

## Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares

*Follicular dynamics in mares: role of intrafollicular factors*

João Rafael Chinait Gurgel<sup>1,4</sup>, Carlos Henrique Cabral Viana<sup>2</sup>;  
Eduardo Gualtieri de Andrade Perez<sup>3</sup>, Marcilio Nichi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Médico Veterinário Autônomo

<sup>2</sup>FMV-PUC/Minas, Poços de Caldas, MG, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, SP, Brasil

<sup>4</sup>Correspondência: [jrgurgel2003@yahoo.com.br](mailto:jrgurgel2003@yahoo.com.br)

### Resumo

Diversos são os fatores intrafoliculares relacionados com o desvio folicular, incluindo o sistema IGF, peptídeos, receptores de gonadotrofinas, fatores angiogênicos e esteróides. A concentração de IGF-1 livre aumenta significativamente no fluido do futuro folículo dominante antes do início do desvio, se comparada à concentração encontrada em folículos subordinados. Quando o maior folículo é eliminado, a concentração de IGF-1 livre no segundo maior folículo começa a aumentar 12 horas antes do início do desvio entre o segundo e o terceiro maior folículo. As IGFBPs regulam a biodisponibilidade de IGFs por meio da ligação seletiva, tornando-os indisponíveis para seus receptores. No entanto, as proteases degradam essas proteínas de ligação e aumentam a biodisponibilidade de IGF-1 nos folículos. O desvio do diâmetro entre os folículos dominantes e subordinados é associado com um aumento diferencial no fluxo sanguíneo nos folículos dominantes que, supostamente, garante aporte gonadotrófico e de nutrientes essenciais para o desenvolvimento de folículos ovulatórios. A melhor compreensão das informações apresentadas na presente revisão de literatura é essencial para o sucesso na aplicação prática e no desenvolvimento de biotecnologias em reprodução equina.

**Palavras-chave:** dinâmica, folicular, fatores, intrafoliculares, égua.

### Abstract

*Several factors are related to follicular deviation, including the IGF system, peptides, gonadotrophin receptors, angiogenic factors, and steroids. Free IGF-1 concentration increase differentially in the fluid of the future dominant follicle before the beginning of deviation, compared to subordinate follicles. When the largest follicle is eliminated, the concentration of free IGF-1 in the second largest follicle starts to increase 12 hours before the beginning of deviation between the second and third largest follicles. IGFBPs regulate the bioavailability of IGFs by selective binding, rendering them unavailable for their receptors. However, proteases degrade these binding proteins and increase bioavailability of IGF in the follicles. The diameter deviation among dominant and subordinate follicles is associated to the differential increase on blood flow in the dominant follicles that, presumably, provides essential trophic support to the development of ovulatory follicles. The better understanding of the information presented in this review is essential for the success on practical application and development of equine reproductive biotechnology.*

**Keywords:** follicular, dynamics, intrafollicular, factors, mare.

### Introdução

O esclarecimento dos mecanismos de desenvolvimento folicular, assim como seleção do folículo dominante, é necessário para a manipulação do ciclo estral e, conseqüentemente, a aplicação de biotecnologias reprodutivas, as quais são fundamentais para a multiplicação de animais geneticamente superiores.

Dinâmica folicular é o processo contínuo de crescimento e regressão folicular que ocorre nos ovários das éguas, o qual é diretamente influenciado por fatores extrínsecos como nutrição, temperatura, estresse e fotoperíodo. De acordo com o fotoperíodo, o ciclo reprodutivo anual é dividido em duas estações, anovulatória e ovulatória. A estação anovulatória é composta de três períodos, que compreendem a transição do outono, o anestro profundo (observado em regiões temperadas) e a transição da primavera, os quais são marcados por pequena concentração sérica de LH, embora a secreção de FSH não sofra alterações substanciais. Já a estação ovulatória é marcada pelo processo de seleção folicular, o qual ocorre no fim da fase de crescimento comum em que o folículo dominante cresce em uma taxa contínua, e os folículos subordinados crescem até o momento da seleção e então regredem. O controle do desvio folicular depende de fatores intrafoliculares, tais como fatores de crescimento, peptídeos, receptores de gonadotrofinas, fatores angiogênicos e esteróides, os quais são secretados de maneira diferenciada nos futuros folículos dominantes e subordinados, determinando efeitos regulatórios autócrinos, parácrinos e endócrinos.

O objetivo da presente revisão de literatura é abordar os mecanismos de controle da dinâmica folicular em éguas, com ênfase em fatores intrafoliculares.

### Ondas foliculares

O termo “onda folicular” compreende um conjunto de fenômenos foliculares que obedecem à seguinte seqüência: recrutamento, seleção, dominância e ovulação ou atresia. Durante o recrutamento, ocorre o crescimento comum de um grupo de folículos antrais sensíveis ao FSH, seguido pela fase de seleção, na qual um ou alguns folículos mantêm o padrão de crescimento, em detrimento dos demais que começam um processo de regressão ou atresia. Nas espécies monovulatórias, normalmente, o folículo que continua a crescer é considerado dominante (fase de dominância); este secreta elevada quantidade de estrógeno e é sensível ao estímulo ovulatório desempenhado pelo padrão de liberação do LH (Driancourt, 2001).

De acordo com o exame de palpação transretal, uma única e maior onda folicular foi proposta inicialmente para o ciclo estral do eqüino. No entanto, os tipos de ondas foliculares que se desenvolvem nas éguas são as ondas maiores (caracterizadas por folículos dominantes e subordinados) e ondas menores (o maior folículo não atinge o diâmetro de um folículo dominante; Ginther, 2000). As ondas maiores foram posteriormente divididas em ondas primárias, cujo folículo dominante se desenvolve e ovula durante o estro e ondas secundárias que têm um folículo dominante que não ovula ou ovula após a onda primária e o estro, sendo denominada ovulação de diestro. Ondas secundárias e menores ocorrem mais freqüentemente na primavera do que no outono (Evans, 2003). Segundo Ginther (2000), em algumas raças (quarto de milha, pôneis), usualmente somente uma onda maior se desenvolve no final do diestro e culmina na ovulação durante o estro. Em raças como o Puro Sangue Inglês (PSI), uma onda secundária maior freqüentemente se desenvolve no início do diestro, e o folículo dominante pode ser anovulatório, entrando em processo de atresia ou pode ovular, fenômeno conhecido como ovulações no diestro.

O estudo realizado por Ginther *et al.* (2003) demonstrou que os maiores folículos das ondas menores alcançam diâmetro inerente ao desvio folicular (22,8 mm), mas, depois disso, param de crescer. Além disso, as concentrações de LH no início do desvio foram maiores no momento correspondente às ondas maiores do que durante o mesmo período das ondas menores. Estes resultados fornecem suporte para o conceito de que o futuro folículo dominante necessita de um estímulo adicional do LH no início do desvio folicular e também indica que o LH fornece o estímulo para conversão de uma onda menor para uma onda folicular maior.

A emergência de folículos é definida pelo menor diâmetro, usado para mensurar o perfil de crescimento por ultra-sonografia e, freqüentemente, é representado por 6 mm de diâmetro em éguas (Ginther, 2000; Ginther *et al.*, 2001, 2005). Após a emergência, os folículos de uma onda entram em uma fase comum de crescimento, envolvendo de 7-11 folículos em média (Ginther *et al.*, 2001). A emergência de cada onda é temporariamente associada com o surgimento do FSH para ondas maiores e menores (Ginther, 2000; Ginther *et al.*, 2003). O pico da concentração de FSH ocorre quando o maior folículo atinge, aproximadamente, 13 mm de diâmetro e, então, começa a declinar (Fig. 1; Ginther, 2000; Machado, 2002; Ginther *et al.*, 2005).

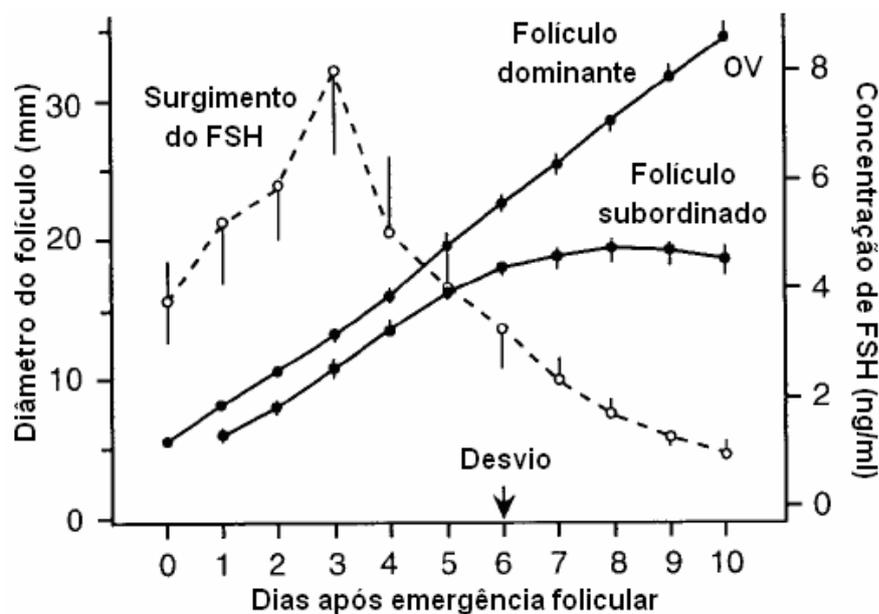


Figura 1. Níveis séricos de FSH e desenvolvimento dos dois maiores folículos (média  $\pm$  EPM) em 14 ondas ovulatórias eqüinas normalizadas no dia da emergência folicular. O futuro folículo dominante emergiu numa média de dois dias após a eliminação de todos os folículos maiores que 8 mm por meio da aspiração folicular no dia 10 após a ovulação, mantendo somente dois folículos, que conseguiram se desenvolver (modelo de dois folículos). OV=ovulação.

Fonte: adaptado de Ginther *et al.*, 2001.

O crescimento paralelo dos folículos finaliza quando o maior folículo alcança um diâmetro de 22 mm (Ginther, 2000; Machado, 2002), e o segundo maior folículo alcança 19 mm com o desvio começando em 6,2 dias depois da emergência de folículos de 6 mm. O folículo que alcançou primeiro 20 mm (avaliação diária) se tornou dominante em 93% das 29 ondas avaliadas (Ginther, 2000).

O futuro folículo dominante emerge em média, nas éguas, um dia mais cedo do que o futuro maior folículo subordinado (Ginther, 2000; Ginther *et al.*, 2001), com isso o dominante alcançou 6 mm antes do futuro maior folículo subordinado e manteve uma média de 3 mm diâmetro de vantagem até o início do desvio (Ginther, 2000). Segundo Ginther (2000), o segundo maior folículo se torna dominante quando o maior folículo é eliminado no começo do desvio. No entanto, um trabalho mais recente, realizado por Gastal *et al.* (2004), mostrou que até o quarto maior folículo pode se tornar dominante, se os três maiores folículos forem eliminados no dia esperado do desvio. Além disso, este experimento demonstrou também que tanto o segundo, quanto o terceiro e o quarto maiores folículos têm capacidade de tornarem-se dominantes, na ausência de um folículo de diâmetro maior, até dois dias após o desvio esperado.

#### *Seleção folicular*

A seleção folicular é um mecanismo pelo qual um (ou alguns) dos folículos recrutados se torna dominante, e exerce um efeito inibitório indireto sobre os demais e, além disso, é capaz de ovular. Eventualmente dois folículos são selecionados, desenvolvendo-se em codominância. A seleção folicular ocorre no fim da fase de crescimento comum, quando o folículo dominante cresce em uma taxa contínua, e os folículos subordinados regridem ou crescem temporariamente em uma taxa reduzida (Ginther, 2000; Ginther *et al.*, 2001; Beg e Ginther, 2006).

#### *Controle da seleção folicular*

As concentrações de FSH diminuem gradativamente a partir do surgimento do pico do FSH quando o maior folículo da onda atinge 13 mm, sendo que as baixas concentrações de FSH são temporariamente associadas com a seleção folicular. Aparentemente, quando o maior folículo alcança um estágio decisivo de desenvolvimento, uma rápida ativação do mecanismo de desvio bloqueia o segundo maior folículo antes de este alcançar um diâmetro decisivo. Por isso, as diferenças no diâmetro entre os dois maiores folículos indicam que o menor folículo deve ser inibido em menos que um dia em éguas (equivalente a uma diferença de 3 mm). O desvio de diâmetro provavelmente é precedido pelo desvio bioquímico ou funcional relacionado com alterações de ecogenicidade detectadas na parede do maior folículo no dia anterior ao início do desvio do diâmetro em éguas (Ginther, 2000).

O intervalo compreendido entre o início do declínio de FSH e o começo do desvio é de aproximadamente três dias. Em éguas, após o início do desvio, as concentrações de FSH continuam a diminuir por alguns dias. Durante o intervalo do início do declínio do FSH até o início do desvio folicular, múltiplos folículos contribuem para o declínio do FSH. Paradoxalmente, o declínio do FSH é imposto pelos folículos. Entretanto, os folículos continuam a necessitar do FSH (Fig. 2; Ginther *et al.*, 2001).

O declínio nas concentrações de FSH pode ser o evento pivô do desvio folicular, pois a secreção de FSH fica abaixo das quantidades necessárias para que os menores folículos continuem se desenvolvendo (Ginther, 2000; Ginther *et al.*, 2001).

Quando o maior folículo alcança um diâmetro crítico (aproximadamente 23 mm), a depressão de FSH continua e o segundo maior folículo é deprimido antes de ele alcançar um diâmetro similarmente crítico. Por isso, duas habilidades se desenvolvem no futuro folículo dominante no início do desvio de diâmetro: 1-habilidade de continuar suprimindo o FSH circulante em concentrações abaixo das necessárias pelos outros folículos e 2-habilidade de utilizar as baixas concentrações de FSH em seu posterior crescimento e desenvolvimento (Ginther, 2000).

É proposto que a regressão dos menores folículos envolva um efeito direto dos fatores foliculares inibidores secretados pelo maior folículo (Armstrong e Weeb, 1997), porém, a evidência para tal efeito não é convincente (Fortune, 1994). Não há relatos sugerindo que tais inibidores possam ser produzidos especificamente pelo maior folículo no início do desvio e que entrem no sistema vascular de modo a afetar outros folículos. Além disso, estudos de ablação indicam que a inibição dos menores folículos durante o desvio folicular é atribuída à supressão contínua das concentrações de FSH abaixo das concentrações necessárias pelos menores folículos (Ginther, 2000).

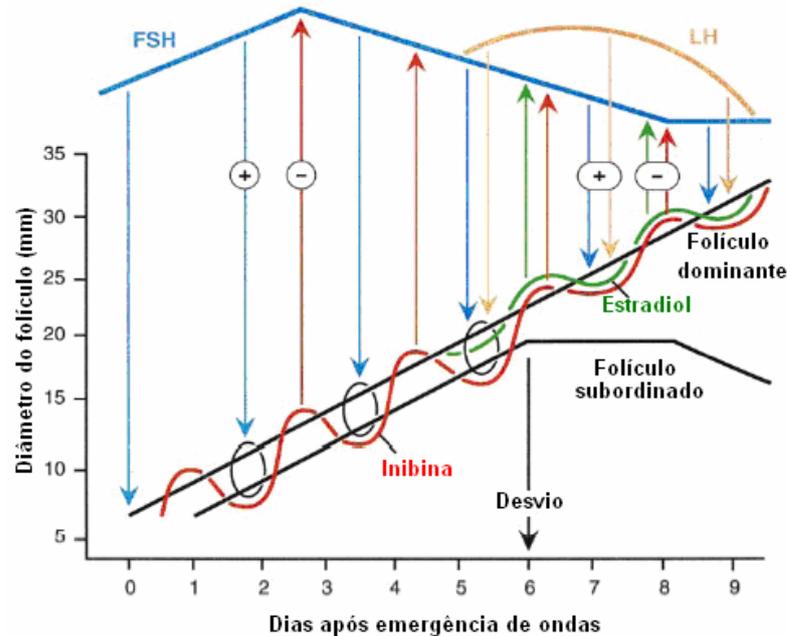


Figura 2. Ilustração dos aspectos das concentrações hormonais durante o desvio usando um modelo de dois folículos. Quando os folículos alcançam aproximadamente 13 mm, eles secretam concentrações aumentadas de inibina durante a fase de crescimento comum. O estradiol aumentado é secretado pelo maior folículo sob influência de concentrações aumentadas de LH. Aparentemente, o aumento no estradiol atua em conjunto com a inibina para continuar a redução nas concentrações de FSH após o desvio. O LH elevado continua a estimular a produção de estradiol por meio do desenvolvimento do folículo dominante e tem um efeito positivo no diâmetro do folículo dominante dentro de dois dias após o início do desvio.

Fonte: adaptado de Ginther *et al.*, 2001.

### Aspectos intrafoliculares

Os fatores intrafoliculares que são candidatos para a ativação do desvio incluem aqueles relacionados ao sistema IGF, esteróides, peptídeos como inibina A/ativina A, receptores de gonadotrofinas, angiogênicos e diversos outros fatores intrafoliculares. Contudo, somente alguns fatores são temporariamente ou funcionalmente implicados no desvio folicular como o IGF-1 e seu sistema associado, estradiol e receptores de LH (Beg e Ginther, 2006).

#### Inibina

As células da granulosa nas gônadas da fêmea são a principal fonte de inibina e proteínas correlatas, que contribuem para a regulação endócrina do sistema reprodutivo. As inibinas são proteínas compreendendo duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  interligadas por pontes de dissulfeto (Hafez e Hafez, 2004). Parece haver somente uma subunidade  $\alpha$  para a inibina, mas existem duas diferentes subunidades  $\beta$  chamadas de  $\beta A$  e  $\beta B$ . A combinação da subunidade  $\alpha$  com qualquer subunidade  $\beta$  produz uma inibina biologicamente ativa (inibina A ou inibina B; (McKinnon e Voss, 1993).

Segundo Hafez e Hafez (2004), as inibinas desempenham um importante papel na regulação hormonal da foliculogênese durante o ciclo estral, atuando como sinalizadores químicos para a hipófise sobre o número de folículos em crescimento no ovário.

Biologicamente, a inibina atua na diminuição da síntese e da liberação do FSH. O efeito da inibina na secreção de FSH é relativamente lento. Aproximadamente 24 horas de exposição das células hipofisárias à inibina *in vitro* são necessárias para produzir uma supressão significativa no GnRH estimulou a secreção de FSH, e o grau de supressão aumenta com o tempo adicional de exposição. O rápido efeito da inibina na síntese do FSH, comparado ao seu efeito relativamente lento na secreção, levou à indagação de que o mecanismo pelo qual a inibina diminui a secreção de FSH é pela redução da síntese de FSH, diminuindo dessa forma a quantidade de hormônios disponível para a liberação (McKinnon e Voss, 1993).

Um *feed-back* negativo da inibina ou de outros produtos protéicos dos folículos também pode regular o declínio dos níveis séricos de FSH, incluindo os baixos níveis durante o desvio (Ginther, 2000; Ginther *et al.*, 2005). Uma atividade supressora do fluido folicular sobre o FSH de equinos foi demonstrada por um aumento nas concentrações de FSH, após a eliminação dos folículos e uma diminuição no FSH, após o tratamento com frações protéicas do fluido folicular (Ginther *et al.*, 2001). A administração de um soro antiinibina aumenta o

FSH plasmático, o número de grandes folículos e o número de ovulações em éguas (Ginther, 2000; Ginther *et al.*, 2001).

Próximo ao dia esperado de desvio, a inibina total permanece em concentrações elevadas e provavelmente contribui para a diminuição contínua do FSH. Na mesma linha, o tratamento com soro anti-inibina, no dia em que o maior folículo tem 20mm e no dia seguinte, resulta em um aumento no número de folículos de 30mm. Portanto, estes resultados sugerem que a inibina continua a ser um supressor de FSH após o desvio em éguas (Ginther *et al.*, 2001).

Estudos realizados por Donadeu e Ginther (2002) demonstraram um aumento diferencial na concentração de inibina A no maior folículo, a partir do momento em que este alcançou um diâmetro de 16 a 19,9mm. Essas maiores concentrações no folículo dominante em relação ao segundo e terceiro maiores folículos sugeriram que a inibina A pode ter uma função na iniciação do desvio folicular e no subsequente crescimento diferencial do folículo dominante. As inibinas A e B diminuíram no segundo e no terceiro maior folículo após a variação de 20-23,9 mm, o que corresponde ao crescimento diminuído destes folículos. Ocorreram alterações diferenciais na inibina dimérica (inibina A e inibina B), sendo que as concentrações de inibina A aumentaram com o diâmetro folicular e foram menores em folículos não dominantes do que em dominantes, enquanto as concentrações intrafoliculares de inibina B não se alteraram com o aumento do diâmetro folicular ou com a maturidade folicular. A inibina A é um estímulo conhecido da produção de andrôgeno, induzido pelo LH em diversas espécies. Portanto, os níveis foliculares de inibina A, aumentados no maior folículo no início do desvio, podem servir para assegurar que uma quantidade adequada de andrôgeno esteja disponível, como substrato para produção de estradiol pelo folículo dominante em éguas.

#### *Ativina e folistatina*

As ativinas são dímeros da subunidade  $\beta$  da inibina e, por isso, podem existir de três formas. A ativina A é um homodímero da subunidade  $\beta A$  da inibina, a ativina B é um homodímero das subunidades  $\beta B$  e ativina AB é um heterodímero composto de uma subunidade  $\beta A$  e uma  $\beta B$  da inibina. Cada um destes componentes tem atividade estimulante de FSH. Como para inibina, o efeito da ativina na secreção de FSH é relativamente lento, necessitando de diversas horas para induzir um aumento na liberação basal de FSH em células hipofisárias cultivadas, enquanto seu efeito na síntese de FSH ocorre muito mais rapidamente. Por isso, o principal efeito da ativina na regulação das concentrações circulantes de FSH pode ser aumentar a quantidade de FSH na hipófise anterior disponível para a liberação (McKinnon e Voss, 1993).

A ativina induz à proliferação de células da granulosa; aumenta a expressão de receptores do FSH, a esteroidogênese da célula da granulosa, a atividade da aromatase estimulada pela gonadotrofina e a produção de estradiol; e atrasa o início da luteinização e atresia (Beg e Ginther, 2006). Estudos realizados por Donadeu e Ginther (2002) mostraram que a ativina A começa a aumentar diferencialmente no maior folículo, simultaneamente com as concentrações de estradiol, antes do desvio do diâmetro. Os presentes resultados sugerem que a ativina A pode ter uma função na melhora da atividade da aromatase no maior folículo, precedendo o início do desvio em éguas.

A folistatina é uma outra glicoproteína isolada do fluido folicular de eqüinos (Beg e Ginther, 2006). Ela não somente inibe a secreção de FSH (similarmente a inibina), mas também liga-se à ativina, neutralizando sua atividade biológica. Portanto, constitui-se num agente modulador da secreção de FSH (Hafez e Hafez, 2004).

As proporções intrafoliculares de ativina: folistatina e ativina: inibina têm sido sugeridas como parâmetros potencialmente importantes na regulação da foliculogênese. A folistatina neutraliza a atividade da ativina A por meio da sua ligação, e a inibina A opõe-se às ações da ativina A. Por isso, uma proporção de ativina A: folistatina e ativina A: inibina A reflete a quantidade líquida de ativina ativa (ação da ativina) provavelmente disponível para a interação com seus receptores (Beg e Ginther, 2006).

#### *Estradiol*

O estradiol, estrógeno primário, é secretado pelos folículos em desenvolvimento e é candidato a um efeito inibitório na secreção de FSH (Ginther, 2000; Hafez e Hafez, 2004) e LH no centro tônico do hipotálamo (Hafez e Hafez, 2004). No entanto, não é conhecido se o estradiol entra na circulação em concentrações adequadas para um *feed-back* negativo com o FSH, especialmente durante a fase inicial da diminuição do FSH (Ginther, 2000).

O estradiol começa a aumentar na circulação um dia antes do início da seleção. Portanto, os níveis séricos de estradiol aparentemente não contribuem para a diminuição do FSH até o dia anterior do desvio

folicular (Gastal *et al.*, 1999b). A eliminação do maior foliculo no início esperado da seleção previne o aumento contínuo do estradiol e resulta em um aumento do FSH, o que não ocorre quando o segundo maior foliculo é eliminado. Tanto a produção de estradiol, quanto a de inibina, é bloqueada se efetivada a eliminação do maior foliculo e uma diminuição nos dois hormônios poderia contar para o aumento resultante no FSH (Gastal *et al.*, 1999a).

Um dia antes do início do desvio, ocorrem tanto um aumento nas concentrações de estradiol, quanto alterações ecogênicas, características da estimulação por estrógenos, na parede do futuro foliculo dominante. Portanto, o início da disponibilidade de estradiol, localmente aumentada, coincide aproximadamente com o início do desvio folicular. As atividades autócrinas e parácrinas do estradiol nas células da granulosa incluem o aumento da atividade da enzima aromatase, promoção da expressão de receptores de LH (LHr), e aumento à sensibilidade ao FSH e LH; todas essas funções parecem relevantes ao mecanismo de desvio. No entanto, a maioria dos estudos na função de estrógenos na foliculogênese foi feita em roedores. Estudos específicos são necessários nas espécies monovulatórias porque as atividades locais do estradiol podem ser cruciais para o mecanismo de desvio. A responsividade aumentada do futuro ou estabelecido foliculo dominante ao FSH poderia também ocorrer por meio de um aumento no número de receptores de FSH nas células da granulosa (Ginther *et al.*, 2001).

#### *Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)*

Mais de vinte anos após a determinação da seqüência de aminoácidos da insulina, em 1955, sugeriu-se o envolvimento da insulina como regulador da atividade ovariana. A presença de insulina e fatores do sistema IGF no ovário foi relatada pela primeira vez em porcas. Desde então, a presença de IGFs no fluido folicular de várias outras espécies tem sido documentada, incluindo bovinos, ovinos, eqüinos e humanos (Ponchirolli, 2003).

IGFs são fatores de crescimento polipeptídicos secretados pelo fígado e por vários tecidos em resposta ao estímulo do Hormônio do Crescimento (GH). Eles são mediadores da maioria das ações promotoras de crescimento do hormônio do crescimento. Regulam a proliferação e a diferenciação de vários tipos celulares e têm efeitos metabólicos semelhantes aos da insulina. Diferentemente da insulina, a maioria dos tecidos os produzem. Os IGFs têm a capacidade de atuar por via endócrina, assim como por mecanismos autócrino e/ou parácrino (Hafez e Hafez, 2004).

O GH é um polipeptídeo simples, produzido na hipófise anterior pelas células somatotrofos e no fígado estimula a síntese de IGF-1, que irá agir nos tecidos periféricos. A liberação do GH é controlada por hormônios produzidos no hipotálamo, que são: fator liberador de hormônio do crescimento e fator inibidor da liberação de hormônio do crescimento. A liberação desses fatores é influenciada por neurotransmissores como a noradrenalina, dopamina, serotonina e vários neuropeptídeos (Gluckman *et al.*, 1986).

Tecidos como o hipotálamo, pituitária, corpo lúteo, foliculos ovarianos e útero contêm RNAm para receptores de GH, mas não está claro se eles contêm receptores para GH. Existem evidências de que, em bovinos, os receptores de GH estão presentes nas células da granulosa folicular, sendo que a sua quantidade é bem menor que no tecido luteínico (Diskin *et al.*, 2003).

O sistema IGF consiste do IGF-1 e IGF-2, proteína ligadora de IGF (*IGF binding protein*, IGFBP) e proteases da IGFBP (Ginther *et al.*, 2001).

É proposto que as IGFBPs exercem uma função pivô na regulação da biodisponibilidade de IGF, por meio da ligação seletiva de IGFs e tornando-os indisponíveis para seus receptores. As IGFBPs são inibitórias para o crescimento e diferenciação folicular induzido por gonadotrofinas e inibem as ações de IGF no nível de células alvo. Pelo menos 4 ou 5 IGFBPs (BP-2, 3, 4 e 5, e um complexo de alto peso molecular de 90-135kDa) foram detectados no fluido folicular de éguas. No entanto, somente a BP-2 tem sido estudada na associação com o desvio em eqüinos (Donadeu e Ginther, 2002).

A complexidade do sistema IGF inclui as proteases da IGFBP, tal como a proteína plasmática associada à prenhez (PAPP)-A, que têm sido constatadas no fluido folicular de eqüinos. As proteases degradam as proteínas de ligação e por isso aumentam a biodisponibilidade de IGF-1 nos foliculos. A atividade proteolítica sobre BP-2, BP-4 e BP-5 também foi relatada nos foliculos dominantes bem depois do início do desvio folicular (Beg e Ginther, 2006).

O IGF-1 e a IGFBP parecem exercer papel fundamental na aquisição da dominância folicular, durante o desenvolvimento folicular, já que as concentrações de IGF-1 no fluido folicular aumentam, enquanto as concentrações de IGFBP-2 decrescem durante o estabelecimento da dominância (Ponchirolli, 2003).

Segundo Webb *et al.* (2006), o IGF-1 interage com o FSH no estímulo da produção de estradiol pelas células da granulosa. O IGF-1 é importante para a maturação sexual, secreção de gonadotrofinas e age sinergicamente com estas para estimular o crescimento e a diferenciação dos folículos (Zulu *et al.*, 2002).

O sistema de IGFs exerce influência sobre as atividades da esteroidogênese, proliferação celular, atividade da aromatase, foliculogênese, ovulação, implantação e desenvolvimento embrionário (Zulu *et al.*, 2002), além de estimular a síntese de DNA e progesterona pelos tecidos ovarianos (Vanderhaar *et al.*, 1995).

As concentrações de IGF-1 livre aumentaram diferencialmente no fluido do futuro folículo dominante antes do início do desvio, em comparação aos folículos subordinados. Quando o maior folículo foi eliminado, a concentração de IGF-1 livre no segundo maior folículo começou a aumentar 12 horas antes do início do desvio entre o segundo e o terceiro maior folículo, enquanto as concentrações de estradiol, inibina A e ativina A aumentaram após o início do desvio entre o segundo e o terceiro maior folículo (Donadeu e Ginther, 2002).

Segundo Beg e Ginther (2006), a injeção de IGF-1 recombinante humano (rhIGF-1) dentro do segundo maior folículo, no início esperado do desvio, estimulou a produção de inibina A, ativina A e fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF) e evitou um aumento na androstenediona e IGFBP-2, dentro de 24 horas. No entanto, o estradiol não aumentou até 48 horas. Em adição, a injeção intrafolicular de uma alta dose de rhIGF-1 dentro do segundo maior folículo levou um maior número de folículos injetados à continuidade do crescimento, ao alcance da dominância e à ovulação em comparação ao grupo-controle que recebeu aplicação de solução salina (NaCl 0,9%). Os resultados da injeção intrafolicular de IGF-1 dentro do segundo maior folículo indicam que o sistema IGF via IGF-1 é um participante precoce no início do mecanismo de desvio em equinos (Fig. 3).

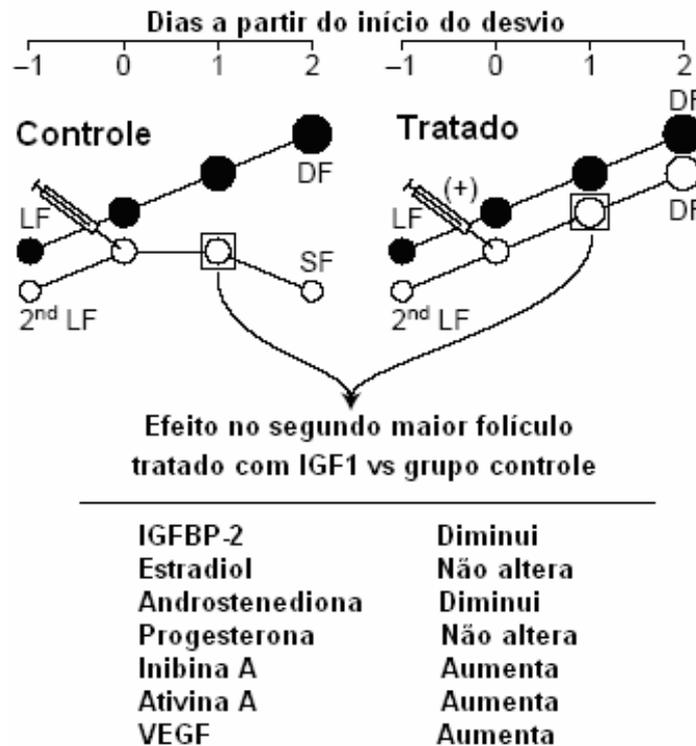


Figura 3. Alterações nas concentrações dos fatores de fluido folicular no segundo maior folículo seguindo o tratamento intrafolicular do segundo maior folículo com solução salina (grupo-controle) ou rhIGF1 (grupo tratado) no início esperado do desvio.

Fonte: adaptado de Beg e Ginther, 2006.

De acordo com Beg e Ginther (2006), as concentrações de IGF-1 livre foram negativamente correlacionadas com os níveis de IGFBP-2, 4 e 5 nos folículos pequenos, médios e grandes na fase folicular e luteínica. As concentrações de IGFBP-2 no fluido folicular foram similares entre o maior e o segundo maior folículo no início do desvio, e as concentrações aumentaram no segundo maior folículo após o início do desvio. Além disso, a eliminação do maior folículo no início esperado do desvio não foi temporariamente associada com uma diminuição nas concentrações de IGFBP-2 no segundo maior folículo. A injeção de IGFBP-3 recombinante humana (rhIGFBP-3) dentro do maior folículo no início esperado do desvio parou o crescimento do maior folículo; o segundo maior folículo se tornou o folículo dominante. No entanto, a taxa de crescimento média dos folículos puncionados é reduzida imediatamente após a punção (agulhas de 25G) e recuperada entre 6 e 12 horas

depois (Ginther *et al.*, 2004). Em adição, a injeção de IGFBP-3 intrafolicular diminuiu as concentrações no fluido folicular de IGF-1 livre, estradiol, ativina A, inibina A e VEGF e aumentou as concentrações de androstenediona dentro de 24 horas (Fig. 4).

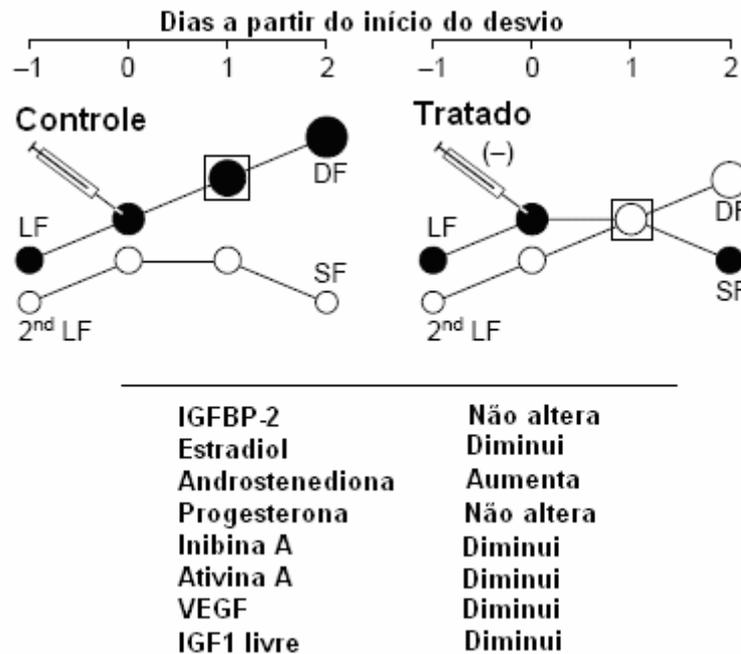


Figura 4. Alterações nas concentrações dos fatores de fluido folicular no maior folículo seguindo o tratamento intrafolicular do maior folículo com solução salina (grupo-controle) ou rhIGFBP-3 (grupo tratado) no início esperado do desvio.

Fonte: adaptado de Beg e Ginther, 2006.

#### Fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF)

Durante as fases de crescimento e atresia folicular, ocorre uma reorganização dos capilares sanguíneos a fim de suprir as necessidades teciduais. Esse processo é definido como angiogênese e é dependente da produção de fatores angiogênicos específicos (Ponchirolli, 2003).

O desvio do diâmetro entre os folículos dominantes e subordinados em éguas cíclicas é associado com um aumento diferencial no fluxo sanguíneo nos folículos dominantes. A vascularização aumentada supostamente fornece aporte essencial para o desenvolvimento de folículos ovulatórios. O principal estimulador da angiogênese é o VEGF, e as concentrações de VEGF no fluido folicular têm se mostrado, diferencialmente, aumentadas nos folículos dominantes ovulatórios de éguas. A vascularização reduzida dos folículos transitórios foi atribuída aos baixos níveis de VEGF e levou ao suporte limitado de gonadotrofina, resultando em deficiências de desenvolvimento e funcionais (baixa capacidade esteroidogênica) nestes folículos (Donadeu e Watson, 2007). Segundo Beg e Ginther (2006), um aumento na vascularização proporciona ao folículo a vantagem de receber suprimento preferencial de fatores de crescimento, gonadotrofinas, precursores esteróides e outros nutrientes necessários para seu desenvolvimento contínuo.

Entre os sinais que regulam a produção de VEGF, a baixa tensão de oxigênio ( $O_2$ ) tem sido relatada como um agente estimulante, enquanto altas tensões desse gás estão relacionadas com a inibição de sua produção. Dentro do folículo, a tensão de oxigênio é baixa, principalmente em folículos grandes, onde os gases devem difundir-se a partir dos vasos presentes na camada de células da teca, até a membrana basal da camada da granulosa e acumular-se no líquido folicular (Ponchirolli, 2003).

O VEGF estimula a mitose de células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular. Uma camada anecogênica expandida dentro da parede do folículo dominante se tornou aparente um dia antes da ovulação e foi atribuída à vascularização aumentada (Fig. 5; Gastal *et al.*, 2006). As concentrações de VEGF no fluido folicular foram mais altas no maior folículo do que no segundo maior folículo, no dia após o início do desvio do diâmetro. Em adição, quando o rhIGF-1 foi injetado dentro do segundo maior folículo no começo esperado do desvio, as concentrações de VEGF aumentaram dentro de 24 horas e, quando o rhIGFBP-3 foi injetado dentro do maior folículo, as concentrações de VEGF diminuíram. Uma injeção intrafolicular de VEGF no segundo maior folículo no início do desvio aumentou as concentrações de IGF-1 livre e diminuiu a androstenediona, mas não afetou as concentrações dos outros fatores (Beg e Ginther, 2006).

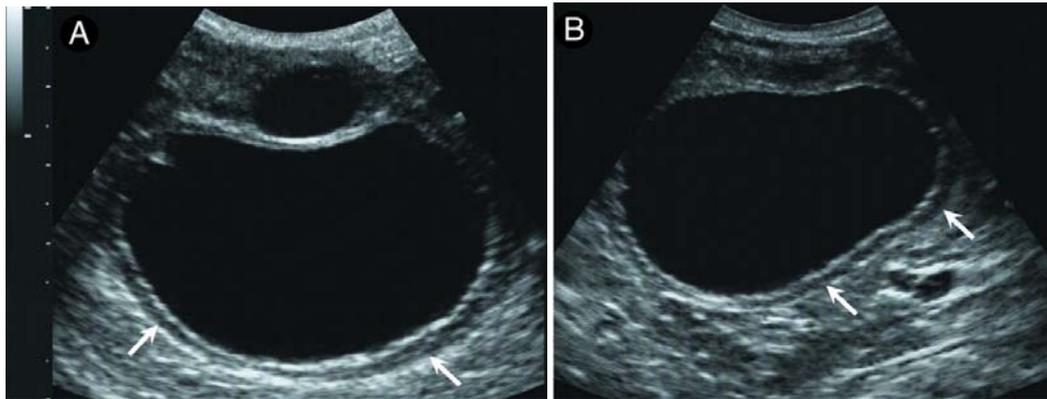


Figura 5. Imagens ultra-sonográficas demonstrando uma camada anecogênica expandida dentro da parede dos folículos (setas brancas). A figura A mostra um folículo 2 dias antes de atingir um diâmetro  $\geq 35$  mm e a figura B mostra um folículo um dia antes de ovular.

Fonte: adaptado de Gastal *et al.*, 2006.

Usando a técnica de doppler colorido, demonstrou-se recentemente que a área de fluxo sanguíneo na parede do folículo foi mais alta no primeiro folículo ovulatório da estação do que no grande folículo anovulatório precedente, começando quando estes folículos tinham aproximadamente 25mm de diâmetro. Em função das gonadotrofinas serem conhecidas por induzir a produção de VEGF pelas células foliculares, foi concluído que os baixos níveis de LH durante a transição levam à vascularização reduzida do folículo e subsequente falha na aquisição da capacidade ovulatória. É demonstrado que o IGF-1 estimula a produção de VEGF nos folículos e é provável que a baixa disponibilidade de IGF-1 nos folículos transicionais, posteriormente, contribua para a reduzida angiogênese folicular (Donadeu e Watson, 2007).

A vascularização folicular no início do desvio foi estudada diretamente em eqüinos por meio de doppler colorido (Fig. 6). A área de fluxo sanguíneo começa a aumentar diferencialmente no futuro folículo dominante em relação ao subordinado, aproximadamente um dia antes do início do desvio do diâmetro. A vascularização precoce aumentada no futuro folículo dominante tem sido relatada em eqüinos (Beg e Ginther, 2006). Acosta *et al.* (2004) encontraram resultados similares que fornecem a primeira indicação direta de que as alterações no fluxo sanguíneo diferencial, entre os futuros folículos dominante e subordinado, precedem o desvio de diâmetro durante a seleção folicular. O futuro folículo dominante, portanto, é favorecido pelo aumento contínuo do suprimento sanguíneo, assim como pela responsividade diferenciada às gonadotrofinas, para continuar o crescimento, apesar das mais baixas concentrações de FSH, enquanto os futuros folículos subordinados são posicionados para a regressão. É sabido que um folículo dominante tem uma maior vascularização da teca e suprimento sanguíneo do que os folículos subordinados; no entanto, os resultados demonstraram que a vascularização diminuída no futuro folículo subordinado começou bem antes de a taxa de crescimento do folículo começar a diminuir.

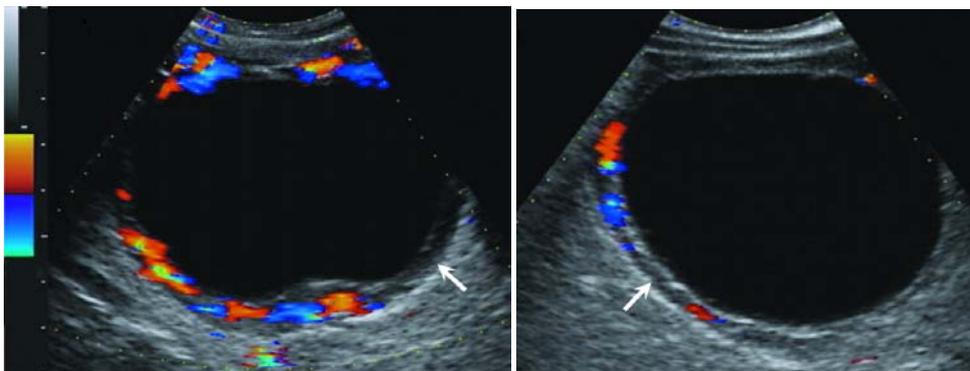


Figura 6. Imagens de doppler colorido ilustrando a vascularização de folículos dominantes.

Fonte: adaptado de Gastal *et al.*, 2006.

### Considerações finais

Em éguas, o início da seleção folicular pode ser considerado quando o maior folículo atinge um diâmetro de 22 mm. Este desvio de diâmetro é precedido por um desvio bioquímico ou funcional, controlado por fatores intrafoliculares. A inibina atua para diminuir a síntese e a liberação do FSH. O principal efeito da ativina é aumentar a quantidade de FSH na hipófise anterior disponível para a liberação. O estradiol aumenta a atividade

da enzima aromatase nas células da granulosa, promove a expressão de receptores de gonadotrofinas, aumentando a sensibilidade do folículo ao FSH e ao LH. As concentrações de IGF-1 livre aumentam diferencialmente no fluido do futuro folículo dominante antes do início do desvio, em comparação aos folículos subordinados. Quando o maior folículo é eliminado, a concentração de IGF-1 livre no segundo maior folículo começa a aumentar 12 horas antes do início do desvio entre o segundo e o terceiro maior folículo. O desvio do diâmetro entre os folículos dominantes e subordinados está associado com um aumento diferencial no fluxo sanguíneo nos folículos dominantes que fornece suporte trófico essencial para o desenvolvimento de folículos ovulatórios. O principal promotor da angiogênese é o VEGF, e as concentrações de VEGF no fluido folicular têm se mostrado, diferencialmente, aumentadas nos folículos dominantes ovulatórios. O VEGF estimula a mitose em células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular.

### Referências

- Acosta TJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA, Ginther OJ.** Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in mares. *Biol Reprod*, v.71, p.502-507, 2004.
- Armstrong DG, Webb R.** Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod*, v.2, p.139-146, 1997.
- Beg MA, Ginther OJ.** Follicle selection in cattle and horse: role of intrafollicular factors. *Soc Reprod Fertil*, v.132, p.365-377, 2006.
- Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenam JM.** Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.345-370, 2003.
- Donadeu FX, Ginther OJ.** Changes in concentrations of follicular fluid factors during follicle selection in mares. *Biol Reprod*, v.66, p.1111-1118, 2002.
- Donadeu FX, Watson ED.** Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse. *Anim Reprod Sci*, v.100, p.225-242, 2007.
- Driancourt MA.** Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v.55, p.1211-1239, 2001.
- Evans ACO.** Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod Domest Anim*, v.38, p.240-246, 2003.
- Fortune JE.** Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*, v.50, p.225-232, 1994.
- Gastal EL, Gastal MO, Beg MA, Ginther OJ.** Interrelationships among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. *Reproduction*, v.128, p.417-422, 2004.
- Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ.** Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. *Biol Reprod*, v.61, p.724-730, 1999a.
- Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ.** Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Soc Reprod Fertil*, v.131, p.699-709, 2006.
- Gastal EL, Gastal MO, Wiltbank MC, Ginther OJ.** Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. *Biol Reprod*, v.61, p.31-39, 1999b.
- Ginther OJ.** Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.61-79, 2000.
- Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K.** Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod*, v.65, p.638-647, 2001.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Meira C, Kot K.** In Vivo Effects of an intrafollicular Injection of Insulin-Like Growth Factor 1 on the Mechanism of Follicle Deviation in Heifers and Mares. *Biol Reprod*, v.70, p.99-105, 2004.
- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA.** Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biol Reprod*, v.73, p.315-323, 2005.
- Ginther OJ, Woods BG, Meira C, Beg MA, Bergfelt DR.** Hormonal mechanism of follicle deviation as indicated by major versus minor follicular waves during the transition into the anovulatory season in mares. *Reproduction*, v.126, p.653-660, 2003.
- Gluckman PD, Breier BH, Davis SR.** Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. *J Dairy Sci*, v.70, p.442-466, 1986.
- Hafez ESE, Hafez B.** *Reprodução animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.
- Machado MS.** Dinâmica folicular em éguas. In: Seminário do Curso de Pós-Graduação, 2002, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, 2002. 20p.
- McKinnon AO, Voss JL.** *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993.
- Ponchirolli CB.** Influência dos fatores de crescimento no desenvolvimento folicular. In: Seminário do Curso de Pós-Graduação, 2003, São Paulo, SP. *Anais...* São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da



Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, 2003. 12p.

**Vandehaar MJ, Sharma BK, Fogwell RL.** Effect of dietary energy restriction on the expression of insulin-like growth factor-1 in liver and corpus luteum of heifers. *J Dairy Sci*, v.78, p.832-841, 1995.

**Webb R, Dunga K, Quinn RL, Fouladi-Nashata AA.** Desenvolvimento folicular em espécies mono e poli-ovulatórias: do feto à fertilização. *Acta Sci Vet*, v.34, p.95-114, 2006.

**Zulu VC, Nakao T, Sawamukai Y.** Insulin-like growth factor-1 as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. *Theriogenology*, v.64, p.657-665, 2002.