

Universidade Estadual do Ceará

José Roberto Viana Silva

**ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR
INICIAL E ATRESIA EM OVÁRIOS CAPRINOS**

Fortaleza – Ceará

Agosto, 2004

Universidade Estadual do Ceará

José Roberto Viana Silva

ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR
INICIAL E ATRESIA EM OVÁRIOS CAPRINOS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução animal.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo

Fortaleza – Ceará

Agosto, 2004

Universidade Estadual do Ceará
Curso de Doutorado em Ciências Veterinárias

Título do trabalho: Estudo do desenvolvimento folicular inicial e atresia em ovários caprinos

Autor: José Roberto Viana Silva

Defesa em: 06/08/2004

Conceito

obtido:

Nota obtida: _____

Banca Examinadora

José Ricardo de Figueiredo, Prof. Dr.

Orientador

Robert van den Hurk, Prof. Dr.

Sônia Nair Bão, Prof^a. Dr^a.

José Ferreira Nunes, Prof. Dr.

Arturo B. Selaive Vilarroel, Prof. Dr.

Davide Rondina, Prof. Dr.

À Eveline, minha esposa, meu amor ...

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Muito obrigado a Deus, pela proteção que tem me concedido durante toda minha vida, por ter me dado força e coragem para enfrentar as dificuldades na vida pessoal e profissional e por ter iluminado o meu caminho e me colocado sempre nos lugares certos para que eu sempre encontrasse as pessoas certas.

Muito obrigado aos meus familiares, em especial minha mãe (Luisa) e meu pai (José Antônio) por todos os ensinamentos e preciosa ajuda. Fico feliz por ter vocês para mostrar minhas vitórias. Muito obrigado aos meus avós queridos (Helena e Antônio), pelo carinho e exemplo de humildade. Vocês me mostraram que tudo pode dar certo quando se acredita em Deus. A minha vida não seria a mesma sem as orações de vocês. Meus agradecimentos à minha esposa (Eveline), sogra (Alzenira), cunhados (Elainne e Renato), concunhado (Eduardo) e sobrinho (José), vocês foram muito importantes nesta fase de minha vida. A compreensão, o incentivo e o amor sincero que recebi, especialmente da minha esposa, foram essenciais para o sucesso deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos ao Dr. José Ricardo de Figueiredo, pela oportunidade de trabalhar em sua equipe e pelo exemplo de profissional e de pessoa. Seu conhecimento científico e sabedoria, associados à sua inestimável dedicação, otimismo, amizade e confiança, proporcionaram-me o crescimento profissional que se concretizou com a elaboração desta tese de doutorado. Aos demais integrantes do LAMOFOPA com quem tive a oportunidade de trabalhar, Ana Paula R. Rodrigues, Sônia H. F. Costa, Evelyn R. Andrade, Marcos A. L. Ferreira, Regiane R. dos Santos, Maria Helena T. Matos, Juliana J. H. Celestino e Fabrício S. Martins, obrigado pela agradável convivência e pelo aprendizado que se adquire com o trabalho em equipe.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior – CAPES e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, muito obrigado por todo apoio financeiro concedido na forma de bolsas de estudos no Brasil (FUNCAP) e no exterior (CAPES) e de recursos para as pesquisas que viabilizaram a realização desta tese.

Ao Dr. Rob van den Hurk, muito obrigado por todos ensinamentos, pela confiança, pela gentileza e pelo incondicional apoio durante o período que estive trabalhando sob sua supervisão na Universidade de Utrecht (Holanda), a sua dedicação aos estudantes de doutorado é admirável. (*Thanks very much to Dr. Rob van den Hurk, my supervisor in Utrecht University, for helping and trusting me during my stay in Holland, your commitment to your PhD students is admirable*). Obrigado à Dra. Sônia Nair Bão, por possibilitar a realização de parte dos experimentos em seu laboratório na Universidade de Brasília, e pelas valiosas sugestões durante os experimentos e redação dos manuscritos. Meus agradecimentos à Dra. Carolina Madeira Lucci pela ajuda nos trabalhos com microscopia eletrônica e pelas sugestões durante a elaboração dos artigos científicos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UECE, que contribuíram para a minha formação na pós-graduação, meus sinceros agradecimentos. Obrigado em especial ao Dr. José Ferreira Nunes, por ser o fundador do PPGCV e por todo o seu esforço para formar uma equipe de profissionais competentes. Muito obrigado às secretárias do PPGCV, Alzenira Andrade e Adriana Albuquerque, pela eterna amizade, dedicação e prestabilidade.

Aos colaboradores de outras instituições, Dr. Francisco Valdeci A. Ferreria, Dr. Manuel Odorico de Moraes, Dra. Cláudia Pessoa, Dra. Ana Paula A. Nunes e Francisco José Queirós (técnico - Universidade Federal do Ceará), obrigado pela contribuição oferecida. Meus agradecimentos ao Dr. Raimundo N. B. Lôbo (Embrapa-caprinos), pela ajuda com a análise estatística dos trabalhos. A todos que não foram aqui mencionados,

mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram (1) determinar as taxas de atresia em folículos pré-antrais, (2) verificar a expressão de EGF e seu receptor em folículos ovarianos caprinos, bem como (3) avaliar a eficiência de MEM, SBAC, (4) FSH e EGF sobre a ativação *in vitro* de folículos primordiais caprinos. As taxas de atresia em folículos primordiais, primários e secundários foram determinadas utilizando-se histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão. Para investigar o envolvimento do sistema EGF/EGF-R no controle da atresia e crescimento folicular, a expressão das respectivas proteínas e RNA mensageiros em folículos ovarianos caprinos foram utilizadas as técnicas de imunohistoquímica e RT-PCR. Fragmentos de córtex ovariano foram cultivados *in vitro* por cinco dias para avaliar a eficiência de cinco meios de cultivo (MEM, SBAC e MEM adicionado de 25, 50 ou 75% de SBAC) e dois tipos de suplementação (ausência ou presença de ITS, piruvato, glutamina, hipoxantina e BSA). Após definir um meio de cultivo de base, os efeitos de FSH e/ou EGF sobre a ativação de folículos primordiais caprinos foram, em seguida, testados. O número de folículos primordiais, intermediários, primários e secundários normais bem como o número de folículos atrésicos antes e após o cultivo *in vitro* foi avaliado. Os resultados mostraram que a percentagem de folículos primordiais, primários e secundários com sinais de atresia foi 8,5, 14,3 e 16,8%, respectivamente. A proteína e o RNA mensageiro para EGF e seu receptor foram encontrados em folículos primordiais, primários e secundários, bem como em pequenos e grandes folículos antrais. Os resultados dos estudos *in vitro* mostraram que os meios testados foram igualmente eficientes em promover a ativação de folículos primordiais, mas a SBAC reduziu significativamente a viabilidade folicular enquanto que a adição de suplementos aumentou o número de folículos viáveis. O FSH e/ou EGF não influenciaram as taxas de ativação de folículos primordiais, mas promoveram crescimento oocitário após cultivo *in vitro*. Em conclusão, a atresia folicular é observada em baixos níveis durante a fase pré-antral da foliculogênese e o sistema EGF/EGF-R é expresso em folículos ovarianos caprinos. O MEM é mais eficiente do que a SBAC para o cultivo de folículos primordiais caprinos, enquanto que FSH e/ou EGF promovem crescimento oocitário durante o cultivo de córtex ovariano caprino.

ABSTRACT

The aims of this study were (1) to determine the rate of atresia in preantral follicles, (2) to verify the expression of EGF and its receptor in goat ovarian follicles, as well as (3) to evaluate the effectiveness of MEM, CWS, (4) FSH and EGF on *in vitro* activation of goat primordial follicles. The rate of atresia in primordial, primary and secondary follicles was evaluated by classical histology and transmission electron microscopy. To investigate the involvement of the EGF/EGF-R system in the control of follicular growth and atresia in goats, protein and mRNA expression for EGF and EGF-R were evaluated in goat follicles using immunohistochemistry and RT-PCR. Then, fragments of ovarian cortex were cultured *in vitro* for five days to investigate the effectiveness of five different media (MEM, SBAC and MEM added of 25, 50 or 75% of CWS) and two supplements (absence or presence of ITS, pyruvate, glutamine, hypoxanthine and BSA). The best medium was, then, used to test the effects of FSH and/or EGF on *in vitro* activation of goat primordial follicles. The number of healthy primordial, intermediate, primary and secondary follicles, as well as the number of atretic follicles before and after culture was evaluated. The distribution of atretic follicles as primordial, primary and secondary follicles was 8.5, 14.3 and 16.8%, respectively. Proteins and mRNAs for EGF and its receptor were found in primordial, primary and secondary follicles, as well as in small and large antral follicles. *In vitro* studies showed that all media tested were equally effective in promoting primordial follicle activation, but CWS significantly reduced follicular viability while the presence of supplements in the media increased the number of healthy follicles. The presence of FSH and/or EGF did not affect primordial follicle activation, but did promote oocyte growth after *in vitro* culture. In conclusion, follicular atresia is observed during early folliculogenesis, and the EGF/EGF-R system is expressed in goat ovarian follicles. To culture goat primordial follicles, MEM is more effective than CWS, and FSH and/or EGF promote oocyte growth during *in vitro* culture of goat ovarian cortex.

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Revisão de literatura	17
2.1. O ovário mamífero	17
2.2. Foliculogênese: aspectos morfológicos e cronologia da formação folicular	18
2.3. Importância de FSH e LH na regulação da foliculogênese	22
2.3.1. Ativação de folículos primordiais e desenvolvimento folicular inicial	23
2.3.2. Desenvolvimento folicular na fase antral	24
2.4. Importância dos fatores de crescimento na regulação da foliculogênese	26
2.4.1. Fatores de crescimento pertencentes à família EGF	27
2.4.2. Fatores de crescimento pertencentes à família TGF- β	29
2.4.3. Fatores de crescimento pertencentes ao grupo FGF	32
2.4.4. IGF e proteínas de ligação de IGF	33
2.4.5. <i>Kit ligand</i> e fator inibidor de leucemia	34
2.5. Atresia folicular	35
2.5.1. Características morfológicas e apoptose	35
2.5.2. Papel de gonadotrofinas e fatores de crescimento no controle da atresia	37
2.6. Modelos <i>in vitro</i> para o estudo da ativação de folículos primordiais	39
2.7. Técnicas utilizadas para comprovar a ativação e crescimento de folículos primordiais	40
2.8. Importância da composição do meio sobre o desenvolvimento folicular <i>in vitro</i>	40
3. Justificativa	43
4. Hipóteses científicas	45
5. Objetivos	46
6. Capítulo 1: Taxa de degeneração de folículos pré-antrais em ovários caprinos	48

7. Capítulo 2: Expressão de RNA mensageiro e localização da proteína para o fator de crescimento epidermal e seu receptor em ovários caprinos	62
8. Capítulo 3: Viabilidade e crescimento de folículos primordiais caprinos após cultivo <i>in vitro</i> de fragmentos de córtex ovariano em meio contendo água de coco	83
9. Capítulo 4: Influências de FSH e EGF sobre folículos primordiais durante cultivo <i>in vitro</i> de córtex ovariano caprino	104
10. Discussão geral	126
10.1. Atresia nos estágios iniciais do desenvolvimento folicular	126
10.2 Evidências da importância do sistema EGF/EGF-R no controle da atresia e crescimento folicular em caprinos	128
10.3. Estudo da eficiência de diferentes meios de cultivo para ativação e manutenção da viabilidade de folículos primordiais caprinos <i>in vitro</i>	130
10.4. Influência de EGF e FSH sobre a ativação e atresia em folículos primordiais caprinos	131
11. Conclusão geral	135
12. Perspectivas	136
13. Referências bibliográficas	137

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ActR	:Receptor para ativina
AMH	:Hormônio anti-Mülleriano
AMHR-2	:Receptor do tipo 2 para o hormônio anti-Mülleriano
ANOVA	:Análise de variância
ATP	:Adenosina Trifosfato
as	:Anti senso

BMP	:Proteína morfogenética óssea
BMPs	:Proteínas morfogenéticas óssea
BMPR	:Receptor para proteína morfogenética óssea
BrdU	:Bromodesoxiuridina
BSA	:Albumina sérica bovina
bp	:Pares de base
°C	:Graus Celsius
Ca ²⁺	:Íon Cálcio
CaCl ₂	:Cloreto de Cálcio
CC	:Células do cúmulus
cDNA	:Ácido desoxirribonucléico complementar
CG	:Células da granulosa
c-Kit	:Receptor para <i>Kit ligand</i>
Cl ⁻	:Íon Cloro
CL	:Corpo lúteo
CO ₂	:Dióxido de carbono
COCs	:Complexos cúmulus-oócitos
CWS	:Solução à base de água de coco
CWS ⁺	:Solução à base de água de coco suplementada
DAB	:Diaminobenzidina
dGC	:Células da granulosa degeneradas
DNA	:Ácido desoxirribonucléico
DNase	:Enzima desoxirribonuclease
dNTP	:Nucleotídeos
dO	:Oócito degenerado
EGF	:Fator de crescimento epidermal
EGF-R	:Receptor para o fator de crescimento epidermal
ErbR	:Receptor do tipo tirosina quinase para o fator de crescimento epidermal
FGF	:Fator de crescimento fibroblástico
FGF-R	:Receptor para o fator de crescimento fibroblástico
FSH	:Hormônio folículo estimulante
FSH-R	:Receptor para o hormônio folículo estimulante
Fig.	:Figura
G1/S	:Primeiro intervalo da mitose / Fase de síntese
G2	:Segundo intervalo da mitose
GC	:Células da granulosa
GDF-9	:Fator de crescimento de diferenciação 9
GI	:Número de acesso ao banco de genes
GnRH	:Hormônio liberador de gonadotrofinas
h	:Horas
H ³	:Hidrogênio triciado

HB-EGF	:Ligante de heparina similar ao fator de crescimento epidermal
HCl	:Cloro de hidrogênio
H ₂ O ₂	:Peróxido de hidrogênio
IAA	:Ácido 3-indol acético
IGF	:Fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	:Proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina
IGFR	:Receptor para o fator de crescimento semelhante à insulina
IgG	:Imunoglobulina
IU	:Unidade internacional
K ⁺	:Íon Potássio
kDa	:Quilodaltons
KGF	:Fator de crescimento queratinocítico
KL	: <i>Kit ligand</i>
LH	:Hormônio Luteinizante
LH-R	:Receptor para o hormônio luteinizante
LIF	:Fator inibidor de leucemia
LIF-R	:Receptor para o fator inibidor de leucemia
M	:Molar
m	:Mitocôndria
MEM	:Meio essencial mínimo
MEM ⁺	:Meio essencial mínimo suplementado
mGC	:Células da granulosa murais
mg	:Miligrama
min.	:Minutos
mL	:Mililitro
mm	:Milímetro
mM	:Milimolar
mOsm/L	:Miliosmol / litro
mRNA	:Ácido ribonucléico mensageiro
n	:Número
N	:Núcleo do oócito
Na ⁺	:Íon Sódio
NaCl	:Cloro de Sódio
ng	:Nanograma
nm	:Nanômetro
Nu	:Núcleo do oócito

O	:Oócito
OSE	:Epitélio superficial do ovário
PAS	:Ácido periódico de Schiff
PBS	:Tampão fosfato salino
PBST	:Tampão fosfato salino adicionado de 0,05 % de Tween
PCNA	:Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	:Reação em cadeia da polimerase
pFSH	:Hormônio folículo estimulante de origem porcina
pH	:Potencial hidrogeniônico
PLSD	:Diferença significativa mínima e protegida
PO ₄ ⁻	:Fosfato
P<0.05	:Probabilidade menor do que 5%
P>0.05	:Probabilidade maior do que 5%
RNA	:Ácido ribonucléico
RNase	:Enzima ribonuclease
RT	:Transcriptase reversa
-RT	:Menos transcriptase reversa
RT-PCR	:Transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase
s	:Senso
SBAC	:Solução à base de água de coco
± SD	:Mais ou menos o desvio padrão
sec.	:Segundos
SER	:Retículo Endoplasmático Liso
SO ₄ ⁻	:Sulfato
T	:Células da teca
TCM 199	:Meio de Cultura de Tecido 199
TGF-α	:Fator de crescimento transformante alfa
TGF-β	:Fator de crescimento transformante beta
TβR	:Receptor para o fator de crescimento transformante
U	:Unidade internacional

V	:Vacúolos
VIP	:Peptídeo intestinal vasoativo
W	:Watts
x^2	:Qui-quadrado
ZP	:Zona pelúcida
μg	:Microgramas
μL	:Microlitro
μm	:Micrômetro
%	:Porcentagem
~	:aproximadamente

1. Introdução

Os caprinos são considerados animais economicamente atrativos por serem importantes fontes de carne, leite e pele (DEBEUF *et al.*, 2004). Além de estarem presentes em todos os continentes, no Brasil eles desempenham importantes papéis econômico e social, especialmente na região nordeste do país. Nas últimas décadas, uma quantidade significativa de pesquisas tem sido realizada na área de reprodução animal visando aumentar o potencial reprodutivo de caprinos de alto valor zootécnico ou em via de extinção. Para machos, já é possível obter milhares de descendentes de um único animal; mas para fêmeas, um número relativamente pequeno tem sido obtido. Neste contexto, torna-se prioritário o desenvolvimento de pesquisas que contribuam para uma melhor compreensão dos processos relacionados com a formação, crescimento e maturação dos oócitos inclusos em folículos ovarianos caprinos.

Ao nascimento, o ovário dos mamíferos geralmente contém milhares de folículos primordiais, os quais são considerados o *pool* de estoque de folículos ovarianos. No entanto, poucos folículos primordiais desenvolvem-se até o estágio de folículo pré-ovulatório, pois a grande maioria morre por atresia após iniciar o crescimento *in vivo* (EPPIG & O'BRIEN, 1996). Estudos em diferentes espécies tem demonstrado que a atresia ocorre predominantemente em folículos antrais (HIRSFIELD, 1988), mas DRIANCOURT *et al.* (1985) relataram que aproximadamente 50% dos folículos pré-antrais de ovelhas desaparecem antes de formarem a cavidade antral. Durante os estágios iniciais da foliculogênese, os fatores de crescimento localmente produzidos exercem um papel determinante na manutenção da viabilidade e do crescimento folicular (FORTUNE, 2003). Após a formação de antro, os folículos tornam-se progressivamente dependentes das gonadotrofinas (FSH e LH) e os fatores de crescimento locais atuam inibindo ou potencializando a ação destes hormônios. Desta forma, a identificação de fatores produzidos localmente em ovários caprinos, associado com estudos *in vitro* poderá

contribuir para uma melhor compreensão dos diversos componentes implicados na foliculogênese e no processo de atresia folicular nesta espécie.

Para um maior esclarecimento da importância deste trabalho, a revisão de literatura a seguir aborda aspectos relacionados ao ovário mamífero, às características morfológicas e cronologia da formação folicular, ao controle da foliculogênese por gonadotrofinas e fatores de crescimento, à atresia folicular, bem como aos modelos utilizados para estudo da foliculogênese *in vitro*. Os benefícios oriundos de uma melhor compreensão do desenvolvimento folicular para a melhoria da eficiência reprodutiva dos caprinos também é enfatizado. Finalmente, será mostrada a contribuição deste trabalho sob a forma de quatro artigos científicos referentes ao estudo da foliculogênese inicial em caprinos.

2. Revisão de literatura

2.1. O ovário mamífero

O ovário mamífero é um órgão complexo composto de vários tipos celulares que incluem oócitos, células da granulosa, da teca, do estroma e do epitélio da superfície ovariana. Estes tipos celulares estão localizados na região cortical do ovário e posteriormente se diferenciam em vários subtipos. Por exemplo, as células da granulosa diferenciam-se em células do cúmulus, murais ou luteais, enquanto que as células da teca desenvolvem-se em camadas internas e externas (ERICKSON & SHIMASAKI, 2003). A região medular é localizada na porção mais interna do ovário, com exceção dos eqüídeos, sendo constituída por tecido conjuntivo (fibroblastos, fibronectina e fibras colágenas do tipo I e II), nervos, vasos sanguíneos e linfáticos responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário (Figura 1). Além dos nutrientes e hormônios provenientes da corrente

sangüínea, outros fatores produzidos pelos diferentes tipos celulares descritos contribuem para a formação de um sistema bastante complexo que regula as funções do ovário, que incluem a produção de gametas e hormônios.

2.2. Foliculogênese: aspectos morfológicos e cronologia da formação folicular

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (SAUMANDE, 1991). Em ruminantes, a foliculogênese tem sido bastante estudada em ovinos e bovinos, mas poucas informações são disponíveis em caprinos. A seguir, serão descritas as alterações morfológicas observadas durante o desenvolvimento de folículos primordiais até o estágio de folículos pré-ovulatórios. Estas características morfológicas são bastante importantes, pois elas são utilizadas para descrever os efeitos de hormônios e fatores de crescimento sobre diferentes tipos foliculares. Além disso, a cronologia do aparecimento de cada categoria folicular em ovários de ruminantes domésticos será descrita.

Durante a vida fetal, a formação dos folículos primordiais em ovários de caprinos, ovinos e bovinos é observada aos 62, 75 e 120 dias, respectivamente (BEZERRA *et al.*, 1998; McNATTY *et al.*, 1999; RÜSSE, 1983). Após a colonização dos ovários pelas células germinativas primordiais e posterior diferenciação em oogônias e oócitos, uma camada de células somáticas planas, conhecidas também como células da pré-granulosa, circundam os oócitos formando assim os folículos primordiais. A maioria das células da pré-granulosa são recrutadas das células mesoteliais oriundas do epitélio da superfície ovariana que tem alta atividade proliferativa. Após circundarem os oócitos, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e entram num período de quiescência (Figura 2, SAWYER *et al.*, 2002). A proliferação celular é retomada somente quando um folículo

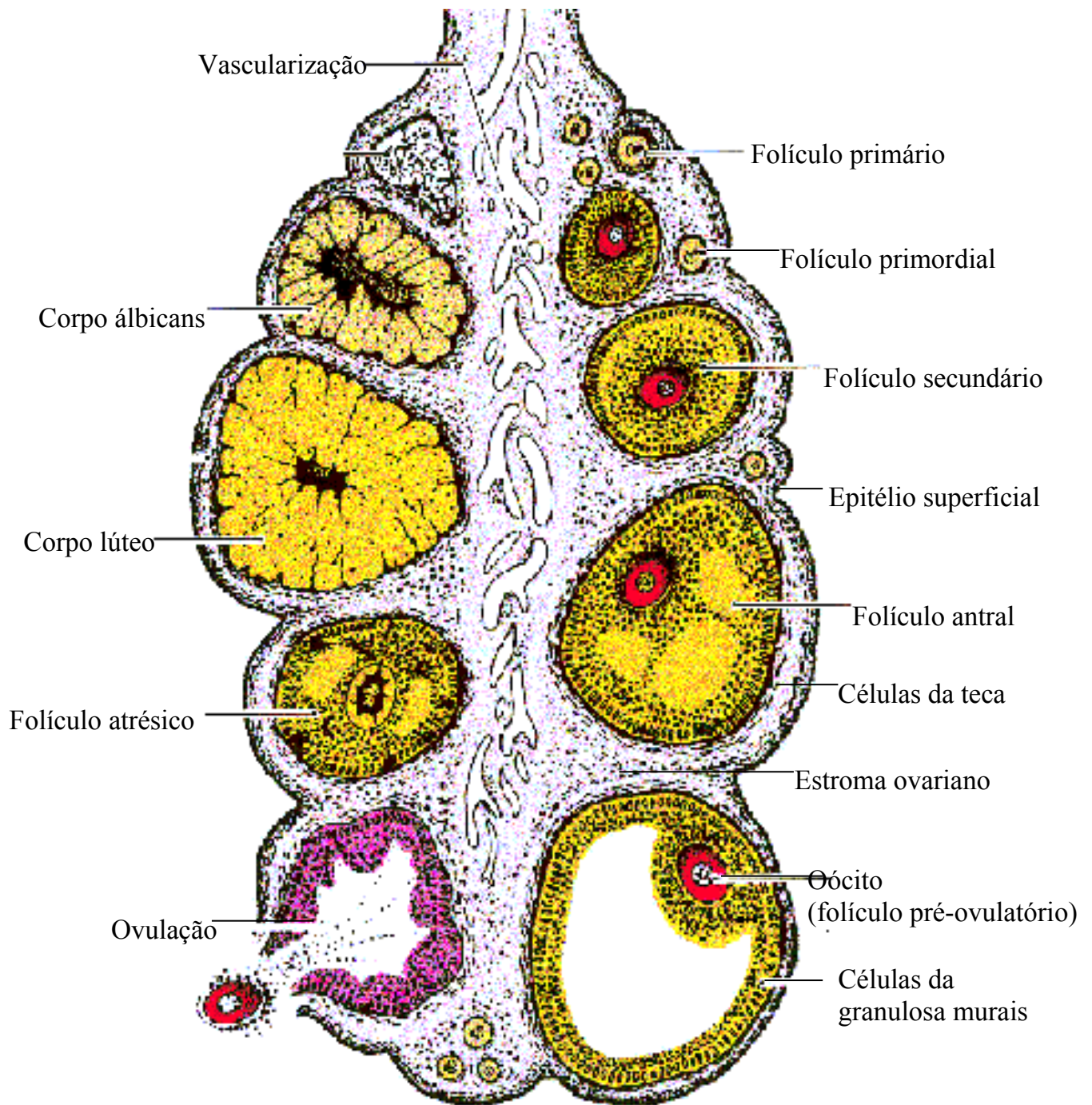


Figura 1. Esquema ilustrando o ovário mamífero com suas principais estruturas.

primordial quiescente começa a crescer, dias, meses ou anos após a sua formação (HIRSHFIELD, 1991).

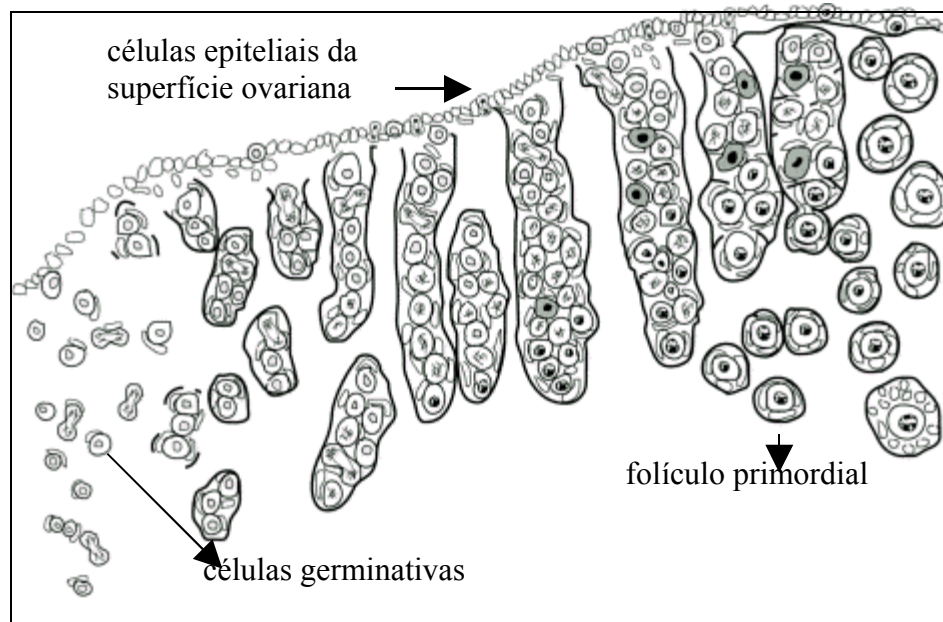


Figura 2. Esquema ilustrando a origem das células da pré-granulosa durante a formação dos folículos primordiais. Fonte: adaptado de JUENGEL *et al.*, 2002

As características morfológicas que marcam o início do crescimento de folículos primordiais são: aumento do diâmetro oocitário, proliferação das células da granulosa e transformação do formato destas células de achatado para cúbico. Durante esta fase, os folículos que apresentam células da granulosa com ambos formatos achatado e cúbico são denominados intermediários. Quando o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico, os folículos são classificados como primários. Em caprinos, ovinos e bovinos, o aparecimento de folículos primários, em fetos, ocorre aos 71, 100 e 140 dias de gestação, respectivamente (BEZERRA *et al.*, 1998; McNATTY *et al.*, 1999; RÜSSE, 1983). À medida que os folículos iniciam o crescimento, as proteínas que irão formar a zona pelúcida começam a ser sintetizadas (LEE, 2000). A zona pelúcida

é uma matriz extracelular glicoprotéica localizada entre o oócito e as células da granulosa e consiste de três glicoproteínas sintetizadas pelo oócito, ou seja, zona pelúcida 1 (ZP-1), ZP-2 e ZP-3 (BECKERS *et al.*, 1996). A multiplicação das células da granulosa dos folículos primários leva à formação de várias camadas destas células ao redor do oócito, formando os folículos secundários. Neste estágio, a zona pelúcida é claramente identificada ao redor do oócito. Quando os folículos possuem de duas a três camadas de células da granulosa, os precursores das células da teca são recrutados do estroma ovariano (PARROT & SKINNER, 2000). Após formação, a camada de células da teca permanece separada das células da granulosa pela membrana basal (PETERS, 1969). Os folículos secundários são observados em ovários de fetos caprinos, ovinos e bovinos aos 80, 120 e 210 dias de gestação, respectivamente (BEZERRA *et al.*, 1998; McNATTY *et al.*, 1999; RÜSSE, 1983).

Com a intensa proliferação das células da granulosa, uma área preenchida por fluido folicular é identificada na camada granulosa e, a partir de então, os folículos passam a ser classificados como antrais. A formação dos folículos antrais em caprinos, ovinos e bovinos é observada aos 110, 135 e 230 dias, respectivamente (BEZERRA *et al.*, 1998; McNATTY *et al.*, 1999; RÜSSE, 1983). A partir deste estágio, o diâmetro folicular aumenta acentuadamente devido ao crescimento do oócito, multiplicação das células da granulosa, da teca e aumento da cavidade antral. As células da teca sofrem alterações morfológicas e funcionais e aquelas células localizadas próximas da membrana basal são denominadas teca interna enquanto que as localizadas periféricamente são classificadas como teca externa. No último estágio do desenvolvimento folicular, o folículo pré-ovulatório é caracterizado por um oócito circundado por células da granulosa especializadas que são denominadas de células do cúmulus (PEDERSON & PETERS, 1968). Tanto o oócito como as células do cúmulus estão conectados com a parede folicular e são banhados pelo fluido folicular. As células da granulosa de folículos pré-ovulatórios param de se multiplicar em resposta ao hormônio luteinizante (LH) e iniciam o programa final de diferenciação. A ovulação do oócito e células do cúmulus ocorre em

resposta ao pico de LH. Em todas as espécies, a formação de folículos pré-ovulatórios ocorre geralmente durante a puberdade (LUCY *et al.*, 1992). As características morfológicas das categorias foliculares descritas, bem como seus diâmetros são mostrados na Figura 1 e na Tabela 1, respectivamente.

Tabela 1: Diâmetros foliculares em ovários de caprinos, ovinos e bovinos.

Categoria folicular	Espécies		
	Caprina	Ovina	Bovina
Folículo primordial	33,0 μm	35,0 μm	35,2 μm
Folículo intermediário	40,7 μm	41,0 μm	42,0 μm
Folículo primário	49,8 μm	52,0 μm	55,1 μm
Pequeno folículo secundário	83,0 μm	73,0 μm	81,0 μm
Início da formação de antro	130,0 μm	119,0 μm	250,0 μm
Folículo pré-ovulatório	7,0 mm	7,0 mm	18,0 mm

Fontes: BEZERRA *et al.*, 1998; BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997; LUCCI *et al.*, 1999a; LUSSIER *et al.*, 1987; McNATTY *et al.*, 2000; MONNIAUX *et al.*, 1993

2.3. Importância do FSH e do LH na regulação da foliculogênese

A foliculogênese é um processo altamente regulado por fatores de crescimento produzidos pelo oócitos, células da granulosa e da teca. Além disto, as gonadotrofinas FSH e LH, produzidas pela glândula pituitária, desempenham funções cruciais para promover o desenvolvimento folicular. Apesar das gonadotrofinas não exercerem efeitos diretos sobre a ativação e crescimento de folículos primordiais, efeitos indiretos têm sido

descritos. Por outro lado, o FSH estimula a proliferação de células da granulosa e crescimento de folículos primários e secundários (WANDJI *et al.*, 1996a). Após a seleção folicular, os folículos antrais tornam-se dependentes de FSH para sobrevivência, crescimento e maturação oocitária (MONNIAUX *et al.*, 1997). Nas seções seguintes serão descritos, de forma mais detalhada, os efeitos de FSH e LH sobre a foliculogênese.

2.3.1. Ativação de folículos primordiais e desenvolvimento folicular inicial

Os folículos primordiais são recrutados do pool de reserva e iniciam o crescimento em direção à ovulação ou atresia. Alguns folículos primordiais iniciam o crescimento imediatamente após a sua formação, mas a maioria permanecem em estágio de dormência por meses ou anos. O FSH não é um fator determinante para o início do crescimento de folículos primordiais, já que camundongos transgênicos que não produzem FSH possuem folículos em crescimento (KUMAR *et al.*, 1997). Além disso, experimentos *in vitro* demonstraram que o FSH não estimula o recrutamento ou ativação de folículos em diferentes espécies (murinos: EPPIG & O'BRIEN, 1996; MAYERHOFER *et al.*, 1997; bovinos: BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997, FORTUNE *et al.*, 1998; DERRAR *et al.*, 2000). Estes resultados são suportados pelas observações de que os receptores de FSH e LH não são encontrados em folículos primordiais (RANNIKKI *et al.*, 1995; OKTAY *et al.*, 1997).

Apesar do FSH não exercer um efeito direto sobre o recrutamento de folículos primordiais, um efeito estimulatório indireto de FSH e LH tem sido descrito. Baixos níveis de FSH e LH após hipofisectomia ou tratamento com antagonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) resulta na manutenção do pool de reserva de folículos primordiais e redução do número de folículos em crescimento (WANG & GREENWALD, 1993; ATAYA *et al.*, 1995). Além disso, altos níveis séricos de FSH e LH estimulam o recrutamento de folículos para o grupo de folículos em crescimento (humanos: FADDY *et al.*, 1992; GOUGEON *et al.*, 1994; murinos: FLAWS *et al.*, 1997).

Estes efeitos do FSH e do LH são indiretos, provavelmente via folículos secundários ou antrais que expressam receptores para ambos os hormônios. Estes folículos podem produzir um ou mais fatores de crescimento que exercem efeitos diretos sobre o início do crescimento de folículos primordiais.

Folículos primários e secundários expressam receptores para FSH (ovinos: TISDALL *et al.*, 1995; roedores: OKTAY *et al.*, 1997) e estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que o FSH estimula o crescimento destes folículos em roedores (CORTVRINDT *et al.*, 1997, 1998), embora não seja essencial. Em animais domésticos, o FSH promove aumento do diâmetro oocitário e crescimento de folículos pré-antrais, bem como estimula a formação de antro e secreção de estrógeno (bovinos: HULSHOF *et al.*, 1995; GUTIERREZ *et al.*, 2000; ovinos: CECCONI *et al.*, 1999; suínos: MAO *et al.*, 2002). Em caprinos, folículos pré-antrais cresceram *in vitro* em meio contendo FSH, mas apenas uma pequena percentagem atingiu a formação de antro (HUANMIN & YOUNG, 2000). Alguns estudos demonstraram que o LH também estimula o crescimento de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (roedores: CORTIVRINDT *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2000; bovinos: ITOH *et al.*, 2002).

2.3.2. Desenvolvimento folicular na fase antral

O desenvolvimento folicular na fase antral ocorre em três fases: recrutamento, seleção e dominância. Apenas folículos dependentes de gonadotrofinas podem ser recrutados. A dependência de gonadotrofinas e recrutamento ocorre quando os folículos atingem 0,2 mm em camundongos, 2 mm em ovinos e primatas e 3 mm em caprinos e bovinos (DRIANCOURT, 2001; RUBIANES & MENCHACA, 2003). Antes de atingirem este estágio, o crescimento folicular é controlado principalmente por fatores de crescimento locais. O FSH é o hormônio responsável pelo recrutamento, pois uma estreita relação entre o aumento dos níveis de FSH e recrutamento folicular tem sido demonstrada em bovinos (GINTHER *et al.*, 1996). Em caprinos, as informações sobre a relação entre

FSH e dinâmica folicular são bastante limitadas, mas tem sido mostrado que o tratamento com FSH estimula o recrutamento folicular (RUBIANES & MENCHACA, 2003). Em bovinos, quando a secreção de FSH é bloqueada, observa-se o desaparecimento de folículos maiores que 4 mm, enquanto que a aplicação de FSH exógeno reinicia o recrutamento (CROWE *et al.*, 2001). O LH está minimamente envolvido no controle deste processo, pois o recrutamento folicular ocorre normalmente em animais com baixas frequências de pulsos de LH (DRIANCOURT, 2001). Por outro lado, o estrógeno pode estar envolvido, já que em caprinos, um aumento das concentrações deste hormônio durante a fase luteal inicial é associado com o recrutamento folicular (DE CASTRO *et al.*, 1999).

O processo de seleção ocorre quando os folículos atingem um diâmetro de 5 mm e existem duas teorias para explicar os mecanismos envolvidos. A primeira teoria afirma que a seleção é controlada apenas por mecanismos endócrinos, ou seja, uma redução do suprimento de FSH para os folículos. Já a segunda teoria diz que o(s) maior(es) folículo(s) produzem alguns componentes que inibem diretamente o crescimento dos folículos menores. Como ambas as teorias não são mutuamente exclusivas, é provável que em espécies com possibilidade de mais de uma ovulação (caprinos e ovinos), somente o mecanismo dependente de FSH pode estar em ação, enquanto que em espécies mono-ovulares (bovinos), com rigoroso controle da taxa de ovulação, os dois mecanismos podem estar atuando (DRIANCOURT, 2001). A primeira teoria é suportada por alguns estudos que demonstraram que na maioria das espécies, uma redução nas concentrações de FSH é associada com o processo de seleção folicular. Esta redução de FSH é causada pela ação de inibina e estrógeno, ambos produzidos por folículos maiores do que 5 mm que desenvolvem mecanismos intracelulares para amplificar a ação do FSH (FORTUNE *et al.*, 2001). Ao contrário, aqueles folículos menores que 5 mm, que possuem alta dependência de FSH, sofrem atresia (MIHM *et al.*, 1999). No entanto, outros fatores produzidos localmente no ovário podem estar envolvidos, já que em vacas imunizadas

contra GnRH, é bastante difícil manipular as taxas de ovulações somente com FSH e LH (CROWE *et al.*, 2001).

A existência de dominância folicular em pequenos ruminantes era um assunto pouco elucidado até recentemente (DRIANCOURT *et al.*, 1999). Entretanto, pesquisas em caprinos demonstraram a presença de dominância folicular, especialmente durante a primeira e a última onda de crescimento folicular (DE CASTRO *et al.*, 1999). É geralmente aceito que o maior folículo de uma onda é provavelmente selecionado para ovulação (GINTHER *et al.*, 1996), mas o processo é bastante complexo, pois todos os folículos de uma onda são funcionalmente diferentes. O LH é o hormônio chave envolvido no crescimento final do folículo dominante, enquanto que os outros folículos sofrem atresia. De um modo geral, um aumento do suprimento sanguíneo no folículo dominante, causado pelo fator de crescimento do endotélio vascular, aumenta o suprimento de gonadotrofinas para este folículo (ZELEZNIK *et al.*, 1981).

2.4. Importância dos fatores de crescimento na regulação da foliculogênese

Os hormônios FSH e LH são extremamente importantes para o desenvolvimento folicular no estágio antral, mas eles não são as únicas substâncias envolvidas. Como descrito anteriormente, o desenvolvimento folicular até o estágio antral inicial pode ocorrer na ausência de gonadotrofinas e isto mostra que os fatores de crescimento locais desempenham um papel crucial nesta etapa. Diversos fatores de crescimento, produzidos pelo oócito, células da granulosa e células da teca, freqüentemente atuam modulando os efeitos de FSH e LH, e a foliculogênese pode ser desregulada quando um determinado fator está ausente (EPPIG, 2001). Desta forma, nas seções seguintes serão descritos os efeitos dos principais fatores de crescimento envolvidos no processo de foliculogênese.

2.4.1. Fatores de crescimento pertencentes à família EGF

Os fatores de crescimento pertencentes à família EGF que participam do controle da foliculogênese são: o próprio EGF, o fator de crescimento transformante- α (TGF- α), o *heparin binding EGF-like growth factor* (HB-EGF), a anfiregulina, a betacelulina e a epiregulina. O EGF é uma proteína de 6 kDa que tem sido demonstrada em oócitos e células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais (humano: MARUO *et al.*, 1993; BENNETT *et al.*, 1996, hamster: ROY & GREENWALD, 1990; suíno: SINGH *et al.*, 1995a) enquanto que o RNA mensageiro para EGF tem sido demonstrado em oócitos e células da granulosa de folículos antrais em suínos (SINGH *et al.*, 1995a).

A ação do EGF nos folículos ovarianos é mediada por um receptor presente na membrana celular, ErbB1, que pertence a superfamília ErbB (RIESE & STERN, 1998). Este receptor de EGF (EGF-R) funciona como receptor para os membros da família EGF que atuam no controle da foliculogênese (RIESE & STERN, 1998). O RNA mensageiro e a proteína para o EGF-R têm sido identificados em oócitos e células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais (camundonga: HILL *et al.*, 1999; rata: CHABOT *et al.*, 1986; FENG *et al.*, 1987; hamster: GARNETT *et al.*, 2002, vaca: LONERGAN *et al.*, 1996; porca: SINGH *et al.*, 1995a; mulher: MARUO *et al.*, 1993; BENNETT *et al.*, 1996; QU *et al.*, 2000).

Todas estas evidências sugerem que o EGF exerce um papel central no controle da atividade ovariana em mamíferos. Realmente, *in vitro*, o EGF tem promovido multiplicação de células da granulosa oriundas de folículos pré-antrais suínos (MORBECK *et al.*, 1993) e aumenta o crescimento de folículos pré-antrais de bovinos (GUTIERREZ *et al.*, 2000), hamsters (ROY, 1993), camundongos (BOLAND & GOSDEN, 1994), e humanos (ROY & KOLE, 1998). O EGF também reduz os níveis de atresia em folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro* (WANDJI *et al.*, 1996a). Em folículos antrais, o EGF tem estimulado a maturação oocitária *in vitro* (murinos: SMITZ *et al.*, 1998; DE LA FUENTE *et al.*, 1999; ovinos: GULER *et al.*, 2000; bovinos:

LONERGAN *et al.*, 1996; humanos: GOUD *et al.*, 1998; suínos: PROCHAZKA *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2002), expansão das células do cúmulus (camundongo: O'DONNELL *et al.*, 2004), proliferação das células da granulosa (suínos: MAY *et al.*, 1992) e produção de estrógeno (humano: MISAJON *et al.*, 1999). Por outro lado, experimentos *in vivo* sugerem um possível papel do EGF na indução de atresia (MONNIAUX *et al.*, 1997). No entanto, o efeito do EGF na indução de atresia em condições fisiológicas é questionável, pois um efeito anti-apotótico do EGF tem sido demonstrado durante o cultivo de células da granulosa de folículos pré-ovulatórios de ratas (TILLY *et al.*, 1992). Além disso, o EGF pode atuar localmente no ovário controlando a ação de FSH e LH, pois alguns estudos mostraram que o EGF inibe a produção de receptores de LH (HATTORI *et al.*, 1995) e aumenta a expressão de receptores de FSH (LUCIANO *et al.*, 1994).

Os outros fatores de crescimento pertencentes a família EGF que têm ação direta no ovário são: TGF- α , HB-EGF, anfiregulina, betacelulina e epiregulina. A expressão de TGF- α tem sido demonstrada em oócitos, células do cúmulus, células da granulosa e da teca em todos os estágios do desenvolvimento folicular (humanos: BENNETT *et al.*, 1996; REEKA *et al.*, 1998). *In vitro*, o TGF- α tem estimulado a proliferação de células da granulosa e da teca em bovinos (SKINNER & COFFEY, 1988). O TGF- α também atua modulando a expressão de receptores de FSH (FINDLAY & DRUMMOND, 1999), pois este fator tem inibido a ação estimulatória do FSH sobre a atividade da enzima aromatase (ADASHI *et al.*, 1987). Com relação aos outros membros da família EGF, o HB-EGF tem sido recentemente demonstrado em células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais, mas está ausente em folículos pré-ovulatórios (PAN *et al.*, 2004). Isto sugere que o HB-EGF pode ser um fator mitogênico para as células da granulosa e que a redução da sua expressão pode ser necessária para a maturação folicular (PAN *et al.*, 2004). Anfiregulina, betacelulina e epiregulina foram também recentemente demonstrados em células da granulosa de folículos pré-ovulatórios. A expressão destes fatores é estimulada pelo LH, e *in vitro*, anfiregulina, betacelulina e epiregulina estimulam a expansão das células do

cúmulus e a maturação oocitária, sugerindo que eles funcionam como mediadores parácrinos que propagam a ação do LH em folículos pré-ovulatórios (PARK *et al.*, 2004).

2.4.2. Fatores de crescimento pertencentes à família TGF- β

A família de fatores de crescimento TGF- β é composta por mais de 40 membros que são agrupados de acordo com homologia estrutural (CHANG *et al.*, 2002). Estudos com fatores de crescimento desta família tem demonstrado que eles exercem suas ações biológicas por meio da ligação com dois tipos de receptores (tipos 1 e 2). Diversos estudos e revisões (DRUMMOND *et al.*, 2003; KNIGHT & GLISTER, 2003) têm mostrado que várias proteínas pertencentes à família TGF- β são expressas em oócitos, células da granulosa e da teca e funcionam como reguladores intraovarianos dos processos de ativação de folículos primordiais, proliferação de células da granulosa e da teca, esteroidogênese e maturação oocitária, bem como no processo de atresia. A localização, sítios de ação e efeito biológico de alguns dos principais membros da família TGF- β , como por exemplo, *bone morphogenetic proteins-2* (BMP-2), BMP-4, -6, -7, -15 e fator de diferenciação do crescimento-9 (GDF-9) são ilustrados resumidamente na Tabela 2. A Tabela 3 mostra informações sobre ativina, inibina, hormônio anti-Mülleriano (AMH), TGF- β e folistatina. Finalmente, a localização dos receptores para os principais fatores desta família é mostrada na Tabela 4.

Tabela 2. Localização, sítio de ação e efeito biológico de BMP-2, -4, 6, -7, -15 e GDF-9 em ovários mamíferos. (CG: células da granulosa)

Fator	Localização	Ação	Efeito
BMP-2	CG / teca	oócito / CG	<ul style="list-style-type: none"> - estimula a produção de inibina e de estrógeno induzida por FSH em CG - promove a ativação de folículos primordiais
BMP-4	teca	CG	<ul style="list-style-type: none"> - inibe a diferenciação e luteinização promovida pelo FSH em CG - manutenção da viabilidade de folículos e CG
BMP-6	oócito / CG	oócito / CG	<ul style="list-style-type: none"> - inibe a expressão de receptores para FSH (FSH-R) - produção de progesterona promovida pelo FSH
BMP-7	teca	Oócito / CG	<ul style="list-style-type: none"> - promove a ativação de folículos primordiais e crescimento de folículos antrais - inibe a luteinização promovida pelo FSH em CG - inibe a produção de progesterona promovida pelo FSH e aumenta a síntese de estrógeno em CG
BMP-15	oócito	oócito / CG	<ul style="list-style-type: none"> - estimula a proliferação de CG e a expressão de KL; e atua na ovulação - inibe a expressão de FSH-R, diferenciação e produção de progesterona promovida pelo FSH
GDF-9	oócito	oócito / CG	<ul style="list-style-type: none"> - promove o crescimento de folículos primários e recrutamento de células da teca - estimula a manutenção da viabilidade folicular e a proliferação de CG; e exerce um efeito sinérgico com o FSH - inibe a expressão de receptores de LH (LH-R) e a síntese de progesterona e estrógeno, mas estimula a produção de inibina. Inibe a diferenciação folicular induzida por FSH - participa da ovulação regulando a expansão do cúmulus e liberação do oócito

Fonte: DONG *et al.*, 1996; ELVIN *et al.*, 1999; HREINSSON *et al.*, 2002; JAATINEN *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2001; NILSSON & SKINNER, 2002, OTSUKA *et al.*, 2000, 2001; OTSUKA & SHIMASAKI, 2002; SHIMASAKI *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2002; VITT *et al.*, 2000ab; YAN *et al.*, 2001.

Tabela 3. Localização, sítio de ação e efeito biológico da ativina, inibina, AMH, TGF- β e folistatina em ovários mamíferos. (CG: células da granulosa)

Fator	Localização	Ação	Efeito
Ativina	Oócito / CG	oócito / CG / teca	<ul style="list-style-type: none"> - estimula o crescimento de folículos pré-antrais - aumenta a expressão de FSH-R bem como a de LH-R induzida por FSH e promove a maturação oocitária - regula a esteroidogênese em CG e reduz a produção de andrógenos em células da teca
Inibina	CG	oócito / CG / teca	<ul style="list-style-type: none"> - estimula a produção de andrógenos em células da teca - antagoniza a ação da ativina e possivelmente dos BMPs
AMH	CG	oócito / CG	<ul style="list-style-type: none"> - inibe a ativação de folículos primordiais - reduz a sensibilidade de folículos antrais ao FSH
TGF- β	CG	oócito / teca	<ul style="list-style-type: none"> - promove o crescimento folicular - promove a síntese de inibina e estradiol
Folistatina	Oócito / CG	oócito / CG / teca	<ul style="list-style-type: none"> - liga-se à ativina de forma quase que irreversível e a neutraliza - antagoniza a ação biológica do BMP-15

Fonte: DE WINTER *et al.*, 1996; DURLINGER *et al.*, 1999, 2001, 2002; FINDLAY, 1993; LI *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1998, 1999; MIZUNUMA *et al.*, 1999; XIAO *et al.*, 1992; YOKOTA *et al.*, 1997.

Tabela 4. Localização dos receptores para os principais fatores de crescimento da família TGF- β .

Fator	Tipo 2 / localização	Tipo 1/ localização	Referência
BMP-2	BMPR-2 / oócito, CG	BMPR-1A / oócito, CG	(1)
BMP-4		BMPR-1B / oócito, CG	(2)
BMP-6	BMPR-2 / oócito, CG	ActR-1A / oócito, CG	(3)
BMP-7	ActR-2A / oócito, CG	BMPR-1B / oócito, CG	(4)
	ActR-2B / oócito, CG		(5)
BMP-15	BMPR-2 / oócito, CG	BMPR-1B / oócito, CG	(2, 6)
GDF-9	BMPR-2 / oócito, CG	T β R-1 / oócito	(2, 7, 8)
		ActR-1A / oócito, CG	(2)
AMH	AMHR-2 / oócito, CG, teca	BMPR-1A / oócito, CG	(6)
		BMPR-1B / oócito, CG	
Ativina	ActR-2A / oócito, CG	ActR-1B / oócito, CG,	(4)
	ActR-2B / oócito, CG	teca	(9)
TGF- β	T β R-2 / oócito, CG, teca	T β R-1 / oócito	(6,10)

Fonte: (1) SHIMASAKI *et al.*, 1999; (2) ERICKSON & SHIMASAKI, 2003; (3) SIDIS *et al.*, 1998; (4) DRUMMOND *et al.*, 2002; (5) KNIGHT & GLISTER, 2003; (6) SHIMASAKI *et al.*, 2004; (7) VITT *et al.*, 2002; (8) MAZERBOURG *et al.*, 2004 (9) PANGAS *et al.*, 2002; (10) TEN DIJKE *et al.*, 1994

2.4.3. Fatores de crescimento pertencentes ao grupo FGF

O grupo de fatores de crescimento fibroblásticos (FGF) é composto de pelo menos 20 membros estruturalmente relacionados (POWERS *et al.*, 2000). No entanto, apenas três fatores deste grupo (FGF-1, FGF-2 e FGF-7) exercem importantes funções no controle da foliculogênese. Os FGF-1 e -7 são expressos em células da granulosa e da teca de folículos antrais (BERISHA *et al.*, 2004) enquanto que o FGF-2 tem sido demonstrado em oócitos de folículos primordiais e primários e também em células da granulosa de

folículos secundários e antrais (VAN WEZEL *et al.*, 1995). Existem quatro tipos de receptores de FGF (FGFR-1, -2, -3, -4) que têm sido demonstrados em folículos ovarianos (BERISHA *et al.*, 2004). O FGF-2 é um importante regulador da função ovariana, pois ele promove início do crescimento de folículos primordiais (NILSSON *et al.*, 2001), bem como a proliferação de células da granulosa (ROBERTS & ELLIS, 1999) e esteroidogênese (VERNON & SPICER, 1994) em folículos antrais. O FGF-7 também exerce importantes funções na regulação das atividades de células da granulosa (PARROTT *et al.* 1994).

2.4.4. IGF e proteínas de ligação de IGF

Diversas evidências têm mostrado que um sistema formado pelos fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGF) e proteínas de ligação de IGF (IGFBP) exercem importantes funções no controle do desenvolvimento folicular e atresia em animais domésticos (MONGET *et al.*, 2002). O sistema IGF é composto de diferentes elementos, ou seja, IGF-1 e IGF-2, dois tipos de receptores (IGFR-1 e IGFR-2) e seis IGFBP (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 e -6). O IGFR-1 funciona como receptor para os dois tipos de IGF enquanto que o IGFR-2 tem maior afinidade para IGF-2 (JONES & CLEMMONS, 1995). As IGFBP estão presentes nos fluidos biológicos e atuam inibindo ou potencializando a ação dos dois tipos de IGF nas células alvo (MONGET *et al.*, 2002). Em ovários de suínos e roedores, o IGF-1 tem sido localizado nas células da granulosa de folículos antrais saudáveis enquanto que o IGF-2 é encontrado nas células da granulosa de folículos saudáveis e atrésicos (ZHOU *et al.*, 1996). Ambos os receptores de IGF estão presentes em células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais (MONGET *et al.*, 1989; WANDJI *et al.*, 1992). A ação do IGF consiste em estimular a proliferação e diferenciação das células da granulosa e da teca (GIUDICE, 1995). Durante o crescimento de pequenos folículos antrais para o estágio de folículos pré-ovulatórios observa-se uma redução progressiva dos níveis de IGFBP devido principalmente a alterações nos processos de síntese e/ou degradação (MONGET *et al.*, 2002). Por outro lado, em

folículos que estão sofrendo atresia, os níveis de IGFBP são altos, principalmente devido a uma redução no processo de degradação (BESNARD *et al.*, 1997). Com o aumento dos níveis de IGFBP ocorre uma redução da disponibilidade de IGF livre no ambiente folicular.

2.4.5. *Kit ligand* e fator inibidor de leucemia

O *Kit ligand* (KL) é um fator de crescimento produzido localmente que desempenha importantes funções no controle da foliculogênese (YOSHIDA *et al.*, 1997). O KL tem sido demonstrado em células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais em diferentes espécies estudadas (murinos: MANOVA *et al.*, 1993; MOTRO & BERNSTEIN, 1993; ISMAIL *et al.*, 1996, humanos: LAITINEN *et al.*, 1995, ovinos: TISDALL *et al.*, 1997, 1999). O receptor para KL, c-Kit, é expresso em oócitos de folículos em todos os estágios de desenvolvimento, pelo menos em roedores (HORIE *et al.*, 1991; MANOVA *et al.*, 1993; MOTRO & BERNSTEIN, 1993) e ovinos (CLARK *et al.*, 1996). O receptor c-Kit também é encontrado nas células da teca de folículos antrais em murinos e ovinos (MANOVA *et al.*, 1993; MOTRO & BERNSTEIN, 1993, CLARK *et al.*, 1996). Recentes estudos têm demonstrado que KL promove o início do crescimento de folículos primordiais (PARROTT & SKINNER, 1999), crescimento oocitário (DRIANCOURT *et al.*, 2000), proliferação das células da granulosa e esteroidogênese (murinos: REYNAUD *et al.*, 2000, 2001; suínos: BRANKIN *et al.*, 2003), bem como crescimento e diferenciação das células da teca (PARROTT & SKINNER, 1997).

O fator inibidor de leucemia (LIF) está presente em células da granulosa de folículos em todos os estágios de desenvolvimento, bem como em oócitos de folículos secundários e antrais (murinos: NILSSON *et al.*, 2002). O LIF também foi demonstrado no fluido folicular em humanos e os seus níveis são regulados de acordo com o estágio do desenvolvimento folicular (GEARING *et al.*, 1987). O receptor para LIF (LIF-R) tem

sido localizado em oócitos de folículos antrais humanos (VAN EIJK *et al.*, 1996). Estudos *in vitro* mostraram que o LIF promove o crescimento de folículos primordiais e estimula a produção de KL pelas células da granulosa (NILSSON *et al.*, 2002).

Como descrito acima, os fatores de crescimento produzidos localmente no ovário exercem ações diretas e / ou indiretas no controle do crescimento folicular. Além disso, os fatores de crescimento também exercem atividades importantes no controle do processo de atresia. As características morfológicas e os fatores envolvidos no processo de atresia serão abordados no próximo tópico.

2.5. Atresia folicular

A grande maioria dos folículos primordiais presentes nos ovários, cerca de 99,9%, não chega até a ovulação, mas sofre um processo degenerativo ou apoptótico conhecido por atresia, fazendo com que o ovário seja um órgão de baixíssima produtividade (IRELAND, 1987). A atresia folicular não é igualmente prevalente em todos os estágios de desenvolvimento folicular (FORTUNE, 1994). Em ratos, folículos pré-antrais atrésicos são raros, sendo a atresia predominante em folículos antrais (HIRSHFIELD, 1988). No entanto, em ovelhas, DRIANCOURT *et al.* (1985) demonstraram que aproximadamente 50% dos folículos presentes nos ovários desaparecem durante a fase pré-antral da foliculogênese. Embora estes dados suportem a idéia de que as perdas oocitárias também ocorrem em folículos primordiais, primários e secundários, informações concisas em outras espécies de animais domésticos ainda não são disponíveis.

2.5.1. Características morfológicas e apoptose

Ainda na década de 80, foi postulado que a atresia ocorre por um processo de morte celular programada conhecido por apoptose (TSAFIRI & BRAW, 1984).

Recentemente, um grande número de evidências tem demonstrado que a apoptose, realmente, é o mecanismo bioquímico responsável pela atresia folicular (TILLY, 1996; REYNAUD & DRIANCOURT, 2000; MARKSTROM *et al.*, 2002). A apoptose é um programa de suicídio celular ativo encontrado em todas os organismos multicelulares e ocorre em tecidos que estão sofrendo alterações de desenvolvimento ou respondendo a um estímulo fisiológico. A alteração típica observada é a condensação da cromatina, resultando na formação de zonas densas de heterocromatina sobre a membrana nuclear (HUGHES & GOROSPE, 1991; TILLY, 1996). Independentemente da condensação da cromatina, endonucleases dependentes de cálcio e magnésio são ativadas, resultando na clivagem do DNA entre as unidades nucleosomais, a cada 180-200 pares de bases (HUGHES & GOROSPE, 1991; TILLY, 1996). O citoplasma de células apoptóticas é caracterizado pela agregação e desorientação das organelas citoplasmáticas. Concomitantemente, a membrana plasmática mostra sinais de retração e finalmente, a célula rompe-se em diversos fragmentos conhecidos por corpos apoptóticos (KAIPIA & HSUEH, 1997). Os corpos apoptóticos são, então, fagocitados pelas células da vizinhança. Este processo usualmente inicia-se antes que a membrana plasmática perca completamente sua integridade, desta forma não ocorre extravasamento dos componentes citoplasmáticos e não é observada reação inflamatória (HSUEH *et al.*, 1994).

Durante a atresia, muitas características morfológicas da apoptose têm sido demonstradas em oócitos e células da granulosa de folículos atrésicos. O processo de atresia usualmente difere entre folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais. Em folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária, o que desencadeia o processo de eliminação irreversível dos folículos ovarianos neste estágio de desenvolvimento (MORITA & TILLY, 1999). Em folículos pré-antrais, alterações nas células da granulosa são raramente observadas (JORIO *et al.*, 1991). É importante ressaltar que após a formação da cavidade antral, ocorre uma alteração na sensibilidade do oócito e das células da granulosa. A partir deste estágio, o oócito torna-se

altamente resistente e as primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas células da granulosa. O aparecimento de células da granulosa com núcleos picnóticos, onde se observa condensação da cromatina e retração nuclear, podem ser considerados como os primeiros sinais morfológicos de atresia, que são observados predominantemente em células da granulosa em proximidade da cavidade antral. Posteriormente, fragmentos de núcleos picnóticos ou corpos apoptóticos são observados na cavidade antral (HUGHES & GOROSPE, 1991; TILLY, 1996). Com a progressão da atresia, observa-se uma redução do número de camadas das células da granulosa e invasão do folículo por fibroblastos e macrófagos. Após estas drásticas mudanças na camada granulosa, o oócito freqüentemente sofre pseudomaturação, fragmenta-se, e finalmente é removido pelas células invasoras durante os estágios finais de atresia (BYSKOV, 1974).

2.5.2. Papel de gonadotrofinas e fatores de crescimento no controle da atresia

A atresia folicular e os fatores que influenciam este processo são extensivamente estudados e tem sido demonstrado que muitos hormônios e fatores de crescimento estão envolvidos. Durante o início do desenvolvimento de folículos primordiais, recentes estudos têm demonstrado que fatores de crescimento, como por exemplo: *kit ligand*, EGF, FGF-2, BMP-4 e GDF-9 são extremamente importantes para a manutenção da viabilidade destes folículos (REYNAUD & DRIANCOURT, 2000; MARKSTROM *et al.*, 2002; NILSSON & SKINNER, 2003). Com relação a folículos primários e secundários, alguns estudos têm reportado que o FSH reduz as taxas de atresia (WANDJI *et al.*, 1996a) durante cultivo *in vitro*, mas neste estágio, são os fatores de crescimento produzidos localmente que exercem um papel fundamental. Em estudos *in vitro*, o fator de crescimento queracínocítico (KGF), o FGF-2 e o EGF promovem manutenção de viabilidade e inibem os níveis de atresia (REYNAUD & DRIANCOURT, 2000; MARKSTROM *et al.*, 2002). Por outro lado, WANDJI *et al.* (1996a) demonstraram que o TGF- β exerce um efeito deletério sobre a viabilidade de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*.

Em folículos antrais, as gonodotrofinas FSH e LH atuam como importantes inibidores da apoptose (MARKSTROM *et al.*, 2002) a partir do estágio em que eles estão aptos a serem recrutados (em camundongos: 0,2 mm; ovinos e primatas: 2 mm e caprinos e bovinos: 3mm). Os efeitos anti-apoptóticos do FSH e do LH são provavelmente mediados pelo IGF-1 (CHUN *et al.*, 1994). A ação anti-apoptótica das gonadotrofinas podem também ser mimetizadas quando os folículos são expostos a neurotrofinas, tais como peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e ativadores da proteína quinase A (FLAWS *et al.*, 1995). Fatores localmente produzidos, como por exemplo, EGF, FGF-2 e ativina também são importantes para manutenção da viabilidade de folículos antrais (CHUN *et al.*, 1996). O estrógeno também exerce um papel anti-apoptótico (BILLIG *et al.*, 1993), mas outros diversos fatores, tais como proteínas semelhantes ao GnRH (BILLIG *et al.*, 1994), interleucina-6 (GOROSPE & SPANGELO, 1993), andrógenos (BILLIG *et al.*, 1993), fator de necrose tumoral- α (TNF- α , KAIPIA *et al.*, 1996) e *Fas-ligand* (HAKUNO *et al.*, 1996) podem desencadear o processo de apoptose em células da granulosa após a interação com receptores específicos. Já os folículos em estágios finais de maturação passam a expressar receptores de LH e tornam-se aptos para responder diretamente aos estímulos deste hormônio (MARKSTROM *et al.*, 2002). Em roedores, tanto o FSH como o LH reduzem os níveis de apoptose em folículos pré-ovulatórios cultivados *in vitro* (CHUN *et al.*, 1994). DANILOVICH *et al.* (2000) demonstraram que o hormônio do crescimento (GH) também reduz os níveis de apoptose nestes folículos. Fatores de crescimento localmente produzidos, como IGF-1, EGF, FGF-2, TGF- α e KGF atuam intermediando a ação das gonadotrofinas ou reduzindo diretamente os níveis de apoptose em folículos pré-ovulatórios e em células da granulosa isoladas e cultivadas *in vitro* (CHUN *et al.*, 1994; TILLY *et al.*, 1992; McGEE *et al.*, 1999).

Conforme observado, a progressão da apoptose em folículos ovarianos é dependente de uma regulação cooperativa de diferentes fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, e é possível que nenhum destes fatores, isoladamente, seja essencial para o

controle do crescimento folicular ou atresia. É mais provável que o balanço entre os fatores que promovem sobrevivência e aqueles que induzem a apoptose decidirá se um determinado folículo continuará o seu desenvolvimento ou sofrerá atresia (HSU & HSUEH, 2000).

Nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos vários modelos *in vitro* que possibilitam o estudo dos fatores que controlam a atresia e crescimento folicular. Nas seções seguintes serão mostrados os principais modelos para o estudo do início do crescimento folicular e atresia em animais de laboratório e domésticos.

2.6. Modelos *in vitro* para o estudo da ativação de folículos primordiais

Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para o estudo da ativação de folículos primordiais. Em roedores, a pequena dimensão dos ovários possibilita o cultivo do órgão inteiro, o que tem sido bastante útil para o estudo da foliculogênese inicial em pequenos mamíferos. EPPIG & O'BRIEN (1996) obtiveram grande sucesso com a ativação de folículos primordiais *in vitro* e, a partir de então, este modelo tem sido utilizado por diferentes grupos de pesquisadores. Por outro lado, em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários não é possível utilizar este modelo. Para estes animais, o cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano, rico em folículos primordiais, tem sido realizado para estudar a ativação de folículos primordiais de bovinos (WANDJI *et al.*, 1996b; BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997), babuínos (FORTUNE *et al.*, 1998) e humanos (HOVATTA *et al.*, 1997). O cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano tem a vantagem de manter o contato celular e facilitar a perfusão do meio para o tecido ovariano (TELFER, 1998).

2.7. Técnicas utilizadas para comprovar a ativação e o crescimento de folículos primordiais

Após a ativação dos folículos primordiais, ocorrem importantes mudanças no oócito e nas células da granulosa. Conseqüentemente, o sucesso dos estudos sobre o início do crescimento de folículos primordiais depende da disponibilidade de marcadores sensíveis para detectar o princípio do crescimento folicular (WANDJI *et al.*, 1996b). O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína produzida por células em multiplicação, o que está relacionado com o início de crescimento folicular (WANDJI *et al.*, 1996b). Neste contexto, FORTUNE *et al.* (1998) demonstraram que o PCNA pode ser utilizado com sucesso como marcador para detectar o início do crescimento de folículos primordiais de bovinos e babuínos. Por outro lado, a incorporação de marcadores radioativos (H^3 -timidina) ou não radioativos (Bromodesoxiuridina – BrdU) no DNA de células com atividade proliferativa também tem sido utilizada com bastante êxito para comprovar o início do crescimento de folículos primordiais bovinos (H^3 -timidina – BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997) e felinos (BrdU – JEWGENOW, 1998).

2.8. Importância da composição do meio sobre o desenvolvimento folicular *in vitro*

A composição do meio de cultivo é um importante fator para obtenção de sucesso durante o cultivo de folículos ovarianos *in vitro*. FIGUEIREDO *et al.* (1994a) descreveram que a sobrevivência dos folículos pré-antrais bovinos *in vitro* foi reduzida na ausência de hipoxantina e substratos energéticos, tais como piruvato e glutamina. Foi demonstrado também que a adição de uma mistura de piruvato (0,23 mM), glutamina (2 mM) e hipoxantina ao meio de cultivo de base, denominado controle (Meio Essencial Mínimo - MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e ITS (insulina – 6,25 μ g/mL, transferrina – 6,25 ng/mL e selênio – 6,25 ng/mL) aumentou significativamente a porcentagem de folículos morfologicamente normais durante o cultivo. JEWGENOW (1998) também mostrou que a adição de piruvato, glutamina e hipoxantina ao meio de cultivo (MEM) é essencial para o crescimento de folículos pré-antrais felinos *in vitro*. No mesmo trabalho, JEWGENOW (1998) demonstrou que o MEM foi mais eficiente do que

o Meio de Cultura de Tecidos 199 (TCM 199) durante o cultivo de folículos pré-antrais felinos. Além disso, o completo desenvolvimento de oócitos inclusos em folículos primordiais até estarem aptos à maturação e fecundação *in vitro* foi obtido quando folículos de camundongas foram cultivados em MEM (EPPIG & O'BRIEN, 1996).

A solução à base de água de coco (SBAC) é outro meio rico em nutrientes e de baixo custo que tem sido utilizada com sucesso para a maturação de oócitos (BLUME *et al.*, 1997a) e cultivo de embriões bovinos (BLUME *et al.*, 1997b) e murídeos (BLUME & MARQUES JR, 1994). A solução à base de água de coco é composta de duas partes de água de coco filtrada, uma parte de citrato de sódio a 5% e uma parte de água ultrapura (NUNES, 1998). COMBARNOUS & FERREIRA-NUNES (1995) isolaram uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o ácido 3-Indol-Acético, substância com atividade hormonal estimuladora do crescimento de vegetais, que demonstrou atividade sobre o metabolismo dos espermatozóides aumentando a motilidade e taxa de fecundidade, além de permitir sua conservação durante períodos mais longos. Assim, a solução à base de água de coco tem sido eficientemente utilizada para conservação de sêmen caprino (NUNES & SALGUEIRO, 1999), ovino (GUERRA & NUNES, 1999), suíno (TONIOLLI *et al.*, 1998), canino (CARDOSO *et al.*, 2002) e humano (NUNES, 1998). A Tabela 5 apresenta a composição da água de coco de frutos da variedade praia aos 150 dias de idade.

Tabela 5. Composição da água de coco de frutos da variedade praia aos 150 dias de idade.

Componentes	mg / 100 mL
-------------	-------------

Sulfatos (SO_4^-)	21,8
Fosfatos (PO_4^-)	34,1
Magnésio	6,5
Cálcio	12,0
Sódio	14,2
Potássio	162,2
Glicose	1.645,0
Frutose	2.380,0
Sacarose	405,0
Proteínas	87,0
Inulina	165,0

Fonte: Laguna & Nunes, 1997

3. Justificativa

Conforme descrito na revisão de literatura, as informações sobre a foliculogênese em caprinos ainda são bastante escassas. A atresia folicular é o fenômeno responsável pela perda de 99,9% dos folículos presentes em ovários mamíferos ao nascimento, no entanto, as informações sobre este processo são oriundas principalmente de estudos com folículos antrais. A determinação das taxas de atresia em folículos pré-antrais é de fundamental importância para o desenvolvimento de estudos visando minimizar a perda folicular que pode ocorrer nesta fase do desenvolvimento folicular. Outra etapa importante para otimizar o aproveitamento de folículos primordiais caprinos seria identificar as substâncias que podem atuar no controle da atresia e do desenvolvimento folicular. Estudos com bovinos e animais de laboratório mostraram que o EGF promove crescimento e reduz os níveis de atresia *in vitro*. No entanto, em caprinos, ainda não foram realizados estudos para identificar a presença do EGF e seu receptor em folículos ovarianos.

O enfoque principal do presente trabalho foi o estudo da população de folículos pré-antrais, com ênfase nos folículos primordiais, os quais constituem o pool de reserva de folículos quiescentes e compreendem cerca de 90 a 95% de toda população folicular presente no ovário mamífero. No entanto, para que os folículos primordiais possam entrar em fase de crescimento (primário, secundário, antral e pré-ovulatório), é preciso que sejam ativados, ou seja, retomem a proliferação das células da granulosa, bem como aumentem o volume citoplasmático do oócito. Neste contexto, é de vital importância o desenvolvimento de um sistema de cultivo de base capaz de ativar esses folículos e assegurar seu posterior crescimento *in vitro*. Assim, uma etapa essencial para iniciar estes estudos é testar eficiência de meios de cultivo comerciais (MEM) e alternativos, como por exemplo, a solução à base de água de coco, que é um meio rico em nutrientes e de baixo custo. Além disso, estudos referentes aos fatores e mecanismos envolvidos na regulação

da ativação *in vitro* dos folículos primordiais em caprinos ainda não foram realizados, especialmente os efeitos de FSH, EGF e suas interações.

Tendo em vista que os caprinos desempenham mundialmente uma importante função econômica por meio da produção de carne, leite e pele, a compreensão da foliculogênese inicial nesta espécie podem possibilitar o desenvolvimento de meios de cultivo que permitissem o crescimento de folículos primordiais *in vitro*. Futuramente, oócitos provenientes destes folículos poderiam ser usados para fecundação *in vitro* e produzir um grande número de embriões, sendo um fator determinante para otimizar a multiplicação de cabras de alto valor zootécnico e/ou em via de extinção, o que poderia trazer benefícios econômicos para as populações que utilizam esta espécie como fonte de proteína e de renda.

4. Hipóteses científicas

Diante do exposto, formularam-se as seguintes hipóteses:

- 1) A atresia não afeta de forma equitativa as diferentes categorias foliculares durante a fase pré-antral do desenvolvimento.
- 2) O EGF e seu receptor podem ser expressos em folículos ovarianos caprinos e podem exercer um importante papel no controle da atresia e do crescimento folicular.
- 3) A SBAC pode ser utilizada como meio de cultivo para o estudo da ativação e crescimento de folículos primordiais *in vitro*.
- 4) EGF e FSH podem influenciar a transição de folículos primordiais para primários.

5. Objetivos

Esta tese foi dividida em quatro capítulos e os objetivos gerais e específicos são descritos abaixo.

Gerais:

- Determinar a taxa de degeneração em folículos pré-antrais caprinos.
- Verificar a expressão do RNA mensageiro e da proteína para o EGF e seu receptor em folículos ovarianos caprinos.
- Desenvolver um meio de cultivo de base para o estudo da ativação de folículos primordiais.
- Avaliar o efeito da adição do FSH e do EGF ao meio de cultivo sobre o crescimento e atresia de folículos pré-antrais caprinos *in vitro*.

Específicos:

- Verificar a distribuição da atresia em cada categoria folicular (primordial, primário e secundário) utilizando as técnicas de histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão.
- Avaliar, em folículos primordiais, primários e secundários, a sensibilidade de oócitos e células da granulosa ao processo de atresia.

- Descrever os compartimentos foliculares (oócito, células da granulosa ou da teca) que expressam a proteína e o RNA mensageiro, para o EGF e seu receptor, durante o desenvolvimento folicular.
- Avaliar os efeitos da SBAC e do MEM, bem como testar o efeito da adição de insulina, transferrina, selênio, piruvato, glutamina, hipoxantina e albumina sérica bovina (BSA) ao meio de cultivo sobre ativação e atresia folicular.
- Determinar as percentagens de folículos pré-antrais com células da granulosa em multiplicação após cultivo *in vitro*, utilizando o PCNA como marcador.

A seguir, será mostrada a contribuição deste trabalho na forma de quatro capítulos referentes a quatro artigos científicos internacionais, sendo que três já foram publicados e um encontra-se em fase de julgamento.

6. Capítulo 1

Taxa de Degeneração de Folículos Pré- Antrais em Ovários Caprinos

Small Ruminant Research 43:203-209, 2002

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de degeneração em folículos pré-antrais caprinos, bem como a distribuição em cada categoria folicular (primordial, primário e secundário). Com esta finalidade, ovários de cabras adultas foram coletados em abatedouros locais. Para avaliar a morfologia dos folículos pré-antrais caprinos, os ovários foram fixados em Carnoy por 12 h, seccionados seriadamente em intervalos de 7 μm e corados com ácido periódico de Schiff e hematoxilina. Em cada categoria, os folículos foram individualmente classificados como morfológicamente normais, degenerados do tipo 1 (alterações observadas somente no oócito), ou do tipo 2 (alterações observadas tanto no oócito como nas células da granulosa). Além disso, foi realizada uma análise ultraestrutural em folículos classificados como normais ou degenerados. Para análise ultraestrutural, pequenos fragmentos de córtex ovariano foram fixados em uma solução contendo 2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio. Em seguida, os fragmentos foram pós fixados em tetróxido de ósmio, desidratados em acetona e inclusos em resina epoxi. Secções ultra-finas foram preparadas somente quando o núcleo do oócito estava visível nas secções semi-finas. As secções semi-finas foram coradas com azul de toluidina enquanto que as ultra-finas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As percentagens de folículos degenerados, em cada categoria, foram comparadas pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,05$). Um total de 235 folículos primordiais, 195 folículos primários e 101 folículos secundários foram analisados utilizando a técnica de histologia clássica. A percentagem de folículos primordiais, primários e secundários com sinais de degeneração foi de 8,5, 14,3 e 16,8 %, respectivamente. Quando os tipos de degeneração 1 e 2 foram agrupados, a percentagem de folículos secundários degenerados foi significativamente maior do que a de primordiais e primários. Considerando cada tipo de degeneração, em cada categoria folicular, uma maior percentagem de degeneração do tipo 1 foi observada em folículos primordiais e primários. Ao contrário, folículos secundários foram mais afetados pela degeneração do tipo 2. Na avaliação ultraestrutural, os folículos degenerados tipo 1 apresentavam retração

nuclear e um grande número de vacúolos no citoplasma do oócito enquanto que as células da granulosa apresentavam morfologia normal com um grande número de mitocôndrias alongadas e retículo endoplasmático bem desenvolvido. Já os folículos degenerados tipo 2 continham oócitos extremamente vacuolizados, o que dificultava a identificação de organelas. As células da granulosa apresentavam-se desorganizadas e com perda de conexão com o oócito. Em conclusão, uma baixa percentagem de folículos pré-antrais degenerados foi observada, porém, à medida que os folículos crescem para o estágio de folículos secundários tornam-se mais afetados pelos processos degenerativos.

Palavras chave: caprinos, folículos pré-antrais, morfologia, ultraestrutura, degeneração

Degeneration Rate of Preantral Follicles in the Ovaries of Goats

J. R. V. Silva^{a,*}, M. A. L. Ferreira^a, S. H. F. Costa^a, R. R. Santos^a, F. C. A. Carvalho^a, A. P. R. Rodrigues^a, C. M. Lucci^a, S. N. Bão^a and J. R. Figueiredo^a

^a Laboratory of Manipulation of Oocytes Enclosed in Preantral Follicles, LAMOFOPA, Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Av. Paranjana 1700, CEP 60740-000, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE, Brazil

^b Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

Abstract

The degeneration rate of ovarian preantral follicles in goats, and the distribution in the follicular classes (primordial, primary or secondary) was assessed. Ovaries from adult goats were collected at a local slaughterhouse. To evaluate the morphology of the caprine preantral follicles in situ, one fragment from each ovary was fixed individually in Carnoy for 12 h, sectioned serially at a thickness of 7 μm and stained with Periodic Acid Schiff-hematoxylin. Preantral follicles were then classified according to the stage of development. Preantral follicles were classified individually either as morphologically normal; as Type 1 degenerated follicles (only the oocyte was degenerated); or as Type 2 degenerated follicles (when degeneration occurred at both oocyte and granulosa cells). The total examined was 235 primordial, 195 primary and 101 secondary follicles. The distribution of degenerated follicles as primordial, primary and secondary follicles was 8.5, 14.3 and 16.8%, respectively. When Types 1 and 2 degenerated follicles were pooled, secondary follicles were significantly more degenerated than primordial and primary follicles. When degeneration Types 1 and 2 was compared in each follicular class, a higher ($P < 0.05$) percentage of Type 1 degeneration was observed in primordial and primary follicles. Conversely, secondary follicles were significantly more affected by

Type 2 degeneration. When the follicular classes were taken together, a significantly higher percentage of Type 1 degenerated preantral follicles was observed when compared with Type 2 degenerated follicles ($P < 0.05$). In conclusion, a low percentage of degenerated preantral follicles was observed and secondary follicles were more affected by degeneration than primordial follicles. Thus, primordial follicles constitute a large and potentially valuable source of oocytes for reproductive programs after *in vitro* growth and maturation.

Keywords: Goat; Preantral follicle; Degeneration; Morphology

1. Introduction

The ovarian preantral follicles represent 90% of the follicular population (SAUMANDE, 1991). The mammalian ovary contains thousands of follicles at birth, but the vast majority (99.9%) become atretic during their growth and maturation (CARROL *et al.*, 1990). Some investigators (BYSKOV, 1974; SADRKHANLOO *et al.*, 1987; HUGES & GOROSPE, 1991) maintain that atresia can occur at any stage of development, suggesting that those follicles which ultimately ovulate have escaped atresia many times during the course of development. Others maintain that the phenomenon of atresia is limited to a particular stage of development (GRIMES *et al.*, 1987; HIRSFIELD, 1988), and that there is a single period of vulnerability during the development of antral follicles. Quantitative data pertinent to this is scarce. Of the few studies, most reports relate only on atresia in antral follicles (OSMAN, 1985; HIRSFIELD *et al.*, 1986). Others fail to define atretic follicles into classes, indicating only the overall incidence of atresia (BYSKOV, 1974). Only a few studies provide detailed data (HIRSFIELD, 1988) on the size distribution of atretic follicles in laboratory species. Some of these studies indicate that atresia is restricted to a discrete developmental period that occurs near the final stages of follicular growth (HIRSFIELD,

1988). Conversely, in goats, BEZERRA *et al.* (1998) and LUCCI *et al.* (1999a) showed that atresia also occurs in preantral follicles, but to our knowledge there is no information available about what class of preantral follicles (primordial, primary or secondary follicles) is more sensitive to atretic changes. The knowledge of the quality of preantral follicles in each class is of importance to understand follicular atresia at the preantral stage as well as to provide healthy oocytes for *in vitro* studies. The *in vitro* growth of preantral follicles in combination with *in vitro* maturation promises to be a powerful technology for use in assisted reproductive programs (TELFER *et al.*, 2000). The aim of the present study was to investigate the degeneration rate in goat preantral follicles and to determine what class of preantral follicles (primordial, primary and secondary follicles) is more sensitive to degenerative changes *in vivo*.

2. Materials and methods

Ovaries ($n=45$) from adult (1–3 years) cross-bred goats were collected at a local slaughterhouse. The animals were cycling and in good body condition. The ovaries were stripped of surrounding fatty tissue and ligaments, washed in a 70% alcohol solution for approximately 10 s, and then twice in a 0.9% saline solution and immediately processed as described below.

To evaluate the morphology of the caprine preantral follicles *in situ*, one fragment from each ovary was fixed individually in a Carnoy solution for 12 h. The fragments were then dehydrated in a graded series of ethanol dilutions, treated with xylol and embedded in paraffin wax. The ovarian tissue was then sectioned serially (at a thickness of 7 μm) and stained with Periodic Acid Schiff-hematoxylin (LUCCI *et al.*, 1999a). Each section was deparaffinized with xylol and rehydrated in graded alcohol. Sections were examined

by light microscopy (Zeiss, Germany). The nucleus of the oocyte was used as a marker for analyzing the follicles.

Preantral follicles were classified in three classes according to the stage of development as primordial (one layer of flattened or flattened-cuboidal granulosa cells around the oocyte); primary (a single layer of cuboidal granulosa cells around the oocyte); or, secondary (oocyte surrounded by two or more layers of cuboidal granulosa cells) (HULSHOF *et al.*, 1994). Follicular morphology was evaluated based on the integrity of the basement membrane, cellular density, presence or absence of pyknotic bodies and integrity of the oocyte. Based on these parameters, primordial, primary and secondary follicles were classified individually as morphologically normal; as Type 1 degenerated follicles (only the oocyte was degenerated) or as Type 2 degenerated follicles (when degeneration occurred at both oocyte and granulosa cells).

Ultrastructural analysis was performed using normal and degenerated follicles. Briefly, small pieces of ovarian cortex from four ovaries were fixed in a solution containing 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2). After fixation, specimens were rinsed in the buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM CaCl₂ in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (SILVA *et al.*, 2001). Subsequently, the samples were dehydrated in acetone and embedded in Spurr's epoxy resin. Thin sections (60 nm) were prepared when the oocyte nucleus was present in the semi-thin sections. Semi-thin sections (3 μm) were stained with toluidine blue while thin sections were then contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined using Jeol 100 C or Zeiss 912 transmission electron microscope.

Data of degenerated preantral follicles from ovarian fragments were pooled. The percentage of degenerated primordial, primary and secondary follicles was compared

using a χ^2 -test (Instat for Macintosh). Values were considered statistically significant at 0.05 or less.

3. Results

Normal preantral follicles exhibited a healthy spherical or oval oocyte with a large central or eccentrically located nucleus. Granulosa cells, well organized in layers, without pyknotic nucleus were observed surrounding the oocyte (Fig. 1a). Type 1 degenerated follicles exhibited an oocyte with a pyknotic nucleus and well-organized granulosa cells without pyknotic nuclei (Fig. 1b). A retracted oocyte and swollen granulosa cells detached from basement membrane were observed in Type 2 degenerated follicles (Fig. 1c). It is important to note that neither pyknotic bodies in the granulosa cells nor rupture of the basement membrane were observed in degenerated follicles.