

SELMO GEBER¹

RODRIGO MEGALE²

LUIS FELIPE VICTOR SPYER PRATES²

DANIELA PARREIRAS FERREIRA²

ANA MARIA ARRUDA LANNA³

ANTÔNIO CARLOS VIEIRA CABRAL⁴

Avaliação da densidade folicular em ovários de fetos humanos

Follicular density evaluation in ovaries of human fetuses

Artigos originais

Palavras-chave

Densidade folicular
Ovário/citologia
Feto/citologia
Folículo ovariano/crescimento & desenvolvimento

Keywords

Follicular density
Ovary/cytology
Fetus/cytology
Ovarian follicle/ growth & development

Resumo

OBJETIVO: avaliar a variação da população de folículos ovarianos ao longo do desenvolvimento fetal e acrescentar dados aos escassos, incompletos e, algumas vezes, divergentes dados descritos na literatura. **MÉTODOS:** doze ovários de fetos necropsiados foram estudados, sendo nove de fetos e três de neonatos. As idades dos fetos foram determinadas pela cronologia e por ultra-sonografia, enquanto os neonatos nascidos na 39ª semana de gravidez faleceram nas primeiras horas de vida. As peças foram fixadas com formaldeído e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados com espessura de 7 μm e a cada 50 cortes, o material foi corado com HE e analisado com microscópio com aumento de 400 vezes. Foram contados os folículos em dez diferentes regiões do córtex ovariano, cada região com uma área de 625 μm^2 . O número total de folículos em 1 mm^3 foi calculado usando-se a fórmula: $Nt = (No \times St \times t) / do$, onde Nt é o número de folículos, No é a média de folículos observados em 1 mm^2 , St é o total de cortes em 1 mm^3 do ovário, t é a espessura do corte e do é o diâmetro médio do núcleo. **RESULTADOS:** a idade dos fetos variou de 24 a 39 semanas. O número de folículos por 0,25 mm^2 variou de $10,9 \pm 4,8$ em um neonato até $34,7 \pm 10,6$ também em um neonato. Entre os fetos, tivemos o menor valor com 36 semanas ($11,1 \pm 6,2$) e o maior valor com 28 semanas ($25,3 \pm 9,6$). O número de cortes observados por ovário variou de seis a 13, correspondendo à contagem de folículos em áreas que variaram de 1,5 a 32,5 mm^2 . O total de folículos estimado variou de 500.000, na idade de 22 semanas, a mais de 1.000.000, na idade de 39 semanas. **CONCLUSÕES:** nossos resultados demonstram as diferentes densidades de folículos ovarianos durante o período gestacional, contribuindo para o escasso conhecimento existente na literatura até o momento.

Abstract

PURPOSE: to determine the variation of the number of ovarian follicles during fetal life. **METHODS:** twelve ovaries donated for research were included in our study, nine from fetuses and three from newborn babies who died in the first hour after being delivered with 39 weeks of pregnancy. Fetal age was confirmed both by the last menstrual period of the woman and by ultrasonography. Ovaries were fixed in formaldehyde, included in paraffin and serially sliced at 7 μm . At every 50 cuts, the obtained material was haematoxylin-eosin stained and evaluated with an optical microscope (400 X). The follicles were counted in ten different regions of the ovarian cortex, each region with an area of 625 μm^2 . The presence of a nucleus was considered the parameter for counting. Follicular density, per 1 mm^3 was calculated using the formula $Nt = (No \times St \times t) / do$, where Nt is the number of follicles; No is the mean number of follicles in 1 mm^2 ; St is the total number of slices in 1 mm^3 ; t is the slice thickness and do is the nuclei mean diameter. **RESULTS:** the gestational age of fetuses ranged from 24 to 39 weeks. The number of follicles per 0.25 mm^2 ranged from 10.9 ± 4.8 in a newborn to 34.7 ± 10.6 in another newborn. Among the fetuses, the least value was obtained in a 36 week-old fetus (11.1 ± 6.2) and the highest in a 28 week-old fetus (25.3 ± 9.6). The total number of slices per ovary ranged from six to 13, corresponding to follicles counted in areas from 1.5 to 32.5 mm^2 . The total number of follicles ranged from 500,000 at the age of 22 weeks to > 1,000,000 at the age of 39 weeks. **CONCLUSIONS:** our results demonstrate different (increasing) densities of ovarian follicles along the gestational period, providing more knowledge about this still not well-known subject.

Correspondência:

Selmo Geber
Rua Alfredo Balena 190/4.016 – Santa Efigênia
CEP 30310-100 – Belo Horizonte/MG
Fone: (31) 3248-9764
E-mail: selmogeber@origen.com.br

Recebido

22/08/2007

Aceito com modificações

11/12/2007

Trabalho desenvolvido no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

¹ Professor Associado do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

² Acadêmicos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

³ Professora Associada do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

⁴ Professor Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

Introdução

Os estudos sobre o número de células germinativas presentes nos ovários de fetos e neonatos, descritos na literatura, são escassos, incompletos e, algumas vezes, divergentes. Isso decorre, em parte, da dificuldade em se obterem amostras para a realização desse tipo de estudo e da variação nos métodos de cada autor, tanto para o cálculo da idade gestacional, quanto para a estimativa do número de folículos. Quem melhor descreveu a metodologia foi Baker¹ e, talvez por isso, seu trabalho ainda seja muito citado quando se trata desse tipo de análise.

A oogênese ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. As células germinativas surgem na parede do saco vitelino, migram e colonizam a crista gonadal². Durante sua migração, proliferam com apenas uma onda de divisão mitótica, dando origem às oogônias³. As oogônias entram na prófase I da meiose e passam pelos estágios leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno¹ e dictioteno⁴ durante a vida intra-uterina. Observações histológicas e ultra-estruturais sugerem que o início da meiose ocorre entre a 11^a e a 12^a semana de vida intra-uterina^{1,4,5}.

Os folículos primordiais são formados depois de o oócito atingir o estágio diploteno. Com 11,5 a 15 semanas de gestação, cerca de metade dos oócitos são envolvidos por uma camada incompleta de células foliculares. Uma passagem intensa de oócitos para o estágio diploteno é observada com 14 a 15 semanas de desenvolvimento. Na 17^a semana, o número de oócitos no estágio de diploteno aumenta consideravelmente e é acompanhado por uma intensa formação de folículos primordiais. O número de células germinativas atinge seu pico entre a 16^a e a 20^a semana, quando também um maior número de atresias é observado. Entre a 19^a e a 22^a semana, o número de células germinativas começa a declinar e o índice mitótico das oogônias tende a cair. Células germinativas em degeneração ocorrem em todos os períodos do desenvolvimento antenatal, durante várias etapas da foliculogênese⁶.

Ao nascimento, a maioria das células germinativas estão no estágio diploteno ou dictioteno e 70% delas estão contidas em folículos primordiais. A proliferação oogonial está restrita ao desenvolvimento antenatal ou logo após o nascimento, e os folículos primordiais constituem um estoque de folículos em repouso que será progressivamente consumido ao longo da vida da mulher.

Estudos quantitativos em ovários humanos, em diversas fases da vida, foram publicados, porém de forma limitada, devido à dificuldade na metodologia necessária para este tipo de estudo⁶⁻⁸. Como os folículos têm diferentes

tamanhos e uma distribuição irregular no órgão, seria necessário, para se obterem valores exatos, seccionar de maneira seriada todo o órgão e calcular, então, o número de folículos de cada secção. Os primeiros estudos realizados não apresentaram metodologias confiáveis, não sendo assim considerados para comparação.

Posteriormente, outro estudo¹ quantitativo e citológico das células germinativas em ovários humanos demonstrou que a população de células germinativas cresce de 600.000 aos dois meses pós-concepção para um pico de 6.800.000 no quinto mês. Ao nascimento, esse número declina para 2.000.000, dos quais 50% são atrésicos. De 1.000.000 de oócitos normais do recém-nascido, somente 300.000 sobrevivem até a idade de sete anos. Outro estudo⁸ relatou a presença de 266.000 folículos em média, após analisar ovários de cinco recém-nascidos. Mais recentemente, foi observado que existe um aumento na quantidade de folículos até a idade gestacional de 34 semanas, quando ocorre uma estabilização até o termo⁹.

O objetivo deste estudo foi avaliar a densidade folicular e a variação da população de folículos ao longo do desenvolvimento fetal, utilizando a contagem de folículos em cortes seriados.

Métodos

Um total de 14 ovários de fetos necropsiados foram estudados num período de 18 meses. Desse total, 12 ovários foram selecionados para esse estudo, por não apresentarem anormalidades morfológicas, sendo nove de fetos e três de neonatos. A idade dos fetos foi determinada pela cronologia e por ultra-sonografia, e variou de 24 a 36 semanas. Os neonatos faleceram nas primeiras horas de vida. Todos os neonatos tinham menos de um dia de vida de uma gestação de 39 semanas.

As peças obtidas foram fixadas com formaldeído a 4% em solução tamponada logo após a necropsia, para evitar autólise dos tecidos. Após sofrerem processo de desidratação, as peças foram incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados nos ovários com a espessura de 7 μm e, a cada 50 cortes, o material obtido foi corado com hematoxilina-eosina e analisado com microscópio óptico em aumento de 400 vezes (Figura 1).

Em cada lâmina, foram contados os folículos de dez diferentes regiões do córtex ovariano. Cada região continha uma área de 625 μm^2 , perfazendo uma área total de 6250 μm^2 . A presença do núcleo na superfície de corte foi usada como marcador para contagem, isto é, o limite de cada área era estipulado baseado na identificação de um núcleo (Figura 2). Uma média dos folículos foi obtida para cada ovário, bem como o desvio padrão.

O cálculo da densidade folicular foi realizado utilizando-se a fórmula de correção do número de folículos descrita previamente¹⁰, com o objetivo de se evitar que um mesmo folículo com núcleo visto em mais de um corte fosse contado mais de uma vez. O número total de folículos em 1 mm³ foi, então,

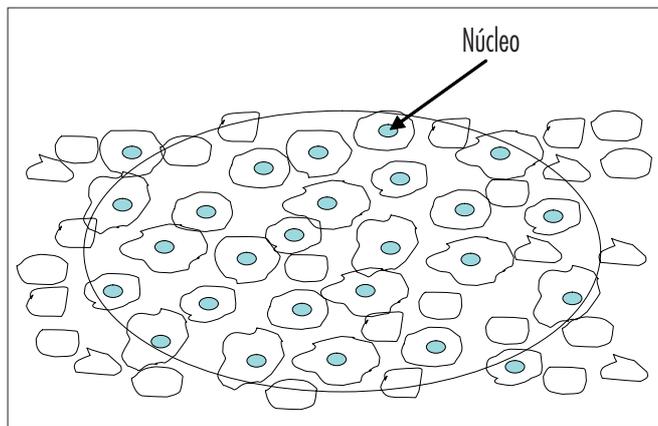


Figura 1 - Técnica para contagem do número de células a partir da identificação dos núcleos.

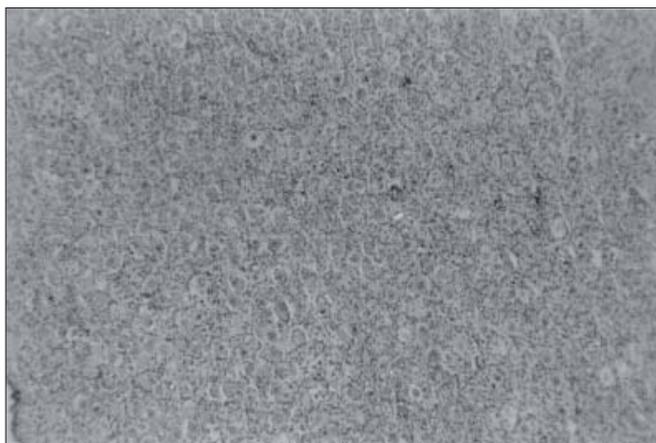


Figura 2 - Fotomicrografia de córtex ovariano fetal.

calculado usando-se a fórmula: $Nt = (No \times St \times t) / do$, onde Nt é o número de folículos, No é a média de folículos observados em 1 mm², St é o total de cortes em 1 mm³ do ovário (143), t é a espessura do corte (7 μm) e do é o diâmetro médio do núcleo (16,1±6,1 μm) para folículos nos estágios primordiais que correspondem a cerca de 95% da população folicular em fetos. Dessa forma, obtivemos a densidade de folículos do córtex ovariano em fetos de diferentes idades.

Resultados

Na análise do córtex ovariano, observamos um predomínio absoluto de células germinativas e folículos primordiais. Poucos folículos primários foram observados. Nenhum estágio superior de desenvolvimento folicular foi visto em nossa série. O número de folículos por 0,25 mm², unidade de área analisada, variou de 10,9±4,8 em um neonato até 34,7±10,6 também em um neonato. Entre os fetos, tivemos o menor valor com 36 semanas (11,1±6,2) e o maior valor com 28 semanas (25,3±9,6). O número de cortes observados por ovário variou de seis a 13, correspondendo a contagem de folículos em áreas que variaram de 15 a 32,5 mm². A densidade folicular, calculada em unidade de 1 mm³, foi de 18.701 para 22 semanas; 17.010 para 23 semanas; 13.031 e 20094 para 24 semanas; 31.833 para 26 semanas; 25.168 para 28 semanas; 18.105 para 31 semanas; 11.141 para 33 semanas; 11.042 para 36 semanas e, 10.843, 12.534 e 34.518 para 39 semanas (Tabelas 1 e 2).

Com os dados obtidos em nosso trabalho, é possível estimar a população total de folículos quando se conhece o volume do córtex ovariano. Sabemos que o córtex corresponde a cerca de 90% do volume total do ovário^{8,11}; assim, a partir do volume do ovário, podemos inferir sobre o total de folículos. Utilizando os volumes descritos

Tabela 1 - Densidade folicular em ovários de fetos com idade gestacional variando de 31 a 39 semanas.

	39 semanas	39 semanas	39 semanas	36 semanas	33 semanas	31 semanas
Folículos/0,25 mm ²	10,9±4,8	34,7±10,3	12,6±6,5	11,1±6,2	11,2±5,1	18,2±6,1
Área (mm ²)	32,5	27,5	30	30	22,5	15
Folículos contados	1.406	3.814	1.512	1.326	1.004	1.096
Folículos/mm ³	10.843	34.518	12.534	11.042	11.141	18.105

Os resultados são em número absoluto±desvio padrão.

Tabela 2 - Densidade folicular em ovários de fetos com idade gestacional variando de 22 a 28 semanas.

	28 semanas	26 semanas	24 semanas	24 semanas	23 semanas	22 semanas
Folículos/50 μm ²	25,3±9,6	32±8,9	20,2±7,2	13,1±6,2	17,1±5,8	18,8±6,5
Área (μm ²)	20	25	22,5	27,5	25	20
Folículos contados	2.025	3.205	1.617	1.444	1.712	1.880
Folículos/mm ³	25.168	31.833	20.094	13.031	17.010	18.701

Resultados são em número absoluto±desvio padrão.

Tabela 3 - População total de folículos em ovários de fetos com idade gestacional de 31 a 39 semanas.

	39 semanas	39 semanas	39 semanas	36 semanas	33 semanas	31 semanas
Volume do ovário	46,1	46,1	46,1	41,1	27,8	27,5
Volume do córtex	36,9	36,9	36,9	33,12	22,24	22
Folículos/ovário	449.881	1.432.191	520.046	411.428	278.761	448.099
Total	899.762	2.864.383	1.040.092	822.856	557.523	896.199

Tabela 4 - População total de folículos em ovários de fetos com idade gestacional de 22 a 28 semanas.

	28 semanas	26 semanas	24 semanas	24 semanas	23 semanas	22 semanas
Volume do ovário	27,5	37,8	37,8	37,8	37,8	14,6
Volume do córtex	22	30,24	30,24	30,24	30,24	13,14
Folículos/ovário	622.908	1.082.960	683.618	443.336	578.706	245.743
Total	1.245.816	2.165.920	1.367.237	886.673	1.157.413	491.486

previamente¹, obtivemos os seguintes resultados: 491.486 para 22 semanas; 1.157.413 para 23 semanas; 1.367.237 e 886.673 para 24 semanas; 2.165.920 para 26 semanas; 1.245.816 para 28 semanas; 896.199 para 31 semanas; 557.523 para 33 semanas; 822.856 para 36 semanas e, 1.040.092, 2.864.383 e 899.762 para 39 semanas (Tabelas 3 e 4). A média do número de folículos de acordo com a idade gestacional encontrada foi de 491.486 para quatro meses, 1.394.311 para cinco meses, 1.071.008 para seis meses, 557.523 para sete meses, 822.856 para oito meses e 1.601.412 para nove meses de gestação. Comparamos estes dados com os obtidos por Baker em 1963 (Quadro 1).

Discussão

Em nosso estudo, utilizamos a contagem direta de folículos em unidades de volume, e encontramos valores semelhantes ao descrito para neonatos de 39 semanas¹, isto é, 1.601.412 folículos (variação de 899.762 a 2.864.383). Infelizmente não encontramos dados na literatura a respeito do número de folículos em ovários fetais estimados por métodos diretos para comparação com nossos valores para as demais idades gestacionais.

Observa-se que, com exceção de um neonato que exibiu um total de folículos bem mais elevado que os demais, a estimativa da população de folículos encontrada foi semelhante à distribuição descrita anteriormente¹, apesar de os valores estimados serem consideravelmente menores. Um pico no número de folículos foi observado na 26^a semana (Tabela 2).

Apesar de os números apresentados há mais de 40 anos¹ serem, ainda hoje, considerados como referência sobre o assunto, algumas ressalvas merecem ser feitas, uma vez que a contagem foi estimada de forma indireta. O número de oócitos ao nascimento, calculado em 2.000.000, não apresenta correspondência com estudos anteriores, nos quais esse número variou de 100.000 a 600.000, porém indiretamente. Anteriormente, outro

Quadro 1 - Número médio de folículos ovarianos presentes em ovários de fetos humanos, de acordo com a idade gestacional (IG).

IG (meses)	Nossos resultados	Baker ¹
2		298.400
3		710.600
4	491.486	1.788.600
5	1.394.311	3.415.800
6	1.071.008	1.804.700
7	557.523	1.138.800
8	822.856	
9	1.601.412	1.011.800

autor⁷ havia determinado esse número, por meio de contagem direta de folículos corrigida pela espessura do corte, obtendo a média de 360.000 folículos em ovários neonatais.

As dificuldades para calcular o volume do córtex nos ovários analisados em nosso estudo, isto é, de criar uma nova forma para realizar este cálculo, nos levaram a adotar valores já consagrados na literatura. Acreditamos, assim, que esse trabalho traz uma contribuição importante aos estudos quantitativos em ovários humanos. O método utilizado se baseia na densidade folicular e, graças a uma distribuição relativamente uniforme dos folículos no córtex de ovários fetais, consideramos o método satisfatório. O erro padrão variou de 0,425 a 1,07 nas séries analisadas. O cálculo do volume do córtex, no entanto, é fundamental para se estimar a população total de folículos a partir desse método. É interessante ressaltar que, até hoje, em nenhum trabalho houve contagem de folículos, mas a estimativa do seu número a partir de frações de volume ocupado por essas células.

Quando comparamos os resultados aqui obtidos com os descritos anteriormente¹ (Quadro 1), identificamos uma diferença importante na quantidade de folículos de acordo com as idades gestacionais avaliadas. Essa diferença pode ser explicada pela metodologia empregada,

uma vez que o primeiro estudo foi realizado no início da década de 1960, e pela reduzida quantidade de ovários avaliados em ambos os estudos.

Podemos concluir também que realmente existe um pico no número de folículos que ocorre durante a vida intra-uterina e que uma rápida redução nesse número ocorre antes do nascimento. Como a maior parte

da perda de folículos só ocorre após o recrutamento, é possível imaginar que é também nesse momento que ocorre a maior taxa de recrutamento folicular.

Em resumo, nossos resultados demonstram as diferentes densidades de folículos ovarianos durante o período gestacional, contribuindo para o escasso conhecimento existente na literatura até o momento.

Referências

1. Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1963;158:417-33.
2. Godin I, Wylie CC. TGF beta1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development.* 1991;113(4):1451-7.
3. Hilscher W. The genetic control and germ cell kinetics of female and male germ line in mammals including man. *Hum Reprod.* 1991;6(10):1416-25.
4. Kurilo LF. Oogenesis in antenatal development in man. *Hum Genet.* 1981;57(1):86-92.
5. Gondos B, Westergaard L, Byskov AG. Initiation of oogenesis in human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am J Obstet Gynecol.* 1986;155(1):189-95.
6. Gondos B, Bhiraless P, Hobel CJ. Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 1971;110(5):644-52.
7. Block E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; methods of quantitative determinations. *Acta Anat (Basel).* 1951;12(3):267-85.
8. Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L, Ferrario VF. Morphometric study of the human neonatal ovary. *Anat Rec.* 1991;231(2):201-8.
9. Forabosco A, Sforza C. Establishment of ovarian reserve: a quantitative morphometric study of the developing human ovary. *Fertil Steril.* 2007;88(3):675-83.
10. Gougeon A, Chainy GB. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J Reprod Fertil.* 1987;81(2):433-42.
11. Sforza C, Forabosco A. A morphometric approach to the study of human ovarian organogenesis. *Ital J Anat Embryol.* 1998;103(4 Suppl 1):51-62.