

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**

**DINÂMICA FOLICULAR EM ÉGUAS**

**Monografia apresentada à Disciplina de Seminários I, do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.**

**Aluna de Mestrado: Milena da Silva Machado**

**Professores Responsáveis: Prof<sup>a</sup> Dra Maria Denise Lopes**

**Prf. Dr. Sony Dimas Bicudo**

**Botucatu- SP**

**2002**

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS -----	01
1. INTRODUÇÃO -----	02
2. REVISÃO DE LITERATURA -----	03
2.1 Oogênese -----	03
2.2 Foliculogênese -----	04
2.3 Ondas Foliculares -----	07
2.4 Divergência e Seleção do Folículo Dominante -----	09
2.5 Atresia e Ovulação -----	13
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	15
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	16

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diagrama da estrutura do ovário -----	06
Figura 2- Crescimento dos folículos dominantes (FD) nas duas ondas foliculares do ciclo estral eqüino -----	08
Figura 3- Esquema do modelo dos maiores folículos; a) divergência folicular eqüina; b) aspectos hormonais envolvidos.-----	12

## 1. INTRODUÇÃO

Visando um maior aproveitamento e intensificação do ritmo do melhoramento genético e a eficiência reprodutiva em eqüinos, criou-se a necessidade da utilização de biotecnologias reprodutivas, com o objetivo de suprir a demanda existente em relação a produtos com alto potencial genético, nos sistemas de produção eqüina.

O esclarecimento dos mecanismos de desenvolvimento folicular, assim como divergência e seleção do folículo dominante, são necessários para a manipulação adequada do ciclo estral e conseqüentemente a aplicação de biotecnologias, com um maior sucesso.

O desenvolvimento folicular é um processo que envolve uma complexa série de eventos que têm o papel de induzir o crescimento e regressão de folículos no ovário da fêmea.

A dinâmica folicular está baseada nos princípios da oogênese e foliculogênese. Ambos os processos iniciam-se no estágio fetal, e trabalham juntamente com outros fatores para assegurar o desenvolvimento dos gametas femininos e da função ovariana. O presente seminário tem como objetivo enfocar os mecanismos de seleção do folículo dominante, dentro da dinâmica folicular em éguas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Oogênese**

No início do desenvolvimento do feto, as células primordiais, originárias do saco vitelínico, migram para a crista genital e colonizam a gônada ainda indiferenciada, onde recebem a denominação de oogônias e começam a multiplicar-se através de divisões mitóticas (VAN DEN HURK et al., 1997). Em equinos, as células primordiais sofrerão mitoses, recebendo a denominação de oogônias ao redor dos 50 dias de gestação (DEANSLY, 1978).

Após a proliferação mitótica, as oogônias iniciam um processo de divisão meiótica, aproximadamente 75 a 160 dias de gestação, transformando-se em oócitos primários, os quais permanecem no diplóteno da profase I (repouso meiótico) (GINTHER, 1989). Os oócitos primários apresentam-se rodeados por uma estreita camada de células da granulosa, formando assim, os folículos primordiais (VAN DEN HURK et al., 1997).

Os oócitos permanecem em repouso meiótico até o início da puberdade, após este período, passam a forma secundária e, possivelmente, oócito terciário. O oócito secundário é formado após a realização da primeira divisão meiótica e caracterizado pelo aparecimento do primeiro corpúsculo polar. O oócito terciário ou zigoto somente se forma no momento em que ocorre a fertilização, eles são identificados pelo aparecimento do segundo corpo polar e formação do pró-núcleo masculino e feminino. Estudos têm demonstrado que a realização da meiose secundária ocorre por meio do fator de ativação de maturação (MFP) e ativador mitogênico da proteína Kinase (MAPK) (GOUDET et al., 1998).

## 2.2 Foliculogênese

Quando as oogônias iniciam seu desenvolvimento, tornam-se circundadas por células precursoras da granulosa, conhecidas como células foliculares, significando o início da foliculogênese. Foliculogênese é um processo pelo qual os folículos crescem, amadurecem e eventualmente são eleitos para a ovulação. O número de folículos que geralmente chegam ao estágio ovulatório é muito baixo, e estima-se que aproximadamente 99% dos folículos ovarianos sofrem atresia (WEBB et al., 1999). Baseado no entendimento de espécies monovulatórias, o desenvolvimento folicular é dividido em três estágios subsequentes: 1) início do crescimento do folículo primordial; 2) recrutamento e crescimento de outros folículos; 3) seleção do folículo dominante e atresia dos folículos subordinados.

Folículos primordiais são os menos desenvolvidos e se apresentam em maior quantidade no ovário. A quantidade inicial e final de folículos é espécie específico. Exames histológicos de ovários, obtidos de éguas em atividade cíclica, revelaram a presença de aproximadamente 36.000 folículos primordiais e 100 folículos em desenvolvimento (DRIANCOUT & PALMER, 1984).

Os folículos primordiais são caracterizados pela presença do oócito primário envolto por uma única camada de células foliculares (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997). Os sinais responsáveis pela ativação dos folículos primordiais e os mecanismos reguladores deste desenvolvimento ainda não foram completamente esclarecidos. Contudo, acumulam-se evidências de que o início e crescimento do folículo primordial requerem a expressão de vários fatores e receptores: receptores de gonadotrofinas, fator de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fator fibroblástico de crescimento 2 (MCNATTY et al., 1999).

Em particular, membros do TGF- $\beta$  têm se mostrado potentes reguladores da proliferação e diferenciação em diferentes espécies. Três membros da família TGF- $\beta$ ,

fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), *bone morphogenetic protein 15* (BMP-15) e (BMP-6), são expressados pelo oócito e acreditam-se serem mediadores para o crescimento do folículo pré-antral (ELVIN et al., 2000).

O desenvolvimento folicular é melhor caracterizado por diferenciação e proliferação das células da granulosa. Acompanhando este processo está a formação da membrana translúcida ao redor do oócito, conhecida como zona pelúcida. A formação de múltiplas camadas ao redor do oócito indica a transformação do oócito primário em secundário (folículo primário a secundário). Folículos primários e secundários são identificados como folículos pré-antrais (HAFEZ & HAFEZ , 2000)

Os sinais responsáveis pela ativação dos folículos primordiais e os mecanismos reguladores do desenvolvimento folicular pré-antral ainda não foram completamente esclarecidos. No entanto, existem evidências de que o desenvolvimento de folículos pré antrais independe da ação das gonadotrofinas, cuja a participação é fundamental em estágios posteriores deste processo (MONNIAUX et al., 1997).

Em éguas, os folículos ovarianos desenvolvem um antro quando atingem aproximadamente 300µm de diâmetro. Junto a esse processo, uma bainha de células, conhecidas como células da teca, formam-se ao redor das células da granulosa. As células da teca formam duas sub-camadas: a teca externa, a qual está constituída, quase que totalmente, por tecido conjuntivo e a teca interna a qual é a camada vascular interna. Enquanto ocorre nova proliferação de células da granulosa, estas células se organizam em múltiplas camadas ao redor do oócito, formando o “cúmmulus oóphorus”. Os principais produtos secretados pelas células da teca são os andrógenos esteróides, enquanto isso, as células da granulosa produzem estrógeno e inibina. Todos estes eventos indicam a transição de folículo secundário a terciário, o qual inicia novo desenvolvimento, até ser eleito à ovulação (Kenney et al., 1979).

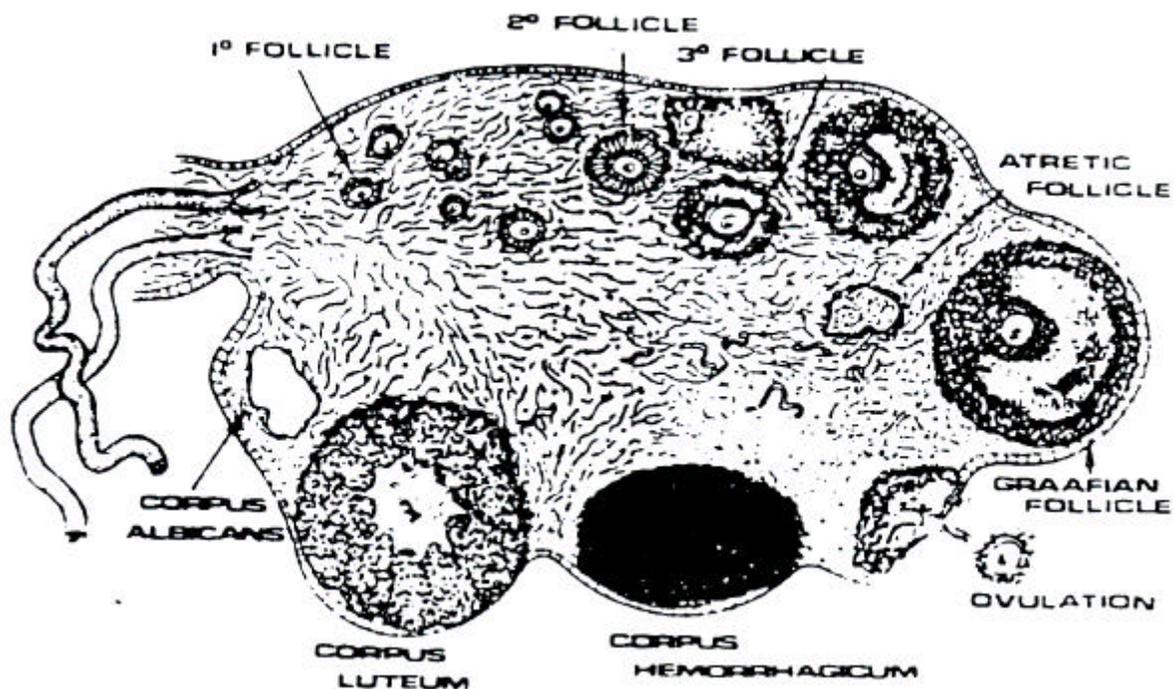


Figura 1- Diagrama da estrutura do ovário

### 2.3 Ondas Foliculares

Com a formação do antro folicular, os folículos tornam-se dependentes de gonadotrofinas para novo desenvolvimento, o qual é evidente pela expressão de receptores de FSH pelas células da granulosa e receptores de LH pelas células da teca (WEBB et al., 1999). Vários destes folículos crescem em sincronia, estabelecendo uma onda de crescimento folicular. As éguas, geralmente apresentam uma ou duas ondas foliculares durante os 21-22 dias do ciclo estral (GINTHER, 1992).

De acordo com Driancourt et al., (1982) as ondas foliculares são caracterizadas pela emergência de pequenos folículos antrais, de aproximadamente 0,2 a 0,4 mm de diâmetro.

Segundo Ginther (1992) a definição de onda folicular maior se aplica a um conjunto de folículos que inicialmente exhibe crescimento sincronizado, sucedido pelo crescimento

preferencial de apenas um, ocasionalmente dois folículos. A onda folicular maior divide-se em onda primária e onda secundária. A onda folicular primária inicia-se na metade do diestro e dá origem ao folículo ovulatório (>35mm). A onda secundária emerge no início do estro e usualmente resulta na formação de grandes folículos anovulatórios (>20 mm) ou, mais raramente, em ovulação durante o diestro. E, finalmente, ondas que não apresentam folículos dominantes são classificadas como ondas menores.

A primeira onda de FSH está geralmente associada com a onda maior primária, e assim, envolvida na estimulação de folículos até tornarem-se aptos a ovular (BERFELT & GINTHER, 1993).

Conforme Ginther (1992), em espécies monovulatórias como os equinos, um único folículo, usualmente, emergirá da onda maior e chegará a folículo dominante. Durante a onda maior, vários folículos emergem e começam a crescer a uma taxa similar (fase paralela).

Buratini (1997) ao observar a dinâmica folicular em éguas, com observação individual dos folículos, relatou que dos dezessete ciclos estrais estudados, treze apresentaram apenas uma onda maior e quatro apresentaram duas (Figura).

O pico da concentração de FSH ocorre quando o folículo maior atinge, aproximadamente, 13mm de diâmetro e então começa a declinar. A fase paralela do crescimento folicular finaliza quando o maior folículo alcança um diâmetro de 22mm, e começam a ocorrer diferenças nas taxas de crescimento entre o maior folículo e os demais (GASTAL et al., 1997).

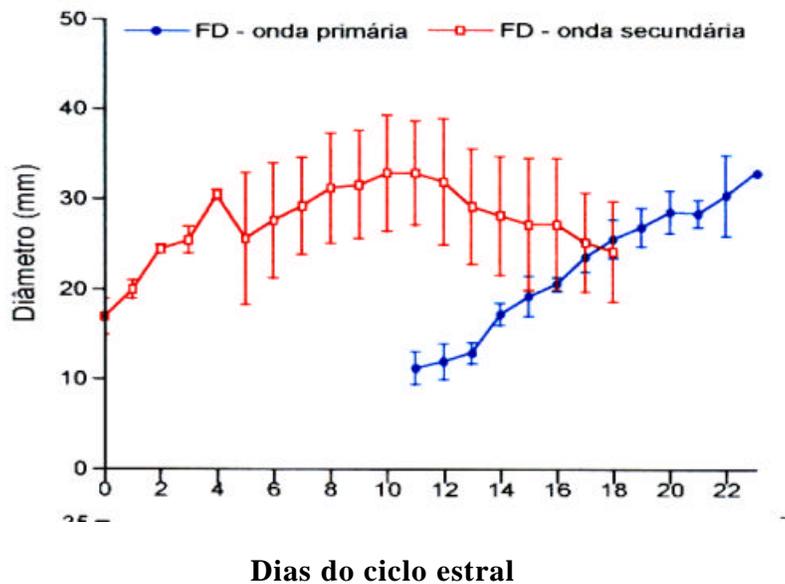


Figura 2– Crescimentos dos folículos dominantes (FD) nas duas ondas foliculares do ciclo estral equino (Fonte: Buratini, 1997).

## 2.4 Divergência e Seleção do Folículo Dominante

A divergência é caracterizada pelo contínuo crescimento do maior folículo tornando-se o folículo dominante, e redução ou bloqueio do crescimento dos outros folículos, tornando-os subordinados. Seleção é um termo geralmente utilizado em espécies monovulatórias para indicar que, usualmente, somente um folículo da onda folicular chega ao estágio de dominância (WILTBANK et al., 2000).

Squires et al. (1986) identificaram que a seleção ocorre ou se inicia antes da detecção ultra-sonográfica da emergência dos folículos. Por esta razão, o início da seleção pode não ser definido, desde então, outros fatores podem determinar qual o momento em que os folículos tornam-se sensíveis aos níveis de FSH.

Os mesmos autores salientaram que o folículo não dominante conserva sua capacidade para iniciar dominância até após a divergência. Portanto, o segundo maior folículo inicia sua dominância quando se realiza a ablação do folículo dominante, neste momento, ocorre o suposto início da divergência. Além disso, iniciando o tratamento com

FSH precocemente, resulta no desenvolvimento da dominância por vários folículos, demonstrando a capacidade de pré-divergência dos folículos.

O declínio nas concentrações de FSH, tem demonstrado ser temporariamente associado com a divergência folicular em éguas (GASTAL et al., 1997).

O estímulo necessário para o recrutamento folicular, ou seja, para a continuidade do crescimento folicular depende de uma elevação das concentrações plasmáticas de FSH. Possivelmente, durante este recrutamento, o futuro folículo dominante, ou seja, aquele cuja o estágio de desenvolvimento está melhor sincronizado com o estímulo gonadotrófico, diferencia-se dos demais folículos e adquire a capacidade de refratariedade aos níveis decrescentes de FSH, desencadeados por ele próprio e supressores do desenvolvimento dos folículos subordinados (FORTUNE, 1994).

Conforme Ginther (2000) o maior folículo emerge, em média, um dia antes da emergência do segundo maior folículo. As concentrações de FSH que estimulam a emergência da onda folicular, inicia-se seu declínio quando os folículos atingem um diâmetro de aproximadamente de 13mm, devido a capacidade destes folículos a secretar inibina. Neste momento os dois maiores folículos crescem paralelamente (fase paralela). Ambos os folículos secretam inibina causando o contínuo declínio das concentrações de FSH, as quais são requeridas por eles mesmos para os seus crescimentos. A fase de crescimento paralelo finaliza-se e inicia-se a fase de divergência folicular, quando o maior folículo atinge 22,5mm de diâmetro. A divergência é caracterizada pela contínua taxa de crescimento do maior folículo, ou folículo dominante, e diminuição da taxa de crescimento do menor folículo, ou folículo subordinado, conforme descrito na figura 3.

Embora alguns mecanismos de divergência sejam desconhecidos, acredita-se que através da secreção de estradiol e inibina, o folículo dominante cause uma redução nos

níveis circulantes de FSH, que se tornam insuficientes para a manutenção do crescimento dos folículos subordinados (BERGFELT & GINTHER, 1986).

De acordo com Monniaux et al. (1997), existe a participação decisiva de fatores de crescimento no processo de seleção e diferenciação do folículo dominante. Os fatores de crescimento fibroblástico (FGF), fator decrescimento epidermal (EGF), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e suas proteínas ligantes (IGFBPs) são consideradas os fatores locais mais importantes desta fase. Foi demonstrado que a biodisponibilização dos IGFs aumenta no fluido folicular dos folículos dominantes na fase terminal do seu desenvolvimento. Provavelmente, no momento da redução das concentrações de FSH, essa maior biodisponibilidade de IGFs no fluido folicular do folículo dominante cause uma elevação da sensibilidade das células da granulosa e uma potencialização das ações do FSH.

Bodensteiner et al. (1996) descreveram que outro fator fundamental da seleção folicular é a alteração da dependência gonadotrófica do folículo dominante. A observação de receptores para o LH nas células da granulosa de folículos dominantes antes da divergência folicular, sugerem uma participação do LH no mecanismo de seleção.

Reforçando esta afirmativa, Gastal et al., (1997) demonstraram que os níveis circulatórios de LH têm se mostrado aumentado durante o momento de divergência folicular. Em um estudo subsequente demonstraram um aumento transitório na concentração de LH durante a emergência da onda folicular e um constante aumento na proporção de LH : FSH (GASTAL et al., 2000).

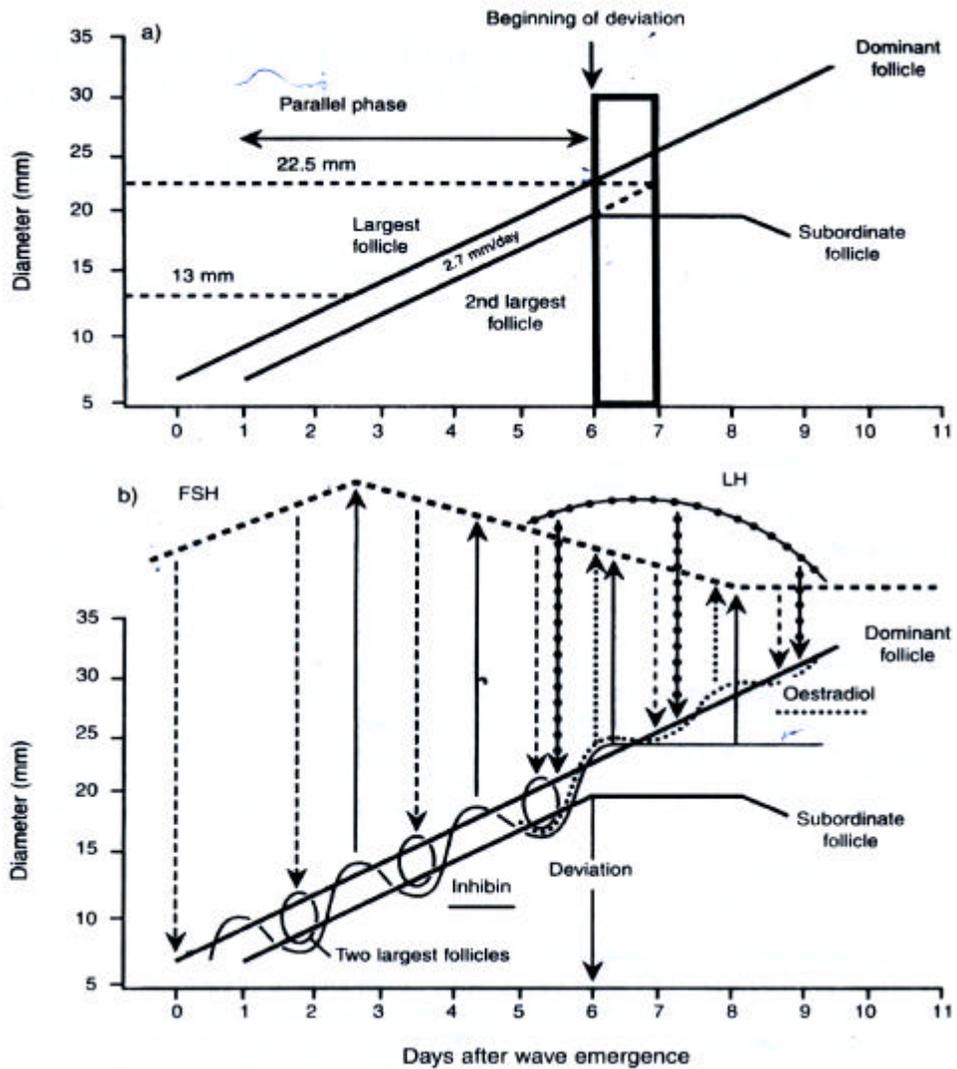


Figura 3- Esquema do modelo dos dois maiores folículos;

a) divergência folicular equina; b) aspectos hormonais envolvidos

(Fonte: Ghinter, 2000).

## 2.5 Atresia e Ovulação

De acordo com Webb et al. (1999), após ocorrer a divergência e seleção do folículo dominante, os folículos restantes ou subordinados sofrem atresia. Aproximadamente 99% de todos os folículos, em espécies monovulatórias, sofrem atresia, conseqüentemente somente alguns folículos derivados de uma enorme população de células primordiais, chegam a ovulação. A atresia é geralmente considerada um processo irreversível, que ocorre por morte celular ou apoptose.

O mecanismo de atresia pôde ser observado em várias espécies, incluindo equinos (KENNEY et al., 1979).

Driancourt & Palmer (1984) estudando ovários retirados cirurgicamente de éguas indicaram que os folículos pequenos, e não o folículo dominante, são capazes de exercer *feedback* negativo na secreção de FSH. Portanto, acumulam-se evidências, de que os futuros folículos subordinados são responsáveis pelo declínio de seu próprio crescimento e sua subseqüente atresia.

Conforme Pierson e Ginther (1987), quando os folículos subordinados iniciam o seu declínio, o folículo dominante começa a crescer rapidamente. Em éguas, a taxa média de crescimento do folículo dominante é aproximadamente de 3 a 5 mm por dia.

Imagens ultrassonográficas do folículo dominante pré ovulatório demonstraram um aumento no volume do antro e um espessamento da parede folicular (TOWNSON E GINTHER, 1989). Em equinos o grande folículo ovulatório, usualmente, alcança um diâmetro de aproximadamente 40mm, e a parede pode apresentar 6mm. Mudanças também ocorrem no interior do folículo, evidenciado por um aumento nas concentrações de estrógenos, andrógenos e inibina dentro do fluído folicular (PIERSON E GINTHER, 1987). No aspecto molecular, houve um aumento expressivo de receptores de LH pelas

células da teca, deste modo tornando o folículo responsivo ao LH pituitário (WEBB et al., 1999).

Em muitas espécies, a ovulação ocorre sobre o pico de LH. Em éguas, a ovulação ocorre após uma constante e lenta elevação na concentração circulatória de LH (GINTHER, 1987). Sob um certo limiar no estímulo de LH, o folículo rompe-se e o oócito é expelido. Adotando um caminho para a fossa de ovulação, o oócito é recolhido pela fímbria e liberado no infundíbulo do oviduto até ocorrer a fertilização. Ocorre, inicialmente, uma hemorragia após a ruptura do folículo, para a formação do corpo hemorrágico. As células da granulosa e da teca, sofrem luteinização para formar o corpo lúteo. A partir deste momento, inicia-se a fase lútea (HAFEZ & HAFEZ, 2000).

A combinação dos eventos que levam à ovulação do folículo dominante é um curioso processo dinâmico. Um melhor entendimento dos vários processos que levam ao recrutamento, seleção e dominância são pré-requisitos para estabelecer um comprovado método para promover uma resposta superovulatória em éguas.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A dinâmica folicular é um complexo processo, que envolve vários fatores que ainda não estão totalmente esclarecidos.

O entendimento dos fatores que estão presentes neste processo são de suma importância para a manipulação do ciclo estral equino e o sucesso da aplicação de biotecnologias, como a superovulação, os quais são melhores esclarecidos em outras espécies domésticas.

Quanto ao número de ondas foliculares que emergem e a caracterização destas ondas durante o ciclo estral equino existem variações na literatura. Existem controvérsias sobre os mecanismos intra-foliculares responsáveis pela divergência e seleção dos folículos dominantes. Portanto, estudos fazem-se necessários para caracterizar um padrão para a espécie estudada, assim, a partir destes esclarecimentos será possível a manipulação do desenvolvimento folicular em equinos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. **Theriogenology** 39, 781-796, 1993.

BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Follicular populations following inhibition of follicle stimulating hormone with equine follicular fluid during early pregnancy in the mares. **Theriogenology** 26, 733-747, 1986.

BODENSTEINER, K.J., WILTBANK, M.C., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. **Theriogenology** 45, 499-512, 1996.

BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal Reproduction Fertility** 109, 165-171, 1997.

BURATINI, J.J. Avaliação da dinâmica folicular em éguas da raça mangalarga utilizando a ultra-sonografia e as concentrações plasmáticas de progesterona e hormônio luteinizante. Tese (Mestrado) – Departamento de Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p66, 1997.

DEANSLEY, R.Y. Germ cell development and the meiotic prophase in the fetal horse ovary. **Journal Reproduction Fertility** 23, 547-552, 1978.

DRIANCOURT, M.A., MARIANA, J.C., PALMER, E. Effect of stage of oestrous cycle on follicular population in pony mares. **Reprod. Nutr. Develop.** 22, 803-812, 1982.

DRIANCOURT, M.A., PALMER, E. Time of ovarian follicular recruitment in cyclic pony mares. **Theriogenology** 21, 591-600, 1984.

ELVIN, J.A., YAN, C., MATZUK, M.M. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. **Molec.Cell.Endoc.** 159, 1-5, 2000.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammal. **Biology Reproduction** 50, 225-232, 1994.

GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biology Reproduction** 57, 1320-1327, 1997.

GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., NOGUEIRA, G.P., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentrations and follicle deviation in mares, **Theriogenology** 53, 925-940, 2000.

GINTHER, O.J., Relationships among number of days between multiple ovulations, number of embryos, and type of embryos fixation in mares. **Journal Equine Veterinary Science** 7, 82-88, 1987.

GINTHER, O.J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **Journal Reproduction Fertility** 90, 311-320, 1989.

GINTHER, O.J. Characteristics of the ovulatory season. In: Reproductive Biology of the Mare, 2ed. Cross Plains: **Equiservices**, 173-232, 1992.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science** 60-61, 61-79, 2000.

GOUDET, G., BELIN, F., BEZARD, J., GERARD, N. Maturation-promoting factor (MFP) and mitogen activated protein Kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in vitro maturation in the mare. **Mol. Hum. Reproduction** 4, 563-570, 1998.

HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. Functional Anatomy of Reproduction In: **Reproduction in Farm Animals**, 7ed., 1-68, 2000.

KENNEY, R.M., CONDON, W., GARJAN, V.K., CHANNING, C.P. Morphological and biochemical correlates of equine ovarian follicles as a function of their stage of viability or atresia. **Journal Reproduction Fertility** 27, 163-171, 1979.

MCNATTY, K.P., HEATH, D.A., LUNDY, T., FIDLER, A.E., SMITH, P. Control of early ovarian follicular development. **Journal Reproduction Fertility** 54, 3-16, 1999.

MONNIAUX, D., MONGET, P., BESNARD, N., HUET, C., PISSELET, C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. **Theriogenology** 47, 3-12, 1997.

PIERSON, R.A., GINTHER, O.J. Follicular population dynamics during the estrous cycle of the mare. **Animal Reproduction Science** 14, 219-231, 1987.

SQUIRES, E.L., GARCIA, R.H., GINTHER, O.J., VOSS, J.L., SEIDEL, G.E. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. **Theriogenology** 26, 661-670, 1986.

TOWNSON, D.H., GINTHER, O.J. Size and shape changes in the preovulatory follicle in mares based on digital analysis of ultrasonic images. **Animal Reproduction Science** 21, 63-71, 1989.

VAN DEN HURK, R., BEVERS, M.M., BECKERS, J.F. In-vivo and in-vitro development of pre antral follicles. **Theriogenology** 47, 73-82, 1997.

WILTBANK, M., FRICKE, P., SANGSRITAVONG, S., SARTORI, R., GINTHER, O.J. Sex and the single follicle: mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, p52-57, 2000.

WEBB, R., CAMPBELL, B.K., GARVERICK, H.A., GONG, J.G., GUTIERREZ, C.G., ARMSTRONG, D.G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal Reproduction Fertility**, Suppl.54, 33-48, 1999.