

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

ATIVAÇÃO DO FOLÍCULO PRIMORDIAL E
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR ATRAVÉS DA
PARTICIPAÇÃO DE ALGUNS FATORES DE CRESCIMENTO

Monografia apresentada à Disciplina de Seminários I, do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

Aluno de doutorado: Andrey Borges Teixeira

Professores Responsáveis: Prof^a Dr^a Maria Denise Lopes

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Botucatu - SP

2002

ABREVIACOES E SÍMBOLOS

μm	Micrmetro
AIgf	Fator de crescimento indutor da produção de andrógenos
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
c-Kit	Receptor de tirosina kinase
CP	Fossas endocíticas ("coated pits")
EGF	Fator de crescimento epidermal
EV	Vesículas endocíticas
FD	Folículo dominante
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FS	Folículos subordinados
FSH	Hormônio folículo estimulante
FSH-R	Receptor do hormônio folículo estimulante
GDF-9	Fator de diferenciação de crescimento 9
GH	Hormônio de crescimento
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I
IGF-I-R	Receptor para o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I
KL	"kit ligant"
LH	Hormônio Luteinizante
LH-R	Receptor do hormônio luteinizante
MGF	Fator de crescimento mastocitário
MT	Microtúbulos
PGCs	Células germinativas primordiais
pRb	Proteína retinoblastoma
RNAm	Mensageiro do cido Ribonucléico
SLF	"Steel factor"
SCF	Fator de crescimento de células tronco
SV	Vesículas secretrias
TGF β	Fatores de crescimento transformantes β
TZP	Projeções transzonais
WT1	Gene supressor do tumor de Wilms
ZP	Zona pelúcida

SUMÁRIO

<i>I - INTRODUÇÃO</i>	4
<i>II - O OVÁRIO</i>	4
Aspectos morfológicos e estruturais	4
População folicular ovariana	6
<i>III - ATIVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO FOLICULAR</i>	6
Origem e formação do folículo primordial	7
Função dos folículos ovarianos	8
Tipos de folículos	9
Ativação dos folículos primordiais	9
Estimuladores de crescimento	10
C-Kit/SCF	10
Gonadotrofinas e seus receptores	10
Subunidades da inibina e activina	11
Folistatina	12
TGF β e FGF	12
bFGF	13
Inibidores de crescimento	13
pRb e Wt1	13
Regulação parácrina do desenvolvimento folicular	14
Zona pelúcida (ZP)	14
Projeções transzonais (TZP) na ligação das células oócito-granulosa	14
Crescimento inicial dos folículos antrais	16
Crescimento terminal dos folículos antrais	17
Duração da foliculogênese	17
<i>IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	18
<i>V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	19
<i>VI - ANEXO</i>	22

I - INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a utilização de técnicas de biologia molecular tem possibilitado aos grandes centros de pesquisas o estudo molecular dos eventos fisiológicos nos órgãos e sistemas de diversos organismos. Estas técnicas permitem verificar as expressões genéticas e protéicas tanto *in vitro quanto in situ*, possibilitando a melhor compreensão dos mecanismos de ação que controlam as funções celulares.

A otimização da exploração do potencial reprodutivo das fêmeas requer uma compreensão mais ampla dos mecanismos que controlam o crescimento e o desenvolvimento folicular, conhecido como foliculogênese, uma vez que o papel preciso do oócito e das células da pré-granulosa na ativação e no crescimento folicular ainda é pouco conhecido. Assim, a compreensão destes eventos associada a outros tipos de biotécnicas tais como a transferência de embriões, a fecundação *in vitro* e a clonagem, poderão ser úteis na preservação de espécies em extinção e no tratamento de certas formas de infertilidade.

O objetivo dessa monografia é destacar a participação de alguns fatores de crescimento na ativação do folículo primordial e no desenvolvimento folicular.

II - O OVÁRIO

Aspectos morfológicos e estruturais

A forma do ovário varia de acordo com a espécie e o estágio do ciclo estral (PINEDA, 1989; NUNEZ, 1993; HAFEZ, 1995). Em bovinos, ovinos (HAFEZ, 1995) e caprinos (NUNEZ, 1993), o ovário tem a forma de amêndoa, enquanto que nos eqüinos ele tem a forma de rim devido à presença da fossa ovulatória. Em porcas, o ovário assemelha-se a um cacho de uvas, em decorrência da presença de folículos e corpos lúteos salientes (HAFEZ, 1995). A figura 1 mostra a forma e o peso ovariano em diferentes mamíferos domésticos.

Animal	Forma	Peso (g)	Referência
Vaca	Amendoada	10-20	Hafez, 1995
Ovelha	Amendoada	3-4	Hafez, 1995
Cabra	Amendoada	3-4	Nunez, 1993
Porca	Cacho de uva	3-7	Hafez, 1995
Égua	Rim	40-80	Hafez, 1995
Cadela	Oval	0,8-1,0	Christiansen, 1988a
Gata	Oval	0,3-1,0	Christiansen, 1988b

Figura 1. Forma e peso do ovariano em diferentes mamíferos domésticos.

O ovário é composto por uma região cortical e uma medular, sendo circundado por um epitélio superficial conhecido como epitélio germinativo que repousa sobre uma membrana basal. Logo abaixo, observa-se a túnica albugínea e o estroma ovariano. No córtex ovariano, de animais que estejam ciclando, podem ser encontrados folículos ovarianos quiescentes, em desenvolvimento ou em atresia, corpos lúteos, corpos albicans e corpos hemorrágicos (MURDOCH, 1996 - Figura 2). No córtex, também encontram-se colágenos dos tipos I e III, fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas (HAFEZ, 1995). A região medular é responsável pela nutrição e sustentação do ovário. Ela consiste de tecido conjuntivo fibroblástico (fibroblasto, fibras de colágeno I e III e fibronectina), nervos e sistemas vasculares (SMITH et al., 1994) que atingem o ovário pelo hilo (HAFEZ, 1995).

O ovário desempenha duas importantes funções, uma exócrina ou gametogênica (produção e liberação de óvulos) e uma endócrina ou esteroideogênica (produção e liberação de hormônios esteróides - HAFEZ, 1995). Essa dupla função é um processo interdependente, complementar e necessário para o sucesso da reprodução (PINEDA, 1989). A produção de óvulos ou gametas femininos é resultante da interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, isto é, a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1981). O presente dará maior enfoque à foliculogênese.

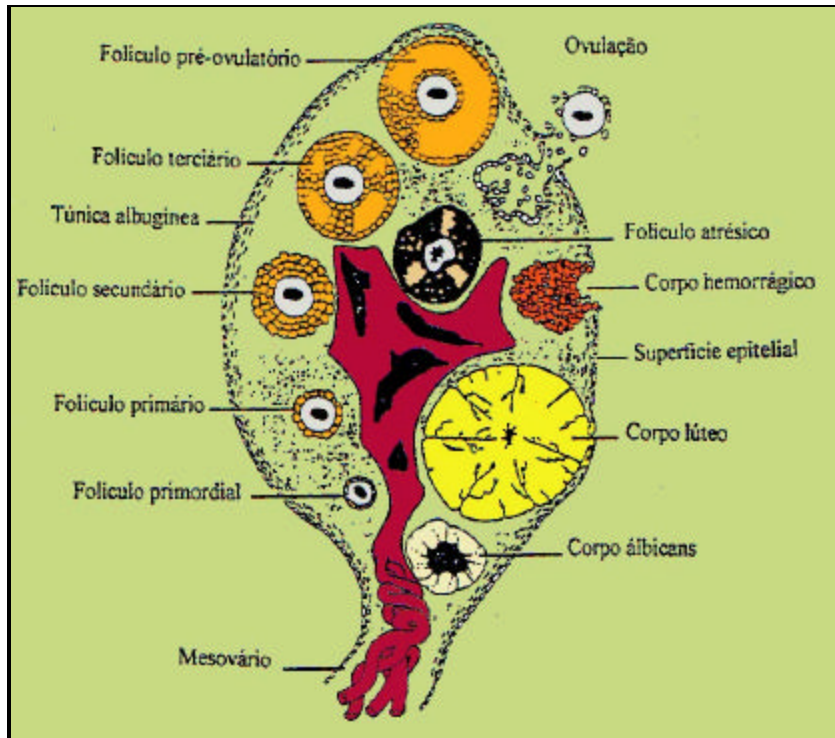


Figura 2. Organização estrutural do ovário mamífero (adaptado de MURDOCH, 1996).

População folicular ovariana

Vários fatores como a espécie, raça (CAHILL et al., 1979), genética (ERICKSON, 1966; SMITH et al., 1994), idade (PETERS, 1976; RÜSSE, 1983; ROY & TREACY, 1993) e estado reprodutivo do animal (ERICKSON et al., 1976) podem influenciar a população de folículos ovarianos. Estima-se que a população folicular ovariana ao nascimento é de aproximadamente 235.000 folículos na vaca, podendo variar de 0 a 720.000 folículos por ovário (BETTERIDGE et al., 1989). Em outras espécies encontram-se aproximadamente 160.000 na ovelha (DRIANCOURT et al., 1991) e 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986).

III – ATIVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

O processo de formação, ativação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo maduro

ou de *Graaf* ou pré-ovulatório é conhecido como foliculogênese (SAUMANDE, 1981; PICTON, 2001).

Origem e formação do folículo primordial

A quantidade total de oócitos presente no ovário adulto origina-se de um número definido de células germinativas primordiais (PGCs) que são derivadas da massa celular interna do blastocisto em desenvolvimento. Uma vez estabelecidas no ovário em desenvolvimento, as PGCs começam a se diferenciar em oogônias. A população de oogônias se expande através de um número predeterminado de divisões mitóticas, espécie específica, até as células se tornarem oócitos por divisão meiótica (PICTON, 2001).

Após o início da meiose as células germinativas, agora chamadas de oócitos primários, continuam a fase de divisão passando pelas fases de leptóteno, zigóteno e paquíteno da prófase I da meiose antes de atingirem a fase de diplóteno. O tamanho das células germinativas aumenta com o desenvolvimento do oócito, passando para a fase de diplóteno. Depois de passarem por uma reorganização citoplasmática, os oócitos primários permanecem em um estado inativo até a puberdade quando os folículos (os selecionados) estão aptos a ovular. O início da meiose nos oócitos coincide com o início da foliculogênese. Antes da formação do folículo, há uma grande colonização do ovário fetal por células mesonéfricas, que podem tornar-se fontes precursoras de células foliculares (PICTON, 2001).

Dentro da região medular do ovário fetal, cordões de células somáticas se ramificam no córtex e invadem os “ninhos” das oogônias e oócitos. Durante este processo os oócitos perdem qualquer relação intercelular e são envolvidos por uma única camada plana ou poliédrica de células pré-granulosas derivadas dos cordões celulares, enquanto formam os primeiros estágios dos folículos primordiais. As células pré-granulosas permanecem em uma fina membrana opostas as células do estroma, algumas das quais vão se diferenciar em uma camada de células da teca após o início do crescimento folicular. Uma vez estabelecida, a unidade folicular, esta irá ajudar a manter o oócito em um ambiente controlado e isolado de qualquer substância que possa prejudicá-lo (PICTON, 2001).

Todos os oócitos que não forem incorporados aos folículos primordiais serão degenerados. Os folículos primordiais constituem o banco de células germinativas no ovário pós-natal e o seu tamanho e número varia de acordo com a espécie (figura 3) e a idade (GOSDEN et al., 1987ab). Assim que o banco de folículo primordial é estabelecido, inicia-se a fase de recrutamento do folículo continuando pelo resto da vida ou até o final da atividade ovariana. O crescimento do folículo é contínuo, podendo terminar com a ovulação de um oócito maduro ou a degeneração (atresia) do folículo e seu oócito.

	Número de células da granulosa	Diâmetro folicular (μm)	Diâmetro do oócito (μm)
Ratas	10	12	17
Ovelhas	15-16	41	35
Vacas	24	45	30
Mulheres	13	35	32

(Adaptado de PICTON, 2001)

Figura 3. Característica dos folículos primordiais de diferentes espécies.

Função dos folículos ovarianos

O folículo é a unidade funcional do ovário mamífero (GORE-LANGTON & ARMSTRONG, 1994). Cada folículo apresenta basicamente duas funções: 1) proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito (GORDON, 1994) para que o mesmo atinja seu potencial máximo que é a fusão com a célula germinativa do macho (espermatozóide) para produzir um embrião capaz de conduzir o seu desenvolvimento até o nascimento de um indivíduo normalmente viável (GORE-LANGTON & ARMSTRONG, 1994); 2) Produção de hormônios esteróides (GORDON, 1994).

Tipos de folículos

A população folicular ovariana é bastante heterogênea (SAUMANDE, 1981). Um sistema atual de classificação dos folículos (tanto para a espécie bovina quanto para a ovina) foi descrito por Braw-Tal e Yossefi (1997). Nesse sistema de classificação os folículos pré-antrais e folículos antrais jovens são classificados como:

- a) tipo 1 – folículos primordiais (uma camada achatada de células da granulosa).
- b) tipo 1a – folículos transitórios (uma mistura de camada achatada e células da granulosa do tipo cubóide).
- c) tipo 2 – folículos primários (1-2 camadas de células da granulosa cubóide).
- d) tipo 3 – folículos pré-antrais pequenos (2-4 camadas de células da granulosa).
- e) tipo 4 - folículos pré-antrais grandes (4-6 camadas de células da granulosa).
- f) tipo 5 - folículos antrais pequenos (presença de antro e mais de cinco camadas de células da granulosa).

Contudo a classificação dos folículos ovarianos ainda não está totalmente definida, podendo variar dependendo da espécie e do padrão de classificação morfológica adotado. Para fins comparativos, foi adotada nesse trabalho a classificação acima descrita.

Ativação dos folículos primordiais

Os folículos primordiais *in vivo* são rodeados por um ambiente extra-folicular complexo, incluindo o estroma ovariano, células da teca em várias fases de diferenciação, ramos do sistema circulatório, sistema nervoso e outros tipos celulares (e.g., macrófagos). A influência que estes diferentes tipos celulares exercem nos eventos intrafoliculares ao longo da foliculogênese está sendo estudada, porém os mecanismos envolvidos ainda permanecem obscuros (McNATTY et al., 1999).

Os folículos em crescimento se encontram na porção córtico-medular que é ricamente vascularizada (van WEZEL et al., 1996) sugerindo que a ativação e o crescimento dos folículos primordiais depende de nutrientes, hormônios e fatores de crescimento. Porém, nem todos os folículos primordiais iniciam seu crescimento ao

mesmo tempo, alguns fatores podem estar retendo alguns desses folículos na fase de quiescência para serem ativados posteriormente ao longo dos anos.

Estimuladores de crescimento

C-Kit/SCF

O receptor de tirosina kinase, c-kit e seus ligantes (SLF, “Steel factor”, também conhecido como MGF, fator de crescimento mastocitário), o fator de crescimento de células tronco (SFC ou “kit ligant”, KL), foram localizados em oócitos e células da granulosa, respectivamente (MOTRO & BERNSTEIN, 1993). Nos ratos, a inibição da interação entre SCF e o c-kit previne a transição de folículos primordiais para folículos primários, contudo sem impedir a ativação de folículos primordiais (HUANG et al., 1993; YOSHIDA et al., 1997). Em ovários ovinos, foram detectadas as expressões de SCF em células da granulosa e de c-kit em oócitos em todos os estágios de crescimento foliculares desde a fase primordial (CLARCK et al., 1996; TISDALL et al. 1997). Além disso, em ovelhas, a proteína c-kit foi localizada em oócitos de folículos primordiais em crescimento, o SCF em células da granulosa e em oócitos de folículos primordiais e primários. Esses achados ressaltam a importância do SCF e do c-kit no crescimento folicular de folículos primordiais. Yoshida et al. (1997) demonstraram em ratos a cessação da proliferação de células da granulosa após a administração de anticorpos contra o c-kit. Isto demonstra que é necessário um sinal proveniente dos oócitos para desencadear o crescimento das células da granulosa. Alguns candidatos que poderiam estar desencadeando este processo são o fator de diferenciação de crescimento 9 (GDF-9 – DONG et al., 1996) ou o fator de crescimento epidermal (EGF) e/ou seus receptores (SINGH et al., 1995).

Gonadotrofinas e seus receptores

Os folículos primordiais começam a crescer em maior número antes da puberdade, mas o crescimento também se inicia durante gravidez e a lactação quando as gonadotrofinas na circulação são baixas e a ovulação é suspensa. Em contraste com as fases posteriores de desenvolvimento, a ativação do folículo primordial é

independente de gonadotrofinas. Além disso, doses superestimulantes de gonadotrofinas não parecem aumentar a taxa de recrutamento de folículo primordial e a administração crônica de gonadotrofina não causa depleção prematura dos folículos no ovário (DANFOUR et al., 1999).

O FSH (hormônio folículo estimulante) parece não ser o fator inicial de crescimento dos folículos primordiais. Há fortes evidências em ovelhas, mulheres, vacas e porcas que o gene que codifica o receptor para FSH (FSH-R) não é expresso antes que o folículo atinja os graus (tipos) 2 e 3 de desenvolvimento folicular (TISDALL et al., 1995; XU et al., 1995; YUAN et al., 1996; OKTAY et al., 1997). A partir desse estágio de desenvolvimento a expressão para o FSH-R está localizada exclusivamente nas células da granulosa. Embora tenha sido demonstrado que o FSH possui efeitos positivos na proliferação e função das células da granulosa de folículos pré-antrais, este não é um fator essencial para o desencadeamento na proliferação destas células (HIRSHFIELD, 1985) ou ainda, para a formação da teca interna (MAGARELLI et al., 1996).

Em ovelhas, a teca interna desenvolve-se em folículos do tipo 3 e em vacas folículos do tipo 4 (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997). A expressão do receptor do hormônio luteinizante (LH-R) foi demonstrada na teca interna de folículos pré-antrais dos tipos 4 e 5 de porcas, vacas e ovelhas (XU et al., 1995; YUAN et al., 1996). Em ruminantes domésticos há evidências que folículos do tipo 4 e 5 têm receptores funcionais para FSH e LH nas células da granulosa e células da teca, respectivamente, e que em ovelhas esses folículos são capazes de sintetizar progestágenos, andrógenos e estrógenos *in vitro* (McNATTY et al., 1986; YUAN et al., 1996; WANDJI et al., 1996).

Subunidades da inibina e activina

A inibina e activina são peptídeos, dímeros dos fatores de crescimento pertencentes à superfamília dos fatores de crescimento transformantes β (TGF β). A subunidade α da inibina, inibina/activina β_A e a inibina/activina β_B juntamente com os receptores do tipo I, IIA e IIB são expressas nas células ovarianas durante o desenvolvimento folicular (ROBERTS et al., 1993; CAMERON et al., 1994). Outros trabalhos demonstraram a evidência da presença dos peptídeos, subunidade β da

inibina/activina em oócitos e células da granulosa de folículos pré-antrais em diferentes estágios de desenvolvimento (TORNEY et al., 1989; BRAW-TALL,1994; TISDALL et al., 1994).

Folistatina

A superexpressão da folistatina em ratos transgênicos inibiu o crescimento folicular primário e subseqüentemente dos outros estágios de desenvolvimento. (GUO et al., 1998). Deste modo a folistatina pode regular as ações da activina ou de outros membros da família dos TGF β , por exemplo, o GDF-9. Em ovelhas a expressão do gene da folistatina foi observada em células da granulosa do tipo 3 (BRAW-TALL, 1994; BRAW-TALL et al., 1994) e em quase todos os folículos pré-antrais e folículos antrais (não atréticos) durante seus estágios de desenvolvimento. Durante a fase de crescimento pré-antral e início da fase antral, a folistatina pode atuar como uma proteína ligadora para prevenir a maturação prematura do oócito.

TGF β e FGF

O TGF β é conhecido por ser produzido pelas células da teca e influenciar na proliferação de células da granulosa em bovinos (McNATTY et al., 1999). No ovário de ovelhas a expressão do TGF β_1 foi observada em tecidos intersticiais e estroma e primeiramente observado na teca interna de folículos do tipo 4 e 5, enquanto que o TGF β_3 foi observado principalmente em células da musculatura lisa de vasos sanguíneos e na camada de células da teca.

O fator de crescimento fibroblástico 8 (FGF-8) apresenta fortes evidências no controle do desenvolvimento folicular. Este fator pertence à família dos FGFs que, além dele, agrega mais 9 membros (FGF 1-9). Os FGFs apresentam padrões temporais e espaciais de expressão específicos e estão envolvidos no desenvolvimento embrionário, angiogênese, cicatrização e oncogênese (BASILICO et al., 1992). Inicialmente, o FGF-8 foi identificado como um fator de crescimento indutor da produção de andrógenos (AIGF) que media o crescimento andrógeno-dependente de células tumorais mamárias da linhagem SC-3 (TANAKA et al., 1992).

Posteriormente, detectou-se a expressão do FGF-8 em vários sítios que sinalizam e direcionam o crescimento do embrião murino, indicando que este fator de crescimento desempenha um papel importante no controle do desenvolvimento embrionário (CROSSLEY et al., 1995). Além disso a expressão de outro FGF foi observada em culturas de células da granulosa (NEUFIELD et al., 1987).

bFGF

O fator de crescimento fibroblástico básico foi localizado em oócitos de folículos primordiais e primários de várias espécies. O bFGF também foi localizado nas células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais. As células da teca de folículos em desenvolvimento também expressam esse gene. Receptores para o bFGF foram observados em células da granulosa de ratos e bovinos (NILSSON et al., 2001).

O bFGF está relacionado com várias funções ovarianas incluindo a mitose de células da granulosa, esteroidogênese, diferenciação e apoptose. Além disso, foi observado que células da granulosa de folículos pré-antral e antral produzem o bFGF durante o desenvolvimento folicular (NILSSON et al., 2001).

Inibidores de crescimento

pRb e WTI

Apesar dos efeitos de estimulação do crescimento no início do crescimento folicular primordial, a presença de pulsos de inibidores de crescimento pode ajudar a manter a quiescência do “pool” de folículos primordiais. Após a ativação do crescimento do folículo primordial, ocorre um aumento da proteína retinoblastoma (pRb) pela proliferação das células da granulosa, por outro lado o aumento do tamanho do oócito provoca uma depleção dessa proteína. A expressão da pRb no nucléolo do oócito pode estar associada com a produção de um inibidor natural de proliferação que pode prevenir proliferação de células da granulosa (BUKOVSKY et al., 1995). Como a pRb, o gene supressor do tumor de Wilms (WTI) pode ser um inibidor genético envolvido na diferenciação folicular agindo em células da granulosa de folículos primordiais, primários e secundários, como por exemplo, a supressão do

receptor para o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I, IGF-I-R (WERNER, 1993). Foi demonstrado que a expressão do WTI no ovário pode estar sendo controlada da mesma forma que a pRb (HSU et al., 1995).

Regulação parácrina do desenvolvimento folicular

Zona pelúcida (ZP)

A ZP é uma matriz extracelular que cerca o oócito e promove um tipo de junção especializada para dentro da camada interna das células da granulosa (as células do cumulus). Embora nos folículos primordiais não exista ainda a ZP, o início do crescimento primordial está associado à expressão genética coordenada da ZP-1 oócito-específico, ZP-2 e ZP-3, formando a ZP em folículos jovens em crescimento (GREEN, 1997). Durante este crescimento inicial, as células da granulosa se dividem e tornam-se metabolicamente unidas entre si, além de formarem junções “gap” heterólogas com o oócito chegando até eles através da ZP (ANDRESON et al., 1976).

Projeções transzonais (TZP) na ligação das células oócito-granulosa

As TZPs são extensões de células foliculares que atravessam a zona pelúcida e terminam na superfície celular do oócito. Estão presentes em maior número durante o desenvolvimento folicular. As TZPs estão ligadas à captura de fatores, assim como a secreção e o transporte transcitótico de fatores entre o oócito, a granulosa e as células da teca, tais como: o GDF-9 e passagem de leptinas de células foliculares para o oócito (Figura 4).

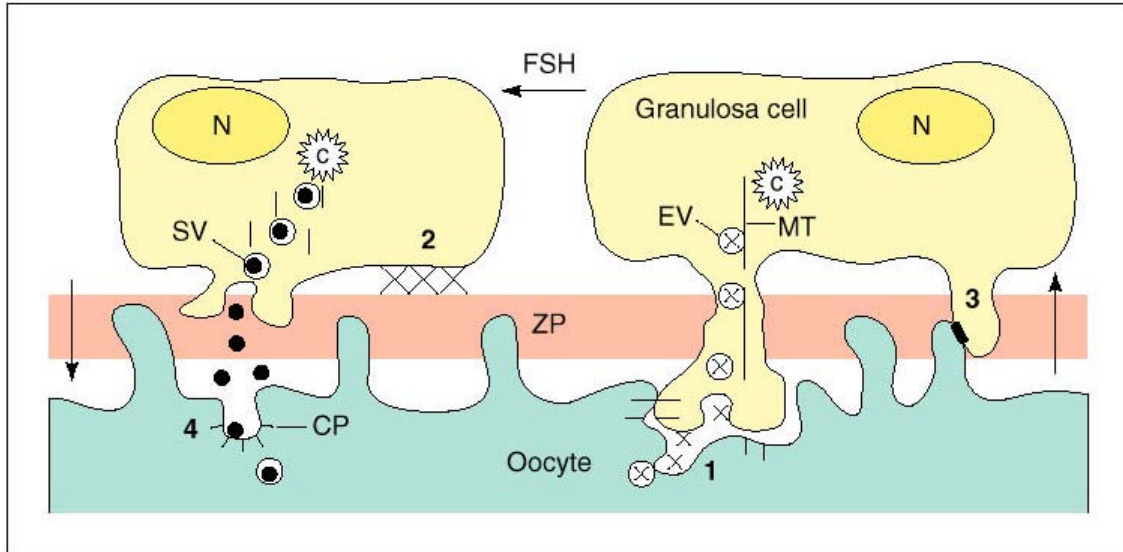


Figura 4. Modelo proposto para regulação de transferência de fatores parácrinos entre a superfície oócito-granulosa. São descritas as modalidades de comunicação: (1) Localização de captura de fatores oocitários (X) semelhante ao GDF-9, por endocitose através do sítio de ligação das TZPs para o oolema; transporte vetorial de vesículas endocíticas (EV) para o corpo das células da granulosa ao longo dos microtúbulos (MT) preparando para o processo de liberação de fatores intracelulares transcitóticos. (2) fixação requerida entre a célula da granulosa e a zona pelúcida para a orientação das TZP. Sítios de contato desempenham um papel de ligação para as células da granulosa e oócito e mudanças na adesão podem ocorrer em resposta às mudanças na composição da ZP. (3) Junções "Gap" que permitem a comunicação intercelular direta entre a microvilosidade do oócito e as TZPs da célula da granulosa. (4) Via de transporte para fatores derivados das células da granulosa (●) vacuolisados em vesículas secretórias (SV) que são subsequentemente absorvidas por endocitose pelos receptores mediadores de endocitose na superfície do oócito através das fossas endocíticas ("coated pits" - CP). Ocorre a modelação do citoesqueleto do microtúbulo (MT) em resposta do estímulo das células da granulosa pelo FSH permitindo a retração da TZP e a modulação dos fatores derivados das células da granulosa (●) para o oócito (seta à esquerda) ou a captura pelas células da granulosa de fatores secretados pelo oócito (X - seta à direita). c: centríolo e N: núcleo (adaptado de ALBERTINI et al., 2001).

Crescimento inicial dos folículos antrais

Respectivamente nas espécies bovina e ovina, esta fase tem início quando o folículo atinge um diâmetro de 0,14mm a 0,28mm (LUSSIER et al., 1987) e 0,216mm a 0,220mm (DUFOUR et al., 1979) e termina quando mede acima de 4mm (DRIANCOURT et al., 1991) e 2mm de diâmetro (DUFOUR et al., 1979). O crescimento dos folículos antrais nesta fase pode ser atribuído a um aumento no tamanho do oócito e no número de células da granulosa e, conseqüentemente, um aumento no número de camadas de células e um pequeno aumento do antro. O crescimento dos folículos ovarianos medindo até 2mm de diâmetro é pouco sensível às variações de gonadotrofinas cíclicas. Suas necessidades em FSH e LH são baixas (DRIANCOURT et al., 1991), significando que os hormônios gonadotróficos não são absolutamente necessários para a proliferação das células da granulosa e da teca (HIRSHFIELD, 1991). As células da teca parecem secretar fatores (TGF- β e EGF) que influenciam a taxa de proliferação das células da granulosa. A administração de estrógeno também pode estimular a proliferação das células da granulosa. Fatores extra-ovarianos como o hormônio de crescimento (GH), também podem alterar a taxa de crescimento folicular. A administração desse hormônio em ratas hipofisectomizadas imaturas resultou no aumento da atividade mitótica (HIRSHFIELD, 1991). Lusseir et al. (1987) demonstraram que em vacas, a atividade mitótica máxima é observada em folículos de 0,68mm a 1,52mm de diâmetro. Essa atividade reduz progressivamente à medida que as células da granulosa adquirem um estado de diferenciação mais avançado (MONNIAUX et al., 1993).

Em ruminantes e outras espécies, o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I, IGF-I estimula tanto a proliferação quanto à diferenciação de células da granulosa *in vitro*. E ovinos o IGF-I, primeiramente estimula a proliferação das células da granulosa de pequenos folículos (1-3 mm), mas não de folículos grandes (> 5mm). Por outro lado, o IGF-I estimula a secreção de progesterona das células da granulosa apenas de folículos grandes (MONNIAUX et al., 1997; MONGET et al., 2000).

Crescimento terminal dos folículos antrais

Na vaca e na ovelha, o crescimento terminal dos folículos ovarianos tem início quando o folículo atinge um diâmetro superior à 4mm e 2mm, respectivamente. Ao contrário, nos folículos acima de 2mm de diâmetro, o crescimento folicular parece resultar do desenvolvimento do antro (LUSSIER et al., 1987), sendo essencialmente dependente de gonadotrofinas hipofisárias (MONNIAUX et al., 1993). Por essa razão, essa fase do crescimento folicular é conhecida como foliculogênese tônica (DRIANCOURT, 1991). As gonadotrofinas aumentam a atividade esteroidogênica nas células da granulosa e células da teca. Isso resulta em um aumento na síntese e acúmulo de esteróides, especialmente o estradiol, na circulação geral e no fluido folicular onde o estradiol é um elemento essencial à foliculogênese e aos eventos fisiológicos necessários para a reprodução (IRELAND, 1987). Neste período do crescimento folicular, mudanças funcionais podem ser observadas como por exemplo: a) aumento da sensibilidade das células da granulosa ao FSH; b) aparecimento dos receptores de LH nas células da granulosa nos folículos acima de 3mm (ovelha) e 5mm (vaca) e c) aumento da atividade da aromatase nas células da granulosa (MONNIAUX et al., 1993).

Duração da foliculogênese

Estima-se que, na ovelha, que ao deixar o *pool* de reserva o folículo levaria aproximadamente 180 dias para atingir o estágio pré-ovulatório, 135 dias, até o aparecimento do antro e mais de 45 dias até a ovulação (CAHILL & MAULÉON, 1980). Por outro lado, pouco se conhece sobre a duração do crescimento folicular em outros ruminantes como a vaca e a cabra. Segundo as observações de Lussier et al. (1987), na vaca, um folículo de 0,13mm de diâmetro levaria 42 dias, ou seja, aproximadamente 2 ciclos estrais para atingir o tamanho pré-ovulatório. Na rata, o período que compreende desde a saída de um folículo primordial do *pool* de reserva até a ovulação é de aproximadamente 21 dias (HIRSHFIELD, 1991).

IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os folículos pré-antrais representam um vasto potencial para manipulação genética das espécies domésticas, para preservação de espécies ameaçadas de extinção e para o estudo de problemas ligados a reprodução. Porém, esse grande “quebra-cabeça”, que são os mecanismos envolvidos na foliculogênese, ainda necessitam de melhor compreensão. Qual o por quê da grande perda de folículos, e do pequeno aproveitamento (cerca de 0,1%) da população folicular ovariana de um organismo durante a sua vida? Seria um tipo de defesa, como uma seleção natural? Perguntas como estas poderão ser respondidas através da elucidação da fisiologia e do controle genético envolvidos na ativação e crescimento dos folículos pré-antrais.

Da mesma forma, o estudo da foliculogênese na fase antral, possibilitará a compreensão de algumas questões ainda não solucionadas, como por exemplo o desvio e a dominância folicular. O entendimento desses mecanismos possibilitaria, entre outras coisas, um melhoramento na manipulação do controle do ciclo estral e conseqüentemente uma otimização de técnicas como a inseminação artificial com tempo predeterminado.

De forma geral, a interação entre as células ovarianas e os fatores de crescimento relacionados com a ativação e o desenvolvimento folicular, começaram a ser elucidados com o auxílio de potentes ferramentas que são as técnicas de biologia molecular, possibilitando sua descoberta e caracterização. Contudo, até agora, pode-se dizer que ainda estamos “engatinhando” no que se diz respeito ao completo entendimento dos “mistérios” envolvidos na foliculogênese.

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI, D.F., COMBELLES, C.M., BENECCI, E., CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, p.647-53, 2001.
- ANDERSON, E., ALBERTINI, D.F. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. **J. Cell Biol.**, v.71, p.680-686, 1976.
- BASILICO, C., MOSCATELLI, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. **Adv. Cancer Res.**, v.59, p.115-65, 1992.
- BETTERIDGE, K.J., SMITH, C., STUBBINGS, R.B., XU, K.P., KING, W.A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v. 38, p. 87-98, 1989.
- BRAW-TAL, R., TISDALL, D.J., HUDSON, N.L., SMITH, P., McNATTY, K.P. Follistatin but not alpha or beta A inhibin subunit mRNA is expressed in ovine fetal ovaries in late gestation. **J. Mol. Endocrinol.**, v.13, p.1-9, 1994.
- BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **J. Reprod. Fertil.**, v.109, p.165-71, 1997.
- BRAW-TAL, R. Expression of mRNA for follistatin and inhibin/activin subunits during follicular growth and atresia. **J. Mol. Endocrinol.**, v.13, p.253-64, 1994.
- BUKOVSKY, A., CAUDLE, M.R., KEENAN, J.A., WIMALASENA, J., FOSTER, J.S., van METER, S.E. Quantitative evaluation of the cell cycle-related retinoblastoma protein and localization of Thy-1 differentiation protein macrophages during follicular development and atresia, and in human corpora lutea. **Biol. Reprod.**, v.52, p.776-792, 1995.
- CAHILL, L.P., MAULÉON, P. Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. **J. Reprod. Fert.**, v.58, p.321-328, 1980.
- CAHILL, L.P., MARIANA, J.C., MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **J. Reprod. Fert.**, v.55, p.27-36, 1979.
- CAMERON, V.A., NISHIMURA, E., MATHEWS, L.S., LEWIS, K.A., SAWCHENKO, P.E., VALE, W.W. Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary, and testis. **Endocrinology**, v.134, p.799-808, 1994.
- CHRISTIANSEN, I.B. J. Reprodução no cão. Ed. Manole. In: Christiansen, IB, **Reprodução no cão e gato**, 1988a.
- CHRISTIANSEN, IB. J. Reprodução no gato. Ed. Manole. In: Christiansen, IB, **Reprodução no cão e gato**, 1988b.
- CLARK, D.E., TISDALL, D.J., FIDLER, A.E., McNATTY, K.P. Localization of mRNA encoding c-kit during the initiation of folliculogenesis in ovine fetal ovaries. **J. Reprod. Fertil.**, v.106, p.329-35, 1996.
- CROSSLEY, P.H., MARTIN, G.R. The mouse FGF8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. **Development**, v.121, p.439-51, 1995.
- DANFOUR, M.A., PICTON, H.M., LEAF, A., GOSDEN, R.G. Impact of gonadotrophin treatment on the size of the ovarian follicle reserve. **J. Reprod. Fertil.**, v.23, p.62, 1999. (abstract)
- DONG, J., ALBERTINI, D.F., NISHIMORI, K., KUMAR, T.R., LU, N., MATZUK, M.M. Protein growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v.383, p.531-5, 1996.
- DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.35, p.55-72, 1991.
- DUFOUR, J.J., CAHILL, L.P., MAULEON, P. Short and long term effects of hypofisectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep. **J. Reprod. Fert.**, v. 57, p.301-309, 1979.
- ERICKSON, B.H., REYNOLDS, R.A., MURPHREE, R.L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biol. Reprod.**, v.15, p.555-560, 1976.
- ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Sem. Reprod. Endocrinol.**, v. 4, p. 233-254, 1986.
- GORDON, I. **Oocyte recovery and maturation**. In: Laboratory Production of Cattle Embryos. Cab International. Wallingford. Oxon. UK., p.30-142, 1994.

- GORE-LANGTON, R.E., ARMSTRONG, D.T. Follicular steroidogenesis and its control. In: KNOBIL, E. & NEIL, J.D. (eds.), **The Physiology of Reproduction**. New York, USA Raven Press, 1994, p.571-628.
- GOSDEN, R.G., TELFER, E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. **J. Zool.**, v.2, p.169-175, 1987a.
- GOSDEN, R.G., TELFER, E. Scaling of follicular sizes in mammalian ovaries. **J. Zool.** v.211, p.157-168, 1987b.
- GREEN, D.P.L. Three dimensional structure of the zona pellucida. **Rev. Reprod.**, v.2, p.147-156, 1997.
- GUO, Q., KUMAR, T.R., WOODRUFF, T., HADSELL, L.A., DEMAYO, F.J., MATZUK, M.M. Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. **Mol. Endocrinol.** v.12, p.96-106, 1998.
- HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animals**. 7ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1995.p.573.
- HIRSHFIELD, A.N. Comparison of granulosa cell proliferation in small follicles of hypophysectomized, prepubertal and mature rats. **Biol. Reprod.**, v. 32, p.979-987, 1985.
- HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Inter. Rev. Citol.**, v.124, p.43-101, 1991.
- HSU, S.-Y., KUBO, M., CHUN, S.-Y., HALUSKA, F.G., HOUSMAN, D.E., HSUEH, A.J.W. Wilms tumor protein WTI as an ovarian transcription factor: decreases in expression during follicle development and repression of inhibin- α gene promoter. **Molec. Endocrinol.**, v.9, p.1356-1366, 1995.
- HUANG, E.J., MANOVA, K., PACKER, A.I., SANCHEZ, S., BACHVAROVA, R.F., BESMER, P. The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. **Dev. Biol.**, v.157, p.100-9, 1993.
- IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. **J. Reprod. Fertil.**, v.34, p.39-54, 1987.
- LUSSIER, J.G., MATTON, P., DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **J. Reprod. Fert.**, v.81, p.301-307, 1987.
- MAGARELLI, P.C., ZACHOW, R.J., MAGOFFIN, D.A. Developmental and hormonal regulation of rat theca-cell differentiation factor secretion in ovarian follicles. **Biol. Reprod.**, v.55, p.416-20, 1996.
- MCNATTY, K.P., HEATH, D.A., LUNDY, T., FIDLER, A.E., QUIRKE, L., O'CONNELL, A., SMITH, P., GROOME, N., TISDALL, D.J. Control of early ovarian follicular development. **J. Reprod. Fertil.**, v.54, p.3-16, 1999.
- MCNATTY, K.P., KIEBOOM, L.E., MCDIARMID, J., HEATH, D.A., LUN, S. Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and steroid production by small ovarian follicles from Booroola ewes with and without a fecundity gene. **J. Reprod. Fertil.**, v.76, p.471-80, 1986.
- MONGET, P., BONDY, C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. **Mol. Cel. Endoc.**, v.163, p.89-93, 2000.
- MONNIAUX, D., MARIANA, J.C., COGNIÉ, Y., RABAHI, F., MONGET, P., MERMILLOD, P., BARIL, G., TOMANEK, M., PISSELET, C., CHUPIN, D., POULIN, N., BRÉBION, P., BOSCH, M., NICOLLE, A., FONTAINE, J., DURAND, P. Contrôle de la maturation terminale des follicules au cours de la phase folliculaire chez les mammifères domestiques. **Contracept. Fertil. Sex.**, v.21, p.403-407, 1993.
- MONNIAUX, D., HUET, C., BESNARD, N., CLÉMENT, F., BOSCH, M., PISSELET, C., MONGET, P., MARIANA, J.C. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. **J. Reprod. Fertil.**, v.51, p.3-23, 1997.
- MOTRO, B., BERNSTEIN, A. Dynamic changes in ovarian c-kit and Steel expression during the estrous reproductive cycle. **Dev. Dyn.**, v.197, p.69-79, 1993.
- MURDOCH, W.J. Ovarian surface epithelium, ovulation and carcinogenesis. **Biol. Ver.**, v.71, p.529-543, 1996.
- NEUFELD, G., FERRARA, N., SCHWEIGERER, L., MITCHELL, R., GOSPODAROWICZ, D. Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. **Endocrinology**. v.121, p.597-603, 1987.
- NILSSON, E., PARROTT, J.A., SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v.175, p.123-30, 2001.

- NUNEZ, Q.M. Morfología del tracto genital de los pequeños ruminantes. **Ver. Cient.**, v.3, p.77-86, 1993.
- OKTAY, K., BRIGGS, D., GOSDEN, R.G. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.82, p.3748-51, 1997.
- PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.**, v.16, p.271-278, 1976.
- PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v.55, p.1193-210, 2001.
- PINEDA, M.H. Female reproductive system. In: MCDONALD, L.E. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 303-354. 1989.
- ROBERTS, V.J., BARTH, S., EL-ROEY, A., YEN, S.S. Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.77, p.1402-10, 1993.
- ROY, S.K., TREACY, B.J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fert. Ster.**, v.59, p.783-790, 1993.
- RÜSSE, I. **Oogenesis in cattle and sheep** Bibliotheca Anatomica, v.24, p.77-92, 1983.
- SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Rec. Méd. Vét.**, v.157, p.29-38. 1981.
- SINGH, B., RUTLEDGE, J.M., ARMSTRONG, D.T. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v.40, p.391-9, 1995.
- SMITH, P.W.S-O., BRAW-TAL, R., CORRIGAN, K., HUDSON, N.L., HEATH, D.A., MCNATTY, K.P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuses that are homozygous carriers or non-carriers of the Fec^B gene. **J. Reprod. Fert.**, v.98, p.41-54. 1994.
- TANAKA, A., MIYAMOTO, K., MINAMINO, M., TAKEDA, M., SATO, B., MATSUO, H., MATSUMOTO, K. Cloning and characterization of androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, p.8928-32, 1992.
- TISDALL, D.J., HUDSON, N., SMITH, P., MCNATTY, K.P. Localization of ovine follistatin and alpha and beta A inhibin mRNA in the sheep ovary during the oestrous cycle. **J. Mol. Endocrinol.**, v.12, p.181-93, 1994.
- TISDALL, D.J., QUIRKE, L.D., SMITH, P., MCNATTY, K.P. Expression of the ovine stem cell factor gene during folliculogenesis in late fetal and adult ovaries. **J. Mol. Endocrinol.**, v.18, p.127-35, 1997.
- TISDALL, D.J., WATANABE, K., HUDSON, N.L., SMITH, P., MCNATTY, K.P. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. **J. Mol. Endocrinol.** v.15, p.273-81, 1995.
- TORNEY, A.H., HODGSON, Y.M., FORAGE, R., DE KRETZER, D.M. Cellular localization of inhibin mRNA in the bovine ovary by in-situ hybridization. **J. Reprod. Fertil.**, v.86, p.391-9, 1989.
- van WEZEL, I.L., RODGERS, R.J. Morphological characterisation of bovine follicles and their environment in vivo. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1003-1011, 1996.
- WANDJI, S.A., SRSEN, V., VOSS, A.K., EPPIG, J.J., FORTUNE, J.E. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. **Biol. Reprod.**, v.55, p.942-8, 1996.
- WERNER, H., ROBERTS, JR. C.T., LEROITH, D. The regulation of IGF-I receptor gene expression by positive and negative zinc-finger transcription factors. **Adv. Exp. Med. Biol.**; v.343, p.91-103, 1993.
- XU, Z.Z., GARVERICK, H.A., SMITH, G.W., SMITH, M.F., HAMILTON, S.A., YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biol. Reprod.**, v.53, p.951-7, 1995.
- YOSHIDA, H., TAKAKURA, N., KATAOKA, H., KUNISADA, T., OKAMURA, H., NISHIKAWA, S.I. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. **Dev. Biol.**, v.184, p.122-37, 1997.
- YUAN, W., LUCY, M.C., SMITH, M.F. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and -II, insulin-like growth factor-binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. **Biol. Reprod.**, v.5, p.1045-54, 1996.

VI - ANEXO

Localização celular da expressão gênica e protéica de alguns fatores supostamente envolvidos na ativação do crescimento dos folículos primordiais.

Fatores	Folículos Primordiais				Primários jovens / Primários			
	Pré-granulosa		Oócito		Pré-granulosa		Oócito	
	RNAm	Proteína	RNAm	Proteína	RNAm	Proteína	RNAm	Proteína
KL/SFC	X	X			X	X	X	X
c-kit			X	X			X	X
pBp	X		XX		XX		X	
WT1	XX				X			
β_B actina/inibina	X				X	X		
β_A actina/inibina		X		X		X		X
Folistatina				X		X		X
FSH-R					X	X		
GDF-9			X				X	
EGF				X				X
EGF-R		X		XX				
TGF α								X
FGF-2				X				X
FGF-R						X		
IGF-I		X		X	X		X	
TGF β				X		XX		X
FIG α			XX				X	

X- expressão; XX - > expressão (Adaptado de PICTON, 2001)