

ALBA SANCHES PATELLI

ATIVIDADE CATEOLÁSICA DO OVÁRIO;
ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOQUÍMICO.

Tese apresentada ao Instituto
Central de Biologia, da Universidade
de Campinas, à obtenção
do grau de Doutor em Ciências.

CAMPINAS, 1969

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS
Biblioteca Central

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Walter August Hadler deixo aqui expressos os meus agradecimentos, pela oportunidade que me ofereceu de participar de sua equipe e especialmente pela orientação e estímulo que propiciaram a realização dêste trabalho.

Tenho a agradecer, ainda, a todos que contribuíram para que esta tese pudesse ser realizada.

ÍNDICE

	página
1 - INTRODUÇÃO.....	01
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	08
A- Material.....	08
B- Métodos.....	09
I- Determinação da atividade catalásica.....	09
II- Método histológico quantitativo.....	10
III- Métodos topoquímicos.....	11
IV- Impregnação argêntica.....	13
V- Apresentação dos resultados.....	13
3 - RESULTADOS.....	14
I- Variação da atividade catalásica do ovário da rata com a idade do animal.....	14
II- Atividade catalásica nas diferentes estruturas do ovário.....	14
III- Contrôlê hipofisário do nível da atividade catalásica do ovário.....	18
A- Ação da hipofisectomia.....	18
B- Ação de hormônios gonadotróficos coriônicos sôbre o nível da atividade catalási ca do ovário de ratas impúberes....	19
IV- Reações topoquímicas.....	20
V- Células argentófilas.....	23
VI- Gráficos.....	25
VII- Tabelas.....	27
VIII- Microfotografias.....	37

	página
4 - DISCUSSÃO.....	46
5 - CONCLUSÕES.....	52
6 - BIBLIOGRAFIA.....	54

INTRODUÇÃO

Admite-se que a biosíntese dos esteróides com atividade hormonal, no interior do ovário, se efetue através da ação de oxi-redutases. Dentre estas destacam-se a 3- β -ol-desidrogenase, 17- α -hidroxilase, 17- β -hidroxilase, 16 - α - hidroxilase, 17-desidrogenase, 20- α -hidroxisteróide-desidrogenase (RYAN, 1962; SMITH & RYAN, 1961, 1962; WIEST & col., 1964; SAVARD & col., 1965; ARMSTRONG, 1966; HELLIG & SAVARD, 1966, SHORT, 1967).

SAVARD & col. (1965) acreditam que estas enzimas ocorram em todas as glândulas produtoras de esteróides; assim, ao nível do corpo lúteo e outras glândulas produtoras de esteróides, tais como a adrenal, a glândulas intersticial do testículo e a placenta, haveria hidroxilação da cadeia lateral do colesterol, em posição 20 e 22, através da ação das hi

droxilases. Ocorreria, a seguir, clivagem da cadeia lateral do esteróide formado pela hidroxilação do colesterol, dando como composto final a pregnenolona. A oxidação da pregnenolona pelo sistema enzimico $\Delta 5-3-\beta$ -hidroxisteróide desidrogenase, coadjuvada pela ação de $\Delta 4-\Delta 5$ -isomerase, daria como produto final a progesterona.

Estas conclusões foram tiradas de resultados obtidos através de técnicas bioquímicas, cuja finalidade era estabelecer uma seqüência de etapas da esteroidogênese, compatível com a biosíntese efetuada, normalmente, nos tecidos ovarianos. Algumas etapas foram mesmo testadas, em fragmentos de órgãos. No entanto, enzimas consideradas importantes na esteroidogênese, poucas vezes puderam ser demonstradas no interior das células admitidas como aptas a efetuarem esse processo de síntese.

Diversas tentativas foram feitas com a finalidade de localizar oxi-redutases no interior das várias estruturas do ovário. As investigações com esse objetivo foram realizadas através do emprêgo de técnicas histoquímicas (MEYER & col., 1947; DEANE & col., 1962; KERN-BONTKE, 1964; TAKI & MORI, 1966) e através de técnicas bioquímicas associadas a técnicas histoquímicas (RUBIN & col., 1963).

A distribuição de oxi-redutases no interior do ovário, especialmente as desidrogenases dependentes de NADP, foi estudada em ovários de ratas e coelhas, por OKANO (1963). Estes estudos mostraram maior concentração dessas enzimas no corpo lúteo gestacional e no tecido intersticial do ovário de coelhas. Por outro lado, em animais não gestantes, as desidrogenases dependentes de NADP e a $3-\beta$ -ol-desidrogenase estavam presentes, principalmente, na teca interna folicular

(OKANO & col., 1966). Estes autores sugeriram que as enzimas oxidativas situadas nas células da granulosa do folículo ovariano estavam relacionadas com o metabolismo da glicose, enquanto que as desidrogenases das células da teca interna atuariam na biosíntese dos esteróides com atividade hormonal. Por outro lado, MAHAJAN & SAMUELS (1963), RYAN & SHORT (1965) e RYAN & col. (1968) demonstraram, através de incubação de células da granulosa e células tecais, que além das tecais, as células da granulosa também produzem hormônios esteróides.

BRANDAN & col. (1967), através de estudo histoquímico efetuado em ovários de coelhas, localizaram oxi-redutases da glicólise e do ciclo do ácido cítrico, bem como a 3- β -hidroxisteróide-desidrogenase, nas células granulosas dos folículos; além disso, obtiveram evidências de que, durante a formação do corpo lúteo, as células luteínicas estão aptas para a produção de progesterona, 8 horas após a ovulação.

Estes resultados, não obstante assinalarem algumas enzimas oxidativas em estruturas ovarianas, apenas sugerem interrelação entre as enzimas evidenciadas e a esteroidogênese, porém, não afastam a hipótese de que outras oxi-redutases possam colaborar nesse processo de síntese.

Dentre as oxi-redutases, as catalases foram assinaladas no ovário por HADLER & col. (1968a). No entanto, a correlação entre as catalases e os sistemas enzimáticos de oxi-redução, presentes no ovário, ainda não foi investigada.

As catalases são encontradas em diversos tecidos animais, onde se apresentam com variações quanto ao nível de atividade. KRUGER (1928), demonstrou, trabalhando com

sangue de gatos, que a atividade catalásica varia em relação à idade do animal, sendo mais intensa nos animais jovens.

A atividade catalásica varia nos diferentes órgãos de uma mesma espécie animal, independentemente da quantidade de sangue contido nos mesmos (BELKINA & col., 1927; HADLER & col., 1967a). BELKINA & col. (1927) demonstraram, em coelhos, que a intensidade da atividade catalásica apresenta-se na seguinte ordem decrescente: sangue, rim, baço, pulmão, coração, cérebro e músculo. A atividade catalásica foi demonstrada, também, em células prostáticas, por SCHIRMER & col., (1964).

A cortical da adrenal de vários mamíferos (rato, cobaio, cão, gato, coelho) apresenta atividade catalásica, que varia, em intensidade, com a espécie animal, na seguinte ordem decrescente: cobaio, cão, gato, coelho e rato; varia, ainda, com o sexo, sendo mais intensa no masculino (HADLER & col., 1966).

Topograficamente, o nível de atividade catalásica da córtex da adrenal do cobaio e do rato aumenta, progressivamente, desde a zona glomerular até as porções mais profundas da zona reticular; a medular da adrenal não demonstra atividade catalásica (HADLER & col., 1967b).

Com base no coeficiente de regressão do nível de atividade catalásica, em função do tempo de fixação de adrenais fixadas em solução de formalina a 15%, a 4°C, conseguiu-se determinar duas atividades catalásicas diferentes, na cortical da adrenal; uma menos resistente à ação desnaturante da formalina, inativada em 8 dias, e outra, mais resistente, que se conserva ativa até o 64º dia (HADLER & col., 1967c).

Apesar de se conhecer relativamente bem, bioquimicamente, as catalases, as quais são facilmente isoladas e cristalizadas a partir de diversos tecidos animais (fígado de boi, SUMNER & DOUNCE, 1937; fígado de cavalo, DOUNCE & FRAMPTON, 1939; eritrócitos de boi, LAKOWSKI & SUMNER, 1941; fígado de carneiro e de boi, DOUNCE, 1942; fígado humano e rim de cavalo, BONNICHSEN, 1947a; eritrócitos e fígado de cavalo, BONNICHSEN, 1947 b; eritrócitos humanos, HERBERT & PINSENT, 1948 a; tecidos vegetais, HERBERT & PINSENT, 1948b, GALSTON & col., 1951), o seu papel nos fenômenos biológicos ainda é motivo de discussão. Supõe-se que as catalases teriam função de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio nos tecidos, formados por ação de desidrogenases aeróbias (BELL & col., 1963; GRAS, 1964; LAGUNA, 1967). No entanto, alguns resultados experimentais sugerem que as catalases poderiam desempenhar outras funções.

HADLER & col. (1966, 1967 d) mostraram que o nível de atividade catalásica da adrenal é influenciada pelo sexo do animal, pela idade e pela administração de alguns hormônios, o que revela estar a biosíntese destas enzimas, nesta glândula, sob controle hormonal, especialmente hipofisário (HADLER & col., 1968 b). Estes resultados sugerem que as catalases, presentes na suprarrenal, estejam relacionadas com a atividade funcional desta glândula, ou seja, com a atividade de secretora específica da cortical da adrenal.

A analogia quanto à origem embriológica (WITSHI, 1951) e quanto à estrutura química dos produtos de secreção, dotados de atividade hormonal, entre a cortical da adrenal e o ovário, sugeriu que também neste último órgão poder~~ia~~ haver correlação entre as catalases e a atividade funcional do ór-

gão. A esse respeito, HADLER & col. (1968 a), mostraram, em ovários de diversas espécies de mamíferos (rato, cobaio, coelho, porco e boi), a presença da atividade catalásica; mostraram, além disso, que em ovários de ratas a atividade catalásica aumenta progressivamente com a idade, desde o 30º até o 90º dia, quanto atinge níveis comparáveis com os do animal adulto. Estes resultados revelam que a atividade catalásica é mais elevada após a puberdade. Neste mesmo trabalho foi verificado, através da determinação da atividade catalásica em diversas estruturas do ovário, que essa atividade é maior nos folículos semi-maduros do que nos maduros; o corpo lúteo apresenta atividade catalásica maior que os folículos. Estes resultados sugerem que o nível de atividade catalásica, no ovário, é mais elevada nas estruturas dotadas de maior atividade funcional, as quais possuem capacidade de sintetizar hormônios esteróides.

De acordo com os resultados assinalados, aventou-se a hipótese de que as catalases estariam correlacionadas com a atividade funcional, ou secretora do ovário. Assim como outras enzimas oxi-redutoras, as catalases poderiam atuar, direta ou indiretamente, na biosíntese dos esteróides com atividade hormonal. Com o objetivo de testar esta hipótese, procurou-se correlacionar a atividade catalásica verificada nas diferentes estruturas do ovário, com a presença de substâncias passíveis de demonstração topoquímica e que estão implicadas na biosíntese dos esteróides do ovário. Dentre estas, salienta-se o colesterol. Com o intuito de melhor verificar essa correlação, foram empregadas condições que influem sobre o nível da atividade catalásica do ovário.

Além disso, com a finalidade de localizar a ati-

vidade catalásica nas diferentes estruturas do ovário, foi empregada uma técnica topoquímica que, a êsse respeito, oferece vantagens em relação à técnica empregada em trabalho anterior (HADLER & col., 1968 a).

MATERIAL E MÉTODOS

A- MATERIAL

Foram utilizados ovários de 70 ratas (Rattus norvergicus, variedade Wistar), de 12 vacas (Bos taurus) e de 10 porcas (Sus scrofa domesticus).

Os ovários de rata foram retirados, após a anestesia do animal com éter, pesados e fixados. Os ovários de vaca e de porca foram colhidos, logo após a sangria do animal, em matadouro, e conservados em gelo, durante o transporte. Este material foi dissecado com a finalidade de isolar os corpos lúteos, folículos e estroma; cada estrutura isolada foi, em seguida, pesada e fixada.

Como fixador utilizou-se solução de formalina a 15%, adicionada de 3 g% de cloreto de cálcio anidro.

Do material proveniente de ratas, um dos ovários foi fixado durante 24 h a 4°C, lavado durante 1 hora, em água corrente e triturado. Após esse preparo, foi determinada

a atividade catalásica. O outro ovário, após fixação, foi lavado, desidratado e incluído em parafina, conforme técnica de rotina e cortado em série. Outras vezes, o ovário foi cortado por congelação, permitindo o emprêgo de algumas técnicas histoquímicas.

Em ovários provenientes de porcas e vacas, procedeu-se da seguinte maneira: as estruturas isoladas (corpo lúteo, folículo e estroma) de ovários de porca e de vaca foram divididos em 2 partes: uma delas foi pesada, fixada durante 24 horas, a 4°C, depois lavada, durante 1 hora, em água corrente, triturada e, em seguida, foi determinada sua atividade catalásica. A outra parte, foi conservada em fixador e submetida a cortes de congelação.

B- MÉTODO

I- Determinação da atividade catalásica:

O ovário total (ratas), ou as estruturas isoladas (porcas e vacas), após terem sido pesados, fixados e triturados, foram incubados em solução M de peróxido de hidrogênio, em pH 7,2, durante 60 minutos, à temperatura ambiente. O volume de oxigênio desprendido, medido manométricamente, foi relacionado com o peso do tecido fresco, sendo o resultado expresso em mm^3 de oxigênio/mg de tecido.

A determinação da atividade catalásica foi efetuada nos seguintes grupos de animais: 1ª) lotes de ratas normais com 30, 60, 90 e 120 dias, contendo os lotes 10 animais

para cada idade; 2º) um lote de 5 ratas adultas hipofisectomizadas, segundo técnica de SMITH (1930), sacrificadas 10 dias após a operação e um lote controle de 5 animais, nos quais se efetuou operação fictícia; 3º) um lote de 10 ratas com 60 dias de idade, injetadas, por via sub-cutânea, com 3 doses de 20 U.I. de gonadotrofina coriônica (PMS)* e sacrificadas no 4º dia após a 1ª injeção, além de 10 animais controle injetados com solução isotônica de NaCl; 4º) corpos lúteos, folículos e estroma de ovários de vaca em gestação (12 animais); 5º) corpos lúteos, folículos e estroma de ovários de porca em gestação e normal (10 animais).

A dosagem da atividade catalásica, dos folículos dos ovários de porca e de vaca, foi efetuada após o isolamento destas estruturas, as quais uma vez isoladas, foram classificadas em dois grupos: o primeiro englobava folículos cujo diâmetro era menor que 5 mm (folículos menos maduros) e o outro continha folículos com diâmetro maior que 5 mm.

II- Método histológico quantitativo: avaliação das proporções de corpo lúteo, folículo, estroma e diâmetro médio dos folículos em ovário de ratas.

Cortes seriados de ovários de ratas, com 8 μ de espessura, foram corados pela HE. A área total do ovário, bem como a correspondente aos folículos e ao corpo lúteo, foram estimadas, após projeção das imagens microscópicas, ampliadas 45X, em uma tela e desenhadas em papel transparente. As áreas desenhadas foram medidas com auxílio de planímetro. A área correspondente ao estroma foi obtida por diferença entre a área total e o resultado da soma das áreas dos folículos, ou dos folículos mais as dos corpos lúteos, nos cortes em que es

* PMS- hormônio registrado sob a denominação de "Matureon do laboratório"Organon"

tes estavam presentes.

A estimação das áreas médias foi feita da seguinte maneira: 1º) dos cortes em série foram desprezados os 10 primeiros e os 10 últimos; 2º) dos cortes restantes as áreas foram determinadas para 1 corte em cada 5, dando um total de, aproximadamente, 15 cortes em que as medidas foram efetuadas; 3º) as proporções médias foram estimadas através das médias obtidas nos cortes medidos.

A avaliação do diâmetro médio dos folículos de o vários de ratas foi efetuada projetando-se os cortes em tela com aumento de 134X. Foram medidos, por meio de régua milimetrada, o diâmetro maior e o menor de cada folículo, nos quais o ovócito estava presente. Considerou-se como diâmetro do fo lículo, a raiz quadrada do produto dos dois diâmetros de cada folículo.

Essas medidas foram feitas em ovários de 5 animais para cada um dos 8 lotes cuja atividade catalásica foi determinada.

III-Métodos topoquímicos

1- Demonstração da presença de lípidos - Com a finalidade de demonstrar lípidos, nas diversas estruturas do ovário, foi utilizada a coloração pelo Sudan negro (LISON, 1960).

2- Evidenciação do colesterol e compostos afins-

a) coloração pelo azul de toluidina, ou pela aldeído-fucsina, segundo técnica de HADLER & col. (1965a; b; 1968c). Os cortes foram tratados por solução de azul de toluidina, ou de aldeído-fucsina, em pH 0,5, após oxidação por KMnO_4 , em meio ácido.

b) Reação de Liebermann-Burchardt, segundo SCHULTZ (1924).

3- Tratamento pelo reativo de Schiff- Para a evidência de grupos redutores usou-se: tratamento pelo reativo de Schiff, durante 10 minutos, seguidos de 3 banhos em solução de bissulfito de sódio, a 0,5% (3 minutos cada banho).

Em alguns casos o reativo de Schiff foi utilizado após prévio tratamento por:

a) mistura em partes iguais de metanol-clorofórmio, durante 24 horas, a 40°C;

b) solução de desoxicolato de sódio a 2%, durante 24 horas, a 40°C;

c) solução de desoxicolato de sódio a 2%, durante 24 horas a 40°C, seguido por mistura de metanol-clorofórmio, também durante 24 horas, a 40°C.

4- Reação do PAS - Efetuada segundo MCMANNUS (1946), modificada por HOTCHKISS (1948).

5- Evidenciação de íon de Fe^{+++} - Com a finalidade de demonstrar a presença de íon Fe^{+++} usou-se a reação do azul da Prússia, segundo técnica modificada por HADLER & col. (1965c).

6- Demonstração de catalases - Para evidenciar catalases foi usada reação estabelecida no Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas e previamente testada em modelos de papel de filtro (HADLER & col. 1969). Com esta finalidade, cortes de congelção foram tratados por solução saturada de sulfato de amônio, durante 5 minutos e, em seguida, colocados em mistura em partes iguais de solução alcoólica a 1% de benzidina e solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 80%, durante 2 a

3 minutos. A catalase aparece como grânulos corados em azul. Esta reação revela, simultâneamente, catalase e ferro hêmico. A distinção se faz através do aquecimento a 85°C, durante 1 hora sendo a catalase termolábil.

7- Ferro hêmico - A demonstração de ferro hêmico foi efetuada pela mesma técnica anterior, porém, em cortes prèviamente aquecidos a 85°C, durante 1 hora. A comparação dos resultados obtidos em cortes não tratados pelo aquecimento e em cortes prèviamente aquecidos, permitiu avaliar a reatividade correspondente à catalase e ao ferro hêmico.

IV- Impregnação argêntica

A impregnação argêntica foi feita com solução de argento-diamina, segundo técnica de RIO HORTEGA (1919), modificada por HADLER (1962). Esta técnica consiste em mergulhar os cortes em solução de composto de argento-diamina, durante 8 segundos e, em seguida, reduzir em solução de formalina a 3%.

V- Apresentação dos resultados

A apresentação dos resultados foi feita determinando-se as médias dos valores obtidos e o desvio padrão das mesmas. Não obstante, os dados numéricos foram sempre analisados através de análise de variância, estabelecendo-se 0,05 como nível de significância.

RESULTADOS

I- Variação da atividade catalásica do ovário da rata com a idade do animal

Os ovários dos animais pertencentes aos diferentes grupos etários estudados apresentam diferenças quanto ao nível de atividade catalásica. Há aumento significativo dessa atividade a partir do 30º até 120º dia (Gráfico I e tabela 1).

II- Atividade catalásica nas diferentes estruturas do ovário

O nível da atividade catalásica, nas diferentes estruturas do ovário, foi averiguado tanto em ratas quanto em vacas e porcas.

Em ovário de ratas, devido a dificuldades técni-

cas inerentes às dimensões da glândula, tentou-se estabelecer a correlação entre o nível da atividade catalásica e as diversas estruturas ovarianas, indiretamente. Com esta finalidade, cortes histológicos de ovários de ratas com idades compreendidas entre 30 e 120 dias foram planimetrados, permitindo, dessa maneira, o cálculo da área média relativa correspondente aos folículos, ao estroma e aos corpos lúteos. Para tanto, tomou-se como parâmetro das variações quantitativas das estruturas ovarianas a relação entre a área da respectiva estrutura e a área total do ovário (ver gráfico II e tabela 2). Com isto, tentou-se diminuir o erro proveniente do aumento do volume total do ovário, que ocorre com o aumento da idade.

A comparação entre os valores das respectivas áreas, nas diferentes idades, e o nível da atividade catalásica, nessas mesmas idades, permitiu correlacionar êsses dois fatores. Conforme revela o gráfico II, há ausência de correlação entre o nível da atividade catalásica e os valores da relação F/AT . Nêsse mesmo gráfico, os resultados referentes aos corpos lúteos foram apresentados em conjunto com os do estroma. Esta forma de apresentação justifica-se pelo seguinte: 1º) os corpos lúteos ocorrem somente a partir do 90º dia; 2º) funcionalmente, o tecido intersticial do estroma ovariano da rata (glândula intersticial) se assemelha aos corpos lúteos (PFEIFFER & HOOKER, 1942; RENNELS, 1951; CLASESSON, 1954; DE GROODT LASSED, 1963; GURAYA & GREENWALD, 1964).

Os resultados do gráfico II mostram que o aumento do nível da atividade catalásica é, aparentemente, paralelo à relação estroma/área total, a partir do 45º dia de vida, sendo inversamente proporcional à relação área folicular/área

total. Estes resultados revelam que o nível da atividade catalásica, após o 45º dia de vida, está correlacionado com o estroma e corpos lúteos, sendo tanto mais elevado quanto maior é a área relativa correspondente a estas estruturas. Estes resultados sugerem que as catalases ocorram, principalmente, no estroma e nos corpos lúteos, após o 45º dia de vida. No 30º dia de vida há discrepância entre o nível da atividade catalásica e a área relativa do estroma do ovário, sugerindo que os folículos, cuja área relativa é elevada nessa idade, sejam responsáveis pela discrepância. Se assim fôsse, as catalases ocorreriam também nos folículos.

Com a finalidade de relacionar o nível da atividade catalásica do ovário com os folículos, foi usado outro método, uma vez que o anterior não se mostrou adequado.

Em ovários de rata, com idades compreendidas entre 30 e 90 dias, efetuou-se a medida do diâmetro dos folículos, sendo os mesmos classificados em 3 tipos, de acordo com o seu diâmetro (ver gráfico III); o tipo I compreende folículos com diâmetro até 125 μ ; o tipo II com diâmetro entre 125 e 250 μ e o tipo III com diâmetro maior que 250 μ . O diâmetro médio dos folículos, estimado através desta técnica, foi correlacionado com o nível da atividade catalásica do ovário. Conforme mostram o gráfico IV e a tabela 3, o diâmetro médio dos folículos aumenta até o 120º dia, o que ocorre também com o nível da atividade catalásica. Estes resultados sugerem correlação entre o grau de maturidade dos folículos (diâmetro) e o nível da atividade catalásica do ovário.

No que se refere à relação entre o nível da atividade catalásica do ovário e os folículos, os resultados obtidos pelos dois métodos são aparentemente contraditórios. Esta aparente contradição pode ser explicada admitindo-se que a atividade catalásica do ovário dependa, primordialmente, do estroma e dos corpos lúteos. Nestas circunstâncias, a corre-

lação entre o nível da atividade catalásica e os folículos se apresentaria mascarada pelo efeito predominante das duas outras estruturas. No entanto, não pode ser afastada a hipótese de que a relação entre o diâmetro médio dos folículos e o nível da atividade catalásica seja apenas aparente, uma vez que o diâmetro médio folicular é maior nos animais com 90 e 120 dias, nos quais a proporção de estroma-corpos lúteos é também maior.

Por outro lado, considerando-se que no gráfico IV as duas linhas (atividade catalásica e diâmetro médio dos folículos) se cruzam, pode-se supor que os folículos jovens exerçam maior atividade, no que se refere a produção de catalases, que os folículos de maiores dimensões.

Com o objetivo de esclarecer estes pontos duvidosos, foram utilizados ovários de porcas e vacas.

Nessas duas espécies animais foi possível determinar o nível da atividade catalásica em folículos, corpos lúteos e estroma, isolados (tabelas 4 e 5). Os resultados assim obtidos revelam que a atividade catalásica/mg de tecido, nos folículos, é menor nos de maiores dimensões (diâmetro maior que 5 mm) do que nos menores (diâmetro menor que 5 mm), mostrando que, à medida que o folículo amadurece, diminui o nível da atividade catalásica.

O nível da atividade catalásica do corpo lúteo e do estroma é bem maior que o dos folículos, conforme mostram as tabelas 4 e 5. No corpo lúteo a atividade catalásica atinge o nível máximo, especialmente, no gestacional.

Em síntese, a relação entre o nível da atividade catalásica e as estruturas do ovário, nas espécies animais estudadas, é a seguinte: 1º) é mais elevada no corpo lúteo, prin

principalmente quando se apresenta em intensa atividade funcional (corpo lúteo gravídico). 2º) atinge valores médios no estroma. 3º) é mais baixo nos folículos, principalmente quando ocorre hipertrofia folicular, com acúmulo de líquido (maturação folicular).

III- Contrôle hipofisário do nível da atividade catalásica do ovário

A- Ação da hipofisectomia - Os ovários de ratas submetidas à hipofisectomia apresentam, no 10º dia após a operação, diminuição acentuada do peso, quando comparados com os de animais contrôles (tabela 6). A tabela 7 mostra que o nível da atividade catalásica do ovário diminui significativamente nos ratos hipofisectomizados. Os dados contidos na tabela 8 sugerem que a redução da atividade catalásica decorra, principalmente, da grande diminuição da área correspondente aos corpos lúteos, uma vez que a relação F/AT não é influenciada pela hipofisectomia e a relação E/AT aumenta, nessas condições. Cortes histológicos de ovários de ratas hipofisectomizadas, corados pela HE, mostram atrofia do órgão, com diminuição acentuada do tamanho dos folículos, bem como atrofia quase completa dos corpos lúteos (ver fotos nºs 1 e 2). No estroma se observa desaparecimento da glândula intersticial e aumento relativo do tecido conjuntivo. Não obstante a redução quase total dos corpos lúteos e da glândula intersticial, a atividade catalásica, nos ovários das ratas hipofisectomizadas, apresenta níveis correspondentes a, aproximadamente, metade dos animais contrôles; esses níveis devem corresponder à atividade catalásica dos folículos, os quais, apesar de pequenos, estão presentes. Aliás, os dados referentes à atividade ca-

talásica dos ovários de ratas hipofisectomizadas são comparáveis aos de animais normais com 30 dias de idade, cujo aspecto histológico é também semelhante.

Estes resultados revelam que a hipofisectomia atua sobre o nível da atividade catalásica do ovário, diminuindo-o.

B- Ação de hormônios gonadotróficos coriônicos sobre o nível da atividade catalásica do ovário de ratas impúberes. - Ratas com 60 dias de idade, injetadas com a preparação de hormônio gonadotrófico empregada, apresentam aumento de peso do ovário, quando comparadas com animais controles (tabela 10).

O ovário das ratas injetadas, histologicamente, apresenta acentuada hipertrofia, com aumento do tamanho dos folículos, e grande desenvolvimento da glândula intersticial, quando comparados com o de ratas controles. Além disso, no ovário das ratas injetadas com hormônio gonadotrófico aparecem corpos lúteos (tabela 11).

O nível da atividade catalásica, nos animais injetados, mostra-se mais elevado do que nos animais controles (tabela 12).

De acordo com os dados da tabela 13, a elevação do nível da atividade catalásica não decorre da hipertrofia folicular, uma vez que a relação F/AT diminui nos animais injetados, mas depende do aparecimento dos corpos lúteos e da hipertrofia do estroma.

Os resultados obtidos confirmam a ação da hipófi se sobre o nível da atividade catalásica do ovário, revelando, como era esperado, que a ação dessa glândula se efetue através das gonadotrofinas.

IV- Reações topoquímicas

As reações topoquímicas foram efetuadas com a finalidade de localizar a atividade catalásica nas diversas estruturas ovarianas e, além disso, de tentar correlacionar essa atividade com processos metabólicos vários.

Para evidenciar, topoquimicamente, a atividade catalásica foi necessário desenvolver uma reação eficaz, porquanto, até agora não havia sido preconizada uma técnica eficiente com êsse objetivo (LISON, 1960; PEARSE, 1961; BARKA, 1963). A referida reação, quando empregada em ovários de ratas e porcas, com menos de 24 h de fixação e cortados por congelamento, revela a presença de atividade catalásica na teca interna e na camada granulosa dos folículos, no corpo lúteo e na glândula intersticial, no caso da rata. A reação é mais intensa nos corpos lúteos que nas outras estruturas (fotos 3 e 4), sendo a intensidade mais elevada nos corpos lúteos gestacionais. Por outro lado, a reação é mais fraca nos folículos semi-maduros que nos jovens.

Esses resultados confirmam os obtidos através da dosagem da atividade catalásica, em cortes ou em fragmentos de ovário.

Nas mesmas estruturas que apresentam atividade catalásica verifica-se a presença de lípides, colesterol, ferro ionizável e ferro hêmico. As reações topoquímicas utilizadas para evidenciar as substâncias acima referidas foram efetuadas em ovários procedentes de ratas com idade de 60, 90 e 120 dias, bem como procedentes de ratas impúberes injetadas com hormônio gonadotrófico.

Verifica-se a presença de material sudanófilo nos folículos (teca interna e granulosa), nos corpos lúteos (fo-

tos 5 e 6) e na glândula intersticial do ovário de ratas (fotos 7 e 8 e tabela 14). O material sudanófilo se apresenta em maior quantidade nos animais de idade adulta, quando comparados com os mais jovens; aumenta nos injetados com hormônio gonadotrófico, quando comparados com os controles. Em ovários de porca e de vaca o material sudanófilo é encontrado na granulosa e na teca interna dos folículos, e nos corpos lúteos; nos animais gestantes há aumento da sudanofilia os corpos lúteos (fotos 9, 10, 11; tabela 15).

O tratamento pelo reativo de Schiff mostra, em o vários de rata, reatividade dos folículos, corpos lúteos e da glândula intersticial (tabela 14). A reatividade é mais intensa na camada granulosa e na glândula intersticial do que no corpo lúteo; nêstes são observadas células dispersas, com reação fortemente positiva (foto 12). Essa mesma tabela mostra que nas estruturas ovarianas não há diferenças apreciáveis de resultados nas diversas idades, exceto a glândula intersticial que, nos animais adultos e nos injetados com hormônios gonadotróficos, apresenta-se mais reativa. Em ovários de porca e vaca o material Schiff positivo está presente nos corpos lúteos e nos folículos (teca interna e granulosa). (tabela 15). Quando o reativo de Schiff é empregado após o tratamento com solução de desoxicolato de sódio a 2% há forte diminuição da reatividade do corpo lúteo e da camada granulosa dos folículos (tabela 16). O tratamento prévio por mistura metanol-clorofórmio, em partes iguais, faz com que a reatividade ao reativo de Schiff seja menor do que quando o pré-tratamento é efetuado pelo desoxicolato de sódio. Os cortes tratados por desoxicolato de sódio, seguido de metanol e clorofórmio, apresentam reatividade ao reativo de Schiff comparável à obtida quando o tratamento é efetuado pe -

la mistura metanol-clorofórmio. Estes resultados sugerem que a reatividade ao reativo de Schiff seja devida, principalmente, à presença de lípidos com propriedades redutoras.

A reação do PAS mostra resultados semelhantes aos obtidos com o emprego do reativo de Schiff* (fotos 13, 14 e 15). As substâncias que, aparentemente, são PAS positivas, na realidade são Schiff positivas. Fazem excessão algumas estruturas do ovócito e depósitos de material de cor parda, situado no tecido intersticial. Essas estruturas, são PAS positivas.

O colesterol, revelado através da coloração pela aldeído fucsina, ou pelo azul de toluidina, após oxidação pelo permanganato de potássio, em meio ácido, e da reação de Schultz, está presente nos folículos (granulosa e teca interna) e nos corpos lúteos, bem como na glândula intersticial do ovário da rata (foto 16; tabela 18). Nesta espécie, verifica-se reação mais intensa nos corpos lúteos que nas outras estruturas (fotos 17 e 18). Na teca interna as reações são intensas nos animais de idade adulta bem como nos injetados com hormônios gonadotróficos (foto 19; tabela 18). Em ovários de vaca e de porca gestantes e não gestantes, as reações são intensas no corpo lúteo (foto 20 e 21) e na teca interna dos folículos. No estroma apenas algumas células esparsas apresentam reação fortemente positiva (foto 22; tabela 15).

A reação do azul da Prússia, em ovários de rata, demonstra a presença de ferro ionizável distribuído na glândula intersticial e teca interna folicular (foto 23), em ovários de vaca e de porca é encontrado na teca interna folicular. No corpo lúteo, tanto em ovários de rata como de porca e de vaca, o ferro ionizável se distribui diferentemente, de acordo com a fase de evolução em que esse corpo se encon-

* Ver tabelas 14, 15 e 17.

tra. Logo após a ovulação, devido a hemorragia que então ocorre, o ferro originário da hemoglobina aparece na porção mais central do corpo lúteo em formação. No corpo lúteo já constituído, nas três espécies animais estudadas, o ferro ionizável se distribui diferentemente, de acordo com o período de evolução em que esse corpo se encontra. No período de estado o ferro se dispõe na porção periférica do corpo lúteo, ou seja, nas células luteínicas mais periféricas; as outras células luteínicas não apresentam Fe^{+++} demonstrável histoquimicamente. Quando o corpo lúteo entre em fase de involução, o Fe ionizável se situa na porção mais central do corpo lúteo, onde são mais numerosas as células luteínicas em degeneração. Nos folículos atrésicos o ferro está presente apenas na porção mais central.

Observa-se ferro hêmico em células esparsas do estroma, que se apresentam em pequenos grupos; além disso, também ocorre nas células da granulosa dos folículos e no corpo lúteo, onde se distribui esparsamente, mas está situado no citoplasma das células luteínicas. Deve ser anotado, que a julgar pela intensidade da reação, é pequena a quantidade de ferro hêmico nas estruturas citadas, uma vez que reagem bem menos intensamente que os glóbulos vermelhos. No entanto, foi possível verificar que o corpo lúteo gestacional reage mais intensamente que as outras estruturas.

V- Células argentófilas

Células argentófilas ocorrem nos folículos (tecas), nos corpos lúteos e no estroma.

As células argentófilas da teca interna do ovário de vaca e porca apresentam corpo alongado, ou irregular, com

inúmeros prolongamentos; dispõem-se de maneira a formar um retículo contínuo, distribuído no interior da teca (foto 24). No corpo lúteo, a morfologia das células argentófilas é semelhante à da teca interna, porém o retículo é descontínuo e as células argentófilas encontram-se distribuídas entre as células luteínicas (fotos 25, 26 e 27). Esta distribuição das células argentófilas acompanha a distribuição dos capilares e varia com a fase de evolução do corpo lúteo. Assim, nos corpos lúteos recém formados, localizam-se junto aos capilares e estão bem desenvolvidas nas porções centrais e daí se prolongam para o interior do mesmo. Nas fases involutivas, as células argentófilas apresentam grande desenvolvimento no interior do corpo lúteo, sendo mais numerosas e volumosas nas porções centrais. No corpo lúteo em franca regressão as células argentófilas apresentam-se triangulares, ou alongadas, com poucas e curtas ramificações e estão localizadas, principalmente, na porção mais central da estrutura. A localização destas células coincide com a região onde é mais abundante o ferro ionizável, demonstrado histoquimicamente.

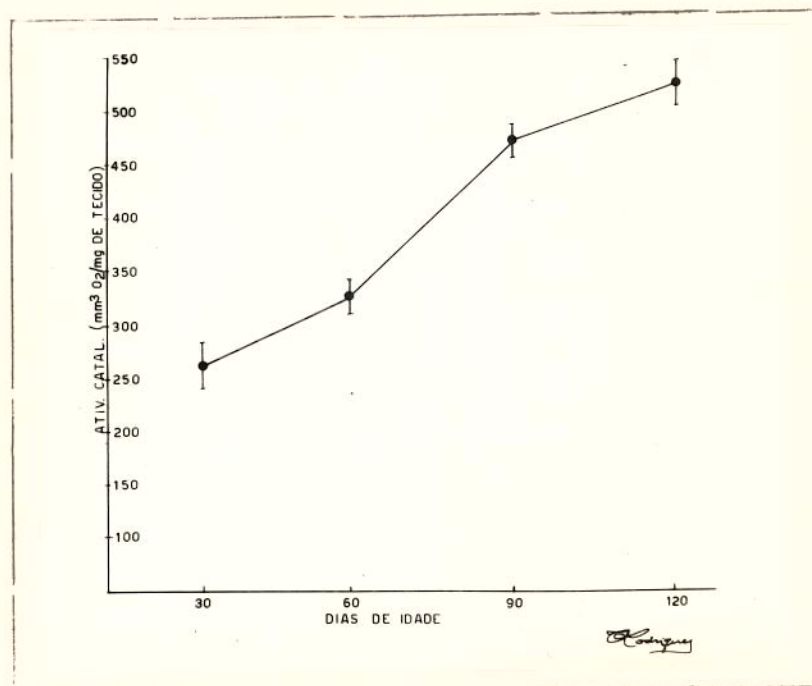


Gráfico I - Atividade catalásica de ovários de ratas de diferentes idades.

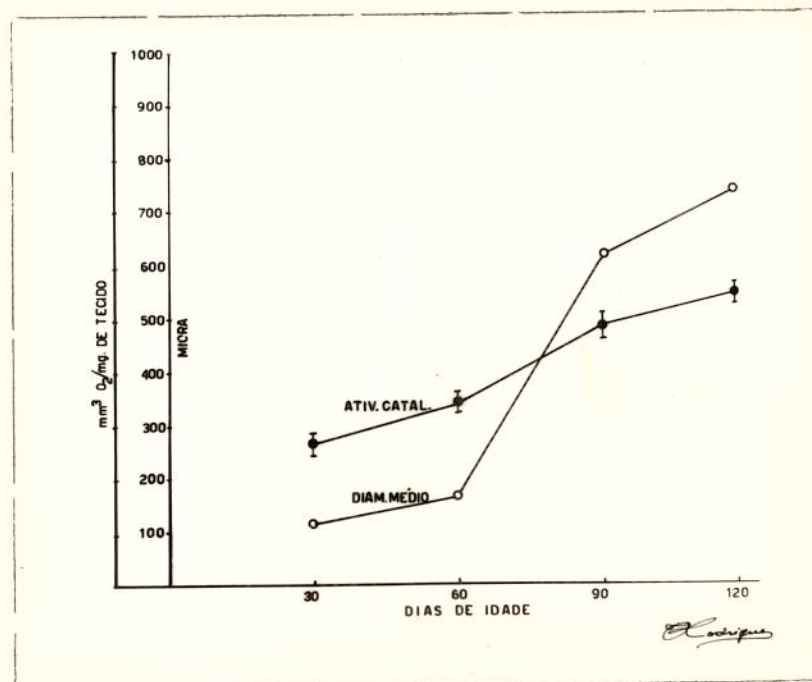


Gráfico II - Comparação entre a atividade catalásica (mm^3 de O_2/mg de tecido) de ovários de ratas de diferentes idades com as relações: estroma/área total e folículo/área total.

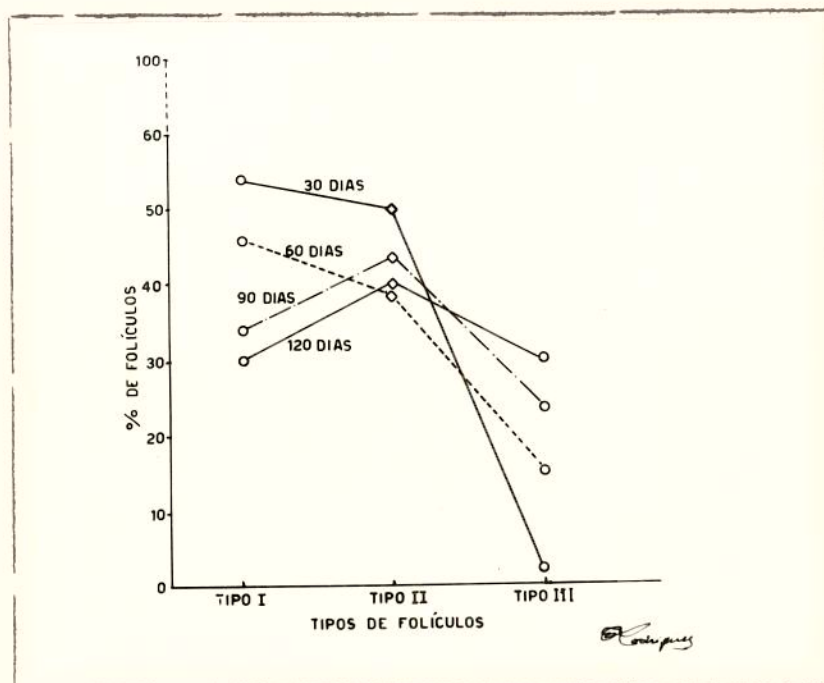


Gráfico III-Percentagem dos diferentes tipos de folículos determinadas em ovários de ratas de diferentes idades. Média de 5 animais para cada grupo etário.

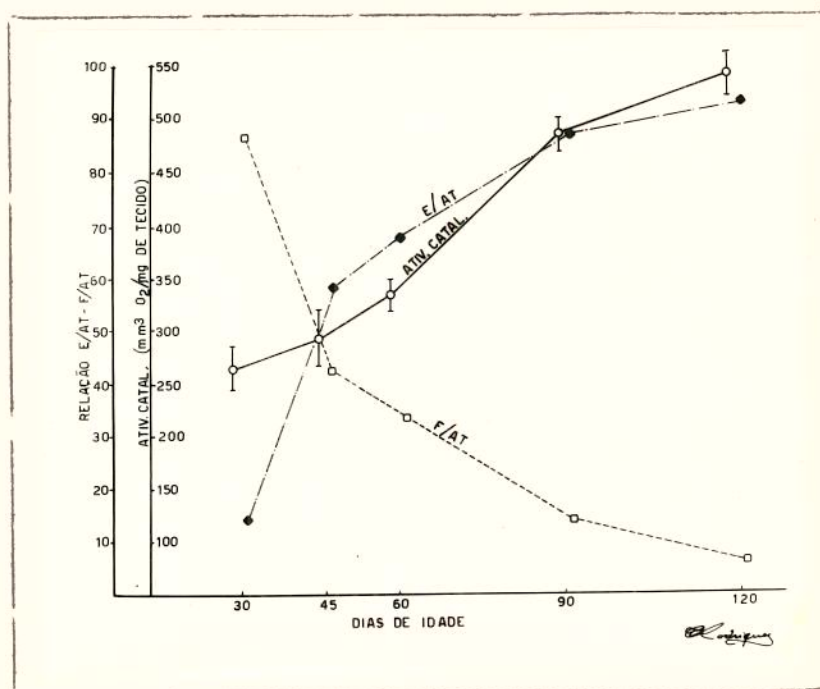


Gráfico IV-Comparação entre o diâmetro médio dos folículos (média de 5 animais) e a atividade catalásica expressa em mm³ O₂/mg de tecido (média de 10 animais); ovários de ratas com diferentes idades.

TABELA 1

Variação da atividade catalásica de ovários de ratas, em função da idade. Os valores da tabela correspondem a média e seu respectivo desvio padrão, expressos em $\text{mm}^3 \text{O}_2/\text{mg}$ de tecido, determinados em 10 animais diferentes para cada idade.

Idade do animal			
30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
266,6 $\pm$ 18,8	333,4 $\pm$ 13,2	484,8 $\pm$ 21,9	542,7 $\pm$ 22,3

TABELA 2

Relação F/AT e CL + E/AT determinada em ovários de ratas de diferentes idades. Os valores da tabela correspondem a média de 5 animais para cada grupo etário.

Idade do animal					
Relação	30 dias	45 dias	60 dias	90 dias	120 dias
F/AT	86,69	42,32	32,58	12,95	6,68
CL + E/AT	13,31	58,72	67,42	87,05	93,32

F/AT = Relação área dos folículos/área total do ovário

CL + E/AT = Relação área de corpos lúteos + área de estroma/área total do ovário

TABELA 3

Diâmetro médio, expressos em μ , dos folículos ovarianos de ratas de diferentes idades (média de 5 animais).

Idade do animal			
30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
10,8	166,0	606,0	740,0

TABELA 4

Atividade catalásica de ovário de vaca (folículos, corpos lúteos e estroma, isolados) expressa em mm^3 de O_2/mg de tecido. Os valores da tabela correspondem às médias, com seu respectivo desvio padrão, resultante da determinação efetuada em 12 estruturas diferentes, para cada caso.

Ovário de vaca			
Folículos com ϕ menor que 5 mm	Folículos com ϕ maior que 5 mm	Corpos lúteos gravídicos	Estroma
92,9 $\pm$ 7,1	14,4 $\pm$ 1,9	501,2 $\pm$ 6,9	139,6 $\pm$ 4,9

TABELA 5

Atividade catalásica de ovário de porca (folículos, corpos lúteos e estroma, isolados) expressa em mm^3 de O_2/mg de tecido. Os valores da tabela correspondem às médias, com seu respectivo desvio padrão, resultante da determinação efetuada em 10 estruturas diferentes para cada caso.

Ovário de Porca				
Folículo jovem	Folículo maduro	Corpo lúteo	Corpos lúteo gravídico	Estroma
$173,2 \pm 19,6$	$50,9 \pm 8,6$	$397,7 \pm 4,5$	$1356,2 \pm 205,7$	$193,6 \pm 21,1$

TABELA 6

Ação da hipofisectomia - Pêso médio de ovários de ratas hipofisectomizadas e contrôles. Os valores da tabela correspondem às médias, expressas em mg e seu respectivo desvio padrão, resultante da determinação efetuada em 5 animais para cada lote.

Ovário de ratas	
Hipofisectomizadas	Contrôles
$7,50 \pm 0,08$	$18,70 \pm 0,58$

TABELA 7

Ação da hipofisectomia - Atividade catalásica, expressa em $\text{mm}^3 \text{O}_2/\text{mg}$ de tecido, determinada em ovários de ratas hipofisectomizadas e controles. Os valores da tabela correspondem às médias, com seu respectivo desvio padrão, da determinação efetuada em 5 animais para cada lote.

Ovário de ratas	
Hipofisectomizadas	Contrôles
266,3 $\pm$ 27,4	513,3 $\pm$ 21,8

TABELA 8

Ação da hipofisectomia - Valores absolutos, expressos em mm^2 , da área total do ovário, dos folículos e do estroma de ratas hipofisectomizadas e controles. Os valores da tabela correspondem às médias, com seu respectivo desvio padrão, da determinação efetuada em 5 animais, para cada lote.

Ovário de ratas				
	Área total	Folículos	Estroma	Corpos lúteos
Hipofisectom.	6541 $\pm$ 812	647 $\pm$ 154	5362 $\pm$ 707	532 $\pm$ 95
Contrôles	12105 $\pm$ 781	1161 $\pm$ 200	3592 $\pm$ 204	7352 $\pm$ 342

T A B E L A 9

Ação da hipofisectomia - Valores da relação entre as áreas dos folículos, corpos lúteos, estroma e área total do ovário, determinados em ratas hipofisectomizadas e controles. Os valores da tabela correspondem às médias de determinação efetuadas em 5 animais para cada lote.

Ovário de rata			
	F/AT	CL/AT	E/AT
Hipofisectomizadas	9,89	8,13	81,98
Contrôles	9,59	60,73	29,68

F/AT = Relação área dos folículos/área total do ovário

CL/AT = Relação área dos corpos lúteos/área total do ovário

E/AT = Relação área de estroma/área total do ovário

T A B E L A 10

Ação de hormônios gonadotróficos coriônicos - Pêso médio de ovários de ratas injetadas com hormônios gonadotróficos coriônicos e controles. Os valores da tabela correspondem às médias, expressas em mg e seu respectivo desvio padrão, resultante da determinação efetuada em 5 animais para cada lote.

Ovários de ratas	
Hormônio Gonadotrófico	Contrôles
29,40 $\pm$ 0,20	8,01 $\pm$ 0,07

T A B E L A 11

Ação de hormônios gonadotróficos coriônicos - Valores absolutos expressos em mm^2 , da área total do ovário, folículos, corpos lúteos e estroma de ratas injetadas com hormônios gonadotróficos e controle. Os valores da tabela correspondem às médias, com seu respectivo desvio padrão, da determinação efetuada em 5 animais para cada lote.

Ovários de ratas				
Hormônio	Área total	Folículos	Estroma	Corpos lúteos
Gonadotrófico	16112 $\pm$ 2490	4939 $\pm$ 664	5047 $\pm$ 1059	6131 $\pm$ 856
Contrôle	6033 $\pm$ 723	3172 $\pm$ 379	2878 $\pm$ 361	0

T A B E L A 12

Ação de hormônios gonadotróficos coriônicos - Atividade catalásica, expressa em $\text{mm}^3 \text{O}_2/\text{mg}$ de tecido, determinada em ovários de ratas hipofisectomizadas e controles. Os valores da tabela correspondem às médias, com seu respectivo desvio padrão, da determinação efetuada em 5 animais para cada lote.

Ovário de ratas	
Gonadotrófico	Contrôle
476,5 $\pm$ 23,5	352,7 $\pm$ 24,1

TABELA 13

Ação de hormônios gonadotróficos - Valores da relação entre a área total e as áreas dos folículos, corpos lúteos e estroma, determinados em ratas hipofisectomizadas e controles. Os valores da tabela correspondem às médias da determinação efetuada em 5 animais para cada lote.

Ovário de rata			
Hormônio Gonadotrófico	F/AT	CL/AT	E/AT
	30,65	38,05	31,30
Contrôle	52,58	0,00	47,42

F = folículo CL = corpo lúteo
AT = área total E = estroma

TABELA 14

REAÇÕES TOPOQUÍMICAS EM OVÁRIO DE RATA

Idade	SUDAN				SCHULTZ				SCHIFF				PAS			
	FOL		E	CL	FOL		E	CL	FOL		E	CL	FOL		E	CL
	T	G			T	G			T	G			T	G		
60 dias	+	+	+		+	+	+			+	+			+	++	
90 dias	++	++	++	++	++	++	++	+++	+	++	+	+	+	+	++	++
120 dias	++	++	++	++	++	++	++	+++	+	++	++	+	+	+	++	++
60 dias PMS	++	++	++	++	++	++	++	+++	+	++	+	++	+	+	++	++

FOL = folículo

T = teca

G = granulosa

E = estroma

CL = corpo lúteo

TABELA 15

REAÇÕES TOPOQUÍMICAS EM OVÁRIOS DE PORCA E DE VACA

Ovários	Reações Topoquímicas	Gestante				Não Gestante			
		FOL		E	CL	FOL		E	CL
		T	G			T	G		
Ovário de porca	KMnO_4 + Azul de Toluidina	++	+	-	++	++	+	-	++
	KMnO_4 + Aldeído-Fucsina	++	+	-	++	++	+	-	++
	Schultz	++	+	-	++	++	+	-	++
	Sudan	++	++	-	++	++	++	-	++
	Schiff	+	++	-	+++	+	++	-	+++
	PAS	+	++	-	+++	+	++	-	+++
Ovário de vaca	KMnO_4 + Azul de Toluidina	+	+	-	++	+	+	-	++
	KMnO_4 + Aldeído-Fucsina	++	+	-	+++	++	+	-	++
	Schultz	++		-	++	++		-	++
	Sudan	-	++	-	++	++	++	-	++
	Schiff	+	+	-	++	++	++	-	++
	PAS	+	++	-	++	++	++	-	++

FOL = folículo

T = teca

E = estroma

G = granulosa

CL = corpo lúteo

TABELA 16

REAÇÕES TOPOQUÍMICAS EM OVÁRIO DE PORCA
AÇÃO DO DESOXICOLATO DE SÓDIO E METANOL-CLOROFÓRMIO

Ovário de porca	Schiff				Desoxicolato de sódio+Schiff				Metanol-Cloro fórmio+Schiff				Desox.sódio+Met. cloroform.+ Schiff			
	FOL		E	CL	FOL		E	CL	FOL		E	CL	FOL		E	CL
	T	G			T	G			T	G			T	G		
gestante	+	++	-	+++	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
não gestante	+	++	-	+++	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

TABELA 17

REAÇÕES TOPOQUÍMICAS EM OVÁRIO DE PORCA
AÇÃO DO DESOXICOLATO DE SÓDIO E METANOL-CLOROFÓRMIO

Ovário de porca	PAS				Desoxicolato de Sódio + PAS				Metanol-Cloro fórmio + PAS				Desox.sódio+Met. cloroform.+ PAS			
	FOL		E	CL	FOL		E	CL	FOL		E	CL	FOL		E	CL
	T	G			T	G			T	G			T	G		
gestante	+	++	-	+++	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
não gestante	+	++	-	+++	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

FOL = folículo

T = teca

G = granulosa

E = estroma

CL = corpo lúteo

T A B E L A 18

REAÇÕES TOPOQUÍMICAS EM OVÁRIOS DE RATA

Idade	KMnO_4 + Azul de Toluidina				KMnO_4 + Aldeído Fucsina			
	FOL		E	CL	FOL		E	CL
	T	G			1	G		
60 dias	+	+	+		+	+	+	
90 dias	+	+	+	+++	+	+	+	+++
120 dias	++	+	++	+++	++	+	++	++
60 dias PMS	++	+	++	+++	++	+	++	++

FOL = folículo

E = estroma

T = teca

CL = corpo lúteo

G = granulosa



Foto 1 -- Ovário normal de rata de 120 dia (HE). X30.

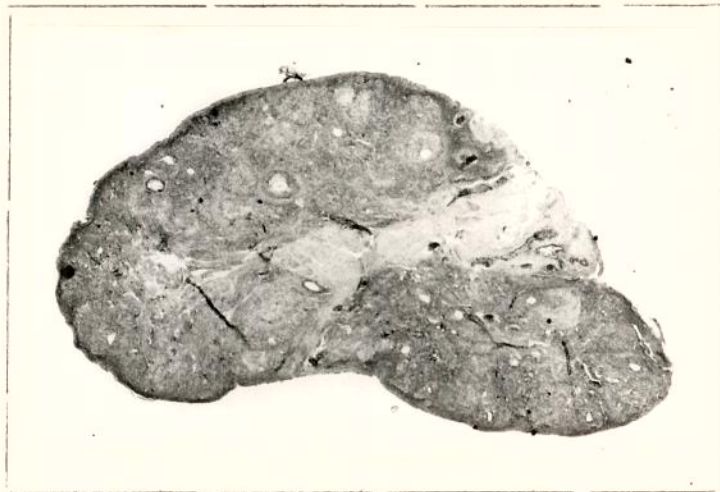


Foto 2 -- Ovário de rata de 120 dias (HE). X30. Ação da hipofisectomia (10º dia da operação). Atrofia dos folículos, corpos lúteos e glândula intersticial.

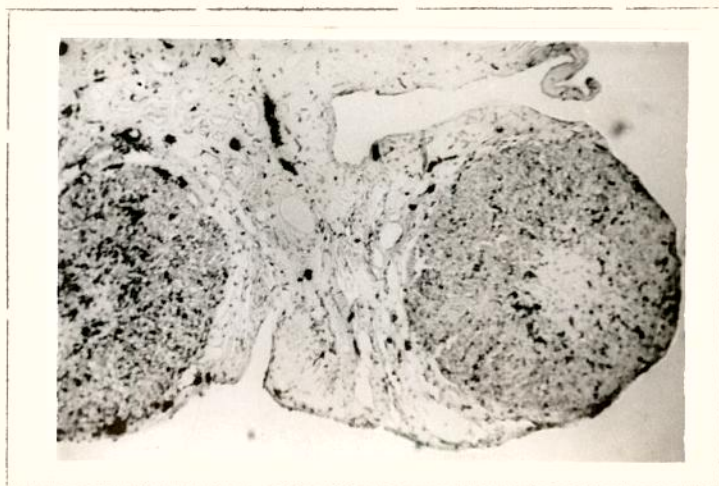


Foto 3 -- Ovário normal de rata de 120 dias (HE). X40. Reação para demonstração de catalase; verificar intensidade maior da reação do corpo lúteo.

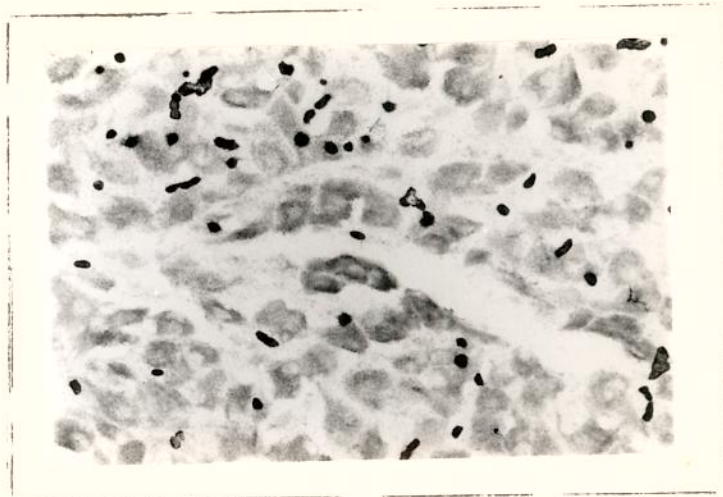


Foto 4 - Corpo lúteo gestacional de ovário de porca adulta. X 250. Reação para catalase; observar grânulos corados no interior das células luteínicas, resultantes da presença de catalase.

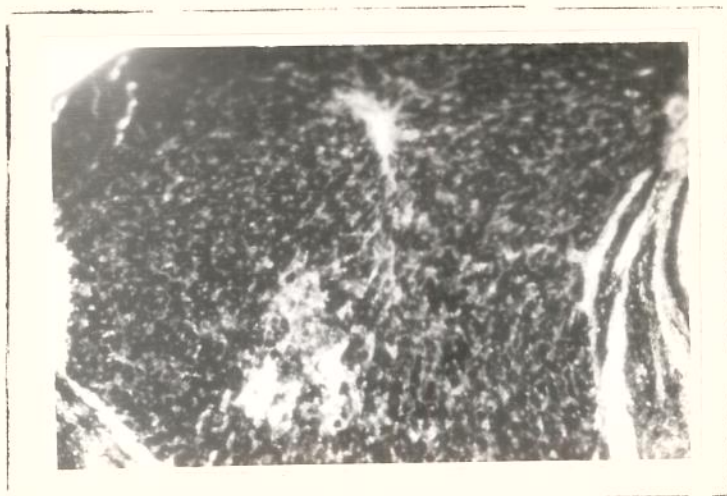


Foto 5 - Ovário normal de rata de 90 dias. Coloração pelo Sudan negro. X130. Presença de material sudanófilo no corpo lúteo.

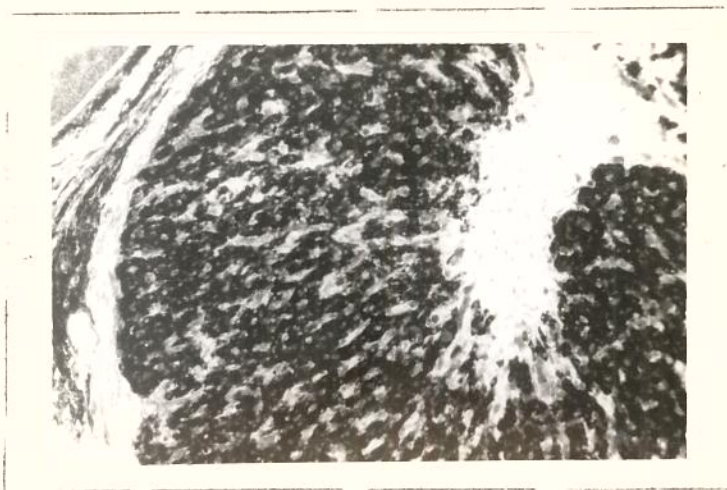


Foto 6 - Ovário de rata de 60 dias; ação de hormônios gonadotróficos. Coloração pelo Sudan negro. X100. Células luteínicas intensamente coradas.



Foto 7 - Ovário de rata, de 60 dias; ação de hormônios gonadotróficos. Coloração pelo Sudan negro. X30. Presença de material sudanófilo no corpo lúteo, glândula intersticial e folículos.



Foto 8 - Ovário de rata de 60 dias; ação de hormônios gonadotróficos. Coloração pelo Sudan negro. X120. Glândula intersticial e toca interna intensamente coradas.



Foto 9 - Ovário de porca adulta normal. Coloração pelo Sudan negro. X25. Presença de material sudanófilo no corpo lúteo e camada granulosa do folículo.



Foto 10 - Ovário de porca adulta normal. Coloração pelo Sudan negro. X120. Células luteínicas intensamente coradas.

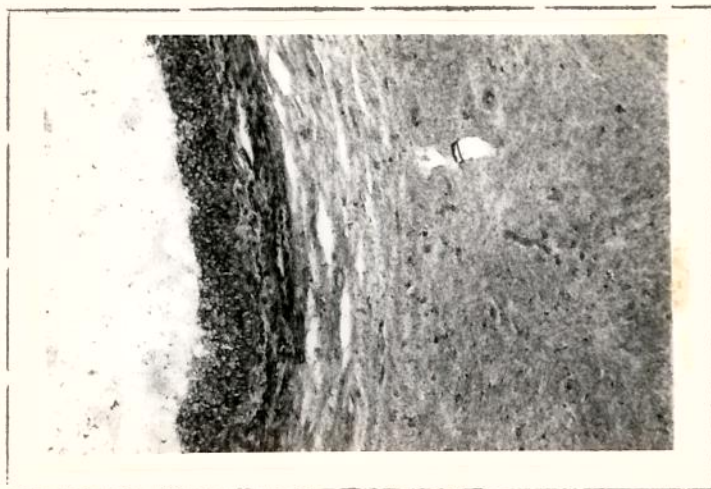


Foto 11 - Ovário de porca em gestação. Coloração pelo Sudan negro. X125. Presença de material sudanófilo na camada granulosa e teca interna.



Foto 12 - Ovário de ratá de 60 dias. Tratamento pelo reativo de Schiff. X110. Presença de material Schiff positivo na teca interna, camada granulosa e em células esparsas do corpo lúteo.

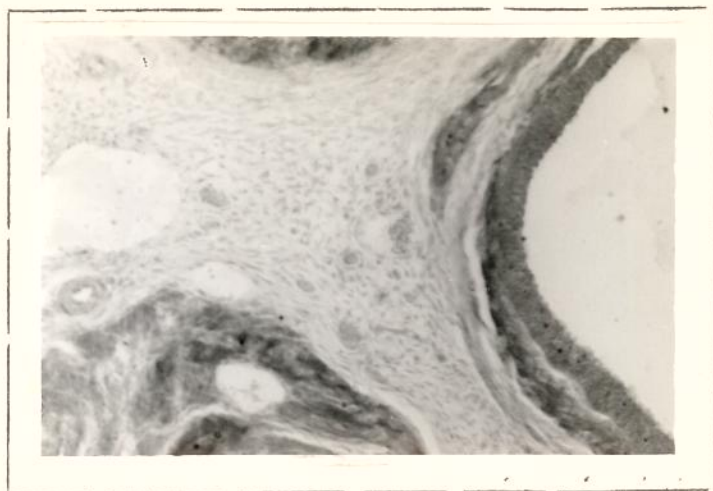


Foto 13 - Ovário de rata de 60 dias. PAS. X133. Presença de material corado no folículo e glândula intersticial.

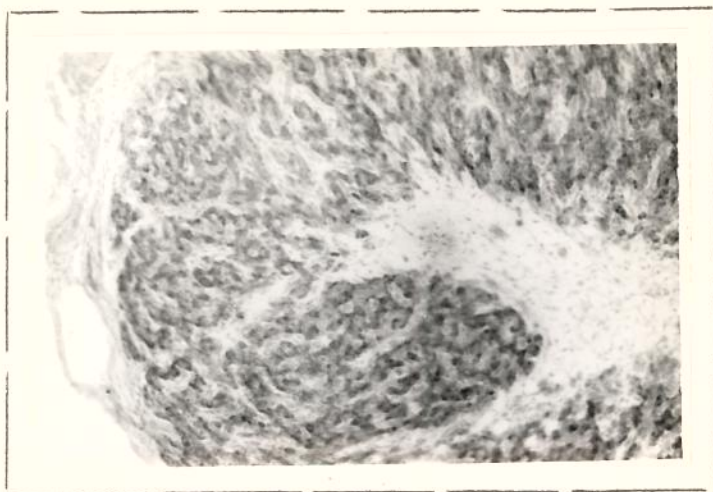


Foto 14 - Ovário de rata de 60 dias injetada com hormônios gonadotróficos. PAS X120. Corpo lúteo.

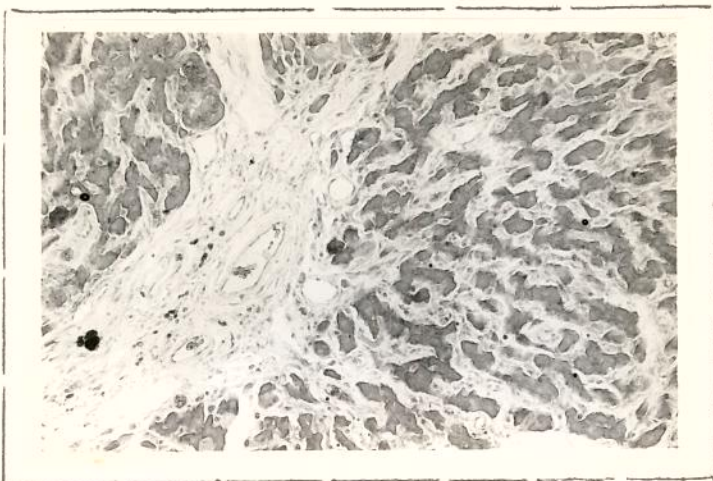


Foto 15 - Corpo lúteo de ovário de porca em gestação. PAS. X125. Células luteínicas apresentam-se coradas.



Foto 16 - Ovário de rata de 60 dias injetada com hormônios gonadotróficos. Azul de toluidina após oxidação. X30. Presença de colesterol no corpo lúteo, folículo e glândula intersticial.

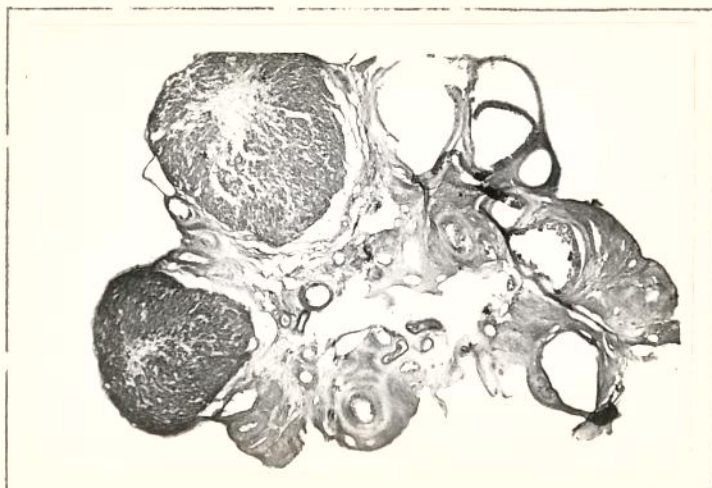


Foto 17 - Ovário de rata de 60 dias injetada com hormônios gonadotróficos. Aldeído fucsina após oxidação. X30 Presença de colesterol nos folículos, corpos lúteos e glândula intersticial.

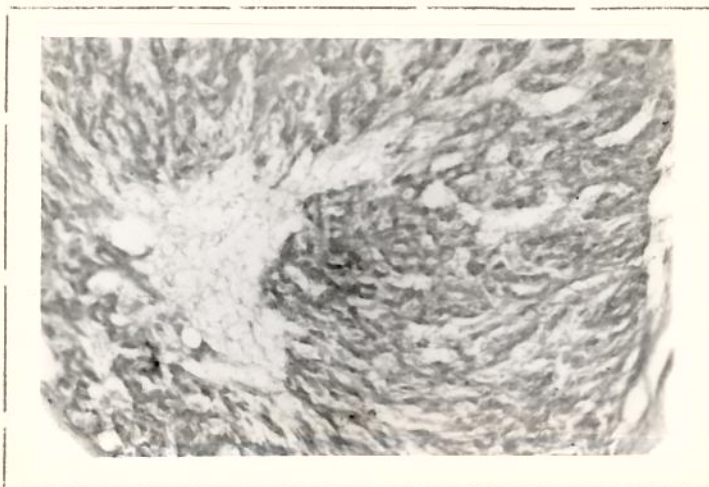


Foto 18 - Corpo lúteo de rata de 60 dias injetada com hormônios gonadotróficos. Aldeído fucsina após oxidação X120. Presença de colesterol no corpo lúteo.



Foto 19 - Ovário de rata de 60 dias, injetada com hormônios gonadotróficos. Aldeído fucsina após oxidação. X133. Presença de colesterol no folículo e glândula intersticial.

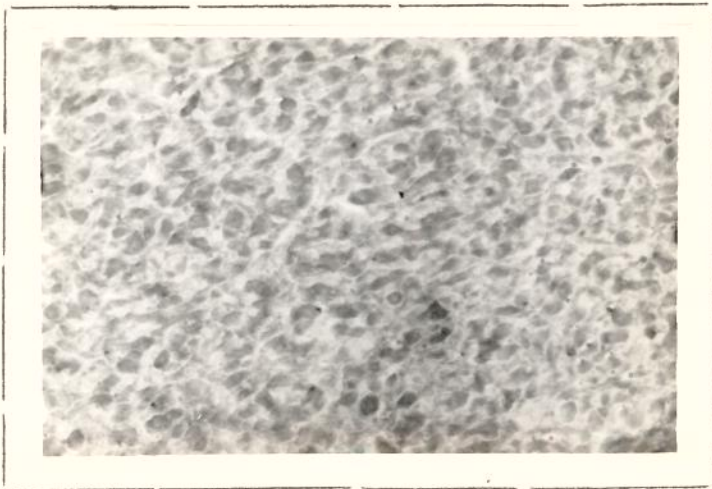


Foto 20 - Corpo lúteo de porca normal. Azul de toluidina após oxidação. X140. Presença de colesterol nas células luteínicas.



Foto 21 - Corpo lúteo gestacional de porca. Aldeído fucsina após oxidação X127. Reação positiva para colesterol nas células luteínicas

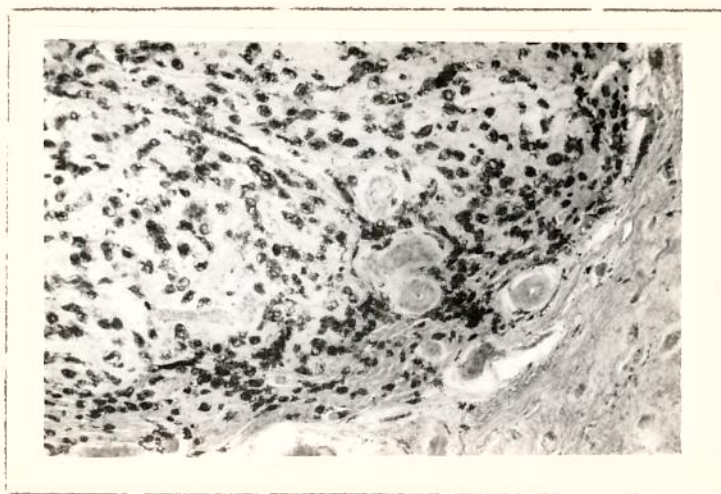


Foto 22-Corpo lúteo gestacional de porca. Aldeído fucsina após oxidação. H100. Presença de colesterol nas células luteínicas e células do estroma.



Foto 23-Ovário de rata de 120 dias. Reação do azul da Prússia. H32. Presença de material azul da Prússia positivo no folículo, glândula intersticial e corpo lúteo.

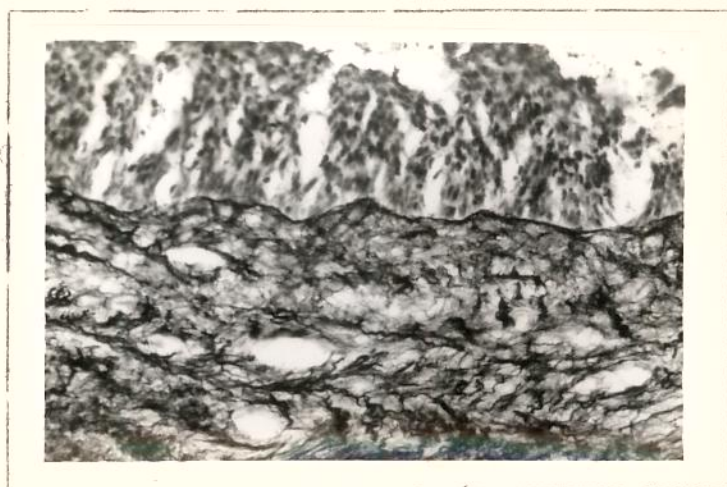


Foto 24-Ovário de vaca em gestação. Impregnação pela prata. H120. Presença de células argentófilas na teca interna folicular.



Foto 25 - Corpo lúteo gestacional de ovário de vaca. Impregnação pela prata. X250. Presença de células argentófilas entre as células luteínicas.

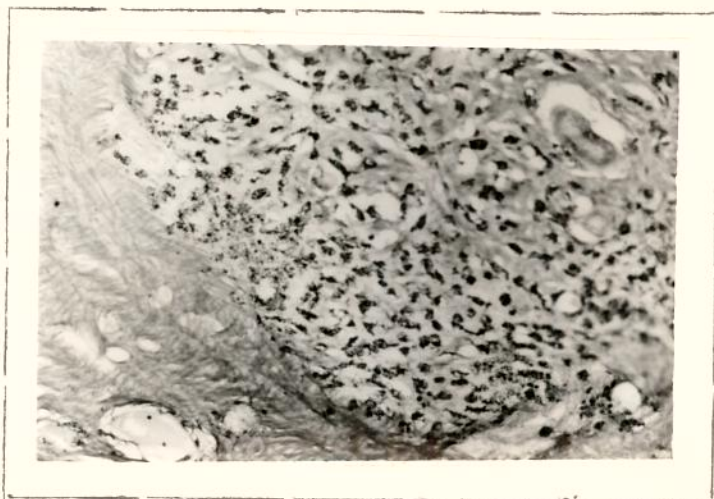


Foto 26 - Corpo lúteo gestacional de porca. Impregnação pela prata. X120. Presença de células argentófilas entre as células luteínicas.

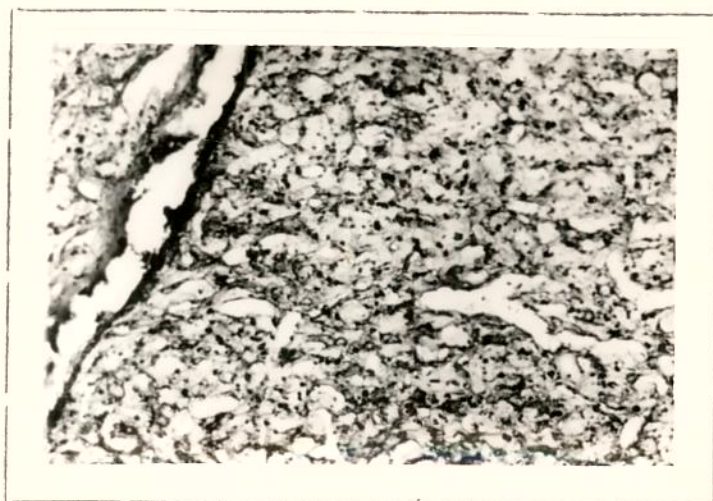


Foto 27 - Ovário de porca normal. Impregnação pela prata. X140. Presença de células argentófilas entre as células luteínicas.

DISCUSSÃO

A determinação do nível da atividade catalásica, nas diversas estruturas do ovário, mostra que, nas espécies animais estudadas, o corpo lúteo é o principal produtor de catalases; essa atividade funcional é maior no corpo lúteo gestacional. O estroma, ou melhor, a glândula intersticial, apresenta maior nível de atividade catalásica que os folículos. Nêstes, o nível de atividade catalásica é menor nas fases mais avançadas da maturação folicular.

Estes resultados, obtidos através da medida do volume de oxigênio desprendido, quando fragmentos de ovário eram incubados com peróxido de hidrogênio, foram confirmados pela técnica topoquímica, empregada para evidenciar a atividade catalásica.

É fato conhecido conterem as catalases ferro hê

mico, como parte integrante de sua macro-molécula (FRUTON, 1961 GRAS, 1964, LAGUNA, 1967). Por esse motivo, a distribuição do ferro hêmico, nas diversas estruturas do ovário, conforme mostram os resultados, coincide com a distribuição das catalases, inclusive quanto às variações de intensidade.

Com a finalidade de se obterem evidências sobre a síntese das catalases, nas estruturas do ovário, deu-se ênfase ao estudo da distribuição do ferro hêmico e do ferro ionizável, no interior dessas estruturas, especialmente no corpo lúteo. Partiu-se da hipótese de que o ferro ionizável fôsse o precursor do ferro hêmico, tal como ocorre na síntese da hemoglobina.

A distribuição do ferro ionizável, nas estruturas ovarianas, em parte, coincide com a distribuição das células argentófilas. Assim, está presente na teca interna, na glândula intersticial, no corpo lúteo e nos folículos atresícos.

Na ovulação, devido à ruptura do folículo, há hemorragia; como consequência, o ferro ionizável presente no corpo lúteo em formação, pode ser originário da hemoglobina que, durante o processo de catabolismo, é desintegrada pelas células argentófilas. Este ferro aparece na porção mais central da estrutura, logo após a ovulação. Os folículos atresícos apresentam, quando se inicia o processo de atresia, migração de fagócitos para as porções mais centrais e, nessa região, aparece ferro ionizável.

No corpo lúteo, em diferentes fases de evolução, a disposição do ferro ionizável é comparável à distribuição das células argentófilas, sugerindo que o ferro tenha como origem a hemoglobina. O ferro ionizável assinalado está situ

ado no interior das células argentófilas e, portanto, no estroma do corpo lúteo. Este metal é o provável responsável pela argentofilia dessas células intersticiais, a julgar pelos resultados de HADLER & col. (1964) e DE LUCCA (1968). Todavia, além do ferro ionizável, cuja disposição é superponível à das células argentófilas, também se encontra ferro ionizável no interior das células luteínicas, que se situam na periferia do corpo lúteo. Este ferro, situado no interior das células parenquimatosas, parece não somente ter origem diferente do situado nas células intersticiais, quanto apresentar destino diverso. A origem diferente é sugerida pela localização apenas na periferia do corpo lúteo, ou seja, na zona mais distante do local da hemorragia. A diferença quanto ao destino baseia-se no seguinte: 1) as células luteínicas periféricas, mais jovens, que contém ferro ionizável, não contém, em geral, ferro hêmico, nem atividade catalásica; 2) as células luteínicas mais internas, mais maduras, apresentam ferro hêmico e atividade catalásica, mas não apresentam ferro ionizável. Estas evidências sugerem que o ferro ionizável, situado na periferia, ou seja, na zona de crescimento do corpo lúteo, antecede ao ferro hêmico e à atividade catalásica; sugerem, também, que o ferro ionizável seja precursor da síntese do ferro hêmico e, portanto, das catalases.

O nível da atividade catalásica é bem mais elevado no corpo lúteo do que nos folículos e varia de acordo com a fase de evolução em que se encontram essas estruturas. No corpo lúteo gravídico, a atividade catalásica é maior do que em corpos lúteos não gravídicos, mostrando, portanto, relação entre o nível de atividade desta enzima e a atividade funcional da estrutura (HADLER & col., 1968 a). Estes dados

constituem evidência de que a atividade catalásica é proporcional ao estado funcional das estruturas referidas. Os resultados mostram, ainda, que nos folículos ovarianos a maturação reduz o nível da atividade catalásica, o que concorda com os resultados de SHORT (1964). Este autor sugere que, antes da ovulação, as células da granulosa sejam deficientes em enzimas necessárias à conversão da progesterona em estrógeno. Por outro lado, LISSE & SCHURENKAMPER (1965) demonstraram, trabalhando com ovários de vaca, que há paralelismo entre a síntese de progesterona e o crescimento de folículos ovarianos. O aumento da progesterona poderia estar relacionado com a falta de uma enzima que continuasse seu metabolismo. Não obstante haver concordância entre a redução de atividade catalásica e das enzimas que transformam a progesterona em estrógeno, nos folículos maduros, isto não significa que as catalases sejam responsáveis por essa transformação. No entanto, estas observações são concordantes no sentido de indicarem redução da atividade enzimica nos folículos maduros.

Para confirmar as evidências que correlacionam a atividade funcional das estruturas ovarianas com o nível de atividade catalásica, foi determinada a atividade catalásica em ovários de animais submetidos à hipofisectomia e de animais injetados com hormônios gonadotróficos, de origem coriônica. Nos animais hipofisectomizados, comprovou-se grande redução da atividade enzimica, quando comparados com os animais controles. Ao mesmo tempo, houve redução quase completa dos corpos lúteos, acentuada diminuição do tamanho dos folículos, desaparecimento quase completo da glândula intersticial e aumento relativo do tecido conjuntivo do estroma, o qual se apresenta em substituição às estruturas do ovário responsáveis

pela síntese hormonal, concordando com os achados de DE GROODT LASSED (1963) e de PERRY & ROWLANDS (1963). A diminuição da atividade catalásica coincide com a regressão acentuada das estruturas ovarianas funcionalmente ativas, traduzindo um estado de hipofunção glandular.

Por outro lado, os hormônios gonadotróficos, injetados em animais impúberes, estimulam o desenvolvimento das estruturas ovarianas funcionalmente ativas (LEATHEM, 1939; STARKEY & LEATHEM, 1939; LEATHEM & STARKEY, 1940; PFEIFFER & HOOKER, 1942; WESTMAN & JACOBSON, 1944; GREEN, 1955; ZARROW & col., 1958; DE GROODT & LASSED, 1963; MC KERNS, 1965), estimulando a mobilização do colesterol (LEVIN & JAILER, 1948), da mesma forma que determinam queda da concentração do colesterol contido no citoplasma das células intersticiais (CLASESSON, 1954; GURAYA & GREENWALD, 1964). Este estímulo ovariano coincide com o aumento da atividade catalásica, ou seja, com intensificação da síntese das catalases pelas estruturas ovarianas.

Estes resultados mostram, portanto, haver relação estreita entre a atividade catalásica do ovário e a atividade funcional do mesmo. Mostram, além disso, que a síntese das catalases pelas diversas estruturas ovarianas, é controlada pela hipófise, através das gonadotrofinas.

Por outro lado, as estruturas ovarianas que apresentam atividade catalásica são as responsáveis pela síntese de hormônios, sugerindo que as catalases estejam, direta ou indiretamente, relacionadas com a síntese destes hormônios.

Com o propósito de verificar evidências correlacionando as catalases e a síntese de hormônios pelo ovário,

foi estudada a distribuição de lípidos e, em especial, do colesterol, nas várias estruturas ovarianas. O colesterol é admitido como precursor dos hormônios esteróides (EVERETT, 1948; LEVIN & JAILER, 1948; BARKER, 1951; RENNELS, 1951; CLARKE, 1954; GURAYA & GREENWALD, 1964; SAVARD & col., 1965; HELBIG & SAVARD, 1966). Por esse motivo, procurou-se identificar o colesterol nas diferentes estruturas ovarianas e verificar sua relação com a atividade catalásica. Foi observada a presença de colesterol nas estruturas que apresentam atividade enzimica, ou seja, nos folículos, no estroma (glândula intersticial) e nos corpos lúteos. As reações histoquímicas que demonstram colesterol são mais intensas no corpo lúteo, no qual também é mais elevado o nível de atividade catalásica. Além disso, no corpo lúteo gestacional, onde é maior o nível da atividade catalásica, são também mais intensas as reações que evidenciam colesterol.

O maior nível de atividade catalásica no corpo lúteo, principalmente no gestacional, sugere relação entre as catalases e a síntese de progesterona. No entanto, deve ser lembrado que embora admita-se que a progesterona seja o principal produto secretado pelo corpo lúteo, parece não haver dúvida de que, pelo menos em algumas espécies (humana, equina), essa estrutura possa, também, secretar quantidades apreciáveis de estrógenos (RYAN & SMITH, 1965; SAVARD & col., 1965; CHANNING, 1966).

CONCLUSÕES

Através da avaliação da atividade catalásica de ovários de diferentes espécies animais e da comparação desta atividade com a atividade secretora das estruturas ovarianas, foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

1) há atividade catalásica nas estruturas ovarianas dotadas de atividade secretora (folículos, corpos lúteos e glândula intersticial),

2) o nível da atividade catalásica diminui nos folículos maduros, nos quais a atividade secretora é menor;

3) esse nível atinge valores máximos nos corpos lúteos, especialmente no gestacional, onde é mais intensa a atividade funcional.

4) o efeito da hipofisectomia e o provocado pela injeção de gonadotrofinas, confirmam a correlação entre -

o nível da atividade catalásica e o estado funcional do ovário, mostrando que o nível da atividade catalásica diminui no repouso funcional e se eleva quando o órgão é estimulado hormônicamente. Além disso, mostram que a atividade catalásica do ovário é controlada pela hipófise através das gonadotrofinas.

Estes resultados sugerem que as catalases do ovário desempenhem ação relacionada com a biosíntese dos hormônios ovarianos.

5) O estudo histoquímico do ovário corrobora com esta hipótese, uma vez que revela a presença de colesterol nas mesmas estruturas que apresentam atividade catalásica. Além disso, no corpo lúteo gestacional, onde é mais elevado o nível da atividade catalásica, são também mais intensas as reações que revelam a presença de colesterol.

BIBLIOGRAFIA

- ARMSTRONG, D.T. - Comparative studies of action of luteinizing hormone upon ovarian steroidogenesis. J.Reprod. Fert. Suppl. 1: 101-112, 1966.
- BARKA, T.&ANDERSON, P.L. - Histochemistry; theory, practice and bibliography. Hoeber Medical Division-Harper &Row Publ. Inc. New York, Evanston, and London, 1st ed., 1963.
- BARKER, W.L. - A cytochemical study of lipids in sow's ovaries during the estrous cycle. Endocrinology, 48: 772-785, 1951
- BELKINA, L.G. KREMLEV, L.L. & FALK, R.V. - Introduction of hepatocatalase and anticatalase content in rabbit tissues. 1- Catalase and anticatalase in blood and tissues of normal rabbits. Journ. Biol. et Méd. Exp. 8 (20): 322-328, 1927.

- BELL, G.H., DAVIDSON, J.N., SCARBOUROUGH, H. - Textbook of Physiology and Biochemistry 5^e ed., 1963.
- BONNICHSEN, R.K. - Catalase from horse kidney and human liver. Acta chem. scand. 1: 114 - 117, 1947 a.
- BONNICHSEN, R.K. - A comparative study of the blood and liver Catalases from the horse. Archs. Biochem. 12: 83-94 1947b.
- BRANDAN H., RENIMLINGER, K. & LUH, W. - Enzyme pattern and progesterone synthesis: a histochemical analysis of the enzyme distribution in the granulosa of the rabbit ovary before and after the maturation of follicles. Acta Endocrinol. 56 (3): 433-444, 1967.
- CHANNING, C.P. - Progesterone biosynthesis by equine granulosa cells growing in tissue culture. Nature, Londres 210: 1266, 1966
- CLASESSON, L. - The intracellular localization of the esterified cholesterol in the living interstitial gland cell of the rabbit ovary. Acta physiol. scand. 31 (suppl. 113): 53-68, 1954.
- DEANE, H.W., LOBEL, B.L. & ROMNEY, S. - Enzymatic histochemistry of normal human ovaries of the menstrual cycle, pregnancy and the early puerperium. Am. J. Obst. Gynec. 83: 281-293, 1962.
- DE GROODT LASSED N. - Functie en vorm van de interstitiele cellen van het ovarium. Presses Academiques Europeennes S.C., Brussels, Belgium, 1963.
- DOUNCE, A.L. & FRAMPTON, O.D. - Crystalline horse liver catalase Science 89: 300-301, 1939.

- DOUNCE, A.L. - Further observations concerning the preparation and properties of catalase from different sources. I- Crystalline lamb liver catalase. II-Preparation of crystalline beef liver catalase by use of acetone or alcohol. J. biol. Chem. 143: 497-501, 1942.
- EVERETT, J.W. Hormonal factors responsible for deposition of cholesterol in the corpus luteum of the rat. Endocrinology 41(5): 364-377, 1947.
- FRUTON, J.S. & SIMMONDS, S. - Bioquímica Geral. Ed. Omega S. A. Barcelona 2ª ed., 1961.
- GALSTON, A.W., BONNICHSEN, R.K., & ARNON, D.I. - The preparation of highly purified spinach leaf catalase. Acta. Chem. scand. 5:781-790, 1951.
- GRAS, J. - Fundamentos de Bioquímica Médica. Ed. Toray S.A. Barcelona. 3ª ed., 1964.
- GREEN, J.A. - Hormone secretion by the immature mouse ovary after gonadotrophic stimulation. Endocrinology 56(6): 621-627, 1955.
- GURAYA, S. & GREENWALD, G.S. - Histochemical studies on the interstitial gland in the rabbit ovary. Am. J. Anat. 114(3): 495-519, 1964.
- HADLER, W.A. - Morfologia e distribuição das células reticulares do baço normal. Estudo efetuado mediante técnica de impregnação argêntica. Tese apresentada ao Concurso de Livre Docência à Cadeira nº 2 da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto do E. de S. Paulo. 1962.
- HADLER, W.A., LUCCA, O. de, VOZZA, J.A., PATELLI, A.S. & ZITI, L.M. - Relação entre a presença de cátions no fixador e a

impregnação argêntica das células reticulares do baço.
Ciência e Cultura 16 (2): 178, 1964.

HADLER, W.A., ZITI, L.M., LUCCA, O.de, PATELLI, A.S. & VOZZA, J.A. - Coloração seletiva pela aldeído fucsina e pela hematoxilina crômica de produtos resultantes da oxidação do colesterol e de outros compostos insaturados. Ciência e Cultura 17: 246 - 247, 1965 a.

HADLER, W.A., PATELLI, A.S., ZITI, L.M., LUCCA, O.de & VOZZA, J.A. - Tentativa de identificação dos grupos reativos originados pela oxidação permangânica do colesterol e de outros compostos insaturados, responsáveis pela coloração com a aldeído-fucsina ou com a hematoxilina. Ciência e Cultura 17: 244-245, 1965 b.

HADLER, W.A., LUCCA, O.de, ZITI, L.M., PATELLI, A.S. & VOZZA, J.A. - Histoquímica do ferro; estudo das condições mais adequadas para o desenvolvimento da reação do azul da Prússia. Ciência e Cultura. 17: 248, 1965 c.

HADLER, W.A., ZITI, L.M., PATELLI, A.S. & LUCCA, O.de - Sobre a atividade catalásica da cortical da adrenal. Ciência e Cultura, 18: 172, 1966.

HADLER, W.A., PATELLI, A.S., ZITI, L.M. & LUCCA, O.de - Ação de diversos fatores sobre a atividade catalásica do fígado; estudo histoquímico. Ciência e cultura. 19: 365-366 1967 a.

HADLER, W.A., ZITI, L.M., PATELLI, A.S. & LUCCA, O.de - Histoquímica da cortical da adrenal. II- Distribuição da atividade catalásica nas diversas zonas da cortical da adrenal. Ciência e Cultura 19: 362-363, 1967 b.

- HADLER, W.A., ZITI, L.M., PATELLI, A.S. & LUCCA, O.de - Histoquímica da cortical da adrenal. III- Identificação de duas catalases na cortical da adrenal. *Ciência e Cultura*. 19: 364-365, 1967 c.
- HADLER, W.A., BAROUDI, R., ZITI, L.M., PATELLI, A.S. & LUCCA, O.de - Histoquímica da cortical da adrenal. I- Ação da idade sobre a atividade catalásica da adrenal do rato. *Ciência e Cultura*, 19: 361-362, 1967 d.
- HADLER, W.A., PATELLI, A.S., ZITI, L.M. - Atividade catalásica do ovário. *Ciência e Cultura* 20 (2): 358, 1968 a.
- HADLER, W.A. & ZITI, L.M. - Ação da hipófise sobre a atividade catalásica da adrenal. *Ciência e Cultura* 20(2): 357, 1968 b.
- HADLER, W.A., ZITI, L.M., LUCCA, O.de & PATELLI A.S. - A new technique for histochemical detection of cholesterol and cholesterol like compounds. *Acta histochem.* 30: 70-78, 1968 c.
- HADLER, W.A., SILVEIRA, S.R., ZITI, L.M. & REIS, N.S. - Técnica histoquímica para demonstração de catalases em tecidos (Em publicação, 1969).
- HELLIG, H.R. & SAVARD, I. - Sterol biosynthesis in the bovine corpus luteum in vitro. *Biochemistry* 5: 2944-2956, 1966.
- HERBERT, D. & PINSENT, J. - Crystalline human erythrocyte catalase. *Biochem. J.* 43: 203-205, 1948 a.
- HERBERT, D. & PINSENT, J. - Crystalline bacterial catalase. *Biochem. J.* 43: 193-202, 1948 b.
- HOTCHKISS, R.D. - A microchemical reaction resulting in the

- staining of polisaccharide structure in fixed tissue preparations. Arch. Biochem. 16: 131-141, 1948.
- KERN-BONTKE, E. - Histochemische nachweisbare Fermentaktivität in den Theca-und Granulosaluteinzellen des Corpus luteum. Histochemie 4: 56-64, 1964.
- "
KRUGER, F. - Katalasezahl und Katalaseindex des Blutes neugeborener Katzen. Biochem. Z. 202: 18-20, 1928.
- LAGUNA, J. - Bioquímica. Prensa Medica Mexicana. 2ª ed., 1967
- LASKOWSKI, M. & SUMNER, J.B. - Crystalline catalase from beef erythrocytes. Science 94: 615, 1941.
- LEATHEM, J.H. - Responses of hipophysectomized immature female rats to mare serum hormone. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 42 (2): 590-592, 1939.
- LEATHEM, J.H. & STARKEI, W.F. - Reaction of immature female guinea pigs to gonadotropic extracts Proc. Pa. Acad. Sci. 14: 109-114, 1940.
- LEVIN, L. & JAILER, J.W. - The effect of induced secretory activity in the cholesterol content of the immature rat ovary. Endocrinology 43(3): 154-166, 1948.
- LISON, L. - Histochemie et cytochemie animales. Principes et methodes. Paris, Gauthiers Villars, 3ème ed., 1960.
- LISSE, Y. & SCHURENKAMPER, P. - The progesterone biosynthesis in bovine ovarian tissue slices during the estrous cycle. Acta endocr. 50(3): 429-438, 1965.
- LUCCA, O.de - Estudo do mecanismo das técnicas rápidas de im-
pregnação pela prata. Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade de Campinas, 1968.

- MAHAJAN, D.K. & SAMUELS, L.T. - Biosynthesis of steroids by different ovarian tissues. 47 Annual meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1963. Fedn.Proc.Am. Soc.exp.Biol. 22(2): 531, 1963.
- MC KERNS, K.W. - Gonadotropin regulation of the activities of dehydrogenase enzymes of the ovary. Biochim. biophys.Acta 97(3): 542-550, 1965.
- MC MANUS, J.F.A. - The histochemical demonstration of mucus after periodic acid. Nature 158: 202, 1946.
- MEYER, R.K., MC SHAN, W.H. ERWAY, W.F. - Succinic dehydrogenase in rat ovarian during pregnancy and lactation. Endocrinology 41: 35-44, 1947.
- OKANO, K. - On the morphological and functional changes of corpus luteum graviditis during after pregnancy. Second Asia and Oceania Congress of Endocrinology, Sydney, May, 1963.
- OKANO, K., MATSUMOTO, K., KOIZUMI, T., MIZUSHIMA, T. & MORI, M. - Histochemical alterations of oxidative enzymes in rodent ovaries under non-pregnancy, pregnancy, through lactation and hormone treated conditions. Acta Histochem. 25: 12-39, 1966 .
- PEARSE, A.G.E. - Histochemistry; theoretical and applied. London J. & A. Churchill Ltda. 2^a ed., 1961.
- PFEIFFER, C.A. & HOOKER, C.W. - Early and late effect of daily treatment with pregnant mare serum upon the ovary of mice of the A strain. Anat. Rec. 84(4): 311-326, 1942.
- PERRY, J.S. & ROWLANDS, T.W. - Hypophysectomy of the immature

guinea pig and the ovarian response to gonadotrophins.
 Jour. Reproduct. Fert. 6(3): 393-404, 1963.

RENNELS, E.G. - Influence of hormone on the histochemistry
 of ovarian interstitial tissue in the immature rat. Amer.
 J. Anat. 88(1): 63-107, 1951.

RIO HORTEGA, P.del - El tercer elemento de los centros
 nerviosos. Poder fagocitario y movilidad de la microglia.
 Boletin de la Sociedad española de biologia. 9: 68-83,
 1919.

RUBIN, B.L., DEANE, H.W., HAMILTON, J.A. & DRIKS, E.C. -
 Changes in Δ^5 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity
 in the ovaries of maturing rats. Endocrinology 72(6):924
 930, 1963.

RYAN, K.J. - Hormones of the placenta. Amer. J. Obst. Gynec.
84: 1695 -1713, 1962.

RYAN, K.J. & SHORT. R.V. - Formation of estradiol by granulosa
 theca cells of equine ovarian follicle. Endocrinology 76
 (1): 108-114, 1965.

RYAN, K.J. PETRO, Z. & KAISER, J. - Steroid formation by
 isolated and recombined ovarian granulosa and thecal cell.
 J. clin. Endocrinol. Metab. 28(3): 355-359, 1968.

SAVARD, K., MARSH, J.M. & RICE, B. F. - Gonadotropins and
 ovarian steroidogenesis. Recent Prog. Horm. Res. 20:
 303-340, 1964.

SCHIRMER, H K.A., WALTON, K.N. & SCOTT, W.W. - Prostatic
 epithelial cells: their preparation and catalase activity
 (dog). Invest. Urol. 1(4): 301-306, 1964.

- SCHULTZ, A. - Eine Methode des mikrochemischen cholesterin nach weises am Gewebsschnitt. Zentbl. allg. path. Anat. 35: 314-316, 1924.
- SHORT, R.V. - Ovarian steroid synthesis and secretion in vivo. Recent Prog. Horm. res. 20: 303-340, 1964.
- SHORT, R.V. - The synthesis and secretion of steroids by the corpus luteum. Archs Anat. microsc. 56(3/4): 258-272, 1967.
- SMITH, O.W. & RYAN, K.J. - Biogenesis of estrogens by the human ovary; formation of neutral steroids intermediate from progesterone - C^{14} androstenedione $4-C^{14}$ and cholesterol $4-^{14}$. Endocrinology, 69: 970-983, 1961.
- SMITH, O.W. & RYAN, K.J. - Estrogens in the human ovary. Amer. J. Obst. Gynecol. 84: 141-153, 1962.
- SMITH, P.E. - Hypophysectomy and replacement therapy in the rat. Amer. J. Anat. 45: 205, 1930.
- STARKEY, W.F. & LEATHEM, J.H. Effect of mare serum hormone on the male and female mouse. Am. J. Physiol. 127(4): 751-754, 1939.
- SUMNER, J.B. & DOUNCE, A.L. Crystalline catalase. Science, 85: 366-367, 1967.
- TAKI, I. & MORI, M. - Histochemical observations of enzymatic patterns in human ovaries under normal and pathological conditions. Amer. S. Obstet. Gynec. (in press) 1966.
- WESTMAN, A. JACOBSON, D. - The production of masculinizing hormone in the ovary. Acta obstet. gynecol. scand. 24: 105-112, 1944.

- WESTMAN, A., JACOBSON, D. - The production of masculinizing hormones in the ovary. *Acta obstet. gynecol. scand.* 24:105-112, 1944.
- WIEST, W.G., KIDWELL, R.W. & KIRSHBAUM, T.H. - Induction of rat ovarian 20 hydroxysteroid dehydrogenase activity by gonadotrophic hormone administration. *Steroids* 2(6): 617-629, 1963.
- WITSCHI, E. Embryogenesis of the adrenal and reproductive glands - Recent. Prog. in Horm. Res. ed. by Pincus G. New York Academic Press, Inc., 1951.
- ZARROW, M.X., GALDWELL, A.L. Jr., HAFEZ, E.S.E., PINCUS, G. - Superovulation in the immature rat as a possible assay for L.H. and H.C.G. *Endocrinology* 63(6): 748-758, 1958.