*. v. 36, p. 3-9, 2001.
- DEPALO, R.; NAPPI, L.; LOVERRO, G.; BETTOCCHI, S.; CARUSO, M. L.; VALENTINI, A. M.; SELVAGGI, L. Evidence of poptosis in human primordial and primary follicles. *Human Reproduction*. v. 18. n. 12. p. 2678-2682, 2003.
- domésticos. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 139, 1986
- DUVALL, E.; WYLLIE, A. H.; MORRIS, R. G. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* v. 56, p. 351-358, 1985.
- ELLENPORT, C. R. Aparelho urogenital geral. In: GETTY, R. Anatomia dos animais
- ETTINGER, S. J.; FELDMAN. E. C. Reprodução em felinos. In. ETTINGER, S.J; FELDMAN, E. C. Tratado de medicina interna de pequenos animais: doenças do cão e do gato. 5. ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2. p.1671-1672.



- FERANIL, J. B.; ISOBE, N.; NAKAO, T. Apoptosis in the Antral Follicles of Swamp Buffalo and Cattle Ovary: TUNEL and Caspase-3. **Histochemistry. Reproduction in Domestic Animals**. [v. 40, n. 2](#), 111–116, 2005.
- FIGUEIREDO, J. R.; AMORIM C.A.; LUCCI, C.M.; GONÇALVES, P.B.D. Isolation and in vitro culture of ruminant preantral follicles. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v. 27, p. 11-31, 1999.
- FIOCRUZ. Felinos. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, [200?]. Disponível em: <  
<http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/infantil/felinos.htm> >. Acesso em: 28 fev. 2014.
- FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; BRITO, T.; BACCHI, C. E.; ALMEIDA, P. C. A Célula Normal e Fundamentos sobre morte celular. In: \_\_\_\_\_. *Patologia Processos Gerais*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 16-17, 47.
- Gougeon A (1996) Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17,121–155.
- GOUGEON, A.; LEFREVE, B. Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 69, n. 2, p. 497-502, 1983.

GRAPHPAD INSTAT VERSION 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego California USA. Disponível em: [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Acesso em: 01 mar. 2013.

- HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*, 6a ed, São Paulo, Manole, 582p. 1995
- HIRSHFIELD, A.N. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biol. Reprod.* v. 38, p. 1181-1188, 1988.
- HOORNAERT, S.; HANON, J.; LYAKU, J.; PASTORET, P. P. The Use of Annexin for Concomitant Detection of Apoptosis and Cellular Phenotype. *Biochemica* v. 3, p. 19-20, 1997.
- Hussein MR (2005) Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum*
- IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. *Journal of Reproduction and Fertility* v. 24, p. 39-54, 1987.
- ISHIZAKI, M. N.; NASCIMENTP, A. A.; KANETO, C. N.; MONTANO, T. R. P.; PERRI, S. H. V.; VASCONCELOS, R. O.; BRESCIANI, K. D. S. Frequência e Intensidade parasitária de Helmintos gastrintestinais em

- felinos da zona urbana do município de Araçatuba-Sp. *ARS Veterinária*, v. 22, p. 212-216, 2006.
- Ji Wu, M.D., PhD., Lizhu Zhang, M.D., Xiuyun Wang, M.D. Maturation and apoptosis of human oocytes in vitro are age-related. *Fertility and Sterility* vol. 74, 6, 1137-1141, December 2000;
  - JOHNSON, A. L.; BRIDGHAM, J. T. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction*, v. 124, n. 1, p. 19-27, 2002.
  - JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Canine and feline theriogenology. 1 ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p.19-104.
  - Jurisicova, A , Varmuza, S., Casper, R F (1996) Programmed cell death and human embryo fragmentation. *MoL Hum. Reprod*, 2, 93-98
  - KERR, J. R. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. v. 26, p. 239- 257, 1972.
  - Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E and Negoescu A (1998) TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem* 46,327–334.
  - LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of caprine arthritis–encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Research*, v.79, p. 165–172, 2001.
  - Mattos, L.M. Biotecnologias em reprodução assistida na preservação de animais silvestres em extinção. UNICEUB, Tese, 2011.
  - MICHELETTI, T.; CUBAS, Z. S.; MORAES, W.; OLIVEIRA, M. J.; MOREIRA, N. Reprodução natural de felídeos selvagens em cativeiro: dificuldades e orientações. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.36, n.1, p.39-43, 2012
  - Peter R.Hurst<sup>1</sup>, Jocelyn M.Mora and Mark A.Fenwick. Caspase-3, TUNEL and ultrastructural studies of small follicles in adult human ovarian biopsies. *Human Reproduction* Vol.21, No.8 pp. 1974–1980, 2006  
Reprod Update 11,162–178.
  - ROBBINS, S. L.; COLLINS, T.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. M. D.  
**Patologia Estrutural e Funcional**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004
  - RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomic* v. 24, p. 77-92, 1983.

- SAUMANDE, J. La folliculogenèse chez les ruminants. **Recueil Médecine Vétérinaire**. v. 167, p. 205-218, 1991.
- THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science*, v.281, n. 5381, 1312–1317, 1998
- TILLY, J.L; BILLIG, H.; KOWALSKI, K. I.; HSUEH, A.J.W.; Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Molecular Endocrinology*, 1992, v.6 , 1942-1950.
- TONIOLLO, G. H.; CURY, S. R.; VICENTE, W. R. R.; CAMACHO, A. A.; GARCIA, J. M.; VANTINI, R. Colpocitologia do ciclo estral em gatas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v. 32, n. 2, p. 125-9, 1995.
- VAN DEN HUCK, R., BEVERS, M. M., BECKERS, J. F. In vivo and in vitro development of preantrais follicles. *Theriogenology* v. 47, p. 73-82, 1997.
- White, K., Grether, M.E., Abrams, J M et al (1994) Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science*, 246, 677-683
- Y.Fujino<sup>1-3</sup>, K.Ozaki<sup>1</sup>, S.Yamamasu<sup>1</sup>, EJto<sup>1</sup>, I.Matsuoka<sup>1</sup>, E.Hayashi<sup>1</sup>, H.Nakamura\ S.Ogita<sup>1</sup>, E.Sato<sup>2</sup> and MJnoue<sup>2</sup> . DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Human Reproduction* vol 11 no 7 pp.1480-1483, 1996
- ZAR, J. H. Biostatistical analysis. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 930p.