

MANUELLA CARVALHO DA COSTA

**CICLO ESTRAL, HISTOMORFOMETRIA OVARIANA E UTERINA DE
CAMUNDONGAS APÓS TRATAMENTO PROLONGADO COM ACETATO
DE MEDROXIPROGESTERONA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular
e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor
Scientiae*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

MANUELLA CARVALHO DA COSTA

**CICLO ESTRAL, HISTOMORFOMETRIA OVARIANA E UTERINA DE
CAMUNDONGAS APÓS TRATAMENTO PROLONGADO COM ACETATO
DE MEDROXIPROGESTERONA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 22 de julho de 2010.

Profa. Mariana Machado Neves

Profa. Sirlene Souza Rodrigues Sartori

Profa. Fabrícia Portes Cury Lima

Profa. Luciane Cristina de Oliveira Lisboa

Profa. Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado

“A árvore nascente aguarda-te
a bondade e a tolerância para que te
possa ofertar os próprios frutos em
tempo certo”.

Chico Xavier

Dedico esta conquista aos meus queridos pais, Manoel Quaresma da Costa (*in memoriam*), que muito contribuiu para a minha formação profissional, e Edna Marques de Carvalho da Costa, que tem me ajudado a superar os momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que traçou meus caminhos até aqui.

A meu pai por todo amor, humildade e respeito, por ser sempre para mim um exemplo a ser seguido. Você sempre estará em meu coração. A minha mãe por todo amor e confiança, meu maior exemplo de força, perseverança e caráter. A minha irmã Mariana pela amizade e cumplicidade, e que ao abrir mão da nossa convivência diária, me incentivou a seguir meu próprio caminho. A tia Ray pela amizade e torcida. Obrigada por tudo, amo muito vocês !!!

À professora orientadora Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado, pela paciência, compreensão, amizade, e oportunidade de amadurecimento científico e pessoal, e pela oportunidade a mim concedida, muito obrigada!

Ao professor Sérgio Luiz Pinto da Matta, pela acolhida no laboratório, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

Ao professor Tarcízio Antônio Rego de Paula pela co-orientação e pelos valiosos ensinamentos em morfometria.

Ao professor Marcelo José Vilela (*in memoriam*) pelas oportunidades e lições ensinadas.

À Mariana e Raphael, dois grandes amigos e colaboradores que caminharam e sofreram comigo durante os experimentos. Sem vocês teria sido impossível.

Ao laboratório de Biologia Estrutural, em especial aos professores Clóvis Andrade Neves, Adilson Ariza Zacaro e José Lino Neto e ao técnico Alex pela receptividade e disponibilidade em sempre ajudar.

Ao querido Bruno por todo amor, carinho e companheirismo, e pelo apoio principalmente na reta final do doutorado.

Às minhas amigas de república Lari, Lare, Thathá e Fê pelo carinho, convivência diária e apoio nos momentos difíceis.

Às grandes amigas Paloma, Val, Mônica, Claudinha, Drê e Bruna pela convivência em Viçosa e pelos inesquecíveis momentos de amizade.

Às amigas e irmãs de coração Wal e Karla que mesmo de longe torceram pela minha vitória. Obrigada pela amizade incondicional!

Aos amigos do curso de Pós-Graduação pela amizade, apoio e companheirismo, em especial à Reggis, Claudinha, Fernandinho, Dani, Marli, Maytê e Kenner.

À professora Sílvia das Graças Pompolo, ao laboratório de Anatomia Vegetal, ao laboratório de Nutrição Experimental e ao Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV pela disponibilidade em ceder seu laboratório, seus materiais e os animais utilizados neste estudo.

Às professoras Sirlene Sartori, Mariana Neves, Luciane Lisboa e Fabrízia Lima pela colaboração nas correções dessa tese e disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários (as) do Departamento de Biologia Geral, em especial a Diana e Beth, pela presteza no cumprimento de suas atividades.

À Universidade Federal de Viçosa pelo acolhimento. Além da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido, através da bolsa de estudos.

Aos animais que possibilitaram a realização desse estudo e que são a razão da minha profissão.

Enfim, agradeço a todos aqueles que um dia esboçaram qualquer incentivo, uma palavra amiga e que torceram por mim, o meu “ Muito obrigada”. Essa vitória não teria acontecido sem vocês !!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Progestágenos.....	2
2. Ciclo estral.....	3
II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
ARTIGO 1- Foliculogênese e folículos multiovocitários.....	10
Resumo.....	10
Introdução.....	10
Estágios do desenvolvimento folicular.....	12
Formação dos folículos primordiais.....	14
Inibinas, ativinas e folistatinas.....	15
FSH, estrógeno, inibina/ativina, e MOFs.....	18
Um mecanismo hipotético para a formação de MOFs.....	19
Considerações finais.....	20
Referências bibliográficas.....	20
ARTIGO 2- Histomorfometria ovariana de camundongas após tratamento prolongado com acetato de medroxiprogesterona.....	25
RESUMO.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1. Animais e grupos experimentais.....	27
2.2. Colheita dos órgãos.....	27
2.3. Processamento histológico.....	28
2.4. Análise morfométrica.....	28

2.4.1. Frequência absoluta de folículos ovarianos.....	28
2.4.2. Diâmetro de folículos.....	29
2.4.3. Proporção volumétrica dos componentes ovarianos.....	30
2.4.4. Volume do ovário.....	31
2.4.5. Análise estatística.....	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1. Índices biométricos.....	31
3.2. Análise morfométrica.....	32
3.2.1. Frequência absoluta de folículos ovarianos.....	32
3.2.2. Diâmetro dos folículos e ovócitos.....	36
3.2.3. Proporção volumétrica dos componentes ovarianos.....	38
4. CONCLUSÕES.....	40
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ARTIGO 3- Influência do acetato de medroxiprogesterona sobre o ciclo estral e a histomorfometria uterina de camundongas.....	44
RESUMO.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1. Animais e grupos experimentais.....	46
2.2. Exame colpocitológico (esfregaços vaginais).....	47
2.3. Avaliação do ciclo estral.....	48
2.4. Colheita dos órgãos.....	48
2.5. Processamento histológico.....	48
2.6. Análise histomorfométrica	49
2.6.1. Espessura do endométrio e miométrio.....	49
2.6.2. Proporção volumétrica dos constituintes do endométrio.....	50
2.7. Análise estatística.....	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.1. Peso corporal.....	51
3.2. Ciclo estral.....	52
3.3. Espessura do endométrio e miométrio.....	54

3.4. Proporção volumétrica.....	56
4. CONCLUSÕES.....	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
III. CONCLUSÕES GERAIS.....	63

LISTA DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO

Figura 1: Caracterização das fases do ciclo estral de camundongas através de esfregaços vaginais. a- Proestro: com predomínio de células epiteliais nucleadas. b- Estro: com a ocorrência de células epiteliais queratinizadas e anucleadas. c- Metaestro: com células epiteliais anucleadas e leucócitos. d- Diestro: predominância de leucócitos e presença de muco. HE. Barra: 30 μm5

Figura 2: Células epiteliais da mucosa vaginal. a- Célula epitelial basal. b- As setas indicam células intermediárias associadas a uma célula superficial com núcleo picnótico. c - Células superficiais nucleadas. d- Células superficiais anucleadas (queratinizadas). Coloração: HE. Barra: 20 μm6

ARTIGO 1

Figura 1: Folículos multiovocitários no ovário de camundonga. a- Estágio pré-antral com três ovócitos. b e c - Estágio antral com dois ovócitos. d- Estágio multilaminar com dois ovócitos. (*) Ovócitos circundados por células da granulosa. Coloração: Azul de Toluidina -Borato de sódio. Barra: a-c= 100 μm ; d= 50 μm12

Figura 2: Mecanismo de sinalização celular das ativinas.....18

ARTIGO 2

Figura 1: Corte longitudinal do ovário esquerdo de camundonga Albino Suíço do grupo tratado 3. No ovário observa-se a medula (M), o hilo (H) e a região cortical (CT) repleta de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento. Coloração: Azul de Toluidina- Borato de Sódio. Barra: 300 μm30

Figura 2: a- folículo unilaminar, contendo um ovócito circundado por células foliculares cúbicas. b- folículo primordial apresentando células foliculares pavimentosas (setas) e folículo multilaminar, regiões da granulosa (G) e da teca (T). c- folículo pré-antral, observa-se o antro (A) entre as células da granulosa (G). d- folículo antral, com ovócito envolvido pela zona pelúcida (ZP). e- folículo atresico com alteração na forma do ovócito e corpos apoptóticos na região da granulosa (círculos). Coloração: Azul de Toluidina-Borato de Sódio. Barra: a= 30µm; b-e = 50 µm.....34

Figura 3: Proporção volumétrica dos componentes básicos no ovário esquerdo nos três grupos de camundongas (G1, G2 e G3 respectivamente): estroma ovariano, folículos ovarianos e região medular (medula).....40

ARTIGO 3

Figura 1: Medidas da espessura do endométrio e miométrio de camundonga do grupo tratado 2; (L1),(L2),(L3),(L4) medidas da espessura do endométrio; (L5),(L6),(L7),(L8) medidas da espessura do miométrio; (E) endométrio; (L) luz uterina; (M) miométrio. Coloração: Azul de Toluidina - Borato de sódio. Barra: 300 µm.....50

Figura 2: Proporção volumétrica dos componentes do endométrio. Os pontos contados localizam-se no ápice dos indicadores. Coloração: Azul de Toluidina - Borato de sódio. Barra: 100 µm.....51

Figura 3: Corte transversal do útero esquerdo de camundongas Albino Suíço. a- grupo controle; b- grupo 2 (tratado com 2mg/kg de MPA), grupo 3 (tratado com 4mg/kg de MPA). Coloração: Azul de Toluidina-Borato de Sódio. Barra: 300 µm.....56

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

Tabela 1: Classificação dos tipos de folículos com base na morfologia das células foliculares, células da teca e aparecimento do antro.....29

Tabela 2: Peso corporal (PC); peso do ovário (PO) direito (D) e esquerdo (E), índice gonadossomático (IGS) e volume do ovário nos três grupos de camundongas.....32

Tabela 3: Frequência absoluta de folículos: primordiais (FP); primários unilaminares (FPU), primários multilaminares (FPM); pré-antrais (FPA); antrais (F A) e atrésicos (FAtr) no ovário esquerdo dos três grupos de camundongas.....33

Tabela 4: Porcentagem de folículos: primordiais (FP); primários unilaminares (FPU), primários multilaminares (FPM), pré-antrais (FPA), antrais (FA) e atrésicos (FAtr) no ovário esquerdo dos três grupos de camundongas.....36

Tabela 5: Diâmetro do folículo (fol) e do ovócito (ov) em folículos primordiais (FP) e primários unilaminares (FPU) nos três grupos de camundongas, expressos em μm 37

Tabela 6: Diâmetro do folículo (fol), sem teca (s/ t) e com teca (c/ t), e diâmetro dos ovócitos, sem zona pelúcida (s/zp) e com zona pelúcida (c/zp), nos folículos: primários multilaminares (FPM); pré-antrais (FPA) antrais (FA) nos três grupos de camundongas, expressos em μm38

Tabela 7: Proporção volumétrica dos componentes do ovário esquerdo nos três grupos de camundongas: Folículos primordiais (FP), primários unilaminares (FPU), primários multilaminares (FPM), pré-antrais (FPA), antrais (FA), atrésicos (FAtr) e folículos sem o ovócito presente no corte (FS/OV); córtex ovariano (C) e região medular do ovário (M).....39

ARTIGO 3

Tabela 1: Classificação dos estágios do ciclo estral com base na morfologia celular dos esfregaços colpocitológicos.....48

Tabela 2: Peso corporal, inicial e final, das camundongas do grupo controle e dos grupos tratados com acetato de medroxiprogesterona (MPA)..... 52

Tabela 3: Número de ciclos estrais, duração em dias de cada fase do ciclo estral, antes do início do tratamento, após a primeira aplicação do MPA e após a última aplicação do MPA.....53

Tabela 4: Espessura do endométrio e miométrio no grupo controle e nos grupos tratados com o acetato de medroxiprogesterona.....54

Tabela 5: Proporção volumétrica dos constituintes do endométrio das camundongas do grupo controle e dos grupos tratados com o acetato de medroxiprogesterona (MPA).....57

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Antro
ActR I	Receptor de ativina tipo I
ActR II	Receptor de ativina tipo II
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas (<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>)
CT	Região cortical
DES	Dietilestibestrol
ER	Receptores de estrogênio
FSH	Hormônio folículo estimulante
F _A	Folículos antrais
F _{At}	Folículos atrésicos
F _P	Folículos primordiais
F _{PA}	Folículos pré-antrais
F _{PM}	Folículos primários multilaminares
F _{PU}	Folículos primários unilaminares
Fs/OV	Folículos sem o ovócito presente no corte
g	Gramas
G	Células da granulosa
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
H	Hilo
HE	Hematoxilina-Eosina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1
IGS	Índice gonadossomático
Kg	Kilogramas
LH	Hormônio luteinizante
M	Região medular
Mg	Miligramas

ml	Mililitros
μm	Microgramas
MOFs	Folículos multiovocitários (<i>Multioocytes follicles</i>)
MPA	Acetato de medroxiprogesterona (<i>Medroxyprogesterone acetate</i>)
PC	Peso corporal
PO	Peso do ovário
T	Teca
TGF-β	Fator transformador de crescimento β (<i>Transforming Growth Factor-β</i>)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VO	Volume do ovário
ZP	Zona pelúcida

RESUMO

COSTA, Manuella Carvalho da. D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. Ciclo estral, histomorfometria ovariana e uterina de camundongas após tratamento prolongado com acetato de medroxiprogesterona. Orientadora: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Co-Orientadores: Sérgio Luiz Pinto da Matta e Tarcízio Antônio Rego de Paula.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do progestágeno acetato de medroxiprogesterona (MPA) sobre o ciclo estral, o desenvolvimento folicular ovariano e a morfologia uterina de camundongas. Foram utilizadas 24 fêmeas nulíparas, com 60 dias de idade, distribuídas nos seguintes grupos: 1 - Controle, sem tratamento com acetato de medroxiprogesterona; 2 - Tratamento com 0,06 mg de MPA/animal e 3 - Tratamento com 0,12 mg de MPA/animal. Nos grupos tratados, cada fêmea recebeu uma dose de MPA, por via subcutânea, a cada 15 dias, sempre no período do diestro, totalizando 90 dias de experimento (6 doses). Após a última dose de MPA, as camundongas foram submetidas à eutanásia no período do diestro. A utilização do MPA na dose de 0,12 mg de MPA/animal promoveu um aumento significativo na fase do diestro. A frequência de folículos primários unilaminares e pré-antrais foi maior ($P<0,05$) nos grupos tratados quando comparados ao controle, o que demonstra que o recrutamento inicial de folículos primordiais não foi prejudicado pelo tratamento. Em função do efeito antigonadotrófico do MPA, não houve diferença significativa entre grupos controle e tratados para a frequência de folículos em estágio avançado de desenvolvimento. Foi observado aumento da proporção volumétrica da região medular ovariana nos grupos tratados, o que sugere remodelação estrutural entre as regiões cortical e medular em função da inibição do recrutamento cíclico provada pelo progestágeno. O MPA causou atrofia das glândulas uterinas e diminuição da espessura do endométrio nos dois grupos tratados.

ABSTRACT

COSTA, Manuella Carvalho da. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2010. Estral cycle, ovarian and uterine histomorfometry of female mice after long-term treatment with medroxyprogesterone acetate. Adviser: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Co-Advisers: Sérgio Luiz Pinto da Matta and Tarcízio Antônio Rego de Paula.

The present study has the objective to evaluate the effects of progestagen Medroxyprogesterone Acetate (MPA), on the estrous cycle, on ovarian follicular development and uterine morphology in female mice. 24 nulliparous female mice with 60 days of age were used and allocated into the following groups: group 1- control, not treated with medroxiprogesterone acetate (MPA); 2- treated with 0.06 mg of MPA / animal; 3- treated with 0.12 mg of MPA / animal. In the treated groups, each female received one dose of MPA, subcutaneously, an interval of 15 days, always into diestrus totaling 90 days of experiment (6 doses). After the last dose of MPA, the female mice were euthanized into diestrus. The use of the MPA at 0.12 mg MPA / animal caused a significant increase in the diestrus phase. The frequency of unilaminars primary follicles and preantral follicles were higher ($P < 0.05$) in treated groups as compared to the controls, demonstrating that the initial recruitment of primordial follicles was not affected by the treatment. There was not observed significant difference between control and treated groups for the frequency of follicles in advanced stages of development. There was observed an increase in the volumetric proportion of ovarian medullary region in the treated groups, suggesting structural remodeling between cortical and medullary regions as a function of inhibiting the recruitment proved by cyclic progestagen. MPA caused atrophy of uterine glands and a decrease in endometrial thickness in both treated groups.

I. INTRODUÇÃO

Atualmente observa-se uma tendência mundial, no uso crescente de contraceptivos hormonais, inclusive no Brasil, pelas adolescentes. Dentre os fatores que contribuíram para esse aumento destacam-se o acesso facilitado aos contraceptivos e o início precoce da vida sexual (MONTEIRO, 2005).

A contracepção hormonal se faz basicamente com o uso de anticoncepcionais orais combinados, constituídos de estrógeno e progestágeno associados, ou então com anticoncepcionais contendo apenas progestágeno (RATHKE et al., 2001).

Desde 1970, os anticoncepcionais que contêm apenas progestágenos vêm sendo muito utilizados devido à sua alta eficácia e baixa contra-indicação. Além disso, os progestágenos podem ser prescritos para pacientes que estão amamentando ou que apresentam patologias, cuja evolução poderá se agravar com terapia exclusivamente estrogênica (FRASER & WEISBERG, 1981).

Na categoria de anticoncepcionais hormonais injetáveis, à base de progestágeno, o acetato de medroxiprogesterona (MPA) é o mais utilizado na clínica médica humana. A dose convencional é de 150mg sendo aplicada na fase folicular do ciclo a cada três meses. O MPA também é indicado para o tratamento da endometriose e na reposição hormonal na menopausa (FUCHS et al., 2004). Além de inibir a ovulação, o MPA induz atrofia endometrial, e pode causar alguns efeitos indesejáveis, dentre eles, o aumento do tempo necessário para que seja restabelecida a função ovariana após a suspensão do tratamento, que pode variar de três meses a um ano (RATHKE et al., 2001).

O MPA (Promone-E®) também é utilizado no manejo reprodutivo de espécies domésticas, sendo preferencialmente administrado por via subcutânea em cadelas na fase do anestro. Para assegurar a inibição contínua do estro a longo prazo, a injeção deve ser repetida a cada seis meses. O principal efeito adverso do MPA em cadelas, principalmente sob uso contínuo, é o risco da hiperplasia endometrial cística, que precede a piometrite, uma infecção uterina caracterizada por acúmulo de exsudato purulento no lúmen uterino (LUCAS et al., 2000/01).

Considerando a importância do MPA na sincronização do ciclo estral dos mamíferos domésticos e de sua frequente utilização como método contraceptivo, além de sua utilização terapêutica em diversas doenças como na hiperplasia endometrial, o presente estudo teve por objetivo analisar os efeitos do tratamento prolongado com este

progestágeno sobre o ciclo estral, o desenvolvimento folicular ovariano e a estrutura da parede uterina de camundongas nulíparas.

1. Progestágenos

Os progestágenos incluem a progesterona, sintetizada naturalmente em indivíduos de ambos os sexos, e as progestinas, derivados sintéticos, que exercem efeito progestogênico no endométrio previamente sensibilizado pelo estrógeno (SCHINDLER et al., 2003). A progesterona é um esteróide derivado do colesterol, sendo que nos indivíduos do sexo masculino, é produzido em baixas quantidades pelas glândulas adrenais e testículos. Nas mulheres, a progesterona é um importante regulador do sistema reprodutor, sendo produzida pelo corpo lúteo, pela placenta durante a gravidez e, em baixas concentrações, pelo córtex da adrenal (SCHINDLER et al., 2003; RUIZ PARRA, 2004).

A maioria das progestinas é derivada da progesterona ou da testosterona e podem se ligar não só a receptores de progesterona quanto de outros esteróides. Possuem várias aplicações na clínica médica, sendo prescritas na terapia de reposição hormonal, na indução de amenorréia, no tratamento de hiperplasia ou câncer de endométrio e hiperandrogenismo, e na contracepção. Os progestágenos derivados da 17- α -hidroxiprogesterona englobam o acetato de medroxiprogesterona (MPA), acetato de megestrol, acetato de ciproterona e acetato de clormadinona. O acetato de ciproterona é utilizado no tratamento de hiperandrogenismo grave ou associado ao estrogênio na pílula anticoncepcional e na terapia de reposição hormonal na menopausa. O acetato de clomadinona apresenta efeito antiestrogênico e já foi utilizado como anticoncepcional. (SCHINDLER et al., 2003; ARAÚJO JÚNIOR & ATHANAZIO, 2007; HICKEY & SALAMONSEN, 2008). O acetato de medroxiprogesterona (MPA) é uma progestina injetável ainda muito utilizada, sendo estimado que, na década de noventa, mais de 15 milhões de mulheres em todo o mundo a utilizavam (RATHER et al., 2001). O MPA inibe a ovulação através da supressão dos picos de FSH e LH e induz atrofia do endométrio e espessamento do muco cervical (GREYDANUS et al., 2001).

Na década de noventa também foi introduzida a drospirenona que é um progestina derivada da espirolactona, um potente antimineralocorticoide (SITRUK-WARE, 2004). A diversidade de progestinas está intimamente associada ao aperfeiçoamento da tecnologia contraceptiva e da terapia de reposição hormonal, sempre na busca de fármacos que não apresentem efeitos indesejáveis. Na contracepção

hormonal, o papel fundamental das progestinas é inibir a ovulação, sendo que os estrógenos são associados às fórmulas dos contraceptivos para diminuir o risco de sangramento uterino, efeito que pode ocorrer com a utilização apenas do progestágeno, ou para potencializar o efeito inibitório sobre a ovulação. Na terapia de reposição hormonal as progestinas oferecem proteção endometrial, evitando a hiperplasia e o adenocarcinoma do endométrio (RUIZ PARRA, 2004).

A ação dos contraceptivos que contêm apenas progestinas depende de muitos fatores, como a via de administração, oral ou parenteral, tempo de tratamento, dose e natureza do hormônio sintético administrado, se semelhante a progesterona ou a testosterona (SCHINDLER et al., 2003; SITRUK-WARE, 2004; HICKEY & SALAMONSEN, 2008). As progestinas, inclusive o MPA, podem apresentar efeitos indesejáveis como cefaléia, ansiedade, tontura, diminuição da libido, hipersensibilidade mamária, depressão, aumento de peso e diminuição da densidade mineral óssea (CROMER et al., 1996; PAIVA, 1997; GREYDANUS et al., 2001; RATHKE et al., 2001). Um dos efeitos colaterais freqüentemente relatados por usuárias que fazem uso contínuo do MPA é o tempo relativamente longo de três meses a um ano, para que seja restabelecida a fertilidade após a suspensão do tratamento (RATHKE et al., 2001).

2. Ciclo Estral

O camundongo torna-se apto à reprodução aos 60 dias de idade e os principais indicadores da maturidade sexual, no macho e na fêmea são, respectivamente, a descida dos testículos para o escroto, verificada em torno do 20º dia de vida pós-natal e a abertura vaginal, fenômeno detectado no 35º dia de vida (ANDRADE et al., 2002).

Os camundongos são mamíferos poliétricos que apresentam ciclo estral regular, com duração média de quatro dias (DELLMANN & BROWN, 1982; SIMÕES, 1984; BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003).

As fases do ciclo estral são o proestro, o estro, o metaestro e o diestro (Fig. 1). O proestro compreende a fase folicular do ovário, que culmina no estro. É caracterizado pela aceleração do crescimento folicular sob influência do FSH e também pelo desenvolvimento endometrial. Os folículos em desenvolvimento começam a secretar estrógeno, que passa a suprimir os níveis de progesterona do ciclo anterior em declínio. O estro se caracteriza pela completa influência do estrógeno sobre os órgãos genitais, correspondendo à fase em que a fêmea está receptiva ao macho. É nesse período que ocorre a ovulação. O metaestro e o diestro correspondem à fase luteínica do ovário,

sendo o metaestro um estágio intermediário, onde a queda nos níveis de estrógeno é compensada pelos níveis de progesterona em ascensão, devido ao início do funcionamento dos corpos lúteos. O diestro é o período do ciclo em que se encontram as maiores concentrações de progesterona de fase luteínica ativa e as glândulas endometriais atingem o pico da sua atividade secretora. Caso ocorra fertilização e prenhez, ocorrerá um prolongamento do diestro.

Quando agrupadas numa mesma gaiola, as camundongas podem apresentar aciclicidade (BANKS, 1992), que é revertida com a exposição das fêmeas ao macho. A partir daí o estro retorna em um prazo de até 48 horas, sendo que a este fenômeno dá-se o nome de Efeito de *Whitten* (ANDRADE et al., 2002). Além disso, fatores como idade, linhagem, bem como as condições alimentares e de luminosidade podem provocar variações no ciclo estral (SIMÕES, 1984). Camundongas C57 BL/6, por exemplo, apresentam um ciclo estral mais longo, que oscila entre 5 a 6 dias (SCHUSTER & SCHAUB, 2001).

Embora o ciclo estral seja definido principalmente pelo quadro de alterações cíclicas que acontecem no ovário e no endométrio, o acompanhamento do ciclo pode ser feito, na prática, pela avaliação de esfregaços vaginais. As variações ocorridas no epitélio da mucosa vaginal, com relação ao número de camadas e grau de queratinização, constituem o principal aspecto analisado nesses esfregaços (BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003).

O epitélio vaginal é classificado histologicamente como estratificado pavimentoso, sendo particularmente sensível às alterações hormonais. Conforme os níveis de estrógeno aumentam, o epitélio da mucosa vaginal aumenta em espessura. As células epiteliais progridem de não-queratinizadas para queratinizadas na medida em que ocorre o espessamento desse epitélio. Histologicamente, o epitélio da mucosa vaginal em proestro é caracterizado por células epiteliais superficiais nucleadas. No estro o epitélio da mucosa vaginal atinge a sua maior espessura, com a ocorrência de células epiteliais superficiais queratinizadas com contornos citoplasmáticos retos e núcleos picnóticos. Entre o estro e o metaestro, a descamação do epitélio vaginal causa a liberação de células epiteliais superficiais queratinizadas e anucleadas, com a redução no número de camadas do epitélio vaginal, o que facilitará a migração de neutrófilos e linfócitos provenientes da lâmina própria para a luz da vagina. No metaestro, portanto, são observados nos esfregaços vaginais, neutrófilos, linfócitos e células epiteliais, principalmente anucleadas. No diestro, os neutrófilos e linfócitos são abundantes no

esfregaço vaginal, reaparecendo as células epiteliais pequenas arredondadas e nucleadas, além da presença de muco oriundo das glândulas cervicais (NELSON et al., 1982; BANKS, 1992; BACHA & BACHA, 2003).

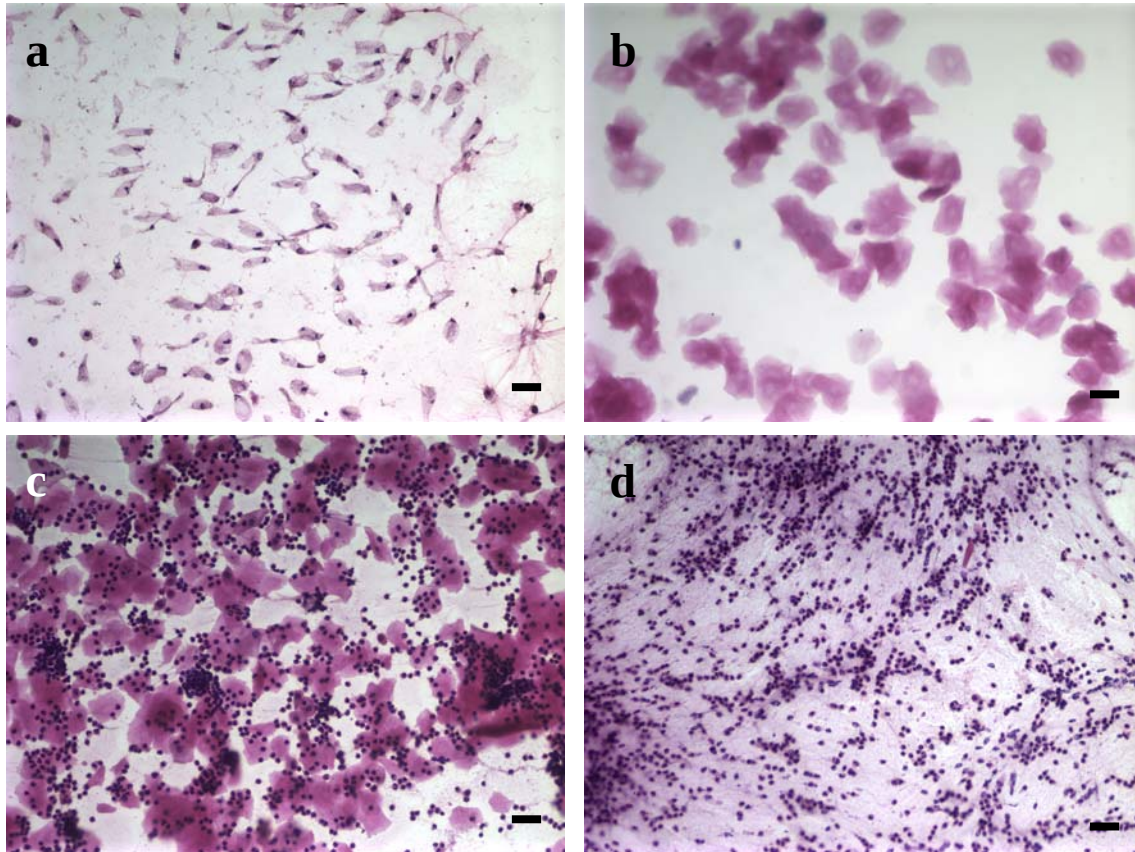


Figura 1: Caracterização das fases do ciclo estral de camundongas através de esfregaços vaginais. a- Proestro: predomínio de células epiteliais nucleadas. b- Estro: com a ocorrência de células epiteliais queratinizadas e anucleadas. c- Metaestro: com células epiteliais anucleadas, linfócitos e neutrófilos. d- Diestro: predominância de neutrófilos, linfócitos e presença de muco. HE. Barra: 30 μ m.

As células do epitélio vaginal são divididas basicamente em três tipos: parabasal, intermediário e superficial. As células parabasais têm formato arredondado e são as menores células observadas nos esfregaços (Fig. 2a). Apresentam uniformidade quanto ao tamanho, sendo observadas de forma isolada ou em pequenos grupos (GUIMARÃES et al., 1997; BACHA & BACHA, 2003; BARBOSA et al., 2007).

As células intermediárias são maiores que as parabasais (Fig. 2b) e apresentam núcleo vesicular, arredondado ou ovóide (BACHA & BACHA, 2003; BARBOSA et al.,

2007). As células superficiais nucleadas (Fig. 2c) são maiores que as intermediárias e possuem forma poligonal e bordas angulares. Seus núcleos podem apresentar-se intactos ou picnóticos. O citoplasma é eosinofílico com grânulos citoplasmáticos peri-nucleares de pequeno tamanho (GUIMARÃES et al., 1997; BACHA & BACHA, 2003; BARBOSA et al., 2007). As células superficiais anucleadas (Fig. 2d), também chamadas de queratinizadas, apresentam forma poligonal e bordas irregulares (GUIMARÃES et al., 1997; BACHA & BACHA, 2003; BARBOSA et al., 2007).

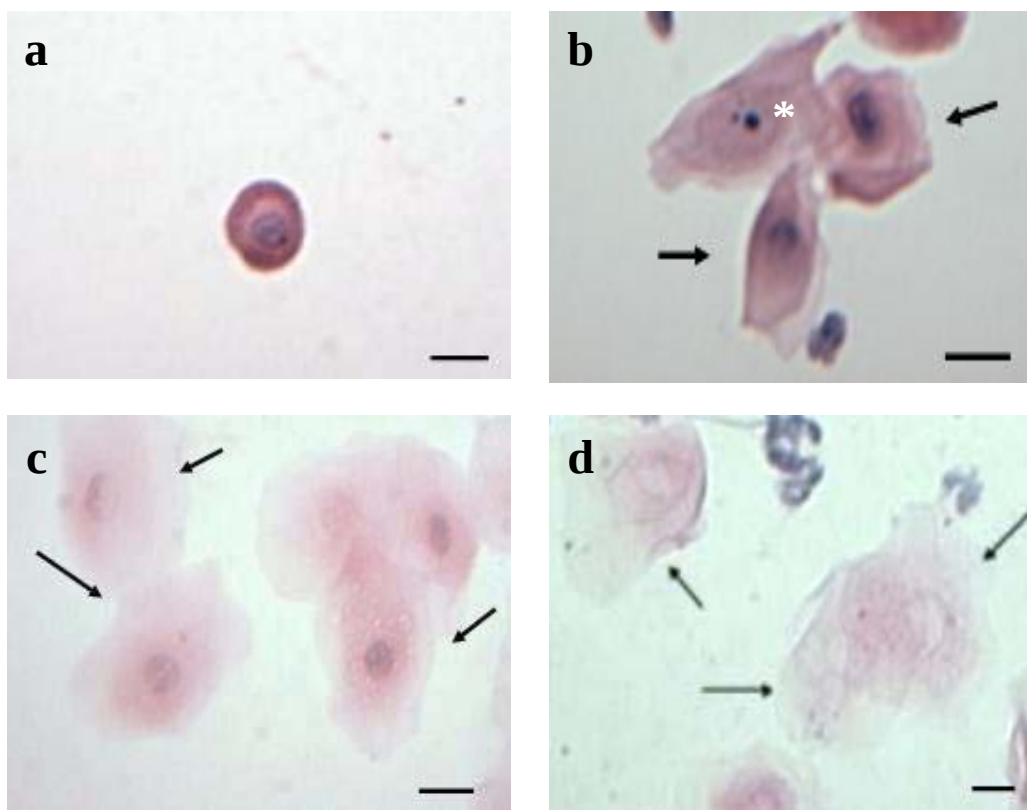


Figura 2: Células epiteliais da mucosa vaginal. a- Célula epitelial parabasal. b- As setas indicam células intermediárias associadas a uma célula superficial com núcleo picnótico (*). c - Células superficiais nucleadas (setas). d- Células superficiais anucleadas e queratinizadas (setas) . Coloração: HE. Barra: 20 μ m.

II. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Fiocruz, 1. ed., 2002.

ARAÚJO JÚNIOR, N. L. C.; ATHANAZIO, D. A. Terapia de reposição hormonal e o câncer do endométrio. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 11, p. 2613-2622, 2007.

BACHA, W. J.; BACHA, L. M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. Roca. 2. ed., 2003.

BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. Manole, 2. ed., 1992, p. 626.

BARBOSA, L. P.; RODRIGUES, M. V.; NEVES, M. M.; MORAIS, D. B.; MELO, B. E. S.; BALARINI, M. K.; COELHO, C. D. P.; MENDONÇA, C. Caracterização da colpocitologia em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n.4, p. 258-266, 2007.

CROMER, B. A.; BLAIR, J. M.; MAHAN, J. D.; ZIBNERS, L. ; NAUMOVSKI, Z. A prospective comparison of bone density in adolescent girls receiving depot medroxyprogesterone acetate (Depo Provera), levonorgestrel (Norplant), or oral contraceptives. **The Journal of Pediatrics**, v. 129, n. 5, p. 671-676, 1996.

DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Guanabara Koogan, 1ª ed., 1982.

FRASER, I. S.; WEISBERG, E. A comprehensive review of injectable contraception with special emphasis on depot medroxyprogesterone acetate. **Medical Journal of Austrália**, v. 24, n.1, p.3-19, 1981.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica – Fundamentos da terapêutica tradicional**. Guanabara Koogan, 3. ed, 2004.

GREYDANUS, D. E.; PATEL, D. R.; RIMSZA, M. E. Contraception in the adolescent: an update. **Pediatrics**, v. 107, n. 3, p. 562- 573, 2001.

GUIMARÃES, D. A.; MOREIRA, D.; VALE, W. G. Determinação do ciclo reprodutivo da cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) através do diagnóstico colpocitológico. **ACTA Amazônica**, v. 27, n.1, p.55-64, 1997.

HICKEY, M.; SALAMONSEN, L. A. Endometrial structural and inflammatory changes with exogenous progestogens. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n.5, p. 167-174, 2008.

LUCAS, S. S.; OLIVEIRA, A. L. L.; SCHOSSLER, J. E. W. Piometrite em cães e gatos: revisão de 103 casos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 7/8, n.1, p. 99-103, 2000/01.

MONTEIRO, A. A. Novos Métodos Contraceptivos. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 21, n. 1, p. 475-83, 2005.

NELSON, J. F. A.; FELICIO, L. S.; RANDALL, P. K.; SIMS, C.; FINCH, C. E. Longitudinal Study of Estrous Cyclicity in Aging C57BL/6J Mice: I Cycle frequency, Length and Vaginal Cytology. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 2, p. 327-339, 1982.

PAIVA, L. H. S. C. **Densidade mineral óssea de usuárias de acetato de Medroxiprogesterona injetável como anticoncepcional comparada a de não-usuárias, no menacme e na pós-menopausa**. 1997. Tese de Doutorado na área de Tocoginecologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

RATHKE, A. F.; POESTER, D.; LORENZATTO, J. F.; SCHMIDT, V. B.; HERTER, L. D. Contraceção hormonal contendo apenas progesterona. **Adolescência Latinoamericana**, v. 2, n. 2, p. 90-96, 2001.

RUIZ PARRA, A. I. Pasado, presente y futuro de las progestinas. **Revista Colombiana de Obstetrícia y Ginecologia**, v. 55, n. 2, p. 167-173, 2004.

SCHINDLER, A. E., CAMPAGNOLI, C.; DRUCKMANN, R.; HUBER, J.; PASQUALINI, J. R. ; SCHWEPPE, K. W.; THIJSEN, J. H. H. Classification and Pharmacology of Progestins. **Maturitas**, 36S1, p. S7-S16, 2003.

SCHUSTER, J. P. & SCHAUB, G. A. *Trypanosoma cruzi*: the development of estrus cycle and parasitemia in female mice maintained with or without male pheromones. **Parasitology Research**, v. 87, n. 12, p.985-993, 2001.

SIMÕES, M. J. **Aspectos morfológicos e morfométricos do endométrio de ratas albinas nas subfases inicial, intermediária e final do proestro e do metaestro**. 1984. Tese de Doutorado em Histologia, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 1984.

SITRUK-WARE, R. Pharmacological profile of progestins. **Maturitas**, v. 47, n. 4, p. 277-283, 2004.

ARTIGO 1

Foliculogênese e os folículos multiovocitários

Manuella Carvalho da Costa¹, Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado¹

Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG,
Brasil

Correspondência: mqmanu@hotmail.com

Resumo

O ovário dos mamíferos é constituído por milhares de folículos primordiais, os quais constituem a reserva folicular ovariana. Os folículos primordiais são formados durante a vida fetal e cada um é composto por um ovócito envolvido por uma camada de células foliculares pavimentosas de natureza epitelial. Geralmente cada folículo apresenta apenas um ovócito, entretanto folículos multiovocitários (MOFs) têm sido relatados em várias espécies de mamíferos. Apesar da incidência relativamente alta de MOFs, o entendimento completo dos mecanismos de formação dos mesmos e o seu significado para a vida reprodutiva da fêmea ainda não foi totalmente elucidado. Este trabalho apresenta aspectos do controle molecular da foliculogênese que subsidiam um possível mecanismo de formação dos MOFs.

Palavras-chave: ativina, folículos multiovocitários, inibina

Introdução

A fertilidade da fêmea depende da diferenciação adequada das gônadas e de eventos determinantes, destacando-se dentre eles a maturação do ovócito, a proliferação e diferenciação das células da granulosa e a interação entre os fatores endócrinos, autócrinos e parácrinos, responsáveis pelas alterações cíclicas do ovário durante o desenvolvimento folicular (ELVIN & MATZUK, 1998). A unidade básica funcional do ovário é o folículo ovariano, basicamente constituído de um ovócito envolvido por uma ou mais camadas de células somáticas (SKINNER, 2005; KNIGHT & GLISTER, 2006). No período fetal, durante a diferenciação do ovário, são formados os folículos primordiais. Esse tipo de folículo é composto por um ovócito bloqueado em diplóteno da Prófase I, circundado por uma camada de células foliculares de natureza epitelial.

O ovário neonatal da mulher é dotado de milhões de folículos primordiais que permanecerão latentes até iniciarem o seu desenvolvimento. O mecanismo molecular que interrompe a latência do folículo e induz a retomada do crescimento para a maturação final ainda não é totalmente conhecido (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006). A população de folículos que efetivamente atinge a maturação é reduzida, aproximadamente 0,1% do total de folículos, sendo que a maioria irá sofrer atresia em algum momento do desenvolvimento folicular (KNIGHT & GLISTER, 2006).

Geralmente, nos mamíferos, cada folículo ovariano apresenta apenas um ovócito (PAYAN-CARREIRA & PIRES, 2008). Entretanto, folículos multiovocitários têm sido relatados em répteis, aves, roedores, cães, gatos, coelhos, macacos do gênero *Rhesus* e mulheres (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006; GUILLETTE Jr & MOORE, 2006; PAYAN-CARREIRA & PIRES, 2008). Os folículos multiovocitários ou MOFs (Fig. 1) são caracterizados por dois ou mais ovócitos circundados por uma ou mais camadas de células da granulosa (GUILLETTE Jr & MOORE, 2006), sendo mais observados no ovário de animais recém nascidos e jovens do que em animais mais velhos (PAYAN-CARREIRA & PIRES, 2008). GUILLETTE Jr & MOORE (2006) observaram alta frequência de MOFs em fêmeas de jacaré expostas a contaminantes ambientais como bisfenol A, endosulfan e atrazina, no período embrionário.

A formação dos MOFs pode ser decorrente da não separação das células germinativas nos cistos durante a formação dos folículos primordiais na vida fetal, ou de rápida proliferação de células germinativas que não é acompanhada por número suficiente de mitoses das células foliculares, resultando na inclusão de mais de um ovócito dentro do mesmo folículo (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006; PAYAN-CARREIRA & PIRES, 2008).

A presente revisão descreve aspectos básicos do controle molecular da foliculogênese nos mamíferos, que subsidiam o possível mecanismo de formação dos folículos multiovocitários.

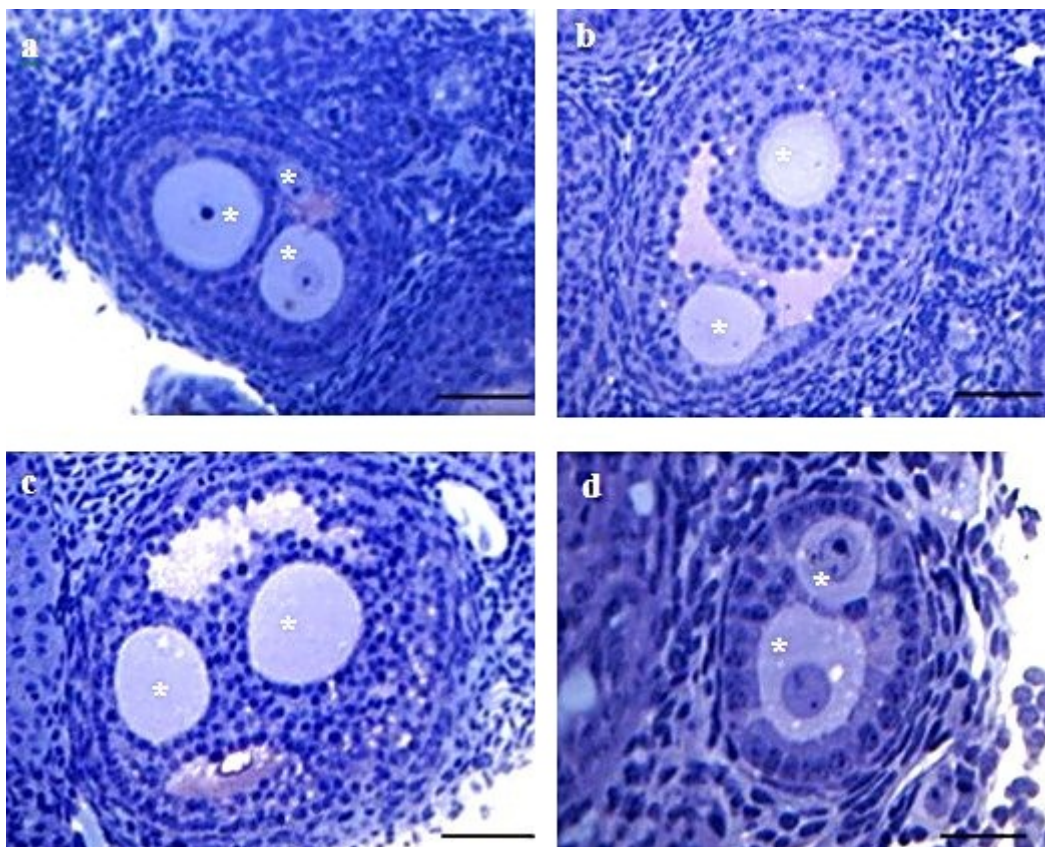


Figura 1: Folículos multiovocitários no ovário de camundonga. a- Estágio pré-antral com três ovócitos. b e c - Estágio antral com dois ovócitos. d- Estágio multilaminar com dois ovócitos. (*) Ovócitos circundados por células da granulosa. Coloração: Azul de Toluidina -Borato de sódio. Barra: a-c= 100 μ m; d= 50 μ m.

Estágios do desenvolvimento folicular

A foliculogênese consiste no processo de formação, crescimento e maturação folicular, começando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo maduro, também denominado *De Graaf* ou pré-ovulatório. Com base no crescimento do folículo e no desenvolvimento do ovócito são identificados basicamente quatro estágios no desenvolvimento folicular: folículos primordiais, folículos primários unilaminares e multilaminares, folículos secundários e folículos maduros (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

As gonadotropinas hipofisárias, FSH e LH, atuam diretamente no crescimento e desenvolvimento ovariano (RACOWSKY & GELETY, 1998). Entretanto, os estágios

iniciais da foliculogênese não são dependentes do controle gonadotrófico. O desenvolvimento dos folículos primordiais até a fase pré-antral acontece de forma aleatória e contínua, independente do estímulo de FSH (GOUGEON, 1996). Este desenvolvimento ocorre mesmo em ocasiões em que o FSH encontra-se suprimido como por exemplo na gestação, tratamento com contraceptivos, lesões hipofisárias. A partir da fase pré-antral, se não houver o efeito estimulador do FSH, o destino da maioria destes folículos é a atresia (GOUGEON, 1996; SPEROFF & FRITZ, 2005).

O primeiro sinal do desenvolvimento morfológico folicular é quando as células foliculares que constituem uma única camada no folículo primordial passam do formato achatado para cúbico (FAIR, 2003; MARTINS et al., 2008). Um ovócito rodeado por uma única camada de células foliculares cúbicas caracteriza o folículo primário unilaminar. Outra modificação importante é o surgimento da zona pelúcida, estrutura glicoprotéica que recobre o ovócito e que é mantida por todo o desenvolvimento folicular (RANKIN et al., 2001; MANNIKKO et al., 2005).

A progressão para folículo multilaminar é caracterizada pelo aparecimento de várias camadas de células foliculares que formam o estrato da granulosa, bem como o aparecimento das células da teca, aumento do diâmetro do ovócito e zona pelúcida evidente (FAIR, 2003; SENEDA & BORDIGNON, 2007). Durante o processo de formação do folículo multilaminar, alguns marcadores têm sido citados como de grande importância, tais como ativina – A e sua proteína de ligação, folistatina (SILVA et al., 2004). É neste momento que os folículos em desenvolvimento parecem tornar-se responsivos às gonadotrofinas FSH e LH (VAN DEN HURK et al., 2000). Em bovinos, ovinos e ratos, a expressão de RNAm para receptores de FSH é detectada em folículos com uma a duas camadas de células granulosa (FAIR, 2003). No estágio de folículo secundário, as células da granulosa apresentam junções do tipo *gap*, que permitem a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, mensageiros secundários e pequenos metabólitos entre as células da granulosa e entre ovócito e granulosa (KIDDER & MHAWI, 2002).

À medida que os folículos crescem ocorre a proliferação das células da granulosa e da teca, que por sua vez se diferencia em teca externa e interna. O líquido folicular começa a se acumular entre as células da granulosa e os espaços que contém este líquido se juntam, formando-se assim uma grande cavidade, o antro folicular, que caracteriza os folículos secundários ou antrais (RACOWSKY & GELETY, 1998; MARTINS et al., 2008). O fluido folicular que preenche esta cavidade contém água,

eletrólitos, proteínas séricas, fatores de crescimento e alta concentração de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa (BARNETT et al., 2006).

Após a formação do antro ocorre a proliferação contínua das células da granulosa e o aumento da cavidade antral resultando em um rápido crescimento do folículo sob a estimulação de FSH. O ovócito se torna localizado excentricamente dentro do antro e é rodeado por duas a três camadas de células da granulosa, conhecidas como *cumulus oophorus*. Assim, o folículo atinge o seu máximo desenvolvimento, sendo considerado maduro (RACOWSKY & GELETY, 1998).

Folículos em diferentes estágios de desenvolvimento podem ser observados ao mesmo tempo no ovário e, embora qualquer um deles possa atingir a maturação, apenas folículos que estiverem em fase mais avançada de desenvolvimento poderão atingir o estágio maduro sob estímulo gonadotrófico (GOUGEON, 1996; FAUSER & VAN HEUSDEN, 1997).

O recrutamento inicial, processo de desenvolvimento de folículos primordiais, acontece de maneira continuada durante a vida da fêmea até a exaustão do estoque de folículos primordiais (GOUGEON, 1996). Em espécies monovulatórias, apenas um folículo é selecionado dentre os recrutados para continuar a crescer e diferenciar-se em folículo ovulatório, enquanto os demais têm como destino a atresia. O folículo selecionado é conhecido como folículo dominante e suprime ativamente o crescimento dos subordinados pela secreção de estradiol e inibina (BURATINI Jr, 2007).

Formação dos folículos primordiais

No embrião, o início do desenvolvimento ovariano começa com a migração das células germinativas primordiais ou gonócitos, localizadas na parede do saco vitelínico, para as gônadas em formação. Os gonócitos, ao colonizarem as gônadas, perdem a sua mobilidade e dão início a gametogênese. No ovário, as células germinativas primordiais sofrem diversas divisões mitóticas e transformam-se em ovogônias. A citocinese é incompleta durante essas divisões celulares, criando assim diversos aglomerados (cistos) de ovogônias, que serão circundados por células somáticas denominadas células da pré-granulosa (CHEN et al., 2007; MAYO et al., 2007; SENEDA & BORDIGNON, 2007; MARTINS et al., 2008). A formação desses cistos tem a vantagem de promover a comunicação entre ovogônias e a diferenciação coordenada destas células (MAYO et al., 2007). Células filhas resultantes da divisão de ovogônias podem ter destinos

diferentes: uma se divide imediatamente, enquanto a outra permanece em intérfase e divide-se periodicamente, originando novas ovogônias (MARTINS et al., 2008). Por sua vez, as ovogônias diferenciam-se em ovócitos I, células programadas para entrar na primeira divisão meiótica e que permanecem bloqueadas na prófase I.

Em ratas, os cistos podem conter aproximadamente 32 ovogônias. Treze dias e meio após a fertilização, já são identificados ovócitos em prófase I. Aproximadamente dezenove dias após o coito os cistos começam a ser invadidos pelas células somáticas (pré-granulosa) que irão circundar os ovócitos. A morte de células germinativas ocorre de maneira intensa entre dezesseis e vinte e quatro dias após o coito (BRISTOL-GOULD et al., 2006; BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006)

Vinte e quatro horas após o nascimento no rato e aproximadamente 21 semanas de gestação nos humanos e macacos, os ovócitos são separados dos cistos germinativos, e irão constituir os folículos primordiais (CHEN et al., 2007). Ao mesmo tempo o número de ovócitos no ovário é drasticamente reduzido por morte celular (MAYO et al., 2007). Em várias espécies de mamíferos, incluindo as ratas, mais da metade dos ovócitos morrem no início do desenvolvimento, antes da formação dos folículos. Durante este processo, algumas células de cada ninho sofrem apoptose, deixando apenas um terço do número total de sobreviventes. Nessas espécies, a separação dos ovócitos do ninho ocorre pela morte de algumas células desse ninho, causando a segregação de um ninho em outro ainda menor. Isto é repetido até que permaneçam poucos ovócitos num indivíduo. Assim, a morte celular programada de alguns ovócitos seria necessária para haver a segregação desses ninhos (CHEN et al., 2007).

Inibinas, ativinas e folistatinas

As ativinas e inibinas são membros da superfamília do *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), assim como o hormônio antimülleriano e as *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs). As ativinas são uma família de proteínas formadas por homodímeros das subunidades β da inibina (ativina A: βA - βA , ativina B: βB - βB) e heterodímeros das subunidades β da inibina (ativina AB: βA - βB) ligadas por pontes de dissulfeto (ETHIER & FINDLAY, 2001; KIPP et al., 2007).

No sistema reprodutor feminino normal, as inibinas atuam na hipófise e no ovário. A subunidade α da inibina é produzida por células da granulosa no ovário, enquanto que as subunidades β e as ativinas atuam em uma variedade de tecidos,

incluindo ovários, hipófise, placenta, tecido nervoso e mamário (GUILLETTE Jr & MOORE, 2006).

Segundo HAFEZ & HAFEZ (2004), as inibinas desempenham um importante papel na regulação hormonal da foliculogênese durante o ciclo estral, atuando como sinalizadores químicos para a hipófise. Biologicamente, a inibina atua na diminuição da síntese e da liberação do FSH. No sistema reprodutor feminino, a ativina exerce funções marcantes no controle da secreção hormonal, atuando nos gonadotrofos hipofisários e promovendo a secreção de FSH induzida pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (BILEZIKJIAN et al., 2004). A ativina induz também a proliferação de células da granulosa e aumenta a expressão de receptores do FSH, a esteroidogênese da célula da granulosa, a atividade da aromatase estimulada pela gonadotrofina e a produção de estradiol, além de atrasar o início da luteinização e atresia folicular (MARTINS DA SILVA et al., 2004; BEG & GINTHER, 2006).

A folistatina é um peptídeo produzido pelas células hipofisárias, incluindo as gonadotróficas, bem como pelas células da granulosa no ovário (LIN et al., 2003; BILEZIKJIAN et al., 2004). Além de sua ação endócrina de inibição da síntese e secreção de FSH e da resposta do FSH ao GnRH, similarmente à inibina, a folistatina tem o importante papel de antagonizar as ações promovidas pela ativina. A folistatina é o principal regulador da bioatividade da ativina, ligando-se a ela com alta afinidade, neutralizando a sua atividade biológica. Portanto, constitui-se num agente modulador da secreção de FSH (PHILIPS & DE KRETZER 1998; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

As proporções intrafoliculares de ativina: folistatina e ativina: inibina têm sido sugeridas como parâmetros potencialmente importantes na regulação da foliculogênese. A folistatina neutraliza a atividade da ativina A por meio da sua ligação, e a inibina A opõe-se às ações da ativina A. Por isso, uma proporção de ativina A: folistatina e ativina A: inibina A reflete a quantidade total de ativina ativa, disponível para a interação com seus receptores (BEG & GINTHER, 2006).

O mecanismo clássico de ação celular da ativina envolve a ligação a receptores transmembrana, que desencadeiam uma cascata de fosforilação protéica intracelular. Existem dois tipos de receptores de ativina (Fig. 2), denominados receptor tipo I (ActRI) e tipo II (ActRII). A ligação da ativina se faz com o ActRII, provocando o recrutamento e ativação do ActRI. O ActRI ativado fosforila uma molécula sinalizadora da família *Smad* (*Smad* 2 ou *Smad* 3), que então interage com a *Smad* 4 e este complexo

se transloca para o núcleo, onde promove expressão gênica (ATTISANO et al., 2001; BERNARD et al., 2001; JONES et al., 2002b; LIN et al., 2003).

A família *Smad* é um conjunto de moléculas responsáveis pela sinalização intracelular. Existem três classes destas moléculas de transdução: as *R-Smad*, que são as moléculas ativadas pela subunidade RI do receptor, as *Common Smad*, ou mediadores comuns que formam um complexo heteromérico com as *R-smad* e translocam para o núcleo para ativar as respostas gênicas específicas, e as *Inhibitory Smad* que são potentes inibidores do sinal de ativina (ATTISANO et al., 2001; GRAY et al. 2001; BERNARD et al. 2001).

Já foram identificados dois subtipos de receptores tipo II (ActRIIA e ActRIIB) e dois subtipos de receptores tipo I (ActRIA ou ALK2-activin receptor like kinase 2 e ActRIB ou ALK4). Entretanto, o ActRIA está mais associado à sinalização das BMPs do hormônio antimülleriano, indicando que o ActRIB é o principal receptor tipo I envolvido no mecanismo de ação da ativina (JONES et al., 2002b).

A biodisponibilidade da ativina é também regulada pela inibina. A inibina é um antagonista de ativina em muitos tecidos. Uma vez que nenhum receptor de inibina foi identificado até o momento, sua ação parece ser decorrente de interação com o ActRII. De fato, a inibina é capaz de ligar-se ao receptor tipo II da ativina, sem, entretanto, disparar a cascata de eventos intracelulares que resultam no efeito final da ativina (WELT et al., 2003). No entanto, o modelo de inibição competitiva não explica satisfatoriamente a ação da inibina, porque sua afinidade pelo ActRII é muito baixa, se comparada àquela da ativina (GRAY et al., 2001).

Recentemente, foi descoberto que a inibina liga-se com alta afinidade ao receptor betaglicano TGF β III, facilitando a interação com o receptor tipo II da ativina, inibindo as ações da ativina mesmo em baixas concentrações de inibinas (GRAY et al., 2001; JONES et al., 2002b).

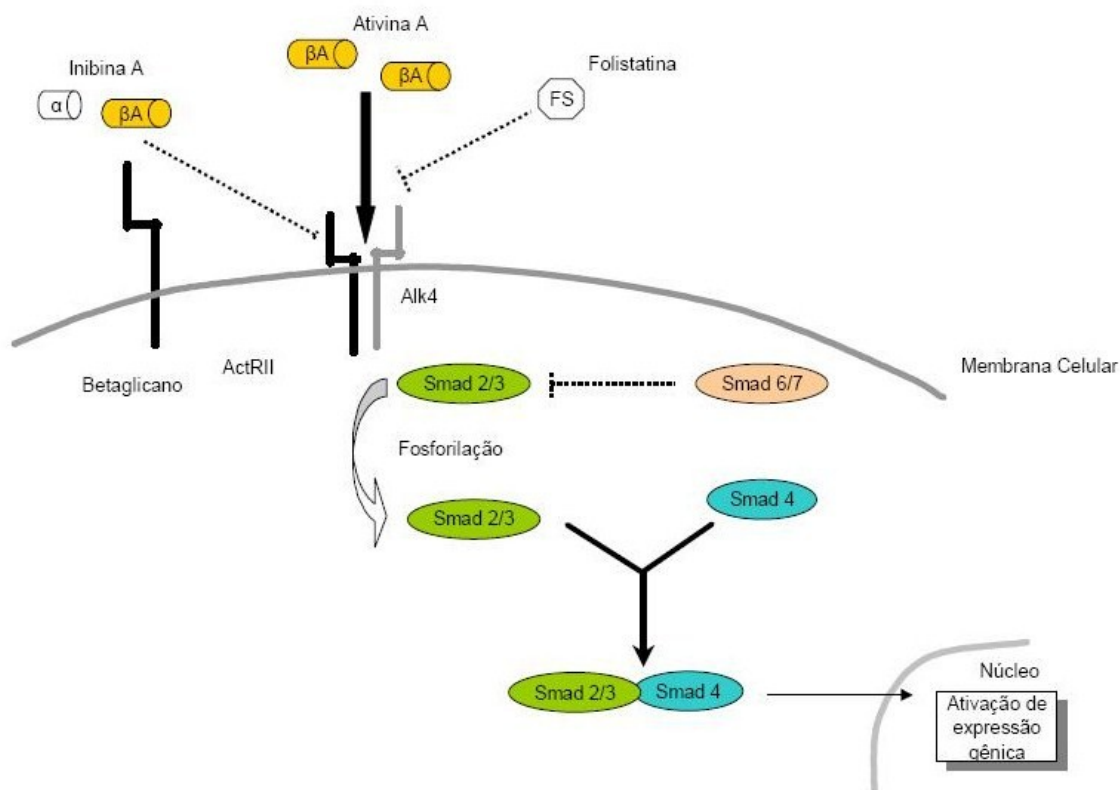


Figura 2: Mecanismo de sinalização celular das ativinas (Fonte: NASCIMENTO, 2006).

FSH, estrógeno, inibina/ativina, e MOFs

Uma série de observações tem contribuído para a hipótese de que os hormônios maternos sejam necessários para a manutenção dos ninhos de células germinativas no feto e que a abrupta diminuição desses hormônios ao nascimento desencadeia a separação dos ninhos e formação dos folículos primordiais. Ovários de ratas expostas a estrogênios no período pré-natal ou neonatal apresentam uma grande quantidade de folículos multiovocitários, sugerindo que a exposição contínua ao estrógeno preserva os ninhos de células germinativas, ocasionando a migração de células pré-granulosas em torno de vários ovócitos (MAYO et al., 2007).

GUILLETTE Jr & MOORE (2006) sugeriram que o aparecimento de folículos multiovocitários pode ser causado pela superexpressão de subunidades α de inibina, favorecidas pelo uso de contaminantes ambientais com ação estrogênica, cujo mecanismo altera o sistema gonadotrofina-estrogênio-inibina/ativina por induzir a expressão gênica de subunidades α de inibina e folistatina no início da foliculogênese. Isso estimularia a produção de níveis aumentados de inibina A, causando a formação de folículos multiovocitários.

Durante a foliculogênese normal, o ovário fetal de humanos e babuínos expressam preferencialmente subunidades de inibina β em vez de subunidades de inibina α (GUILLETTE Jr & MOORE, 2006).

O aparecimento dos MOFs parece estar associado à exposição no período neonatal de desreguladores endócrinos com atividade estrogênica, dentre eles os estrógenos endógenos, como o 17 β -estradiol, estrógenos sintéticos, como o dietilestilbestrol (DES) e fitoestrógenos (JEFFERSON et al., 2007; KIM et al., 2008; PAYAN-CARREIRA & PIRES, 2008).

As ações do estrogênio são mediadas por receptores de estrogênio (ER) do tipo alfa (ER α) e beta (ER β). No ovário, ER α são expressos nas células intersticiais e da teca, enquanto que ER β nas células da granulosa (KIPP et al. 2007). DES pode se ligar a ambos os ER α e ER β , com maior afinidade do que o 17 β -estradiol. De acordo com KIM et al. (2008) o uso de DES induziu a formação de folículos multiovocitários *in vitro*, sugerindo que as gonadotrofinas hipofisárias podem não ser essenciais para a ocorrência de folículos multiovocitários.

Por outro lado, o FSH estimula as células da granulosa a produzirem subunidades de inibina α e inibina β_A *in vitro* e *in vivo* em células da granulosa maduras (GUILLETTE Jr & MOORE, 2006).

Um mecanismo hipotético de formação de MOFs

GUILLETTE Jr & MOORE (2006) estabeleceram uma hipótese de via de formação dos folículos multiovocitários através de fatores capazes de alterar a sinalização normal de estrógenos no desenvolvimento ovariano.

No início do processo de foliculogênese normal, subunidades de ativina β_A são expressas predominantemente no ovário. Essas subunidades dimerizam para produzir níveis críticos de ativina A, que estimulam a proliferação de células da granulosa durante a foliculogênese.

Estrógenos ambientais incluindo vários pesticidas, plastificantes e fitoestrógenos, interferem no desenvolvimento dos ovários. Esses estrógenos ambientais se ligam à receptores perinucleares, ocasionando a produção de fatores de transcrição, que induzem a síntese de várias proteínas da via normal de foliculogênese. A inibina alfa e a folistatina são exemplos de proteínas cuja síntese é estimulada. A produção aumentada

de inibina α leva a um aumento inadequado de inibina A, que atua como uma antagonista local da ativina. A folistatina também atua como antagonista local da ativina, através da ligação e inativação das moléculas de ativina A.

Finalmente, a inibição da ativina A resulta na formação de folículos multiovocitários devido ao comprometimento da proliferação das células da granulosa e possível aumento de apoptose destas células.

Considerações Finais

Nesta revisão, evidenciou-se a participação da inibina que pode atuar como um antagonista local da ativina A por competir com o seu receptor, facilitando a formação dos folículos multiovocitários. Têm-se sugerido que desreguladores endócrinos com atividade estrogênica poderiam levar à alteração da fertilidade, tal como tem sido relatado em animais silvestres e em roedores, utilizados como modelos experimentais em laboratório. Entretanto, mais estudos são necessários para investigar o mecanismo molecular na indução do desenvolvimento folicular e aparecimento de MOFs, bem como até que ponto a presença de grande quantidade de MOFs poderia comprometer a fertilidade feminina.

Referências bibliográficas

ATTISANO L, SILVESTRI C, IZZI L, LABBE E. The transcriptional role of Smads and FAST (FoxH1) in TGF beta and activin signalling. *Mol Cell Endocrinol*, v. 180, p. 3-11, 2001.

BARNETT KR, SCHILLING CCR, GREENFELD CR, TOMIC D, FLAWS JA. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod*, v.12, p. 537-555, 2006.

BEG MA, GINTHER OJ. Follicle selection in cattle and horse: role of intrafollicular factors. *Soc Reprod Fertil*, v. 132, p. 365-377, 2006.

BERNARD DJ, CHAPMAN SC, WOODRUFF TK. An emerging role for co-receptors in inhibin signal transduction. *Mol Cell Endocrinol*, v. 180, p. 55-62, 2001.

BILEZIKJIAN LM, BLOUNT AL, LEAL AMO, DONALDSON CJ, FISCHER WH, VALE WW. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol*, v. 225, p. 29-36, 2004.

BRISTOL-GOULD A, WOODRUFF TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, v. 66, p. 5-13, 2006.

BRISTOL-GOULD A, KREEGER PK, SELKIRK CG, KILEN SM, COOK RW, KIPP JL, SHEA LD, MAYO KE, WOODRUFF TK. Postnatal regulation of germ cells by activin: The establishment of the initial follicle pool. *Dev Biol*, v. 298, p. 132-148, 2006.

BURATINI Jr. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.190-196, 2007.

CHEN Y, JEFFERSON WN, NEWBOLD RR, PADILLA-BANKS E, PEPLING ME. Estradiol, Progesterone, and Genistein Inhibit Oocyte Nest Breakdown and Primordial Follicle Assembly in the Neonatal Mouse Ovary *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology*, v. 148, p. 3580-3590, 2007.

ELVIN AJ, MATZUK MM. Mouse models of ovarian failure. *J Reprod Fertil*, v. 3, p. 183-195, 1998.

ETHIER JF, FINDLAY JK. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction*, v. 121, p. 667-75, 2001.

FAIR T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, v.78, p. 203-216, 2003.

FAUSER BCJM, VAN HEUSDEN AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev*, v. 18, p. 71-106, 1997.

GOUGEON A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, v. 17, p. 121-155, 1996.

GRAY PC, BILEZIKJIAN LM, VALE W. Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan-glycan. *Mol Cell Endocrinol*, v. 180, p. 47-53, 2001.

GUILLETTE Jr LJ, MOORE BC. Environmental contaminants, fertility, and multioocytic follicles: a lesson from wildlife? *Semin Reprod Med*, v. 24, p. 134- 141, 2006.

HAFEZ ESE, HAFEZ B. *Reprodução animal*. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

JEFFERSON WN, PADILLA-BANKS E, NEWBOLD RR. Disruption of the female reproductive system by the phytoestrogen genistein. *Reprod Toxicol*, v. 23, p. 308-316, 2007.

JONES RL, SALAMONSEN LA, ZHAO YC, ETHIER JF, DRUMOND AE, FINDLAY JK. Expression of activin receptors, follistatin and betaglycan by human endometrial stromal cells consist with a role for activins during decidualization. *Mol Hum Reprod*, v. 8, p. 363-374, 2002b.

KIDDER GM, MHAWI AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, v.123, p. 613, 2002.

KIM H, HAYASHIA S, CHAMBONB P, WATANABEC H, IGUCHIC T, SATOA T. Effects of diethylstilbestrol on ovarian follicle development in neonatal mice. *Reprod Toxicol*, v. 27, p. 55-62, 2008.

KNIGHT PG, GLISTER C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, v. 132, p. 191-206, 2006.

KIPP JL, KILEN SM, BRISTOL-GOULD S, WOODRUFF TK, MAYO KE. Neonatal Exposure to Estrogens Suppresses Activin Expression and Signaling in the Mouse Ovary. *Endocrinology*, v. 148, p. 1968-1976, 2007.

LIN SY, MORRISON JR, PHILLIPS DJ, KRETSEY DM . Regulation of ovarian function by the TGF- β superfamily and follistatin. *Reproduction*, v. 126, p. 133-158, 2003.

MANNIKKO M, TORMALA RM, TUURI T, HALTIA A, MARTIKAINEN H, ALA-KOKKO L, TAPANAINEN JS, LAKKAKORPI JT. Association between sequence variations in genes encoding human zona pellucida glycoproteins and fertilization failure in IVF. *Hum Reprod*, v. 20, p.1578-85, 2005.

MARTINS FS, SILVA JRV, RODRIGUES APR, FIGUEIREDO JR. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 32, p.36-49, 2008.

MARTINS DA SILVA SJ, BAYNE RAL, CAMBRAY N, HARTLEY PS, MCNEILLY AS, ANDERSON RA. Expression of activin subunits and receptors in the developing human ovary: activin A promotes germ cell survival and proliferation before primordial follicle formation. *Dev Biol*, v. 266, p. 334-345, 2004.

MAYO K, JAMESON L, WOODRUFF TK. Eggs in the Nest. *Endocrinology*, v. 148, p. 3577-3579, 2007.

NASCIMENTO LLO. Detecção de ativina A e folistatina no sangue menstrual: comparação entre mulheres sadias e portadoras de sangramento uterino disfuncional. 2006. 63f. Dissertação de Mestrado em Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Medicina, Belo Horizonte, 2006.

PAYAN-CARREIRA R, PIRES MA. Multioocyte follicles in domestic dogs: A survey of frequency of occurrence. *Theriogenology*, v. 69, p. 977-982, 2008.

PHILLIPS DJ, DE KRETSEY DM. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol*, v. 19, p. 287-322, 1998.

RACOWSKY C, GELETY TJ. Principles of Medical Biology. The Biology of the Ovary, JAI press Inc, v. 12, p.77-102, 1998.

RANKIN TL, O'BRIEN M, LEE E, WIGGLESWORTH K, EPPIG J, DEAN J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development*, v. 128, p. 1119-1126, 2001.

SENEDA MM, BORDIGNON V. Novos conceitos em foliculogênese. PUBVET, Londrina, v. 2, p. 13, set. 4, 2007. Disponível em <http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=88> Acesso em 02/06/09.

SILVA JRV, VAN DEN HURK R, VAN TOL HTA, ROELEN BAJ, FIGUEIREDO JR. Gene expression and protein localisation for activin - a, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *J Endocrinol*, v. 183, p. 405-15, 2004.

SKINNER MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, v. 11, p. 461-471, 2005.

SPEROFF L, FRITZ MA. *Clinical gynecologic and endocrinology and infertility*, 7th ed. Lippincot Willian and Wilkins, Philadelphia, USA, 2005.

VAN DEN HURK R, ABIR R, TELFER EE, BEVERS MM. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum Reprod Update*, v. 6, p. 457-474, 2000.

VAN DEN HURK R, ZHAO J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

WELT CK, PAGAN YL, SMITH PC, RADO KB, HALL J. Control of follicle-stimulating hormone by estradiol and inhibins: critical role of estradiol at the hypothalamus during the luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 88, p. 1766-1771, 2003.

ARTIGO 2
HISTOMORFOMETRIA OVARIANA DE CAMUNDONGAS APÓS
TRATAMENTO PROLONGADO COM ACETATO DE
MEDROXIPROGESTERONA

Manuella Carvalho da Costa.¹, Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado², Raphael Teixeira Melo³, Mariana Ferreira Lanna⁴, Sérgio Luis Pinto da Matta², Tarcizio Antonio Rego de Paula².

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento prolongado com o progestágeno acetato de medroxiprogesterona sobre a histomorfometria ovariana de camundongas. Foram utilizadas 24 fêmeas nulas, com 60 dias de idade, distribuídas nos seguintes grupos: 1- Controle (n=8) sem tratamento com acetato de medroxiprogesterona (MPA); 2- Tratado com 0,06 mg de MPA/animal (n=8); 3- Tratado com 0,12 mg de MPA/animal (n=8). Nos grupos tratados, cada fêmea recebeu uma dose de MPA, a cada 15 dias, por via subcutânea, sempre no período do diestro, totalizando 90 dias de experimento (6 doses). Após a última dose de MPA, as camundongas foram submetidas à eutanásia no período do diestro. Realizou-se a microtomia seriada do ovário esquerdo de cada camundonga, obtendo-se cortes com 4 µm de espessura que foram corados com azul de toluidina e borato de sódio a 1%. A análise morfométrica consistiu na avaliação quantitativa de folículos primordiais, primários unilaminares, multilaminares, pré-antrais, antrais e atresicos, na determinação do diâmetro das diversas categorias de folículos e respectivos ovócitos, além da proporção volumétrica dos seguintes constituintes: folículos, estroma do córtex ovariano e região medular. A frequência de folículos primários unilaminares e pré-antrais foi maior ($P<0,05$) nos grupos tratados, não havendo diferença entre os grupos para outras categorias de folículos, indicando que o tratamento com o MPA não prejudicou o recrutamento inicial de folículos primordiais. A proporção volumétrica da região medular ovariana foi maior nos grupos tratados, sugerindo uma possível reorganização entre as regiões cortical e medular em decorrência da inibição de ovulação pelo MPA.

Palavras chave: acetato de medroxiprogesterona, ovário, folículos ovarianos, recrutamento inicial.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os anticoncepcionais que contêm apenas progestágenos vêm sendo muito utilizados devido à sua alta eficácia e baixa contra-indicação. Além disso, os progestágenos podem ser prescritos para pacientes que estão amamentando ou que apresentam doenças, cuja evolução poderá se agravar com terapia exclusivamente estrogênica (FRASER & WEISBERG, 1981).

Na categoria de anticoncepcionais hormonais injetáveis, à base de progestágeno, o acetato de medroxiprogesterona (MPA) é um dos contraceptivos mais utilizados, tanto na clínica médica humana quanto na medicina veterinária, sendo aplicado em mulheres na fase folicular do ciclo a cada três meses, enquanto que em cadelas é administrado na fase do anestro, devendo ser repetida a cada seis meses (LUCAS et al., 2000/01; RATHKE et al., 2001).

O acetato de medroxiprogesterona ou acetato de 17- α -hidroxi-progesterona, é um derivado sintético da progesterona que apresenta atividade progestacional prolongada quando administrado por via intramuscular. Seu efeito contraceptivo ocorre pela inibição da produção das gonadotrofinas hipofisárias, LH e FSH, que por sua vez previne a maturação folicular e ovulação, além de promover um aumento da viscosidade do muco cervical e inibir a contratilidade do miométrio (RATHKE et al., 2001; SCHINDLER et al., 2003; HICKEY & SALAMONSEN, 2008).

De modo geral, os contraceptivos podem apresentar vários efeitos indesejáveis. Uma queixa freqüentemente relatada por usuárias que fazem tratamento contínuo com o MPA é o tempo necessário para que seja restabelecida a função ovariana e fertilidade após a suspensão do tratamento, que pode variar de três meses a um ano (RATHKE et al., 2001). Já em gatas e cadelas, a estimulação contínua com MPA predispõe ao desenvolvimento de hiperplasia endometrial cística e piometrite, além da ocorrência de tumores mamários. Com base nestes relatos, o objetivo deste trabalho foi avaliar por métodos histomorfométricos os efeitos do tratamento prolongado com MPA sobre a reserva folicular ovariana de camundongas adultas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizadas 24 camundongas albino suíço, nulíparas, com 60 dias de idade e provenientes do biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As camundongas foram mantidas no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição da UFV e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da UFV (Processo 54/2009). Durante o período experimental as camundongas foram mantidas em gaiolas individuais, sob condições de fotoperíodo controlado (claro/escuro de 12h/12h), temperatura entre 22 e 24°C, com água e ração comercial *ad libitum*.

Após verificação da regularidade do ciclo estral, através de exame colpocitológico, as fêmeas foram distribuídas de modo aleatório nos seguintes grupos: 1) Controle: receberam seis doses de 0,06 ml de água destilada, por via subcutânea (n=8); 2) 0,06 mg (ou 2 mg/Kg) de MPA/fêmea (n=8) e 3) 0,12 mg (ou 4 mg/Kg) de MPA/fêmea (n=8). Nos grupos tratados, cada fêmea recebeu uma dose de MPA¹, PROMONE-E[®], PFIZER por via subcutânea a cada 15 dias, sempre no período do diestro, totalizando 90 dias de experimento (6 doses). O PROMONE-E[®] encontra-se disponível sob a forma de suspensão aquosa estéril, em embalagem de 1ml com 50 mg. Essa suspensão foi diluída em água destilada, de maneira que as fêmeas do grupo 2 recebessem doses de 2mg/Kg e as do grupo 3, doses de 4 mg/Kg.

2.2. Colheita dos ovários

As camundongas controle e dos grupos tratados foram submetidas à eutanásia por deslocamento cervical, sempre no período do diestro. Após a obtenção do peso da camundonga em balança digital (0,01g), foi feita uma incisão abdominal sobre a linha Alba, do púbis até a cartilagem xifóide, para a exposição do conteúdo abdominal e localização dos órgãos internos do aparelho reprodutor. Em seguida, os ovários foram removidos sob lupa e pesados em balança digital (0,01g). A partir dos valores de peso corporal e peso ovariano, calculou-se o índice gonadosomático (IGS) através da seguinte fórmula:

¹ PROMONE-E[®] Pfizer S.A., São Paulo, Brasil.

$$\text{IGS} = \frac{\text{PG}}{\text{PC}} \times 100$$

onde:

PG = somatória do peso dos dois ovários

PC = peso corporal

Os ovários foram fixados por imersão em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,4 0,1mol L⁻¹.

2.3. Processamento histológico

Após 12 horas de fixação, os ovários foram transferidos para uma solução de álcool etílico 70%. Apenas o ovário esquerdo de cada fêmea foi submetido ao processo de desidratação em série etanólica crescente e posterior inclusão em resina à base de glicol-metacrilato (Historesin®, Leica). Antes da desidratação, o ovário foi seccionado de maneira longitudinal mediana com o auxílio de uma lâmina de aço. Na inclusão, as duas metades de cada ovário foram orientadas com as faces de seccionamento voltadas para baixo, posicionando-se uma metade ao lado da outra. A microtomia foi realizada em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut, Germany), obtendo-se cortes seriados de 4 µm de espessura, que foram ordenados em lâminas histológicas previamente limpas e identificadas. Em cada lâmina, foram colocadas três fileiras de cortes, sendo cada fileira composta de um mínimo de seis e no máximo de oito cortes. A coloração das preparações foi feita com azul de toluidina/borato de sódio a 1% e, para montagem permanente das preparações, utilizou-se o meio Entellan-Merck®.

2.4. Análise morfométrica

2.4.1. Frequência absoluta de folículos ovarianos

Utilizando o microscópio Olympus BX-40 e objetivas de 10, 20 e 40X foi determinada a frequência absoluta de folículo primordial, primário unilaminar e multilaminar, pré-antral, antral e atrésico em dez cortes do ovário esquerdo de cada fêmea. O reconhecimento de cada tipo de folículo foi baseado na descrição apresentada na tabela 1, preconizada por FLAWS et al. (1997).

Foram contados todos os folículos com ovócito visível. O primeiro corte analisado foi estabelecido na primeira lâmina obtida na microtomia e os cortes

subseqüentes foram analisados, respeitando-se o intervalo de 80 μm . Estes cortes também foram utilizados em outras análises, e por isso foram circulados em cada lâmina com caneta de retroprojeto para facilitar sua posterior identificação. Para cada tipo ou categoria de folículo, realizou-se a somatória dos valores encontrados nos dez cortes.

Tabela 1. Classificação dos tipos de folículos com base na morfologia das células foliculares, células da teca e aparecimento do antro (FLAWS et al., 1997).

<i>Tipos de folículos</i>	
<i>Primordial</i>	Ovócito envolvido por uma camada de células foliculares pavimentosas
<i>Unilaminar</i>	Ovócito circundado por uma única camada de células foliculares pavimentosas e cúbicas ou totalmente cúbicas
<i>Multilaminar</i>	Ovócito envolto por diversas camadas foliculares, mas sem a presença de antro e células da teca em torno do folículo
<i>Pré-antral</i>	Ovócito envolvido por até cinco camadas de células foliculares, líquido antral entre estas células e teca organizada
<i>Antral</i>	Mais de quatro camadas de células da granulosa, antro bem desenvolvido e teca
<i>Atrésico</i>	Presença de núcleos picnóticos e/ ou corpos apoptóticos entre as células da granulosa, separação das células da granulosa da membrana basal e alterações na forma do ovócito

2.4.2. Diâmetro dos folículos

Realizou-se o registro das imagens microscópicas, utilizando-se o fotomicroscópio Olympus BX-60, objetiva de 20X e o sistema de captura *QCapture* versão 1.91.0. Através do programa de análise *Image Pro Plus®* versão 4.5 para Windows 98, determinou-se o diâmetro de 30% da média obtida no grupo para folículos primordiais, primários unilaminares, primários multilaminares, pré-antrais e antrais. Estes percentuais foram definidos após o estudo de frequência dos folículos, nos diferentes estágios de desenvolvimento, nos cortes de ovário dos três grupos estudados. Em cada folículo primordial e primário unilaminar foram traçadas duas linhas que passavam pelo centro do folículo e terminavam na membrana basal que apóia o epitélio folicular ou a granulosa. O diâmetro de cada folículo, expresso em micrômetros, foi obtido pela média do comprimento das duas linhas traçadas. O mesmo procedimento

foi adotado para medir o diâmetro do ovócito. Já nos folículos em crescimento, multilaminar, pré-antral e antral, foram utilizadas quatro linhas passando pelo centro, obtendo-se posteriormente uma média destas quatro linhas. As medidas destes folículos foram obtidas com e sem a teca e o diâmetro do ovócito foi determinado com e sem a zona pelúcida.

2.4.3. Proporção volumétrica dos componentes ovarianos

Para cálculo da proporção volumétrica dos componentes ovarianos, foram obtidas imagens panorâmicas dos dez cortes de ovário/camundonga, utilizando-se o fotomicroscópio Olympus AXC-70, objetiva de 4 X e o sistema de captura SPOT, versão 3.5.9. Uma gradícula composta por 96 intersecções foi aplicada sobre as imagens (Fig. 1). Foram computados os pontos coincidentes sobre o estroma ovariano (epitélio de revestimento, albugínea ovariana e tecido conjuntivo intersticial) folículos e região medular. Foram contados todos os pontos que incidiram sobre o corte do ovário, totalizando-se 960 pontos por camundonga (96 pontos x 10 cortes).

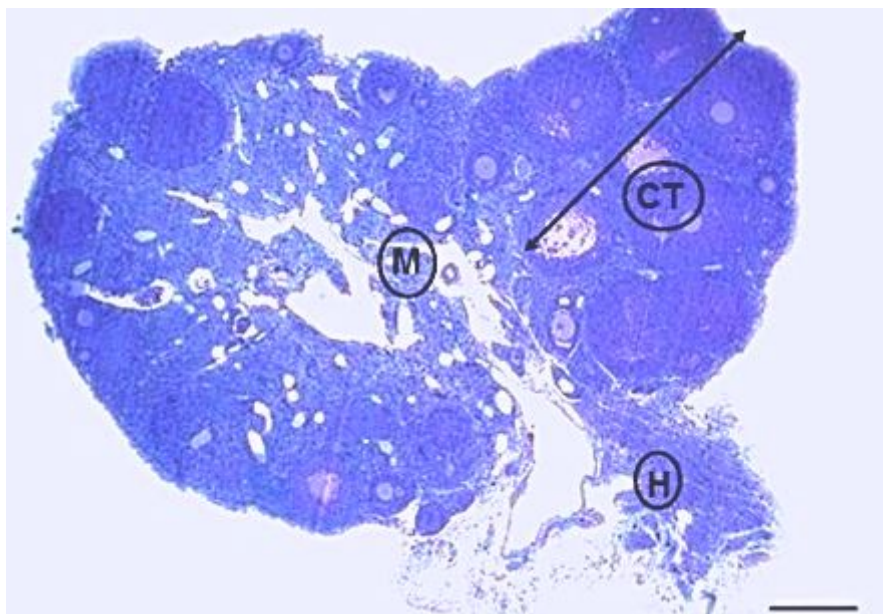


Figura 1: Corte longitudinal do ovário esquerdo de camundonga Albino Suíço do grupo 3. No ovário observa-se a medula (M), o hilo (H) e a região cortical (CT) repleta de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento. Coloração: Azul de Toluidina-Borato de Sódio. Barra: 300 μ m.

2.4.4. Volume do ovário

Para o cálculo do volume do ovário foi mensurada as suas dimensões de comprimento, largura e espessura com auxílio do programa *Image ProPlus*, versão 4.5 para *Windows 98*. Estas dimensões foram utilizadas através da fórmula: $V = 4/3\pi (A.B.C)$, onde A representa a metade do comprimento, B a metade da largura e C a metade da espessura (MOREIRA et al., 1997; MASCARENHAS et al., 2006).

2.5. Análise estatística

Os valores obtidos foram representados através de suas médias $\pm$ desvio-padrão. Para comparação entre médias, utilizou-se o teste de Student Newman-Keuls a 5% de significância, através do software STATISTICA em ambiente *Windows 98*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Índices biométricos

Os valores médios dos pesos corporais, inicial e final, peso ovariano, índice gonadosomático e volume do ovário encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Peso corporal inicial e final, peso do ovário (PO) direito (D) e esquerdo (E), índice gonadosomático (IGS) e volume do ovário (VO) de camundongas submetidas ao tratamento prolongado com MPA.

		<i>Grupos</i>		
		<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>
<i>Peso corporal inicial (g)</i>		16,28 $\pm$ 2,34 ^a	16,98 $\pm$ 2,12 ^a	17,39 $\pm$ 1,54 ^a
<i>Peso corporal final (g)</i>		29,65 $\pm$ 2,83 ^a	32,84 $\pm$ 5,35 ^a	29,48 $\pm$ 2,97 ^a
<i>PO (mg)</i>	D	5,99 $\pm$ 1,99 ^a	7,43 $\pm$ 2,03 ^a	5,73 $\pm$ 1,65 ^a
	E	5,32 $\pm$ 1,90 ^a	6,91 $\pm$ 1,20 ^a	5,70 $\pm$ 1,17 ^a
<i>IGS (%)</i>		0,038 $\pm$ 0,012 ^a	0,043 $\pm$ 0,005 ^a	0,034 $\pm$ 0,011 ^a
<i>VO (ml)</i>		0,016 $\pm$ 0,007 ^a	0,013 $\pm$ 0,004 ^a	0,013 $\pm$ 0,005 ^a

Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$).

Observou-se que os valores obtidos para o peso corporal ao final do tratamento foram maiores que no início do tratamento, mas não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$). O aumento do peso corporal é relatado em alguns estudos de acompanhamento de pacientes que fizeram uso de contraceptivos somente à base de progestágenos (SIVIN, 2003; BERENSON et al., 2008). Contudo, vários fatores podem contribuir para esse resultado, dentre eles, a faixa etária das pacientes, o perfil lipídico da população analisada, a dose utilizada e a classe do progestágeno usado, com propriedade androgênica ou não (MAINWARING et al., 1995; CURTIS et al., 2009). MAINWARING et al. (1995) não encontraram diferença significativa para o ganho de peso em 22 pacientes tratadas com acetato de medroxiprogesterona de depósito, o que é concordante com os resultados obtidos no presente estudo.

Também não foi observada diferença ($P>0,05$) entre o peso e volume dos ovários dos animais, bem como do índice gonadossomático dos diferentes grupos, o que indica homogeneidade para essas características entre os animais.

3.2. Análise Morfométrica

3.2.1. Frequência absoluta de folículos ovarianos

Os valores médios da frequência absoluta de folículos ovarianos encontram-se na tabela 3 e os tipos de folículos analisados são apresentados na figura 2.

Tabela 3. Frequência absoluta de folículos primordiais (F_P), primários unilaminares (F_{PU}), primários multilaminares (F_{PM}), pré-antrais (F_{PA}), antrais (F_A) e atresícos (F_{Attr}) no ovário esquerdo de camundongas tratadas por tempo prolongado com o MPA.

<i>Tipo de Folículo</i>	<i>Grupos</i>		
	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>
F_P	44,20 ± 14,65 ^a	51,63 ± 28,16 ^a	60,00 ± 29,23 ^a
F_{PU}	47,40 ± 17,82 ^a	122,13 ± 30,58 ^c	92,88 ± 29,14 ^b
F_{PM}	36,30 ± 10,68 ^a	24,38 ± 10,46 ^a	27,00 ± 17,52 ^a
F_{PA}	14,60 ± 6,52 ^a	32,13 ± 12,30 ^b	31,13 ± 12,25 ^b
F_A	11,60 ± 4,40 ^a	14,38 ± 5,48 ^a	13,63 ± 6,19 ^a
F_{Attr}	10,40 ± 4,72 ^a	16,75 ± 9,18 ^a	19,13 ± 9,34 ^a

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p>0,05$)

Não foram verificadas diferenças significativas ($P>0,05$) em relação à frequência absoluta de folículos primordiais entre os três grupos (Tab. 3). Sabe-se que o *pool* de ovócitos no ovário de camundongas é estabelecido no período neonatal, para formar a reserva ovariana, da qual os folículos serão recrutados para o crescimento e posterior ovulação ou atresia durante a vida reprodutiva (MCGEE & HSUEH, 2000; MARTINS et al., 2008).

Resultado diferente foi obtido com a frequência de folículos primários unilaminares e pré-antrais. Nestes, as médias obtidas para os grupos tratados foram maiores que o grupo controle ($p<0,05$).

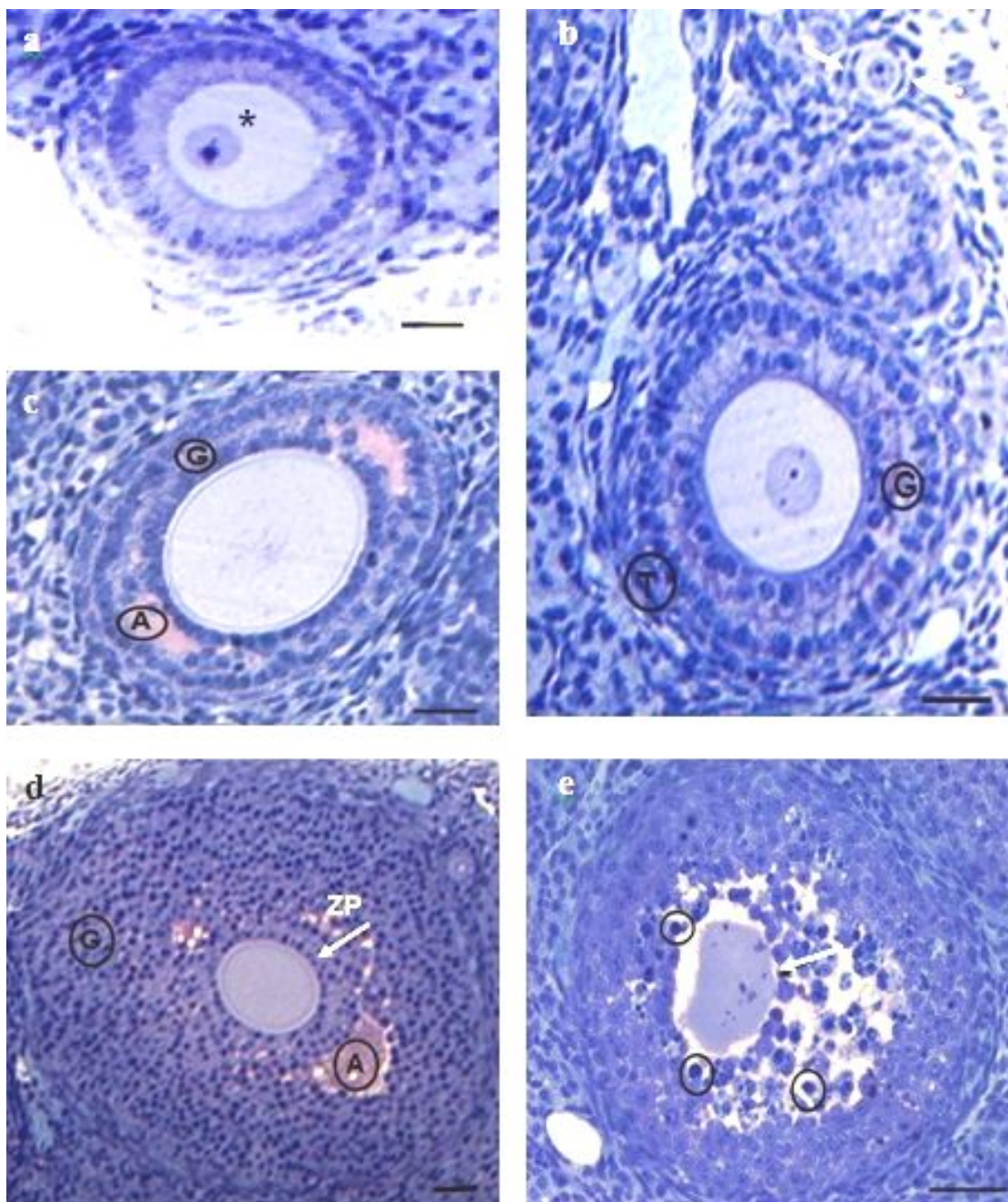


Figura 2: Fotomicrografia de ovário de camundonga do grupo tratado 3. a- Folículo unilaminar contendo um ovócito (*) circundado por células foliculares cúbicas. b- Folículo primordial apresentando células foliculares pavimentosas (setas) e folículo multilaminar com as regiões da granulosa (G) e da teca (T). c- Folículo pré-antral, observa-se o antro (A) entre as células da granulosa (G). d- Folículo antral, com ovócito envolvido pela zona pelúcida (ZP). e- Folículo atrésico com alteração na forma do ovócito (seta) e corpos apoptóticos na região da granulosa (círculos). Coloração: Azul de Toluidina-Borato de Sódio. Barra: a= 30 μ m; b-e = 50 μ m.

As médias de folículos antrais e atrésicos não apresentaram diferenças nos três grupos estudados ($P>0,05$). Com a chegada da puberdade, alguns folículos antrais são resgatados pelas gonadotrofinas circulantes e continuam a crescer pelo recrutamento cíclico (MCGEE & HSUEH, 2000). Os folículos, cujo desenvolvimento não está em sincronia com os eventos hormonais do ciclo estral, entram em atresia (HIRSHFIELD, 1988). Em função do efeito antigonadotrófico do MPA não foi observado aumento de folículos antrais nas camundongas tratadas quando comparadas com as classes anteriores de folículos. O tratamento prolongado com MPA aparentemente não causou aumento de atresia folicular.

No presente estudo foi observada a ocorrência escassa de folículos multiovocitários, também referidos como poliovulares, nos três grupos experimentais. Esses folículos são caracterizados por dois ou mais ovócitos circundados por uma ou mais camadas de células da granulosa, sendo observados com maior frequência em animais recém nascidos e jovens do que em animais mais velhos. Embora seu significado permaneça obscuro e pouco freqüente, estes folículos já foram descritos em roedores, cadelas, coelhas, gatas e jacarés fêmeas. Têm-se sugerido que desreguladores endócrinos com atividade estrogênica poderia levar ao aparecimento desses folículos multiovocitários, tal como tem sido relatado em camundongas e ratas tratadas com dietilbestrol, no período neonatal, e em jacarés fêmeas residentes em regiões contaminadas por agrotóxicos, como o bisfenol e o endosulfan (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006; GUILLETTE Jr & MOORE, 2006; PAYAN-CARREIRA & PIRES, 2008; STOKER et al., 2008). Na pesquisa de histomorfometria ovariana realizada por LANNA (2009), verificou-se a presença de folículos multiovocitários no ovário de camundongas com 30, 70 e 180 dias de idade.

O valor percentual de cada tipo de folículo foi também calculado, a partir do total de folículos encontrados (Tab. 4).

A porcentagem de folículos primordiais, pré-antrais, antrais e atrésicos não apresentou diferença estatística entre os três grupos, diferente do observado para os folículos primários unilaminares, onde o grupo 2 apresentou porcentagem maior quando comparado ao grupo 1 e 3 ($P<0,05$). Quanto aos folículos multilaminares foi observado porcentagem significativamente menor nos grupos tratados com MPA em relação ao controle, não havendo diferença entre eles.

Tabela 4. Porcentagem de folículos primordiais (F_P), primários unilaminares (F_{PU}), primários multilaminares (F_{PM}), pré-antrais (F_{PA}), antrais (F_A) e atresicos (F_{Atr}) no ovário esquerdo de camundongas tratadas por tempo prolongado com o MPA.

<i>Tipo de Folículo</i>	<i>Grupos</i>		
	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>
F_P	26,47% $\pm$ 5,55 ^a	19,46% $\pm$ 9,43 ^a	24,58% $\pm$ 9,81 ^a
F_{PU}	28,24% $\pm$ 5,85 ^a	50,67% $\pm$ 15,55 ^b	38,25% $\pm$ 9,29 ^a
F_{PM}	22,59% $\pm$ 5,92 ^a	9,22% $\pm$ 3,55 ^b	10,63% $\pm$ 4,03 ^b
F_{PA}	8,91% $\pm$ 3,26 ^a	12,35% $\pm$ 4,17 ^a	13,20% $\pm$ 4,73 ^a
F_A	7,15% $\pm$ 2,28 ^a	5,40% $\pm$ 1,31 ^a	5,59% $\pm$ 1,97 ^a
F_{Atr}	6,64% $\pm$ 3,30 ^a	6,34% $\pm$ 2,99 ^a	7,71% $\pm$ 2,90 ^a

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$)

Os valores de frequência folicular expressos em porcentagens, não são rotineiros em estudos morfométricos com ovários de camundongas. Entretanto, num estudo realizado por LANNA (2009) verificou-se que a apresentação da análise quantitativa de folículos expresso em porcentagem produz valores de desvio padrão com uma dispersão menor quando comparados aos valores absolutos. Concordando com LANNA (2009), no presente estudo foram observados resultados semelhantes entre as tabelas 3 e 4.

3.2.2. Diâmetro dos Folículos e Ovócitos

Os diâmetros dos folículos primordiais, bem como de seus respectivos ovócitos, foram significativamente maiores no grupo tratado 3, em relação ao controle e ao grupo tratado 2 ($p < 0,05$) (Tab. 5). Os diâmetros dos folículos unilaminares não foram diferentes entre os três grupos. Mesmo havendo variação entre os valores de alguns diâmetros entre os grupos, ao comparar os resultados obtidos neste trabalho com estudos histomorfométricos em camundongos, observa-se que os valores dos diâmetros de folículos e ovócitos encontrados são semelhantes (MCGEE & HSUEH, 2000; BALIGAR & KALIWAL, 2004; GRIFFIN et al., 2006).

Tabela 5. Diâmetro do folículo (fol) e do ovócito (ov) em folículos primordiais (F_P) e primários unilaminares (F_{PU}) no ovário esquerdo de camundongas tratadas por tempo prolongado com o MPA, expressos em µm.

Tipo de folículo		Grupos		
		G1	G2	G3
F_P (µm)	fol	23,70 ± 0,85 ^a	24,53 ± 2,16 ^{ab}	25,58 ± 1,69 ^b
	ov	16,42 ± 0,93 ^a	17,75 ± 1,76 ^{ab}	18,59 ± 1,65 ^b
F_{PU} (µm)	fol	42,87 ± 5,45 ^a	38,80 ± 3,56 ^a	38,11 ± 2,52 ^a
	ov	24,71 ± 2,80 ^a	22,20 ± 1,74 ^a	22,47 ± 1,13 ^a

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si (p>0,05)

Os valores dos diâmetros de folículos multilaminares, com e sem a teca folicular, foram menores nos grupos tratados com MPA, bem como o diâmetro de seus respectivos ovócitos com e sem a zona pelúcida (P<0,05) (Tab. 6). Sendo ainda que entre os grupos tratados, o diâmetro do folículo multilaminar com teca do grupo 3 apresentou-se estatisticamente menor que o grupo tratado 2. Os diâmetros dos folículos antrais iniciais sem a teca foram menores no grupo 3 do que no grupo 1, mas não houve diferença quanto ao grupo 2. Os diâmetros destes folículos com a teca não foram significativos estatisticamente entre os três grupos. O diâmetro dos ovócitos sem a zona pelúcida foi significativamente menor no grupo 3 do que no grupo 1. Com relação aos folículos antrais, foi observado que os diâmetros destes folículos, com e sem a teca foram maiores nos grupos tratados em relação ao controle (P<0,05). Já os diâmetros dos ovócitos sem e com a zona pelúcida não apresentaram diferenças estatísticas (p>0,05).

Tabela 6. Diâmetro do folículo (fol), sem teca (s/ t) e com teca (c/ t), e diâmetro dos ovócitos (ov), sem zona pelúcida (s/zp) e com zona pelúcida (c/zp), nos folículos primários multilaminares (F_{PM}); pré-antrais (F_{PA}) e antrais (F_A) no ovário esquerdo de camundongas tratadas por tempo prolongado com o MPA, expressos em μm .

Tipo de folículo			Grupos		
			G1	G2	G3
F_{PM}	fol	s/ t	117,45 $\pm$ 7,26 ^a	99,25 $\pm$ 6,32 ^b	93,04 $\pm$ 4,20 ^b
		c/ t	137,09 $\pm$ 9,26 ^a	122,41 $\pm$ 6,22 ^b	114,67 $\pm$ 5,45 ^c
	ov	s/ zp	56,59 $\pm$ 3,97 ^a	45,85 $\pm$ 5,48 ^b	45,24 $\pm$ 5,32 ^b
		c/ zp	61,56 $\pm$ 3,90 ^a	54,56 $\pm$ 5,21 ^b	53,69 $\pm$ 6,29 ^b
F_{PA}	fol	s/ t	134,86 $\pm$ 10,99 ^a	127,87 $\pm$ 7,85 ^{ab}	119,16 $\pm$ 6,19 ^b
		c/ t	158,28 $\pm$ 11,88 ^a	152,32 $\pm$ 8,20 ^a	145,65 $\pm$ 8,34 ^a
	ov	s/ zp	61,22 $\pm$ 4,84 ^a	57,50 $\pm$ 6,15 ^{ab}	52,82 $\pm$ 4,57 ^b
		c/ zp	67,03 $\pm$ 5,11 ^a	67,68 $\pm$ 5,87 ^a	63,04 $\pm$ 5,55 ^a
F_A	fol	s/ t	258,19 $\pm$ 58,08 ^a	320,30 $\pm$ 23,46 ^b	320,00 $\pm$ 43,01 ^b
		c/ t	296,73 $\pm$ 62,27 ^a	365,02 $\pm$ 23,75 ^b	359,15 $\pm$ 44,53 ^b
	ov	s/ zp	68,93 $\pm$ 5,70 ^a	66,99 $\pm$ 11,39 ^a	65,59 $\pm$ 7,96 ^a
		c/ zp	74,88 $\pm$ 6,11 ^a	78,69 $\pm$ 10,76 ^a	77,15 $\pm$ 7,13 ^a

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$)

3.2.3. Proporção volumétrica dos componentes ovarianos

Os resultados obtidos para a proporção volumétrica dos componentes do ovário estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Proporção volumétrica dos componentes do ovário esquerdo de camundongas tratadas por tempo prolongado com o MPA: folículos primordiais (F_P), primários unilaminares (F_{PU}), primários multilaminares (F_{PM}), pré-antrais (F_{PA}), antrais (F_A), atrésicos (F_{Atr}) e folículos sem o ovócito presente no corte ($F_{S/OV}$); estroma ovariano (E) e região medular do ovário (M).

<i>Componentes</i>	<i>Grupos</i>		
	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>
F_P	0,17% $\pm$ 0,14 ^a	1,26% $\pm$ 1,34 ^b	1,27% $\pm$ 0,60 ^b
F_{PU}	0,52% $\pm$ 0,36 ^a	2,66% $\pm$ 2,57 ^b	1,12% $\pm$ 0,49 ^a
F_{PM}	4,50% $\pm$ 1,27 ^a	1,50% $\pm$ 0,57 ^b	2,31% $\pm$ 0,95 ^b
F_{PA}	2,86% $\pm$ 1,03 ^a	1,84% $\pm$ 1,07 ^a	2,11% $\pm$ 1,09 ^a
F_A	4,36% $\pm$ 1,77 ^a	6,38% $\pm$ 1,99 ^{ab}	7,68% $\pm$ 3,70 ^b
F_{Atr}	2,12% $\pm$ 1,73 ^a	1,54% $\pm$ 0,83 ^a	1,39% $\pm$ 0,65 ^a
$F_{S/OV}$	14,95% $\pm$ 3,67 ^a	10,70% $\pm$ 3,91 ^a	10,92% $\pm$ 5,61 ^a
<i>E</i>	52,91% $\pm$ 6,95 ^a	42,63% $\pm$ 8,65 ^b	45,85% $\pm$ 8,22 ^{ab}
<i>M</i>	15,17% $\pm$ 6,24 ^a	31,46% $\pm$ 2,98 ^b	27,34% $\pm$ 5,33 ^b

Letras iguais nas linhas não diferem significativamente entre si ($p>0,05$).

A proporção volumétrica dos folículos primordiais foram maiores nos grupos tratados com MPA, porém não houve variação entre eles. A proporção dos folículos unilaminares foi significativamente maior no grupo tratado 2. Com relação aos folículos multilaminares, observou-se uma proporção estatisticamente menor nos grupos tratados com MPA. Os valores referentes aos folículos antrais são significativamente maiores no grupo tratado 3, porém não houve diferença do grupo tratado 2. As proporções dos folículos pré-antrais, atrésicos e que não apresentavam ovócitos visíveis no corte não foram significativas estatisticamente em nenhum dos grupos. A proporção de estroma ovariano foi significativamente menor no grupo tratado 2 quando comparado ao grupo controle, porém não apresentou variação quando comparado ao grupo tratado 3. Em relação à região medular do ovário, os grupos tratados com MPA apresentaram médias significativamente maiores quando comparados ao grupo controle, não apresentando diferenças entre os dois outros grupos ($p>0,05$).

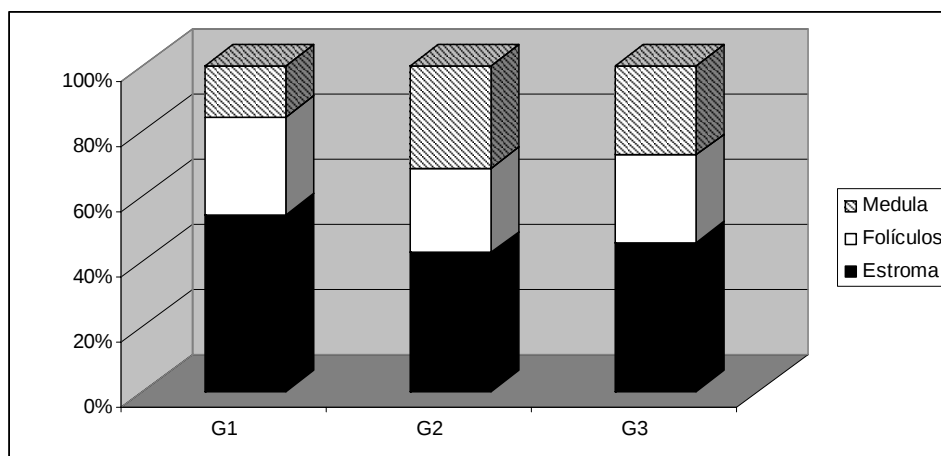


Figura 3: Proporção volumétrica dos constituintes ovarianos de camundongas tratadas por tempo prolongado com o MPA (G1, G2 e G3 respectivamente): estroma ovariano, foliculos ovarianos e região medular (medula).

4. CONCLUSÕES

O tratamento prolongado com acetato de medroxiprogesterona em camundongas não prejudicou o recrutamento inicial de foliculos primordiais, e a população de foliculos íntegros em estágio avançado de desenvolvimento foi semelhante entre grupos controle e tratados. Nas camundongas tratadas com MPA, houve aumento significativo da proporção volumétrica da região medular ovariana, o que pode sugerir uma reorganização entre as regiões cortical e medular do ovário em decorrência da inibição de ovulação pelo MPA. O reconhecimento morfológico de foliculos atresicos não revelou diferenças significativas entre os grupos controle e tratados, o que somado aos valores biométricos do ovário das camundongas tratadas, é sugestivo de que as doses de MPA utilizadas neste estudo não comprometeram a integridade dos foliculos ovarianos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALIGAR, P. N.; KALIWAL, B.B. Temporal effect of carbofuran on estrous cycle compensatory ovarian hypertrophy and follicles in hemiovariectomized albino mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 15, n. 2, p. 71-77, 2004.

BERENSON, A.B.; ODOM, S.D.; BREIKOPF, C.R.; RAHMAN, M. Physiologic and psychological symptoms associated with use of injectable contraception and 20 microg oral contraceptive pills. **American Journal Obstetrics & Gynecology**, v. 199, n. 4, p. 351-342, 2008.

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

CURTIS, K. M.; RAVI, A.; GAFFIELD, M.L. Progestogen-only contraceptive use in obese women. **Contraception**, v. 80, n. 4, p. 346-354, 2009.

FLAWS, J. A.; ABBUD, R.; MANN, R. J.; NILSON, J. H.; HIRSHFIELD, A. N. Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 5, p. 1233-1237, 1997.

FRASER, I. S.; WEISBERG, E. A comprehensive review of injectable contraception with special emphasis on depot medroxyprogesterone acetate. **Medical Journal of Austrália**, v. 24, n.1, p.3-19, 1981.

GRIFFIN, J.; EMERY, B.R.; HUANG, I.; PETERSON, C. M.; CARRELL, D.T. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig and human). **Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction**, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2006.

GUILLETTE Jr, L. J.; MOORE, B. C. Environmental contaminants, fertility, and multioocytic follicles: a lesson from wildlife? **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 24, n. 3, p. 134-141, 2006.

HIRSHFIELD, A. N. Size-Frequency Analysis of Atresia in Cycling Rats. **Biology of Reproduction**, v. 38,n. 5, p. 1181-1188, 1988.

HICKEY, M.; SALAMONSEN, L. A. Endometrial structural and inflammatory changes with exogenous progestogens. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n.5, p. 167-174, 2008.

LANNA, M. F. **Estudo morfométrico do desenvolvimento folicular ovariano de camundongas albino suíço**. 2009. 48f. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

LUCAS, S. S.; OLIVEIRA, A. L. L.; SCHOSSLER, J. E. W. Piometrite em cães e gastos: revisão de 103 casos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 7/8, n.1, p. 99-103, 2000/01.

MAINWARING, R.; HALES, H.A.; STEVENSON, K.; HATASAKA, H.H.; POULSON, A.M.; JONES, K.P.; PETERSON, C.M. Metabolic Parameter, Bleeding, and Weight Changes in U.S. Women Using Progestin Only Contraceptives. **Contraception**, v. 51, n. 3, 149-153, 1995.

MARTINS, F. S.; SILVA J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista brasileira de reprodução animal**, v. 32, n. 1, p. 36-39, 2008.

MASCARENHAS, R. M; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; LANNA, L. L.; FONSECA, C.C.; NEVES, M. T. D. Morfometria macro e microscópica e índices somáticos dos componentes testiculares de cães sem raça definida, do período púbere à senilidade. **Revista Ceres**, v. 53, p. 106-112, 2006.

MCGEE, E. A., HSUEH, A. J. W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 2, p. 200–214, 2000.

MOREIRA, J. R.; MACDONALD, D. W. CLARKE, J. R. Correlates of testis mass in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*): dominance assurance or sperm production? **Journal of Zoology**, v. 241, n. 3, p. 457-463, 1997.

PAYAN-CARREIRA, R.; PIRES, M.A. Multioocyte follicles in domestic dogs: A survey of frequency of occurrence. **Theriogenology**, v. 69, n. 8, p. 977-982, 2008.

RATHKE, A. F.; POESTER, D.; LORENZATTO, J. F.; SCHMIDT, V. B.; HERTER, L. D. Contracepção hormonal contendo apenas progesterona. **Adolescência Latinoamericana**, v. 2, n. 2, p. 90-96, 2001.

SCHINDLER, A. E., CAMPAGNOLI, C.; DRUCKMANN, R.; HUBER, J.; PASQUALINI, J. R. ; SCHWEPPE, K. W.; THIJSEN, J. H. H. Classification and Pharmacology of Progestins. **Maturitas**, 36S1, p. S7-S16, 2003.

SIVIN, I. Risks and benefits, advantages and disadvantages of levonorgestrel-releasing contraceptive implants. **Drug Safety**, v. 26, n. 5, p. 303-35, 2003.

STOKER, C., BELDOMÉNICO, P. M., BOSQUIAZZO, V. L., ZAYAS, M. A., REY, F., RODRÍGUEZ, H., MUÑOZ-DE-TORO, M., LUQUE, E. H. Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 156, n. 3, p. 603-612, 2008.

ARTIGO 3
INFLUÊNCIA DO ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA SOBRE O
CICLO ESTRAL E A HISTOMORFOMETRIA UTERINA DE
CAMUNDONGAS

Manuella Carvalho da Costa.¹, Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado², Raphael Teixeira Melo³, Mariana Ferreira Lanna⁴, Sérgio Luis Pinto da Matta², Tarcizio Antonio Rego de Paula².

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do acetato de medroxiprogesterona (MPA) sobre o ciclo estral e a histomorfometria uterina de camundongas. Foram utilizadas 18 fêmeas nulíparas, com 60 dias de idade, distribuídas nos seguintes grupos: 1) controle, sem tratamento com MPA; 2) dose de 0,06 mg de MPA/animal; 3) dose de 0,12 mg de MPA/animal. Nos grupos tratados, cada fêmea recebeu uma dose de MPA por via subcutânea a cada 15 dias, sempre no período do diestro, totalizando 90 dias de experimento (6 doses). Todas as fêmeas foram submetidas à eutanásia no período do diestro. Fragmentos dos cornos uterinos foram fixados em solução tamponada de paraformaldeído a 4% e incluídos em resina à base de glicol-metacrilato. Cortes semi-seriados e transversais do corno uterino direito, com 4 µm de espessura, foram corados com solução de azul de toluidina/borato de sódio. A análise histomorfométrica consistiu na determinação da espessura do endométrio e miométrio, além da proporção volumétrica dos seguintes constituintes: glândulas uterinas, conjuntivo da lâmina própria, artérias, veias, capilares e polimorfonucleares. As fêmeas do grupo 3, após a última dose de MPA, apresentaram maior duração do diestro. O acetato de medroxiprogesterona causou atrofia das glândulas uterinas, fenômeno que determinou a diminuição da espessura do endométrio nos dois grupos tratados. O MPA também promoveu aumento de capilares sanguíneos e de polimorfonucleares no conjuntivo endometrial.

Palavras chave: acetato de medroxiprogesterona, endométrio, ciclo estral, miométrio, progesterona.

1. INTRODUÇÃO

Dentro da designação de progestágenos são incluídas a progesterona e as progestinas sintéticas, sendo estes hormônios que atuam na regulação do ciclo reprodutivo feminino (SCHINDLER et al., 2003; RUIZ PARRA, 2004). A progesterona é naturalmente produzida pelo corpo lúteo, pela placenta e em pequenas quantidades pelo córtex da adrenal (SCHINDLER et al., 2003). Já as progestinas sintéticas, de acordo com a molécula da qual são derivadas, podem estar, em princípio, estruturalmente relacionadas à testosterona ou progesterona.

O acetato de medroxiprogesterona (MPA) ou acetato de 17- α -hidroxi-progesterona é a progestina injetável mais utilizada na clínica médica. É um derivado sintético da progesterona que apresenta atividade prostacional prolongada quando administrada por via intramuscular, resultando principalmente na inibição da ovulação, aumento da viscosidade do muco cervical e inibição da contratilidade do miométrio (RATHKE et al., 2001; SCHINDLER et al., 2003; HICKEY & SALAMONSEN, 2008).

A diversidade de progestinas sintéticas está intimamente associada ao aperfeiçoamento da tecnologia contraceptiva e da terapia de reposição hormonal, sempre na busca de fármacos que não apresentem efeitos indesejáveis. Na contracepção hormonal, o papel fundamental das progestinas é inibir a ovulação. Os estrógenos, quando associados às fórmulas dos contraceptivos, diminuem o risco de sangramento uterino, causado pelo progestágeno, e potencializam o efeito inibitório da ovulação. Na terapia de reposição hormonal, as progestinas oferecem proteção endometrial ao evitando a hiperplasia e o adenocarcinoma do endométrio (RUIZ PARRA, 2004).

A ação dos contraceptivos que contêm apenas progestágenos depende de vários fatores. Dentre eles: a classe molecular do progestágeno, se semelhante à progesterona ou à testosterona, a dose utilizada e as características farmacocinéticas do progestágeno, as quais podem envolver vários aspectos como: a rota de administração, absorção, metabolismo no trato gastro-intestinal, distribuição e armazenamento nos tecidos, ligação a proteínas séricas, inativação e conjugação (SITRUK-WARE, 2004).

O MPA é utilizado no manejo reprodutivo de espécies domésticas, principalmente cadelas, sendo administrado na fase do anestro. Para assegurar a inibição contínua do estro por um longo prazo, a administração do MPA deve ser repetida a cada seis meses. O principal efeito adverso deste progestágeno em cadelas, principalmente

quando sob uso contínuo, é o aumento da predisposição para hiperplasia cística endometrial (HCE), que pode preceder a piometrite ou piometra, infecções caracterizadas por acúmulo de exsudato purulento no lúmen uterino (LUCAS et al., 2000/01). A HCE é uma lesão uterina, relativamente comum entre cadelas de meia idade, podendo ocorrer espontaneamente durante o metaestro e anestro (BOSSCHERE et al., 2003). BOSSCHERE et al. (2002) propuseram que o endométrio de fêmeas que desenvolvem HCE não é exposto a influência progestacional suficiente durante o início do estágio do metaestro e que os efeitos estrogênicos podem não ser adequadamente contrabalançados pela progesterona, havendo um desequilíbrio entre as concentrações de estrógeno/ progesterona. Os mesmos autores também demonstraram que ocorre aumento da expressão de receptores para estrógeno e progesterona em diferentes tipos celulares da parede uterina de cadelas com HCE espontânea. Apesar da constatação de que o uso contínuo de MPA pode aumentar o risco de predisposição à hiperplasia cística endometrial, ainda assim a patogênese da síndrome HCE/piometrite não se resume apenas à ação do progestágeno sobre o endométrio, havendo outras moléculas e eventos envolvidos neste processo. O desenvolvimento da piometrite, por exemplo, pode estar associado a características específicas de determinadas bactérias invasoras. Algumas metaloproteinases existentes na matriz do conjuntivo, conhecidas por atuarem na remodelação do endométrio humano na fase menstrual, não estão elevadas na HCE canina, mas apresentam níveis aumentados no endométrio da cadela com HCE/piometrite. Além disso, IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1), um potente estimulador da proliferação endometrial, é expresso em quantidades elevadas no endométrio de cadelas com HCE (SCHLAFFER & GIFFORD, 2008).

Considerando a importância dos contraceptivos que hoje são amplamente utilizados, inclusive a partir da adolescência, realizou-se o presente estudo com o objetivo de analisar a influência do tratamento com acetato de medroxiprogesterona sobre o ciclo estral e o útero de camundongas nulíparas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e Grupos Experimentais

As camundongas foram mantidas no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da UFV (Processo 54/2009). Foram utilizadas 18 camundongas albino suíço, nulíparas, com 60

dias de idade e provenientes do biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Durante o período experimental as camundongas foram mantidas em gaiolas individuais, sob condições de fotoperíodo controlado (claro/escuro de 12h/12h), temperatura entre 22 e 24°C, com água e ração comercial *ad libitum*.

Após verificação da regularidade do ciclo estral, através de exame colpocitológico, as fêmeas foram distribuídas de modo aleatório nos seguintes grupos: 1) Controle, onde elas receberam seis doses de 0,06 mL de água destilada, por via subcutânea (n=6); 2) 0,06 mg (ou 2 mg/Kg) de MPA/fêmea (n=6) e 3) 0,12 mg (ou 4 mg/Kg) de MPA/fêmea (n=6). Nos grupos tratados, cada fêmea recebeu uma dose de MPA¹ (PROMONE-E[®], PFIZER) por via subcutânea a cada 15 dias, sempre no período do diestro, totalizando 90 dias de experimento (6 doses). O PROMONE-E[®] encontra-se disponível sob a forma de suspensão aquosa estéril, em uma embalagem de 1mL com 50 mg. Essa suspensão foi diluída em água destilada, de maneira que as fêmeas do grupo 2 recebessem doses de 2mg/Kg e as do grupo 3, doses de 4 mg/Kg.

2.2. Exame colpocitológico

Na realização do exame colpocitológico foi utilizada uma haste flexível e revestida com algodão que, após ser umedecida em solução salina, foi cuidadosamente introduzida no canal vaginal da camundonga para obtenção do material. Em seguida, o material foi espalhado sobre uma lâmina histológica, sendo a preparação fixada em álcool 95°. Após coloração com HE, as lâminas foram analisadas em microscópio binocular Olympus BX-41, objetiva de 40X, para diagnóstico das fases do ciclo estral.

Durante o experimento foram realizados exames colpocitológicos a cada 15 dias antes de cada aplicação do MPA, para assegurar que a medicação seria aplicada sempre no período de diestro. Além disso, foram realizados três períodos de avaliação contínua para o monitoramento do ciclo estral. As avaliações consistiram na obtenção diária dos esfregaços sempre no mesmo horário, durante 10 dias antes do início do tratamento com o MPA, durante 15 dias após a primeira dose de MPA, e durante 15 dias após a última dose de MPA.

¹ PROMONE-E[®] Pfizer S.A., São Paulo, Brasil.

2.3. Avaliação do ciclo estral

A classificação das fases do ciclo estral foi realizada de acordo com NELSON et al. (1982) (Tab. 1).

Tabela 1. Classificação dos estágios do ciclo estral com base na morfologia celular dos esfregaços colpocitológicos.

<i>Estágio do ciclo celular</i>	<i>Tipo celular*</i>		
	<i>Leucócitos</i>	<i>Células epiteliais nucleadas</i>	<i>Células epiteliais queratinizadas</i>
<i>Proestro</i>	0	+ / +++ (Predominantes)	0 a +
<i>Estro</i>	0	0	++ a +++
<i>Metaestro</i>	0 a ++	0	++ a +++ Achatadas e agrupadas
<i>Diestro</i>	+ a +++	+ [Formato irregular e vacuolizadas]	0

*Densidade celular: 0 = ausência; + = poucas; ++ = frequência moderada; +++ = frequência elevada.

2.4. Colheita dos órgãos

As camundongas do grupo controle e dos grupos tratados foram submetidas à eutanásia por deslocamento cervical, sempre no período do diestro. Após a obtenção do peso da camundonga em balança digital (0,01g), foi feita uma incisão abdominal sobre a linha Alba, do púbis até a cartilagem xifóide, para a exposição do conteúdo abdominal e localização dos órgãos internos do aparelho reprodutor, que foram cuidadosamente dissecados. Em seguida, os cornos uterinos foram fixados por imersão em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,4 0,1mol L⁻¹.

2.5. Processamento histológico

Após 24 horas de fixação, os cornos uterinos foram transferidos para uma solução de álcool etílico a 70% e fragmentos da região intermediária do lado uterino direito foram incluídos em historesina (LEICA). A microtomia foi realizada em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut, Germany), obtendo-se cortes

transversais de 4 µm de espessura, semi-seriados, com intervalo mínimo de 80 µm entre cortes. Os cortes corados com solução de azul de toluidina e borato de sódio foram analisados com objetivas de 4 e 10X (zoom 1,25) em microscópio Olympus AX70 acoplado a uma câmara de captura de imagens com o programa SPOT versão 3.5.9.

2.6. Análise histomorfométrica

Todas as medidas da análise histomorfométrica foram feitas com auxílio do programa *Image ProPlus*, versão 4.5 para *Windows 98*.

2.6.1. Espessura do endométrio e miométrio

A espessura do endométrio foi determinada pela distância compreendida entre a superfície livre do epitélio endometrial e o limite da lâmina própria com o miométrio. Para a determinação da espessura do miométrio, foram consideradas as duas camadas de tecido muscular liso, circular interna e longitudinal externa. Utilizaram-se quatro secções transversais/camundonga e em cada uma delas foram feitas quatro medidas diametralmente opostas para o endométrio e quatro medidas diametralmente opostas para o miométrio. Portanto, a espessura do endométrio para cada fêmea foi obtida pela média de 16 medidas, o mesmo acontecendo para a determinação da espessura do miométrio.

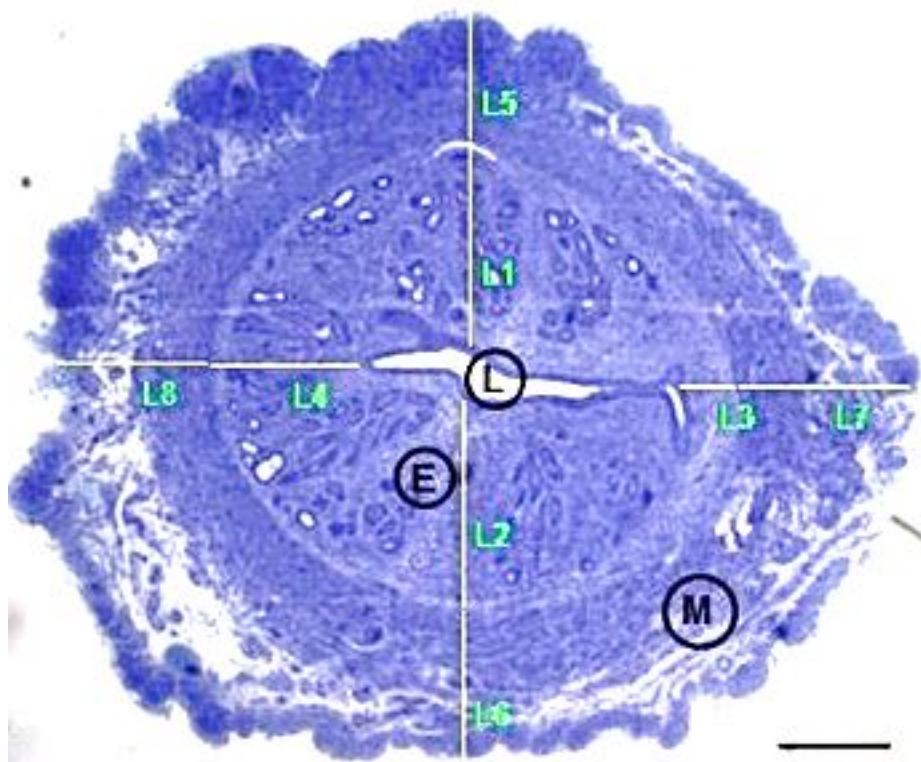


Figura 1: Medidas da espessura do endométrio e miométrio de camundonga do grupo tratado 2. (L1),(L2),(L3),(L4) medidas da espessura do endométrio; (L5),(L6),(L7),(L8) medidas da espessura do miométrio; (E) endométrio; (L) luz uterina; (M) miométrio. Coloração: Azul de Toluidina - Borato de sódio. Barra: 300 μ m.

2.6.2. Proporção volumétrica dos constituintes endometriais

Para a proporção volumétrica dos constituintes do endométrio foram utilizados quatro cortes transversais por animal, sendo a imagem de cada corte subdividida em quatro quadrantes. No endométrio de cada quadrante, foi aplicada uma área de interesse na forma de um quadrado, com 350 μ m de lado e contendo 50 pontos. Foram computados os pontos coincidentes sobre glândulas uterinas, conjuntivo da lâmina própria, artérias, veias, capilares e polimorfonucleares, totalizando-se 800 pontos por camundonga (50 pontos x 4 quadrantes x 4 cortes).

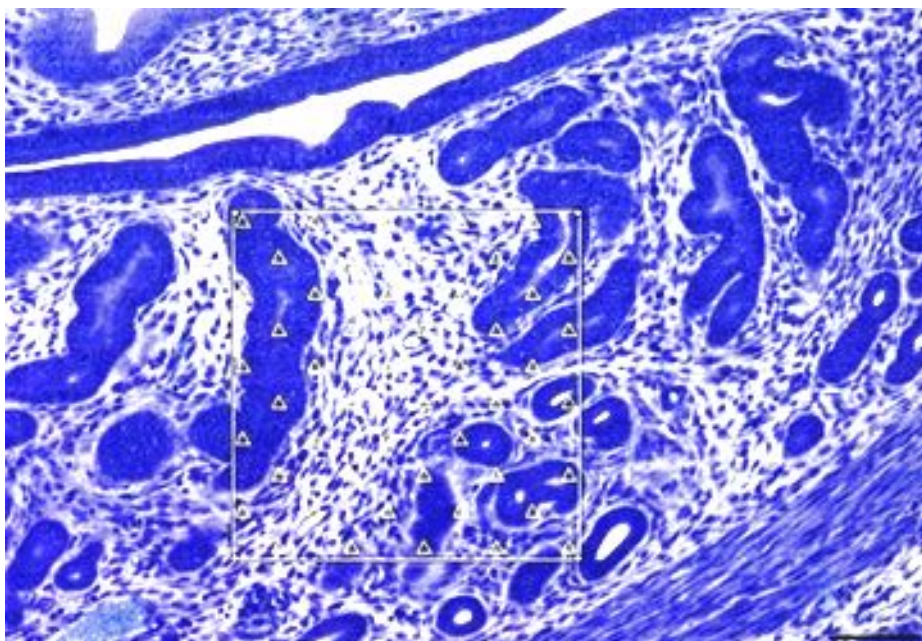


Figura 2: Proporção volumétrica dos constituintes endometriais. Os pontos contados localizam-se no ápice dos indicadores. Coloração: Azul de Toluidina - Borato de sódio. Barra: 100 μ m.

2.7. Análise estatística

Os valores obtidos foram representados através de suas médias $\pm$ desvio-padrão. Para comparação entre médias utilizou-se o teste de Student Newman-Keuls a 5% de significância, através do software STATISTICA em ambiente Windows 98.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Peso corporal

Os valores médios dos pesos corporais das camundongas encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Peso corporal inicial e final, das camundongas do grupo controle e dos grupos tratados com acetato de medroxiprogesterona (MPA).

<i>Grupos</i>	<i>Peso corporal inicial (g)</i>	<i>Peso corporal final (g)</i>
1 (n=6)	16,28 ± 2,34 ^a	29,99 ± 2,42 ^a
2 (n=6)	16,98 ± 2,12 ^a	30,98 ± 4,24 ^a
3 (n=6)	17,39 ± 1,54 ^a	29,18 ± 3,49 ^a

Média ± Desvio Padrão. Grupo 1: fêmeas não tratadas com MPA; Grupo 2: 0,06 mg de MPA/fêmea ; Grupo 3: 0,12 mg/ de MPA/fêmea. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (P > 0,05).

Os resultados obtidos no presente trabalho não indicaram aumento do peso corporal de camundongas tratadas com MPA em relação ao controle (Tab. 2). O aumento do peso corporal é relatado em alguns estudos de acompanhamento de pacientes que fizeram uso de contraceptivos somente à base de progestogênio (SIVIN, 2003; BERENSON et al., 2008). Contudo, vários fatores podem contribuir para esse resultado, dentre eles, a faixa etária das pacientes e perfil lipídico da população analisada (CURTIS et al., 2009). Segundo MAINWARING et al. (1995), o progestágeno pode influenciar no ganho de peso e em parâmetros metabólicos, como triglicerídeos e lipoproteínas de alta e baixa densidade, na dependência da dose utilizada e de acordo com a classe de progestágeno, com propriedade androgênica ou não. Os mesmos autores não encontraram diferença significativa para ganho de peso em 22 pacientes tratadas com MPA de depósito, o que é concordante com os resultados obtidos no presente estudo.

3.2. Ciclo estral

Os resultados obtidos para o número de ciclos e duração de cada fase do ciclo estral, em cada período de avaliação, estão representados na tabela 3.

Tabela 3. Número de ciclos estrais e duração em dias de cada fase do ciclo estral, antes do início do tratamento, após a primeira aplicação do MPA e após a última aplicação do MPA.

<i>Animais</i>	<i>1º período de avaliação: 10 dias (sem tratamento)</i>				
	<i>nº de ciclos</i>	<i>Proestro</i>	<i>Estro</i>	<i>Metaestro</i>	<i>Diestro</i>
G1	2,16 ± 0,75 ^a	1,50 ± 1,04 ^a	6,00 ± 1,41 ^a	1,16 ± 0,98 ^a	1,33 ± 0,81 ^a
G2	3,33 ± 0,51 ^a	0,80 ± 0,36 ^a	5,60 ± 0,81 ^a	2,50 ± 1,64 ^a	1,83 ± 1,16 ^a
G3	3,00 ± 0,40 ^a	1,33 ± 1,86 ^a	4,66 ± 1,96 ^a	2,66 ± 1,03 ^a	1,33 ± 1,50 ^a
<i>Animais</i>	<i>2º período de avaliação: 15 dias (1ª aplicação)</i>				
	<i>nº de ciclos</i>	<i>Proestro</i>	<i>Estro</i>	<i>Metaestro</i>	<i>Diestro</i>
G1	3,83 ± 0,75 ^a	0,66 ± 0,81 ^a	4,83 ± 2,92 ^a	6,50 ± 2,50 ^a	3,00 ± 1,67 ^a
G2	4,33 ± 0,51 ^a	2,83 ± 1,94 ^a	4,50 ± 1,51 ^a	3,16 ± 1,16 ^b	4,00 ± 3,22 ^a
G3	3,83 ± 0,40 ^a	1,33 ± 1,21 ^a	5,60 ± 2,33 ^a	2,83 ± 1,47 ^b	5,16 ± 2,56 ^a
<i>Animais</i>	<i>3º período de avaliação: 15 dias (6ª aplicação)</i>				
	<i>nº de ciclos</i>	<i>Proestro</i>	<i>Estro</i>	<i>Metaestro</i>	<i>Diestro</i>
G1	3,66 ± 0,81 ^a	1,60 ± 0,08 ^a	5,16 ± 2,31 ^a	4,33 ± 1,03 ^a	3,83 ± 2,31 ^a
G2	4,16 ± 0,40 ^a	2,83 ± 1,94 ^a	4,50 ± 1,51 ^a	3,16 ± 1,16 ^a	4,00 ± 3,22 ^a
G3	2,83 ± 1,47 ^a	0,83 ± 0,98 ^a	2,83 ± 4,02 ^b	3,33 ± 3,32 ^a	8,00 ± 5,76 ^b

Média ± Desvio Padrão. Grupo 1: fêmeas não tratadas com MPA; Grupo 2: 0,06 mg de MPA/fêmea ; Grupo 3: 0,12 mg/ de MPA/fêmea. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (P > 0,05).

Durante o primeiro período de avaliação não se verificou diferença na duração de cada fase do ciclo estral entre os três grupos (Tab. 3). Foi observado que todas as camundongas apresentavam ciclos estrais regulares, sem alterações na duração de cada fase do ciclo.

No segundo período de análise dos esfregaços vaginais, verificou-se uma redução da duração do metaestro nos grupos tratados com MPA. Já no terceiro e último período de avaliação, houve uma redução significativa da duração do estro e um aumento significativo da duração do diestro para as fêmeas que receberam maior dose de MPA (grupo 3).

MENDONÇA et al. (2007) trabalhando com camundongas, notaram que o uso do acetato de medroxiprogesterona nas doses de 0,75 mg e 1,5 mg por animal, levaram as camundongas à ausência de ciclicidade. Neste contexto, no grupo 3 do presente estudo, duas camundongas após a última dose de MPA permaneceram em diestro, durante todo o período de avaliação.

Segundo VALENTE et al. (1998), desde que o acetato de medroxiprogesterona começou a ser utilizado como contraceptivo, houve pouco interesse na avaliação dos

efeitos do MPA sobre a colpocitologia. Os mesmos autores, ao analisar esfregaços cervicais de pacientes tratadas com acetato de medroxiprogesterona de depósito, relataram a ocorrência freqüente de células epiteliais atípicas, semelhantes àquelas encontradas na metaplasia escamosa.

3.3. Espessura do endométrio e miométrio

Os resultados obtidos para a espessura do endométrio e miométrio estão representados na tabela 4.

Tabela 4. Espessura do endométrio e miométrio de camundongas do grupo controle e dos grupos tratados com o acetato de medroxiprogesterona.

<i>Animais</i>	<i>Espessura do endométrio (μm)</i>	<i>Espessura do miométrio (μm)</i>
Grupo 1 (n=6)	724,90 ± 319,92 ^a	763,04 ± 245,31 ^a
Grupo 2 (n=6)	481,79 ± 182,97 ^b	463,57 ± 53,01 ^a
Grupo 3 (n=6)	520,47 ± 240,61 ^b	539,08 ± 268,85 ^a

Média ± Desvio Padrão. Grupo 1: fêmeas não tratadas com MPA; Grupo 2: 0,06 mg de MPA/fêmea ; Grupo 3: 0,12 mg/ de MPA/fêmea. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (P > 0,05).

Nos animais tratados observou-se atrofia endometrial em relação aos animais controle (Fig.3). Os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados por KAUNITZ & MISHELL (1994), PAIVA (1997) e MENDONÇA et al. (2006). PAIVA (1997) mostrou que o diagnóstico histológico do endométrio de usuárias do MPA revelou um endométrio compatível com algum sinal de atrofia em 90% das biópsias, sem, contudo, apresentar atipias endometriais, como alterações pré-malignas ou malignas. MENDONÇA et al. (2006) mostraram que a utilização do MPA em diferentes doses induziu a formação de um endométrio pouco desenvolvido e com formação de processos degenerativos. Desta forma, a atrofia endometrial pode ter ocorrido devido à ação do progestágeno em inibir a fase proliferativa endometrial, sem, contudo, induzir processo degenerativo (MENDONÇA et al., 2003).

Os progestágenos apresentam uma série de efeitos sobre o endométrio, que dependem da existência de estrogênio, do tempo de administração, do percurso do hormônio até o órgão alvo, se sistêmico ou localmente no útero, e da dose diária

disponível no organismo (SONG & FRASER, 1995; BENAGIANO et al., 2000; SCHINDLER et al., 2008). No presente estudo as doses calculadas foram estimadas segundo as utilizadas na mulher e na cadela. Com base nas informações contidas na bula, sabe-se que para cadela, a dose preconizada é de 2 a 5 mg/ kg. Já para o DepoPROVERA® (PFIZER), de uso humano, recomenda-se para uma mulher de até 70 kg a dose única de 150 mg a cada 3 meses. O acetato de medroxiprogesterona foi administrado através da via subcutânea, procurando-se criar uma situação experimental semelhante à de uma mulher que faz uso desse hormônio.

No presente trabalho não foi verificado, em nenhum dos tratamentos, qualquer sinal de metaplasia. Tais diferenças podem ser devidas às espécies utilizadas, uma vez que as respostas fisiológicas frente às terapias progestacionais ocorrem de diversas maneiras nas diferentes espécies. MENDONÇA et al. (2006) observaram hipotrofia endometrial, além de metaplasia celular para o tipo cúbico, nas ratas tratadas com acetato de medroxiprogesterona nas doses de 0,75 mg, 1,5 mg e 4,5 mg por animal.

Corroborando com essa assertiva PONTES et al. (2000), ao tratarem pacientes com hiperplasia de endométrio, constataram que o acetato de medroxiprogesterona na dose de 10mg/dia por num período de 10 dias, durante 3 a 18 meses, foi eficaz na regressão de hiperplasias sem atipias em 83,2% dos casos (35/42).

De acordo com PONTES et al. (2000) os progestágenos são potentes agentes antiestrogênicos quando utilizados em doses farmacológicas. Eles estimulam a atividade das enzimas 17 β -hidroxi esteróide desidrogenase e da sulfonil transferase, que convertem o estradiol em sulfato de estrona, o qual é rapidamente excretado da célula. Os progestágenos também diminuem os efeitos dos estrogênios sobre as células-alvo, pela inibição da expressão dos receptores estrogênicos. Além disso, suprimem a transcrição de oncogenes mediada pelos estrogênios, levando a um efeito antimitótico ou antiproliferativo das células endometriais. Em função destes efeitos, o MPA é eficaz no tratamento das hiperplasias de endométrio revertendo a maioria das lesões hiperplásicas (HORN et al., 2004; RATTANACHAIYANONT et al., 2005). A amenorréia comumente relatada por mulheres durante o tratamento com o MPA (HACHER, 1992) pode ser devido à atrofia endometrial (PAIVA, 1997).

Não foi observada diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados em relação à espessura do miométrio. Segundo FLEISCHER et al. (2008), a progesterona pode estimular a proliferação de células de leiomioma, principalmente na presença de estrógeno. Contudo, o efeito mais conhecido da progesterona e de outros

progestogênios sobre o miométrio é inibir a contração das células musculares lisas. JEYASURIA et al. (2009) relacionaram as elevadas concentrações de progesterona na gravidez com a atividade também aumentada de caspase 3, que atua como agente inibidor da contração no miométrio, por promover a lise das proteínas que formam os filamentos contráteis.

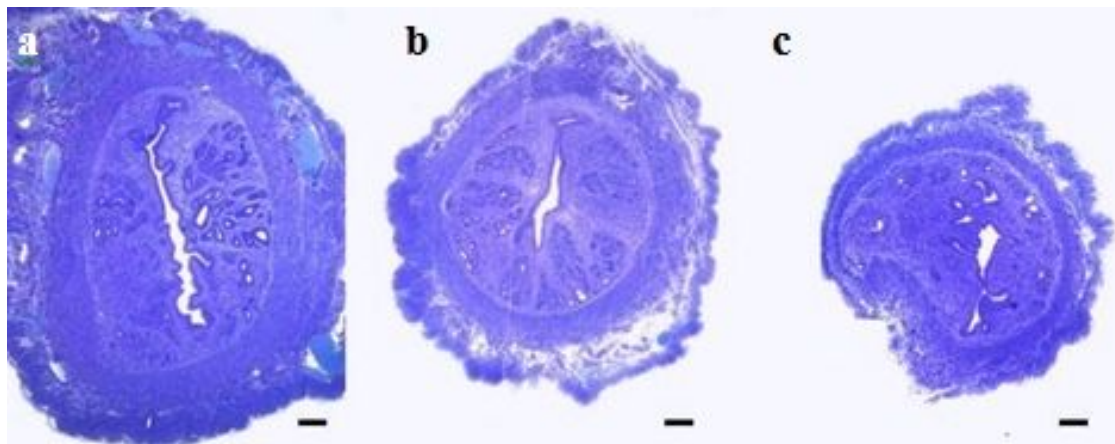


Figura 3: Corte transversal do corno uterino direito de camundongas Albino Suíço. a- grupo controle; b- grupo 2 (tratado com 2mg/kg de MPA), grupo 3 (tratado com 4mg/kg de MPA). Coloração: Azul de Toluidina-Borato de Sódio. Barra: 300 µm.

3.4. Proporção volumétrica

Os resultados obtidos para a proporção volumétrica dos constituintes do endométrio estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Proporção volumétrica dos constituintes do endométrio das camundongas do grupo controle e dos grupos tratados com o acetato de medroxiprogesterona.

<i>Animais</i>	<i>Glândulas endometriais</i>	<i>TC</i>	<i>PM</i>	<i>Artérias</i>	<i>Veias</i>	<i>Capilares</i>
Grupo 1 (n=6)	37,51% ± 41,32 ^a	60,23% ± 31,77 ^a	1,42% ± 4,60 ^a	0,06% ± 0,83 ^a	0,62% ± 3,12 ^a	0,19% ± 0,83 ^a
Grupo 2 (n=6)	27,29% ± 45,03 ^b	67,77% ± 52,04 ^a	3,10% ± 9,62 ^b	0,28% ± 1,72 ^a	0,69% ± 3,77 ^a	0,84% ± 3,56 ^b
Grupo 3 (n=6)	24,81% ± 60,26 ^b	70,22% ± 60,29 ^a	2,99% ± 4,96 ^b	0,27% ± 2,09 ^a	1,09% ± 5,87 ^a	0,58% ± 1,72 ^b

Média ± Desvio Padrão. Grupo 1: fêmeas não tratadas com MPA; Grupo 2: 0,06 mg de MPA/fêmea ; Grupo 3: 0,12 mg/ de MPA/fêmea. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (P > 0,05). TC = tecido conjuntivo da lâmina própria, PM= polimorfonucleares.

As terapias contraceptivas à base de progestágenos causam alterações entre os vários componentes teciduais do endométrio (SONG & FRASER, 1995). Um aumento da densidade vascular e atrofia do endométrio foram observados em pacientes usuárias de levonorgestrel (HICKEY & FRASER, 2000). SILVERBERG et al. (1986) verificaram que o tratamento prolongado com levonorgestrel pode causar alterações no estroma endometrial com decidualização e infiltração leucocitária. Segundo CHOKSUCHAT et al. (2009) a utilização do acetato de medroxiprogesterona causa apoptose em células endoteliais do endométrio humano, o que, de certa forma, predispõe à fragilidade vascular, resultando em sangramentos anormais.

A análise quantitativa de constituintes do endométrio revelou maior proporção volumétrica de glândulas endometriais no grupo controle (Tab. 5). Esses resultados sugerem que houve pouco desenvolvimento das glândulas endometriais nos grupos experimentais, concordando com o que foi descrito por BENAGIANO et al. (2000), PONTES et al. (2000) e RATHKE et al. (2001). É também concordante com o estudo de MENDONÇA et al. (2007) que, ao utilizar 0,375 mg/animal de acetato de medroxiprogesterona em camundongas, observou pouco desenvolvimento das glândulas uterinas.

Foi observado que o acetato de medroxiprogesterona causou alterações na microvascularização endometrial, provocando aumento significativo no número de

capilares dos grupos tratados em relação ao controle. Este resultado é concordante com o estudo realizado por GIRLING et al. (2004) que verificaram aumento da densidade vascular e da imunoreatividade para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no estroma endometrial de camundongas tratadas com acetato de medroxiprogesterona e também com levonorgestrel.

Nos animais tratados, em relação ao grupo controle, observou-se maior ocorrência de polimorfonucleares no conjuntivo endometrial (Tab. 5), talvez associado a alterações de natureza estrutural e molecular na parede dos capilares, favorecendo a diapedese. Entre os grupos tratados não se observou diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$), indicando que a diferença entre as doses utilizadas talvez não influencie na migração neutrofílica para o endométrio.

4. CONCLUSÕES

O MPA nas doses de 2mg/kg e 4mg/kg causou atrofia do endométrio, sem provocar lesões degenerativas. As glândulas endometriais apresentaram redução significativa nos grupos tratados e houve aumento na frequência de capilares e polimorfonucleares no endométrio desses animais.

A utilização do acetato de medroxiprogesterona na dose de 4mg/kg, promoveu um aumento significativo no período de diestro do ciclo estral de camundongas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENAGIANO, G.; PERA, A.; PRIMIERO, F. M. The endometrium and hormonal contraceptive. **Human Reproduction**, v. 15, suppl. 1, p. 101-118, 2000.

BERENSON, A. B.; ODOM, S. D.; BREIKOPF, C. R.; RAHMAN, M. Physiologic and psychologic symptoms associated with use of injectable contraception and 20 microg oral contraceptive pills. **American Journal Obstetrics & Gynecology**, v. n. 4, 199, p. 351-342, 2008.

BOSSCHERE, H. DE.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; CORYN, M. Estrogen- α and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. **Animal Reproduction Science**, v. 70, n. 3, p. 251-259, 2002.

BOSSCHERE, H. DE.; DUCATELLE, R.; TSHAMALA, M.; CORYN, M. The use of epostane in an attempt to reproduce cyclic endometrial hyperplasia in the bicht. **Veterinay Research Communications**, v. 27, n. 7, p. 527-538, 2003.

CHOKSUCHAT, C.; ZHAO, S.; DEUTCH, T. D.; KIMBLE, T. D. ARCHER, D. F. Effects on progesterone, levonorgestrel and medroxyprogesterone acetate on apoptosis in human endothelial cells. **Contraception**, v. 79, n. 2, p. 139-145, 2009.

CURTIS, K. M.; RAVI, A.; GAFFIELD, M.L. Progestogen-only contraceptive use in obese women. **Contraception**, v. 80, n. 4, p. 346-354, 2009.

FLEISCHER, R.; WESTON, G. G.; VOLLENHOVEN, B. J.; ROGERS, P. A. Pathophysiology of fibroid disease: angiogenesis and regulation of smooth muscle proliferation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics**, v. 22, n. 4, p. 603-614, 2008.

GIRLING, J. E.; HERYANTO, B.; PATEL, N.; ROGERS, P. A.W. Effect of long-term progestin treatment on endometrial vasculature in normal cycling mice. **Contraception**, v. 70, n. 4, 70, p. 343-350, 2004.

HACHER, R.A. Contraceptive Technology. **Paperback**, 16. ed, 1992.

HICKEY, M.; FRASER, I.S. The structure of endometrial microvessels. **Human Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 57-66, 2000.

HICKEY, M.; SALAMONSEN, L. A. Endometrial structural and inflammatory changes with exogenous progestogens. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n.5, p. 167-174, 2008.

HORN, L. C.; SCHNURRBUSCH, U.; BILEK, K.; HENTSCHEL, B.; EINENKEL, J. Risk of progression in complex and atypical endometrial hyperplasia: clinicopathologic analysis in cases with and without progestogen treatment. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 14, n. 2, p. 348-353, 2004.

JEYASURIA, P.; WETZEL, J.; BRADLEY, M.; SUBEDI, K.; CONDON, J.F. Progesterone-Regulated Caspase 3 Action in the Mouse May Play a Role in Uterine Quiescence During Pregnancy through Fragmentation of Uterine Myocyte contractile Proteins. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 5, p. 928-934, 2009.

KAUNITZ, A. M; MISHELL, D. R. JR. Progestin-only contraceptives: current perspectives and future directions. **Dialogues Contracept**, v. 4, n. 2, p. 1-10, 1994.

LUCAS, S. S.; OLIVEIRA, A. L. L.; SCHOSSLER, J. E. W. Piometrite em cães e gastos: revisão de 103 casos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 7/8, n.1, p. 99-103, 2000/01.

MAINWARING, R.; HALES, H.A.; STEVENSON, K.; HATASAKA, H.H.; POULSON, A.M.; JONES, K.P.; PETERSON, C.M. Metabolic Parameter, Bleeding, and Weight Changes in U.S. Women Using Progestin Only Contraceptives. **Contraception**, v. 51, n. 3, p. 149-153, 1995.

MENDONÇA, F. S.; EVÊNCIO-NETO, BARATELLA-EVÊNCIO, L.J.; SÁ, F. B.; SIMÕES, M. J. Avaliação do ciclo estral de ratas (*Rattus norvegicus albinus*) tratadas com diferentes dosagens de acetato de medroxiprogesterona. **Arquivos do Instituto Biológicos**, v. 70, n. 3, p. 276-280, 2003 (supl.).

MENDONÇA, F. S.; EVÊNCIO-NETO, J.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, M. J. Aspectos histológicos do útero de ratas utilizadas como modelo experimental de endometrite. **Revista Brasileira de Saúde e Reprodução Animal**, v. 7, n.1, p. 47-56, 2006.

MENDONÇA, F. S.; EVÊNCIO-NETO, J. ; SIMÕES, M. J; SÁ, F. B.; CAMARGO, L. M.; BARATELLA-EVÊNCIO, L. Aspectos citopatológicos da mucosa vaginal de camundongas tratadas com progesterona. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 313-318, 2007.

NELSON, J. F. A.; FELICIO, L. S.; RANDALL, P. K.; SIMS, C.; FINCH, C. E. Longitudinal Study of Estrous Cyclicity in Aging C57BL/6J Mice: I Cycle frequency, Length and Vaginal Cytology. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 2, p. 327-339, 1982.

PAIVA, L. H. S. C. **Densidade mineral óssea de usuárias de acetato de Medroxiprogesterona injetável como anticoncepcional comparada a de não-usuárias, no menacme e na pós-menopausa**. 1997. Tese de Doutorado na área de Tocoginecologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

PONTES, A.; TRAIMAN, P.; FRANCO, M.; NAHÁS, E. A. P.; DIAS, R.; DE LUCA, L. A. Tratamento Clínico e Seguimento das Hiperplasias de Endométrio. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 22, n. 6, p. 325-331, 2000.

RATTANACHAIYANONT, M.; ANGSUWATHANA, S.; TECHATRISAK, K.; TANMAHASAMUT, P.; INDHAVIVADHANA, S.; LEERASIRI, P. Clinical and pathological responses of progestin therapy for non-atypical endometrial hyperplasia: A prospective study. **Journal of Obstetrics and Gynaecologic. Research**, v. 31, n. 2, p. 98-106, 2005.

RATHKE, A. F.; POESTER, D.; LORENZATTO, J. F.; SCHMIDT, V. B.; HERTER, L. D. Contracepção hormonal contendo apenas progesterona. **Adolescência Latinoamericana**, v. 2, n. 2, p. 90-96, 2001.

RUIZ PARRA, A.I. Pasado, presente y futuro de las progestinas. **Revista Colombiana de Obstetrícia y Ginecologia**, v. 55, n.2, p. 167-173, 2004.

SCHLAFER, D.H.; GIFFORD, A.T. Cystic endometrial hyperplasia, pseudo-placentational endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 349-358, 2008.

SCHINDLER, A. E., CAMPAGNOLI, C.; DRUCKMANN, R.; HUBER, J.; PASQUALINI, J. R. ; SCHWEPPE, K. W.; THIJSSEN, J. H. H. Classification and Pharmacology of Progestins. **Maturitas**, 36S1, p. S7-S16, 2003.

SILVERBERG, S. G.; HAUKKAMAA, M.; ARKO, H. NILSSON, C. G. LUUKKAINEN, T. Endometrial morphology during long-term use of levonorgestrel-releasing intrauterine devices. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 5, n. 3, p. 235–241, 1986.

SITRUK-WARE, R. Pharmacological profile of progestins. **Maturitas**, v. 47, n. 4, p. 277-283, 2004.

SIVIN, I. Risks and benefits, advantages and disadvantages of levonorgestrel-releasing contraceptive implants. **Drug Safety**, v. 26, n. 5, p. 303-35, 2003.

SONG, J. Y.; FRASER, I. S. Effects of progestogens on human endometrium. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 50, n. 5, p. 385-94, 1995.

VALENTE, P. T. Cytologic Changes in Cervical Smears Associated with Prolonged Use of Depot-medroxyprogesterone Acetate. **Cancer** (Cancer Cytopathology), v. 84, n.6, p. 328-334, 1998.

IV. CONCLUSÕES GERAIS

- O tratamento prolongado com MPA aumentou a frequência de folículos primários unilaminares e pré-antrais.
- As doses de MPA utilizadas nesse estudo não comprometeram a integridade dos folículos ovarianos.
- O aumento da região medular ovariana nos animais tratados com MPA sugere uma reorganização entre as regiões, cortical e medular do ovário.
- O MPA nas doses de 2mg/kg e 4mg/kg causou atrofia do endométrio, sem, entretanto, provocar lesões degenerativas. As glândulas endometriais apresentaram redução significativa nos grupos tratados, e houve aumento na frequência de capilares e polimorfonucleares no endométrio desses animais.
- A utilização do MPA na dose de 4mg/kg prolongou o período do diestro do ciclo estral de camundongas.