

MARIANA FERREIRA LANNA

**ESTUDO MORFOMÉTRICO DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR
OVARIANO DE CAMUNDONGAS ALBINO SUIÇO**

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.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

MARIANA FERREIRA LANNA

**ESTUDO MORFOMÉTRICO DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR
OVARIANO DE CAMUNDONGAS ALBINO SUIÇO**

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: 31 de julho de 2009

Prof. Sérgio Luiz Pinto da Matta
(co-orientador)

Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula
(co-orientador)

Prof. Adilson Ariza Zacaro

Profa. Luciane Cristina de Oliveira Lisboa

Profa. Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado
(Orientadora)

"De manhã escureço
De dia tardo
De tarde anoiteço
De noite ardo.
A oeste a morte
Contra quem vivo
Do sul cativo
O este é meu norte.
Outros que contem
Passo por passo:
Eu morro ontem
Nasço amanhã
Ando onde há espaço:
- Meu tempo é quando."

Vinícius de Moraes

Dedico esta dissertação à minha querida mãe,
Amada, Maria Auxiliadora Ferreira Lanna.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai pelo exemplo de humildade e respeito, que persistem em minha memória e em meu coração. À minha amada mãe por seu amor e zelo, fonte de força, simplicidade e honestidade que regem minha vida. Às minhas irmãs, Denise e Káthia pelo elo de cumplicidade e fraternidade que nos une. Aos meus cunhados, Alexsander e Varney, e meus sobrinhos, Veronna e Edson, pela amizade e torcida. À minha avó Irene, tios, Antônio e Luzia, e primos, Rogério, Maura e Bruno, pelo apoio e carinho. Enfim, a toda minha família, muito obrigada!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Governo Brasileiro por me propiciarem um ensino público e de qualidade. Ao Programa de Pós-Graduação de Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade de realização deste mestrado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido, através da bolsa de estudos.

À professora Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado orientadora e amiga. Obrigada pela orientação, pelos grandes ensinamentos, pela paciência e pelo incentivo. Sou muito grata por ter aceitado o desafio de me orientar e ter me iniciado no mundo da morfologia, um caminho verdadeiramente sem volta!

Ao professor Sérgio Luiz Pinto da Matta pela sabedoria, receptividade e disponibilidade desde a graduação. Pelo suporte e ensinamentos múltiplos, muito obrigada!

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

Ao professor Adilson Ariza Zacaro pela paciência e simplicidade! À professora Luciane Cristina de Oliveira Lisboa pela simpatia e alegria intrínsecas, pelo acolhimento e por tudo que tem me ensinado!

Ao laboratório de Biologia Estrutural, em especial aos professores Clóvis Andrade Neves e José Lino Neto e ao Sr. Alex pelo companheirismo e disponibilidade em sempre ajudar.

Aos meus colegas de república, amigos e irmãos Luana e Rafael, ao Márcio, por todo amor, carinho e cuidado, e à Flor de Ósmio, pela amizade despretensiosa. Aos grandes amigos Bola de Fogo e Madu pela convivência e pelos inesquecíveis momentos de amizade. Aos ciladianos Jane, Lílian, Sílvia, Danielle, Katiane, Sirlene e Sabrina pelas inúmeras risadas e pelo apoio. À

Manuella e ao Raphael pela ajuda na execução deste trabalho, pelos momentos compartilhados dentro e fora do laboratório!

À professora Silvia 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 espaço, seus materiais e os animais utilizados neste estudo.

Aos colegas de disciplinas e companheiros do Laboratório de Biologia Estrutural por me ajudarem sempre. Aos colegas do Setor de Morfologia e Patologia da UFOP, pelo profissionalismo e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral, em especial às funcionárias Diane e Beth, pela presteza no cumprimento de suas atividades. A Rita e Carlinhos pela alegria e simpatia na convivência com as pessoas.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Jamais esquecerei estes anos em Viçosa, não somente pelos títulos alcançados, mas principalmente pelas pessoas que ficarão para sempre em minha memória! Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Mariana Ferreira Lanna, filha de Edson Martins Lanna e Maria Auxiliadora Ferreira Lanna, nascida em Ponte Nova, MG, em 28 de Julho de 1983.

Em outubro de 2006, graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa - MG. Durante o período de graduação, de 2002 a 2006 foi estagiária do Laboratório de Biologia Estrutural, Departamento de Biologia Geral, UFV, Viçosa – MG.

Em outubro de 2006 iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, defendendo a dissertação em agosto de 2009.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO GERAL.....	4
2.1. Objetivos Específicos.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 Origem das Células Germinativas e Ovocitogênese.....	5
3.2. Recrutamento Inicial e Cíclico.....	5
3.3. Classificação	9
3.4. Ciclo Estral	10
3.5. Atresia Folicular.....	11
3.6. Morfometria ovariana.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. Obtenção dos ovários e dos índices biométricos.....	14
4.2. Processamento histológico.....	15
4.3. Análise morfométrica.....	16
4.3.1. Frequência absoluta de folículos ovarianos.....	16
4.3.2. Diâmetro dos folículos.....	16
4.3.3. Proporção volumétrica dos componentes ovarianos.....	19
4.4. Análise Estatística.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1. Índices biométricos.....	22
5.2. Análise morfométrica.....	22
5.2.1. Frequência absoluta de folículos ovarianos.....	22
5.2.2. Diâmetro de folículos e ovócitos.....	26
5.2.3. Proporção volumétrica dos componentes ovarianos.....	29
6. CONCLUSÕES.....	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

RESUMO

LANNA, Mariana Ferreira. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Estudo morfométrico do desenvolvimento folicular ovariano de camundongas Albino Suíço**. Orientadora: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Coorientadores: Sérgio Luis Pinto da Matta e Tarcízio Antônio Rego de Paula.

A análise histomorfométrica é uma das principais ferramentas no estudo do desenvolvimento folicular ovariano, principalmente em animais de experimentação. Contudo, os resultados revistos na literatura são contraditórios, principalmente no tocante à quantificação de folículos ovarianos. O presente trabalho foi realizado com um total de 29 camundongas virgens, entre pré-púberes, jovens e adultas (30, 70 e 180 dias), com o objetivo de utilizar a histomorfometria na determinação dos seguintes parâmetros: frequência absoluta de folículos ovarianos (atrésicos e não atrésicos), diâmetro de folículos e respectivos ovócitos nos estágios representativos da foliculogênese e proporção volumétrica de folículos, da região cortical (epitélio de revestimento, albugínea e conjuntivo intersticial) e medular do ovário. Foi feita a microtomia seriada do ovário esquerdo de cada camundonga, obtendo-se cortes com quatro micrômetros de espessura que foram corados com azul de toluidina e borato de sódio a 1%. Para cada fêmea, foram analisados dez cortes com intervalo de oitenta micrômetros. A determinação da frequência absoluta de folículos ovarianos, embora ofereça resultados que não são completamente concordantes com os obtidos em outros estudos, é um importante parâmetro para acompanhamento da dinâmica folicular. Os resultados de diâmetro dos folículos, em diferentes estágios de desenvolvimento, mostraram pouca variação entre camundongas da mesma idade, se constituindo em um tipo de critério adequado tanto para a classificação dos folículos quanto para a detecção de alterações no desenvolvimento folicular ovariano. A análise de características morfológicas dos folículos revelou variações nem sempre consideradas em boa parte dos estudos de morfometria ovariana de camundongas, destacando-se os folículos antrais incipientes e folículos multiovocitários. A proporção volumétrica de constituintes ovarianos é um parâmetro válido, embora a quantificação de folículos, se realizada em uma amostra de cortes representativa do ovário como um todo, reflita com maior clareza a dinâmica do desenvolvimento folicular ovariano.

ABSTRACT

LANNA, Mariana Ferreira. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July of 2009. **Morphometric study of the ovarian follicular development in Swiss Albino mice.** Adviser: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Co-Advisers: Sérgio Luis Pinto da Matta and Tarcízio Antônio Rego de Paula.

The histomorphometric analysis is one of the main tools in the study of ovarian follicular development, mainly in animal experimentation. However, the results reviewed in the literature are contradictory, especially regarding to the quantification of ovarian follicles. This work was conducted with 29 virgin mice, among pre-pubertal, young and adult (30, 70 and 180 days), the aim was to use the histomorphometry to determine the following parameters: the absolute frequency of ovarian follicles (atretic and non-atretic), diameter of follicles and oocytes in the representative stages of folliculogenesis and volumetric proportion of follicles, cortical region (surface epithelium, tunica albuginea and connective tissue) and medulla of the ovary. The serial microtomy of the left ovary of each mouse was made, resulting in cuts with four micrometers of thickness which were stained with toluidine blue and sodium borate, 1%. For each female, ten sections were analyzed within an eighty micrometers interval. The determination of the ovarian follicles' absolute frequency, although providing results that are not fully consistent with those obtained in other studies, is an important parameter for monitoring follicular dynamics. The results of the diameter of follicles at different stages of development, showed little variation between mice in the same age, it is an appropriate criterion for classification of the follicles and detection of changes during the ovarian follicular development. The analysis of morphological characteristics of the follicles showed variations not always considered in most studies of ovarian morphology in mice, especially the incipient antral and multiocyte follicles. The volumetric proportion of the ovarian constituents is a valid parameter, but the quantification of follicles, if performed on a representative sample of the ovary, reflects more clearly the dynamics of the ovarian follicular development.

1 - INTRODUÇÃO

O ovário tem a capacidade de produzir ovócitos, além de garantir o ambiente hormonal que sustenta a atividade reprodutiva. Ele é revestido por um epitélio simples e dividido internamente em região medular e cortical, sem um limite distinto entre as duas. Histologicamente, a medula é composta de tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado, e o córtex é predominantemente composto de folículos ovarianos (KESSEL, 2001). Os folículos representam as unidades morfofuncionais do ovário dos mamíferos, e sob o aspecto funcional podem ser subdivididos em duas populações: folículos em repouso e em crescimento (MIGUEL, 2002; FORABOSCO *et al.*, 2007). A população em repouso, também denominada reserva folicular ovariana, consiste em folículos primordiais que, após a sua formação, serão recrutados para o desenvolvimento de maneira gradual e contínua (MCGEE & HSUEH, 2000). O folículo primordial é constituído por uma camada de células foliculares achatadas, circundando um ovócito primário que entrou na primeira divisão da meiose, mas se encontra estacionado em diplóteno (FLAWS *et al.*, 2001; UZUMCU *et al.*, 2006). A população em repouso é estabelecida ao final da organogênese ovariana, quando são formados os folículos primordiais, que podem ser identificados no ovário de algumas espécies, antes do nascimento (ex.: vaca, ovelha, mulher) ou imediatamente após o nascimento (ex.: camundonga, rata, hamster) (FORABOSCO *et al.*, 2007). Por outro lado, a população em crescimento engloba folículos em diferentes estágios do desenvolvimento: primário unilaminar, primário multilaminar; antral incipiente (antral inicial) antral, também classificado como secundário, e maduro (terciário ou de Graaf). No entanto, a maioria dos folículos primordiais que são recrutados para o desenvolvimento não atinge o estágio de folículo maduro, sofrendo atresia (MCGEE & HSUEH, 2000).

O desenvolvimento folicular ovariano ou foliculogênese consiste no processo de formação, crescimento e maturação folicular, que começa com o aparecimento dos folículos primordiais e culmina com a formação do folículo maduro (MARTINS *et al.*, 2008). No desenvolvimento embrionário humano, os folículos primordiais são observados no ovário a partir da décima terceira semana após a fecundação. Durante a vida fetal, a partir de dezessete semanas, são identificados folículos primários, antrais incipientes e antrais (FORABOSCO *et al.*, 2007).

Um dogma da biologia reprodutiva é que as fêmeas dos mamíferos, após o nascimento, não apresentam mais a capacidade de renovação e aumento de suas células germinativas, já que o número de folículos e ovócitos é finito e diminuirá com o passar do tempo, principalmente em função da depleção por apoptose, processo que acomete tanto ovócitos quanto células foliculares (JOHNSON *et al.*, 2004). Apesar de alguns estudos registrarem que, após o nascimento, possa ocorrer a formação de novos ovócitos a partir de células-tronco provenientes da medula óssea, por exemplo (BUKOVSKY, 2005; JOHNSON *et al.*, 2005), ainda se considera que a neo-ovogênese e neo-foliculogênese no ovário do mamífero adulto são eventos naturalmente raros para a maioria das espécies (FORABOSCO *et al.*, 2007).

A foliculogênese apresenta mecanismos ainda não totalmente elucidados, destacando-se o controle molecular do recrutamento inicial e da dominância folicular. No sentido de elucidar esses aspectos, os estudos sobre foliculogênese se intensificaram nas duas últimas décadas com implicações clínicas importantes, principalmente na área de contraceptivos e reprodução assistida (MCGEE & HSUEH, 2000; SENEDA & BORDIGNON, 2007).

Na experimentação animal, os camundongos são amplamente utilizados em decorrência de várias vantagens, dentre elas: porte pequeno, ninhada variando de oito a dez filhotes, período curto de gestação (entre 19 a 21 dias), fácil manutenção (CHORILLI *et al.*, 2007) e semelhança com o genoma do homem e do camundongo (CHURCH *et al.*, 2009).

Trabalhos que avaliam o efeito de produtos químicos sobre a fertilidade feminina utilizam, freqüentemente, métodos morfométricos, sendo as ratas e camundongas os modelos mais utilizados (BOLON *et al.*, 1997; SREELAKSHMI & KALIWAL, 2007). As camundongas Albino Suíço, por exemplo, têm sido muito utilizadas em estudos que avaliam os efeitos de inseticidas sobre o desenvolvimento folicular ovariano (HIREMATH & KALIWAL, 2002; BALIGAR & KALIWAL, 2004).

Estudos histomorfométricos do ovário de roedores indicam que a estimativa da quantidade de folículos ovarianos em um dado estágio de desenvolvimento e em uma determinada espécie pode ser amplamente variável, dependendo da metodologia utilizada (PEPLING & SPRADLING, 2001; TILLY, 2003). Nesse sentido, a realização de um planejamento experimental cuidadoso, principalmente quanto ao detalhamento do protocolo morfométrico é, sem

dúvida, uma prática altamente recomendável para a obtenção de resultados confiáveis.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi utilizar a análise morfométrica no estudo do desenvolvimento folicular ovariano de camundongas Albino Suíço com trinta, setenta e cento e oitenta dias de idade.

2.1 Objetivos específicos

- a) Estimar a população e o diâmetro de folículos ovarianos (primordiais, primários unilaminares, primários multilaminares, antrais incipientes, antrais) e dos respectivos ovócitos.
- b) Determinar a frequência absoluta de folículos atrésicos.
- c) Utilizar e recomendar critérios e procedimentos histomorfométricos que visem a melhor adequação da morfometria no diagnóstico de alterações no desenvolvimento folicular ovariano de camundongos em futuros estudos experimentais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Origem das Células Germinativas e Ovocitogênese

Nos mamíferos, a oocitogênese começa na vida embrionária com a chegada das células germinativas primitivas (CGPs) no ovário em formação. As CGPs são identificadas entre as células endodérmicas do saco vitelino junto à origem do alantóide. Durante o fechamento do corpo do embrião, a parte dorsal do saco vitelino é incorporada pelo embrião e, à medida que isto ocorre, as CGPs migram ao longo do mesentério dorsal para as gônadas em desenvolvimento (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005), onde perdem suas características de motilidade e sofrem proliferação celular, transformando-se em ovogônias (SADEU *et al.*, 2006). Inicialmente, as ovogônias estão agrupadas em cistos e se encontram conectadas umas às outras por pontes citoplasmáticas intercelulares. Os cistos vão sendo gradualmente circundados por células somáticas, denominadas células pré foliculares. No interior destes cistos, várias ovogônias sofrem apoptose, enquanto outras entram em meiose, originando os ovócitos I (HIRSHFIELD, 1991; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). A primeira interrupção da divisão meiótica ocorre nos ovócitos primordiais, ou ovócitos I, no estágio de diplóteno da meiose I. Estes folículos, contendo o ovócito I, permanecem estacionados neste estágio até sofrerem apoptose ou iniciarem o crescimento e atingirem a maturidade citoplasmática e nuclear. Para a maioria das espécies de mamíferos, no estágio de folículo antral, o ovócito retoma a meiose, ficando parado em metáfase II. Caso ocorra ovulação e o ovócito seja fecundado, a meiose é concluída (MOORE & PERSAUD, 2008).

3.2. Recrutamento Inicial e Cíclico

O processo de contínuo crescimento que culmina com a formação de folículos pré-ovulatórios é denominado dinâmica folicular. A garantia da perfeita dinâmica folicular é dada pelos processos de recrutamento, seleção e dominância dos folículos em um ciclo estral/menstrual (MIGUEL, 2002).

Denomina-se recrutamento o processo em que uma quantidade de folículos inicia o seu desenvolvimento. O recrutamento é subdividido em inicial e cíclico. A transição de folículos primordiais do estado de quiescência (dormência) para o desenvolvimento caracteriza o recrutamento inicial. Com exceção dos

bovinos, o recrutamento inicial não depende da estimulação de gonadotrofinas, sendo observado logo após a formação dos folículos primordiais. Ocorre de maneira gradativa e contínua, no decorrer da vida, até a completa depleção da reserva de folículos primordiais (Fig. 1). Já o recrutamento cíclico é observado após a puberdade, e ocorre a cada ciclo reprodutivo, sendo desencadeado pelo aumento dos níveis séricos do hormônio folículo estimulante (FSH) (MCGEE & HSUEH, 2000). No recrutamento cíclico, um grupo de folículos antrais é ativado para completar o seu desenvolvimento, alcançando o estágio de folículo maduro ou pré ovulatório, porém a maioria deles não conclui a maturação, sofrendo atresia antes disso. Em mulheres jovens sabe-se que, a cada ciclo, cerca de dez folículos antrais se desenvolvem, porém apenas um se desenvolverá mais do que os outros folículos, produzindo níveis elevados de estrógeno e inibina. Este folículo se tornará o dominante, enquanto os demais se tornarão folículos subordinados. A inibina e os estrógenos inibem a liberação de FSH pela adenohipófise e, conseqüentemente, os folículos subordinados estarão privados da estimulação adequada para se desenvolverem e o destino deles será o processo de apoptose. Embora se desconheça a razão exata pela qual um folículo se torna dominante, sabe-se que esse folículo é mais sensível ao FSH, possivelmente por apresentar aumento na expressão de receptores, tanto para FSH quanto para o hormônio luteinizante (LH). O folículo dominante também produz uma série de fatores de crescimento que estimulam a neovascularização próxima a esse folículo, o que determina um mecanismo positivo de seleção (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

O recrutamento cíclico e a seleção do(s) folículo(s) dominante(s) é um processo contínuo (Fig. 1). Em roedores, o recrutamento cíclico de folículos antrais incipientes, no início do estágio antral, e a seleção de folículos dominantes são similares ao observado nos primatas, com a diferença de que múltiplos folículos se tornam dominantes a cada ciclo estral nos roedores.

Na espécie humana, estima-se que o total de folículos primordiais na puberdade seja em torno de 200.000. A tendência é que durante o período reprodutivo diminua gradativamente a população de folículos primordiais, até que dez anos antes da menopausa, com o aumento dos níveis séricos de FSH e diminuição de inibina, o declínio na quantidade de folículos primordiais seja ainda mais expressivo. A exaustão folicular ovariana leva à menopausa, que ocorre em média aos 51 anos idade na espécie humana.

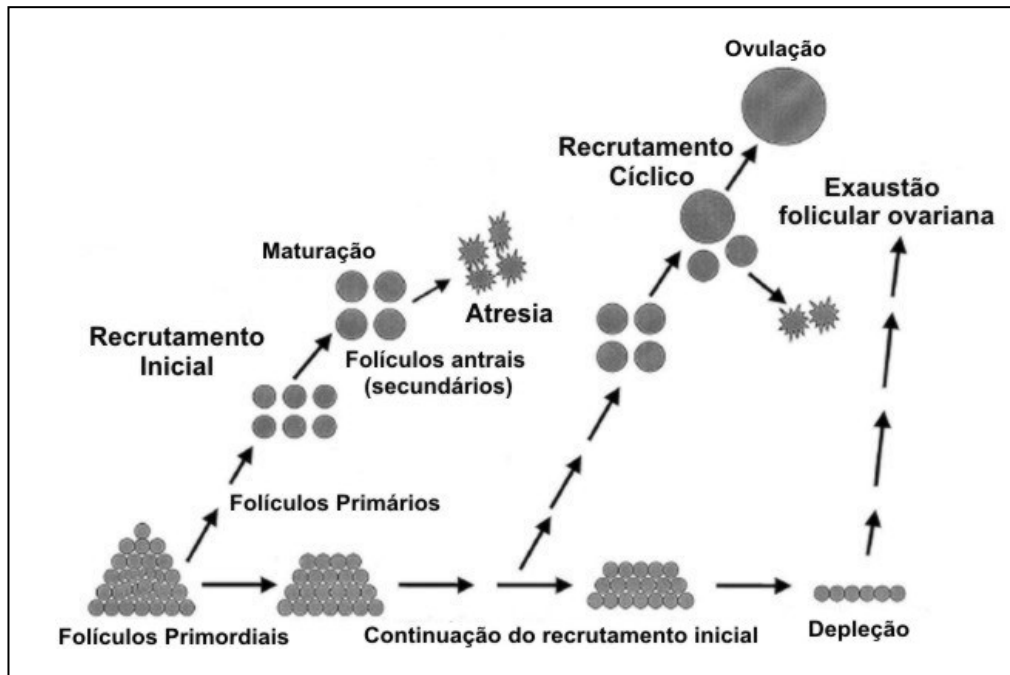


Figura 1 - Destino dos folículos ovarianos: a formação da reserva de folículos primordiais, recrutamento inicial, maturação, atresia; recrutamento cíclico, ovulação e depleção dos folículos primordiais determinando a exaustão folicular ovariana (Modificado: McGee e Hsueh, 2000).

O FSH e o LH são importantes fatores tróficos para a proliferação e sobrevivência de células foliculares e para o recrutamento cíclico de folículos antrais. O FSH é o fator de sobrevivência predominante neste estágio de desenvolvimento folicular (CHUN *et al.*, 1996), resgatando um número limitado de folículos antrais, enquanto o restante é submetido à atresia. Os ovócitos destes folículos já completaram seu crescimento, adquiriram zona pelúcida e são competentes para retornar a meiose (TROUNSON *et al.*, 1998). Além das gonadotrofinas, um mecanismo elaborado de controle intrafolicular garante a sobrevivência dos folículos pré-ovulatórios. Tratamentos com hormônio de crescimento e fatores locais, como o fator de crescimento epidermal e o fator de crescimento de fibroblasto, suprimem a apoptose de células foliculares (CHUN *et al.*, 1996; HSUEH *et al.*, 1996; TILLY *et al.*, 2001). Assim, embora as gonadotrofinas sejam os fatores de sobrevivência mais importantes de folículos pré-ovulatórios, esse conjunto de sinais extracelulares agindo através de mecanismos endócrinos, parácrinos, autócrinos ou justácrinos garantem a sobrevivência para ovulação (MCGEE & HSUEH, 2000).

Em humanos, a partir da segunda metade do desenvolvimento fetal, alguns folículos primordiais deixam a população em repouso, iniciando seu crescimento. A maioria destes folículos em crescimento progride até o estágio de folículo antral, quando, inevitavelmente, sofrem atresia. Após a puberdade, um pequeno número de folículos antrais é resgatado pelas gonadotrofinas, podendo continuar seu crescimento, até a formação do folículo pré-ovulatório. Em humanos, folículos antrais desenvolvem-se em folículos pré-ovulatórios em apenas 14 dias, durante a fase folicular do ciclo menstrual, sendo que mais de 85 dias são necessários para que os folículos primários multilaminares cresçam e formem os folículos maduros (GOUGEON, 1996). Em adição, foi estimado que mais de 120 dias são necessários para que folículos primários unilaminares cresçam até o estágio de antrais, sendo necessário ainda mais tempo para o desenvolvimento de folículos primordiais em primários unilaminares (GOUGEON, 1986; GOUGEON, 1996; MCGEE & HSUEH, 2000). Desta maneira, na espécie humana, toda a fase de crescimento de um folículo, de primordial até pré-ovulatório, é superior a 200 dias, ou 8 ciclos menstruais.

O tempo de crescimento folicular foi avaliado meticulosamente em ratos (HIRSHFIELD, 1991). Em roedores, os folículos primordiais são formados em torno do terceiro dia de idade e a primeira onda de recrutamento folicular acontece ao longo das três semanas subseqüentes (HIRSHFIELD, 1989; RAJAH *et al.*, 1992). Folículos antrais incipientes bem desenvolvidos são encontrados no sétimo dia de idade e, por volta do décimo oitavo dia são observados folículos antrais (MCGEE & HSUEH, 2000). Por um período superior a 60 dias, ou cerca de 15 ciclos estrais, os folículos primordiais crescem até o estágio de folículo maduro (Fig.2) Desta maneira, assim como nos humanos, o início do crescimento folicular em roedores é relativamente longo (HIRSHFIELD & DeSANTI, 1995).

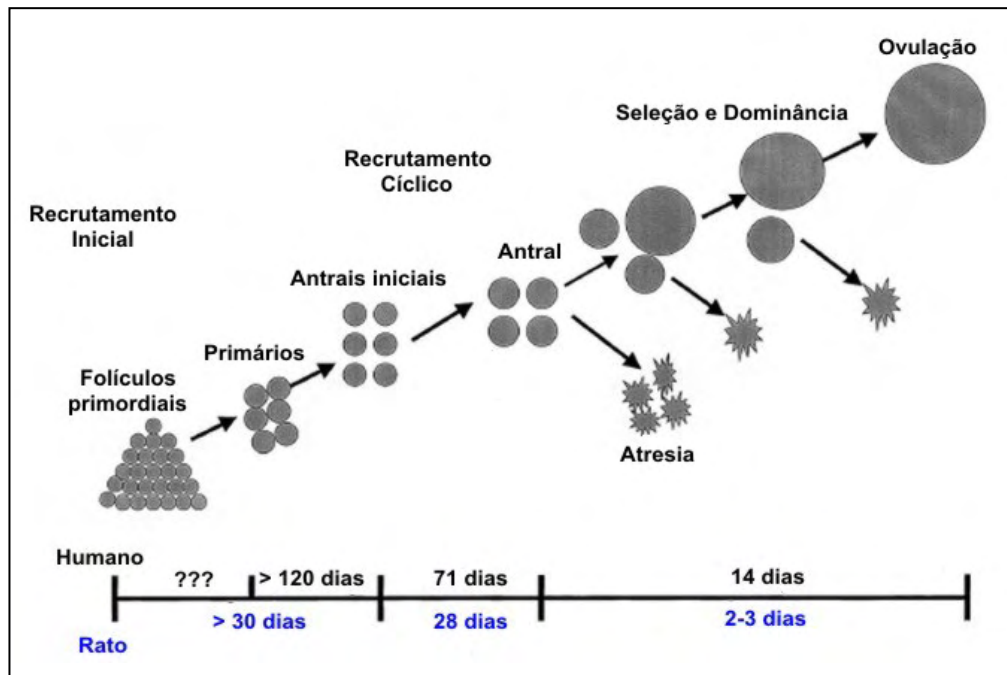


Figura 2 - Comparação entre a espécie humana e o rato quanto à duração do recrutamento e da seleção folicular no ovário (Fonte: McGee e Hsueh, 2000).

3.3. Classificação

A organização histológica básica ovariana é um consenso, mas a classificação atribuída aos diversos folículos é relativamente variável. Diversos autores adaptam a classificação realizada por PEDERSEN & PETERS (1968), que divide os folículos em dez categorias, de acordo com suas características morfológicas, agrupando-os em três tipos: folículos pequenos, ovócito circundado por uma única camada de células da granulosa; em crescimento, ovócitos rodeados de várias camadas da granulosa; e antral, ovócito envolvido por muitas camadas de células da granulosa e presença de antro (BUCCI *et al.*, 1997; BALIGAR & KALIWAL, 2004; MAYER *et al.*, 2004; REYNAUD *et al.*, 2009). Embora este método de classificação seja amplamente utilizado, ele não releva algumas importantes alterações morfológicas e funcionais que ocorrem durante o crescimento folicular.

Outro aspecto ignorado na maioria das classificações e trabalhos quantitativos é o registro de folículos multiovocitários. Na maioria dos casos, os folículos de mamíferos contêm somente um ovócito por folículo, mas podem existir folículos com mais de um ovócito, esta é a situação do folículo multiovocitário, também referido como poliovular. Estes folículos já foram

descritos em cadelas, coelhas, gatas e jacarés fêmeas (PAYAN-CARREIRA & PIRES, 2008; STOKER *et al.*, 2008) e, embora seu significado permaneça pouco claro, os folículos multiovocitários foram descritos em camundongas e ratas tratadas no período neonatal com dietilbestrol e em populações de jacarés em regiões contaminadas por disruptores endócrinos, dentre eles o bisfenol e agrotóxicos, como o endosulfan (GUILLETTE *et al.*, 1994; JEFFERSON *et al.*, 2002; STOKER *et al.*, 2008).

3.4. O Ciclo Estral

Nas camundongas, de um modo geral, o ciclo estral dura quatro a cinco dias, sendo subdividido nas seguintes fases: proestro, estro (fase de receptividade sexual ou cio), metaestro e diestro.

O proestro é associado com níveis relativamente elevados de estrógeno no sangue; o estro apresenta níveis intermediários de estrógeno, o metaestro é caracterizado pelo início de funcionamento do(s) corpo(s) lúteo(s) e finalmente o diestro é caracterizado por níveis reduzidos de estrógeno circulante e máxima produção de progesterona (BANKS, 1992). O camundongo é uma espécie poliéstrica, ou seja, um ciclo estral termina em diestro e evolui para o proestro do ciclo seguinte. Porém, quando camundongas são agrupadas numa mesma gaiola, podem permanecer em anestro continuamente, período em que os órgãos reprodutores se encontram relativamente quiescentes (BANKS, 1992). Quando expostas a um macho, o estro retorna no prazo de até 72 horas (HAFEZ, 1970).

Embora o ciclo estral seja definido principalmente pelo quadro de alterações cíclicas que acontecem nos ovários e no endométrio uterino, o acompanhamento deste ciclo pode ser feito, na prática, pela avaliação microscópica de esfregaços colpocitológicos ou vaginais. As variações no epitélio estratificado pavimentoso da mucosa vaginal, com relação ao número de camadas e grau de queratinização, constituem no principal parâmetro analisado nestes esfregaços (BANKS, 1992). O ciclo estral vaginal é considerado um dos melhores marcadores da função ovariana, constituindo num procedimento que não é letal e que permite monitorar as alterações cíclicas do aparelho reprodutor feminino ao longo do tempo (NELSON *et al.*, 1982), algo especialmente importante em situações experimentais.

3.5. Atresia Folicular

O número de folículos ovarianos que chega ao estágio ovulatório é muito pequeno. Diversos estudos postulam que a atresia ocorre por um processo de morte celular, a apoptose (TSAFIRI & BRAW, 1984; TILLY, 2001; MARKSTROM *et al.*, 2002; MAYER *et al.*, 2004), que exerce um papel fundamental no desenvolvimento normal das células germinativas (DE POL *et al.*, 1997), especialmente durante a ovocitogênese (HIRSHFIELD, 1991; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Duas famílias de proteínas regulam o processo apoptótico: as caspases e a Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2). As caspases são consideradas as principais executoras da rota apoptótica e atuam ativando DNases, que são endonucleases responsáveis pela fragmentação do DNA internucleossomal. A família Bcl-2 compreende tanto proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-X_L quanto pró-apoptóticas, incluindo Bax, Bid, Bik, BOD e Bcl-X_S (MORITA *et al.*, 1999; MARKSTROM *et al.*, 2002).

Em mamíferos, durante a foliculogênese primordial, os ovócitos não circundados por células pré-granulosas são perdidos por apoptose, reduzindo drasticamente o número de ovócitos no ovário (COUCOUVANIS *et al.*, 1993; DE POL *et al.*, 1997). Em roedores, os ovócitos apoptóticos são numerosos durante os primeiros dias após o nascimento, mas raros em fases posteriores da vida (BYSKOV *et al.*, 1978; HIRSHFIELD, 1988). A grande maioria de folículos primordiais permanece quiescente, mas alguns destes folículos deixam o a população de descanso e iniciam o crescimento (recrutamento inicial). Antes da puberdade, quando estes folículos chegam ao estágio de folículos antrais eles, inevitavelmente, sofrem atresia. Com a chegada da puberdade, alguns folículos são resgatados pelas gonadotrofinas circulantes e continuam a crescer (recrutamento cíclico) (MCGEE & HSUEH, 2000).

Folículos em degeneração estão presentes em grande quantidade em ovários de mamíferos adultos. Acredita-se que os folículos em crescimento entram em atresia porque seu estágio de desenvolvimento não está em sincronia com os eventos hormonais do ciclo estral (HIRSHFIELD, 1988). Folículos que degeneraram provavelmente não desenvolveram receptores adequados para os hormônios (RICHARDS *et al.*, 1978), podendo ter sido privados do suporte hormonal, ou ainda expostos a hormônios deletérios (fatores pró-apoptóticos) em fases sensíveis do seu desenvolvimento (HIRSHFIELD, 1988).

Os resultados obtidos por HIRSHFIELD (1988) sugerem que as vias que levam à ovulação e atresia não divergem até a penúltima etapa do crescimento folicular. Durante o ciclo reprodutivo deve haver um período onde os folículos se tornam mais sensíveis à atresia. Observa-se que a maioria dos pequenos folículos em crescimento parece ser relativamente pouco suscetível à atresia, enquanto que os folículos antrais são muito mais susceptíveis a ela. Estes resultados estão em concordância com diversos outros autores que afirmam que a atresia é freqüente neste estágio de desenvolvimento (RICHARDS & MIDGLEY, 1976; RICHARDS *et al.*, 1978). Provavelmente, a atresia em folículos antrais é um componente do processo que controla o número de folículos selecionados para a ovulação (HIRSHFIELD, 1988).

Atresia pode ter início em quatro compartimentos celulares diferentes: nas células da teca, da granulosa, do *cumulus oophorus* (as células foliculares mais próximas do ovócito) e no ovócito (MIKKELSEN *et al.*, 2001). Em pequenos folículos, a degeneração do ovócito é o primeiro sinal da atresia (BYSKOV, 1978; HIRSHFIELD, 1988). Nos folículos antrais, a atresia é morfologicamente caracterizada pela presença de células com núcleos picnóticos (com acentuada redução do volume e corados fortemente pela hematoxilina) na granulosa e no antro folicular (BLONDIN *et al.*, 1996; IRVING-RODGERS *et al.*, 2001). Um número reduzido de mitoses nas células da granulosa é também aceito como um sinal inicial de atresia. A separação das células da granulosa da membrana basal, a destruição da granulosa e do *cumulus oophorus*, bem como a morte do ovócito são considerados eventos tardios na atresia folicular (IRVING-RODGERS *et al.*, 2001). Em roedores, apesar das células da granulosa e dos ovócitos degenerarem durante a atresia, as células da teca interna dos folículos atrésicos podem persistir, formando arranjos cordonais dentro do estroma ovariano, denominados de células ou glândulas intersticiais, ativas na secreção de andrógenos (MAYER *et al.*, 2004).

3.6. Morfometria ovariana

A avaliação histomorfométrica é um tipo de análise quantitativa realizada em cortes bidimensionais. Em termos práticos, permite obter informações quantitativas que são principalmente utilizadas para detectar diferenças entre as amostras de animais controle e experimentais. A morfometria é, portanto, uma ferramenta importante do morfologista na medida em que diminui a imprecisão e

a subjetividade da análise. Normalmente, os valores morfométricos são feitos numa determinada amostra de estruturas de diferentes indivíduos para se obter um resultado que deve representar, estatisticamente, a média das medidas feitas (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995).

Contudo, os estudos de morfometria ovariana apresentam ampla variação de resultados, em razão de diversos fatores, como: idade dos animais (cada estudo utiliza idade ou faixa etária diferente), linhagem de camundongo (CANNING, 2003), estado nutricional, condições variadas de fotoperíodo (SANTOS *et al.*, 2003), protocolos morfométricos distintos e número de cortes analisados (TILLY, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 29 camundongas virgens, com 30 dias de idade, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Durante o período experimental as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais, no Laboratório de Nutrição Experimental, com fotoperíodo 12:12 e temperatura entre 22 e 24°C, recebendo água e ração comercial *ad libitum*.

As camundongas foram aleatoriamente distribuídas nos seguintes grupos:

- C₃₀: camundongas eutanasiadas aos 30 dias de idade (n= 9)
- C₇₀: camundongas eutanasiadas aos 70 dias de idade (n= 10)
- C₁₈₀: camundongas eutanasiadas aos 180 dias de idade (n= 10)

Para verificar se as fêmeas do grupo C₇₀ e C₁₈₀ estavam apresentando ciclos estrais regulares realizou-se, antes da eutanásia, exame colpocitológico diário durante pelo menos um período de 10 dias. As fêmeas do grupo C₃₀ (fêmeas pré-púberes), por não apresentarem abertura do orifício vaginal, não foram submetidas a esse acompanhamento. Para o exame colpocitológico, realizou-se a obtenção do material sempre no mesmo horário (14 horas). Utilizou-se uma haste com um algodão, umedecido em solução salina, que foi introduzida cuidadosamente no canal vaginal da camundonga, procedendo-se um movimento giratório da haste para viabilizar a obtenção do material. Este material foi transferido para lâmina de vidro através de um movimento rotatório da haste de algodão sobre a lâmina. Estas preparações foram imediatamente fixadas com uma solução de álcool 95% éter etílico, em partes iguais. Em seguida as lâminas foram tratadas numa seqüência alcoólica decrescente e coradas com HE (Hematoxilina de Harris e Eosina). Após a montagem das lâminas, realizou-se o diagnóstico microscópico dos estágios do ciclo estral (proestro, estro, metaestro e diestro) com base na caracterização descrita por NELSON *et al.* (1982).

4.1. Obtenção dos ovários e dos índices biométricos

Todas camundongas dos grupos C₇₀ e C₁₈₀ foram eutanasiadas no diestro, havendo, assim, uma padronização nos eventos fisiológicos. Imediatamente após a eutanásia, cada camundonga foi pesada em balança de

precisão com duas casas decimais e os ovários foram cuidadosamente removidos sob lupa e pesados separadamente em balança analítica com quatro casas decimais. A partir dos valores de peso corporal e peso ovariano, foi calculado o índice gonadosomático (IGS) através da seguinte fórmula:

$$\text{IGS} = \frac{\text{POD} + \text{POE}}{\text{PC}} \times 100$$

onde:

POD = peso ovário direito

POE = peso ovário esquerdo

PC = peso corporal

4.2. Processamento histológico

Os ovários foram imersos em solução fixadora de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio pH 7,4, 0,1 mol⁻¹. Após 12 horas de fixação os ovários foram transferidos para uma solução de álcool 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 do processamento de desidratação, o ovário foi seccionado ao meio e longitudinalmente (sagital intermédio), utilizando-se uma lâmina de barbear. Na inclusão, os dois cortes de cada ovário foram orientadas com as faces de seccionamento voltadas para a superfície do corte, com uma fatia ao lado da outra. Para a microtomia utilizou-se o micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut, Germany), obtendo-se cortes seriados, com 4 µm de espessura, que foram ordenados sequenciadamente 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 1% e para montagem permanente das preparações utilizou-se o meio Entellan-Merck®.

No presente trabalho, os folículos foram classificados como: primordial (quiescente), ovócito envolvido por uma camada de células foliculares pavimentosas (Figura 3 A); primário unilaminar, ovócito circundado por uma única camada de células foliculares pavimentosas e cúbicas (Figura 3 B) ou

totalmente cúbicas (Figura 3 C); primário multilaminar, ovócito envolto por diversas camadas foliculares, mas sem a presença de antro e células da teca em torno do folículo (Figura 3 D); antral incipiente, ovócito envolvido por até cinco camadas de células foliculares, líquido antral entre estas células e teca organizada (Figura 3 E); antral, mais de quatro camadas de células da granulosa, antro bem desenvolvido e teca (Figura 4 A); atrésico, 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 (Figura 4 B); e folículos multiovocitários, folículos possuindo mais de um ovócito em seu interior (Figura 4 C e D).

4.3. Análise morfométrica

4.3.1. Frequência estimada da população

Utilizando o microscópio Olympus BX-40 e objetivas de 10, 20 e 40X foi analisada a frequência absoluta de folículos primordiais, primários unilaminares e multilaminares, antrais incipientes (iniciais), antrais e atrésicos em dez cortes do ovário esquerdo de cada fêmea. O reconhecimento de cada tipo de folículo foi baseado nas descrições adotadas por FLAWS *et al.* (1997).

Foram contados todos os folículos com ovócito visível no corte analisado. O primeiro corte analisado foi estabelecido na primeira lâmina obtida na microtomia e os cortes subsequentes foram analisados, respeitando-se o intervalo de 80 µm. Estes cortes também foram utilizados em outras análises (itens 4.3.2 e 4.3), 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.

4.3.2. Diâmetro dos folículos

Realizou-se o registro de imagens dos dez cortes de ovário analisados na contagem de folículos ovarianos, 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 10% da média obtida no grupo para folículos primordiais e primários unilaminares, e 30% da média de folículos primários multilaminares, antrais iniciais e antrais. Estes percentuais foram definidos após

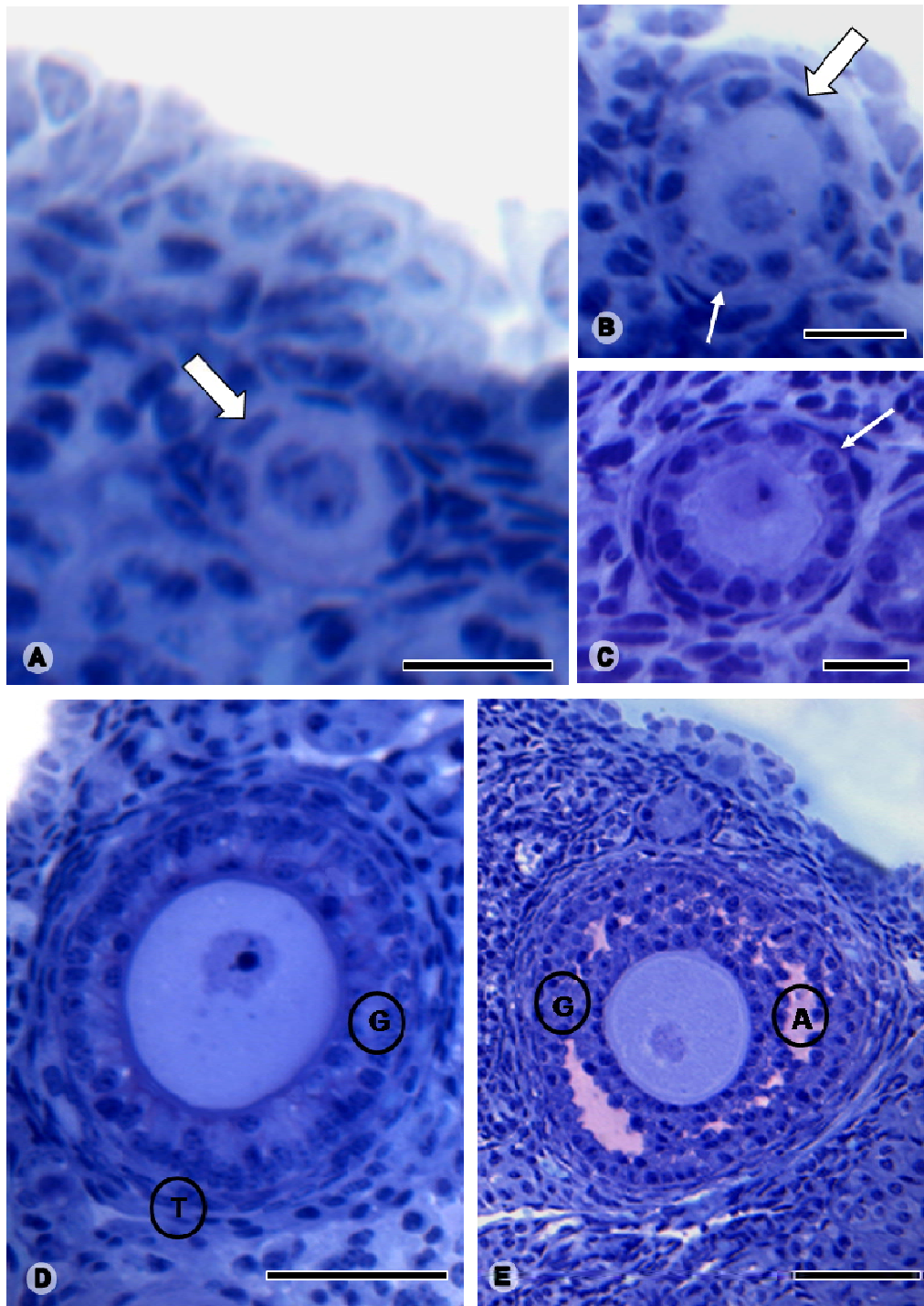


Figura 3 - A: folículo primordial, contendo um ovócito circundado por células foliculares pavimentosas (seta larga). B: folículo primário unilaminar, com células foliculares pavimentosas (seta larga) e cúbicas (seta). C: folículo unilaminar, ovócito envolvido por uma camada de células foliculares cúbicas (seta). D: folículo multilaminar, regiões da granulosa (G) e da teca (T). E: folículo antral incipiente, observa-se o antro (A) entre as células da granulosa (G). Coloração: Azul de Toluidina-Borato de Sódio. Barra: A-C= 15 μ m; D-E= 30 μ m.

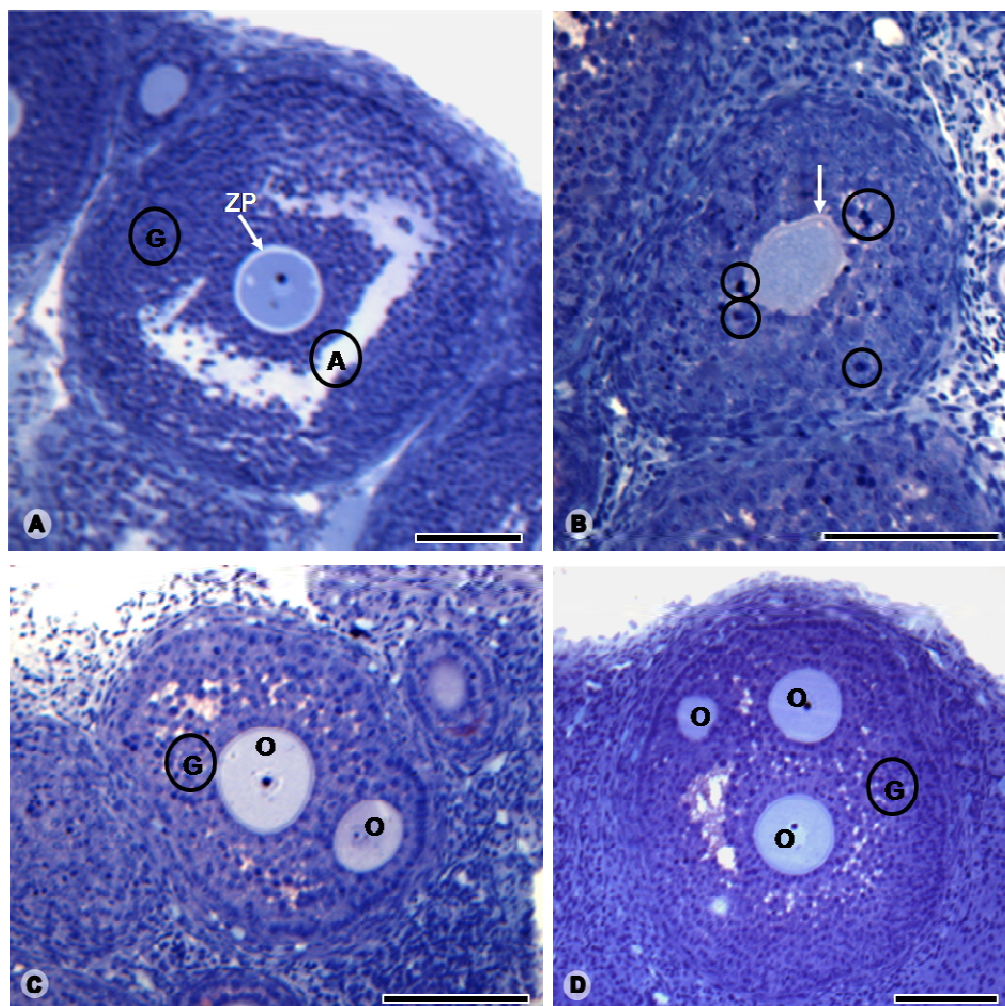


Figura 4 - Detalhe da região cortical do ovário de camundonga Albino Suíço. Observa-se em A: folículo antral, com ovócito envolvido pela zona pelúcida (ZP), a região da granulosa (G) e o antro folicular (A). B: folículo atrésico com alteração na forma do ovócito e corpos apoptóticos na região da granulosa (círculos). C e D: folículos multiovocitários, ovócitos (O) circundados por células da granulosa (G) Coloração: Azul de Toluidina-Borato de Sódio. Barra: 100 µm.

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. Nos folículos multilaminares, antrais incipientes e antrais, 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.

4.3.3. Proporção volumétrica dos componentes ovarianos

Obteve-se o registro de 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. Para determinar a proporção da região cortical (epitélio de revestimento, albugínea ovariana e tecido conjuntivo intersticial), folículos e região medular, utilizou-se um retículo com 792 intersecções (pontos) acoplado à imagem do corte no programa *Image Pro-Plus*®. Foram contados todos os pontos que incidiram sobre o corte do ovário.

4.4. Análise Estatística

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fêmeas do grupo C₇₀ e C₁₈₀ apresentaram ciclos estrais regulares, com duração entre 4-5 dias, compatível ao encontrado na literatura (HIREMATH & KALIWAL, 2002; SANTOS *et al.*, 2003; MAYER *et al.*, 2004; SREELAKSHMI & KALIWAL, 2007). Como as modificações no esfregaço vaginal observadas durante o ciclo estral fornecem um índice confiável da atividade ovariana e da síntese hormonal (BALIGAR & KALIWAL, 2004), podemos inferir que o ciclo estral regular destas camundongas indica seu equilíbrio hormonal. NUMAZAWA & KAWASHIMA (1982) estudaram quantitativamente as modificações morfológicas em folículos saudáveis e atresicos durante as fases do ciclo estral em camundongo, chegando à conclusão que existem diferenças significativas na quantidade de folículos entre as quatro fases. Por este motivo, todas as camundongas do presente estudo foram eutanasiadas na mesma fase, o diestro.

Histologicamente, o ovário de camundongas albino suíço apresenta-se organizado à semelhança dos demais roedores, sendo revestido por epitélio simples cúbico e dividido internamente em região cortical e medular (Figura 5). A medula é localizada centralmente sendo constituída por tecido conjuntivo frouxo caracterizado por extensos vasos sanguíneos, que chegam ao ovário através do hilo. Na região cortical é observada grande riqueza de tipos celulares e, predominantemente, de folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento. O limite entre estas regiões não é muito distinto (KESSEL, 2001).



Figura 5 - Corte longitudinal intermédio do ovário esquerdo de camundonga Albino Suíço com 30 dias de idade. 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: 500 μ m.

5.1. Índices Biométricos

Os valores médios dos pesos corporal, ovariano e índice gonadossomático encontram-se na Tabela 1. Observou-se que, para estes parâmetros, os valores obtidos nos grupos C₇₀ e C₁₈₀ foram maiores que os do grupo C₃₀ ($p < 0,05$), mas não houve diferença significativa entre C₇₀ e C₁₈₀. Como os grupos apresentavam idades diferentes, é esperado que o do peso corporal aumente em consequência do crescimento e que o peso ovariano e índice gonadossomático também aumentem com a maturidade sexual destas fêmeas.

Tabela 1. Peso corporal (PC); peso do ovário (PO) direito (D) e esquerdo (E) e índice gonadossomático (IGS) nos três grupos de camundongas.

		Grupos		
		C ₃₀	C ₇₀	C ₁₈₀
PC (g)		20,39 ± 2,97 ^a	28,84 ± 2,64 ^b	29,65 ± 2,83 ^b
PO (mg)	D	2,46 ± 0,55 ^a	6,99 ± 2,04 ^b	5,99 ± 1,99 ^b
	E	2,49 ± 0,76 ^a	6,10 ± 1,70 ^b	5,32 ± 1,90 ^b
IGS (%)		0,025 ± 0,006 ^a	0,450 ± 0,010 ^b	0,383 ± 0,013 ^b

C₃₀, C₇₀, C₁₈₀: Camundongas com 30, 70 e 180 dias de idade, respectivamente

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

5.2. Análise Morfométrica

5.2.1. Frequência estimada da população

A média de folículos primordiais variou de 111,56, no grupo C₃₀ a 44,20, no grupo C₁₈₀, (Tabela 2). Sabe-se que a população de ovócitos no ovário de camundongas é estabelecido no período neonatal, tornando-se a reserva ovariana, da qual os folículos são recrutados para o crescimento e posterior ovulação ou atresia (MCGEE & HSUEH, 2000; MARTINS *et al.* 2008). Desta maneira, espera-se que animais jovens, como os do grupo C₃₀, possuam uma

reserva ovariana com maior quantidade de folículos primordiais quando comparados a animais mais velhos, grupo C₁₈₀.

Resultado diferente foi obtido com a frequência de folículos primários unilaminares e multilaminares. Nestes, as médias obtidas para o grupo C₇₀, foram significativamente maiores ($p < 0,05$). A puberdade e o primeiro ciclo estral ocorrem, em camundongos, próximo ao trigésimo dia de vida, mas as fêmeas só se tornam aptas à reprodução, atingindo a maturidade sexual, aos sessenta dias de idade (COBEA; MCGEE & HSUEH, 2000), justificando a maior média obtida pelas camundongas do grupo C₇₀, visto que são fêmeas maduras sexualmente, no período reprodutivo.

Quanto aos folículos antrais, observou-se que a média do grupo C₇₀ foi significativamente maior que a apresentada no grupo C₁₈₀, mas não houve diferenças com relação ao grupo C₃₀. As médias de folículos antrais incipientes e atrésicos não apresentaram diferenças significativas nos três grupos estudados ($p > 0,05$). Com a chegada da puberdade, alguns folículos antrais são resgatados pelas gonadotrofinas circulantes e continuam a crescer (recrutamento cíclico) (MCGEE & HSUEH, 2000). O restante, cujo desenvolvimento não está em sincronia com os eventos hormonais do ciclo estral, entra em atresia (HIRSHFIELD, 1988). Como a eutanásia dos animais do presente trabalho foi procedida durante o diestro, fase caracterizada pelo declínio de gonadotrofinas e estrógeno circulantes (BANKS, 1992), os folículos que se tornaram dependentes de gonadotrofinas entraram em atresia.

Tabela 2. Número absoluto de folículos: primordiais (F_P); primários unilaminares (F_{PU}), primários multilaminares (F_{PM}); antrais incipientes (F_{AI}); antrais (F_A) e atresícos (F_{Atr}) no ovário esquerdo dos três grupos de camundongas.

Folículo	Grupos		
	C ₃₀	C ₇₀	C ₁₈₀
F _P	111,56 ± 25,99 ^a	97,90 ± 25,12 ^a	44,20 ± 14,64 ^b
F _{PU}	58,67 ± 10,63 ^a	81,10 ± 17,33 ^b	47,40 ± 17,82 ^a
F _{PM}	41,33 ± 11,04 ^a	55,10 ± 17,81 ^b	36,30 ± 10,67 ^a
F _{AI}	16,22 ± 8,88 ^a	22,70 ± 8,56 ^a	14,60 ± 6,51 ^a
F _A	15,33 ± 5,33 ^{ab}	17,50 ± 4,03 ^a	11,60 ± 4,40 ^b
F _{Atr}	7,67 ± 6,18 ^a	5,40 ± 3,92 ^a	10,40 ± 4,71 ^a

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

A metodologia mais utilizada para estimar a frequência de folículos é baseada na análise de amostras de cortes histológicos representativas da massa total do ovário. Muitas vezes, os valores obtidos na contagem de cada tipo de folículo é seguido pela aplicação de um fator de correção (TILLY, 2003). No entanto, não existe um fator de correção padrão a ser utilizado. Alguns autores utilizam o intervalo de cortes analisados, outros a espessura dos cortes, podendo-se utilizar ainda estes dois valores multiplicados entre si ou ainda nenhum fator (HIRSHFIELD & MIDGLEY, 1978; BOLON *et al.*, 1997; BUCCI *et al.*, 1997; FLAWS *et al.*, 1997; FLAWS *et al.*, 2001; TILLY, 2003). Pela diversidade de fatores de correção citados na literatura, optou-se neste trabalho pela não utilização de fator de correção. Em uma revisão sobre este assunto, TILLY (2003) deixa claro que a aplicação de um fator de correção específico não muda as conclusões finais em um trabalho, se este fator for igualmente aplicado em todos os resultados obtidos.

A amostragem utilizada no presente trabalho corresponde a cerca de 2% do total de cortes por ovário, porcentagem considerada suficiente para se obter uma estimativa confiável de folículos (BUCCI *et al.*, 1997). Apesar de somente 10 cortes por ovário terem sido analisados, recomenda-se que o restante dos cortes seriados não sejam descartados. Aconselha-se a manter todos os cortes seriados, pois, freqüentemente, é necessário consultar os cortes adjacentes para diagnosticar com certeza determinado folículo.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com estudos de morfometria ovariana, observa-se que o número absoluto de folículos é bastante semelhante, ao encontrado em trabalhos que não utilizam o fator de correção (BOLON *et al.*, 1997; BUCCI *et al.*, 1997). Naqueles que escolheram algum tipo de fator, ao multiplicar os resultados aqui obtidos pelo fator de correção sugerido, como espessura do corte, também encontramos resultados similares (HIRSHFIELD & MIDGLEY, 1978; FLAWS *et al.*, 1997; FLAWS *et al.*, 2001).

O valor percentual de cada tipo de folículo foi também calculado, a partir do total de folículos encontrados (Tabela 3). A porcentagem de folículos primordiais foi diferente entre os três grupos, sendo o maior valor observado no grupo C₃₀, 44,59%. Com relação aos folículos unilaminares, os percentuais encontrados nos grupos C₇₀ e C₁₈₀, 29,00% e 28,24%, respectivamente, foram significativamente maiores que os do grupo C₃₀, 23,55%. As porcentagens para os folículos multilaminares variaram significativamente entre os grupos C₃₀ e C₁₈₀, mas não houve diferenças com relação ao grupo C₇₀. Quanto aos folículos atresícos, foi encontrado porcentagem significativamente maior no grupo C₁₈₀, 6,64%. As porcentagens de folículos antrais incipientes e antrais não apresentaram diferenças significativas nos três grupos estudados ($p > 0,05$).

Tabela 3. Porcentagem estimado de folículos: primordiais (F_P); primários unilaminares (F_{PU}), primários multilaminares (F_{PM}), antrais incipientes (F_{AI}), antrais (F_A) e atresícos (F_{Atr}) no ovário esquerdo dos três grupos de camundongas.

Folículo	Grupos		
	C ₃₀	C ₇₀	C ₁₈₀
F _P	44,59 ± 6,02 ^a	35,20 ± 7,73 ^b	26,47 ± 5,55 ^c
F _{PU}	23,55 ± 2,21 ^a	29,00 ± 4,22 ^b	28,24 ± 5,82 ^b
F _{PM}	16,37 ± 2,41 ^a	19,46 ± 4,08 ^{ab}	22,59 ± 5,92 ^b
F _{AI}	6,48 ± 3,72 ^a	8,08 ± 2,77 ^a	8,91 ± 3,26 ^a
F _A	6,04 ± 1,54 ^a	6,25 ± 1,06 ^a	7,15 ± 2,28 ^a
F _{Atr}	2,97 ± 2,06 ^a	2,00 ± 1,39 ^a	6,64 ± 3,30 ^b

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

Valores de frequência folicular expressos em porcentagens, não são rotineiros em estudos morfométricos com ovários de camundongos. Porém, foi encontrado um trabalho recente em que os autores trabalharam com populações de jacarés fêmeas expostas a desreguladores endócrinos, cuja apresentação dos resultados foi feita na forma de porcentagem (STOKER et al., 2008).

Verificou-se neste trabalho, 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, mas, em termos gerais, os mesmos fenômenos foram observados como se verifica nas Tabelas 2 e 3. Ao avaliar, por exemplo, a frequência de folículos primordiais verifica-se que a maior parte dos folículos encontrados pertence a este tipo e que, em fêmeas jovens eles estão presentes em maior quantidade e porcentagem (Tabela 2 e 3).

5.2.2. Diâmetro dos Folículos e Ovócitos

Os diâmetros dos folículos primordiais foram significativamente menores no grupo C₃₀, mas os diâmetros dos ovócitos neste tipo de folículos, não apresentaram variação significativa ($p > 0,05$) (Tabela 4). Os diâmetros dos folículos unilaminares não foram diferentes entre os três grupos, mas os ovócitos destes folículos foram significativamente menores no grupo C₁₈₀, do que nos grupos C₃₀ e C₇₀. 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).

A ativação do crescimento folicular é caracterizada pela mudança na morfologia das células foliculares, que passam de pavimentosas a cúbicas, alterando, desta maneira, o diâmetro total do folículo. Apesar de não haver sinais detectáveis de síntese no ovócito, a passagem de folículo primordial para unilaminar é marcada intracelularmente pelo aumento de mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso, refletindo o aumento das exigências de energia e aparato sintético dos ovócitos (FAIR, 2003) e o aumento do diâmetro.

Tabela 4. Diâmetro do folículo (fol) e do ovócito (ov) em folículos primordiais (F_P) e primários unilaminares (F_{PU}) nos três grupos de camundongas, expressos em µm.

Tipo de folículo		Grupos		
		C ₃₀	C ₇₀	C ₁₈₀
F _P (µ)	fol	22,17 ± 1,28 ^a	23,10 ± 0,74 ^b	23,70 ± 0,85 ^b
	ov	15,95 ± 0,92 ^a	16,50 ± 0,80 ^a	16,42 ± 0,93 ^a
F _{PU} (µ)	fol	46,02 ± 3,58 ^a	45,48 ± 2,97 ^a	42,87 ± 5,45 ^a
	ov	27,84 ± 2,32 ^a	29,28 ± 1,57 ^a	24,71 ± 2,80 ^b

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

Os valores dos diâmetros de folículos multilaminares sem e com a teca folicular não variaram (Tabela 5), mas os diâmetros do ovócito, sem e com a zona pelúcida, foram maiores no grupo C₇₀. Os diâmetros dos folículos antrais iniciais sem a teca foram significativamente maiores no grupo C₇₀ do que no grupo C₃₀, mas não houve variação quanto ao grupo C₁₈₀. Os diâmetros destes folículos com a teca foram significativamente menores nas camundongas C₃₀. O diâmetro dos ovócitos sem e com a zona pelúcida foram maiores no grupo C₇₀, não havendo variação entre os dois outros grupos. Com relação aos folículos antrais, foi observado que os diâmetros destes folículos sem a teca folicular foram significativamente maiores no grupo C₇₀ do que os do grupo C₁₈₀, mas não houve variação quanto ao grupo C₃₀. Considerando a teca nestes folículos, os diâmetros obtidos no grupo C₇₀ foram maiores que nos dois outros grupos. Os diâmetros dos ovócitos sem e com a zona pelúcida foram significativamente maiores no grupo C₇₀ (p<0,05).

O desenvolvimento para o estágio de folículo multilaminar é associado com os primeiros sinais detectáveis de síntese de RNA no ovócito (FAIR, 2003). Ovócitos de folículos antrais incipientes são transcrionalmente ativos, sendo este, um sinal de maturidade ovocitária e competência meiótica (GRIFFIN *et al.*, 2006). Em diversas espécies estudadas, incluindo camundongas, o ovócito se torna pleno no estágio de antral incipiente, quando atinge cerca de 65 µm de diâmetro, mas tanto o ovócito quanto o folículo, continuam a crescer até o estágio de folículo ovulatório ou de Graaf (GRIFFIN *et al.*, 2006).

Tabela 5. 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 (F_{PM}); antrais incipientes (F_{AI}) antrais (F_A) nos três grupos de camundongas, expressos em μm .

Tipo de folículo			Grupos		
			C_{30}	C_{70}	C_{180}
F_{PM}	Fo	s/ t	$119,60 \pm 14,82^a$	$127,50 \pm 12,06^a$	$117,45 \pm 7,26^a$
	I	c/ t	$138,88 \pm 16,35^a$	$149,08 \pm 13,75^a$	$137,09 \pm 9,26^a$
	Ov	s/ zp	$58,02 \pm 3,95^a$	$64,22 \pm 2,44^b$	$56,59 \pm 3,97^a$
		c/ zp	$63,17 \pm 4,18^a$	$68,71 \pm 2,48^b$	$61,56 \pm 3,90^a$
F_{AI}	Fo	s/ t	$125,65 \pm 9,86^a$	$137,55 \pm 9,61^b$	$134,86 \pm 10,99^{ab}$
	I	c/ t	$145,48 \pm 10,66^a$	$163,24 \pm 10,45^b$	$158,28 \pm 11,88^b$
	Ov	s/ zp	$59,54 \pm 4,65^a$	$66,78 \pm 2,43^b$	$73,05 \pm 4,84^a$
		c/ zp	$65,10 \pm 5,05^a$	$71,56 \pm 2,50^b$	$66,89 \pm 5,11^a$
F_A	Fo	s/ t	$282,08 \pm 43,04^{ab}$	$327,39 \pm 48,47^a$	$265,48 \pm 58,08^b$
	I	c/ t	$317,46 \pm 46,45^a$	$372,17 \pm 54,14^b$	$304,88 \pm 62,27^a$
	Ov	s/ zp	$67,07 \pm 3,03^a$	$75,49 \pm 3,58^b$	$69,01 \pm 5,70^a$
		c/ zp	$73,91 \pm 2,86^a$	$80,98 \pm 3,60^b$	$75,00 \pm 6,11^a$

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

No total, observa-se que o folículo cresceu de, aproximadamente, 23 μm (folículo primordial) até cerca de 330 μm em diâmetro (folículo antral), por um período de 58 dias (Fig. 2).

Observa-se que os resultados da análise do diâmetro dos folículos e dos ovócitos, em diferentes estágios de desenvolvimento, mostraram pequenas variações entre as camundongas do mesmo grupo, constituindo um critério adequado tanto para a classificação dos estágios foliculares quanto para a detecção de alterações no desenvolvimento folicular ovariano.

5.2.3. Proporção Volumétrica dos Componentes Ovarianos

Os valores referentes à proporção entre os componentes ovarianos, folículos, córtex e medula encontram-se na Tabela 6. A proporção de folículos primordiais variou nos três grupos, sendo muito maior no grupo C₃₀. Com relação aos folículos unilaminares, observou-se uma proporção significativamente maior no grupo C₃₀. As proporções para os folículos multilaminares variaram significativamente entre os grupos C₃₀ e C₁₈₀, mas não houve diferenças com relação ao grupo C₇₀. Os valores referentes aos folículos antrais são significativamente maiores no grupo C₃₀. As proporções de folículos antrais iniciais, atresícos e multiovocitários não apresentaram diferenças significativas nos três grupos estudados. Os pontos que incidiram sobre os folículos que não apresentavam ovócitos visíveis no corte e sobre o interstício variaram significativamente nos três grupos, sendo maior no grupo C₃₀. As proporções de medula foram significativamente maiores no grupo C₁₈₀, não apresentando diferenças entre os dois outros grupos ($p>0,05$).

Ao somar as proporções do componente germinativo do córtex, ou seja, os folículos, observa-se diferença significativa entre os três grupos, sendo maior no grupo C₃₀, 59%, intermediário nas camundongas C₇₀, 41%, e menor no grupo C₁₈₀, 30% (Figura 6).

A proporção volumétrica de constituintes ovarianos é um parâmetro válido, permitindo detectar as variações na população celular ovariana (folículos, córtex e medula) com clareza, embora a frequência de folículos, se realizada em uma amostra de cortes histológicos representativa da massa total do ovário, reflita de forma evidente a dinâmica do desenvolvimento folicular ovariano.

Tabela 6. Proporção volumétrica dos componentes do ovário esquerdo nos três grupos de camundongas: Folículos primordiais (F_P), primários unilaminares (F_{PU}), primários multilaminares (F_{PM}), antrais incipientes (F_{AI}), antrais (F_A), atresícos (F_{Atr}), multiovocitários (F_{MO}) e folículos sem o ovócito presente no corte ($F_{S/OV}$); estroma ovariano (E) e região medular do ovário (M).

Componentes	GRUPOS		
	C ₃₀	C ₇₀	CC ₁₈₀
F_P	$1,62 \pm 0,67^a$	$0,64 \pm 0,49^b$	$0,17 \pm 0,14^c$
F_{PU}	$2,08 \pm 0,66^a$	$0,92 \pm 0,48^b$	$0,52 \pm 0,36^b$
F_{PM}	$7,69 \pm 2,16^a$	$6,32 \pm 2,64^{ab}$	$4,50 \pm 1,27^b$
F_{AI}	$3,70 \pm 1,75^a$	$3,08 \pm 1,00^a$	$2,86 \pm 1,03^a$
F_A	$8,35 \pm 2,98^a$	$5,95 \pm 1,27^b$	$4,36 \pm 1,77^b$
F_{Atr}	$1,37 \pm 0,91^a$	$1,02 \pm 0,63^a$	$2,12 \pm 1,73^a$
$F_{S/OV}$	$34,80 \pm 4,99^a$	$22,95 \pm 8,43^b$	$14,95 \pm 3,67^c$
F_{MO}	$0,04 \pm 0,12^a$	$0,15 \pm 0,26^a$	$0,52 \pm 0,74^a$
E	$33,52 \pm 8,05^a$	$48,64 \pm 11,67^b$	$52,91 \pm 6,95^b$
M	$6,82 \pm 2,71^a$	$10,31 \pm 3,02^a$	$17,10 \pm 3,36^b$

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

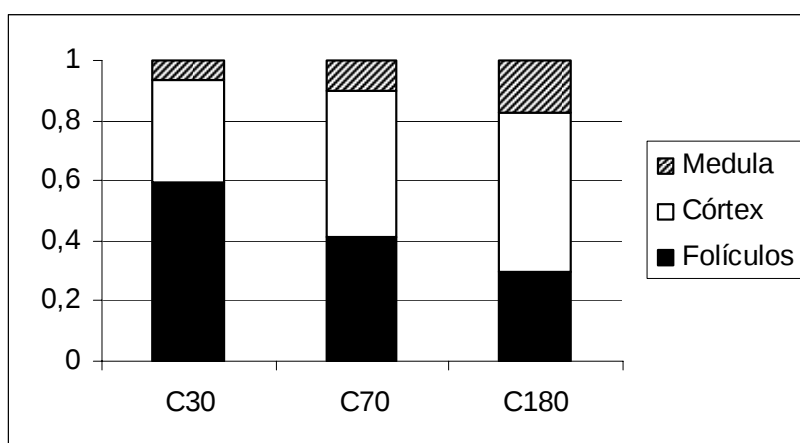


Figura 6 - Proporção volumétrica dos componentes básicos no ovário esquerdo de camundongas com 30, 70 e 170 dias de idade (C_{30} , C_{70} e C_{180} respectivamente): folículos ovarianos, estroma da região cortical (córtex) e região medular (medula).

6. CONCLUSÕES FINAIS

- A frequência estimada de folículos ovarianos nos diversos estágios de desenvolvimento é um parâmetro recomendável para se acompanhar o recrutamento inicial e cíclico dos folículos ao longo da vida.
- A atresia acomete principalmente folículos em crescimento, mas a sua incidência não variou entre as faixas etárias estudadas.

- A análise da proporção volumétrica demonstrou claramente o declínio do componente germinativo (folículos ovarianos) na estrutura do ovário com o avançar da idade da fêmea.
- Os parâmetros morfométricos adotados neste trabalho são válidos e podem ser utilizados em outros estudos experimentais que visem detectar alterações no desenvolvimento folicular ovariano de camundongas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALIGAR P. N., KALI WAL B.B. (2004). Temporal effect of carbofuran on estrous cycle compensatory ovarian hypertrophy and follicles in hemiovariectomized albino mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**; 15: 71-77.

BANKS, W.J. (1992). Histologia Veterinária Aplicada. Trad. Francisco Javier Hernandez Blasquez, 2^a ed., **Manole**, cap.27.

BLONDIN P., DUFOUR M., SIRARD M.A. (1996). Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. **Biology of Reproduction**; 54:631-637.

BOLON B., BUCCI T. J., WARBRITTON A. R., CHEN J. J., MATTINSON D. R., HEINDEL J. J. (1997). Differential follicle counts as a screen for chemically induced ovarian toxicity in mice: results from continuous breeding bioassays. **Fundamental and Applied Toxicology**; 39: 1-10.

BUKOVSKY A. (2005). Can ovarian infertility be treated with bone marrow – or ovary derived-stem cells? **Reproductive Biology and Endocrinology**; 3:1-3.

BUCCI T.J., BOLON B., WARBRITTON A.R., CHEN J.J., HEINDEL J.J. (1997). Influence of sampling on the reproducibility of ovarian follicle counts in mouse toxicity studies. **Reproductive Toxicology**; 11 (5):689-696.

BYSKOV A.G., PETERS H., GRINSTED J. (1978). Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries of humans and other primates. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**; 7(3):469-485.

CANNING J., TAKAI Y., TILLY J. (2003). Evidence for genetic modifiers of ovarian follicular endowment and development from studies of five inbred mouse strains. **Endocrinology**; 144(1): 9-12.

CHORILLI M., MICHELIN D.C., SALGADO H.R.N. (2007). Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**; 28:11-23.

CHUN S.Y., EISENHAUER K.M., MINAMI S., BILLIG H., PERLAS E., HSUEH A.J.W. (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. **Endocrinology**; 137:1447-1456.

CHURCH D.M., GOODSTADT L., HILLIER L.W., ZODY M.C., GOLDSTEIN S. (2009). Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. **Plos Biology**; 7(3).

COBEA, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Acesso no site <http://www.cobea.org.br/cobea.htm>.

COUCOUVANIS E.C., SHERWOOD S.W., CARSWELL-CRUMPTON C., SPACK E.G., JONES P.P. (1993). Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. **Experimental Cell Research**; 209:238-247.

DE POL A., VACCINA F., FORABOSCO A., CAVAZZUTI E., MARZONA L. (1997). Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. **Human Reproduction**; 12:2235–2241

FAIR T. (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**; 78:203-216.

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

FLAWS J.A., HIRSHFIELD A.N., HEWITT J.A., BABUS J.K., FURTH P.A. (2001). Effect of Bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary. **Biology of Reproduction**; 64:1153-1159.

FORABOSCO A., SFORZA C. (2007). Establishment of ovarian reserve: a quantitative morphometric study of the developing human ovary. **Fertility and Sterility**; 88 (3): 675-683.

GUILLETTE L.J., GROSS T.S., MASSON G.R., MATTER J.M., PERCIVAL H.F., WOODWARD A.R. (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. **Environmental Health Perspective**; 102: 680–688.

GOUGEON A. (1986) Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. **Human Reproduction**; 1:81-87.

GOUGEON A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**; 17:121-155.

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

HAFEZ, E.S.E. (1970) Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. **USA, Lea & Febiger, Philadelphia**, 375 p.

HIREMATH M.B., KALIWAL B.B. (2002) Effect of endosulfan on ovarian compensatory hypertrophy in hemicastrated albino mice. **Reproductive Toxicology**; 16: 783-790.

HIRSHFIELD A.N., MIDGLEY A.R.JR. (1978) Morphometric analysis of follicular development in the rat. **Biololy of Reproduction**; 19:597-605.

HIRSHFIELD A.N. (1988). Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. **Biology of Reproduction**; 38, 1181-1188.

HIRSHFIELD A.N. (1989). Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. **Biology of Reproduction**; 41:309-316.

HIRSHFIELD, A.N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. **International Reviews Cytology**; 124:43–101.

HIRSHFIELD A.N., DeSANTI A.M. (1995). Patterns of ovarian cell proliferation in rats during the embryonic period and the first three weeks postpartum. **Biology of Reproduction**; 53:1208-1221.

HSUEH A.J.W., EISENHAUER K., CHUN S.Y., HSU S.Y., BILLIG H. (1996). Gonadal cell apoptosis. **Recent Progress in Hormone Research**; 51:433-455.

IRVING-RODGERS H.F., VAN WEZEL I.L., MUSSARD M.L., KINDER J.E., RODGERS R.J. (2001). Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. **Reproduction**; 122:761-775.

JEFFERSON W.N., COUSE J.F., PADILLA-BANKS E., KORACH K.S., NEWBOLD R.R. (2002). Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) alpha expression and multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic action. **Biology of Reproduction**; 67:1285-1296.

JOHNSON J., CANNING J., KANEKO T., PRU J.K., TILLY J.L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**; 428: 145-150.

JOHNSON J., BAGLEY J., SKAZNIK-WIKIEL M., LEE H.J., ADAMS G.B., NIKURA Y., TSCHUDY K.S., TILLY J.C., CORTES M.L., FORKERT R., SPITZER T., IACOMINI J., SCADDEN D.T., TILLY J.L. (2005). Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**; 122: 303-315.

KESSEL R.G. (2001). Histologia Médica Básica. A biologia das células, tecidos e órgãos. Trad. Mira de Casrilevitz Engelhardt, Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**; 511p.

MANDARIM-DE-LACERDA C. (1995). Métodos quantitativos em Morfologia. Rio de Janeiro, **EDUERJ**; 131p.

MARKSTRÖM E., SVENSSON E.C., SHAO R., SVANBERG B., BILLIG H. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation. **Reproduction**; 123:23-30.

MARTINS F.S., SILVA J.R.V., RODRIGUES A.P.R., FIGUEIREDO J.R. (2008). Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**; 32:36-39.

MAYER L.P., DEVINE P.J., DYER C.A., HOYER P.B. (2004). The Follicle-Deplete Mouse Ovary Produces Androgen. **Biology of Reproduction**; 71:130–138.

MCGEE E.A., HSUEH A.J.W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**; 21:200–214.

MIGUEL K.J. (2002). Estudo da população de mastócitos e da concentração de histamina na superovulação e na atresia folicular em ratas Wistar pré-púberes. Dissertação de Mestrado em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia, **UNICAMP**, 77 p.

MIKKELSEN A.L., HOST E., LINDENBERG S. (2001). Incidence of apoptosis in granulosa cells from immature human follicles. **Reproduction**; 122:481-486.

MOORE K.L., PERSAUD T.V.N. (2008). Embriologia Básica. Trad. Mira de Casrilevitz Engelhardt, Rio de Janeiro; **Elsevier**; 365p.

MORITA Y., PEREZ G.I., MARAVEI D.V., TILLY K.I., TILLY J.L. (1999). Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis *in vitro*. **Molecular Endocrinology**; 13(6): 841-850.

NELSON J. F., FELICIO L. S., RANDALL P. K., SIMS C., FINCH C. (1982). A longitudinal study of estrous cyclicity in aginf C57BL/6J Mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. **Biology of Reproduction**; 27: 327-339.

NUMAZAWA A., KAWASHIMA S. (1982). Morphometric studies on ovarian follicles and corpora lutea during the oestrous cycle in the mouse. **Journal Reproduction and Fertility**; 64:275-283.

PAYAN-CARREIRA R., PIRES M.A. (2008). Multioocyte follicles in domestic dogs: a survey of frequency of occurrence. **Theriogenology**; 69:977-982.

PEDERSEN T., PETERS H. (1968). Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **Journal Reproduction and Fertility**; 17:555-557.

PEPLING M.E., SPRADLING A.C. (2001). Mouse ovarian germ cells cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. **Developmental Biology**; 234:339-351

RAJAH R., GLASER E.M., HIRSHFIELD A.N. (1992). The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. **Developmental Dynamics**; 194:177-192.

REYNAUD K., GICQUEL C., THOUMIRE S., CHEBROUT M., FICHEX C., BESTANDJI M., CHASTANT-MAILLARD A. (2009). Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in the feline ovary. **Reproduction of Domestic Animals**; 44:174-179.

RICHARDS I.S., MIDGLEY A.R. (1976). Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. **Biology of Reproduction**; 14:82-94.

RICHARDS J.S., RAO M.C., IRELAND J.J. (1978). Actions of pituitary gonadotrophins on the ovary. In: Crighton CB, Haynes NB, Foxcroft GR, Lamming GE (eds.), Control of Ovulation, **26th Easter School Symposium**, University of Nottingham, Nottingham, England. London: Butterworths:197-216.

SADEU J.C., CORTVRINDT R., RON-EL R., KASTERTEIN E., SMITZ J. (2006). Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**; 85:1130-1141.

SANTOS K.R.P., MENDONÇA J.S., TEIXEIRA V.W., TEIXEIRA A.A.C. (2003). Influência da ausência de luz sobre o ciclo estral de ratas. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo; 70:21-23.

SENEDA M.M., BORDIGNON V. (2007). Novos conceitos em foliculogênese, PUBVET, **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**; 1 (8). Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=88>.

SREELAKSHMI T.S., KALI WAL B.B. (2007). Phosphamidon induced effects on estrous cycle, ovarian and uterine biochemical parameters in Swiss albino mice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**; 87; 204-210

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

TILLY J.L., (2001). Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**; 2:838-848

TILLY J.L. (2003). Ovarian follicle counts – not as simple as 1,2,3. **Reproductive Biology and Endocrinology**; 11: 1-4.

TROUNSON A., ANDERIESZ C., JOENS G.M., KAUSCHE A., LOLATGIS N., WOOD C. (1998). Oocyte maturation. **Human Reproduction**; 3:52-62.

TSAFIRI A., BRAW R.H. (1984). Experimental approaches to atresia in mammals. **Oxford Reviews in Reproductive Biology**; 6:226-265.

UZUMCU M., KUHN P.E., MARANO J.E., ARMENTI A.E., PASSANTINO L. (2006). Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Müllerian hormone production in the rat ovary. **Journal of Endocrinology**; 191(3): 549-558.

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