

## QUANTIFICAÇÃO E MORFOMETRIA FOLICULAR DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) PROVENIENTES DE CRUZAMENTO OUTBRED

Paulo Henrique de Almeida Campos Júnior<sup>1,3</sup>; Fernanda Matias de Miranda<sup>1,3</sup>; Ribrio Ivan Pereira Batista<sup>3</sup>; Carolina Marinho de Assunção<sup>3</sup>; Carlos Alberto S. Paim<sup>1</sup>; Fabíola A. M. Souza<sup>1</sup>; João Henrique Moreira Viana<sup>1,3</sup>

1-Estudante do curso de Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES/JF), Email: phacj@ig.com.br; 2-Professor do curso de Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES/JF); 3-Embrapa Gado de Leite

**Palavras-chave:** camundongos; folículo; oócito; morfometria.

### INTRODUÇÃO

Em fêmeas, é observado que células germinativas primordiais são originadas por mitoses. Em seguida, estas migram através de movimentos amebóides do saco vitelínico para as gônadas, e diferenciando-se em oogônias (SOTO-SUAZO & ZORN, 2005). As oogônias formadas são envolvidas por um cordão de células somáticas provenientes do mesonefro, e a partir de então sofrem divisão meiótica e originam o oócito. No entanto, esta divisão é paralisada no diplóteno da prófase I, permanecendo até a maturação no chamado bloqueio meiótico (FREEMAN, 2003; VAN DEN HURK & ZHAO, 2004).

A partir da iniciação da meiose é observado que o oócito encontra-se envolvido por uma camada de células somáticas achatadas que passam então a serem chamadas de células da granulosa, sendo este estágio denominado folículo primordial (SOTO-SUAZO & ZORN, 2005). A reserva folicular ovariana é composta por folículos primordiais, que podem ou não continuar o desenvolvimento e maturação. Alguns destes folículos sofrerão degeneração (atresia), outros serão recrutados, desenvolvendo-se em folículos primários (FORTUNE, 2003).

A diferença inicial entre estes dois estágios é que o folículo primordial apresenta maior número de células da granulosa num formato cuboidal. Além disso, é na transição primordial-primário (ativação do folículo) que surge a zona pelúcida e outra linhagem de células que tem relação direta no crescimento folicular, as células da teca. A partir de então as células da granulosa aumentam significativamente sua taxa de divisão, caracterizando o folículo secundário (VAN DEN HURK & ZHAO, 2004; FORTUNE, 2003).

A próxima etapa crítica deste processo é a formação do antro, espaço entre o conjunto formado pelo oócito e as células do *cumulus* e as demais células da granulosa mural, que é preenchido por fluido folicular, responsável pela regulação e modulação de substâncias provenientes das células foliculares e pela comunicação endócrina que o folículo começa a estabelecer (VAN DEN HURK & ZHAO, 2004; FORTUNE, 2003). A interação destas linhagens de células somáticas com o oócito contribui para o funcionamento ovariano, sendo este processo ocorrido em "micro-ambientes", os folículos, que são caracterizados conforme seu grau de desenvolvimento (primordial, primário, secundário, início de fase antral, antral e atrésico). Desta forma, a caracterização da população folicular ovariana fornece dados importantes para o conhecimento do mecanismo de oogênese, ativação e atresia folicular, além de fornecer informações que contribuam para o conhecimento do ciclo reprodutivo destes animais, podendo relacionar esses dados a respostas moleculares e endócrinas (MYERS et al, 2005; TILLY, 2003).

Buscando um maior conhecimento da dinâmica e morfologia folicular este trabalho teve como objetivo fazer um estudo quantitativo e morfométrico da população folicular ovariana de camundongos púberes.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### *Localização, seleção e manejo dos animais*

Os experimentos foram conduzidos no biotério do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES/JF), MG. Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) provenientes do cruzamento outbred C57Bl/6 X SWISS como modelos biológicos. Os animais foram adquiridos do biotério da Fundação Gonçalo Muniz - FIOCRUZ - Salvador. Estes animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, recebendo ração Novilab concentrada comercial, fornecida *ad libitum* e mantidos em um ambiente com exposição de 12h com luz e 12h sem.

#### *Coleta dos ovários e preparação das lâminas*

SP 3929  
P-137

Ovários, recuperados de fêmeas com 60 dias de idade, foram coletados, fixados em solução de paraformaldeído, desidratados em soluções crescentes de etanol (50-100%), diafanizados em xilol e emblocados na parafina. Estes foram seccionados em séries de 5 µm e posteriormente corados com Hematoxilina-eosina.

#### ***Classificação Morfológica dos folículos:***

Os folículos foram classificados conforme critérios adaptados dos previamente estabelecidos para roedores por Pedersen e Peters (1968):

Folículo Primordial: um oócito cercado por uma camada parcial ou completa de células achatadas denominadas células foliculares ou células da granulosa.

Folículo Primário: com única camada de células cubóides da granulosa.

Folículo Secundário: mais de uma camada de células da granulosa com nenhum antro visível.

Folículo em início de fase antral (IFA): somente uma ou duas áreas pequenas de líquido folicular (antro).

Folículo Antral: um único espaço antral grande.

Folículo Atrésico: apresentando sinais morfológicos de atresia, como picnose, fragmentação e desagregação celular.

#### ***Quantificação Folicular***

As sessões obtidas foram avaliadas em um microscópio Zeiss Axioskop, com objetiva de X40. As quantificações foram realizadas conforme descrito por Tilly (2003), sendo avaliados cortes a cada três sessões (15 µm), sendo quantificados apenas os folículos que apresentassem núcleo evidente, evitando contagem redundante. O número de folículos obtidos foi multiplicado 5 (espessura do corte) e em seguida multiplicado por 3 (intervalo de cortes não lidos), obtendo o número aproximado de folículos por ovário.

#### ***Análise Morfométrica***

Com o auxílio do software *Pinnacle*, as imagens de 20 folículos de cada estágio, escolhidos aleatoriamente, foram capturadas (Figura 2) e armazenadas em formato *.bpm*. Em seguida, estas imagens foram analisadas com o software *ImageJ*, para avaliação do diâmetro folicular e oocitário e também foram contadas as células da granulosa dos folículos pré-antrais.

#### ***Análise Estatística***

Os resultados de morfometria e contagem celular foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade das variâncias pelos testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente. Posteriormente, os resultados de morfometria e contagem celular foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey. As análises foram realizadas com auxílio do Software SAEG (Euclides, 1982).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A avaliação da população folicular ovariana dos animais provenientes deste cruzamento indica a predominância (Figura 1) de folículos primordiais, que correspondem a 79,91% dos folículos presentes nestes ovários, constituindo a reserva folicular ovariana destes animais. Os demais 20,09% dos folículos correspondem aos folículos que já tiveram seu desenvolvimento ativado e os que sofreram atresia, podendo ter sofrido este processo de degeneração antes ou após a ativação (MYERS et al, 2005; FORTUNE, 2003). Os valores observados foram equivalentes aos encontrados em outros trabalhos (MYERS et al, 2005; CANNING et al, 2003; BENEDICT et al, 2000; RATTS et al, 1995) realizados com animais inbreed.

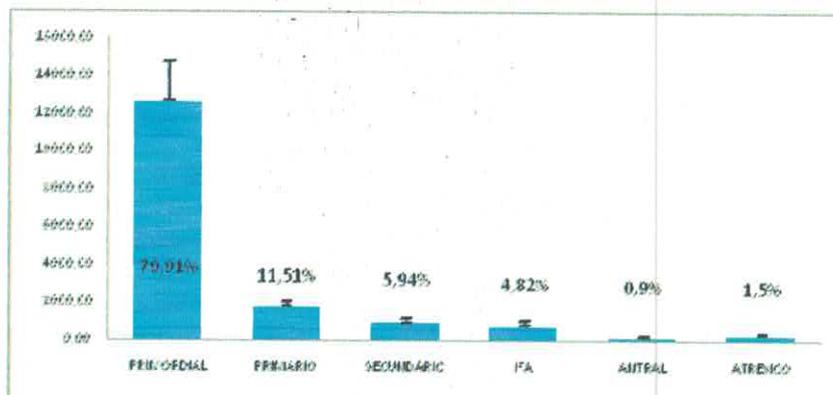


Figura 1: Média da população folicular ovariana do cruzamento outbreed, C57Bl/6 X SWISS.

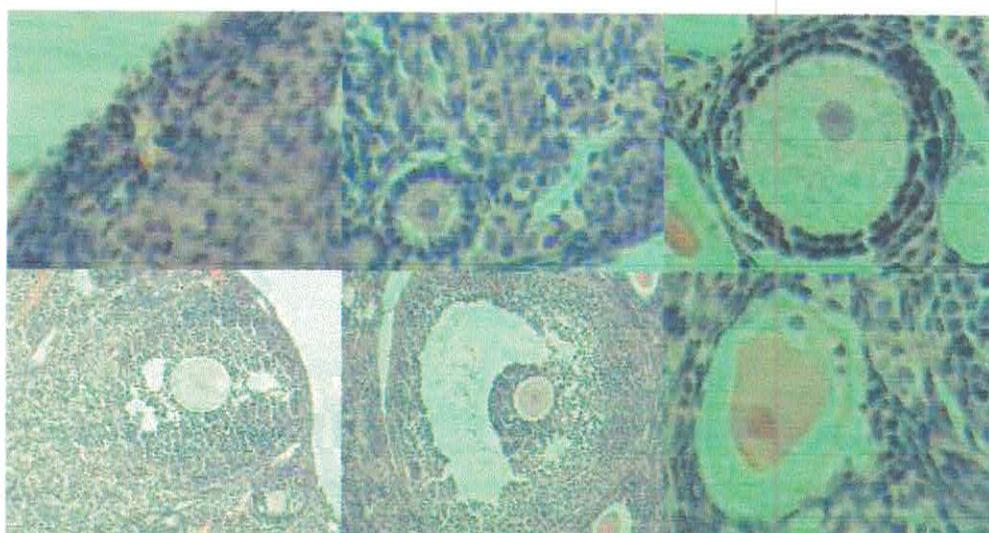


Figura 2: Folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, primordial (40X), primário (40X), secundário (40X), em início de fase antral (10X), antral (10X) e atrésico respectivamente (40X).

Com a análise morfométrica (Figura 3), foi observado que o diâmetro folicular possui grande variação, aumentando principalmente a partir dos estágios antrais, o que está relacionado à formação do antro e ao aumento do número de células da granulosa (VAN DEN HURK & ZHAO, 2004). No entanto, o diâmetro dos folículos atrésicos não possui diferença estatística dos folículos secundários ( $P < 0,05$ ). O diâmetro dos oócitos também aumentou em função do desenvolvimento folicular, fato que está relacionado a eventos como a formação da zona pelúcida e principalmente ao acúmulo de material de reserva citoplasmático que está diretamente relacionado à maturação (HEIKINHEIMO & GIBBONS, 1998). Assim como ocorrido na avaliação do diâmetro folicular, o diâmetro oocitário também não diferiu estatisticamente entre os estágios atrésicos e secundário ( $P < 0,05$ ). Desta forma, pode-se inferir que ocorre um elevado percentual de atresia em folículos secundários.

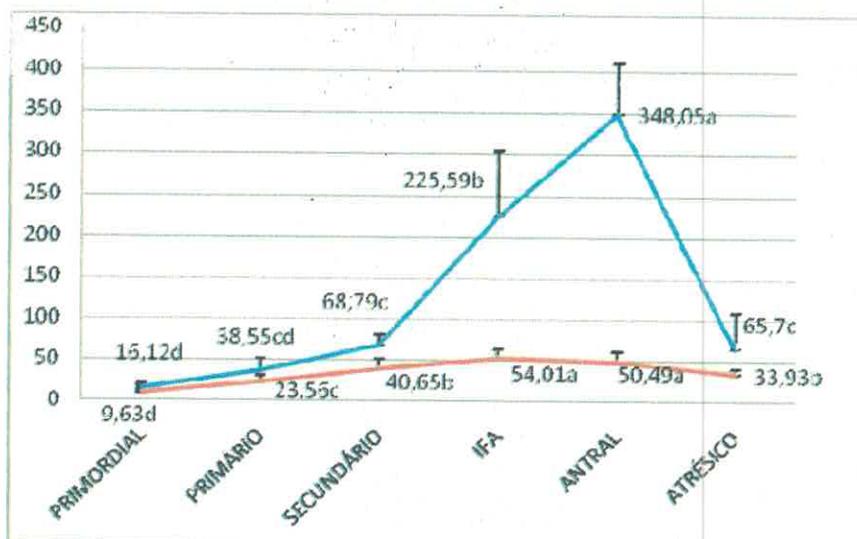


Figura 3: Diâmetro do folículo e oócito ( $\mu\text{m}$ ) nos diferentes estágios do crescimento folicular do cruzamento outbreed C57Bl/6 X Swiss.

Na avaliação do número de células da granulosa ao redor do oócito nos estágios pré-antrais (Figura 4), houve diferença entre os três estágios avaliados ( $p > 0,05$ ). Conforme citado por Fortune (2003), a mobilização dos folículos da reserva ovariana acarreta inicialmente aumento da taxa de mitoses das células da granulosa, o que está relacionado ao aumento da comunicação oócito-células somáticas, dando suporte à continuidade deste desenvolvimento folicular (EPPIG, 2001).

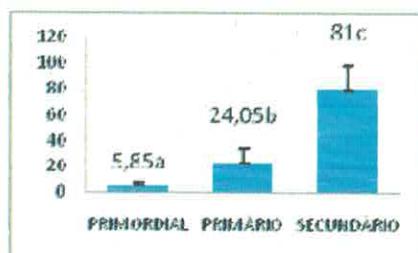


Figura 4: Número de células da granulosa envolvendo o oócito nos estágios pré-antrais.

## CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram que os animais provenientes do cruzamento outbreed possuem população folicular ovariana semelhante à de animais inbreed descritos na literatura, que o crescimento do oócito ocorre predominantemente na fase pré-antral e que o maior percentual de atresia folicular ocorre em folículos secundários.

## AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisas do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES/JF), pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENEDICT, J.C.; LIN, T.M.; LOEFFLER, I.K.; PETERSON, R.E.; FLAWS, J.A. Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicological Sciences*. v.56, p.382-388. 2000.

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

- EPPIG J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. v.122, p.829-838. 2001.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. v.78, p. 203-216. 2003.
- FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. v.78, p.135-163. 2003.
- FREMAN, B. The active migration of germ cells in the embryos of mice reproduction. v.125, p.635-632. 2003.
- HEIKINHEIMO, O.; GIBBONS, W. E. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Molecular Human Reproduction*. v.4, p.745-756. 1998.
- RATTS, V.S.; FLAWS, J.A.; KOLP, R.; SORENSON, C.M.; TILLY, J.L. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology*. v.136, p.3665-3668. 1995.
- SENEDA, M. M.; BORDIGNON, V. New concepts on folliculogenesis. *Acta Science Veterinarie*. v.35 p863-868. 2007.
- SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. *Animal Reproduction*. v.3 p.147-160. 2005.
- TILLY, J.L. Ovarian follicle counts – not as simple as 1, 2, 3. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.1, p.1-4. 2003.



A cura está na consciência de  
quem faz da Terra o seu laboratório



ANAIS  
XXXI SEMANA DE BIOLOGIA  
XIV MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA  
6 a 10 de outubro de 2008

**dacbio**

# XXXI SEMANA DE BIOLOGIA

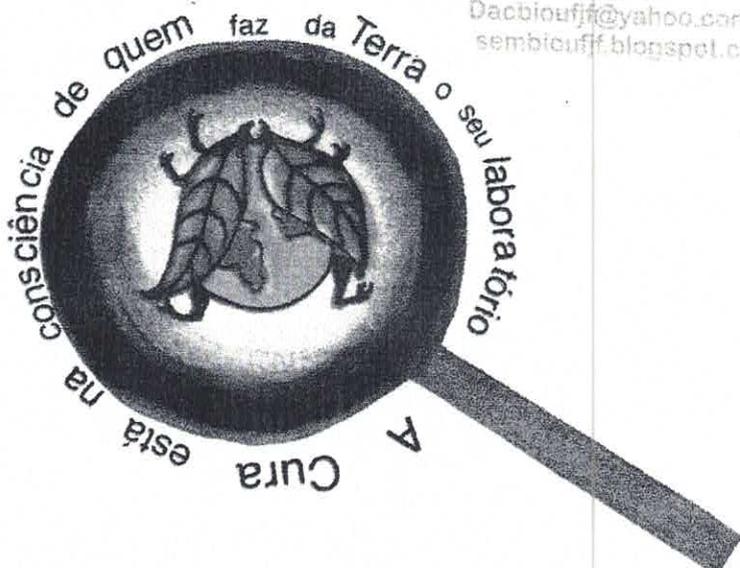
## 6 a 10 de Outubro

**Biologia e Saúde**  
*Biologia e Saúde*

Realização



Dacbioufff@yahoo.com.br  
sembiouceufff.blogspot.com



XIV Mostra de Produção Científica  
III Concurso de Fotografias Biológicas  
Mini-Cursos      Ciclo de Palestras  
Mesa Redonda      Assembléia



design gráfico: www.fineartphoto.com 014744833