

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

ESTUDO DA POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS E DA CONCENTRAÇÃO DE HISTAMINA NA SUPEROVULAÇÃO E NA ATRESIA FOLICULAR EM RATAS WISTAR PRÉ-PÚBERES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia.

• **IRIRARAAD**

UNIDADE	CB
Nº CHAMADA	
T/UNICAMP	
M588e	
V	EX
TOMBO BC/	53489
PROC.	124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/04/03
Nº CPD	

CM00182587-7

IBID. 290736

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

MIGUEL, KATIA JACQUELINE

M588e

Estudo da população de mastócitos e da concentração de histamina na superovulação e na atresia em ratas wistar pré-púberes/

Katia Jacqueline Miguel. --

Campinas, SP:[s.n.], 2002.

Orientadora: Regina Célia Spadari-Bratfisch

Co-orientadora: Alzira Amélia Martins Rosa e Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

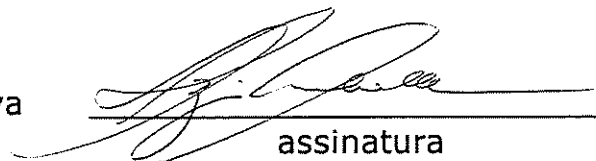
Instituto de Biologia

1.Progesterona. 2.Estradiol. 3.Mastocitos. I. Spadari-Bratfisch, Regina Célia. II. Rosa-e-Silva, Alzira Amélia Martins. III Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 10 de fevereiro de 2003

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Alzira Amélia Martins Rosa e Silva



assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

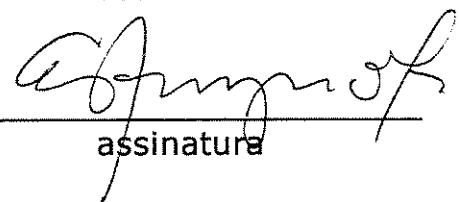
assinatura

Profa. Dra. Laurelúcia Orive Lunardi



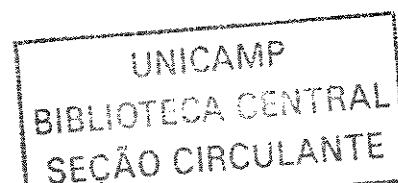
assinatura

Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua



assinatura

7770442



À minha família:
meu pai JAIME, minha mãe ANTÔNIA,
minha irmã IMACULADA (JANE) e meu irmão CLEBER
Agradeço a Deus por tê-los em minha vida.
Vocês são o princípio e a base de tudo.
Amo Vocês!

Dedico esta Dissertação de Mestrado a vocês que são a minha vida.

Agradecimentos Especiais

Agradeço

À DEUS, nosso criador, por mais uma etapa vencida em minha vida. Sei que o Senhor esteve presente em todos os instantes de felicidade e angústia. O Senhor é o meu porto seguro de onde saio e aonde chego.

À Prof^a Dr^a Regina Célia Spadari-Bratfisch

Pela amizade, respeito, constante incentivo ao trabalho e compreensão diante das dificuldades.

À Prof^a Dr^a Alzira Amélia Martins Rosa e Silva

Pela amizade, confiança, paciência e colaboração constantes. Palavras não são suficientes para agradecer-lá por ter dado o melhor de si, mesmo nos momentos mais difíceis, para que eu pudesse alcançar tudo que alcancei. Se hoje posso caminhar na carreira é porque me ensinou a dar os primeiros passos e a andar.

À Prof^a Dr^a Laurelúcia Orive Lunardi

Pela amizade, confiança, incentivo ao trabalho e, sobretudo, pela sua colaboração e orientação em nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Pela amizade, confiança, atenção e valioso incentivo ao trabalho.

À Prof^a Dr^a Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

Pela confiança, atenção, presteza e pela valiosa colaboração em nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. José Carlos Gomes

Por ter cedido gentilmente seu laboratório para que pudéssemos realizar as dosagens de histamina.

Aos docentes, Professores Doutores: Antonio Carlos Boschero, Dora Maria G. Kassisse, Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes e Miguel Arcanjo Areas

Pela confiança, atenção e colaboração que tornaram possível a realização deste trabalho.

Aos meus pais Jaime e Antônia, meus irmãos Imaculada (Jane) e Cleber, minha cunhada Fabiana e ao Baby que está por vir

Pelo amor, carinho e por vocês serem a minha vida. Amo vocês. Vocês são muito especiais para mim.

Às minhas queridas Avós Ana (Nica) e Judith, meus queridos Avôs João[†] e Euclides[‡] ([†]in memoriam), meus queridos padrinhos e primos-irmãos: Tio Sérgio e Tia Eva, Douglas e Renata, Roni e Marília

Pelo amor, carinho, amizade e dedicação com que sempre me acolheram em todos os momentos. Amo vocês.

Vocês são muito especiais para mim.

As minhas queridas primas-sobrinhas: Ana Lara, Victória e Beatriz

Que Deus as protejam, pois vocês são o futuro. Vocês são minhas princesinhas, as tenho em meu coração, vocês são muito especiais para mim. Amo vocês.

Aos meus queridos amigos:

Adriana Calderini, Alexandre Miotto, Ana Letícia de Moraes, Ana Paula Balbi (Tikira), André Moura, Andréa Lima, Bruno Ivo, Carla Piccinato, Carolina Santos, Cleonice Silva, Cleuzenir Barbieri, Christianna Collares (Kika), Dayane Gomes, Danielle Senador, Elisângela Farias-Silva, Emanuel Couto (Mánel), Fabiano Abreu (Jala), Iraídes dos Santos, Jeanne Montrezor, Josemar Vanzo, Luiz Carlos Zuchetto Junior, Luis Henrique Montrezor, Marcelo Inácio, Marcelo Rocha, Marcos Fernando Costa, Marília Montovani, Rildo Volpini (Fedo), Rogério de Azevedo, Rosângela Chrügner (Poodle), Tatiane Zuchetto, Telma Soares (Nega), Maria Theresa Laguna (Thererê) e Valéria Nunes
Pelo carinho e apoio constantes, e por me ensinarem constante e incansavelmente o verdadeiro significado da palavra amizade. Adoro vocês.

Ao Friends: Bruninho, Mánel, Márcelin, Thererê e Tikis

Pelos bons momentos vividos e por tudo que aprendemos juntos. Não importa a distância: Que o Friends nunca saia de cena. Adoro vocês.

À minha afilhada Daniele e sua família: Andréia, Joel, Teresa, Valdemar, Sandra e Douglas

Por estarem sempre dispostos a me ajudar e pelo carinho que sempre me dedicaram.

Aos colegas de pós-graduação do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biologia-UNICAMP e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

Pelo companheirismo ao longo deste trabalho.

Aos técnicos: Rogério Rosário de Azevedo, Dimitrius Leonardo Pitof, Rubens Eduardo de Souza Júnior e Luis

Mais do que pela inestimável colaboração, pelo carinho que sempre me dedicaram e acolheram.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biologia-UNICAMP e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP:

Alexandra, Andréia, Elisa, Fernando, Ivo, Leonardo (Léo), Maria Luiza, Marina e D. Zefa.

Pelos detalhes que fizeram a diferença no dia-a-dia.

Aos animais que cederam suas vidas para que a pesquisa pudesse ser realizada.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela assessoria e apoio financeiro concedido para que este trabalho pudesse ser realizado.

ÍNDICE

Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	x
Abreviações	xi
Resumo	xii
Summary	xiii
I. Introdução Geral	01
1.1. Foliculogênese	02
1.2. Superovulação	05
1.3. Atresia Folicular	07
1.4. Sistema Imunoendócrino	08
1.4.1. Mastócitos/Histamina	08
Capítulo 1. Indução de atresia folicular altera a concentração de histamina intra-ovariana e intra-uterina em ratas pré-púberes?	12
Introdução	13
Material e Métodos	14
Resultados	16
Discussão	23
Capítulo 2. Indução de superovulação altera a concentração de histamina intra-ovariana e intra-uterina em ratas pré-púberes?	27
Introdução	28
Material e Métodos	30
Resultados	32
Discussão	38
II. Conclusão Geral	42
III. Referências Bibliográficas	44
IV. Apêndice de Tabelas	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1A. Concentração de histamina (ng/mg) determinada em ovários de ratas pré-púberes induzida à atresia folicular	17
Figura 1B. Concentração de histamina (ng/mg) determinada no útero de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	17
Figura 2A. Perfil da população de mastócitos ovarianos intactos de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	17
Figura 2B. Perfil da população de mastócitos ovarianos desgranulados de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	17
Figura 3A. Concentração plasmática de estradiol (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	18
Figura 3B. Concentração intra-ovariana de estradiol (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	18
Figura 4A. Concentração plasmática de progesterona (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	19
Figura 4B. Concentração intra-ovariana de progesterona (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	19
Figura 5A. Razão E2:P4 plasmática (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	19
Figura 5B. Razão E2:P4 intra-ovariana (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	19
Figura 6. Fotomicrografias de cortes histológicos de ovário (mastócitos) do grupo de pré-púberes induzidos à atresia folicular (72 horas após PMSG)	20
Figura 7. Fotomicrografias de cortes histológicos de ovário (mastócitos) do grupo de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular (96 horas após PMSG)	20
Figura 8. Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários (foliculos) do grupo de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular (72 horas após PMSG)	21
Figura 9. Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários (foliculos) do grupo de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular (72 horas após PMSG)	21
Figura 10. Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários (foliculos) do grupo de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular (96 horas após PMSG)	22
Figura 11. Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários (foliculos) do grupo de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular (96 horas após PMSG)	22
Figura 12A. Concentração de histamina (ng/mg) determinada em ovários de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	32
Figura 12B. Concentração de histamina (ng/mg) determinada no útero de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	32
Figura 13A. Perfil da população de mastócitos ovarianos intactos de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	33

Figura 13B. Perfil da população de mastócitos ovarianos desgranulados de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	33
Figura 14A. Concentração plasmática de estradiol (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	33
Figura 14B. Concentração intra-ovariana de estradiol (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	33
Figura 15A. Concentração plasmática de progesterona (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	34
Figura 15B. Concentração intra-ovariana de progesterona (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	34
Figura 16A. Razão E2:P4 plasmática (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	35
Figura 16B. Razão E2:P4 intra-ovariana (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	35
Figura 17. Fotomicrografias de cortes histológicos de ovário (mastócitos) do grupo de animais controle (superovulação experimental)	36
Figura 18. Fotomicrografia de corte histológico de ovário (mastócitos) do grupo de animais pré-púberes induzidos à superovulação	36
Figura 19. Fotomicrografias de cortes histológicos de ovários (folículos) do grupo de animais pré-púberes induzidos à superovulação	37
Figura 20. Fotomicrografias de cortes histológicos de ovários (folículos) do grupo de animais pré-púberes induzidos à superovulação	37

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de histamina (ng/mg) determinada em ovários de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	60
Tabela 2. Concentração de histamina (ng/mg) determinada no útero de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	60
Tabela 3. Perfil da população de mastócitos ovarianos intactos de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	60
Tabela 4. Perfil da população de mastócitos ovarianos desgranulados de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	60
Tabela 5. Concentração plasmática de estradiol (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	61
Tabela 6. Concentração intra-ovariana de estradiol (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	61
Tabela 7. Concentração plasmática de progesterona (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	61
Tabela 8. Concentração intra-ovariana de progesterona (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	61
Tabela 9. Razão E2:P4 plasmática (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	62
Tabela 10. Razão E2:P4 intra-ovariana (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular	62
Tabela 11. Concentração de histamina (ng/mg) determinada em ovários de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	62
Tabela 12. Concentração de histamina (ng/mg) determinada no útero de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	62
Tabela 13. Perfil da população de mastócitos ovarianos intactos de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	63
Tabela 14. Perfil da população de mastócitos ovarianos desgranulados de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	63
Tabela 15. Concentração plasmática de estradiol (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	63
Tabela 16. Concentração intra-ovariana de estradiol (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	63
Tabela 17. Concentração plasmática de progesterona (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	64
Tabela 18. Concentração intra-ovariana de progesterona (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	64
Tabela 19. Razão E2:P4 plasmática (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	64
Tabela 20. Razão E2:P4 intra-ovariana (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação	64

ABREVIações

AMP_c – ADENOSINA MONOFOSFATO CÍCLICA

CG – CÉLULA DA GRANULOSA

CT – CÉLULA DA TECA

E₂ – 17 β -ESTRADIOL

FD – FOLÍCULO DOMINANTE

FIV – FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

FSH – HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE

hCG – GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA

IgE – IMUNOGLOBULINA E

IL – INTERLEUCINA

LH – HORMÔNIO LUTEINIZANTE

NGF – FATOR DE CRESCIMENTO DE NERVOS

P₄ – PROGESTERONA

PMSG – SORO DE GONADOTROFINA DE ÉGUA PRENHE

RAZÃO E₂:P₄ – RAZÃO ENTRE ESTRADIOL E PROGESTERONA

RNA_m – ÁCIDO RIBONUCLÉICO MENSAGEIRO

SCF – FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIAS

RESUMO

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido conduzidos visando o conhecimento dos folículos ovarianos e da dinâmica folicular ovariana nas principais espécies de mamíferos domésticos bem como em humanos. Dos folículos que compõem o "pool" de folículos recrutados e selecionados somente um ou alguns poucos (quota ovulatória) ovulam e o restante, que é a grande maioria entra em estado de atresia folicular.

Os mastócitos têm sido estudados principalmente por seu envolvimento em reações alérgicas e inflamatórias. Os mastócitos constituem a principal fonte de histamina nos tecidos. Sabe-se que os mastócitos são influenciados por hormônios esteróides principalmente estradiol e testosterona. A histamina aumenta a permeabilidade vascular e o fluxo sanguíneo ovariano, em resposta ao hormônio luteinizante (LH). Algumas ações dos estrógenos, como vasodilatação e permeabilidade vascular, parecem ser mediadas pela histamina liberada de mastócitos uterinos. Assim, o presente estudo foi conduzido para determinar os efeitos da superovulação e atresia na concentração de histamina no ovário e no útero de ratas pré-púberes. O procedimento experimental de indução de atresia folicular mostrou no ovário características morfológicas e humorais condizentes com o processo clássico de atresia folicular ovariana, ou seja, folículos ovarianos com vários sítios de ruptura nas células da granulosa (CG), aumento da concentração de progesterona e baixa razão entre estradiol e progesterona ($E_2:P_4$). Nestes animais, a concentração de histamina intra-ovariana e intra-uterina estava reduzida. O procedimento experimental de indução de superovulação mostrou, no ovário, características morfológicas e humorais condizentes com o processo clássico de superovulação ovariana, ou seja, folículos pré-ovulatórios com alguns sítios de ruptura, folículos antes da ovulação e folículos depois da ovulação, aumento da concentração de estradiol e de progesterona e elevada razão $E_2:P_4$. Nestes animais, a concentração de histamina intra-uterina estava aumentada, já a concentração de histamina intra-ovariana não se alterou. Estes resultados se revestem de importância ao demonstrarem que existe uma inter-relação entre os sistemas imune e reprodutivo, e que há uma conexão entre hormônios esteróides (estradiol e progesterona), gonadotrofinas (FSH e LH), fatores de crescimento ovarianos e uterinos e mastócitos/histamina.

SUMMARY

Lately several studies have been aiming the understanding of the ovarian follicles and follicular dynamics in the main mammals species as well as in human beings. From those follicles that compound the pool of recruited and selected follicles just only one or a few of them (ovulatory quote) ovulate and the remaining follicles that are majority undergo to atresia.

Mast cells have been studied mainly for their involvement in allergic and inflammatory reactions. These secretory cells are the main source of histamine. Nowadays, it has been well established that sex steroids, particularly estradiol and testosterone, significantly affect mast cells in rodents. Histamine has been proposed increase vascular permeability and ovarian blood flow in response to luteinizing hormone. Some actions of estrogens like uterine vasodilatation and vascular permeability seem to be mediated through the release of histamine from uterine mast cells. So, the present study was conducted to determine the effects of superovulation and atresia on ovarian and uterine histamine concentration in pre-pubertal female rats. The experimental procedure of follicular atresia induction showed that the morphological and hormonal characteristics in the ovary are similar to that classic ovarian atresia process: ovarian follicles with many rupture site forms in the granulosa cells, layer increased progesterone concentration and decreased ratio $E_2:P_4$ and reduced intra-ovarian and intra-uterine histamine concentration. The experimental procedure of superovulation induction showed that morphological and hormonal characteristics in the ovary are the same from the classic superovulation process: the presence of many pre- and post-ovulatory follicles, increased estradiol and progesterone concentrations and increased ratio $E_2:P_4$. The intra-uterine histamine concentration was low and the intra-ovarian histamine concentration did not change. This results are important because based on them it is possible to show that there is a inter-relationship between endocrine and immunological systems and there is a connection between steroids hormones (estradiol and progesterone), gonadotrophins (FSH and LH), ovarian and uterine growth factors and mast cells/histamine.

*“O grande Mestre do Céu, nosso Criador,
Quando nascemos um dom nos dá
E cada um segue na vida o seu destino...”*

Chitãozinho & Xororó

Introdução Geral

I - INTRODUÇÃO GERAL

No período pré-púbere inicia-se o desenvolvimento ovariano (foliculogênese) sob o controle de gonadotrofinas. Há um aumento progressivo no nível do hormônio folículo estimulante (FSH) e seleção de folículos ovarianos. Segundo OJEDA e URBANSKI (1994), a puberdade pode ser caracterizada como um período transitório na vida do animal, quando o processo gradual de maturação sexual se instala, culminando com o aparecimento da função reprodutiva do adulto. Neste período um grande número de eventos fisiológicos estão interconectados.

Assim, a instalação da puberdade em ratas, caracteriza-se por um primeiro sinal externo, que é a abertura vaginal por volta dos 34 dias de idade. Esta característica está associada à primeira ovulação, permitindo assim, o estabelecimento de um correlato somático com o surgimento das gonadotrofinas pré-ovulatórias (ROSA-e-SILVA *et al.*, 1982), com consequente aumento da produção de esteróides pelos ovários.

O período puberal é caracterizado pelo aumento de esteróides ovarianos, principalmente o estradiol (E_2) (OJEDA e URBANSKI, 1994) que induzem a abertura vaginal e estimulam os órgãos sexuais acessórios. Os hormônios FSH e LH estimulam o crescimento dos folículos ovarianos de modo que ocorre a primeira ovulação, definindo a maturação sexual (ODELL *et al.*, 1990).

1.1. FOLICULOGÊNESE

Nos últimos anos, diversos estudos foram conduzidos visando o conhecimento do processo de crescimento dos folículos ovarianos e da dinâmica ovariana nas principais espécies de mamíferos domésticos (EPPIG *et al.*, 1989; DANIEL *et al.*, 1990; SANTOS, 1997; FIGUEIREDO e RODRIGUES, 2001; FORTUNE *et al.*, 2001). O ovário detém, em sua essência fisiológica, a capacidade de produzir oócitos, os gametas femininos, além de garantir o ambiente hormonal que sustenta a atividade reprodutiva (para revisão ver ERICKSON, 2001).

Apesar do conceito de que as gonadotrofinas são os reguladores primários da foliculogênese, aceita-se atualmente que há um controle intra-ovariano das funções reprodutivas, sendo este um sistema complexo relacionado, na maioria das vezes, à

modulação das respostas foliculares às gonadotrofinas circulantes (ADASHI e ROBAN, 1992; JONES e CLEMMONS, 1995; ARMSTRONG *et al.*, 1996; MONGET *et al.*, 1996; FORTUNE *et al.*, 2001).

Considera-se o folículo como a principal unidade morfofuncional do ovário, o qual produz esteróides, polipeptídeos e fatores diversos, essenciais para que a dinâmica ovariana ocorra de maneira harmônica. A associação da ação dos hormônios hipofisários – FSH e LH – aos produtos ovarianos citados garante a regulação do ciclo estral/menstrual (IRELAND, 1987; NAYUDU e OSBORN, 1992; FIGUEIREDO e RODRIGUES, 2001; FORTUNE *et al.*, 2001).

GOE-LANGTON e ARMSTRONG (1994) referindo-se ao conhecimento atual em fisiologia folicular ovariana, avaliaram que os hormônios esteróides representam os produtos foliculares mais conhecidos e melhor caracterizados. No ovário de fêmeas adultas de mamíferos a maior parte dos folículos ovarianos encontra-se no estágio primordial (RICHARDS, 1980; HIRSHFIELD, 1986; TAHA e SCHELLANDER, 1992; AMORIM *et al.*, 2000; PICTON, 2001).

O número de folículos primordiais presentes nos ovários é estabelecido ao nascimento e este conjunto de folículos constitui a reserva total de oócitos a serem recrutados, selecionados e ovulados ao longo da vida reprodutiva (BYSKOV, 1978; TAHA e SCHELLANDER, 1992; BECKERS *et al.*, 1996; AMORIM *et al.*, 2000; FORTUNE *et al.*, 2001; PICTON, 2001).

Os folículos primordiais consistem de um oócito em prófase I da primeira divisão meiótica, envolvido por células pré-granulosas achatadas (HIRSHFIELD, 1991; PICTON, 2001) e uma lâmina basal. Devido à natureza avascular da parte do ovário, onde estão localizados os folículos primordiais, considera-se que os fatores de crescimento produzidos localmente sejam os reguladores mais prováveis da ativação de folículos primordiais para a fase de crescimento, e não os fatores endócrinos sistêmicos (HIRSHFIELD, 1991; PICTON, 2001).

Durante o desenvolvimento pré-antral, o oócito aumenta seu diâmetro e a zona pelúcida forma-se entre este e as células da granulosa (CG). Estas células adquirem configuração cuboidal e representam o sítio sintético dos componentes da matriz extracelular (BAKER e SPEARS, 1999). Estes folículos primordiais ativados deixam, assim, seu pequeno grupo e dão origem aos chamados folículos primários. As células da teca (CT) são geralmente indistinguíveis até o folículo apresentar multicamadas de

CG. Estas, quando se desenvolvem, caracterizam o folículo secundário (SOPELAK, 1997; BAKER e SPEARS, 1999). Destaca-se, ainda, que gonadotrofinas apresentam ação trófica sobre as células foliculares, especialmente sobre as CG (HIRSHFIELD, 1991).

Continuando seu desenvolvimento, os folículos passam a adquirir cavidade antral repleta de fluido. A formação antral inicia-se quando a população de CG alcança aproximadamente duas a três mil células, na maioria das espécies estudadas (GOSDEN *et al.*, 1993(a); WEBB *et al.*, 1999). Folículos maduros contêm várias camadas de CT associadas. A mais próxima camada, associada à face externa da lâmina basal, é facilmente identificada por sua alta vascularização, além destas células apresentarem gotas lipídicas e serem estruturalmente mais arredondadas que as CT externas (O'SHEA, 1971; HSUEH *et al.*, 2000; PICTON, 2001; para revisão ver ERICKSON, 2001).

A expressão de receptores para FSH em folículos é notada desde os estágios iniciais de desenvolvimento folicular no feto (BAO e GARVERICK, 1998), mas continua incerto se gonadotrofinas hipofisárias ou placentárias exercem qualquer efeito neste estágio de desenvolvimento gonadal (WEBB *et al.*, 1999). O processo de foliculogênese pode ser dividido em fases de acordo com a necessidade ou não de gonadotrofinas para o desenvolvimento folicular, sendo o desenvolvimento até folículo primordial independente de gonadotrofinas, de primordial até antral inicial sensível a gonadotrofinas e a partir de então, dependente de gonadotrofinas (FSH primeiramente e LH, posteriormente) (DRIANCOURT, 1991; McNEILLY *et al.*, 1991; WEBB *et al.*, 1999).

Os folículos ovarianos produzem uma quantidade considerável de fatores de crescimento e/ou bloqueadores de crescimento de ação local. Podem ser peptídeos, proteínas e outras substâncias que interagem diretamente com as células que os sintetizam (função autócrina) ou com outros tipos celulares durante o desenvolvimento folicular (função parácrina), estimulando e/ou atenuando as respostas celulares às gonadotrofinas. Mecanismos como o justácrino (ativação de receptores nas membranas celulares adjacentes às células sintetizadoras desses fatores) e intrácrino (estimulação da célula sintetizadora do fator sem que haja secreção imediata do mesmo) são também reconhecidos como estratégias pelas quais as CT e CG podem controlar o

desenvolvimento folicular ovariano (HIRSHFIELD, 1991; ARMSTRONG e WEBB, 1997; BAKER e SPEARS, 1999).

1.2. SUPEROVULAÇÃO

O processo de contínuo crescimento e regressão de folículos antrais que culmina com o aparecimento de folículos pré-ovulatórios é denominado dinâmica folicular. Assim, como avaliou HODGEN (1982), a garantia da perfeita dinâmica folicular é dada pelos processos de recrutamento, seleção e dominância dos folículos em um ciclo estral/menstrual.

Desta forma, definiu-se o recrutamento como a fase em que uma quantidade de folículos iniciam o desenvolvimento após estímulo gonadotrópico (FSH) tônico para permitir progressão em direção à ovulação (LUCY *et al.*, 1992). A etapa de seleção ocorre quando os folículos (ou o folículo, em espécies monovulatórias) são escolhidos e impedidos de entrar em atresia, apresentando ainda competência para atingir ovulação. Os folículos selecionados, por sua vez entram em dominância e, a partir de então, impedem o recrutamento de uma nova corte de folículos bem como inibem o desenvolvimento de seus subordinados (HODGEN, 1982; LUCY *et al.*, 1992). Assim, gradual e continuamente alguns folículos deixam seu grupo, dando início ao seu crescimento.

Os mecanismos de controle do recrutamento inicial dos folículos primordiais ainda são bastante controversos. Compreender o processo através do qual um folículo é escolhido entre os recrutados e, assim, é impedido de entrar em atresia, apresentando, portanto, potencial para alcançar ovulação, tem sido um dos principais objetivos de diversos pesquisadores da área de reprodução animal.

O processo de seleção folicular envolve níveis superiores de organização na dependência de gonadotrofinas, LH e FSH, que por sua vez influenciam a citodiferenciação das CG, das CT e dos oócitos. Assim, somente alguns folículos alcançam estágios pré-ovulatórios e a maioria dos folículos entra em atresia (GORE-LANGTON e ARMSTRONG, 1994).

RICHARDS (1980), trabalhando com camundongas, ressaltou a capacidade do E₂ em aumentar a responsividade ao FSH, já que altas concentrações deste estrógeno no fluido folicular do folículo dominante (FD) podem aumentar a sensibilidade ao FSH.

A visão tradicional de regulação interfolicular da dominância compreende a secreção de alguns fatores pelo FD, capazes de inibir o desenvolvimento de seus vizinhos subordinados (BAKER e SPEARS, 1999). Como existe uma população de células afetando o destino de outras células não equivalentes, pode-se dizer que os fatores liberados representam “sinais de indução” produzidos pelo FD (BAKER e SPEARS, 1999).

Um aumento da taxa ovulatória é um procedimento de suma importância para o estudo do mecanismo básico ovulatório em animais de laboratório, além de ser aplicado em animais domésticos, visando a produção animal e em seres humanos almejando o sucesso na perpetuação da espécie, nos procedimentos de fertilização *in vitro*. Este processo é conhecido por superovulação e só é considerado como tal, quando a quota ovulatória desta espécie é dobrada.

Diversos pesquisadores utilizam a técnica de tratamento com Soro de Gonadotrofina de Égua Prenhe (PMSG) e com Gonadotrofina Coriônica humana (hCG), na indução de ovulação em ratas pré-púberes, sendo que os resultados esperados são satisfatórios em sua maioria. Além da técnica da indução de ovulação em animais imaturos, o PMSG e o hCG também podem ser utilizados com sucesso na indução de superovulação em animais de laboratório.

O PMSG tem efeito semelhante ao do hormônio folículo estimulante e uma única injeção é suficiente para se manter uma população de folículos em crescimento destinados à ovulação (JUNEJA e DODSON, 1995). Além disso sua molécula também apresenta bioatividade semelhante à do LH. Assim o PMSG tem a habilidade de promover aumento nas primeiras etapas da esteroidogênese, proporcionando um aumento global dos esteróides (GREENWALD e ROY, 1994). Já o hCG tem efeito fisiológico semelhante ao do hormônio luteinizante e é administrado para facilitar a ruptura dos folículos ovarianos (JUNEJA e DODSON, 1995).

Trabalhos clássicos da literatura já mostravam claramente que, em ratas, a administração de PMSG acompanhado do hCG, induz superovulação em animais imaturos. GREENWALD e ROY (1994) utilizando ratas que aos 30 dias de idade receberam uma única injeção de 30UI de PMSG e, 56 horas depois, 10UI de hCG, observaram que houve um aumento no número de ovulações, chegando ao máximo de 55 óvulos ovulados entre 23 a 32 dias de idade, porém decrescendo a 18 óvulos

ovulados entre 39 e 40 dias de idade. Neste processo observa-se um aumento expressivo da aromatase, enzima que produz E_2 a partir dos andrógenos ovarianos.

1.3. ATRESIA FOLICULAR

Nas várias espécies animais, observa-se que 70-99% dos folículos ovarianos são eliminados antes de maturarem completamente (PELUSO *et al.*, 1977(a); PELUSO *et al.* 1977(b); BYSKOV, 1978; RICHARDS *et al.*, 1979; RICHARDS, 1980; HIRSHFIELD, 1986; FORTUNE, 1994; FORTUNE *et al.*, 2001). Tal processo degenerativo pelo qual os folículos são eliminados nas várias etapas de desenvolvimento antes de alcançarem a ovulação é denominado atresia folicular. Deve-se lembrar ainda que o processo degenerativo característico da atresia folicular ocorre por dois caminhos, necrose ou apoptose, sendo essa última uma importante forma de detecção da atresia folicular e a mais aceita atualmente (FORTUNE, 1994; FIGUEIREDO e RODRIGUES, 2001; FORTUNE *et al.*, 2001).

Atentando-se ao fato de que a atresia folicular pode ser observada em todos os estágios do ciclo reprodutivo, nas gônadas, diversos hormônios e fatores de crescimento podem agir como fatores de sobrevivência para inibir ou induzir apoptose. GORE-LANGTON e ARMSTRONG (1994) estudando folículos com recente formação de antro e mesmo folículos pré-ovulatórios, ambos tratados com FSH, verificaram que os mesmos apresentaram indução espontânea da fragmentação de DNA internucleossomal característica da apoptose celular.

Em camundongas e ratas, demonstrou-se que apesar de pouca atresia ocorrer durante as primeiras sete gerações de CG, a maioria dos folículos torna-se atrésico durante a oitava e a nona gerações. Em teoria, apenas os folículos que estão expostos a sinais adicionais específicos continuam a crescer até a décima geração de camadas de CG (FORTUNE, 1994). Em outras espécies, como a bovina, a vasta maioria dos processos atrésicos ocorre durante o curso de poucas gerações de CG, próxima ao final do desenvolvimento folicular, especialmente durante o curto período de desenvolvimento que precede a penúltima geração de CG (FORTUNE, 1994; FIGUEIREDO e RODRIGUES, 2001; FORTUNE *et al.*, 2001).

GREENWALD e ROY (1994) relatam que ratas com 26 dias de idade que receberam 5UI de PMSG apresentaram folículos capazes de ovular. Porém as mesmas

não ovularam e tiveram seus folículos rapidamente degenerados 60 a 72 horas após o tratamento com PMSG. Ultraestruturalmente o sinal da atresia é aparente após 72 horas, quando 28% dos folículos são atrésicos, apresentando degeneração de áreas focais na célula da granulosa; em 96 horas todos os folículos antrais foram degenerados. Deste modo, a comunicação célula-a-célula foi rompida, sendo que as concentrações de testosterona e estradiol ovarianos foram significativamente reduzidas 72 e 96 horas quando comparadas a 48 horas após a administração de PMSG.

1.4. SISTEMA IMUNOENDÓCRINO

Atualmente está claro que existem interações complexas entre o sistema endócrino e o sistema imunológico, no que se refere à ação de vários hormônios afetando a imunidade natural, modificando o número total de células imunocompetentes, como os mastócitos, e a modulação da responsividade celular a antígenos estranhos, função fagocítica e eventos da cascata inflamatória (REICHLIN, 1993).

Diversos fatores secretados pelas células imunocompetentes podem agir diretamente sobre o eixo hipotálamo-hipófise-glândulas endócrinas, induzindo modificação na secreção hormonal (JONES *et al.*, 1994).

1.4.1. MASTÓCITOS/HISTAMINA

Nos últimos anos houve um aumento considerável de estudos que visam conhecer a regulação endócrina de mastócitos, células envolvidas na resposta inflamatória. Os mastócitos constituem uma população heterogênea de células, que variam amplamente na forma, função e composição química nas diferentes espécies animais e nos diversos tecidos (ASKENASE, 1980; METCALFE *et al.*, 1997; BEIL *et al.*, 2000). Os precursores dos mastócitos, ainda bastante indiferenciados, entram na circulação em pequenas quantidades e antes que possam ser morfológicamente identificados. Nos tecidos periféricos podem proliferar e ou diferenciar-se sob a influência de fatores ambientais, do fator estimulante de colônia (SCF) e outras citocinas produzidas localmente (METCALFE *et al.*, 1997).

Mastócitos são encontrados normalmente, nos espaços extravasculares sangüíneos e linfáticos (COLUMBO *et al.*, 1995), ao redor ou no interior de nervos (MYERS *et al.*, 1991) e às vezes, em superfícies epiteliais expostas a antígenos do meio ambiente, como nos sistemas respiratório e gastrointestinal. São originados de células precursoras pluripotentes, provenientes da medula óssea (METCALFE *et al.*, 1997).

Os mastócitos têm fascinado a comunidade científica, por apresentarem o citoplasma carregado de grânulos ricos em proteoglicanas e proteases (METCALFE *et al.*, 1997). Além de possuírem um alto teor de heparina, os mastócitos ainda armazenam, em seus grânulos, grande quantidade de produtos biologicamente ativos entre os quais: histamina (DVORAK *et al.*, 1993), bradicinina, α quimase (LOGIN *et al.*, 1987), enzimas lisossomais (JAMUR e VUGMAN, 1988), óxido nítrico (HUANG *et al.*, 1995) e, em algumas espécies, serotonina (DVORAK, 1991).

A proliferação e o desenvolvimento dos mastócitos dependem de Células T e de algumas citocinas (interleucinas – IL) como: IL-3, IL-4, IL-9 e IL-10, além de fatores de crescimento derivados de fibroblastos, fator estimulante de colônias (SCF) e fator de crescimento dos nervos (NGF) (KITAMURA *et al.*, 1993; METCALFE *et al.*, 1997).

Apesar de muitas células serem envolvidas na cascata de eventos da alergia, o mastócito é a célula efetora inicial na doença alérgica em virtude de sua localização no tecido residente (METCALFE *et al.*, 1997). A ligação de antígenos multivalentes ao receptor próprio de Imunoglobulina E (IgE), que é o anticorpo fixo na superfície do mastócito, causa a desgranulação do mastócito, com consequente liberação de mediadores na reação alérgica (METCALFE *et al.*, 1997).

Os mastócitos podem ser considerados como células efetoras imprescindíveis na reação inflamatória básica a uma hipersensibilidade imediata. Podem ainda participar ativamente e contribuir no desenvolvimento e modulação de numerosos processos inflamatórios e fisiológicos. Mudanças no número de mastócitos em vários sítios anatômicos e/ou evidências de desgranulação tem sido observada em um grande espectro de respostas imunes próprias, adaptativas e patológicas em um amplo número de doenças ou processos relacionados a doenças, incluindo reações de hipersensibilidade tardia, fibrose tecidual, patologias autoimunes, neoplasias e doenças inflamatórias do intestino (METCALFE *et al.*, 1997).

Atualmente a função fisiológica dos mastócitos na inflamação e em reações alérgicas é muito conhecida. Porém, pouco se sabe da regulação endócrina destas células. Em geral, trabalhos realizados com esteróides sexuais, utilizam a população de mastócitos presentes na glândula harderiana de roedores, na cavidade peritoneal, no útero e no interstício testicular, em animais adultos.

MODAT e colaboradores (1982) observaram que o número e o tamanho de mastócitos peritoneais de ratas diminuíram após a ovariectomia. Este efeito foi parcialmente inibido pela administração de E₂ exógeno.

A histamina participa da regulação da permeabilidade capilar e do fluxo sanguíneo ovariano, além de estimular a contratilidade ovariana, a ovulação e a secreção de progesterona folicular *in vitro* (KRISHNA *et al.*, 1989).

Diversos trabalhos efetuados com fêmeas demonstram variação na população de mastócitos e na liberação de histamina no ovário e no útero função da fase do ciclo estral/menstrual e que os estrógenos podem estimular a proliferação de mastócitos em determinadas fases do ciclo sexual (PADILLA *et al.*, 1990).

JAISWAL e KRISHNA (1996) estudando a variação no número e a desgranulação de mastócitos no complexo ovariano de camundongas, verificaram que os hormônios FSH, LH e E₂, causam aumento na desgranulação de mastócitos ovarianos.

Segundo HUNT e colaboradores (1997) estrógenos e progesterona (P₄) podem ser considerados sinais do meio endócrino que governam a síntese de células imunes uterinas de substâncias pró-inflamatórias.

Existem duas situações de interesse na literatura: a superovulação e a atresia folicular, que se caracterizam por aumento e diminuição do E₂, respectivamente. Tanto a superovulação quanto a atresia podem ser induzidas experimentalmente.

Até aonde pudemos constatar, não estão descritos na literatura, os efeitos de indução de superovulação e de atresia folicular, em ratas pré-púberes, sobre o binômio mastócito/histamina. Portanto, nossos objetivos foram analisar não só as alterações da população de mastócitos decorrentes da alteração de E₂, oriunda de indução de superovulação e atresia folicular, mas também o que os próprios processos (superovulação e atresia folicular) afetariam nessa população de células e histamina.

Assim os objetivos específicos do presente estudo foram:

1. Padronizar as técnicas de indução de atresia folicular e de superovulação em ratas pré-púberes;
2. Estudar os efeitos da indução de atresia folicular bem como de superovulação em ratas pré-púberes sobre os mastócitos/histamina presentes no ovário e no útero.

*“É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar
que em dias tristes, em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver.”*

Martin Lúther King

Capítulo 1. *Indução de atresia folicular altera a concentração de histamina intra-ovariana e intra-uterina em ratas pré-púberes?*

TÍTULO: INDUÇÃO DE ATRESIA FOLICULAR AFETA A CONCENTRAÇÃO DE HISTAMINA INTRA-OVARIANA E INTRA-UTERINA EM RATAS PRÉ-PÚBERES?

INTRODUÇÃO

A dependência de gonadotrofinas para o crescimento e diferenciação de folículos médios e grandes é conhecida. Alguns estudos relatam que tanto o hormônio folículo estimulante (FSH) quanto o hormônio luteinizante (LH) são necessários para o crescimento e desenvolvimento de folículos que poderão ovular no próximo ciclo estral/menstrual (para revisão ver ERICKSON, 2001). Uma vez que os folículos iniciam seu crescimento eles podem ser destinados à ovulação ou entrarem em atresia folicular (PELUSO *et al.*, 1977(a); PELUSO *et al.* 1977(b); RICHARDS *et al.*, 1979; RICHARDS, 1980; HIRSHFIELD, 1986).

O recrutamento de folículos ovarianos ocorre em duas etapas, sendo que a primeira etapa consiste no recrutamento de uma grande quantidade de folículos, porém esta quantidade é reduzida para um número apropriado de folículos para ovulação, enquanto a grande maioria entra em estado de atresia folicular (HIRSHFIELD, 1982; KAIPIA e HSUEH, 1997). Os estímulos hormonais que governam a primeira etapa da seleção folicular (recrutamento) em roedores estão bem caracterizados, porém pouco se sabe sobre os fatores que governam o segundo processo (atresia).

A atresia folicular é caracterizada por uma diminuição significativa no número de células da granulosa, diminuição no número de receptores de FSH e LH (IRELAND e ROCHE, 1983) e diminuição na capacidade de produção de E₂ (BADINGA *et al.*, 1992; DE LA SOTA *et al.*, 1993).

A ocorrência da morte celular natural em folículos ovarianos foi primeiro descrita por FLEMMING (1885), baseado em observações de alterações morfológicas nos folículos ovarianos estudados (HSU e HSUEH, 1997). A destruição de células foliculares associadas com a formação de núcleo picnótico é chamada de atresia folicular (KAIPIA e HSUEH, 1997; AMSTERDAM *et al.*, 1999). A degeneração folicular ou atresia folicular é um processo de apoptose envolvido por diversos sinais hormonais (HSUEH *et al.*, 1994; HSU e HSUEH, 1997; KAIPIA e HSUEH, 1997) que ocorrerem em todos os estágios do desenvolvimento folicular ovariano (HIRSHFIELD, 1991; HSUEH *et al.*, 1996; HSU e HSUEH, 1997; KAIPIA e HSUEH, 1997).

A interação entre os sistemas reprodutivo e imune compõe uma importante função imunoregulatória, uma vez que evidências clínicas e experimentais suportam a hipótese de que os esteróides gonadais regulam funções imunes (DIXON NORTHERN *et al.*, 1994). Por outro lado, as células do sistema imune também afetam o sistema endócrino/reprodutor. Neste aspecto, a participação dos mastócitos no processo ovulatório tem se tornado cada vez mais evidente.

Os mastócitos liberam histamina (PARSHAD e KATHPALIA, 1988; KITAMURA *et al.*, 1993; METCALFE *et al.*, 1997) que está envolvida em numerosas funções reprodutivas, tais como, regulação do crescimento e vascularização folicular ovariana, mediador de ações hormonais, ovulação, contratilidade uterina e implantação do blastocisto (PARSHAD e KATHPALIA, 1988; JONES, 1994).

A vasodilatação, a permeabilidade vascular e o crescimento uterino são mediados pela liberação de histamina de mastócitos uterinos, a qual parece ser mediada pela ação de estrógenos (PADILLA *et al.*, 1990).

Tendo em vista a importância da participação do sistema imune em diversas situações do sistema reprodutivo, nosso objetivo neste estudo foi avaliar a população de mastócito bem como a concentração de histamina em condições onde constatamos alta concentração de P₄ (atresia folicular).

MATERIAL E MÉTODOS

Ratas albinas variedade Wistar, com 26 dias de vida (pré-púberes) foram utilizadas nesse estudo. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, recebendo água e ração comercial “*ad libitum*”. Foram utilizados animais controle e animais submetidos ao tratamento com PMSG.

Os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo 1: Ratas com 26 dias de vida (pré-púberes) receberam injeção subcutânea com 5UI de PMSG. Os animais foram sacrificados por decapitação 72 horas após este tratamento. Os animais controle receberam injeção subcutânea de veículo diluidor de PMSG (solução de NaCl a 0,9% - salina), sendo sacrificados por decapitação 72 horas após.

Grupo 2: Ratas com 26 dias de vida (pré-púberes) receberam injeção subcutânea com 5UI de PMSG. Os animais foram sacrificados por decapitação 96 horas após este tratamento. Os animais controle receberam injeção subcutânea de veículo diluidor de PMSG (solução de NaCl a 0,9% - salina), sendo sacrificados por decapitação 96 horas após.

Dos animais sacrificados foram coletados:

Sangue: para dosagem hormonal;

Ovários direito e esquerdo: para dosagem de hormônios (E_2 e P_4) e de histamina, e para confecção de lâminas histológicas para contagem de mastócitos ovarianos;

Útero: para dosagem de histamina.

Dosagem de esteróides:

O sangue foi coletado logo após a decapitação do animal e centrifugado a 2500 rpm, durante 15 minutos, a 4°C. O plasma foi separado e estocado a -20°C para dosagem de E_2 e P_4 . Para a dosagem destes hormônios foram utilizados *Kits* da Diagnostic Products Corporation (DPC, Immulite System, Los Angeles, Califórnia). Foi utilizado o método de quimioluminescência, realizado em simplicata. Todas as amostras foram dosadas com um mesmo kit em único ensaio.

O ovário direito, após ser dissecado, foi pesado e imerso em nitrogênio líquido, sendo mantido em "freezer" a -70°C, para dosagem de E_2 e P_4 , pelo método de radioimunoensaio, descrito por BÉLANGER *et al.*, 1980 e modificado por ROSA-e-SILVA *et al.*, 1993.

Dosagem de histamina:

O ovário esquerdo e o útero, depois de dissecados, foram pesados e imersos em 3mL de ácido perclórico a 0,4N, sendo mantidos em geladeira até a homogenização. Após a homogenização o material foi centrifugado para dosagem de histamina. O método de extração para dosagem da concentração de histamina foi o descrito por SHORE *et al.*, 1959. As extrações e dosagens de histamina foram feitas

pelo método fluorimétrico através do processo automático descrito SIRAGANIAN, 1974.

As amostras contendo histamina foram submetidas à extração butanólica após adição de NaOH a 2M saturado com NaCl. A fase aquosa foi desprezada e à fase orgânica foi adicionado NaOH a 0,1M saturado com NaCl para remover resíduos orgânicos. A fase aquosa foi novamente desprezada e, então, foi adicionado HCl a 0,1N para acidificar o meio, e heptano para facilitar a passagem de histamina à fase aquosa. A fase orgânica foi desprezada ficando a histamina extraída na fase aquosa ácida. Após extração, a histamina foi condensada em ortoftaldeído (OPT) em solução fortemente alcalina. O resultado foi um produto fluorescente, posteriormente estabilizado com HCl a 3N. A intensidade de fluorescência fornece a base para o cálculo da porcentagem de histamina liberada, sendo o padrão utilizado de 50 ng/mL.

Histologia ovariana:

O ovário esquerdo foi dissecado, pesado e imerso em formaldeído 4%, pH 7,4, para posterior preparo de cortes de lâmina histológica. Os corte histológicos foram de 5 micrômetros, sendo os cortes corados com a coloração Giemsa e observados em microscópio de luz convencional em objetiva de 40x.

Análise estatística:

Os resultados estão expressos como médias $\pm$ erro padrão da média, submetidos ao teste estatístico de análise de variância (ANOVA) não-paramétrica, seguida do teste de Kruskal-Wallis. Sendo as diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

A Figura 1 mostra as concentrações de histamina intra-ovariana e intra-uterina, respectivamente. Estes resultados nos mostram que há uma redução significativa tanto na concentração de histamina intra-ovariana (Figura 1A) quanto na concentração de histamina intra-uterina (Figura 1B) nos animais submetidos à indução de atresia folicular (72 horas após PMSG) quando comparados aos seus respectivos grupos controles (animais pré-púberes) (tabelas 1 e 2 do apêndice).

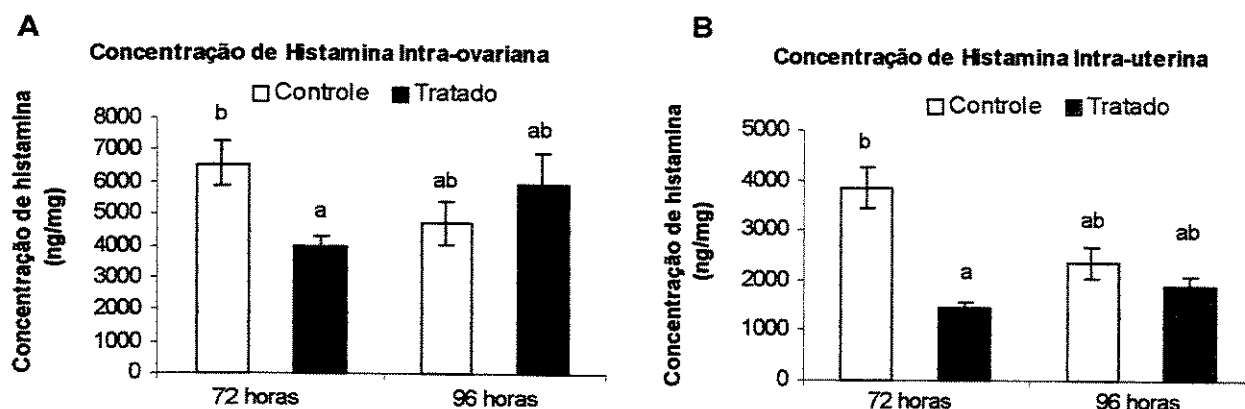


Figura 1. Concentração de histamina (ng/mg) determinada em ovários (A) e em útero (B) de ratas induzidas à atresia folicular 72 ou 96 horas após PMSG (média $\pm$ erro padrão da média). Teste estatístico: análise de variância (ANOVA) não-paramétrica, seguida do teste de Kruskal Wallis, onde letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas. ($p < 0,05$)

Na Figura 2 podemos verificar a população de mastócitos ovarianos intactos e desgranulados. A Figura 2A mostra que há diminuição na população de mastócitos ovarianos intactos nos animais submetidos à indução de atresia folicular (72 horas após PMSG). Na Figura 2B observamos que há aumento significativo na população de mastócitos ovarianos desgranulados nos animais submetidos à indução de atresia folicular (72 horas após PMSG) (tabelas 3 e 4 do apêndice).

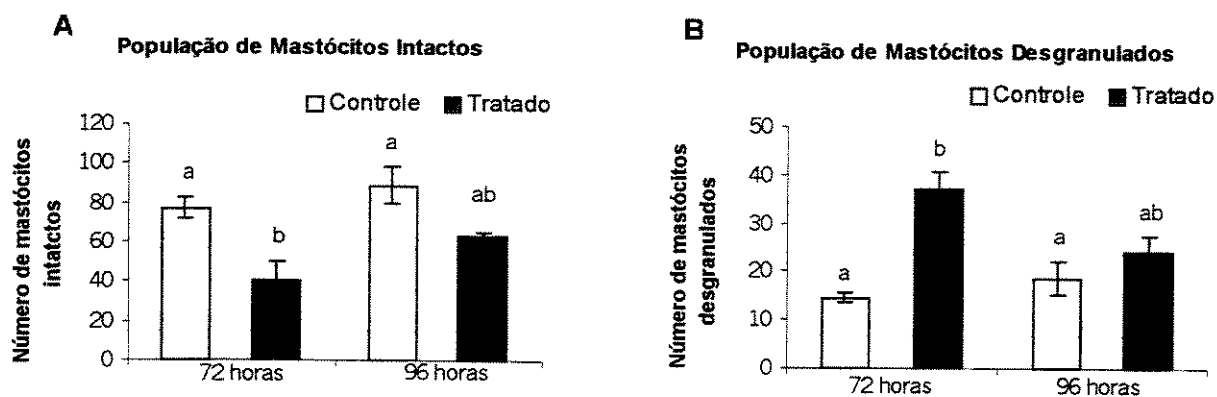


Figura 2. População de mastócitos no ovário de ratas induzidas à atresia folicular 72 ou 96 horas após PMSG (média $\pm$ erro padrão da média). A: Mastócitos intactos; B: Mastócitos desgranulados. Teste estatístico: análise de variância (ANOVA) não-paramétrica, seguida do teste de Kruskal Wallis, onde letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas. ($p < 0,05$)

A Figura 3 nos mostram a concentração plasmática e intra-ovariana de estradiol. Observamos que não há diferenças significativas entre os grupos experimentais (tabelas 5 e 6 do apêndice).

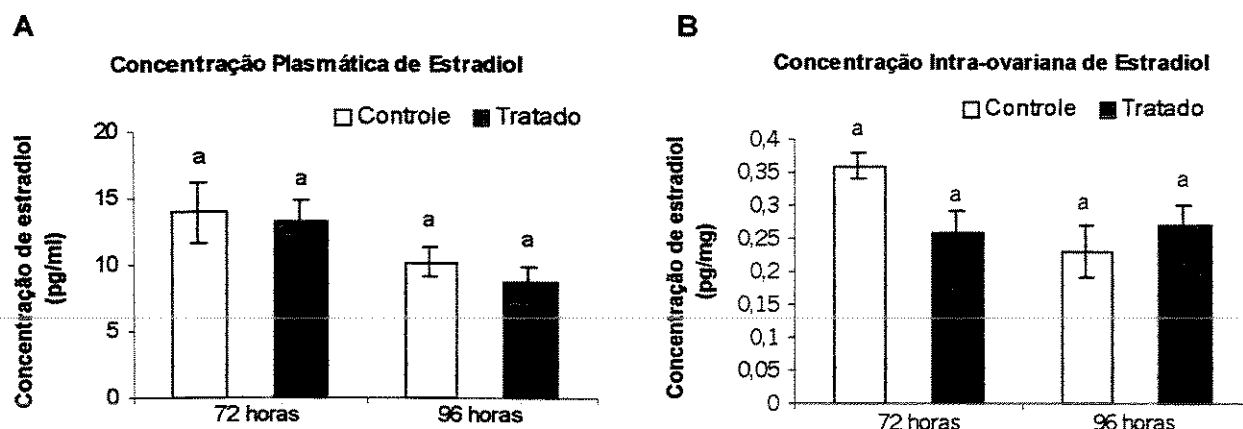


Figura 3. Concentração de estradiol onde: **A:** Concentração plasmática de estradiol (pg/ml) e **B:** Concentração intra-ovariana de estradiol (pg/mg) em ratas induzidas à atresia folicular 72 ou 96 horas após PMSG (média $\pm$ erro padrão da média). Teste estatístico: análise de variância (ANOVA) não-paramétrica, seguida do teste de Kruskal Wallis.

A Figura 4 representa a concentração plasmática e intra-ovariana de progesterona. Notamos que há um aumento significativo na concentração plasmática de progesterona (Figura 4A) nos animais submetidos à indução de atresia folicular (96 horas após PMSG) quando comparado aos demais grupos experimentais. A concentração intra-ovariana de progesterona (Figura 4B) está aumentada nos animais submetidos à indução de atresia folicular (72 e 96 horas após PMSG) quando comparado aos grupos controles (animais pré-púberes) (tabelas 7 e 8 do apêndice).

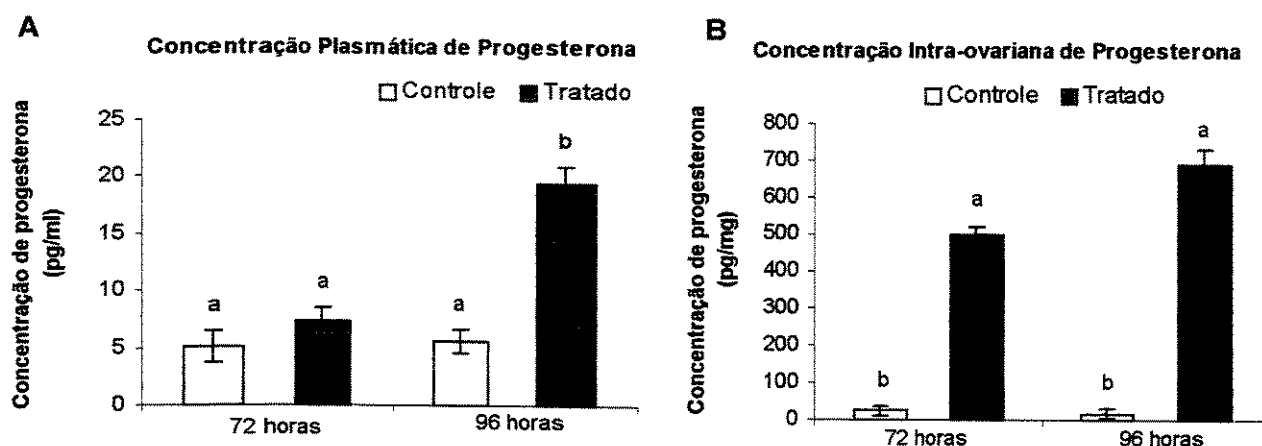


Figura 4. Concentração de progesterona onde: **A:** Concentração plasmática de progesterona (pg/ml) e **B:** Concentração intra-ovariana de progesterona (pg/mg) em ratas induzidas à atresia folicular 72 ou 96 horas após PMSG (média $\pm$ erro padrão da média). Teste estatístico: análise de variância (ANOVA) não-paramétrica, seguida do teste de Kruskal Wallis, onde letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas. ($p < 0,001$)

Na Figura 5 podemos verificar a razão entre o E_2 e a P_4 ($E_2:P_4$) plasmática e intra-ovariana. Observamos que a razão $E_2:P_4$ plasmática (Figura 5A) e a razão $E_2:P_4$ intra-ovariana (Figura 5B) são menores nos animais submetidos à indução de atresia folicular (72 e 96 horas após PMSG) quando comparados aos grupos controle (animais pré-púberes) (tabelas 9 e 10 do apêndice).

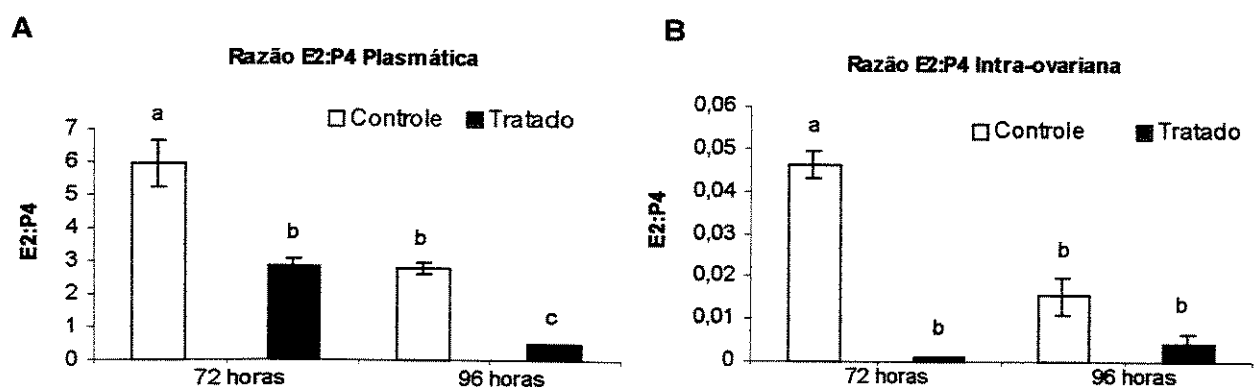


Figura 5. Razão $E_2:P_4$ plasmática (A) e intra-ovariana (B) de ratas induzidas à atresia folicular 72 ou 96 horas após PMSG (média $\pm$ erro padrão da média). Teste estatístico: análise de variância (ANOVA) não-paramétrica, seguida do teste de Kruskal Wallis, onde letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas. ($p < 0,01$; e $p < 0,001$)

Na Figura 6 podemos observar mastócitos ovarianos intactos e desgranulados do grupo de animais submetidos à indução de atresia folicular (72 horas após PMSG). Na Figura 7 observamos mastócitos ovarianos intactos e desgranulados do grupo de animais submetidos à indução de atresia folicular (96 horas após PMSG).

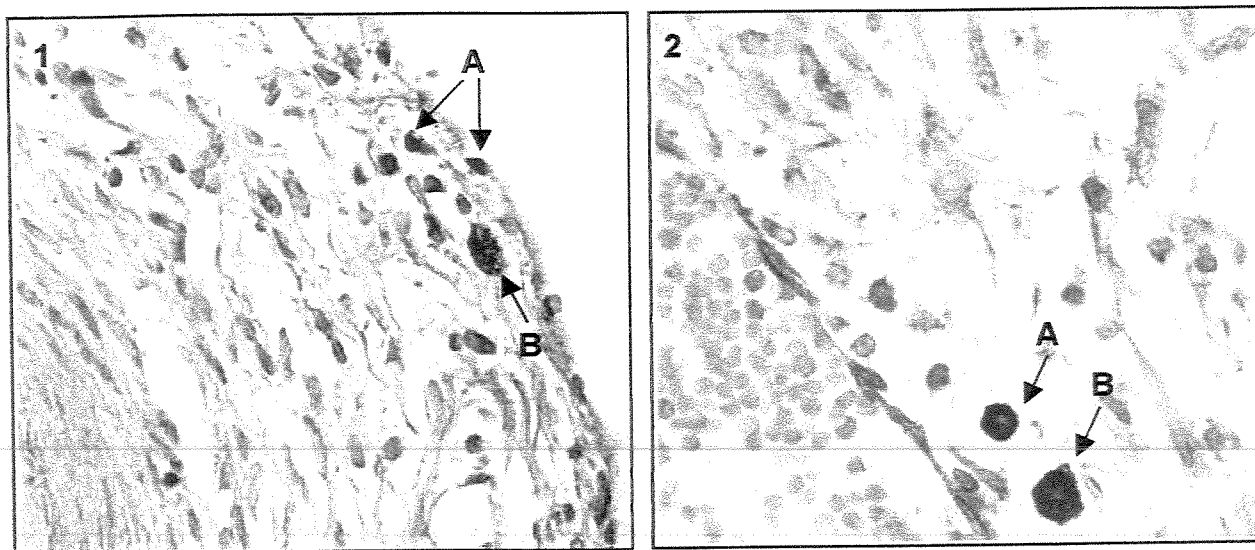


Figura 6. Fotomicrografias de cortes histológicos de ovários, onde podemos verificar em:
 1 - Grupo controle; 2 - Grupo tratado (atresia folicular 72 horas após PMSG)
 A: mastócitos intactos; B: mastócitos desgranulados. (encontrados na cápsula conjuntiva) 400x

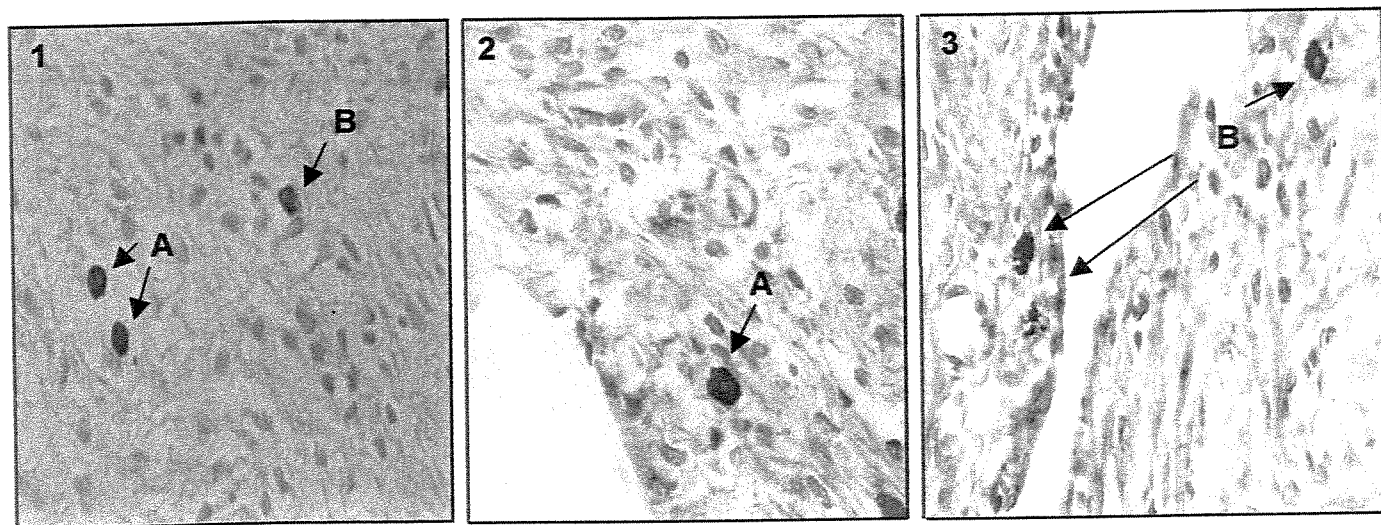


Figura 7. Fotomicrografias de cortes histológicos de ovários, onde podemos verificar em:
 1 - Grupo controle; 2 e 3 - Grupo tratado (atresia folicular 96 horas após PMSG)
 A: mastócitos intactos; B: mastócitos desgranulados. (1: parênquima ovariano;
 2 e 3: cápsula conjuntiva) 400X

A Figura 8 mostra cortes histológicos de ovários do grupo de animas submetidos à indução de atresia folicular (72 horas após PMSG), onde verificamos folículos ovarianos nos diferentes estágios de desenvolvimento. Na Figura 9 observamos a presença de folículos ovarianos já em estágios de atresia folicular (atresia folicular 72 horas após PMSG).

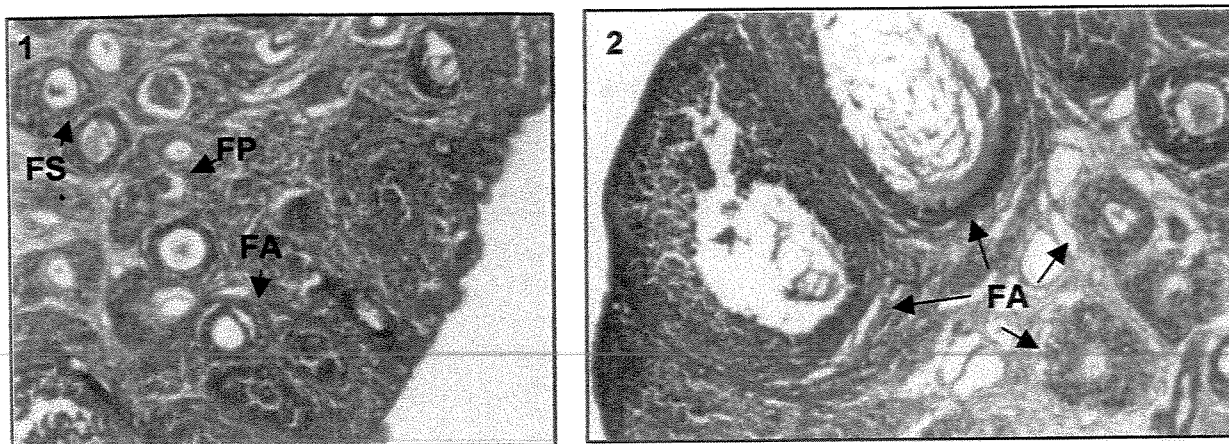


Figura 8. Fotomicrografias de ovários onde podemos verificar em: 1 - Grupo Controle; 2 - Grupo Tratado (atresia folicular 72 horas após PMSG).

FP: Folículo Primário; FS: Folículo Secundário; FA: Folículo em Atresia 40x

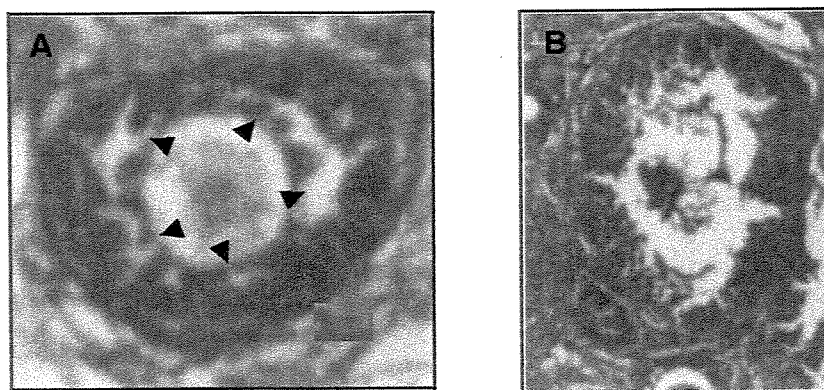


Figura 9. Fotomicrografias de ovário do grupo tratado dos animais submetidos à indução de atresia folicular (72 horas após PMSG), onde podemos verificar em: A – Há vários sítios de ruptura nas células da granulosa (ponta de seta); B – Folículo em estágio avançado de atresia, onde verificamos vários sítios de ruptura nas células da granulosa. 40x

A Figura 10 apresenta cortes histológicos de ovários do grupo de animais submetidos à indução de atresia folicular (96 horas após PMSG), onde verificamos folículos ovarianos nos diferentes estágios de desenvolvimento. Na Figura 11 notamos a presença de folículos ovarianos já em estágios de atresia folicular (atresia folicular 96 horas após PMSG).

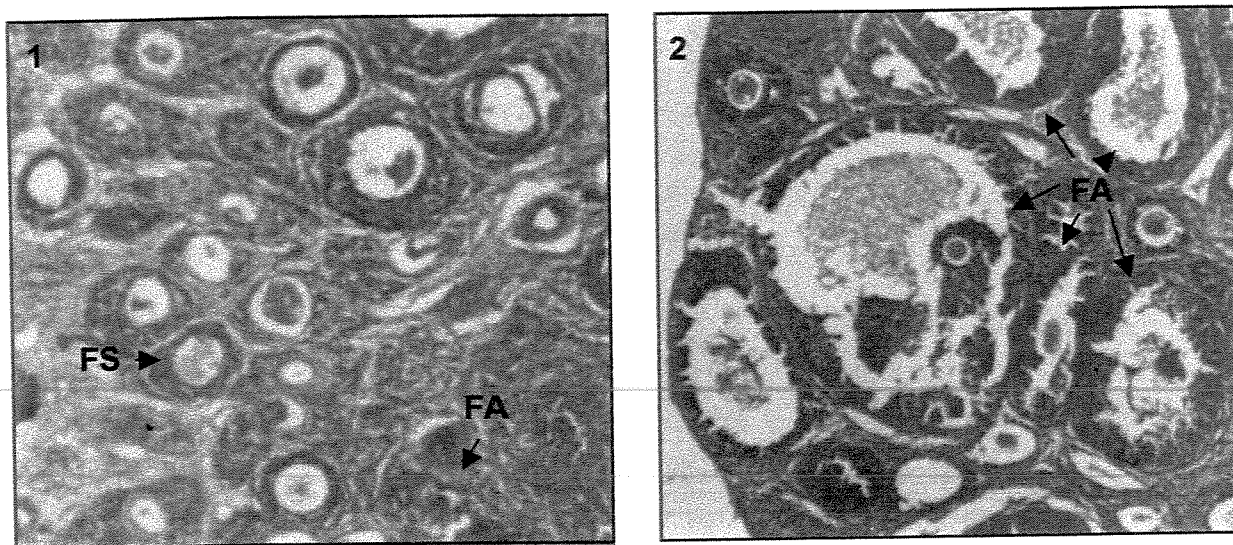


Figura 10. Fotomicrografias de ovários onde podemos verificar em: 1 - Grupo Controle; 2 - Grupo Tratado (atresia folicular 96 horas após PMSG).

FP: Folículo Primário; FS: Folículo Secundário; FA: Folículo em Atresia. 40x

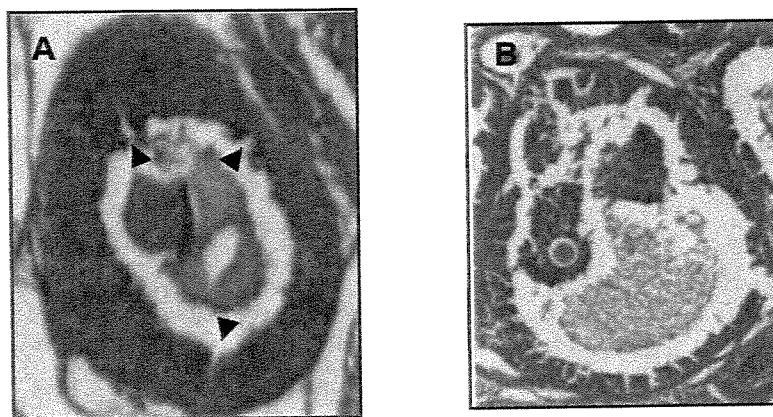


Figura 11. Fotomicrografias de ovário do grupo tratado dos animais submetidos à indução de atresia folicular (96 horas após PMSG), onde podemos verificar em: A – Há sítios de ruptura se projetando nas células da granulosa (ponta de seta); B – Folículo em estágio avançado de atresia, onde verificamos vários sítios de ruptura nas células da granulosa. 40x

DISCUSSÃO

Neste trabalho utilizamos dois grupos experimentais de indução de atresia folicular. Utilizamos o PMSG em ratas pré-púberes (26 dias de idade) em dose e tempos pré-determinados, sendo que a caracterização da estrutura morfológica dos folículos ovarianos foi considerada necessária para a comprovação da técnica utilizada. Da mesma maneira, a análise da razão entre o E_2 e a P_4 ($E_2:P_4$), também foi importante, já que esta relação indica o destino do folículo ovariano (atresia folicular ou dominância). Neste trabalho, nosso objetivo foi verificar a concentração de histamina nos ovários e no útero, frente as alterações dos esteróides gonadais (E_2 e P_4).

Quanto à morfologia folicular ovariana nossos resultados mostram que nos ovários dos animais submetidos à indução de atresia folicular (72 e 96 horas após PMSG) encontramos folículos com sítios de rupturas se projetando nas CG. Observamos também folículos ovarianos em estágios já avançados de atresia folicular nos quais é possível verificar vários sítios de ruptura nas CG.

Essas alterações morfológicas ovarianas são semelhantes às observadas por PELUSO e colaboradores (1977b), que estudaram a atresia folicular em ratas pré-púberes, e relataram que no início da atresia folicular ocorrem alterações morfológicas na CG que incluem achatamento e perda de citoplasma. As alterações na membrana das CG também estão correlacionadas com perda de receptor de LH (PELUSO *et al.*, 1977a; NORMAN and BRÄNNSTRÖM, 1996), uma vez que o LH regula algumas das funções da CG, uma redução no número de receptores de LH pode acarretar em menor responsividade ao LH (HSUEH *et al.*, 2000) e resultar no declínio do metabolismo folicular (HAMBERGER *et al.*, 1971) e da esteroidogênese (DORRINGTON, 1977).

Mudanças bioquímicas também ocorrem durante a atresia folicular ovariana. Essas mudanças incluem: redução da síntese de DNA da CG, diminuição da proliferação celular, decréscimo das gonadotrofinas, decréscimo dos RNAs mensageiros para a aromatase e decréscimo dos receptores de gonadotrofinas (GORE-LANGTON e ARMSTRONG, 1994; HSUEH *et al.*, 1994; AMSTERDAM e SELVARAJ, 1997; TILLY *et al.*, 1997; AMSTERDAM *et al.*, 1998).

Os hormônios esteróides, tais como os estrógenos, progestinas e andrógenos, são produzidos pelo folículo ovariano durante seu desenvolvimento. A dinâmica folicular ovariana é controlada não só por interações de sinais endócrinos (hormônios esteróides e gonadotrofinas), mas também por hormônios peptídicos produzidos localmente e por fatores de crescimento tais como: fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e proteína de ligação do IGF (IGF-BP) (ZHOU e BONDY, 1993; ADASHI, 1995; MONGET e MONNIAUX, 1995). As gonadotrofinas também estimulam numerosas ações celulares incluindo a síntese de diferentes fatores de crescimento intra-ovarianos, os quais interagem com as gonadotrofinas para regular passos específicos que culminam com o crescimento folicular ovariano e esteroidogênese (GREENWALD e ROY, 1994; PELUSO, 1997).

Nossos resultados mostram que não houve alteração na concentração de E_2 . A concentração de P_4 encontra-se aumentada nos dois grupos experimentais de atresia folicular. Contudo observamos diminuição da razão $E_2:P_4$ 72 e 96 horas após a administração de PMSG, comprovando a eficácia da técnica utilizada.

HSUEH e colaboradores (1994) constataram declínio na síntese de E_2 em ratas submetidas à indução de atresia folicular. Isto difere dos nossos resultados uma vez que, em nossos modelos experimentais não verificamos alteração na concentração de E_2 . O que pode estar ocorrendo em nossos modelos de indução experimental de atresia folicular, é a síntese de E_2 em níveis basais (animais pré-púberes) uma vez que a apoptose (atresia folicular) em células esteroidogênicas como CG apresenta uma característica especial: a esteroidogênese pode permanecer ativa nestas células em apoptose enquanto as organelas da maquinaria esteroidogênica não estiverem destruídas, mesmo que estas fiquem compartimentalizadas na região perinuclear devido à nova conformação adquirida pelo citoesqueleto durante o processo apoptótico (AMSTERDAM *et al.*, 1998).

Apesar da diferença na concentração de E_2 , HSUEH e colaboradores (1994), também verificaram um aumento na produção de P_4 em ratas submetidas à indução de atresia folicular. Outros trabalhos também sugerem que a indução de atresia folicular é acompanhada pelo aumento de progesterona plasmática (BRAW *et al.*, 1981; AMSTERDAM *et al.*, 1998). Uma vez que a P_4 regula a viabilidade de células uterinas, mamárias, corpo lúteo e folículos ovarianos (células da granulosa), diversos grupos de pesquisa tem investigado a relação entre alterações no nível de P_4 e atresia folicular

ovariana (ROTELLO *et al.*, 1992; JUENGEL *et al.*, 1993; LUCIANO *et al.*, 1994; FENG *et al.*, 1995; PELUSO, 1997). A P₄, também, promove a resposta ao FSH, em cultura de CG de ratas, com aumento da produção de AMP cíclico (AMPc), e a amplitude e duração da ação do AMPc pode determinar se a CG irá luteinizar ou sobreviver ou ainda se irá entrar em atresia folicular (GOFF *et al.*, 1979; AHARONI *et al.*, 1995; PELUSO, 1997; AMSTERDAM *et al.*, 1998).

De uma maneira geral, nossos resultados estão condizentes com a literatura, tanto no aspecto morfológico quanto no perfil esteroidogênico, visto que a atresia folicular ovariana está associada com uma alteração na produção de hormônios esteróides e de proteínas necessárias para manter a integridade do folículo ovariano (receptores de FSH e LH, aromatase). Assim, não só as gonadotrofinas, mas os esteróides gonadais também modulam a incidência de atresia folicular ovariana (HARMAM *et al.*, 1975; BRAW e TSAFRIRI, 1980; TILLY *et al.*, 1991; VINATIER *et al.*, 1996).

A histamina é um dos principais mediadores biológicos sintetizados pelos mastócitos. Estes constituem a principal fonte de histamina nos tecidos. Alguns trabalhos sugerem que a histamina esteja envolvida no processo ovulatório em ratos, cobaias, coelhos e humanos (MORIKAWA *et al.*, 1976; BATA, 1980; MORIKAWA *et al.*, 1981; KOBAYASHI *et al.*, 1983; SCHMIDT *et al.*, 1986; SCHMIDT *et al.*, 1988; JONES *et al.*, 1994).

Em roedores, os mastócitos são limitados ao hilo ovariano e não são observados em folículos, corpo lúteo e interstício ovariano (KRISHNA *et al.*, 1986). Vários estudos têm relatado que durante as diferentes fases do ciclo estral e prenhez ocorre variação na concentração de histamina e no número de mastócitos no útero de roedores e que os estrógenos estimulam a proliferação de mastócitos uterinos, em determinadas fases do ciclo estral (PADILA *et al.*, 1990; MENEDEZ-PELAEZ *et al.*, 1992; AYDIN *et al.*, 1998).

Nossos resultados mostram que as concentrações de histamina intra-ovariana e intra-uterina estão reduzidas no grupo de animais submetidos a indução de atresia folicular (72 horas após PMSG) e que tivemos uma diminuição no número de

mastócitos ovarianos intactos e aumento no número de mastócitos desgranulados nos dois grupos experimentais de atresia folicular (72 e 96 horas após PMSG).

Sabe-se que o útero é um dos órgãos alvo para as ações do estradiol o qual, apesar de não apresentar alterações estatisticamente significativas, encontra-se em concentrações baixas em nossos modelos de indução de atresia folicular, possivelmente contribuindo para a diminuição na concentração de histamina intra-uterina, uma vez que a ação de estrógenos no útero incluindo crescimento e proliferação celular uterina é mediada pela histamina (SZEGO, 1965; WORDINGER *et al.*, 1985; PADILLA *et al.*, 1990; DRUDY *et al.*, 1991; GOSDEN *et al.*, 1993b; GUNIN e SHAROV, 1998).

Quanto a concentração intra-ovariana de histamina nossos resultados estão de acordo com trabalhos da literatura onde relatam que a concentração intra-ovariana de histamina encontra-se reduzida após a estimulação por gonadotrofinas, o que está associado com um aumento da desgranulação de mastócitos (SZEGO e GITIN, 1964; HUNTER e LEATHEM, 1968; LIPNER, 1971; JONES *et al.*, 1980; SCHMIDT *et al.*, 1988). A histamina tem uma importante função no crescimento folicular ovariano e ovulação (LIPNER, 1971; KNOX, 1974; GERGELY *et al.*, 1976; KRISHNA *et al.*, 1989; JONES *et al.*, 1980; JONES *et al.*, 1994). Trabalhos na literatura sugerem que histamina intra-ovariana estimule o acúmulo de AMPc e a síntese de P₄ (SCHMIDT *et al.*, 1987; SCHMIDT *et al.*, 1988).

Com base nestes achados da literatura, constatamos que nossos resultados apresentam um padrão coerente no perfil esteroidogênico (E₂ e P₄) e imunológico (mastócitos/histamina) no útero e nos ovários dos animais submetidos à indução de atresia folicular experimental.

Podemos concluir nossa análise com relação aos resultados obtidos neste trabalho que a metodologia utilizada, utilização do PMSG para indução de atresia folicular experimental, foi efetiva uma vez, que os folículos ovarianos observados mostraram características morfológicas condizentes com o processo clássico de indução de atresia folicular, aumento da concentração de progesterona e baixa razão E₂:P₄. A indução de atresia folicular diminuiu a concentração de histamina no ovário e no útero.

“Passou a diligência pela estrada e foi-se.

A estrada não ficou mais bela nem

sequer mais feia...

Assim é a ação do homem por esse mundo afora:

Nada pomos, nada tiramos; passamos e esquecemos.

E o sol é sempre pontual todos os dias!”

Alberto Caeiro

Capítulo 2. Indução de superovulação altera a concentração de histamina intra-ovariana e intra-uterina em ratas pré-púberes?

TÍTULO: INDUÇÃO DE SUPEROVULAÇÃO ALTERA A CONCENTRAÇÃO DE HISTAMINA INTRA-OVARIANA E INTRA-UTERINA EM RATAS PRÉ-PÚBERES?

INTRODUÇÃO

Compreender os fundamentos dos sistemas envolvidos na via esteroidogênica folicular tem sido um dos principais objetivos de pesquisadores da área de reprodução animal.

O ciclo reprodutivo na fêmea é mantido por interações endócrinas, parácrinas e autócrinas. A função principal dos hormônios hipofisários FSH e LH está diretamente relacionada com o recrutamento e crescimento folicular, atresia e ovulação (RICHARDS e HEDIN, 1988). O ovário tem duas funções principais: produção de oócitos, o gameta feminino, e sustentação da função reprodutiva com a produção de hormônios esteróides tais como: 17- β estradiol (E_2) e progesterona (P_4). O fator ou fatores que determinam o início do desenvolvimento folicular no ovário em um determinado momento ainda é desconhecido.

Um dos passos mais críticos na foliculogênese é a transformação do folículo primordial em folículo primário. O crescimento de um folículo parece iniciar com o aumento do oócito primário, com a proliferação das células da granulosa (CG) e com a organização da membrana externa das células da teca (CT) (PATON e COLLINS, 1992; CAMPBELL *et al.*, 1996; HSUEH *et al.*, 2000; PICTON, 2001).

GOODMAN e HODGEN (1983) sugerem os termos recrutamento, seleção e dominância para descrever o desenvolvimento de folículos antrais. Recrutamento é um evento dependente de gonadotrofinas durante o qual os folículos adquirem a habilidade de responder à dependência de gonadotrofinas para seu crescimento contínuo. Seleção é o processo pelo qual somente alguns dos folículos recrutados serão selecionados para “escapar” da atresia e sobreviver até a ovulação. Outros fatores como concentração de E_2 e P_4 podem ser importantes para estabelecer qual ou quais folículos serão dominantes durante a fase de seleção (SUNDERLAND *et al.*, 1994; BAO *et al.*, 1997). A dominância é o mecanismo que os folículos dominantes usam para “escapar” da atresia e inibir o recrutamento de novos folículos. A expressão de receptores de LH nas CG está associada à dominância (XU *et al.*, 1995; YUAN *et al.*, 1998).

O desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas como superovulação, inseminação artificial, transferência de embriões e fertilização *in vitro* fez e faz uso destes conhecimentos e, por sua vez, promove maior eficiência reprodutiva nos animais. Obtendo-se bons índices reprodutivos, também bons índices zootécnicos serão alcançados, garantindo assim, a segurança alimentar de gerações futuras. Por outro lado, a melhora nos índices reprodutivos em animais silvestres gera diversidade genética, com possibilidade de perpetuação de espécies em risco de extinção. E também em humanos o processo pode ser utilizado almejando o sucesso da reprodução em alguns casos nos quais esta seria impossível. Assim sendo, folículos pré-ovulatórios cuja maturação foi induzida por gonadotrofinas são frequentemente usados em pesquisa de muitos processos reprodutivos (SZOŁTYŚ *et al.*, 1994).

A superovulação, em animais domésticos e de laboratório, obtida através da aplicação de gonadotrofinas, tornou-se uma importante técnica que permite a recuperação de grande número de oócitos para fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embriões (DURRANT e BENIRSCHKE, 1981; FLEMING, 1982; SZOŁTYŚ *et al.*, 1994, SANTOS, 1997).

Sabe-se que há uma interação entre os sistemas reprodutivo e imune no que se refere à ação dos esteróides gonadais regulando funções imunes (DIXON NORTHERN *et al.*, 1994).

Os mastócitos têm sido estudados principalmente por seu envolvimento em reações alérgicas e inflamatórias, onde secretam mediadores biológicos em resposta à imunoglobulina E (IgE) e antígenos específicos (SERAFIN e AUSTEN, 1987). Um corpo crescente de evidências sugere que os mastócitos são regulados pelo sistema neuroimunoendócrino. Diversos autores relataram que os mastócitos são influenciados por hormônios sexuais. Em geral, em roedores existem algumas diferenças no número de mastócitos associadas ao sexo, sendo que as fêmeas possuem maior número de mastócitos que os machos (PAYNE *et al.*, 1982; SHIRAMA *et al.*, 1988; MENENDEZ-PELAEZ *et al.*, 1992). Entretanto, a função dos esteróides ovarianos e dos andrógenos na regulação dos mastócitos ainda não está bem esclarecida (LIMA *et al.*, 2000).

A histamina liberada pelos mastócitos está envolvida em numerosas funções reprodutivas tais como regulação do crescimento e vascularização folicular ovariana, ovulação, contratilidade uterina e implantação de blastocisto (PARSHAD e KATHPALIA, 1988; KITAMURA *et al.*, 1993; JONES, 1994; METCALFE *et al.*, 1997).

Com base na importância da participação do sistema imune em diversas situações do sistema reprodutivo o objetivo do nosso trabalho foi de avaliar a população de mastócitos bem como a concentração de histamina em condições onde constatamos alta concentração de E_2 durante a indução de superovulação.

MATERIAL E MÉTODOS

Ratas albinas variedade Wistar, com 26 dias de idade (pré-púberes) foram utilizadas nesse estudo. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, recebendo água e ração comercial "*ad libitum*". Foram utilizados animais controle e animais submetidos a tratamento com PMSG + hCG.

Os animais com 26 dias de idade receberam injeção subcutânea com 30UI de PMSG. Após 56 horas da administração do PMSG, estes animais receberam injeção subcutânea de 10UI de hCG, sendo sacrificados por decapitação 24 horas após a injeção de hCG. Os animais controle receberam injeção subcutânea de veículo diluidor de PMSG e hCG (solução de NaCl a 0,9% - salina). Todos os animais controle foram sacrificados por decapitação 24 horas após a última injeção de salina.

Dos animais sacrificados foram coletados:

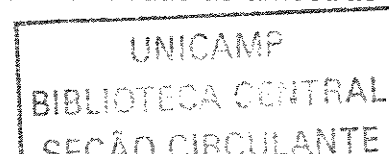
Sangue: para dosagem hormonal;

Ovários direito e esquerdo: para dosagem de hormônios (E_2 e P_4) e de histamina, e para confecção de lâminas histológicas para contagem de mastócitos ovarianos;

Útero: para dosagem de histamina.

Dosagem de esteróides:

O sangue foi coletado logo após a decapitação do animal e centrifugado a 2500 rpm, durante 15 minutos, a 4°C. O plasma foi separado e estocado a -20°C para dosagem de E_2 e P_4 . Para a dosagem destes hormônios foram utilizados *Kits* da Diagnostic Products Corporation (DPC, Immulite System, Los Angeles, Califórnia). Foi utilizado o método de quimioluminescência, realizado em simplicata. Todas as amostras foram dosadas com um mesmo kit em único ensaio.



O ovário direito, após ser dissecado, foi pesado e imerso em nitrogênio líquido, sendo mantido em “freezer” a -70°C , para dosagem de E_2 e P_4 , pelo método de radioimunoensaio, descrito por BÉLANGER *et al.*, 1980 e modificado por ROSA-e-SILVA *et al.*, 1993.

Dosagem de histamina:

O ovário esquerdo e o útero, depois de dissecados, foram pesados e imersos em 3mL de ácido perclórico a 0,4N, sendo mantidos em geladeira até a homogenização. Após a homogenização o material foi centrifugado para dosagem de histamina. O método de extração para dosagem da concentração de histamina foi o descrito por SHORE *et al.*, 1959. As extrações e dosagens de histamina foram feitas pelo método fluorimétrico através do processo automático descrito SIRAGANIAN, 1974.

As amostras contendo histamina foram submetidas à extração butanólica após adição de NaOH a 2M saturado com NaCl. A fase aquosa foi desprezada e à fase orgânica foi adicionado NaOH a 0,1M saturado com NaCl para remover resíduos orgânicos. A fase aquosa foi novamente desprezada e, então, foi adicionado HCl a 0,1N para acidificar o meio, e heptano para facilitar a passagem de histamina à fase aquosa. A fase orgânica foi desprezada ficando a histamina extraída na fase aquosa ácida. Após extração, a histamina foi condensada em ortoftaldeído (OPT) em solução fortemente alcalina. O resultado foi um produto fluorescente, posteriormente estabilizado com HCl a 3N. A intensidade de fluorescência fornece a base para o cálculo da porcentagem de histamina liberada, sendo o padrão utilizado de 50 ng/mL.

Histologia ovariana:

O ovário esquerdo foi dissecado, pesado e imerso em formaldeído 4%, pH 7,4, para posterior preparo de cortes de lâmina histológica. Os corte histológicos foram de 5 micrômetros, sendo os cortes corados com a coloração Giemsa e observados em microscópio de luz convencional em objetiva de 40x.

Análise estatística:

Os resultados estão expressos como médias $\pm$ erro padrão da média, submetidos ao teste estatístico de Student (teste *t*) não pareado. Sendo as diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

A Figura 12 mostra as concentrações de histamina intra-ovariana e intra-uterina. Estes resultados nos mostram que não há diferença significativa na concentração de histamina intra-ovariana entre os grupos experimentais (Figura 12A). A Figura 12B mostra que há um aumento na concentração de histamina intra-uterina nos animais submetidos à indução de superovulação em relação ao seu grupo controle (animais pré-púberes) (tabelas 11 e 12 do apêndice).

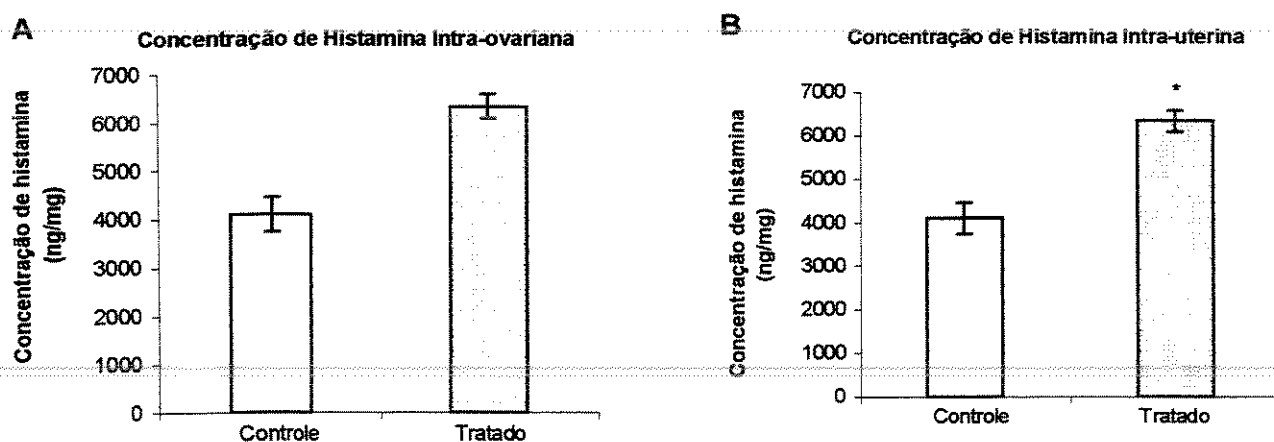


Figura 12. Concentração de histamina (ng/mg) determinada em ovários (A) e em útero (B) de ratas induzidas à superovulação (média $\pm$ erro padrão da média). Teste estatístico: teste *t* (Student) não pareado. ($p < 0,05$)

Na Figura 13 podemos verificar a população de mastócitos ovarianos intactos e desgranulados. Notamos que não há diferenças significativas tanto na população de mastócitos ovarianos intactos (Figura 13A) quanto na população de mastócitos ovarianos desgranulados (Figura 13B) entre os grupos estudados (tabelas 13 e 4 do apêndice).

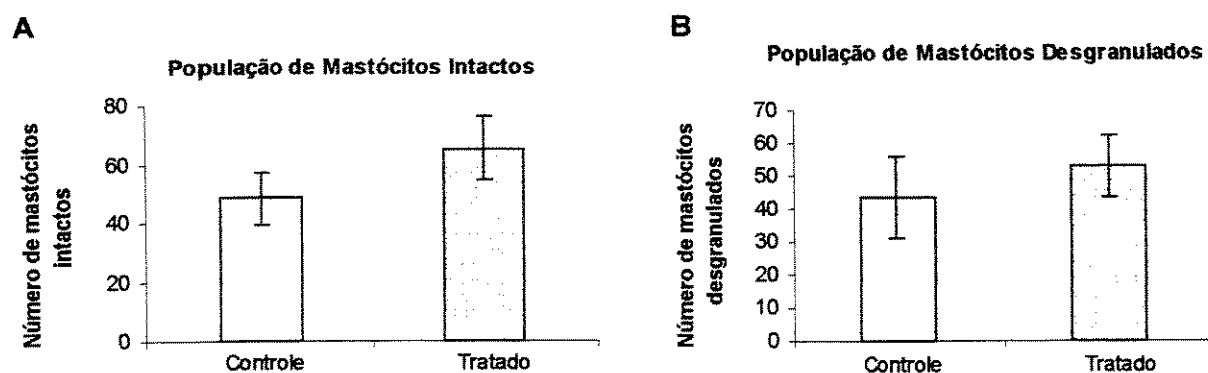


Figura 13. Perfil da população de mastócitos no ovário de ratas induzidas à superovulação. **A:** Mastócitos intactos; **B:** Mastócitos desgranulados. (média $\pm$ erro padrão da média). Teste estatístico: teste *t* (Student) não pareado.

A Figura 14 representa as concentrações plasmática e intra-ovariana de estradiol. Observamos que há um aumento tanto na concentração plasmática (Figura 14A) quanto na concentração intra-ovariana (Figura 14B) de estradiol nos animais submetidos à indução de superovulação em relação ao seu grupo controle (animais pré-púberes) (tabelas 15 e 16 do apêndice).

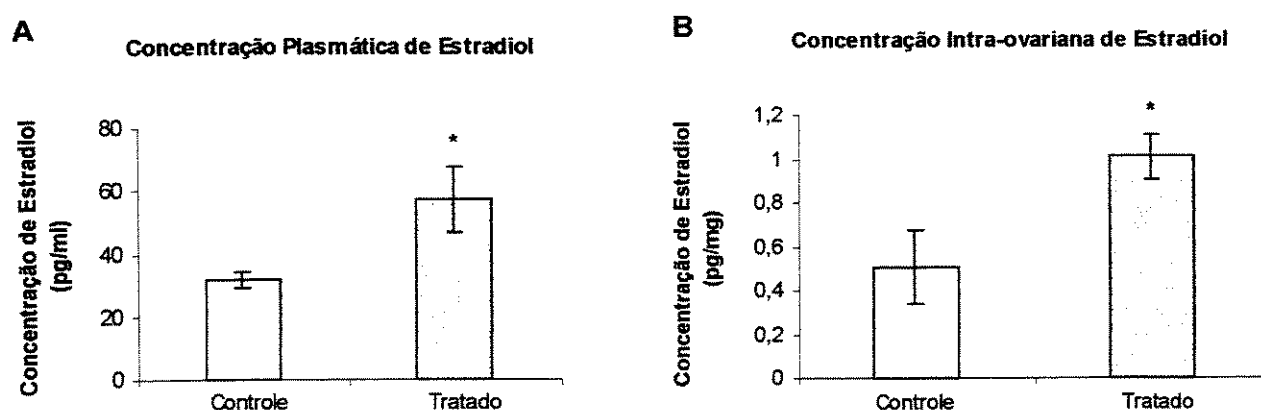


Figura 14. Concentração de estradiol onde: **A:** Concentração plasmática de estradiol (pg/ml) e **B:** Concentração intra-ovariana de estradiol (pg/mg) em ratas induzidas à superovulação (média $\pm$ erro padrão da média). Teste estatístico: teste *t* (Student) não pareado. ($p < 0,05$)

A Figura 15 mostra as concentrações plasmática e intra-ovariana de progesterona. Notamos que há um aumento tanto na concentração plasmática (Figura 15A) quanto na concentração intra-ovariana (Figura 15B) de progesterona nos animais submetidos à indução de superovulação em relação ao seu grupo controle (animais pré-púberes) (tabelas 17 e 18 do apêndice).

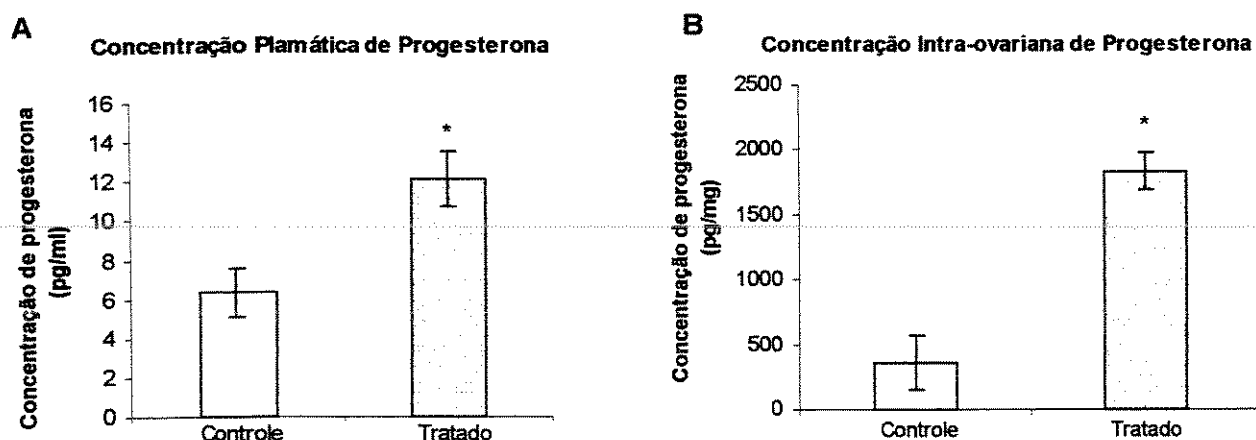


Figura 15. Concentração de progesterona onde: **A:** Concentração plasmática de progesterona (pg/ml) e **B:** Concentração intra-ovariana de progesterona (pg/mg) em ratas induzidas à superovulação (média + erro padrão da média). Teste estatístico: teste *t* (Student) não pareado. ($p < 0,05$ e $p < 0,001$)

Na Figura 16 podemos verificar a razão $E_2:P_4$ plasmática e intra-ovariana. Observamos que não há alteração na razão $E_2:P_4$ plasmática (Figura 16A). A razão $E_2:P_4$ intra-ovariana (Figura 16B) está aumentada nos animais submetidos ao tratamento de indução de superovulação (tabelas 19 e 20 do apêndice).

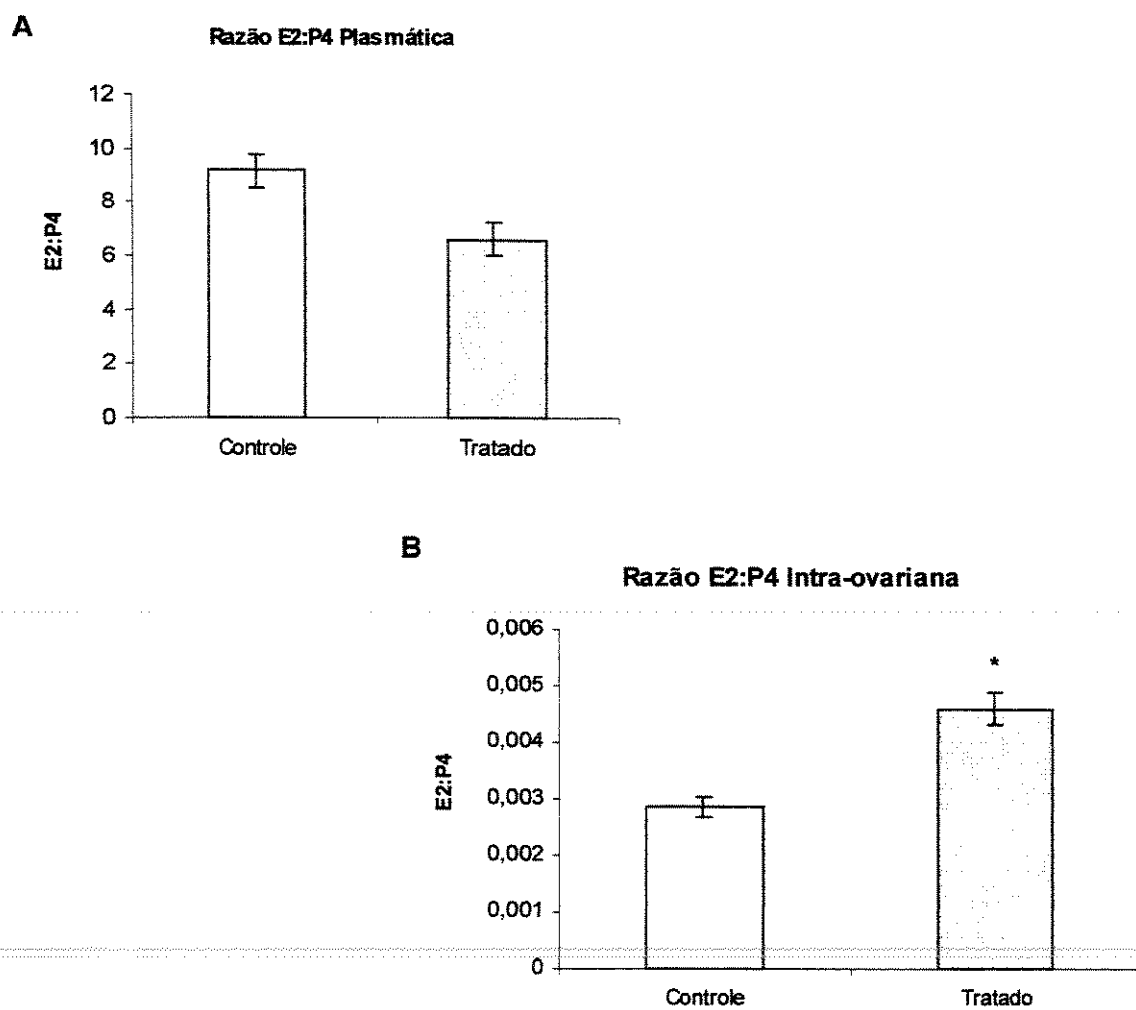


Figura 16. Razão E₂:P₄ plasmática (A) e intra-ovariana (B) de ratas induzidas à superovulação (média $\pm$ erro padrão da média). Teste estatístico: teste *t* (Student) não pareado. ($p < 0,05$)

Na Figura 17 podemos observar mastócitos ovarianos intactos e desgranulados do grupo de animais controle. Na Figura 18 verificamos mastócitos ovarianos intactos e desgranulados do grupo de animais submetidos à indução de superovulação experimental.

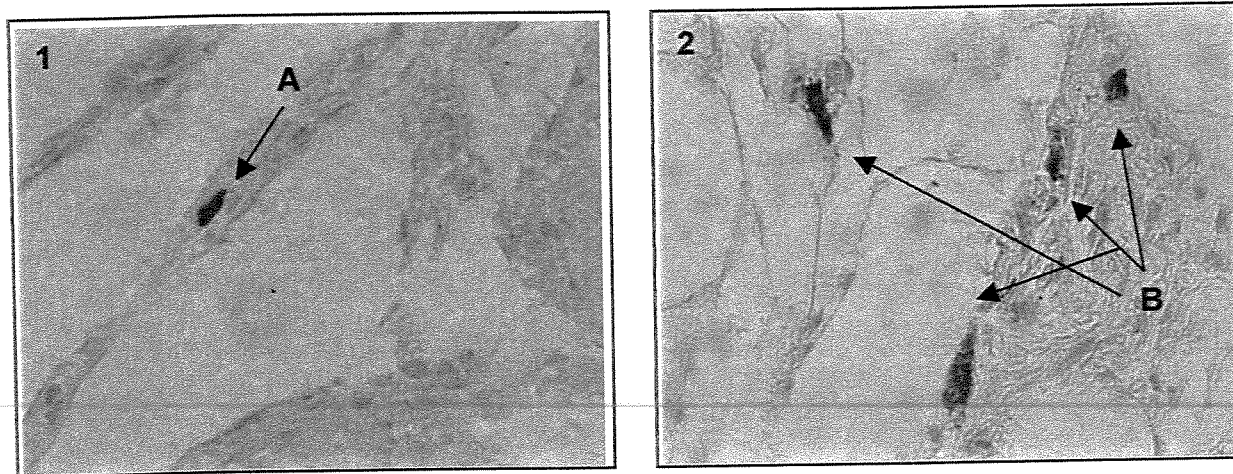


Figura 17. Fotomicrografias de cortes histológicos de ovários, onde podemos verificar em:
1 e 2 - Grupo controle **A:** mastócitos intactos; **B:** mastócitos desgranulados.
 (encontrados no parênquima ovariano) **400x**

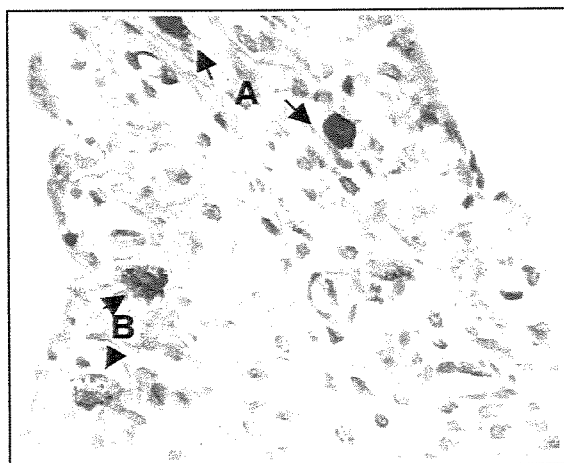


Figura 18. Fotomicrografia de corte histológico de ovário do grupo de animais submetidos à indução de superovulação. A: mastócitos intactos; B: mastócitos desgranulados. (encontrados na cápsula conjuntiva) 400x

A Figura 19 mostra cortes histológicos de ovários do grupo de animas submetidos à indução de superovulação, onde verificamos folículos ovarianos nos diferentes estágios de desenvolvimento. Na Figura 20 observamos cortes histológicos de ovário do grupo de animas submetidos à indução de superovulação, onde notamos a presença de folículos ovarianos em estágios avançados do desenvolvimento folicular.

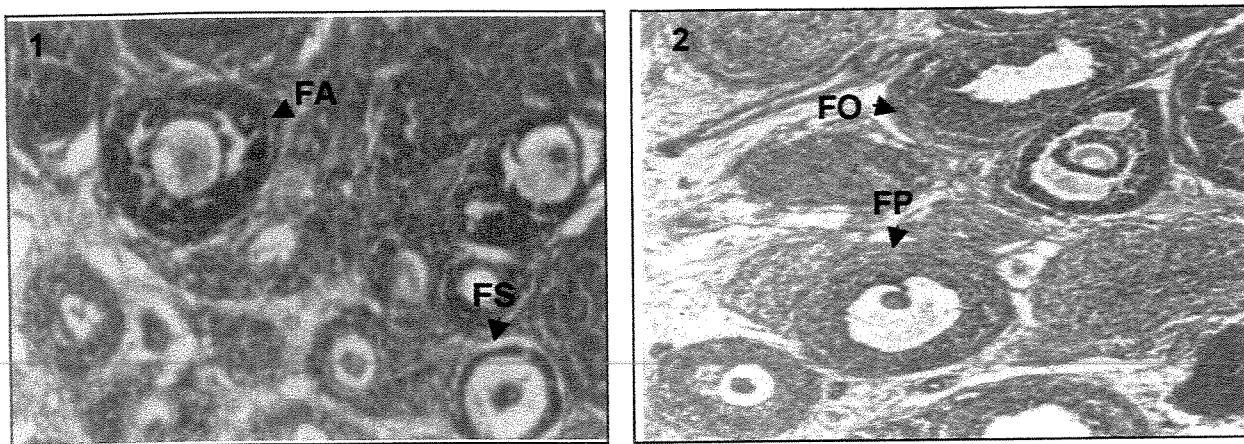


Figura 19. Fotomicrografias de ovários onde podemos verificar em: 1 - Grupo Controle; 2 - Grupo Tratado (superovulação). FS: Folículo Secundário; FA: Folículo em Atresia; FP: Folículo pré-ovulatório; FO: Folículo ovulado. 40x.

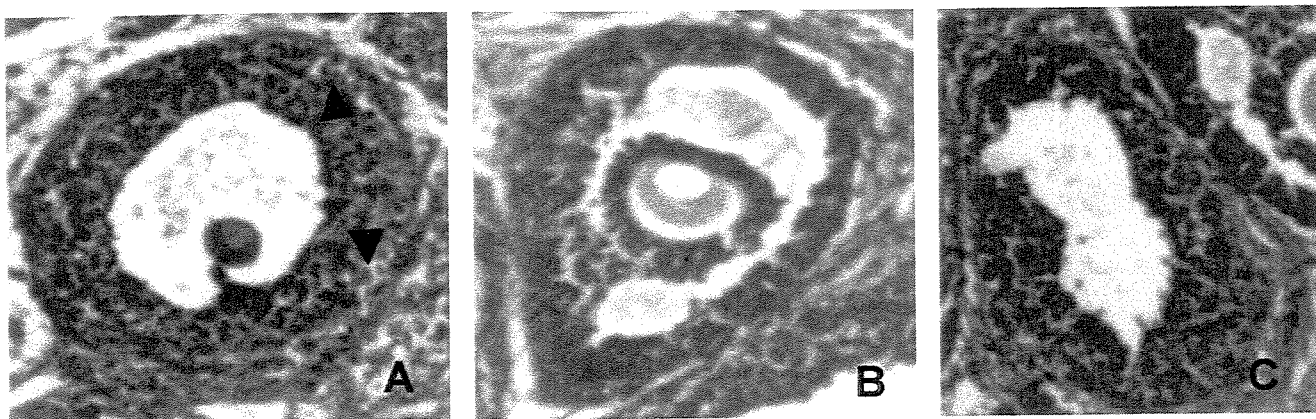


Figura 20. Fotomicrografias de ovário do grupo de animais submetidos à indução de superovulação, onde observamos em: A – Folículo pré-ovulatório, as setas indicando sítios de ruptura se projetando. B – Folículo antes da ovulação, note que há vários sítios de ruptura. C – Folículo ovulado.

DISCUSSÃO

Como modelo para indução de superovulação experimental utilizamos o PMSG e hCG em ratas pré-púberes (26 dias de idade) em dose e tempos pré-determinados, sendo que a caracterização da estrutura morfológica dos folículos ovarianos foi considerada necessária para a comprovação da técnica utilizada. Da mesma maneira, a análise da razão entre o E_2 e a P_4 ($E_2:P_4$), também foi importante, já que esta relação indica o destino do folículo ovariano (atresia folicular ou dominância). Neste trabalho, nosso objetivo foi verificar a concentração de histamina nos ovários e no útero, frente as alterações dos esteróides gonadais (estradiol e progesterona).

De acordo com os nossos resultados, podemos verificar que nos ovários dos animais submetidos à indução de superovulação encontramos folículos pré-ovulatórios onde verificamos sítios de rupturas se projetando nas CG. Observamos também folículos antes da ovulação e folículos que ovularam. Nestes folículos é possível verificar áreas nas quais as CT estão luteinizadas e sítios de ruptura.

Essas características morfológicas ovarianas são semelhantes às observadas por SZOŁTYS e colaboradores (1994), em ovários de ratas adultas ciclando. No entanto, diferem das características dos folículos ovarianos derivados do tratamento com PMSG/hCG onde SZOŁTYS e colaboradores (1994) relatam que a maioria dos folículos apresentam CT interna hipertrofiadas e as CG reduzidas e degenerando-se, e um grande número de folículos pré-ovulatórios não ovulados. Porém, SZOŁTYS e colaboradores (1994) utilizaram animais pré-púberes com 24 dias de idade e injetaram nestes animais 20UI de hCG. Neste caso, o que pode estar interferindo é o tempo diferencial e a concentração por eles utilizados, uma vez que em nosso modelo experimental utilizamos animais com 26 dias de idade e injetamos 10UI de hCG.

O crescimento de folículos envolve diferenciação e proliferação das células da granulosa e da teca. Um evento chave na foliculogênese é a aquisição da capacidade das células foliculares responderem às gonadotrofinas. Essa responsividade envolve a expressão de receptores apropriados de FSH e LH e a maturação do sistema de transdução de sinal pós-receptor (FINDLAY *et al.*, 1996). Muitos fatores de crescimento (como, por exemplo: ativina, inibina, IGF-1, IGF-2, IGF-BP) e citocinas (como: ILs e TGF- α e β) são conhecidos por alterar a estabilidade responsiva das células da teca ao LH e das células da granulosa ao FSH e LH (ZHOU e BONDY, 1993; NORMAN e

BRÄNNSTRÖM, 1994; ADASHI, 1995; MONGET e MONNIAUX, 1995; FINDLAY *et al.*, 1996; CHAMBERLAIN e SPICER, 2001). Esses fatores podem ter ações positivas e/ou negativas e, em alguns casos, podem até mesmo exercer as ações das gonadotrofinas de modo autócrino ou parácrino (HAMMOND *et al.*, 1993; FINDLAY, 1993; 1995; SPICER e ECHTERNKAMP, 1995; FINDLAY *et al.*, 1996; ADASHI, 1998; MENDOZA *et al.*, 1999; CHAMBERLAIN e SPICER, 2001).

Quanto à concentração de esteróides nossos resultados mostram que houve um aumento na concentração plasmática e intra-ovariana tanto de E_2 quanto de P_4 . Podemos verificar também que a razão $E_2:P_4$ intra-ovariana está elevada nos animais submetidos à indução de superovulação, comprovando a eficácia da técnica utilizada.

O aumento na concentração de E_2 nos animais tratados com PMSG/hCG evidencia a grande quantidade de folículos maduros encontrados em nosso modelo experimental de superovulação. Apesar das diferenças morfológicas (relatadas acima) entre nossos resultados e os de SZOŁTYS e colaboradores (1994), estes autores, como nós, verificaram um aumento na concentração de E_2 em ratas tratadas com PMSG/hCG, o que pode ser atribuído à grande quantidade de folículos grandes dominantes não ovulados, os quais contribuíram para o aumento desse esteróide, visto que o E_2 é secretado por folículos nesta fase de desenvolvimento (KAIPIA and HSUEH, 1997).

Em nosso modelo de indução de superovulação experimental verificamos que a P_4 está elevada. Da mesma maneira, SZOŁTYS e colaboradores (1994) também obtiveram aumento da concentração de P_4 em ratas tratadas com PMSG/hCG, o que condiz com YUN e colaboradores (1987) que relatam que o tratamento com PMSG afeta os níveis de esteróides ovarianos, em ratas. Segundo BAULIEU (1989), a P_4 tem uma importante função na ovulação e, em ratas, o pico ovulatório causa um súbito e transitório aumento na secreção de P_4 , sendo que a secreção de P_4 é mais ou menos pronunciada de acordo com a espécie animal (IWAMASA *et al.*, 1992; JUNEJA e DODSON, 1995). A função da P_4 como um mediador de LH no processo ovulatório tem mostrado que este esteróide aumenta durante a última metade do processo ovulatório, o que contribui para a ruptura folicular (THIBAUT e LEVASSEUR, 1988; ESPEY e LIPNER, 1994; JUNEJA e DODSON, 1995; DUANYAI e SRIKANDAKUMAR, 1998).

Mastócitos e histamina podem regular a hiperemia ovariana induzida por LH (SCHAYER, 1962; KRISHNA *et al.*, 1989; TAMURA *et al.*, 1998). Alguns autores relatam que a histamina esteja envolvida na regulação do crescimento e vascularização folicular ovariana (PARSHAD e KATHPALIA, 1988; KRISHNA *et al.*, 1989; JONES, 1994) e no processo de ovulação em ratos (BATTI, 1980; SCHMIDT *et al.*, 1986), coelhos (KNOX e BECK, 1976; KOBAYASHI *et al.*, 1983) e hamsters (KRISHNA *et al.*, 1986).

HUNT e colaboradores (1997) sugerem que E_2 e P_4 possam estar envolvidos em sinais que governam a síntese de células imunes uterinas, além de controlarem a produção de fatores de crescimento e de citocinas uterinas. Dependendo da dose e da duração do tratamento, o E_2 pode produzir desgranulação de mastócitos e liberação de histamina no útero de roedores (MAMMEN e PENNEFATHER, 1988).

Nossos resultados mostram claramente que não houve alteração na concentração intra-ovariana de histamina e que a concentração intra-uterina de histamina está elevada nos animais submetidos à indução de superovulação.

Quanto à concentração de histamina intra-uterina nossos resultados estão de acordo com GUNIN e SHAROV (1998), que relatam que estrógenos estão envolvidos na ação de mastócitos, incluindo a estimulação de crescimento e proliferação celular no útero, sendo o efeito dos mastócitos mediado pela histamina por eles liberada.

Nossos resultados quanto à concentração de histamina intra-ovariana diferem, em parte, dos encontrados por SZEGO e GITIN (1964), os quais verificaram que após injeção de LH (ou hCG), há um edema e hiperemia ovariana, acompanhados por uma diminuição na concentração de histamina ovariana, uma vez que em nosso modelo de indução experimental de superovulação, não verificamos diminuição da histamina. No entanto, verificamos edema e hiperemia ovariana. SCHMIDT e colaboradores (1988), que relatam que ovários de ratas pré-púberes em cultura "*in vitro*" e tratados com LH não tiveram alteração no conteúdo de histamina ovariana. Há várias vias pelas quais a histamina pode influenciar o processo ovulatório. Histamina, como LH, causa hiperemia ovariana na fase pre-ovulatória (WURTMAN, 1964), resultando em aumento da habilidade dos hormônios, citocinas e fatores de crescimento ovarianos (SCHMIDT *et al.*, 1988; TAMURA *et al.*, 1998; TAMURA e KOGO, 1999). Alguns autores também sugerem que a histamina exerce um efeito no complexo neuromuscular nas paredes foliculares (SCHMIDT *et al.*, 1986; SCHMIDT *et al.*, 1987).

Resumindo, os resultados encontrados neste trabalho, abrem novos caminhos para uma pesquisa mais detalhada sobre a participação da progesterona, a qual foi encontrada em concentrações elevadas, no processo de regulação dos mastócitos. Outra idéia que o presente trabalho sugere é a investigação da ação parácrina de mastócitos localizados em órgãos alvos, como os ovários e útero, e ainda o fato de a concentração de histamina/mastócito no ovário estar sob a ação do PMSG/hCG, tendo em vista que alguns autores relatam que os oócitos, resultante de fêmeas submetidas a indução de superovulação, muitas vezes não são saudáveis, sugerindo então que a falência da prenhez/gravidez em fêmeas superovuladas possa estar envolvendo componentes multifatoriais no ovário e no útero.

Podemos concluir nossa análise com relação aos resultados obtidos neste trabalho que a metodologia utilizada, uso do PMSG+hCG para indução de superovulação, foi efetiva uma vez que os folículos ovarianos observados mostraram características morfológicas condizentes com o processo clássico de indução de superovulação, aumento da concentração de estradiol e alta razão $E_2:P_4$. A indução de superovulação aumenta a concentração de histamina no útero, mas não altera a concentração de histamina no ovário.

*“A vida deve sempre ter um propósito, mesmo que nas pequenas coisas.
Durante a vida nenhum ato, nenhuma palavra são indiferentes.
Tudo deixa um rastro, transforma-se em sementes.
É como uma pedra que atiras na água:
de círculo em círculo o movimento atingirá a margem distante.”*

Autor desconhecido

Conclusão Geral

ATRESIA FOLICULAR

- O procedimento experimental de indução de atresia folicular mostrou no ovário características morfológicas e humorais condizentes com o processo de atresia folicular ovariana clássica, ou seja, folículos ovarianos com vários sítios de ruptura nas CG, aumento da concentração de progesterona e baixa razão $E_2:P_4$;
- A indução de atresia folicular diminuiu a concentração de histamina no ovário e no útero.

Se os mastócitos ovarianos e uterinos respondem aos diferentes níveis de estrógenos, direta ou indiretamente, é uma questão que ainda necessita de investigações mais minuciosas. Por outro lado, é provável que esta ativação não dependa de um fator de ativação específico, mas de uma ativação sequencial de diferentes hormônios.

SUPEROVULAÇÃO

- O procedimento experimental de indução de superovulação mostrou no ovário características morfológicas e humorais condizentes com o processo de superovulação ovariana clássica, ou seja, folículos pré-ovulatórios com alguns sítios de ruptura, folículos antes da ovulação e folículos depois da ovulação, aumento da concentração de estradiol e de progesterona e elevada razão $E_2:P_4$;
- A indução de superovulação aumenta a concentração de histamina no útero, mas não altera a concentração de histamina no ovário.

A importância dos nossos resultados está no fato de comprovarem uma inter-relação entre os sistemas imune e reprodutivo, existindo uma conexão entre hormônios esteróides (estradiol e progesterona) e mastócitos/histamina, e ainda que nossos resultados não sejam conclusivos eles abrem as portas para uma ampla área de investigação a ser conduzida.

*"Que Deus não permita que eu perca o OTIMISMO,
mesmo sabendo que o futuro que nos espera pode não ser tão alegre...*

*Que eu não perca a VONTADE DE VIVER,
mesmo sabendo que a vida é, em muitos momentos, dolorosa...*

*Que eu não perca a vontade de TER GRANDES AMIGOS,
mesmo sabendo que, com as voltas do mundo,
eles acabam indo embora de nossas vidas...*

*Que eu não perca o EQUILÍBRIO, mesmo sabendo
que inúmeras forças querem que eu caia...*

*Que eu não perca a LUZ E O BRILHO NO OLHAR,
mesmo sabendo que muitas coisas que verei no mundo escurecerão meus olhos...*

*Que eu não perca a GARRA, mesmo sabendo que
a derrota e a perda são dois adversários extremamente perigosos...*

*Que eu não perca a RAZÃO, mesmo sabendo que
as tentações da vida são inúmeras e deliciosas...*

*Que eu não perca o SENTIMENTO DE JUSTIÇA,
mesmo sabendo que o prejudicado possa ser eu...*

*Que eu não perca o meu FORTE ABRAÇO,
mesmo sabendo que um dia meus braços estarão fracos...*

*Que eu não perca a BELEZA E A ALEGRIA DE VER,
mesmo sabendo que muitas lágrimas brotarão dos meus olhos e
escorrerão por minha alma...*

*Que eu não perca o AMOR POR MINHA FAMÍLIA,
mesmo sabendo que ela muitas vezes me exigiria esforços
incríveis para manter a sua harmonia...*

*Que eu não perca a vontade de SER GRANDE,
mesmo sabendo que o mundo é pequeno...*

E acima de tudo...

Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente!

*Que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um
é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois...*

*A VIDA É CONSTRUÍDA NOS SONHOS
E CONCRETIZADA NO AMOR!"*

Francisco Cândido Xavier

Referências Bibliográficas

ADASHI, E.Y.; ROBAN, R.M. Intraovarian regulation. Peptidergic signalling systems. **Trends Endocrinol Metab**, v. 3, p. 243-248, 1992.

ADASHI, E.Y. Insulin-like growth factors as determinants of follicular fate. **J Soc Gynecol Investig**, v. 2, p. 721-726, 1995.

ADASHI, E.Y. The IGF family and folliculogenesis. **J Reprod Immunol**, v. 39, p. 13-19, 1998.

AHARONI, D.; DANTES, A.; OREN, M.; AMSTERDAM, A. c-AMP mediated signals as determinants for apoptosis in primary granulosa cells. **Exp Cell Res**, v. 218, p. 271-282, 1995.

AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 37, p. 269-277, 2000.

AMSTERDAM, A.; SELVARAJ, N. Control of differentiation, transformation and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses and tumor supressor genes. **Endocr Rev**, v. 18, p. 435-467, 1997.

AMSTERDAM, A.; DANTES A.; HOSOKAWA, K.; SCHERE-LEVY, C.P.; KOTSUSUJI, F.; AHARONI, D. Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells. **Steroids**, v. 63, p. 314-318, 1998.

AMSTERDAM, A.; GOLD, R.S.; HOSOKAWA, K.; YOSHIDA, Y.; SASSON, R.; JUNG, Y. and KOTSUJI, F. Crosstalk among multiple singnaling pathways controlling ovarian cell death. **Trends Endocrinol Metab**, v. 10, n. 7, p. 255-262, 1999.

ARMSTRONG, D.G.; HOGG, C.O.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. Insulin-like growth factor (IGF)-binding production by primary cultures of ovine granulosa and theca cells. The effects of IGF-I, gonadotropin, and follicle size. **Biol Reprod**, v. 55, p. 1163-1171, 1996.

ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **J Reprod Fertil**, p. 139-146, 1997.

ASKENASE, P.W. Immunopathology of parasitic diseasea: Involvement of basophils and mast cells. **Springer Semin Immunopathol**, v. 2, p. 417-442, 1980.

AYDIN, Y.; TUNCEL, N.; GURER, F.; TUNCEL, M.; KOSAR, M.; OFLAZ, G. Ovarian, uterine and brain mast cells in female rats cyclic changes and contribution to tissue histamine. **Comp Biochem Physiol A mol Integr Physiol**, v. 120, n. 2, p. 255-262, jun, 1998.

BADINGA, L.; DRIANCOURT, M.A.; SAVIO, J.D.; WOLFENSON, D.; DROST, M.; DE LA SOTA, R.L. and THATCHER, W.W. Endocrine and ovarian responses associated with the first wave dominant follicle in cattle. **Biol Reprod**, v. 47, p. 871-883, 1992.

BAKER, S.J.; SPEARS, N. The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. **Human Reproduction Update**, v. 5, n. 2, p. 153-165, 1999.

BAO, B.; GARVERIC, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; SALFEN, B.E. Changes in messenger ribonucleic acid encoding lutealizing hormone receptor, cytochrome P450-side-chain-cleavage and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biol Reprod**, v. 56, p. 1158-1169, 1997.

BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **J Anim Sci**, v. 76, p. 1903- 1921, 1998.

BATTA, S.K. Effect of histamine, phencyclidine, phenoxybenzamine and gamma-aminobutyric acid on ovulation and quality of ova in rats. **Reproduction**, v. 4, p. 99-107, 1980.

BAULIEU, E.E. Contraception and other clinical applications of RU 486, an antiprogestosterone at the receptor. **Science**, v. 245, p. 1351-1357, 1989.

BECKERS, J.F.; DRION, P.V.; FIGUEIREDO, J.R.; GOFFIN, L.; PIROTTIN, D.; ECTORS, F.J. The ovarian follicle in cow: *in vivo* growth and *in vitro* culture. **Reproduction Dom Anim**, v. 31, p. 543-548, 1996.

BEIL, W.J.; SCHULZ, M.; WEFELMEYER, U. Mast cell granule composition and tissue – a close correlation. **Histol Histopathol**, v. 15, p. 937-946, 2000.

BÉLANGER, A .; CARON, S.; PICARD, V. Simultaneous radioimmunoassay of progestins, androgens and estrogens in rat testis. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 13, p. 185-190, 1980.

BRAW, R.H. and TSAFRIRI, A. Effect of PMSG on follicular atresia in the rat ovary. **J Reprod Fertil**, v. 59, p. 267-272, 1980.

BRAW, R.H.; BARAMI, S.; TSAFRIRI, A. Effect of hypophysectomy on atresia of rat pre-ovulatory follicles. **Biol Reprod**, v. 25, p. 989-996, 1981.

BYSKOV, A.G. Follicular atresia. In: Jones R.E. (ed.). **The Vertebrates Ovary**. Plenum Press, New York, p. 533-562, 1978.

CAMPBELL, B.K.; SCARAMUZZI, R.J. and WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. **J Reprod Fertil**, v. 106, p. 7-16, 1996.

CHAMBERLAIN, C.S.; SPICER, L.J. Hormonal control of ov(0Ucell production of insulin-like growth factor binding proteins. **Mol Cell Endocrinol**, v. 182, p. 69-81, 2001.

COLUMBO, M.; BOCHNER, B.; MARONE, G. Human mast cells adhere to extracellular matrix proteins through their selective expression of B1. **International Archives of Allergy and Immunology Basel**, v. 107, p. 3336-3337, 1995.

DANIEL, A.J.; ARMSTRONG, D.G. and GORE-LANGTON, R.E. Growth and development of rat oocyte in vitro. **Gam Res**, v. 24, p. 109-121, 1990.

DE LA SOTA, R.L.; SMITH, E.; SIMMEN, F.A.; THATCHER, W.W. Endocrine changes associated with ovarian follicular dominance in cattle. **Biol Reprod**, v. 48 (suppl), p. 122, 1993.

DIXON NORTHERN, A.L.; RUTTER, S.M. and PETERSON, C.M. Cyclic changes in the concentrations of peripheral blood immune cells during the normal menstrual cycle. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 207, p. 81-88, 1994.

DORRINGTON, J.H. Steroidogenesis *in vitro*. In: Zuckerman, S.; Weir, B.J. (eds) **The Ovary**, vol III, New York, p. 359-399, 1977.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 55-79, 1991.

DRUDY, L.; SHEPPARD, B. and BONNAR, J. Mast cells in the normal uterus and in dysfunctional uterine bleeding. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 39, p. 193-201, 1991.

DUANYAI, S. and SRIKANDAKUMAR, A. Premature evaluation of progesterone shortens duration of ovulation in PMSG/hCG-treated prepubertal gilts. **Theriogenology**, v. 50, p. 433-443, 1998.

DURRANT, B.; BENIRSCHKE, K.M. Embryo transfer in exotic animals. **Theriogenology**, v. 15, p. 77, 1981.

DVORAK, A.M. Blood cell biochemistry: Basophil and mast cell degranulation and integrins recovery. **New York: Plenum Press**, 1991.

DVORAK, A.M.; MORGAN, E. ; SCHILEIMER, R.P.; LICHTENSTEIN, L. Diamine oxidase-gold labels histamine in human mast cell granules: A new enzyme-affinity ultrastructural method. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, New York, v. 41, p. 787-800, 1993.

EPPIG, J.J.; SCHROEDER, A.C.; SANDT, J.J.M.; ZIOMEK, C.A. and BAVISTER, B.D. Development capacity of mouse oocytes that grow and mature in culture: the effect of modification of protocol. **Theriogenology**, v. 33, p. 89-100, 1989.

ERICKSON, G.F. Folliculogenesis, ovulation, and luteogenesis. In: **Endocrinology**. DEGROOT, L.J. and JAMESON, J.L. (eds). W.B. Saunders Company, v. 3, p. 2061-2071, 2001.

ESPEY, L.L.; LIPNER, H. Ovulation. In: **The Physiology of Reproduction**. KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (eds). Raven Press, New York, p. 725-780, 1994.

FENG, A.; MARTI, A.; JEHN, B.; ALTERMATT, H.J.; CHICAIZA, G. JAGGI, R. Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. **J Cell Biol**, v. 131, p. 1095-1103, 1995.

FIGUEIREDO, J.R. and RODRIGUES, A.P.R. State of art of the manipulation of oocytes enclosed in preantral follicles. In: **BR Monographs of Reproduction & Catalog Group**. Rosa-e-Silva, A.A.M. (ed.). Villipress Arte e Ciência, São Paulo, p. 39-49, 2001.

FINDLAY, J.K. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. **Biol Reprod**, v. 48, p. 15-23, 1993.

FINDLAY, J.K. Is the intraovarian IGF system a mediator of growth hormone action? In: **The Somatotrophic Axis and the Reproductive Process in Health and Disease**.

ADASHI, E.Y. and THORNER, M.O. (eds). Serono Symposium, Springer, New York, p. 202-211, 1995.

FINDLAY, J.K.; DRUMMOND, A.E.; FRY, R.C. Intraovarian regulation of follicular development and ovulation. **Anim Reprod Sci**, v. 42, p. 321-331, 1996.

FLEMING, A.D. Developmental capability of superovulated ova. In: **In vitro Fertilization and Embryo Transfer**. Hafez, E.S.E.; Semm, K. (eds). Lancaster, UK: MTP Press, p. 277, 1982.

FLEMMING, W. Über die Bildung von Ring- und Stufenfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graaf'scher follikel. **Arch Anat Physiol Jahrgang**, p. 221-224, 1985.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol Reprod**, v. 50, p. 225-232, 1994.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M. and KOMAR, C.M. Selection and differentiation of dominant ovarian follicles in cattle. In: **BR Monographs of Reproduction & Catalog Group**. Rosa-e-Silva, A.A.M. (ed.). Villipress Arte e Ciência, São Paulo, p. 21-38, 2001.

GERGELEY, R.Z.; PALDI, E.; ERLIK, Y. and MAKLER, A. Treatment of ovarian hyperstimulation syndrome by antihistamine. **Obstet Gynecol**, v. 47, p. 83-85, 1976.

GOFF, A.K.; LEUNG, P.C.K.; ARMSTRONG, D.T. Stimulatory action of follicle-stimulating hormone and androgen on the responsiveness of rat granulosa cells to gonadotropin in vitro. **Endocrinology**, v. 104, p. 1124-1129, 1979.

GOODMAN, A.I. and HODGEN, G.D. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. **Recent Prog Horm Res**, v. 39, p. 1-73, 1983.

GORE-LANGTON, E.; ARMSTRONG, D.T. Follicular Steroidogenesis and its Control. In: **The Physiology of Reproduction**. KNOBIL, E. and NEIL, J.D. (eds), p. 571-627, 1994.

GOSDEN, R.G.; BOLAND, N.I.; SPEARS, N.; MURRAY, A.A.; CHAPMAN, M. The biology and technology of follicular oocyte development *in vitro*. **Reproductive Medicine Review**, v. 2, p. 129-152, 1993a.

GOSDEN, R.G.; HUNTLEY, J.F.; DOUGLAS, A.; INGLIS, L. and MILLER, H.R. Quantitative and cytochemical studies of mast cell proteases in rat ovaries and uteri in various reproductive states. **J Reprod Fertil**, v. 98, p. 577-582, 1993b.

GREENWALD, G.S. and ROY, S.K. Follicular development and its control. In: **The Physiology of Reproduction**. Knobil, E. and Neill, J.D., 2^a edition, Raven Press, p. 629-724, 1994.

GUNIN, A.G. and SHAROV, A.A. Role of mast cells in oestradiol effects on the uterus of ovariectomized rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, p. 61-68, 1998.

HAMBERGER, L.; HAMBERGER, A.; HERLITZ, K. Methods for metabolic studies on isolated granulosa and theca cells. **Acta Endocrinol**, v. 153 (suppl), p. 41-61, 1971.

HAMMOND, J.M.; SAMARAS, S.E.; GRIMES, R.; LEIGHTON, J.; BARBER, J.; CANNING, S.F.; GUTHRIE, H.D. The role of insulin-like growth factors and epidermal growth factor-related peptides in intraovarian regulation in the pig ovary. **J Reprod Fertil**, v. 48 (suppl), p. 117-125, 1993.

HARMAM, S.M.; LOUVET, J.P.; ROSS, G.T. Interaction of estrogen and gonadotropins on follicular atresia. **Endocrinology**, v. 96, p. 1145-1152, 1975.

HIRSHFIELD, A.N. Follicular recruitment long-term hemicastrate rats. **Biol Reprod**, v. 27, p. 48-53, 1982.

HIRSHFIELD, A.N. Effect of a low dose of pregnant mare's serum gonadotropin on degranulation of mast cells in the ovarian complex of. **Biol Reprod**, v. 35, p. 113-118, 1986.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int Rev Cytology**, v. 124, p. 43-99, 1991.

HODGEN, G. D. The dominant ovarian follicle. **Fertil Steril**, v. 38, p. 281-300, 1982.

HSU, S.Y. and HSUEH, A.J.W. Hormonal regulation of apoptosis. An ovarian perspective. **Trends Endocrinol Metab**, v. 8, n. 5, p. 207-213, 1997.

HSUEH, A.J.W.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocr Ver**, v. 15, p. 707-724, 1994.

HSUEH, A.J.W.; EISENHAUER, K.; CHUN, S.Y.; HSU, S.Y.; BILLIG, H. Gonadal cell apoptosis. **Recent Prog Horm Res**, v. 51, p. 433-455, 1996.

HSUEH, A.J.W.; McGREE, E.A.; HAYASHI, M.; HSU, S.Y. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. **Mol Cel Endocrinol**, v. 163, p. 95-100, 2000.

HUANG, J.; ROBY, K.F.; PACE, J.L.; RUSSEL, S.W.; HUNT, J.S. Cytochemical demonstration of basic protein in mast cell maturation. **Cell Mol Biol**, v. 57, p. 27-35, 1995.

HUNT, J.S.; MILLER, L.; ROBY, K.F.; HUANG, J.; PLATT, J.S.; DEBROT, B.L. Female steroid hormones regulate production of pro-inflammatory molecules in uterine leukocytes. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 35, p. 87-99, 1997.

HUNTER, F. & LEATHEM, J.H. Histamine concentrations in normal and cystic rat ovaries. **Endocrinol**, v. 82, p. 171-172, 1968.

IRELAND, J.J. and ROCHE J.F. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. **Endocrinology**, v. 112, p. 150-156, 1983.

IRELAND, J.J. Control of follicular grow and development. **J Reprod Fertil**, v. 34, p. 39-54, 1987.

IWAMASA, J.I.N.; SHIBATA, S.; TANAKA, N.; MATSUURA, K.; OKAMURA, H. The relationship between ovarian progesterone and proteolytic enzyme activity during ovulation in the gonadotropin-treated immature rat. **Biol Reprod**, v. 46, p. 309-313, 1992.

JAISWAL, K.; KRISHNA, A. Effects of hormones on the number, distribution and degranulation of mast cells in the ovarian complex of mice. **Acta Physiol Hung**, v. 84, n. 2, p. 183-190, 1996.

JAMUR, M.C.; VULGMAN, I. Cytochemical demostration of basic protein in rat mast cell maturation. **Cellular and Molecular Biology, Noisy-Le-Grand**, v. 34, p. 27, 1988.

JONES, R.E.; DUVALL, D. and GUILLETE, Jr., L.J. Rat ovarian mast cells: Distribution and cyclic changes. **Anatomical Record**, v. 197, p. 489-493, 1980.

JONES, T.H. Interleukin-6 an endocrine cytokine. **Clinical Endocrinology**, v. 40, n. 6, p. 703-713, 1994.

JONES, R.E.; DUVALL, D.; GILLETTE, L.J.JR.; LOPEZ, K.H. Number and state of rat ovarian mast cells after exogenous administration of luteinizing hormone. **Comp Biochem Physiol Comp Physiol**, v. 108, n. 4, p. 555-559, 1994.

JONES, J.I.; CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocr Rev**, v. 16, p. 3-34, 1995.

JUENGEL, J.L.; GARVERICK, H.A.; JOHNSON, A.L.; YOUNG-QUIST, R.S.; SMITH, M.F. Apoptosis during luteal regression in cattle. **Endocrinology**, v. 132, p. 249-254, 1993.

JUNEJA, S.C. and DODSON, M.G. Ova recovery, *in vivo* and *in vitro* fertilization of ova from RU486-treated PMSG/hCG-primed mice. **Reprod Fertil**, v. 7, p. 1243-1248, dez, 1995.

KAIPIA, A. and HSUEH, A.J.W. Regulation of ovarian follicle atresia. **Annual Reviews Physiology**, v. 59, p. 349-363, 1997.

KITAMURA, Y.; KASUGAI, T.; NOMURA, S. and MATSUDA, H. Development of mast cells and basophils. In: **Immunopharmacology of Mast Cells and Basophils**. Foreman, J.C., Academic Press, p. 05-28, 1993.

KNOX, G.E. Antihistamine blockage of the ovarian hyperstimulation syndrome. **Amer J Obst Gynecol**, v. 113, p. 992-994, 1974.

KNOX, G.E.; BECK, L.R. Prevention of ovulation in rabbits by antihistamine. **Ginecol Invest**, v. 7, p. 30-31, 1976.

KOBAYASHI, Y.; WRIGHT, K.H.; SANTULLI, R.; KITAI, H.; WALLACH, E.E. Effect of histamine and histamine blockers on the ovulatory process in the *in vitro* perfused rabbit ovary. **Biol Reprod**, v. 28, p. 385-392, 1983.

KRISHNA, A.; TERRANOVA, P.F.; MATTERI, R.L. & PAPKOFF, H. Histamine and increased ovarian blood flow mediate LH-induced superovulation in the cyclic hamster. **J Reprod Fertil**, v. 76, p. 23-29, 1986.

KRISHNA, A.; BEESLEY, K.; TERRANOVA, P.F. Histamine, mast cells and ovarian function. **J Endocrinol**, v. 120, n. 3, p. 363-371, 1989.

LIMA, A.P.; LUNARDI, L.O. and ROSA E SILVA, A.A.M. Effects of castration and testosterone replacement on peritoneal histamine concentration and lung histamine concentration in pubertal male rats. **J Endocrinol**, v. 167, p. 71-75, 2000.

LIPNER, H. Ovulation from histamine depleted ovaries. **Proc Soc Exptl Biol Med**, v. 136, p. 111-114, 1971.

LOGIN, G.R.; GALLI, S.J.; MORGAN, E.; ARIZONO, N.; SCHWARTZ, L.B.; DVORAK, A.M. Rapid microwave fixation of rat mast cells. I. Localization of granule chymase with an ultrastructural postembedding immunogold technique. **Laboratory Investigation**, v. 57, n. 5, p. 595-599, 1987.

LUCIANO, A.M.; PAPPALARDO, A.; RAY, C.; PELUSO, J.J. Epidermal growth factor inhibits large granulosa cell apoptosis by stimulating progesterone synthesis and regulating the distribution of intracellular free calcium. **Biol Reprod**, v. 51, p. 646-654, 1994.

LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J Anim Sci**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.

MAMMEN, J.G. and PENNEFATHER, J.N. The actions of histamine on the separated layers of the guinea-pig uterus: the influence of ovarian steroids. **Agents Actions**, v. 24, n. 1-2, p. 49-55, 1988.

McNEILLY, A.S. The ovarian follicle and fertility. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 40, p. 29-33, 1991.

MENDOZA, C.; CREMADES, N.; RUIZ-REQUENA, E.; MARTINEZ, F.; ORTEGA, E.; BERNABEU, S. and TESARIK, J. Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. **Human Reprod**, v. 14, n. 3, p. 682-635, 1999.

MENENDEZ-PELAEZ, A.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; PEREZ, M.; ANTOLIN, J.; TOLIVIA, D. Development and hormonal regulation of mast cells in the Harderian gland of Syrian hamsters. **Anat Embriol**, v. 186, p. 91-97, 1992.

METCALFE, D.D.; BARAM, B.; MEKORI, Y.A. Mast cells. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033-1079, 1997.

MODAT, G.; BENMBAREK, A.; LALAURIE, M. Quantitative variations in the number and size of peritoneal mastocytes in the female rat during the normal sexual cycle, following ovariectomy and administration of estrogens. **C R Seances Soc Biol Fil**, v. 176, n. 5, p. 675-680, 1982.

MONGET, P. and MONNIAUX, D. Growth factors and the control of folliculogenesis. **J Reprod Fertil**, v. 49 (suppl), p. 321-333, 1995.

MONGET, P.; BESNARD, N.; HUET, C.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. **Horm Res**, v. 45, p. 211-217, 1996.

MORIKAWA, H.; OKAMURA, H.; OKAZAKI, T. & NISHIMURA, T. Changes of histamine in rabbit ovary during ovulation. **Acta Obstet Gynecol Jap**, v. 28, p. 504-508, 1976.

MORIKAWA, H.; OKAMURA, H.; TAKENAKA, A.; MORIMOTO, K. & NISHIMURA, T. Histamine concentration and its effect on ovarian contractility in humans. **Int J Fertil**, v. 26, p. 283-286, 1981.

MYERS, A.C.; UNDEM, B.J. ; WEINREICH, D. Influence of antigen on membrane properties of guinea pig bronchial ganglion neurons. **Journal of Applied Physiology**. Bethesda, v. 71, p. 970-976, 1991.

NAYUDU, P.L. & OSBORN, S.M. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. **J Reprod Fertil**, v. 95, p. 349-362, 1992.

NORMAN, R.J. and BRÄNNSTRÖM, M. Commentary; white cells and the ovary incidental invaders or essential effectors? **J Endocrinol**, v. 140, p. 333-336, 1994.

NORMAN, R.J. and BRÄNNSTRÖM, M. Cytokines in the ovary: Pathophysiology and potential for pharmacological intervention. **Pharmacol Ther**, v. 69, n. 3, p. 219-236, 1996.

O'SHEA, J.D. Smooth muscle-like cells in the theca externa of ovarian follicle in the sheep. **J Reprod Fertil**, v. 24, p. 283-285, 1971.

ODELL, W.D. Sexual maturation in the rat. In: **Control of the Onset of Puberty**. Grumbach, M.M. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 183-210, 1990.

OJEDA, S.R. and URBANSKI, H.F. Puberty in the rat. In: **The Physiology of Reproduction**. Knobil, E. and Neill, J.D., 2^a edition, Raven Press, p. 363-409, 1994.

PADILLA, L.; REINICKE, K.; MONSTESINO, H.; VILENA, F.; ASECIO, H.; CRUZ, M.; RUDOLPH, M.I. Histamine content and mast cells distribution in mouse uterus: the effect of sexual hormones, gestation and labor. **Cell Mol Biol**, v. 36, n. 1, p. 93-100, 1990.

PARSHAD, R.K. & KATHPALIA, K. Distribution and characteristics of mast cells in immature rat ovary. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 26, p. 937-940, 1988.

PATON, A.C. and COLLINS, W.P. Differentiation process of granulosa cells. **Oxford Rev Reprod Biol**, v. 14, p. 169-223, 1992.

PAYNE, A.P.; McGADEY, J.; JOHNSTON, H.S.; MOORE, M.R. & TOMPSON, G.G. Mast cells in the hamster harderian gland: sex difference, hormonal control and relationship to porphyrin. **Journal of Anatomy**, v. 135, p. 451-461, 1982.

PELUSO, J.J.; STEGER, R.W.; HAFEZ, E. Sequential changes associated with the degeneration of preovulatory rat follicles. **J Reprod Fertil**, v. 54, p. 275-278, 1977a.

PELUSO, J.J.; STEGER, R.W.; HAFEZ, E. Superface ultrastructural changes in granulosa cells of atretic follicles. **Biol Reprod**, v. 16, p. 600-605, 1977b.

PELUSO, J.J. Placing progesterone in the apoptotic pathways. **Trends Endocrinol Metab**, v. 8, n. 7, p. 267-271, 1997.

PICTON, H.M. Ativation of follicle development: The primordial follicle. **Theriogenology**, v. 55, p. 1193-1210, 2001.

REICHLIN, S. Neuroendocrine-immune interactions. **N Engl J Med**, v. 329, p. 1246-1253, 1993.

RICHARDS, J.S.; UILENBROEK, JthJ.; JONASSEN, J.A. Follicular growth in rat: a reevaluation of the roles of FHS and LH. In Channing, C.P., Marsh, J., Salder, W.A. (eds), **Ovarian Follicular an Corpous Luteum Functions**. NY: Plenum Press, p. 11-26, 1979.

RICHARDS, J. S. Maturation of ovarian follicles: action and interations of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiol Ver**, v. 60, p. 51-89, 1980.

RICHARDS, J.S and HEDIN, L. Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Ann Rev Physiol**, v. 50, p. 441-463, 1998.

ROSA-e-SILVA, A.A.M.; FERNANDES, G.A.; LIMA FILHO, E.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Puberty and sexual maturation in hemidecorticated (HD) female rats. **Braz J Med Biol Sci**, v. 15, n. 6, p. 367-375, 1982.

ROSA-e-SILVA, A.A.M. et al. Setting up and validation of two radioimmunoassay method for determination of plasma progesterone concentration in mares cows and rats. **Ars Veterinária**, v. 9, p. 1-9, 1993.

ROTELLO, R.; LIEBERMAN, R. LEPOFF, R.; GERSCHENSON, L. Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU 486. **Am J Patol**, v. 140, p. 449-456, 1992.

SANTOS, R.L. Dinâmica ovariana e crescimento folicular. **Veterinária Notícias**, v. 3, n. 1, p. 159-167, 1997.

SCHAYER, R.W. Evidence that induced histamine is an intrinsic regulator of the microcirculatory system. **Am J Physiol**, v. 202, p. 66-72, 1962.

SCHMIDT, G.; OWMAN, Ch. & SJÖBERG, N.O. (1986) Histamine induces ovulation in the isolated perfused rat ovary. **J Reprod Fertil**. 78, p.159-166.

SCHMIDT, G.; AHRÉN, K.; BRÄNNSTRÖM, M. KANNISTO, P.; OWMAN, Ch.; SJÖBERG, N.-O. & TENENBAUM, A. (1987) Histamine stimulates progesterone synthesis and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate accumulation in isolated preovulatory rat follicles. **Neuroendocrinology**. 46, p.69-74.

SCHMIDT, G.; OWMAN, Ch.; SJÖBERG, N.-O. Cellular localization of ovarian histamine, its cyclic variations, and histaminergic effects on ovulation in the rat ovary perfused in vitro. **J Reprod Fertil**, v. 82, p. 409-417, 1988.

SERAFIN, W.E. & AUSTEN, K.F. Mediators of immediate hypersensitivity reactions. **New England Journal of Medicine**, v. 317, p. 30-34, 1987.

SHIRAMA, K.; KOHDA, M. & KOHANO, M. Effects of endocrine glands and hormone replacement on mast cell count of the harderian gland of mice. **Acta Anatomical**, v. 131, p. 327-331, 1988.

SHORE, P.A.; BURKHALTER, A.; CHON, V.H. A method for the fluorometric assay of histamine in tissue. **J Pharmacol Exper Ther**, v. 127, p. 182-186, 1959.

SIRAGANIAN, R.P. An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. **Annual Biochem**, v. 57, p. 383, 1974.

SOPELAK, V.M. Gametogenesis. In : B.D. Cowan & D.B. Seifer. **Clinical Reproductive Medicine**, p. 143- 150, 1997.

SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with and emphasis on domestic animals. **Dom Anim Endocrinol**, v. 12, p. 223-245, 1995.

SUDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.B.; ROCHE, J.F. and IRELAND, J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. **J Reprod Fertil**, v. 101, p. 547-555, 1994.

SZEGO, C.M. and GITIN, E.S. Ovarian histamine depletion during acute hyperemic response to luteinizing hormone. **Nature**, v. 201, p. 682-684, 1964.

SZEGO, C.M. Role of histamine in mediation of hormone action. **Federation Proceedings. Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, p. 1343-1352, 1965.

SZOŁTYŚ, M.; GALAS, J.; JABLONKA, A.; TABAROWSKI, Z. Some morphological and hormonal aspects of ovulations and superovulations in the rat. **J Endocrinol**, v. 141, p. 91-100, 1994.

TAHA, T.A. and SCHELLANDER, K. Isolation and culture of primary follicles from cattle ovaries. **Int Cong Anim Reprod**, v. 1, p. 275-277, 1992.

TAMURA, K.; TAMURA H.; KUMASAKA, K.; MIYAJIMA, A.; SUGA, T. KOGO, H. Ovarian immune cells express granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) during follicular growth and luteinization in gonadotropin-primed immature rodents. **Mol Cell Endocrinol**, v. 3, p. 513-523, 1998.

TAMURA, K.; KOGO, H. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances interleukin-1 β stimulated histamine release in the preovulatory rat ovary. **European Journal of Pharmacology**, v. 373, p. 207-213, 1999.

THIBAUT, C. and LEVASSEUR, M.C. Ovulation. **Human Reprod**, v. 3, p. 513-523, 1988.

TILLY, J.L.; KPWALSKI, K.I.; JOHNSON, A.L.; HSUEH, A.J.W. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. **Endocrinol**, v. 129, p. 2799-2801, 1991.

TILLY, J.L.; TILLY, K.I.; PEREZ, G.I. The genes of cell death and cellular susceptibility to apoptosis in the ovary: a hypothesis. **Cell Death Differ**, v. 4, p. 180-187, 1997.

VINATIER, D.; DUFOUR, Ph.; SUBTIL, D. Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 67, p. 85-102, 1996.

WEBB, R.; GOSDEN, R.G.; TELFER, E.E.; MOOR, R.M. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Anim Sci**, v. 68, p. 257-284, 1999.

WORDINGER, R.J.; ORR, E.L.; PACE, K.; OAKFORD, L. and MORRILL, A. An assessment of mast-cells deficient mice (W/W^v) as a model system to study the role of histamine in implantation and deciduoma formation. **J Reprod Fertil**, v. 73, p. 451-456, 1985.

WURTMAN, R.J. An effect of luteinizing hormone on the fractional perfusion of the rat ovary. **Endocrinol**, v. 75, p. 927-933, 1964.

XU, Z.Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH M.F.; HAMILTON, S.A. and 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. 951-957, 1995.

YUAN, W.; BAO, B.; GARVERICK, H.A.; YOUNGQUIST, R.S. and LUCY, M.C. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. **Dom Anim Endocrinol**, v. 15, p. 55-63, 1998.

YUN, Y.W.; YUEN, B.H. & MOON, Y.S. Effects of superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin on oocyte quality and ovulatory and steroid hormone responses in rats. **Gamete Research**, v. 16, p. 109-120, 1987.

ZHOU, J.; BONDY, C. Anatomy of the human ovarian insulin-like growth factor system. **Biol Reprod**, v. 48, p. 467-482, 1993.

*“Não chores porque já terminou,
sorria porque aconteceu...”*

Gabriel Garcia Márquez

Apêndice de Tabelas

Tabela 1: Concentração de histamina (ng/mg) determinada em ovários de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular por injeção de 5UI/200 μ l/rata de PMSG e sacrificadas após 72 ou 96 horas. Os animais controles de cada grupo receberam injeção de solução salina a 0,9% no mesmo volume e tempo. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	ATRESIA FOLICULAR			
	72 horas		96 horas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Conc. de histamina (ng/mg)	6544,26	3978,48*	4675,23	5921,9
n	7	7	7	7
Erro Padrão da Média	707,6	293,9	672,92	968,23

n = número de animais

* = $p < 0,05$

Tabela 2: Concentração de histamina (ng/mg) determinada no útero de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular por injeção de 5UI/200 μ l/rata de PMSG e sacrificadas após 72 ou 96 horas. Os animais controles de cada grupo receberam injeção de solução salina a 0,9% no mesmo volume e tempo. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	ATRESIA FOLICULAR			
	72 horas		96 horas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Conc. de histamina (ng/mg)	3835,11	1463,46*	2330,2	1893,8
n	7	7	7	7
Erro Padrão da Média	404,08	109,85	313,1	191,68

n = número de animais

* = $p < 0,05$

Tabela 3: Perfil da população de mastócitos ovarianos intactos de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular por injeção de 5UI/200 μ l/rata de PMSG e sacrificadas após 72 ou 96 horas. Os animais controles de cada grupo receberam injeção de solução salina a 0,9% no mesmo volume e tempo. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	ATRESIA FOLICULAR			
	72 horas		96 horas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Num. de mastócitos intactos	77,00	40,67*	89,00	63,34
n	3	3	3	3
Erro Padrão da Média	5,30	9,50	9,50	1,85

n = número de animais

* = $p < 0,05$

Tabela 4: Perfil da população de mastócitos ovarianos desgranulados de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular por injeção de 5UI/200 μ l/rata de PMSG e sacrificadas após 72 ou 96 horas. Os animais controles de cada grupo receberam injeção de solução salina a 0,9% no mesmo volume e tempo. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	ATRESIA FOLICULAR			
	72 horas		96 horas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Num. de mastócitos desgranulados	14,67	37,00*	18,67	24,34
n	3	3	3	3
Erro Padrão da Média	3,38	1	3,64	3,28

n = número de animais

* = $p < 0,05$

Tabela 5: Concentração plasmática de estradiol (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular por injeção de 5UI/200 μ l/rata de PMSG e sacrificadas após 72 ou 96 horas. Os animais controles de cada grupo receberam injeção de solução salina a 0,9% no mesmo volume e tempo. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	ATRESIA FOLICULAR			
	72 horas		96 horas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Estradiol (pg/ml)	13,96	13,23	10,21	8,72
n	13	13	13	13
Erro Padrão da Média	2,27	1,55	1,11	1,11

n = número de animais

Tabela 6: Concentração intra-ovariana de estradiol (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular por injeção de 5UI/200 μ l/rata de PMSG e sacrificadas após 72 ou 96 horas. Os animais controles de cada grupo receberam injeção de solução salina a 0,9% no mesmo volume e tempo. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	ATRESIA FOLICULAR			
	72 horas		96 horas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Estradiol (pg/mg)	0,36	0,26	0,23	0,27
n	13	13	13	13
Erro Padrão da Média	0,02	0,03	0,04	0,03

n = número de animais

Tabela 7: Concentração plasmática de progesterona (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular por injeção de 5UI/200 μ l/rata de PMSG e sacrificadas após 72 ou 96 horas. Os animais controles de cada grupo receberam injeção de solução salina a 0,9% no mesmo volume e tempo. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	ATRESIA FOLICULAR			
	72 horas		96 horas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Progesterona (pg/ml)	5,14	7,25	5,61	19,36*
n	13	13	13	13
Erro Padrão da Média	1,32	1,27	0,97	1,53

n = número de animais

* = p<0,001

Tabela 8: Concentração intra-ovariana de progesterona (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular por injeção de 5UI/200 μ l/rata de PMSG e sacrificadas após 72 ou 96 horas. Os animais controles de cada grupo receberam injeção de solução salina a 0,9% no mesmo volume e tempo. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	ATRESIA FOLICULAR			
	72 horas		96 horas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Progesterona (pg/mg)	24,00	499,55*	16,77	688,76*
n	13	13	13	13
Erro Padrão da Média	13,33	23,11	13,85	40,61

n = número de animais

* = p<0,001

Tabela 9: Razão $E_2:P_4$ plasmática de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular por injeção de 5UI/200 μ l/rata de PMSG e sacrificadas após 72 ou 96 horas. Os animais controles de cada grupo receberam injeção de solução salina a 0,9% no mesmo volume e tempo. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	ATRESIA FOLICULAR 72 horas		ATRESIA FOLICULAR 96 horas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
$E_2:P_4$	5,94	2,85*	2,77	0,46**
n	13	13	13	13
Erro Padrão da Média	0,73	0,20	0,18	0,02

n = número de animais

* = $p < 0,01$

** = $p < 0,001$

Tabela 10: Razão $E_2:P_4$ intra-ovariana de ratas pré-púberes induzidas à atresia folicular por injeção de 5UI/200 μ l/rata de PMSG e sacrificadas após 72 ou 96 horas. Os animais controles de cada grupo receberam injeção de solução salina a 0,9% no mesmo volume e tempo. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	ATRESIA FOLICULAR 72 horas		ATRESIA FOLICULAR 96 horas	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
$E_2:P_4$	0,05	0,0008**	0,015	0,004*
n	13	13	13	13
Erro Padrão da Média	0,003	0,0003	0,004	0,003

n = número de animais

* = $p < 0,01$

** = $p < 0,001$

Tabela 11: Concentração de histamina (ng/mg) determinada em ovários de ratas pré-púberes induzidas à superovulação por injeção de 30UI/200 μ l/rata de PMSG e após 56 horas injeção de 10UI/200 μ l/rata de hCG e sacrificadas após 24 horas. O grupo de animais controles recebeu injeção de solução salina a 0,9% nos mesmos volumes e tempos. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	SUPEROVULAÇÃO	
	Controle	Tratado
Conc. de histamina (ng/mg)	4092,57	6322,64
n	7	7
Erro Padrão da Média	355,96	250,90

n = número de animais

Tabela 12: Concentração de histamina (ng/mg) determinada no útero de ratas pré-púberes induzidas à superovulação por injeção de 30UI/200 μ l/rata de PMSG e após 56 horas injeção de 10UI/200 μ l/rata de hCG e sacrificadas após 24 horas. O grupo de animais controles recebeu injeção de solução salina a 0,9% nos mesmos volumes e tempos. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	SUPEROVULAÇÃO	
	Controle	Tratado
Conc. de histamina (ng/mg)	1029,04	2939,2*
n	7	7
Erro Padrão da Média	111,2	251,85

n = número de animais

Tabela 13: Perfil da população de mastócitos ovarianos intactos de ratas pré-púberes induzidas à superovulação por injeção de 30UI/200 μ l/rata de PMSG e após 56 horas injeção de 10UI/200 μ l/rata de hCG e sacrificadas após 24 horas. O grupo de animais controles recebeu injeção de solução salina a 0,9% nos mesmos volumes e tempos. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	SUPEROVULAÇÃO	
	Controle	Tratado
Num. de mastócitos intactos	48,33	65,00
n	3	3
Erro Padrão da Média	8,76	10,85

n = número de animais

Tabela 14: Perfil da população de mastócitos ovarianos desgranulados de ratas pré-púberes induzidas à superovulação por injeção de 30UI/200 μ l/rata de PMSG e após 56 horas injeção de 10UI/200 μ l/rata de hCG e sacrificadas após 24 horas. O grupo de animais controles recebeu injeção de solução salina a 0,9% nos mesmos volumes e tempos. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	SUPEROVULAÇÃO	
	Controle	Tratado
Num. de mastócitos desgranulados	43,67	52,75
n	3	3
Erro Padrão da Média	12,2	9,37

n = número de animais

Tabela 15: Concentração plasmática de estradiol (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação por injeção de 30UI/200 μ l/rata de PMSG e após 56 horas injeção de 10UI/200 μ l/rata de hCG e sacrificadas após 24 horas. O grupo de animais controles recebeu injeção de solução salina a 0,9% nos mesmos volumes e tempos. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	SUPEROVULAÇÃO	
	Controle	Tratado
Estradiol (pg/ml)	31,61	57,21*
n	13	13
Erro Padrão da Média	2,51	10,64

n = número de animais

* = p<0,05

Tabela 16: Concentração intra-ovariana de estradiol (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação por injeção de 30UI/200 μ l/rata de PMSG e após 56 horas injeção de 10UI/200 μ l/rata de hCG e sacrificadas após 24 horas. O grupo de animais controles recebeu injeção de solução salina a 0,9% nos mesmos volumes e tempos. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	SUPEROVULAÇÃO	
	Controle	Tratado
Estradiol (pg/mg)	0,51	1,01*
n	13	13
Erro Padrão da Média	0,17	0,10

n = número de animais

* = p<0,05

Tabela 17: Concentração plasmática de progesterona (pg/ml) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação por injeção de 30UI/200µl/rata de PMSG e após 56 horas injeção de 10UI/200µl/rata de hCG e sacrificadas após 24 horas. O grupo de animais controles recebeu injeção de solução salina a 0,9% nos mesmos volumes e tempos. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	SUPEROVULAÇÃO	
	Controle	Tratado
Progesterona (pg/ml)	6,35	12,10*
n	13	13
Erro Padrão da Média	1,25	1,37

n = número de animais

* = $p < 0,05$

Tabela 18: Concentração intra-ovariana de progesterona (pg/mg) de ratas pré-púberes induzidas à superovulação por injeção de 30UI/200µl/rata de PMSG e após 56 horas injeção de 10UI/200µl/rata de hCG e sacrificadas após 24 horas. O grupo de animais controles recebeu injeção de solução salina a 0,9% nos mesmos volumes e tempos. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	SUPEROVULAÇÃO	
	Controle	Tratado
Progesterona (pg/mg)	354,81	1832,21*
n	13	13
Erro Padrão da Média	209,14	140,84

n = número de animais

* = $p < 0,001$

Tabela 19: Razão $E_2:P_4$ plasmática de ratas pré-púberes induzidas à superovulação por injeção de 30UI/200µl/rata de PMSG e após 56 horas injeção de 10UI/200µl/rata de hCG e sacrificadas após 24 horas. O grupo de animais controles recebeu injeção de solução salina a 0,9% nos mesmos volumes e tempos. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	SUPEROVULAÇÃO	
	Controle	Tratado
$E_2:P_4$	9,17	6,61
n	13	13
Erro Padrão da Média	0,62	0,62

n = número de animais

Tabela 20: Razão $E_2:P_4$ intra-ovariana de ratas pré-púberes induzidas à superovulação por injeção de 30UI/200µl/rata de PMSG e após 56 horas injeção de 10UI/200µl/rata de hCG e sacrificadas após 24 horas. O grupo de animais controles recebeu injeção de solução salina a 0,9% nos mesmos volumes e tempos. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

	SUPEROVULAÇÃO	
	Controle	Tratado
$E_2:P_4$	0,0029	0,0046*
n	13	13
Erro Padrão da Média	0,00017	0,0003

n = número de animais

* = $p < 0,05$