

DESENVOLVIMENTO FOLICULAR, ONDAS FOLICULARES E MANIPULAÇÃO*

Introdução

A função ovariana nos bovinos tem início ainda no período fetal e estende-se após a puberdade, até idades que podem atingir aos 15 anos. Durante o desenvolvimento fetal sob a influência dos hormônios maternos os ovários do feto apresentam crescimento e atresia folicular. Do nascimento à puberdade, na ausência de função do hipotálamo e da hipófise, as gônadas femininas permanecem em repouso. Após a puberdade quando o sistema nervoso central e a hipófise iniciam a liberação do GnRH e das gonadotrofinas (FSH e LH), respectivamente os ovários passam a funcionar realizando um conjunto de atividades, as quais denominamos de ciclo ovariana. Nas diferentes fases do ciclo estral existem nos ovários um número de folículos entre 200 e 400 que encontram-se em fase de crescimento, destes 25 a 50 são folículos terciários, dos quais 1 será selecionado como folículo dominante, adquirindo as características para realizar a maturação e a ovulação.

Ciclo estral

O ciclo estral é o ritmo funcional dos órgãos reprodutivos femininos que se estabelece a partir da puberdade. Compreende as modificações cíclicas na fisiologia e na morfologia dos órgãos genitais e também no perfil dos hormônios relacionados. Didaticamente o ciclo pode ser dividido em 4 fases que são limitadas por eventos reprodutivos coordenados pela secreção de hormônios. As fases são:

* Seminário apresentado na disciplina de Endocrinologia da Reprodução (VET00169) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, pela aluna CLAUDIA BRIANI ANTONIOLLI, no segundo semestre de 2002. Professor da disciplina: Félix H. Díaz González.

(1) Pró-estro: fase que antecede o estro ou o cio. Esta fase é marcada por um aumento gradativo circulantes de estrógeno, devido ao início do desenvolvimento folicular. Os achados principais são decorrentes desse perfil hormonal: ocorre um aumento gradativo na vascularização e tônus muscular dos órgãos genitais edemaciação inicial da vulva, proliferação do epitélio vaginal e relaxamento das cérvix. Tem duração média de 2 a 3 dias, termina quando a fêmea passa a aceitar o macho.

(2) Estro: caracteriza-se pela aceitação do macho. É a fase de mais fácil definição. Nesta fase os níveis circulantes de estrógeno são elevados, os achados decorrem desta alta taxa. O útero e as tubas se encontram túrgidos, a cérvix relaxada, vagina e vulva com sinais de hiperemia e edema com corrimento de muco. Esta fase tem duração variada entre 12 a 18 horas na vaca, assim terminando quando a fêmea deixa de aceitar o macho.

(3) Metaestro: fase de mais difícil caracterização. O corpo lúteo formado após a ovulação, secreta quantidades crescentes de progesterona até atingir sua produção máxima. A ovulação na vaca ocorre nesta fase. Com a produção inicial de progesterona, a genitália tende a ficar com menor tônus, menos vascularizadas e edemaciada. Em bovinos pode ocorrer uma pequena hemorragia caruncular, decorrente das alterações hormonais. Dura em média 2 ou 3 dias e termina quando o corpo lúteo atinge sua plena capacidade de produção de progesterona.

(4) Diestro: fase de maior duração, que ocorre sob predomínio da progesterona. Devido a presença deste esteróide, o endometrio fica mais espesso e com maior atividade das glândulas, a cérvix se fecha, a musculatura do genital relaxa e ocorre uma diminuição da vascularização e hipotrofia do epitélio vaginal. Dura cerca de 13 a 15 dias, terminando quando ocorre a regressão fisiológica do corpo lúteo, tendo início a outro ciclo.

Controle endócrino do ciclo estral

O GnRH, secretado pelo hipotálamo, através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, atinge esta glândula e estimula a liberação das gonadotrofinas, FSH e LH. Existem 2 locais de secreção e produção de GnRH no hipotálamo: os centros controladores de secreção tônica, que secretam GnRH de uma forma relativamente contínua, e os centros controladores da onda pré-ovulatória que secretam grandes quantidades de GnRH de uma só vez. As gonadotrofinas, além de distribuírem no organismo via circulação sistêmica, atingem o hipotálamo, pelo vaso de fluxo retrógrado, onde causam um bloqueio parcial na liberação de GnRH (mecanismo conhecido como “feed back” negativo). Via circulação, as gonadotrofinas chegam aos ovários, especificamente aos folículos, onde o FSH principalmente, estimula o desenvolvimento dos mesmos. Com isto, os folículos iniciarão a produção de estrógeno, que via circulação sistêmica atingiram o hipotálamo provocando um efeito negativo na secreção tônica e um efeito positivo, estimulando os centros controladores da onda pré-ovulatória, além de um efeito positivo na secreção de gonadotrofinas na hipófise. Quando a quantidade de estrógeno na circulação chega em determinado nível (devido a produção crescente pelos folículos em desenvolvimentos) este sensibiliza áreas superiores do sistema nervoso central, fazendo com que a fêmea manifesta sinais de aceitação do macho (estro) e age também nos centros controladores da onda pré-ovulatória de GnRH, fazendo com que uma grande quantidade deste hormônio seja liberada na circulação. Na etapa final de seu desenvolvimento, os folículos secretam outro hormônio, a inibina, que via sistêmica tem a função de bloquear seletivamente a síntese de FSH na hipófise. Por este motivo, acompanhando o pico de liberação de GnRH (onda pré-ovulatória) teremos um

pico maior de LH, já que a produção FSH encontra-se parcialmente bloqueada. Este pico de LH é responsável pela ovulação dos folículos presentes nos ovários que tem desenvolvimento compatível. As células remanescentes do folículo que ovulou sofreram uma transformação chamada luteinização, formando o corpo lúteo, que produz progesterona. Estes eventos também são coordenados pelo LH. A produção de progesterona alcança seu limite por volta de 5 a 7 dias após a formação do corpo lúteo, e enquanto permanecer em níveis elevados na circulação é responsável por bloquear a liberação de GnRH e das gonadotrofinas hipofisárias, ou seja, o animal não apresenta estro novamente enquanto estiver em concentrações circulantes elevadas, considerando que a fêmea não tenha ficado gestante no estro anterior, o corpo lúteo, cerca de 10 a 15 dias após a formação, iniciará a produção de ocitocina, que no endométrio estimulará a produção de prostaglandina, responsável pela regressão do corpo lúteo, processo conhecido como luteólise. Com isso, a concentração plasmática de progesterona diminui, possibilitando aumentos gradativos na secreção de GnRH, FSH e LH, iniciando um novo ciclo.

Caso o animal fique gestante, o corpo lúteo não pode sofrer regressão pois é a principal fonte de progesterona no início da gestação em todas as espécies domésticas. O bloqueio da luteólise é feito por substâncias produzidas pelo feto, que inibem a produção e/ou acesso da prostaglandina ao ovário. Estas substâncias tem natureza diversa entre as espécies. Foram identificadas proteínas, esteróides e outras com tal função.

Folículo-logênese

Refere-se ao crescimento dos folículos ovarianos. Envolve uma série de mudanças seqüências em componentes da parede folicular como células da teca, células da granulosa e ovócito. Até bem pouco tempo acreditava-se que os folículos ovarianos iniciavam seu desenvolvimento continuamente de uma forma aleatoria, independente das fases do ciclo estral ou gestação. Atualmente esse conceito se modificou. Hoje sabe-se que grupos de folículos iniciam o desenvolvimento sincronicamente, em determinados períodos do ciclo estral. Esses fenômenos são conhecidos como ondas de crescimento folicular. Estas ondas provavelmente ocorrem em todos os animais domésticos e se iniciam em períodos determinados, mesmo na ausência de níveis elevados de gonadotrofinas (ocorrem durante o ciclo estral e mesmo na gestação). Em um determinado momento, durante a onda de crescimento folicular um ou mais folículos, dependendo da espécie são selecionados para ovular. Este processo de seleção ainda não está totalmente elucidado, mas envolve além do desenvolvimento de um ou mais folículos, chamados de dominantes, e atresia dos demais permanentes a mesma onda. Quando o folículo dominante se desenvolve até um tamanho em condições de ovular, na presença de altas taxas de progesteronas este não sofre tal processo, entra em atresia e uma nova onda tem início.

Fases do crescimento dos folículos

Existem duas fases nas quais o crescimento do folículo pode ser didaticamente dividido. O tempo total do início do desenvolvimento, quando ele é retirado da reserva existente dos ovários, até a ovulação é longo, dura aproximadamente trinta dias que envolvem duas fases:

(1) até a formação do antro: depende de fatores ovarianos intrínsecos (regulado pelo próprio ovário, ou seja, substâncias e mecanismos que atuam na própria gônada). É a fase mais longa e a que menos se conhecem os mecanismos.

(2) após a formação do antro: depende principalmente da presença de gonadotrofinas (regulado pela hipófise) principalmente FSH e LH além de uma participação de estrógeno, que é produzido pelo próprio folículo. Uma onda de desenvolvimento folicular termina e a subsequente tem início quando o folículo dominante da onda anterior ovula ou inicia o processo de atresia.

O antro é definido como a cavidade preenchida por líquido, presente nos folículos a partir de certa fase de desenvolvimento, é formado através de pressão exercida pelo líquido de transudação produzido pelas células da teca e da granulosa. A composição e quantidade do fluido se modifica com o desenvolvimento do folículo. Os principais constituintes do líquido folicular são: estrógeno (quantidades crescentes com o desenvolvimento), progesterona (presente em folículos e atresia e próximos a ovulação), OMI (fator inibidor da maturação do ovócito) e inibina (quantidades crescentes no final do desenvolvimento). O fluido folicular possui várias funções tendo como principais: controlar o crescimento do folículo (E_2 e P_4), regular a maturação do ovócito (OMI), facilitar a captação do ovócito e acelerar o metabolismo dos espermatozóides. O crescimento dos folículos após a formação do antro é dependente principalmente da ação de estrógeno e das duas gonadotrofinas, FSH e LH. Estas agem sempre em conjunto, mas dependendo da função pode haver predomínio de estímulo por uma delas.

A ação do FSH predomina nas seguintes funções: início da formação do antro e fluido folicular, multiplicação das células da granulosa e da teca, formação de receptores para LH e estímulo da esteroidogênese.

A LH atua na modificação na esteroidogênese (estrógeno para progesterona), promove a ovulação e a formação do corpo lúteo e inicia a secreção de progesterona.

O mecanismo de produção hormônios esteróides, tanto na gônada feminina como na gônada masculina, ocorre de forma semelhante e é chamado de mecanismo de duas células e duas gonadotrofinas. Para a produção dos esteróides sexuais predominantes do macho e na fêmea, são necessárias as duas gonadotrofinas, LH e FSH, e dois tipos celulares. No caso da fêmea participam as células de sertoli e de leydig. O LH age nas células da teca ou de leydig, induzindo a transformação de colesterol em testosterona. Esta testosterona, principalmente na fêmea, passa para as células da granulosa, onde sob efeito do FSH, é transformada em estrógeno. Isto também ocorre no macho, porém em menor escala na célula de Sertoli.

Maturação do ovócito

Refere-se as transformações ocorridas no ovócito durante o desenvolvimento folicular e podem ser divididas em duas fases:

(1) Fase de crescimento que ocorre a partir do início do desenvolvimento folicular. Nesta fase ocorre um ligeiro aumento do volume do ovócito, cujo metabolismo é suprimido por nutrientes obtidos de projeções das células do *cumulus oophorus*, que são células da granulosa em íntimo contato com o ovócito. As células sanguíneas da fêmea não entram em contato direto com o ovócito. Durante esta fase também é formada a zona pelúcida.

(2) Preparação para a fertilização: fase que ocorre simultaneamente com o final da fase de crescimento folicular. A partir desta fase o ovócito terá condições para ser

fecundado. Ela envolve principalmente modificações no núcleo das células, devido a complementação do processo de meiose. Quando o folículo é formado, o ovócito se encontra no estágio de prófase 1 ($2n$), da primeira sub-fase da meiose desde a sua formação no embrião, e assim permanece até a onda pré ovulatória de gonadotrofinas. Provavelmente um dos fatores que fazem com que o folículo permanece com a meiose bloqueada, é o OMI (fator inibidor da maturação do ovócito) encontrado no fluido folicular. A partir da onda de gonadotrofinas, que também provoca a ovulação, o ovócito retoma a meiose e se desenvolve até o estágio de metáfase 1 ($2n$) ou metáfase 2($2n$), sendo liberado do folículo em um destes estágios, dependendo da espécie. A meiose somente se completará se o ovócito entrar em contato com o espermatozóide.

Finalmente a ovulação é o processo pelo qual o ovócito é liberado do folículo. A partir de uma onda de crescimento folicular o folículo que vai ovular é selecionado por processos ainda não totalmente elucidados. Os que não vão ovular, pertencentes a mesma onda, sofrem atresia.

Padrões de ondas foliculares

São estabelecidos padrões de 2 ondas foliculares, onde a primeira tem início no dia zero (dia da ovulação) e a segunda no dia 10 e padrão de 3 ondas, onde a emergência destas ocorre entre os dias 0, 9 e 16, do ciclo estral, sendo a as duas primeiras anovulatórias.

Existem trabalhos que demonstram dados obtidos através de ultra-sonografia, que indicam que em vacas Nelore ocorre predominância (90%) de duas ondas de crescimento folicular, enquanto que em novilhas apresentam maior frequência de três ondas (67%).

O mecanismo que regula a dinâmica folicular está baseado nas diferentes respostas ao FSH e LH, os aumentos periódicos de concentrações de FSH circulante são responsáveis pela emergência das ondas foliculares, portanto vacas com duas ondas tem 2 aumentos e vacas com três ondas tem 3 aumentos de FSH. A supressão periódica do FSH circulante pelo mecanismo de “feed-back” negativo favorece a reserva do ovário prevenindo o recrutamento contínuo de folículos antrais grandes, já que 99% destes irão sofrer atresia. O aumento de FSH permite o crescimento folicular suficiente para que alguns (não todos os folículos adquiram a capacidade de responder ao LH), ao mesmo tempo que permite o crescimento do folículo dominante os subordinados começam a diferenciar-se (momento da seleção) o FSH tem um declínio rápido por volta do 2º dia da emergência da onda.

O folículo destinado a ser dominante aparentemente tem mais receptores para LH, estabelecendo assim uma vantagem competitiva sobre os outros folículos destinados a serem subordinados que lhe permitem sobreviver sem o FSH.

Existem pesquisadores que defendem a predominância de ciclos de duas ondas, como existem os que defendem os de três ondas e ainda os que dizem que os de duas e três tem distribuição igual, assim como pesquisas demonstram ciclos de até quatro ondas em *Bos indicus*.

Existem fatores que afetam o desenvolvimento folicular tais como: nível nutricional, estresse calórico e anestro lactacional, que podem modificar o padrão de desenvolvimento. Um nível nutricional baixo estaria associado a uma proporção mais alta de ciclos de três ondas foliculares, estes fatores tem sido muito discutidos e aparentemente a fertilidade das vacas não demonstra diferença entre animais com duas ou três ondas de desenvolvimento folicular.

Os folículos subordinados podem converter-se em folículos dominantes se este for removido. A capacidade de um folículo subordinado em tornar-se dominante é observado em animais superovulados com altas doses de FSH, estes folículos alcançam um diâmetro máximo menor comparado ao de um folículo originalmente dominante (Figura 1).

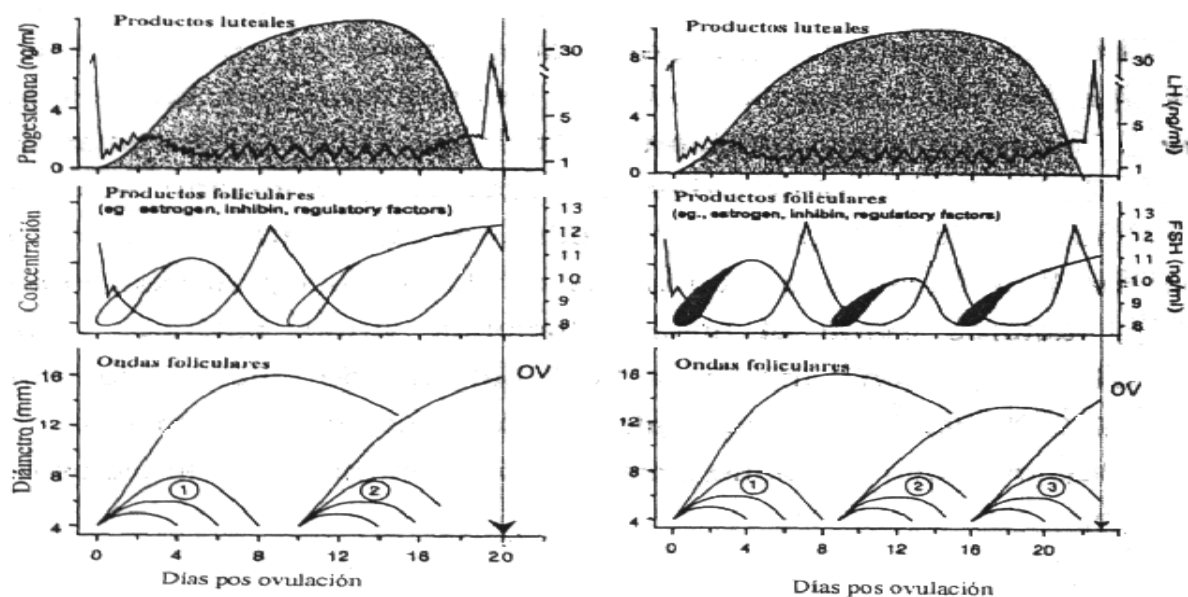


Figura 1. Modelo proposto para explicar a dinâmica folicular em ondas durante intervalos ovulatórios de duas ondas do lado esquerdo e três ondas do lado direito. Na parte superior demonstra concentrações plasmáticas de progesterona (ng/ml), e pulsos de LH esquemáticos que indicam a frequência e a amplitude dos pulsos reais. Na parte central representam os produtos foliculares (valores relativos) e o FSH. Nos gráficos inferiores está representado um esquema do desenvolvimento folicular dos folículos dominantes e subordinados.

Desenvolvimento folicular no período pós-parto

O reinício da dinâmica folicular em vacas leiteiras e de corte ocorre no começo do período pós-parto. Para que a ovulação ocorra, o folículo dominante deve estar exposto à correta frequência de pulsos de LH (Figura 2).

Punções foliculares

Histórico

A técnica de punção folicular transvaginal utilizando o auxílio de ultrassonografia foi primeiramente desenvolvida para o uso para a medicina humana sendo adaptada em 1988 por Pieterse et al. para uso em medicina veterinária.

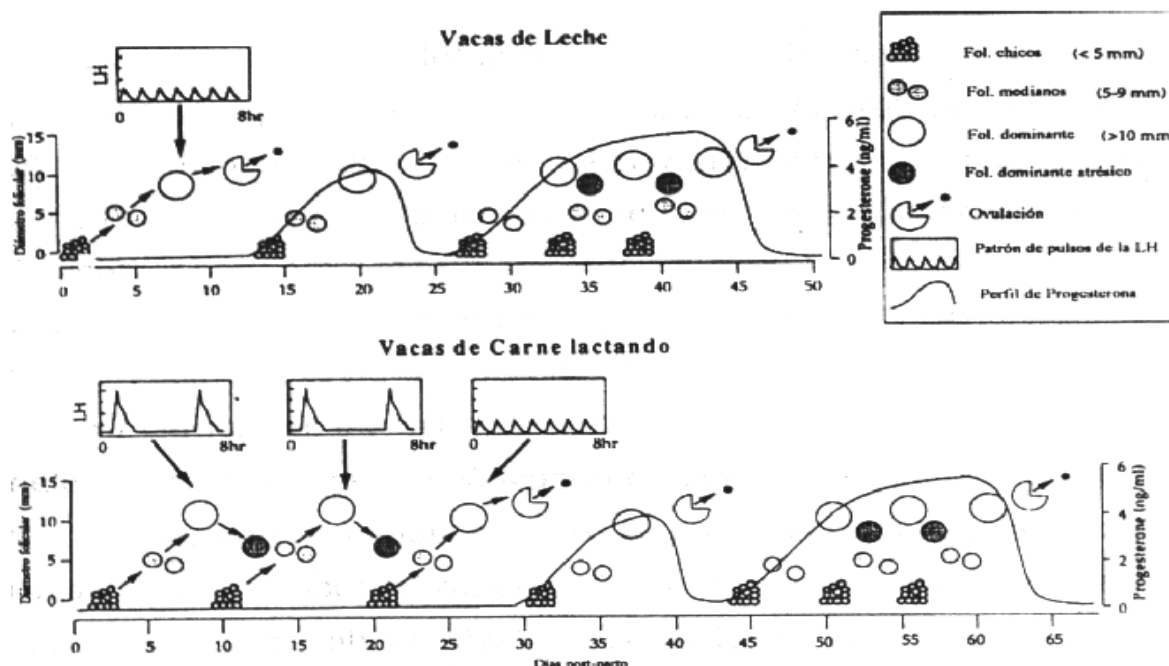


Figura 2. Esquema proposto para demonstrar o desenvolvimento do folículo dominante e o início da ciclicidade durante o período pós-parto em vacas leiteiras e de corte em lactação sem estresse nutricional. A frequência dos picos de LH está demonstrada em períodos de oito horas (Adaptado de Roche et al., 1992).

Objetivo

Recuperar oócitos repetidamente de animais vivos previamente selecionados de alto valor genético diminuindo assim o intervalo entre gerações e possibilitando o nascimento de um maior número de descendentes por produção conhecida por fêmea.

Utilização

Pode ser empregada em animais jovens, senis, gestantes, lactantes e em animais com problemas de infertilidade adquiridos.

Material

O sistema é composto por três componentes: aparelho de ultrassonografia com transdutor setorial de 7,5 MHz, bomba de aspiração e sistema condutor da agulha.

Método

Sedação dos animais, anestesia epidural, limpeza e desinfecção da área (períneo), introdução do transdutor conectado ao sistema condutor da agulha. O ovário é posicionado (através da manipulação retal) na extremidade do transdutor, e os folículos são visualizados na tela do aparelho. A introdução da agulha por um segundo operador, pode ser acompanhada na tela e a aspiração do conteúdo folicular também (a linha de biópsia é programada para aparecer na tela e servir de ajuda). A agulha é ligada à bomba de sucção que aspira o fluido folicular e o oócito em um recipiente contendo PBS modificado acrescido de 1% de soro fetal bovino e aproximadamente 0,1% de heparina. Subseqüentemente, os oócitos são identificados e passados para placas de maturação, posteriormente fecundação e por último o cultivo.

Entre os fatores que influenciam o sucesso das punções foliculares, estão: tratamentos hormonais, frequência das aspirações, nível de vácuo e experiência do operador.

No Brasil as aplicações utilizando aspirações foliculares tinham como objetivo a pesquisa e a produção de embriões de vacas com problemas reprodutivos adquiridos (Tabela 1). Atualmente, já existem condições que viabilizam a produção de embriões utilizando esta tecnologia como: melhoria dos sistemas de maturação, fecundação e

cultivo, redução nos custos da técnica, acesso aos meios de cultura, aquecimento do mercado de gado de elite e necessidade dos criadores em aumentar seus rebanhos em curto espaço de tempo.

Tabela 1. Dados obtidos por uma empresa privada brasileira referente aos dezoito primeiros meses de atividades comerciais utilizando punções foliculares.

Total de fazendas	16
Total de raças (<i>B. taurus</i> x <i>B. indicus</i>)	9 (5 x 4)
Total de vacas	321
Total de OPU	937
Total de oócitos	12.440
Total de oócitos qualidade I	1.953
Total de oócitos qualidade II	2.812
Total de oócitos qualidade III	4.539
Total de oócitos viáveis (I, II e III) (%)	9.304 (74,8)
Total de touros utilizados	98
Total de embriões clivados (%)	7.068 (75,9)
Total de blastocistos (%)	3.930 (42,2)
Total de embriões transferidos	3.270
Total de prenhezess (%)	840 (35,4)
Total macho/fêmea (%)	75/59 (56/44)
Embriões/OPU/vaca	4,2
Abortos	28/840 (3%)

Outro fator muito importante é a oferta que o Brasil dispõe em relação as receptoras a um custo mais baixo, reduzindo em 50% comparado aos países desenvolvidos.

Tendo em vista que a aspiração pode ser feita a campo, enquanto a FIV requer laboratório adequado, a tendência é que ocorra no Brasil o mesmo que em outros países como a Alemanha, França e Canadá, onde existem laboratórios regionais que recebem os oócitos aspirados por médicos veterinários que atuam em fazendas. No laboratório é produzido o embrião *in vitro* que é entregue ao veterinário que o transferirá para vacas receptoras que levarão a gestação a termo.

Conclusões

- Apesar dos períodos sem uma atividade cíclica regular (pré-púbere, prenhez e anestro pós-parto), constituem a parte mais importante da vida de uma fêmea bovina, a maior atenção tem sido atribuída aos períodos de atividade cíclica. Este é o período onde o homem tem a possibilidade de intervir com mais frequência como na sincronização dos ciclos estrais, inseminação artificial com tempo fixo, entre outros.
- Muito já foi descoberto através do auxílio de aparelhos de ultra-sonografia que demonstram a imagem em tempo real, podendo assim determinar o padrão de desenvolvimento folicular simulando ondas. Muito ainda tem a ser elucidado, como por exemplo a eleição do folículo dominante de cada onda. O que leva a sua escolha?
- O homem tem caminhado em pród destas descobertas e vem criando meios e adaptando técnicas para que se obtenha uma maior eficiência e aproveitamento do que a natureza já lhe oferece, como no caso das punções foliculares onde se torna possível

o aproveitamento na reprodução de animais com problemas reprodutivos adquiridos.

O que ainda hoje está obscuro, amanhã será esclarecido e surgirão novas dúvidas. Este é o nosso desafio!

Referências bibliográficas

BARUCELLI, P. Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo. 2000.

CUPPS, T.P. Reproduction in Domestic Animals. 4.ed. Department of Animal Science, University of California. Davis. 1991.

FERNANDES, C.A. Fisiopatologia e Biotecnologia da Reprodução Animal. Universidade de Alfenas. 2000.

MIES FILHO, A. Reprodução dos Animais. 6ª ed. Editora Sulina, Porto Alegre. 1987.

THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.C., HUNTER, R.H. Reproduction in mammals and man. Paris: Ellipses. 1993.