

3 Fisiologia do ovário e da fecundação

Teresa Almeida Santos

1. INTRODUÇÃO

Os ovários, tal como os testículos, são glândulas endócrinas cuja função não se limita à secreção de hormonas para a circulação sistémica. O ovário é o órgão onde se produzem as células germinais femininas, assegurando a sua maturação e libertação a intervalos regulares, durante a idade reprodutiva da mulher, de um gameta capaz de ser fecundado.

As duas funções fisiológicas básicas associadas ao funcionamento dos ovários são a gametogénese e a esteroidogénese e estão intimamente ligadas. A primeira consiste num conjunto de processos maturativos que culminam com a libertação de um ovócito maduro, apto para ser fecundado. A segunda é a síntese e libertação de hormonas esteróides. Estas duas funções processam-se ao nível da unidade fundamental e funcional do ovário, o folículo, constituído pelo ovócito (célula germinal com origem extra-embriónica e endodérmica) rodeado por várias camadas de células especializadas que constituem a granulosa e a teca e situado no seio de um estroma conjuntivo.

A ovogénese é um processo gradual através do qual as propriedades necessárias à expressão da competência do desenvolvimento são adquiridas em sucessivos estádios de diferenciação e que envolve mecanismos reguladores a vários níveis, de forma a permitir o crescimento e maturação de uma única célula destinada a assegurar a continuidade da espécie. Este processo não

é muito eficiente nos primatas em que se verifica um grande investimento na produção de ovócitos antes do nascimento para apenas uma pequena fracção destes atingir a maturação total e a ovulação, ao longo da vida reprodutiva.

A função endócrina dos ovários, produzindo estrogénios e progesterona, sincroniza a actividade do tracto genital e da glândula mamária com o ciclo ovulatório permitindo, assim, a libertação cíclica de um ovócito.

No ovário identificam-se duas zonas, uma periférica designada córtex e uma outra central denominada medula. O córtex possui numerosos folículos em diversos estádios de desenvolvimento, corpos amarelos e *corpus albicans* formados por regressão dos anteriores (Fig. 1).

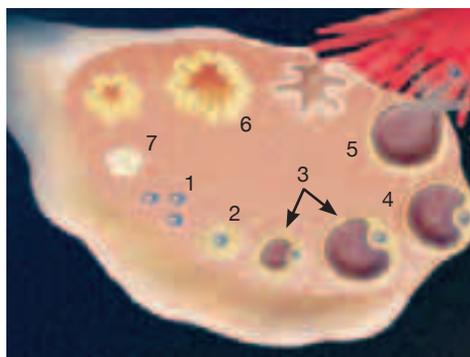


Figura 1. Esquema do ovário humano mostrando os diferentes estádios do desenvolvimento do ovócito. 1: folículos primordiais; 2: folículo primário; 3: folículos antrais; 4: folículo pré-ovulatório; 5: ovulação; 6: *corpus luteum*; 7: *corpus albicans*.

O desenvolvimento folicular inicia-se na parte mais interna do ovário pelas 15 semanas de gestação. O encapsulamento do ovócito no interior do folículo impede o processo de atresia e permite que o ovócito se mantenha bloqueado no estágio de diplóteno da pro-fase I porque se mantém em contacto com factores inibidores da meiose, produzidos pelas células da granulosa e que chegam ao citoplasma do ovócito via *gap-junctions*¹. O córtex de um ovário humano apresenta um número finito de células germinativas primordiais, número que vai decrescendo ao longo da vida do indivíduo do sexo feminino, como consequência das ovulações e atresia. Aos seis meses de gestação, os ovários contêm cerca de sete milhões de células germinativas ou ovogónias; no momento do nascimento subsistem apenas cerca de dois milhões e a redução da população de células germinativas continua até que, por altura da menarca, existem apenas cerca de 300.000 folículos. A «perda» de folículos por atresia é contínua, sofrendo uma aceleração acentuada por volta dos 38 anos, existindo, nessa altura, apenas cerca de 1.000 folículos. Inicia-se, então um decréscimo da função endócrina, começando a mulher a entrar no climatério². Associada a este processo, ocorre também uma redução da qualidade ovocitária na qual poderá estar implicada uma disfunção mitocondrial³. A data exacta da menopausa é determinada quer pela quantidade inicial de células germinativas, quer pela sua depleção ao longo da vida. No mundo ocidental a idade média em que ocorre a menopausa situa-se nos 51 anos².

2. FUNÇÃO OVÁRICA

2.1. FOLICULOGÉNESE, ESTEROIDOGÉNESE E MATURAÇÃO OVOCITÁRIA

A foliculogénese é o conjunto de transformações que o folículo sofre desde o momento em que sai da reserva inerte de células ger-

minais para iniciar o seu crescimento, até à sua involução atretica ou, muito menos frequentemente, à sua expulsão do ovário na ovulação. Podem distinguir-se neste processo as seguintes fases: iniciação, crescimento pré-antral, recrutamento, selecção e dominância. Cada uma das etapas corresponde a um estado morfológico particular do folículo.

Estes processos têm início na vida fetal e caracterizam-se morfológicamente pelo aumento do tamanho do ovócito, pelo acréscimo do número de células da granulosa e, conseqüentemente, o aumento do tamanho do folículo.

2.1.1. INICIAÇÃO E CRESCIMENTO PRÉ-ANTRAL

Durante a vida reprodutiva há permanentemente folículos a entrar em crescimento (cerca de 15 por dia aos 20 anos e apenas um número muito reduzido aos 40 anos). Um folículo destinado a evoluir até à ovulação inicia o seu crescimento 85 dias antes de atingir a maturação completa, não sendo ainda completamente conhecido o mecanismo desta iniciação que é independente das gonadotrofinas. A FSH exerce apenas uma influência permissiva após o início da maturação folicular.

No ovário da mulher jovem, os folículos primordiais (Fig. 2) são os mais numerosos, constituindo a população a partir da qual uma coorte inicia o processo de maturação. O folículo primordial é composto por um ovócito primário envolvido por uma camada de células epiteliais achatadas e mede aproximadamente 25 µm de diâmetro, apresentando um núcleo volumoso e um citoplasma relativamente reduzido em relação ao volume total da célula. A activação dos folículos primordiais é progressiva e inicia-se pela proliferação e modificação morfológica das células da granulosa passando as células epiteliais a uma forma cubóide. Quando estas células cubóides formam uma camada que envolve completamente o ovócito, o folículo primordial transforma-se em folículo primário. Neste,

o ovócito já tem maiores dimensões e entre o ovócito e as células foliculares desenvolve-se uma membrana glicoproteica denominada zona pelúcida. A transição de folículo primordial para folículo primário é prolongada para permitir a fase de crescimento da ovogénese, em que ocorre uma hipertrofia do citoplasma do ovócito enquanto as células da granulosa proliferam e se forma a estrutura característica do folículo primário. Segue-se uma intensa actividade mitótica das células da granulosa que é acompanhada por modificações na zona pelúcida e atinge-se o estágio do folículo pré-antral, assistindo-se então, ao recrutamento das células somáticas do tecido intersticial adjacente para formar a teca.

As mitoses sucessivas e a formação de várias camadas de células da granulosa levam ao aparecimento do folículo secundário. Neste momento inicia-se a formação da teca interna que resulta de uma condensação das células conjuntivas que envolvem o folículo, separadas da granulosa por uma membrana basal. A teca interna faz parte da unidade funcional folicular que atinge, assim, o estágio de folículo pré-antral e, ao contrário da granulosa, é vascularizada.

A proliferação contínua de células da granulosa leva à produção e acumulação de líquido entre as células formando pequenas cavidades. Estas cavidades acabam por coalescer e formar uma cavidade única central (antro) com as células da granulosa dispostas à periferia formando a parede folicular – folículos antrais precoces. O ovócito mantém-se rodeado por células da granulosa que se designam por células do *cumulus* e constituem o compacto complexo cumulo-ovocitário. Na fase final do crescimento folicular as células da granulosa que constituem a parede folicular adquirem propriedades morfológicas e funcionais diferenciadas: as mais periféricas, localizadas junto à membrana basal, não proliferam e sintetizam enzimas envolvidas nas esteroidogénese, adquirindo receptores da LH. As células das camadas mais internas mantêm a capacidade proliferativa e pos-

suem escassa actividade secretora e raros receptores da LH. Após o pico pré-ovulatório de LH estas células sintetizam e depositam uma matriz extracelular que permite a expansão do *cumulus* e o destaca da parede folicular, enquanto as células da granulosa periféricas permanecem aderentes à membrana basal.

Apesar de as células dos pequenos folículos pré-antrais responderem ao estímulo da FSH, esta hormona não é necessária para as fases iniciais de proliferação e crescimento folicular. Contudo, a segunda fase da foliculogénese é hormonodependente, envolvendo um processo complexo essencial ao objectivo primário da foliculogénese, a ovulação de um ovócito fecundável.

No decurso da fase folicular, o folículo dominante, que atinge 13 mm de diâmetro, começa a exercer uma acção frenadora sobre a secreção de FSH, mediada pelos estrogénios e provavelmente também pela inibina, levando à atresia dos outros folículos em crescimento⁴. Estes efeitos exercem-se também no ovário contralateral. Atingida a maturação folicular na fase pré-ovulatória, o folículo mede entre 20 e 28 mm e faz proclividade na superfície do ovário.

A inibina, a activina e a follistatina são três factores expressos nas células da granulosa e da teca dos folículos antrais e nas células da granulosa luteinizadas que foram identificados no líquido folicular e que são responsáveis por uma acção reguladora local e à distância.

A inibina e a activina são membros da família TGF- α (Transforming growth factor α) que regulam a produção de FSH, a activina estimulando-a e a inibina reprimindo-a. A acção da follistatina, uma glicoproteína com estrutura semelhante às da família da inibina/activina, também inibe a produção de FSH através da sua capacidade de neutralizar a activina pela sua ligação a este factor.

A inibina é segregada pelos folículos de maiores dimensões e exerce uma acção frenadora sobre os restantes folículos, impedindo o seu crescimento.

O *insulin-like growth factor I* (IGF-I), um outro factor de crescimento com função idêntica à da activina, é expresso nas células dos pequenos folículos antrais e pré-antrais e no *cumulus* dos folículos pré-ovulatórios e estimula a expressão do receptor da FSH nas células da granulosa.

A ausência do gene IGF-I provoca alterações morfológicas no ovário idênticas à da ausência da FSH, isto é, a foliculogénese é bloqueada no estágio pré-antral e a expressão dos receptores da FSH está significativamente reduzida.

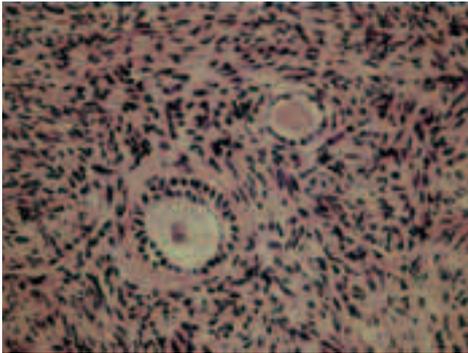


Figura 2. Folículo primordial e primário (ovário humano).

2.1.2. FASE HORMONODEPENDENTE

A partir do estágio antral é possível distinguir diversas etapas que levarão, por um lado, à maturação completa do folículo destinado a ovular e, por outro, à atresia de todas as outras unidades foliculares em crescimento.

O recrutamento da coorte folicular no seio da qual se encontra o folículo destinado a ovular efectua-se no início da fase luteínica do ciclo precedente, sob influência do pico de FSH que se produz a meio do ciclo. Só os folículos que atingiram um estado adequado de maturação serão recrutados, os restantes sofrerão atresia. A selecção designa a emergência do folículo ovulatório de entre os folículos recrutados e corresponde ao início da fase folicular do ciclo em que terá lugar a ovulação. Nesta altura, a coorte recrutada é particularmente sensível às gonadotrofinas, o que explica

que a elevação artificial da concentração sérica destas possa salvar da atresia alguns folículos, como ocorre com os tratamentos de estimulação da ovulação em que é possível obter um número elevado de ovócitos maduros. A limitação do recrutamento e a atresia dos folículos não seleccionados de entre a coorte dos recrutados deve-se à redução fisiológica das concentrações de FSH no decurso das fases pré e pós-ovulatória. O folículo pré-ovulatório que se auto-selecciona pelo seu crescimento mais rápido, persiste e domina, pois as suas necessidades em FSH são apenas metade das necessárias para o recrutamento.

A dominância folicular será explicada pela aquisição mais rápida de receptores da LH e por uma amplificação da resposta à FSH resultante de um mecanismo autócrino. A FSH tem a capacidade de induzir a síntese dos seus próprios receptores nas células da granulosa cuja actividade mitótica estimula, em sinergia com os estrogénios. A multiplicação das células da granulosa reforça, assim, a capacidade de aromatização do folículo e resulta de mecanismos de retrocontrolo positivo que explicam o perfil exponencial do crescimento folicular e da produção de estrogénios no decurso da primeira fase do ciclo menstrual. Em ecografia, o folículo dominante pode ser identificado por volta do 8.º dia do ciclo menstrual com um diâmetro próximo de 10 mm que atingirá 20-24 mm na fase pré-ovulatória. A presença do folículo dominante leva à atresia dos folículos não seleccionados em ambos os ovários. Morfologicamente, esta involução corresponde a uma degenerescência cariopícnótica das células da granulosa e à transformação da teca interna em glândula intersticial, degenerando também o ovócito. O determinismo da atresia folicular será diferente segundo se trata de estados pré ou pós-antrais. No estado pré-antral, a involução folicular será independente das secreções endócrinas e regulada por factores genéticos e/ou metabólicos locais.

No caso dos folículos já evoluídos, a causa da atresia é a redução dos níveis de FSH (Fig. 3) e a perda da capacidade de transformação dos androgénios, que se acumulam no líquido folicular, em estrogénios, por redução da actividade da aromatase. A redução da sensibilidade à FSH contribui para a diminuição da capacidade de aromatização. Simultaneamente reduz-se, também, a actividade mitótica das células da granulosa por deficiência em estrogénios.

As ovogónias entram em meiose após um período de interfase em que ocorre a replicação do ADN. Durante a profase, a fase da meiose com maior duração e na qual se observa uma endoreduplicação do ADN, destacam-se quatro estádios: leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. O núcleo do ovócito mantém-se em diplóteno com um conteúdo tetraplóide em ADN em que os cromossomas estão emparelhados em tétradas e durante o qual se produz o *crossing-over*, através do qual cromossomas de origem materna e paterna podem trocar fragmentos, contribuindo para a diversi-

dade genética. O ovócito bloqueado neste estágio apresenta um núcleo designado por vesícula germinativa e assim permanece durante anos até que nas horas que precedem a ovulação um sinal induzido pelo pico de LH promove o reinício da primeira divisão da meiose que separa os cromossomas emparelhados, reduzindo o seu número a metade e a quantidade de ADN a um valor diplóide. A meiose volta então a sofrer um bloqueio em metafase II (MII), até que ocorra uma possível fecundação (Fig. 4). A inibição do reinício da meiose no período que precede a descarga gonadotrófica ovulatória depende de factores denominados OMI (*ovocyte meiosis inhibitors*), que provêm da granulosa e são transmitidos ao ovócito através de pontes intercelulares que atravessam a zona pelúcida. A regulação da inibição meiótica é essencialmente assegurada pelo AMPc. No entanto, para além da supressão do mecanismo inibidor associado aos níveis elevados de AMPc, existe também uma substância estimulante que participa no processo – o *maturation promoting factor* (MPF).

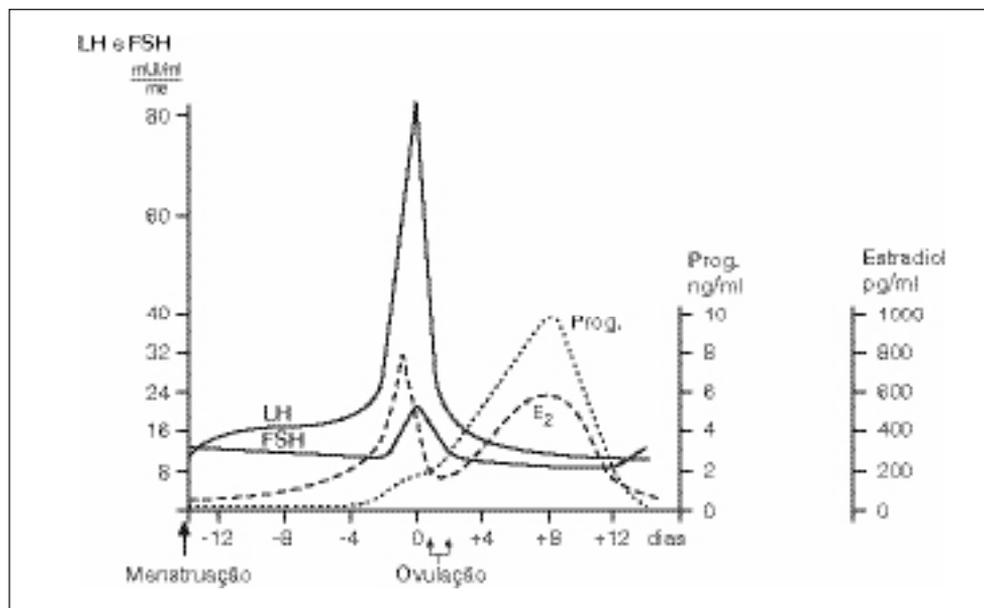


Figura 3. Evolução dos níveis séricos de gonadotrofinas e de hormonas esteróides ováricas no decurso do ciclo menstrual⁵

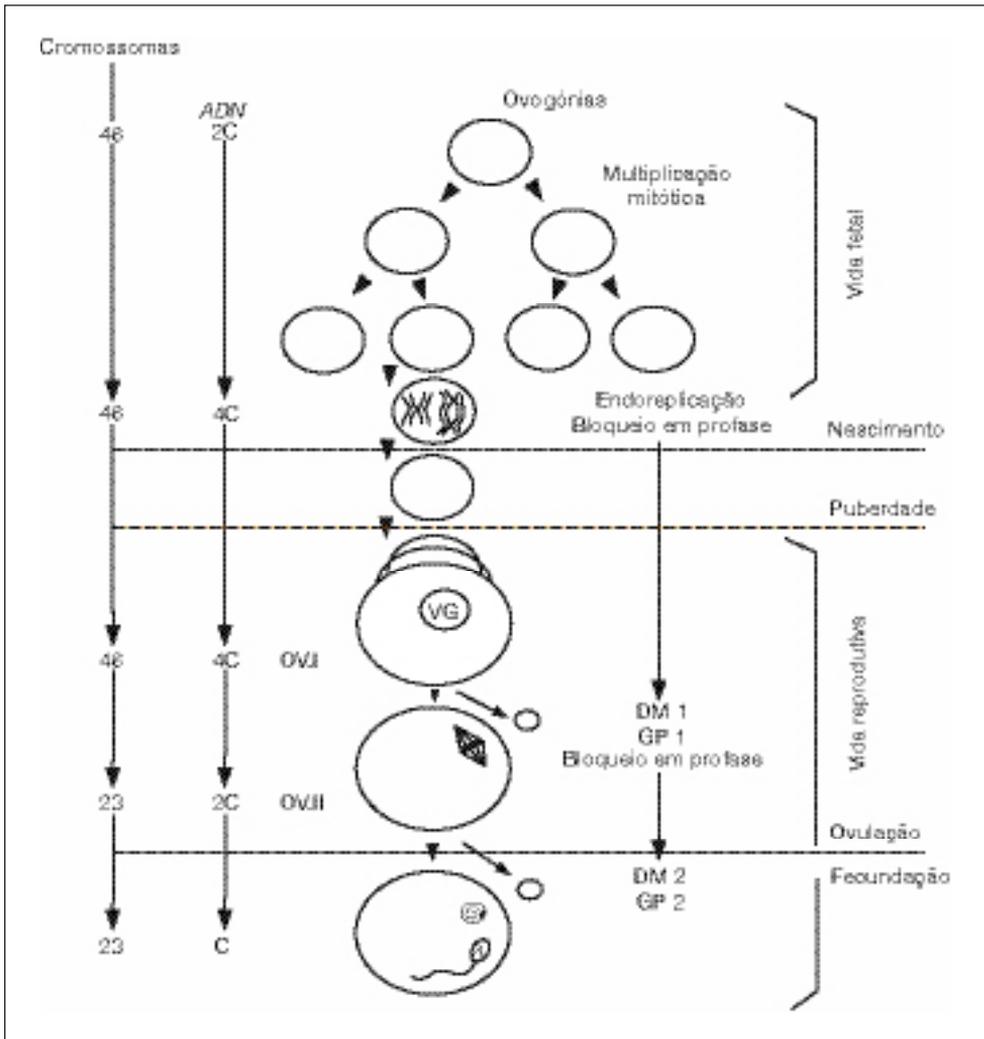


Figura 4. Etapas da meiose ovocitária⁵. VG: vesícula germinativa; DM: divisão de maturação; GP: globo polar; C: complemento haplóide de ADN; OV. I e II: ovócito primário e secundário.

2.2. REGULAÇÃO PARÁCRINA E AUTÓCRINA

A qualidade de um ovócito está estreitamente relacionada com o ambiente hormonal do folículo o que se deve, em larga medida, a mecanismos de controlo parácrino e autócrino identificados na década de 80. A evidência de que a função ovárica seria regulada por factores produzidos na própria célula (autócrinos), ou em células vizinhas

(regulação parácrina) e que estes factores poderiam modular a resposta celular às gonadotrofinas hipofisárias, representou um grande avanço no conhecimento dos mecanismos do desenvolvimento e da atresia folicular. O líquido folicular é um reservatório onde se acumulam estes factores que são produzidos e actuam localmente e que englobam hormonas esteróides e proteínas reguladoras que interagem de uma

forma complexa. De entre os factores parácrinos e autócrinos ováricos, destacam-se a família das inibinas/activinas, o TGF- β (*transforming growth factor* β) e a MIS (*mullerian inhibiting substance*). A inibina terá uma acção local reduzindo a aromatização dos androgénios e reprimindo a meiose, acção que será favorecida pelo TGF- β e inibida pela MIS. Outros factores de crescimento são produzidos no folículo e têm um papel essencial, nomeadamente o FGF (*fibroblast growth factor*) capaz de estimular o crescimento da granulosa mas também e, sobretudo, de induzir a angiogénese da teca e do corpo amarelo. O IGF-I é sintetizado pelas células da granulosa sob o efeito dos estrogénios e estimula a esteroidogénese nestas mesmas células, aumentando o efeito da LH na produção de androgénios a nível da teca. O EGF (*epidermal growth factor*) é um potente estimulante mitótico. Também a hormona antimülleriana (AMH) terá um efeito regulador da FSH a nível dos pequenos folículos antrais, além de inibir a activação dos folículos primordiais. Este efeito será exercido através da inibição da acção da FSH no equilíbrio de crescimento dos folículos pré-antrais. Estes mecanismos de retroregulação e pró-regulação destinam-se a promover a fase de crescimento da ovogénese através das relações simbióticas entre o ovócito e as células da granulosa. A circunstância de as células da granulosa dos folículos pré-antrais sintetizarem inibina/activina, folistatina e AMH e de serem capazes de responder ao estímulo da FSH caracteriza a importância da sinalização mútua e da estreita comunicação intercelular. A nível do ovário, existem dois tipos de receptores dos estrogénios (ER), os ER α e os ER β , sendo estes últimos mais abundantes. Os ratinhos *knockout* para os ER α são estéreis, verificando-se bloqueio do desenvolvimento folicular ao nível dos folículos antrais. Pelo contrário, os ratinhos desprovidos de ER β são apenas menos férteis que os que exprimem os receptores α dos estro-

génios, o que sugere que os ER α estarão associados à proliferação celular (das células da granulosa) e os ER β terão uma função na diferenciação, bloqueando a proliferação celular e iniciando as modificações essenciais à ovulação⁶.

O IGF-I induz a proliferação das células da granulosa mas também estimula a síntese de receptores de LH (LHR) nas células da granulosa e da teca, realçando a importância da interacção entre IGF-I, estradiol e FSH na foliculogénese e iniciando a fase de resposta destas células à LH, essencial à ovulação, formação e actividade endócrina do corpo amarelo.

As células da teca produzem quantidades crescentes de androgénios sob o estímulo da LH, cujo pico pré-ovulatório activa uma secreção crescente de proteínas responsáveis por grandes transformações nas células foliculares, nomeadamente a paragem da proliferação e a diferenciação terminal (luteinização) com reinício da meiose (bloqueada em profase I) e libertação do óvulo.

A ruptura do bloqueio meiótico só ocorre nos ovócitos de folículos que completaram o seu crescimento e maturação e nos quais o citoplasma aumentou de volume através da reorganização dos organitos e do aumento das reservas de ARNm.

A zona pelúcida é um revestimento extracelular constituído por três glicoproteínas (glicoproteínas da zona pelúcida designadas por ZP1, ZP2 e ZP3) que cobre o ovócito durante o seu crescimento e vai acompanhando o aumento de volume deste, só desaparecendo após a eclosão do blastocisto. O aparecimento desta membrana está relacionado com o início do crescimento ovocitário, uma vez que os folículos quiescentes não têm zona pelúcida. Durante o processo de desenvolvimento folicular, formam-se também os grânulos corticais para preparar o ovócito para as reacções subsequentes à fecundação e consequente bloqueio à polispermia, pela libertação do conteúdo dos grânulos para o espaço perivitelino após a fecundação.

2.3. OVULAÇÃO

O folículo maduro rompe 36 a 40 horas após o início da descarga pré-ovulatória de LH e liberta o ovócito envolvido em células do *cumulus* que é captado para o interior da trompa onde reinicia a meiose com expulsão do 1.º globo polar e o subsequente bloqueio da meiose em metafase da 2.ª divisão meiótica. Este bloqueio só terminará com a emissão do 2.º globo polar, após a fecundação.

A ruptura folicular é um fenómeno ainda mal compreendido, existindo algumas hipóteses para explicar o crescimento rápido provocado pelas modificações no conteúdo hormonal e as alterações de pressão intrafolicular. Foi também demonstrado um papel importante da síntese de proteases que actuariam sobre a lâmina basal induzindo a sua ruptura. Efectivamente, a libertação do ovócito está associada a alterações do colagénio da parede folicular provocadas por enzimas proteolíticas. As células da granulosa e da teca produzem activadores do plasminogénio em resposta à FSH e LH que activam esta substância para produzir plasmina, a qual promove o aparecimento de colagenase activa que induz a ruptura da parede folicular.

A concentração de algumas prostaglandinas (E e F) no líquido folicular aumenta significativamente na fase pré-ovulatória, atingindo o máximo antes da ruptura folicular. Sabe-se que as prostaglandinas podem libertar enzimas proteolíticas, promover a angiogénese e a hiperémia e terão um efeito contráctil sobre o músculo liso da camada externa do folículo, contribuindo para a expulsão do conteúdo folicular.

Do ponto de vista endócrino, é o próprio folículo que desencadeia a ovulação através da síntese crescente de estradiol que, ao atingir um determinado limiar, activa o mecanismo de retroregulação que estimula a libertação de gonadotrofinas até ao pico pré-ovulatório característico. A ovulação ocorre habitualmente 34-36 horas após o início do pico ovu-

latório de LH que é o responsável último pela ovulação e se associa aos seguintes efeitos:

- Reinício da meiose ovocitária com inibição da substância inibidora da meiose.
- Luteinização das células da granulosa.
- Estímulo da actividade proteolítica e da síntese de enzimas proteolíticas essenciais à ruptura folicular.

O pico de FSH, embora de menor magnitude, tem também efeitos importantes designadamente:

- Aumento da produção de activador do plasminogénio.
- Secreção de ácido hialurónico pelas células do *cumulus* facilitando a expansão e dispersão destas células e permitindo que flutuem livremente no líquido folicular antes da ruptura.
- Constituição de um nível suficiente de receptores de LH na granulosa, essencial para uma função luteínica adequada.

2.4. FORMAÇÃO E MANUTENÇÃO DO CORPO AMARELO

Logo após a expulsão do ovócito, inicia-se uma série de modificações ao nível do folículo, tanto do ponto de vista morfológico como a nível endócrino. Já antes da ovulação, as células da teca começam a aumentar de tamanho e adquirem uma aparência vacuolar com depósito de um pigmento amarelo responsável pela coloração do corpo amarelo que resulta do folículo após a ovulação. Um outro fenómeno característico da ovulação é a proliferação de fibroblastos e capilares sanguíneos que penetram na granulosa através da lâmina basal. Esta angiogénese é uma fase fundamental no processo de luteinização e é mediada por factores de crescimento vasculares, nomeadamente o *vascular epithelial growth factor* (VEGF). Esta intensa vascularização permite o aporte ao corpo amarelo de substratos necessários à síntese de estrogénios e progesterona.

O corpo amarelo é a principal fonte de hormonas esteróides sexuais nesta fase do ciclo

A esteroidogénese está funcionalmente compartimentada no foliculo. A teca interna apenas contém receptores de LH e sintetiza preferencialmente androgénios – androsteronediona e testosterona – os quais difundem através da membrana basal para o interior das células da granulosa que, sob a influência da FSH e da indução da actividade enzimática da aromatase, convertem estes androgénios em estrogénios (estrone e estradiol) – esta é a base da teoria «duas células, duas gonadotrofinas», que codifica o conceito universalmente aceite de que uma interacção estreita entre FSH e LH é um requisito essencial ao desenvolvimento e maturação foliculares normais e que representa a necessidade da teca e da granulosa para a produção de estradiol (Figs. 6 e 7). Os equipamentos enzimáticos dos dois tecidos são diferentes e limitam reciprocamente as suas capacidades. A teca sintetiza androgénios que não consegue aromatizar em grande quantidade e a granulosa possui uma grande capacidade de aromatização dos androgénios produzidos na teca. As células da granulosa segregam também grandes quantidades de inibina que tem a propriedade de bloquear a síntese e a libertação de FSH pela hipófise. As taxas plasmáticas de inibina são paralelas às do estradiol e, em conjunto, reduzem a secreção da FSH, suprimindo assim o suporte aos foliculos

hormonodependentes que sofrem atresia. O foliculo dominante não é sensível a este efeito porque evolui de forma autónoma, sem necessidade do estímulo da FSH.

Os estrogénios exercem também uma acção de retrocontrolo positivo sobre a libertação hipofisária de LH cuja resposta depende do nível e da impregnação estrogénica, sabendo-se que para induzir o pico de LH são necessárias concentrações de estradiol de 200 pg/ml durante mais de 50 horas. O conjunto das regulações do eixo hipotálamo-hipófise-ovário pode resumir-se da seguinte forma: a partir da puberdade, a descarga pulsátil de GnRH permite uma secreção basal de FSH que estimula o recrutamento folicular. Os estrogénios intrafoliculares, formados a partir dos androgénios segregados sob o controlo da LH, mantêm a sua própria produção e a proliferação da granulosa. Em sinergia com a inibina, os estrogénios reduzem a libertação de FSH, assegurando a selecção e a dominância do foliculo ovulatório. Acima de um determinado limiar, os estrogénios sensibilizam as células gonadotróficas hipofisárias à acção da GnRH provocando, assim, a descarga pré-ovulatória de LH. A progesterona produzida na fase luteínica reduz o ritmo pulsátil da secreção de GnRH que apenas voltará a sofrer uma aceleração após a queda pré-menstrual da concentração de progesterona.

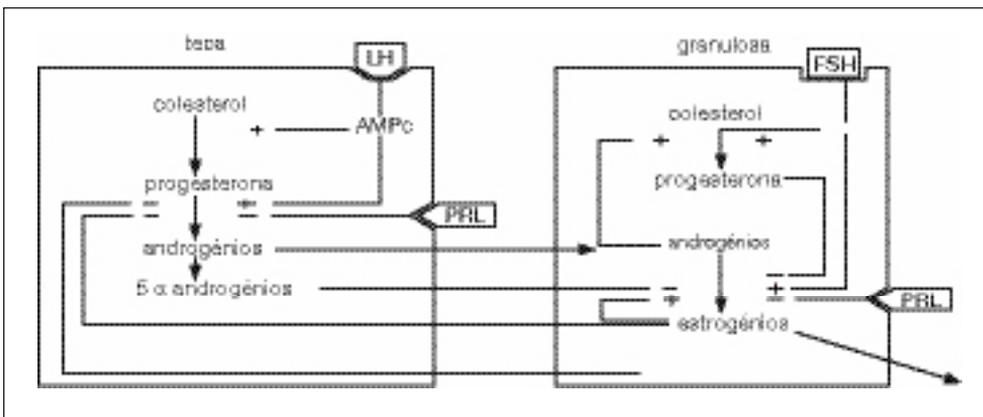


Figura 6. Compartimentação da esteroidogénese ovárica (adaptado de Thibault, et al.⁷).

manutenção dos órgãos reprodutivos, sendo também importantes para a regulação de processos metabólicos independentes das funções reprodutoras. Os estrogénios têm uma importância capital no desenvolvimento e fisiologia dos órgãos reprodutivos da mulher. Além do crescimento e desenvolvimento folicular, assumem um papel fundamental no desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários mas exercem também efeitos sobre órgãos e sistemas extragenitais, nomeadamente na estimulação da síntese de proteínas hepáticas e também na manutenção da estrutura trabecular óssea, na distribuição da gordura corporal e ao nível das glândulas mamárias. As hormonas esteróides exercem a sua presença graças a receptores nos órgãos-alvo. A hormona atravessa a membrana celular por difusão simples, é transportada ao núcleo, une-se ao receptor nuclear específico e dá-se a interacção do complexo hormona-receptor com o ADN; segue-se a síntese de ARNm e o seu transporte aos ribossomas para a síntese proteica. A actividade biológica é mantida enquanto o complexo hormona-receptor está unido ao ADN. Recentemente têm sido descritos mecanismos alternativos, não genómicos, de acção dos estrogénios, designados por acções rápidas das hormonas esteróides.

3.1. ACÇÃO DAS HORMONAS ESTERÓIDES OVÁRICAS AO NÍVEL DOS ÓRGÃOS GENITAIS FEMININOS

Ao nível da vulva, os estrogénios aumentam a vascularização e turgescência, regulando a função das glândulas de Bartholin, de Skene e sebáceas, estimulando o aumento da sua secreção. O desenvolvimento do clítoris, dos grandes lábios e dos pêlos púbicos é provocado pelos androgénios. Os estrogénios promovem o espessamento e maturação do epitélio vaginal mantendo, de forma indirecta, o meio fisiologicamente ácido da vagina já que o glicogénio proveniente das células superficiais descamadas é utilizado

pelos bacilos de Doderlëin que o convertem em ácido láctico. Por acção dos estrogénios a vagina alonga-se e torna-se mais elástica. A progesterona induz uma discreta diminuição da espessura do epitélio e descamação das células superficiais da vagina.

O crescimento do útero na puberdade é devido aos estrogénios que têm um efeito tónico sobre o miométrio e as contracções uterinas enquanto a progesterona actua de modo oposto, promovendo a sedação uterina.

Ao nível do colo uterino, os estrogénios aumentam as dimensões do orifício externo do canal cervical durante a fase pré-ovulatória, atingindo o máximo no momento da ovulação. Também a secreção do muco cervical aumenta, diminuindo a sua viscosidade e o seu conteúdo em leucócitos, tornando-se aquoso, filante e transparente, de forma a permitir a penetração dos espermatozóides. A típica cristalização em forma de folhas de feto do muco cervical que seca sobre uma lâmina de vidro deve-se ao seu elevado conteúdo em cloreto de sódio na fase pré-ovulatória.

A progesterona provoca a regressão das modificações promovidas pelos estrogénios como o estreitamento do canal cervical e a redução da quantidade de muco que se torna viscoso e turvo dificultando a passagem de espermatozóides.

O endométrio é a mucosa que reveste a cavidade uterina e que deve ser preparada em cada ciclo para possibilitar a implantação do blastocisto, no caso de existir fecundação. A acção coordenada dos esteróides sexuais produz uma série de modificações importantes ao nível do endométrio. Os estrogénios induzem o crescimento e proliferação das glândulas, epitélio e estroma da camada funcional do endométrio enquanto a progesterona determina as modificações características da segunda fase do ciclo (explicitadas em maior detalhe adiante). As diversas fases do ciclo endometrial (proliferativa, secretora e menstrual) são determinadas pelo funcionamento ovárico.

Histologicamente, o endométrio é composto por um epitélio cilíndrico com uma camada de células ciliadas secretoras que repousam sobre uma membrana basal sob a qual existem numerosas glândulas tubulares simples, constituídas por células secretoras suspensas num córion ou estroma. Funcionalmente, distinguem-se no endométrio duas camadas, uma superficial e outra profunda, apenas a primeira sendo hormonodependente e por isso designada de funcional. Esta camada é constituída por tecido conjuntivo laxo e glândulas e descama na menstruação, regenerando-se em cada novo ciclo. A camada basal, de localização mais profunda, é constituída por endométrio não funcional e pouco diferenciado. Possui a propriedade de regenerar a camada funcional após a perda menstrual cíclica. O ciclo endometrial pode dividir-se em várias fases, segundo a acção das hormonas ováricas. De uma forma simples podemos considerar as fases proliferativa e secretora, ambas divisíveis em precoce e tardia e a fase descamativa. Dado que a menstruação é o fenómeno mais evidente da descamação endometrial, considera-se este evento como o início do ciclo, apesar de, em sentido estrito, o ciclo se iniciar com a proliferação endometrial e terminar com a menstruação, no caso de não ocorrer fecundação. A fase proliferativa estende-se desde o final da menstruação (dias 3.º a 5.º do ciclo) até à ovulação (entre os dias 13.º e 15.º do ciclo) e corresponde ao crescimento e reconstrução do endométrio a partir da camada basal, em paralelo com a fase folicular do ciclo ovárico com secreção de quantidades crescentes de estrogénios que actuam nos receptores endometriais e contribuem para o espessamento da mucosa. Posteriormente, seguem-se as modificações destinadas a permitir a implantação, com modificação de todas as estruturas da mucosa endometrial. As glândulas respondem à estimulação estrogénica com transformação do epitélio plano estratificado em epitélio pseudo-es-

tratificado, formando um revestimento epitelial contínuo. O lúmen das glândulas torna-se evidente e o estroma passa de denso (característico da fase proliferativa precoce) a laxo, de tipo sincicial. No entanto, dado que o crescimento do estroma se dá a um ritmo inferior ao crescimento glandular, as glândulas assumem um aspecto tortuoso e o estroma aparece desagregado. As estruturas vasculares endometriais designadas por artérias espiraladas só adquirem esta morfologia típica na fase proliferativa tardia. A proliferação celular do estroma e das glândulas é paralela aos níveis de estradiol circulante, aumentando até ao 10.º dia do ciclo, o que coincide com a maior densidade de receptores estrogénicos a nível endometrial. Os estrogénios estimulam, além da síntese dos seus próprios receptores, a síntese de receptores da progesterona preparando as modificações endometriais induzidas por esta na fase luteínica do ciclo. Começa assim a actividade secretora das glândulas endometriais, acumulando-se no epitélio vacúolos de glicogénio que servirão de fonte energética para o zigoto. A fase secretora corresponde à formação do corpo amarelo e é caracterizada pela preparação definitiva do tecido endometrial para favorecer a implantação e para nutrir adequadamente o produto de concepção. A fase pré-menstrual (entre o 25.º e o 28.º dias do ciclo) caracteriza-se por uma descida dos níveis de estrogénios e progesterona que ocorre nas situações em que não há fecundação e em que não se produzem gonadotrofinas trofoblásticas que substituam as do corpo amarelo em involução. A queda dos níveis hormonais acarreta a involução endometrial, com apoptose das células estromais, redução da espessura endometrial (por perda de líquido a nível do estroma), infiltração leucocitária e extravasamento intraglandular de sangue devido a reacções vasomotoras das arteríolas espiraladas. Estas modificações vasculares são determinadas por variações na síntese de prostaglandinas e

fenómenos de vasoconstricção e relaxamento rítmico destes vasos, sendo os espasmos cada vez mais prolongados até provocarem esclerose da camada funcional, necrose e descamação celular (menstruação).

A acção das hormonas produzidas pelo ovário condiciona também alterações cíclicas ao nível das trompas, distinguindo-se uma fase folicular em que a actividade do músculo liso tubar aumenta progressivamente, tornando-se bidireccional e propulsiva na fase pré-ovulatória, com o objectivo de possibilitar a ascensão dos espermatozoides e o transporte do ovócito no sentido caudal para facilitar a fecundação.

Ao nível da mucosa também se verifica um aumento de densidade de células ciliadas e as células secretoras acumulam produtos de secreção na sua região apical. Estas secreções contribuem para o aumento do fluido tubar até à ovulação. Após a ovulação, o aumento de progesterona causa uma redução do tónus muscular e reduz a actividade peristáltica da trompa. Se acontece a gravidez, o epitélio tubar sofre atrofia, com repouso da actividade ciliar, secretora e peristáltica.

3.2. ACÇÕES EXTRAGENITAIS DAS HORMONAS ESTERÓIDES OVÁRICAS

Os efeitos extragenitais dos estrogénios incluem o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários (nomeadamente como estímulo fundamental para o desenvolvimento mamário na puberdade), a indução da síntese proteica e a manutenção da estrutura óssea e prevenção da osteoporose.

A acção dos estrogénios sobre o hipotálamo e a hipófise é uma acção de tipo regulador. A síntese das gonadotrofinas pelas células gonadotróficas da hipófise anterior depende dos estrogénios circulantes, sendo o armazenamento da reserva mobilizável destas gonadotrofinas dependente da exposição prévia aos estrogénios, o que é de fundamental importância para o pico de gonadotrofinas que assegura a ovulação.

A nível do metabolismo lipídico, os estrogénios aumentam as concentrações de colesterol-HDL e diminuem as de colesterol-LDL, acção mediada pela diminuição da lipase hepática. Também promovem um aumento dos triglicérides, provavelmente devido a um aumento da produção de VLDL. Ao nível do metabolismo proteico, os estrogénios exercem um efeito anabolizante inferior ao dos androgénios, mas estimulando a síntese de proteínas, o crescimento e desenvolvimento da pele e mucosas e a síntese de proteínas hepáticas, aumentando o angiotensinogénio, a SHBG e alguns factores fibrinolíticos e de coagulação.

Os estrogénios favorecem a retenção de água, sódio e cloretos pelos túbulos renais, o que assume particular importância se ocorre gravidez.

Os androgénios promovem o crescimento ósseo, exercendo uma acção directa ao nível dos receptores dos osteoblastos e, indirectamente, através de citocinas e factores de crescimento locais.

4. A FECUNDAÇÃO NOS MAMÍFEROS

Nas espécies com reprodução sexuada, a fecundação assegura a criação de um novo indivíduo a partir dos gâmetas feminino e masculino. Pode definir-se fecundação como o conjunto de transformações que se produzem no ovócito após a interacção e fusão dos gâmetas e que terminam na singamia (fusão dos complementos cromossómicos de origem materna e paterna).

Na espécie humana, a fecundação ocorre no terço externo da trompa de Falópio onde os espermatozoides chegam progressivamente e entram em contacto com o ovócito, entretanto libertado e captado pelo pavilhão tubar. Deve realçar-se que, apesar de um número muito elevado de espermatozoides ser depositado na cavidade vaginal durante uma relação sexual, no momento da fecundação apenas um número muito

limitado (algumas centenas) se encontra na proximidade do ovócito.

A fecundação é um processo que culmina na união de um único núcleo de um espermatozóide com o pronúcleo feminino no citoplasma de um ovócito activado que exige a concretização atempada de uma série de acontecimentos:

- A formação dos espermatozoides.
- A penetração do espermatozóide no citoplasma do ovócito que inclui a união e fusão das membranas plasmáticas de ambos os gâmetas.
- A conclusão da segunda divisão meiótica ovocitária com extrusão do 2.º globo polar e a activação metabólica de um ovócito previamente quiescente.
- A descondensação do núcleo do espermatozóide e dos cromossomas maternos em pronúcleos masculino e feminino, seguida da migração citoplasmática dos pronúcleos, levando à sua aposição e posterior singamia.
- A primeira divisão mitótica do zigoto e o seu desenvolvimento inicial.

A deficiência de qualquer destes eventos é letal para o zigoto e causa de insucesso reprodutivo.

O processo de fecundação inicia-se com o reconhecimento da presença do espermatozóide na vizinhança do ovócito. Este reconhecimento celular induz a reacção acrossómica que resulta na externalização do conteúdo do acrossoma, o qual é constituído por enzimas proteolíticas que possibilitam a penetração da zona pelúcida, bem como proteínas e glicoproteínas que permitem a ligação do espermatozóide ao óvulo.

O espermatozóide é provavelmente a célula mais diferenciada da economia animal, sendo os seus componentes citoplasmáticos reduzidos ao mínimo, através da eliminação da maioria dos organelos, à excepção das mitocôndrias, que são essenciais para a mobilidade. Durante a espermatogénese, o núcleo do gâmeta masculino

sofre um processo de compactação, sendo as histonas substituídas por protaminas, responsáveis pela hipercondensação da cromatina do espermatozóide num núcleo muito denso. O centríolo do gâmeta masculino é transformado em pré-centrossoma, capaz de recrutar do *pool* materno os produtos necessários à formação do fuso mitótico durante a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial. Assim, o espermatozóide é o veículo de uma contribuição fundamental: o genoma haplóide paterno; o sinal que induz a activação metabólica do ovócito; o centríolo que forma o centrossoma do zigoto, orienta a organização dos microtúbulos e leva à união dos pronúcleos e formação do primeiro fuso mitótico embrionário.

Analizamos de seguida, de forma sumária, as diferentes etapas que constituem o processo de fecundação.

4.1. INTERACÇÃO OVÓCITO-ESPERMATOZÓIDE E PENETRAÇÃO DO ESPERMATOZÓIDE NO CITOPLASMA OVOCITÁRIO

A maturação ovocitária não se resume às modificações nucleares, sendo um fenómeno complexo que inclui também as células da granulosa. Este processo envolve aspectos nucleares e citoplasmáticos estreitamente relacionados e com consequências fundamentais na fecundabilidade do ovócito e no seu potencial de desenvolvimento. A maturação ovocitária depende de uma complexa interacção de factores parácrinos e endócrinos que condicionam o microambiente intrafolicular e dos quais depende o desenvolvimento normal do gâmeta feminino.

A incorporação do espermatozóide no ooplasma ocorre em simultâneo com o processo de activação e a reacção cortical. Nos mamíferos o espermatozóide coloca-se tangencialmente à superfície do ovócito, sendo fundamental a acção dos microfilamentos de actina do ooplasma para a conclusão do processo de incorporação.

4.2. ACTIVAÇÃO METABÓLICA DO OVÓCITO

A união e consequente fusão dos gâmetas feminino e masculino iniciam uma cascata de eventos que transforma o ovócito quiescente num zigoto, iniciando o programa de desenvolvimento embrionário. Não está ainda esclarecido o mecanismo preciso como ocorre esta activação, apesar de ser claro que a elevação da concentração de cálcio intracelular será o mensageiro central na comunicação do sinal activador. Efectivamente, a penetração de um espermatozóide num ovócito em que se inibiu a elevação das concentrações de cálcio não resulta em activação.

O aumento de cálcio livre no citoplasma ocorre alguns segundos após o estabelecimento de continuidade entre as membranas dos gâmetas e assume a forma de ondas que atravessam o ovócito. Estas oscilações do cálcio que persistem durante algumas horas, antecedendo o início da primeira mitose do ovo, serão geradas pela activação de receptores do inositol trifosfato (IP3) no

retículo endoplasmático com a subsequente libertação deste ião dos depósitos intracelulares. Alguns fenómenos mais tardios da activação ovocitária implicam o recrutamento de ARN mensageiro materno e a síntese de proteínas.

A manutenção do bloqueio meiótico ovocitário por longos períodos de tempo requer mecanismos que inibam a destruição do MPF e a migração dos cromossomas. O bloqueio do ciclo celular do ovócito em MII (Fig. 8) será devido à presença de um factor citostático (CSF) que estabiliza o MPF. Os estímulos que induzem a activação ovocitária têm em comum o facto de provocarem um influxo de cálcio e a degradação da ciclina B1, a qual tem uma função reguladora do MPF que assim é inactivado na transição metafase-anáfase (Fig. 9). A elevação intracelular do cálcio após a incorporação do espermatozóide destrói o CSF e leva também à destruição da subunidade ciclina do MPF. Com a degradação da ciclina, o ovócito entra em anáfase e progride para o primeiro ciclo celular.

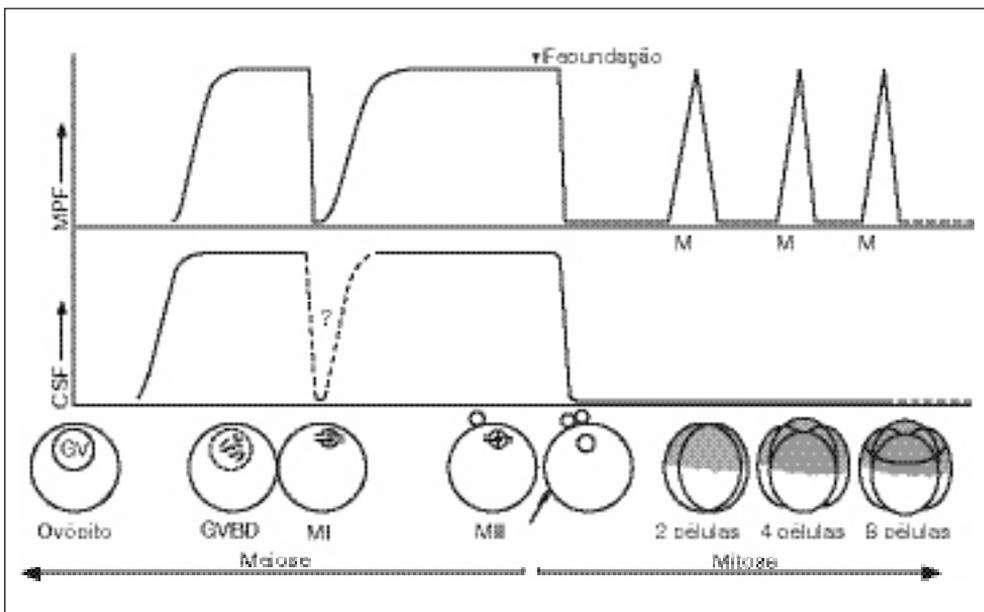


Figura 8. Modificações dos níveis intra-ovocitários de actividade do CSF e do MPF no decurso da meiose ovocitária, durante a fecundação e as primeiras mitoses embrionárias⁸.

O mecanismo de activação envolvendo segundos mensageiros como os iões cálcio e as cinases das proteínas seria desencadeado primariamente por factores espermáticos permitindo, assim, a sincronização do desenvolvimento dos pronúcleos masculino e feminino, ao mesmo tempo que impediria a activação indesejada do ciclo celular ovocitário por sinais de origem materna. Assim, a conclusão da meiose ovocitária e a activação dos mecanismos antipolispermia, ambos destinados a evitar a poliploidia, seriam dependentes do sinal activador do espermatozóide. Quer seja mediado por receptores membranares, quer introduzido no ovócito como factor solúvel, o sinal desencadeador da activação ovocitária será sempre transmitido pelo espermatozóide. Uma outra possibilidade é que a fecundação tenha evoluído através de várias vias, as quais se poderão sobrepor ou constituir alternativas, de forma a assegurar o sucesso, mesmo em condições adversas, designadamente de anomalias gaméticas, de um mecanismo essencial à sobrevivência da espécie.



Figura 9. Ovócito humano em metafase II (1.º globo polar às zero horas).

4.3. REACÇÃO CORTICAL E BLOQUEIO À POLISPERMIA

O bloqueio à polispermia depende da exocitose dos grânulos corticais, designada reac-

ção cortical, a qual destrói enzimaticamente os locais de ligação dos espermatozóides e endurece a zona pelúcida, tornando-a impenetrável. Assim se impede a penetração de mais do que um espermatozóide no ooplasma e se assegura a preservação do número de cromossomas característico da espécie.

4.4. FORMAÇÃO E FUSÃO DOS PRONÚCLEOS

A fecundação envolve a descondensação e o processamento de ambos os genomas parentais. O espermatozóide introduz no ovócito um núcleo muito condensado e inactivo, o qual requer um processamento que envolve a libertação das ligações dissulfureto e a substituição das protaminas por histonas do ovócito. O núcleo do gâmeta masculino sofre profundas modificações durante a espermiogénese, destinadas a proteger o ADN do espermatozóide das múltiplas agressões que está destinado a sofrer ao longo da travessia do tracto genital feminino. Depois de incorporado no citoplasma ovocitário, o ADN paterno liga-se a histonas e outras proteínas e reconstitui-se um invólucro nuclear com material de origem materna. A aposição dos pronúcleos que precede a singamia é um processo guiado pelos microtúbulos do citoesqueleto ovocitário. Este fenómeno depende da capacidade do zigoto reconstruir o centrossoma a partir do centríolo paterno e do material pericentriolar ovocitário, implicando a duplicação do centríolo, fundamental para orientar o desenvolvimento pronuclear e a formação do primeiro fuso mitótico. O centrossoma do zigoto organiza uma estrutura radiária de microtúbulos, o aster, responsável pelo movimento do núcleo do espermatozóide para o centro do ovócito, a aproximação dos pronúcleos e a sua migração para uma posição central. Os cromossomas maternos encontram-se condensados em metafase II e sofrem descondensação em pronúcleo feminino após o termo da segunda divisão meiótica. O desenvolvimento do pronúcleo masculino parece estar sincronizado com o desfecho da

meiose ovocitária e a organização do homólogo de origem materna. A descondensação completa da cromatina paterna é necessária para a replicação do ADN, podendo esta ordenação ser assegurada por um ponto de controlo (*check point*) da replicação do ADN e/ou por uma ansa de retrocontrolo entre os pronúcleos, destinada a evitar as assincronias e assimetrias na sua formação, as quais parecem estar correlacionadas com um acréscimo na incidência de mosaicismo e de anomalias do desenvolvimento embrionário precoce.

4.5. MIGRAÇÃO PRONUCLEAR E SINGAMIA

Nos mamíferos, os pronúcleos não se fundem em interfase, verificando-se a desintegração das membranas pronucleares na primeira mitose e ocorrendo a mistura dos cromossomas maternos e paternos aquando do alinhamento na placa metafásica do primeiro ciclo mitótico. Consequentemente, os acontecimentos envolvidos na fecundação iniciam-se durante a segunda

divisão meiótica e só terminam na primeira mitose do zigoto.

Bibliografia

1. Hourvitz A, Adashi EY. Menstrual cycle: follicular maturation. Em: Rabe T, Diedrich K, Strowitzki T, eds. Manual on Assisted Reproduction. 2.a ed. act. Berlin, Heidelberg, Nova Iorque: Springer-Verlag; 2000. p. 11-23.
2. Faddy MJ. Follicle dynamics during ovarian ageing. Mol Cell Endocrinol. 2000;163(1-2):43-8.
3. Almeida Santos T. Esterilidade ovocitária – contribuição para o diagnóstico etiológico da ausência de fecundação in vitro e definição de uma nova classe de esterilidade [dissertação de doutoramento]. Coimbra: Faculdade de Medicina de Coimbra; 2003.
4. Zeleznik AJ. Dynamics of primate follicular growth. A Physiologic perspective. Em: Adashi E, Leung P, eds. The ovary – Comprehensive endocrinology revised series. Nova Iorque: Raven Press; 1993.
5. Leroy F, Lejeune B. Physiologie de l'ovaire. Em: Hédon B, Madelénat P, Dargent D, Frydman S, coords. Gynécologie. Paris: Ellipses; 1998.
6. Rodrigues P, Limback D, McGinnis LK, Plancha CE, Albertini DF. Oogenesis: Prospects and challenges for the future. J Cell Physiology. 2008;216(2):355-65.
7. Thibault E, Levasseur MC, coords. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris: Ellipses; 1991.
8. Edwards R, Brody SL. Principles and Practice of Assisted Human Reproduction. WB Saunders Company; 1995.

Secção II

OBSERVAÇÃO CLÍNICA

Capítulo 4 - Relação Médico-Doente

Professor Doutor António Macedo

Capítulo 5 - Semiologia ginecológica

Professor Doutor José Martinez de Oliveira

