

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Pós-Graduação em Ciência Animal

**ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA O ESTUDO *IN VIVO* DA
VASCULARIZAÇÃO E DA CARACTERIZAÇÃO DO FLUIDO FOLICULAR E
CÉLULAS DA GRANULOSA**

EDUARDO KENJI NUNES ARASHIRO

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Pós-Graduação em Ciência Animal

**ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA O ESTUDO *IN VIVO* DA
VASCULARIZAÇÃO E DA CARACTERIZAÇÃO DO FLUIDO FOLICULAR E
CÉLULAS DA GRANULOSA**

EDUARDO KENJI NUNES ARASHIRO

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal

Curso: Ciência Animal
Área de concentração: Reprodução Animal
Orientador: Prof. Dr. Marc Henry
Co-orientador: Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana
Co-orientador: Prof. Dr. Alan Maia Borges

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2012

**ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA O ESTUDO *IN VIVO* DA
VASCULARIZAÇÃO E DA CARACTERIZAÇÃO DO FLUIDO FOLICULAR E
CÉLULAS DA GRANULOSA**

EDUARDO KENJI NUNES ARASHIRO

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marc Roger Jean Marie Henry - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. José Buratini Júnior
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. José Monteiro da Silva Filho
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^a. Dr^a. Monique de Albuquerque Lagares
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela dedicação, carinho e apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

À minha amada esposa Adriana, minha melhor amiga e eterna namorada, agradeço por todo o amor, carinho, dedicação e incentivo, fundamentais para vencer mais esta etapa da vida. Agradeço também sua grande ajuda na extração de mRNA.

Aos meus queridos irmãos Roberto (e também sua esposa Edna) e Leandro pela fiel amizade e companheirismo.

A minha sobrinha e afilhada Isabela, que trouxe muita alegria para minha família.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto. O presente estudo foi desenvolvido como parte integrante do Projeto Fapemig APQ CVZ 02863/09 (“Estabelecimento de modelos de referência *in vivo* para o desenvolvimento de sistemas de maturação oocitária *in vitro*”).

Ao Prof. Dr. Marc Henry, pela orientação e dedicação dispensadas durante o período do doutorado.

Ao Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana, por toda dedicação e orientação dispensada ao longo desse projeto.

Ao Prof. Dr. Alan Maia Borges, pela sua colaboração no exame de Qualificação e na pré-defesa.

Ao Prof. Dr. Antônio de Pinho Marques Júnior, pela sua colaboração no exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Miller Pereira Palhão, pela grande ajuda durante os experimentos e também pela sua colaboração no exame de Qualificação.

Aos membros da banca, que aceitaram dedicar parte de seu tempo para ler e corrigir essa tese.

A Sabine Wholres-Viana pela enorme ajuda na coleta das amostras, extração de mRNA e análises por PCR em tempo real.

A Natana Rabelo pela ajuda na coleta das amostras e extração de mRNA.

Ao setor de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite pela disponibilidade dos equipamentos e instalações do laboratório para a realização deste estudo.

Ao Laboratório de Endocrinologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, em nome da Profa. Dr^a. Eunice Oba, pela receptividade e apoio na realização das dosagens hormonais.

Ao Dr. Jorge Lopes e Ricardo Gomes do Instituto Nacional de Tecnologia, pelo suporte técnico na área de modelagem tridimensional.

Ao amigo Del (Gilmar Pereira Alvim), que me ajudou no mestrado, e mais ainda no doutorado.

Ao amigo Alberto Mansur Ghetti, pela grande ajuda nas avaliações ultrassonográficas e também pelas suas piadas e histórias sempre bem humoradas.

Aos meus colegas Carlos Clemente, Betina Cruz, Ana Maria Loiza e Fabiana Varago que me ajudaram muito ao longo do curso de doutorado.

A todos os outros colegas da Pós (Reprodução Animal) pelos divertidos momentos nas aulas, viagens e, principalmente, na cantina.

A todos que de alguma forma ajudaram para concluir mais esta etapa.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	11
2.	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	FOLÍCULO OVARIANO.....	11
2.1.1	O folículo como unidade funcional do ovário.....	11
2.1.2	Estrutura do folículo ovariano.....	12
2.1.2.1	<i>Camada de células da granulosa</i>	12
2.1.2.2	<i>Antro folicular</i>	13
2.2	DESENVOLVIMENTO FOLICULAR.....	13
2.2.1	Fatores envolvidos no controle do desenvolvimento folicular.....	13
2.3	VASCULARIZAÇÃO FOLICULAR.....	16
2.4	ULTRASSONOGRRAFIA NO ESTUDO da FOLICULOGÊNESE.....	17
2.4.1	Uso da ultrassonografia para coleta de fluido folicular e células da granulosa.....	17
2.4.2	Ultrassonografia com Doppler colorido.....	18
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

CAPÍTULO I

Utilização da modelagem tridimensional a partir de imagens ultrassonográficas: uma nova abordagem para o estudo da vascularização folicular

	RESUMO	25
	ABSTRACT	25
1.	INTRODUÇÃO	26
2.	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANIMAIS.....	26
2.2	EXPERIMENTO I: VALIDAÇÃO DO USO DO ALGORITMO COMPUTACIONAL....	27
2.2.1	Avaliações ultrassonográficas.....	27
2.2.2	Captura e processamento das imagens para modelagem tridimensional.....	27
2.3	EXPERIMENTO II: AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA VASCULARIZAÇÃO FOLICULAR.....	28
2.3.1	Avaliações ultrassonográficas.....	28
2.3.2	Captura e processamento das imagens para modelagem tridimensional.....	28
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.	CONCLUSÃO	32
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

CAPÍTULO II

Aspiração folicular guiada por ultrassonografia utilizando um sistema adaptado para coleta *in vivo* de fluido folicular e células da granulosa de folículos bovinos de diferentes tamanhos

	RESUMO	35
	ASBTRACT	35
1.	INTRODUÇÃO	36
2.	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANIMAIS.....	36
2.2	EXPERIMENTO I: ADAPTAÇÃO DO SISTEMA DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR.....	37
2.3	EXPERIMENTO II: RECUPERACAO <i>IN VIVO</i> DE FLUIDO FOLICULAR UTILIZANDO O SISTEMA ADAPTADO DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR.....	37
2.4	EXPERIMENTO III: RECUPERAÇÃO DE CELULAS DA GRANULOSA UTILIZANDO O SISTEMA ADAPTADO DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR.....	38
2.4.1	Extração de mRNA, transcrição reversa e PCR.....	39
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.	CONCLUSÃO	43
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

CAPÍTULO III

Caracterização da concentração intrafolicular de estradiol e progesterona e da expressão gênica de células da granulosa em novilhas Holandesas e Gir utilizando um modelo *in vivo*

	RESUMO	46
	ABSTRACT	46
1.	INTRODUÇÃO	47
2.	MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANIMAIS.....	47
2.2	COLETA DE CELULAS DA GRANULOSA E FLUIDO FOLICULAR.....	47
2.3	DOSAGEM DE ESTRADIOL E PROGESTERONA NO FLUIDO FOLICULAR.....	48
2.4	EXTRAÇÃO DE mRNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	48
2.5	PCR EM TEMPO REAL.....	48
2.5.1	Análise dos resultados.....	50
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
3.	RESULTADO E DISCUSSÃO	51
4.	CONCLUSÃO	57
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
	ANEXO I	61
	ANEXO II	62
	ANEXO III	63
	ANEXO IV	64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 -	Número de quadros na sequência de imagens utilizada para realizar a modelagem tridimensional do folículo dominante (FD) ao longo do seu desenvolvimento.....	27
Tabela 2 -	Tabela 2. Número de quadros na sequência de imagens utilizada para realizar a modelagem tridimensional do folículo dominante (FD) ao longo do seu desenvolvimento nas raças Gir e Holandesa (média±EPM).....	28
Tabela 3 -	Volume esperado (VE) e volume calculado (VC) por reconstrução tridimensional do folículo dominante ao longo do seu desenvolvimento.....	30

CAPÍTULO II

Tabela 1 -	Perdas na aspiração simulada <i>in vitro</i> do volume esperado em folículos com 4, 6, 8,10 e 12 mm de diâmetro (média±EPM).....	40
Tabela 2 -	Volume esperado e volume recuperado de fluido folicular de folículos de 4 a 16 mm de diâmetro aspirados <i>in vivo</i> pela técnica convencional (folículos com diâmetro > 8 mm) ou pela técnica adaptada (folículos diâmetro ≤ 8 mm) (média±EPM).....	40
Tabela 3 -	Número de células da granulosa recuperadas <i>in vivo</i> a partir de folículos de diferentes diâmetros (média±EPM).....	42
Tabela 4 -	Número de amostras de fluido folicular perdidas devido a contaminação por sangue ou quantidade insuficiente de células da granulosa (< 100 mil).....	43

CAPÍTULO III

Tabela 1 -	Sequência dos <i>primers</i> específicos utilizados para o estudo de expressão gênica em células da granulosa bovinos, temperaturas de ligação, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no GenBank e/ou referência bibliográfica.....	49
------------	--	----

Tabela 2 -	Concentração de estradiol (E2) e progesterona (P4) no fluido folicular de folículos de diferentes tamanhos na raça Holandesa e Gir (média±EPM).....	53
------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 -	A , Um dos quadros mostrando a região do antro folicular (em preto). B , No programa de computador específico (Mimics 8.13) a região do antro folicular foi selecionada (verde). C , Após a seleção ser realizada em todos os quadros, o modelo tridimensional foi gerado e o volume do folículo pode então ser calculado.....	28
Figura 2 -	Processamento das imagens ultrassonográficas para a modelagem tridimensional. A , Folículo dominante (D6) com presença de vascularização detectável pela ultrassonografia com Doppler colorido na parede. B , Mesma imagem após o processamento no Adobe Photoshop 5.5 mostrando que a região da vascularização da parede folicular foi pintada de branco. C , No programa de computador (Mimics 8.13), a região do antro folicular (verde) e a vascularização folicular (vermelho) foram selecionados em cada quadro para posterior modelagem tridimensional. D , Modelo tridimensional do folículo dominante mostrando a região do antro folicular (verde) e a presença de fluxo sanguíneo detectado pelo aparelho de ultrassonografia na parede folicular (vermelho).....	29
Figura 3 -	Crescimento progressivo ($P<0,05$) do volume da vascularização folicular ao longo do desenvolvimento do folículo dominante nas novilhas Holandesas e Gir calculado com auxílio da modelagem tridimensional.....	30
Figura 4 -	Modelo tridimensional de um folículo dominante (9,7 mm de diâmetro) gerado a partir de imagens ultrassonográficas. O fluxo detectado pelo aparelho de ultrassonografia está presente na região basal e lateral do folículo, indicando assim a presença de um fluxo sanguíneo mais intenso nestas regiões.....	31

CAPÍTULO II

Figura 1 -	Esquema do ensaio <i>in vitro</i> de aspiração de plasma sanguíneo para determinação da perda de volume causada pelo circuito de teflon. 1 , Tubo de 1,5 mL; 2 , Agulha de 20G; 3 , Circuito de Teflon; 4 , Tubo de 1,5 mL para recuperação das amostras após a aspiração.....	37
Figura 2 -	Ilustração do sistema adaptado de aspiração folicular. Uma palheta de sêmen de 0,25 mL (4) foi colocada entre o circuito de Teflon (2) e a agulha (6); um pequeno tubo de silicone (3) foi utilizado para manter unidos a palheta de sêmen e o circuito de Teflon, além de selar o circuito e permitir a formação da pressão negativa durante a aspiração. Quando o folículo tinha 8 mm de diâmetro, uma segunda palheta de sêmen era adicionada entre a primeira palheta (4) e a agulha (6). O tampão de algodão da segunda palheta era removido e outro tubo de silicone era utilizado para manter as duas palhetas de sêmen unidas. 1 , Guia da agulha; 2 , Circuito de Teflon; 3 , Tubo de silicone; 4 , Palheta de sêmen (0,25 mL); 5 , Adaptador da agulha; 6 , Agulha 20G.....	38
Figura 3 -	Volume esperado* (●) e volume recuperado (○) de fluido folicular a partir de folículos de diferentes diâmetros aspirados <i>in vivo</i> utilizando o sistema convencional de aspiração folicular (folículo com diâmetro > 8 mm) e o sistema adaptado (folículos diâmetro ≤ 8 mm). $y=0,008x^2-0,05x+0,014$; $r^2=0,72$. * Volume calculado pela fórmula $(4/3\pi r^3)$, onde $\pi=3,1416$ e r é a metade do diâmetro folicular.....	41
Figura 4 -	Eletroforese em gel de agarose (2%) demonstrando a identificação do mRNA dos genes endógenos GAPDH (peso molecular: 237pb) e β -ACTINA (peso molecular: 224pb) nas amostras de CG. MPM, Marcador de peso molecular; pb, pares de bases.....	42

CAPÍTULO III

- Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose (2%) demonstrando a identificação do mRNA dos genes IGF-1r (peso molecular: 179pb), P450arom (peso molecular: 300pb), FSHr (peso molecular: 104pb), INHA (peso molecular: 83pb) e CYP17A1 (peso molecular: 329pb). MPM, Marcador de peso molecular (50pb); pb, pares de bases..... 50
- Figura 2 - Concentração intrafolicular de estradiol (E2) em função categoria folicular nas raças Holandesa (HPB) e Gir..... 51
- Figura 3 - Concentração intrafolicular de estradiol nas raças Holandesa e Gir em função do diâmetro folicular ($y=31,9x^2-392,8x+1257,7$; $r^2=0,86$ e $y=7,1x^2-48,7+88,8$; $r^2=0,231$ para Holandesa e Gir respectivamente)..... 52
- Figura 4 - Expressão relativa do gene P450arom nas células da granulosa coletada nas diferentes categorias foliculares de novilhas Holandesa e Gir. Na raça Holandesa o grupo controle foi formado pelos folículos da categoria de 8 mm, e na raça Gir pelos folículos da categoria de 6 mm. Dentro de cada raça, o asterisco indica uma diferença significativa na expressão relativa do gene P450arom entre as demais categorias e o grupo controle..... 53
- Figura 5 - Expressão relativa dos genes P450arom, FSHr, INHA e IGF-1r nas células da granulosa coletada nas diferentes categorias foliculares de novilhas Holandesas e Gir. O grupo controle foi formado pelos folículos da categoria de 8 mm na raça Holandesa. Na raça Gir, o grupo controle foi formado pelos folículos da categoria de 6 mm. Dentro de cada raça, o asterisco indica uma diferença significativa na expressão relativa do gene entre as demais categorias e o grupo controle..... 55

1. INTRODUÇÃO GERAL

A compreensão da fisiologia ovariana é fundamental para o desenvolvimento e sucesso das biotecnologias aplicadas a reprodução animal, como por exemplo, a inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Para isso, inúmeras tecnologias e metodologias estão sendo utilizadas e desenvolvidas.

Durante a fase antral, o crescimento folicular é controlado por uma série de fatores endócrinos (FSH, LH e esteroides) e locais (p.ex., IGI-I e II, inibina, ativina, folistatina) que vão estimular ou inibir a atividade dos diferentes componentes celulares (célula da granulosa e da teca) que formam o folículo ovariano (Salustri et al., 2004). As células da granulosa, em conjunto com as células da teca, são responsáveis pela síntese do estradiol, um esteroide importante para o crescimento folicular (Fortune et al., 2004). Além disso, a comunicação por meio de sinais parácrinos entre as células da granulosa e o oócito é importante para o desenvolvimento de um ambiente intrafolicular favorável para o desenvolvimento do gameta feminino (Eppig, 2001). Dentro deste contexto, as células da granulosa tornam-se um importante componente celular para o desenvolvimento folicular. O estudo das células da granulosa utilizando as técnicas de biologia molecular, em especial a análise de expressão gênica, permitiu significativos avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos no crescimento dos folículos ovarianos (Bonnet et al., 2008). Contudo, as células da granulosa utilizadas nas pesquisas são obtidas a partir de ovários de matadouro; nesse caso, a fisiologia reprodutiva da doadora é desconhecida, limitando a interpretação dos resultados (Doyle et al., 2010). A utilização de células da granulosa obtidas *in vivo* já vem sendo utilizada, contudo a coleta ainda é restrita aos folículos com diâmetros maiores (Lavon et al., 2011).

A formação de um plexo vascular funcional na parede do folículo ovariano também é fundamental para o seu desenvolvimento. A vascularização folicular apresenta influência direta sobre a composição do fluido folicular (Sutton et al., 2003; Rodgers e Irving-Rodgers, 2010a) e está associado aos eventos que vão resultar na seleção do folículo dominante (Acosta, 2007). A ultrassonografia com Doppler colorido está cada vez mais presente na Medicina Veterinária, e sua aplicação para o estudo da fisiologia ovariana vem sendo avaliada em inúmeros estudos (Acosta et al., 2004; Acosta et al., 2005; Miyamoto et al., 2006). Dentro destes estudos, foi demonstrada a associação entre o grau de vascularização folicular e o estabelecimento da

gestação em vacas (Sidiqqi et al., 2009a) e da qualidade do oócito utilizado para PIVE (Chui et al., 1997; Sidiqqi et al., 2009b). Contudo, observa-se que essa avaliação foi realizada subjetivamente. Metodologias quantitativas foram propostas com base na mensuração da área de sinais coloridos observados na parede folicular (Rauch et al., 2008). No entanto, como o vaso sanguíneo é uma estrutura tubular, dependendo da posição do transdutor em relação ao ovário, a área de vascularização pode sofrer grandes variações. Além disso, as características morfológicas dos vasos sanguíneos não são uniformes ao longo da parede folicular (Jiang et al., 2002), assim a imagem utilizada para mensuração da área de vascularização pode não ser representativa.

O presente estudo teve como objetivo: (1) desenvolver uma metodologia de coleta *in vivo* de células da granulosa e fluido folicular de folículos pequenos para análise de expressão gênica e dosagens hormonais; (2) desenvolver uma metodologia para avaliar *in vivo* e de forma quantitativa a vascularização do folículo ovariano; e (3) caracterizar *in vivo* a dinâmica vascular e o progresso da esteroidogênese folicular nas diferentes fases do desenvolvimento do folículo em duas raças diferentes de bovinos (Gir e Holandês).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FOLÍCULO OVARIANO

2.1.1 O folículo como unidade funcional do ovário

Os folículos constituem uma das unidades funcionais do ovário. Além de envolverem o gameta (oócito), as células que compõem o folículo (granulosa e teca) são responsáveis pela produção dos esteroides (p.ex., estradiol e progesterona) importantes para o desenvolvimento do próprio folículo e do oócito, das características sexuais primárias e secundárias, comportamento sexual e para o estabelecimento e manutenção da gestação.

A síntese dos esteroides nas células foliculares segue o modelo “duas células-dois hormônios” previamente descrito (Fortune e Quirk, 1988). Resumidamente, durante o crescimento do folículo, a primeira etapa ocorre nas células da teca, onde o colesterol é transformado em pregnenolona pela ação da enzima P450_{scc}. Posteriormente, a pregnenolona é convertida em andrôgenos pela ação da enzima P450_{c17}, que são transportados para as células da granulosa onde são convertidos a estradiol por meio da ação da enzima P450_{arom}. Após a ovulação, a expressão da enzima P450_{scc} aumenta nas células da teca e começa a se expressar

nas células da granulosa. Assim os dois tipos celulares passam a produzir pregnenolona. Ao mesmo tempo elas passam a expressar também a enzima 3β -HSD, responsável pela conversão da dehidroepiandrosterona em androstenediona e também pregnenolona em progesterona.

2.1.2 Estrutura do folículo ovariano

Os folículos ovarianos são formados ainda no período fetal (em bovinos, aproximadamente no 130º dia da gestação – Figueiredo et al., 2002) e estão localizados na região cortical do ovário. Ao longo do desenvolvimento e crescimento dos folículos, quatro tipos foliculares podem ser observados. Os **folículos primordiais** constituem a forma mais imatura, onde se observa apenas o oócito imaturo circundado por uma única camada de 5 a 14 células da granulosa achatadas (Fair et al., 1997). Ao nascimento, as bezerras apresentam aproximadamente entre 150 e 230 mil folículos primordiais no ovário (Betteridge et al., 1989; Webb et al., 1992) que permanecem quiescentes até o momento em que são ativados e iniciam seu crescimento.

Uma vez ativados, os folículos primordiais começam a crescer, o oócito também começa a aumentar seu tamanho, as células da granulosa começam a se multiplicar (8 a 20 células) e passam a ter um formato cuboide, formando os **folículos primários** (Fair et al., 1997). As células da granulosa continuam a se multiplicar e mais de uma camada passa a envolver o oócito, formando assim o **folículo secundário**. Nessa fase, exteriormente à membrana basal tem início a formação de uma nova camada de células denominada teca, e ao redor do oócito inicia-se a formação da zona pelúcida (Fair et al., 1997; Salustri et al., 2004). Na sequência do desenvolvimento, ocorre intensa proliferação das células da granulosa e da teca e tem início a formação do antro folicular, uma cavidade central preenchida pelo fluido folicular, caracterizando assim o início da fase antral. O folículo passa a ser classificado como **folículo terciário** e continua seu crescimento até o momento da ovulação ou até entrar em regressão, dependendo da fase do ciclo reprodutivo. No folículo terciário, separando o antro folicular e o estroma ovariano, três camadas celulares podem ser observadas, de fora para dentro, a saber: a camada de células da teca (externa e interna) e a camada de células da granulosa (Senger, 2003). As células da granulosa estão apoiadas na membrana basal (Edwards, 1974; Fair et al., 1997). Uma rede bem desenvolvida de capilares sanguíneos é observada na camada de células da teca. A camada de células da granulosa é avascular, recebendo os nutrientes e demais substâncias por difusão passiva (Robinson et al., 2009).

2.1.2.1 Camada de células da granulosa

Após sua ativação, os folículos primordiais iniciam seu crescimento e as células da granulosa começam a se multiplicar e passam a ter formato cuboide. A multiplicação das células da granulosa continua durante todo o desenvolvimento folicular. Com 18 mm de diâmetro, o número de células dobrou 21 vezes, chegando a aproximadamente 40 milhões de células (van Wezel e Rodgers, 1996). As células da granulosa se acomodam em inúmeras camadas sobre a membrana basal, formando a chamada “camada de células da granulosa”, também referenciada como “membrana granulosa” ou “epitélio folicular”. Este tipo celular desempenha papel muito importante durante o crescimento folicular. Além de sintetizarem o estradiol, as células da granulosa se comunicam com o oócito e as células da teca por meio de sinais parácrinos que vão regular o desenvolvimento e o crescimento do folículo (Eppig, 2001; Gilchrist et al., 2008).

Durante a fase de crescimento antral do folículo, as células da granulosa adquirem propriedades morfológicas e funcionais distintas dependendo de sua localização no folículo ovariano (Zlotkin et al., 1986), recebendo então denominações distintas. As células do *cumulus* são aquelas que circundam o oócito, formando o chamado complexo *cumulus*-oócito. As células presentes na parede folicular são denominadas células murais, podendo ainda ser divididas em células basais (mais próximas da membrana basal) ou antrais (mais próximas da região do antro folicular) (Rodgers et al., 1999). Durante o crescimento folicular, diferenças funcionais entre estes dois tipos celulares são observados. As células da granulosa basais param de se multiplicar, se alongam, sintetizam enzimas envolvidas na produção do estradiol e adquirem receptores para o hormônio luteinizante (LH). Por outro lado, as células da granulosa antrais permanecem poliédricas, continuam a se multiplicar, apresentam uma capacidade esteroideogênica limitada e adquirem uma menor quantidade de receptores para LH (Salustri et al., 2004). As células da granulosa antrais e do *cumulus* apresentam uma maior quantidade de RNA para fator semelhante à insulina (IGF, Oliver et al., 1989), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, Dissen et al., 1994) e hormônio anti-Mulleriano (AMH, Ueno, et al., 1989), enquanto que as células da granulosa basais possuem uma maior quantidade de RNA para Kit ligand (KL, Manova et al., 1993).

O folículo primordial, antes envolvido por apenas uma única camada de células da granulosa, passa a ser envolvido por inúmeras camadas quando chega à fase antral. Contudo, o número de camadas de células da granulosa não é uniforme quando se

compara folículos com o mesmo diâmetro (McNatty et al., 1979; van Wezel et al., 1999). Esta observação sugere que as taxas de multiplicação destas células e de crescimento do folículo (expansão do antro folicular) não ocorrem de forma coordenada (Rodgers et al., 1999), uma vez que os folículos ovarianos na espécie bovina apresentam diferentes taxas de crescimento (Fortune et al., 1991; Ginther et al., 1996). Caso a taxa de crescimento do folículo seja maior do que a taxa de multiplicação das células da granulosa, as células terão mais espaço para a acomodação e, de forma que, o número de camadas será menor, sendo as camadas mais compactas. Por outro lado, se a taxa de crescimento do folículo for menor, as células terão menor espaço para a acomodação, causando aumento do número de camadas que, além disso, serão menos compactas (Rodgers et al., 2001; Rodgers e Irving-Rodgers, 2010a).

2.1.2.2 Antro folicular

Ao longo do desenvolvimento do folículo secundário, múltiplos focos de acúmulos de fluido começam a ser observados entre as células da granulosa. Esses focos continuam a crescer e coalescem, formando assim uma cavidade central preenchida pelo fluido folicular (Rodgers e Irving-Rodgers., 2010b). O antro folicular, em bovinos e humanos, responde por até 95% do volume folicular (Rodgers et al., 2001). Além da importância do fluido folicular para o transporte e desenvolvimento do gameta, sugere-se que a formação do antro seja importante para manter as células da granulosa mais próximas dos vasos sanguíneos localizados na camada de células da teca. Caso não houvesse a formação do antro, à medida que as células da granulosa se multiplicassem, as camadas de células mais internas ficariam mais afastadas da vascularização, comprometendo assim seu suprimento de nutrientes (Rodgers et al., 2001).

Inicialmente, o fluido folicular é formado a partir de secreções das células da granulosa (Edwards, 1974). Contudo, à medida que o folículo se desenvolve e a vascularização na camada de células da teca cresce, o fluido folicular também passa a receber componentes provenientes da corrente sanguínea (Edwards, 1974; Rodgers e Irving-Rodgers., 2010b). O fluido folicular apresenta componentes inorgânicos como, íons e gases, e componentes orgânicos como carboidratos (principalmente a glicose), mucopolissacarídeos, lipídeos, proteínas e os hormônios esteroides. Portanto, observa-se a importância do fluido folicular para os diversos eventos fisiológicos que acontecem durante o desenvolvimento do folículo (Edwards, 1974) e do oócito (Sutton et al., 2003). Adicionalmente, o fluido folicular é importante no transporte do

gameta para a tuba uterina durante o processo de ovulação. Alterações na composição do fluido alteram sua viscosidade, podendo comprometer o sucesso do transporte do oócito durante a ovulação (Luck et al., 2000). Assim, o fluido folicular reflete atividade bioquímica e endócrina do folículo ovariano, sendo, portanto, um importante parâmetro na avaliação no desenvolvimento e crescimento folicular (Edwards, 1974).

2.2 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

O desenvolvimento folicular pode ser dividido em duas grandes fases: a fase pré-antral e a fase antral. Na fase pré-antral, do momento da ativação do folículo primordial até o início da fase antral (aproximadamente 4 mm de diâmetro), tem sido demonstrado a presença de receptores de FSH (FSHr) nas células da granulosa em folículos pré-antrais (Xu et al., 1995). Entretanto, nesta fase, o crescimento folicular independe das gonadotropinas hipofisárias (FSH e LH), sendo controlado por uma gama de fatores locais sintetizados e secretados pelas células foliculares (granulosa e teca) e pelo oócito (revisado por Webb et al., 2004).

Já na fase antral, quando os folículos apresentam em torno de 4 mm de diâmetro, uma elevação na concentração circulante de FSH promove o crescimento de um grupo de folículos (recrutamento). Durante o crescimento, os folículos passam a sintetizar quantidades crescentes de estradiol. O estradiol age na hipófise diminuindo a secreção do FSH, reduzindo assim a concentração circulante desse hormônio. Nesse momento, quando ocorre a seleção do folículo dominante, um dos folículos do grupo adquirem receptores para LH, de forma a reduzir sua dependência do FSH. Os outros folículos, agora denominados subordinados, entram em regressão. Quando o folículo dominante se forma na presença de um corpo lúteo (CL) ativo, a progesterona sintetizada e liberada pelo CL diminui a pulsatilidade do LH e o folículo dominante entra em regressão, proporcionando o aparecimento de um novo grupo de folículos recém-recrutados. Caso o CL entre em regressão, causando uma redução na concentração plasmática de progesterona, o folículo dominante continua seu desenvolvimento até o momento da ovulação (revisado por Lucy et al., 1992; Adams e Pierson, 1995; Webb et al., 1998; Adams et al., 2008).

2.2.1 Fatores envolvidos no controle do desenvolvimento do folicular

A ativação do crescimento dos folículos primordiais é um mecanismo complexo que envolve sinais estimulatórios e inibitórios gerados localmente por diferentes componentes celulares ovarianos (Salustri

et al., 2004). Pesquisas em animais de laboratório evidenciaram a ação do *Kit-ligand*, sintetizado nas células da granulosa, sobre o oócito, ativando o início de seu crescimento (Klinger et al, 2002; Webb et al., 2004). Oócitos isolados de ovários pré-natais cultivados *in vitro*, sem as células da granulosa, tiveram seu crescimento ativado após o tratamento com *Kit-ligand* (Yoshida et al., 1997), assim como o bloqueio do receptor (c-Kit) no oócito impediu o crescimento do mesmo (Packer et al., 1994). Outros fatores como, por exemplo, o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), fator de crescimento do nervo (NGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e a família do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) também estão envolvidos na ativação do folículo primordial. Os folículos primordiais crescem de forma bem lenta até fase de folículo secundário. Em bovinos, o intervalo de tempo da ativação do folículo primordial até o início da fase antral é de aproximadamente 90 dias (Webb et al., 2004), em ovinos esse tempo foi estimado em 130 dias (Viñoles, 2003).

A segunda fase (fase antral) é caracterizada pela formação do antro folicular, e nessa fase os folículos passam a ser progressivamente responsivos às gonadotrofinas. Em um primeiro momento, a taxa de crescimento destes folículos é baixa até atingirem aproximadamente 1 mm de diâmetro. Posteriormente, a taxa de crescimento dos folículos aumenta até que estes atinjam o diâmetro ovulatório (Viñoles, 2003). Em diversas espécies é possível monitorar essa fase de crescimento acelerado com auxílio da ultrassonografia, quando três momentos distintos podem ser observados: recrutamento, seleção e dominância (revisado por Fortune, 1994; Adams et al., 2008). No recrutamento, um grupo de folículos é mobilizado e progride seu crescimento em resposta ao estímulo do FSH. Na seleção, dependendo da taxa de ovulação espécie-específica, o crescimento de um ou mais folículos diverge(m) dos demais folículos da mesma onda e se estabelece(m) como dominante(s). Uma vez estabelecida a dominância, os folículos subordinados interrompem o crescimento e, posteriormente, entram em regressão. Dependendo da fase do ciclo estral, o folículo dominante pode ovular ou também entrar em regressão.

O crescimento folicular durante a fase antral é controlado por ações coordenadas de um complexo mecanismo onde estão envolvidos fatores endócrinos (gonadotrofinas hipofisárias e esteroides) e locais (p.ex., IGF, inibina, ativina, folistatina). O hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) são as

gonadotrofinas hipofisárias cujas ações sobre as células da granulosa e da teca estão associadas ao crescimento folicular. O FSH é mais importante durante a fase inicial do crescimento, enquanto que o LH torna-se mais importante durante a fase final do desenvolvimento, maturação folicular e ovulação (Bao e Garverick, 1998). Durante a fase de recrutamento, o FSH estimula a expressão de RNAm das enzimas P450scc e P450aromatase nas células da granulosa, responsáveis respectivamente pela transformação do colesterol em pregnenolona e dos andrógenos em estradiol (Xu et al, 1995; Bao et al., 1997a).

A fase de seleção é caracterizada pelo início da expressão de receptores para LH (LHr) e níveis maiores de RNAm das enzimas P450scc e P450arom nas células da granulosa do folículo dominante (Bao et al., 1997a, Mihn et al., 2006). Nas células da teca, é observado a elevação na quantidade de RNAm para p450c17, 3 β -HSD e StAR (Bao et al, 1997b). O rápido aumento nas concentrações de estradiol no fluido folicular é considerado uma característica chave do folículo dominante (Fortune et al., 2004). O estradiol tem ação mitogênica e aumenta a sensibilidade das células da granulosa ao estímulo do FSH, e estimula a expressão de receptores para LH (Richards et al., 1987). A expressão do LHr ocorre sob o estímulo do FSH, sendo potencializado pela ação do estradiol (Richards et al., 1987). Todas essas alterações acontecem na fase de desenvolvimento onde as concentrações plasmáticas de FSH estão diminuindo (Ginther et al., 1996). Assim o folículo selecionado como dominante será aquele que desenvolver primeiro a condição de responder aos estímulos tanto do FSH quanto do LH (Bao et al., 1998; Mihn et al., 2006). Após o estabelecimento da dominância, a expressão de RNAm para os receptores das gonadotrofinas e das enzimas esteroidogênicas continua aumentando, permitindo que o folículo dominante continue seu desenvolvimento (Bao et al., 1997a). Caso o animal esteja na fase de diestro, caracterizado por elevadas concentrações de progesterona, o folículo dominante entra em regressão devido à redução da pulsatilidade de LH (Sirois e Fortune, 1990). Observa-se então uma acentuada redução da quantidade de RNAm dos receptores de gonadotrofina e das enzimas esteroidogênicas, assim como da concentração de esteroides no FF (Bao et al., 1997a).

O IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) é um dos fatores ovarianos locais envolvidos no desenvolvimento folicular, principalmente na fase de seleção. O sistema IGF ovariano é composto por dois ligantes (IGF-I e II), dois receptores (tipo 1 e 2), seis proteínas ligadoras (IGFBP-1 a 6) e uma IGFBP protease. O IGF potencializa a ação do FSH,

que estimula a síntese de estradiol pelos folículos. As IGFBP apresentam ação inibitória sobre a molécula de IGF, impedindo sua ligação nos receptores. A PAPP-A (proteína plasmática-A associada à gestação) é responsável pela clivagem da IGFBP, permitindo que o IGF livre se ligue ao seu receptor (Fortune et al., 2004). Uma associação entre os níveis de IGF livre no FF e a dominância folicular foi observada em estudo anterior (Ginther et al., 2004). Contudo, a correlação entre as concentrações intrafoliculares de estradiol e IGF total (IGF livre e ligada a IGFBP) não foi observada, demonstrando que para o desenvolvimento folicular, a biodisponibilidade de IGF no fluido folicular é mais importante do que a própria concentração do IGF (Fortune et al., 2004). Corroborando com estes resultados, a expressão de RNAm para IGFBP-2 foi praticamente indetectável nos folículos dominantes, enquanto que nos subordinados os níveis de expressão estavam elevados (Yuan et al., 1998).

A ativina, inibina e a folistatina fazem parte da família TGF- β (*Transforming Growing Factor- β*) e também estão envolvidas no controle do desenvolvimento folicular (Knight e Glister, 2006). A ativina é um dímero composto por duas subunidades- β (β A e β B), que podem ser ordenadas de modo a formarem três formas ativas do dímero: ativina A (β A β A), ativina B (β B β B) e ativina AB (β A β B). A inibina é um heterodímero, formado pela subunidade - β da ativina associada a uma subunidade- α , dando origem assim a duas formas: inibina A (α β A) e inibina B (α β B) (Stacey et al., 2004). Inicialmente, a ativina e a inibina foram identificadas como hormônios não esteroides de efeitos antagônicos que atuam no controle da síntese e secreção do FSH pela hipófise (Carrol et al., 1989; Weiss et al., 1993). Além desse efeito endócrino na hipófise, a ativina e a inibina possuem ação parácrina nas células foliculares (granulosa e teca) onde modulam o crescimento folicular e a esteroidogênese (Knight e Glister, 2003).

As subunidades- β que compõe a ativina são sintetizadas em inúmeros tecidos, incluindo a hipófise, placenta, tecido nervoso, tecido mamário e ovário (Stacey et al., 2004). Na hipófise, a ativina estimula a produção de FSH pelos gonadotrofos hipofisários (Bilezikjian et al., 2001). A ativina atua em conjunto com o GnRH, sendo um mediador da ação do GnRH sobre a produção de FSH na hipófise (Weiss et al., 1992). Além disso, a ativina estimula a síntese da subunidade- β do FSH (Carrol et al., 1989). Nas células da granulosa de camundongos e bovinos, a ativina potencializa o efeito estimulador do FSH sobre a atividade da enzima aromatase (Miró et al., 1992; Shukovski et al., 1991). Esse sinergismo é consequência do aumento na expressão

de receptores de FSH nas células da granulosa determinado pela ativina (Nakamura et al., 1993). A folistatina é uma proteína sintetizada nos mesmo tecidos capazes de produzir a ativina, sendo responsável pela regulação das ações parácrinas e autócrinas da ativina (Stacey et al., 2004). A folistatina possui uma alta afinidade de ligação à ativina, e essa ligação inibe a atividade da ativina e inicia seu processo de degradação. Embora com menor afinidade, a folistatina também tem capacidade de se ligar a inibina, contudo sem comprometer sua atividade (Knight e Glister, 2003).

A inibina como o próprio nome indica, apresenta efeito inibitório sobre síntese e liberação de FSH mediada pela ativina (Stacey et al., 2004). Estudos anteriores mostraram que a imunização contra a inibina aumentou a resposta ovariana quando os animais imunizados foram submetidos a protocolos de superovulação com FSH (Takedomi et al., 2005; Mei et al., 2009). Na fase final do desenvolvimento folicular, a inibina estimula a produção de andrógenos mediada pelo LH nas células da teca, fornecendo para as células da granulosa quantidade suficiente de precursor para a manutenção da síntese de estradiol, e consequentemente, do desenvolvimento folicular (Campbell e Baird, 2001). Ao demonstrarem o efeito regulador da inibina dentro do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, Bleach et al. (2001) observaram que as concentrações plasmáticas de inibina A aumentaram paralelamente ao crescimento do folículo dominante, sendo também observada uma correlação negativa entre a concentração plasmática de inibina A e a de FSH. Uma correlação positiva entre a concentração plasmática de inibina A e a de estradiol também foi evidenciada.

As células da granulosa apresentam a capacidade de sintetizar ativina, inibina e folistatina desde a fase inicial de seu crescimento (Knight e Glister, 2003). A concentração destas três proteínas é importante durante o processo de seleção do folículo dominante (Hiller, 1991). Um estudo com ovários bovinos obtidos em matadouro demonstrou uma correlação positiva entre as concentrações intrafoliculares de inibina A e ativina A e o diâmetro folicular (Knight e Glister, 2003). Também em bovinos, um estudo mais recente demonstrou um aumento de 30 e seis vezes nas concentrações intrafoliculares de ativina A e inibina A, respectivamente, quando o folículo cresceu de 2 para 6 mm de diâmetro (Glister et al., 2006). Entretanto, foi observada em outro estudo uma redução na expressão do gene para inibina A ao longo do crescimento folicular (Minh et al., 2006), nos folículos com 6 a 20 mm de diâmetro a concentração de inibina A permaneceu elevada, enquanto que a concentração de ativina A reduziu três vezes (Glister et al., 2006). Paralelamente, foi

observado um aumento na concentração de estradiol no fluido folicular a partir de 6 mm de diâmetro. As concentrações de folistatina se mantiveram constantes nos folículos de 2 a 10 mm de diâmetro, reduzindo pela metade quando atingiu 20 mm (Glister et al., 2006). Esses dados demonstraram que somente após o folículo atingir 6 mm de diâmetro, a quantidade de ativina A produzida foi suficiente para saturar a quantidade de folistatina presente no fluido folicular, permitindo assim o aumento na concentração de estradiol.

2.3 VASCULARIZAÇÃO FOLICULAR

O complexo vascular ovariano, a cada ciclo estral, sofre contínuo processo de remodelamento, permitindo que os folículos ovarianos e o corpo lúteo recebam nutrientes, oxigênio, hormônios e fatores de crescimento necessários para o seu desenvolvimento. Além disso, a presença dos vasos sanguíneos permite que os esteroides sintetizados pelas estruturas ovarianas sejam conduzidos para os demais sistemas que compõem o organismo.

Os folículos primordiais e os folículos primários não apresentam suprimento vascular próprio (Stouffer et al., 2001). Nessa fase do desenvolvimento, os nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento chegam em quantidade suficientes até os folículos por difusão passiva a partir dos vasos sanguíneos presentes no estroma ovariano (Robinson et al., 2009). O desenvolvimento folicular a partir dessa fase requer a formação de um plexo vascular ao redor de cada folículo em crescimento. À medida que o folículo primário se desenvolve, um fino complexo vascular composto por arteríolas e vênulas começa a se formar na camada de células da teca (Robinson et al., 2009). Um intenso crescimento e remodelamento desse complexo vascular acompanha o desenvolvimento folicular (Machirelli et al., 2007). Já na fase de dominância, uma densa rede vascular pode ser observada na camada de células da teca. O plexo vascular ao redor do folículo dominante é formado por duas redes concêntricas de capilares localizadas na camada de células da teca interna e externa que se comunicam por meio de anastomoses (Tamanini et al., 2004; Martelli et al., 2009). Os vasos sanguíneos presentes na camada de células da teca formam pequenos vasos na região basal do folículo e, posteriormente, se comunicam com os vasos presentes no estroma ovariano (revisado por Hazzard e Stouffer, 2000). Durante toda a foliculogênese, os capilares não penetram na membrana basal do folículo, ficando a vascularização folicular restrita à camada de células da teca. A camada de células da granulosa permanece avascular e recebe os nutrientes,

oxigênio e fatores de crescimento por meio de difusão passiva.

A angiogênese observada na camada de células da teca durante o crescimento do folículo ovariano é regulada por inúmeros fatores locais sintetizados e secretados pelas células da granulosa e células da teca. Dentre os fatores angiogênicos envolvidos na regulação da formação do plexo vascular folicular estão: o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente estimulador da proliferação endotelial (Ferrara et al., 2003); o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), que estimula a proliferação e migração endotelial (Presta et al., 2005) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que estimula o recrutamento dos pericitos (Fredricksson et al., 2004).

A formação da vascularização folicular tem início ainda na fase pré-antral, juntamente com a formação da camada de células da teca. Durante o desenvolvimento da camada de células da teca, aproximadamente 40% das células em multiplicação são de origem endotelial. Além disso, o aumento paralelo da expressão de mRNA para VEGF pode ser observado tanto nas células da teca quanto nas células da granulosa (Martelli et al., 2009). Entretanto, o estímulo para o início na angiogênese no folículo primordial ainda permanece desconhecido. O fator induzido pela hipóxia 1α (HIF1A) é um indutor de VEGF, no entanto ele não foi identificado nos folículos pré-antrais (Duncan et al., 2008). Estudos indicam a participação do oócito nesse estímulo inicial, uma vez que os fatores FGF-2 e PDGF foram identificados no oócito de folículos primordiais e primários (van Wezel et al., 1995; Nilsson et al., 2006). À medida que o folículo cresce, observa-se o aumento significativo na expressão de mRNA para VEGF e FGF nas células da teca e granulosa, e também na concentração intrafolicular da proteína VEGF (Berisha et al., 2000). Outro estudo demonstrou que em folículos ativos (E2:P4 > 1), a concentração de estradiol e VEGF foi maior do que nos folículos inativos. Adicionalmente, uma maior expressão dos fatores angiogênicos VEGF foi observada nas células da teca dos folículos ativos (Grazul-Bilska et al., 2007). A degeneração dessa vascularização é um dos primeiros indícios de regressão folicular (Tamanini et al., 2004). Em ovinos, o início da regressão folicular foi acompanhada pela redução na quantidade de mRNA para VEGF (Rosales-Torres et al., 2010).

Extensas revisões sobre a angiogênese ovariana reportaram estudos do início do século XIX, quando o desenvolvimento da vascularização ovariana foi avaliado da idade fetal até a idade adulta, permitindo uma melhor compreensão sobre a arquitetura

vascular nas diversas estruturas ovarianas (Redmer e Reynolds, 1996; Hazzard e Stouffer, 2000). Nesses estudos, a importância da vascularização para o crescimento folicular já havia sido relatada. Estudos mais recentes, utilizando tecnologias mais avançadas, incluindo marcadores moleculares e utilização sistemática da ultrassonografia com Doppler colorido, ratificaram essas observações realizadas há mais de 100 anos. A expansão da vascularização folicular coincide com o seu crescimento, de forma a sugerir que a seleção do folículo dominante esteja associada à formação de um plexo vascular maior (Grazul-Bliska et al., 2007). A vascularização folicular está positivamente associada à concentração de estradiol no fluido folicular, indicando que o suprimento sanguíneo para o folículo é importante para os eventos fisiológicos que irão determinar a seleção do folículo dominante (Acosta, 2007). Em equinos, os folículos que se tornaram dominantes já apresentavam, antes mesmo da divergência, um fluxo sanguíneo mais intenso na parede folicular quando comparados aos folículos subordinados (Acosta et al., 2004). Em bovinos, antes da fase de divergência, a presença do fluxo sanguíneo foi observada no maior, no segundo maior e em alguns pequenos folículos. Contudo, após a fase de divergência, o fluxo sanguíneo foi detectado apenas nos maiores folículos, evidenciando a importância da vascularização para a manutenção do crescimento folicular (Acosta et al., 2005).

Além de permitir o desenvolvimento do folículo, a vascularização presente na camada de células da teca participa ativamente na composição do fluido folicular (Rodgers e Irving-Rodgers, 2010b; Sutton et al., 2003), passando a ter influência direta, desta forma, sobre o desenvolvimento do oócito. Em seres humanos, a avaliação da vascularização folicular foi utilizada como parâmetro preditivo do sucesso na FIV (Chui et al., 1997). Outro estudo demonstrou que o grupo de mulheres que receberam embriões oriundos de oócitos que se desenvolveram em folículos mais vascularizados teve maiores taxas de gestação (Vlaisavljevic et al., 2010). Em animais, a avaliação da vascularização folicular também está associada ao estabelecimento da gestação e ao sucesso das biotecnologias aplicadas à reprodução (Honnens et al., 2008; Siddiqui et al., 2009a, Siddiqui et al., 2009b).

2.4 ULTRASSONOGRAFIA NO ESTUDO DA FOLICULOGÊNESE

2.4.1 Uso da ultrassonografia para coleta de fluido folicular e células da granulosa

A foliculogênese ovariana é um complexo processo biológico, e sua avaliação torna-se complicada em

função de sua natureza dinâmica, além do envolvimento e interação de diferentes tipos celulares (Bonnet et al., 2008). O advento da ultrassonografia permitiu importantes avanços no sentido de elucidar os diferentes eventos reprodutivos dos animais domésticos, dentre eles a dinâmica folicular, sendo então considerada a inovação tecnológica mais significativa no campo de pesquisa em clínica reprodutiva (Ginther, 1986). Com o avanço observado no campo da biologia molecular, surgiram novas abordagens para o estudo dos sistemas biológicos, incluindo o ovário.

Nesse sentido, estudos sobre a foliculogênese estão sendo realizados avaliando o perfil de expressão gênica em todos os componentes celulares que compõe o folículo ovariano (Ndiaye et al., 2005; Minhn et al. 2006, Portela et al., 2008). Entretanto, o uso de técnicas moleculares no estudo da foliculogênese se depara com um importante fator limitante: a coleta e a quantidade de material biológico recuperado, o que torna o estudo individual de folículos muito mais difícil, em especial na fase antral inicial (Ndiaye et al., 2005; Agca et al., 2006). Por esta razão, a maioria dos estudos sobre foliculogênese utilizam amostras de fluido folicular e células foliculares (granulosa e/ou teca) obtidas de ovários de matadouro (Mingoti et al., 2002; Mihh et al., 2006; Matti et al., 2010). A utilização de material biológico oriundo de ovários coletados em matadouro limita a interpretação dos resultados, uma vez que há pouca ou nenhuma informação sobre a condição reprodutiva da doadora. Além disso, os efeitos ambientais sobre os animais doadores muitas vezes são desconhecidos.

O sistema de aspiração folicular guiada pela ultrassonografia, referenciada apenas como aspiração folicular, foi desenvolvido para a recuperação de complexo-*cumulus*-oócito (COC) destinados para produção *in vitro* de embriões (Pieterse et al., 1988). Durante o processo de aspiração folicular, além do COC, também se recupera o fluido folicular, onde é possível observar a presença de células da granulosa (Bossaert et al., 2010). Dessa forma, Ginther et al. (1997) utilizaram a técnica de aspiração folicular guiada por ultrassonografia para a coleta individual de fluido folicular. Nesse estudo, apenas um pequeno volume de fluido folicular foi aspirado (20µL), suficiente para as dosagens hormonais e para permitir que o folículo continuasse seu crescimento. No entanto, os autores não tentaram recuperar células da granulosa das amostras coletadas, provavelmente em função do pequeno volume aspirado. Em outro estudo mais recente, a técnica de aspiração folicular foi utilizada para obter *in vivo* amostras de fluido folicular e células da granulosa (Lavon et al., 2011). Diferentemente, nesse estudo apenas folículos

dominantes foram utilizados, e todo o volume do folículo foi aspirado, permitindo a recuperação de células da granulosa, no entanto impedindo a progressão do desenvolvimento folicular. Em virtude do extenso circuito de teflon, esse sistema não permite a aspiração e coleta individual de amostras a partir de folículos menores.. Resultados preliminares mostraram que a adaptação realizada no sistema de aspiração folicular com uma palheta de sêmen permitiu a coleta individual de amostras de fluido folicular e células da granulosa de folículos de 4 a 18 mm de diâmetro (Arashiro et al., 2012). Entretanto, a utilização deste material para posteriores análises ainda precisa ser avaliada.

2.4.2 Ultrassonografia com Doppler colorido

Como descrito anteriormente, a vascularização folicular é importante para a manutenção da função folicular e, conseqüentemente, para seu desenvolvimento e crescimento. A ultrassonografia com Doppler colorido permite que a vascularização folicular seja avaliada em tempo real durante toda a fase antral do desenvolvimento folicular. Sendo assim, ela se torna uma importante ferramenta auxiliar no estudo da foliculogênese. Contudo, sua utilização na avaliação da vascularização folicular apresenta algumas limitações. Como os vasos sanguíneos na parede folicular são muito pequenos e tortuosos, não há como determinar o ângulo de insonação (ângulo Doppler) entre os vasos e o feixe da onda sonora. Dessa forma, não é possível obter informações relativas a velocidade do fluxo sanguíneo. Alternativamente, a avaliação da vascularização folicular pode ser realizada utilizando-se metodologias qualitativas, onde se observa apenas a presença ou ausência dos sinais coloridos na parede folicular (Acosta et al., 2004). Outros estudos utilizaram metodologias subjetivas onde a vascularização folicular foi classificada, pela simples visualização das imagens, dentro uma escala de graduação previamente determinada (Chui et al, 1997; Silva et al., 2006). Metodologias subjetivas estão mais sujeitas a erros, sendo sua utilização muito difícil por outros grupos de pesquisa.

O cálculo da área de vascularização folicular (área da parede folicular ocupada por sinais coloridos) foi utilizado em outro estudo para avaliar de forma quantitativa a vascularização folicular. Nesse estudo, a área dos sinais coloridos em uma ou mais imagens ultrassonográficas bidimensionais foram calculados e a média utilizada como área de fluxo sanguíneo (Rauch et al., 2008). Entretanto, o uso dessa abordagem requer alguns cuidados. Inicialmente, o vaso sanguíneo é uma estrutura tubular, portanto, dependendo do posicionamento do transdutor em relação ao ovário, o vaso sanguíneo pode ser observado no monitor como uma faixa

(corte longitudinal) ou então como um simples ponto (corte transversal), e a área de vascularização calculada pela imagem bidimensional será muito diferente entre esses dois cortes.

Um segundo ponto que deve ser considerado quando se utiliza a área para avaliar a vascularização folicular é a falta de uniformidade da intensidade do fluxo na parede folicular. A densidade e a morfologia dos capilares sanguíneos presentes na parede folicular não são iguais em todas as regiões do folículo. A avaliação da microvascularização folicular com moldes de corrosão mostrou que a densidade e o diâmetro dos capilares sanguíneos são diferentes entre as regiões basal, lateral e apical do folículo ovariano (Jiang et al., 2002). Certamente, essas diferenças morfológicas vão refletir na intensidade do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, na imagem ultrassonográfica. Adicionalmente, foi observado que o fluxo sanguíneo no folículo pré-ovulatório é mais intenso na base e na região lateral (Brännström et al., 1998). Dessa maneira, a região do folículo utilizada para calcular a área de vascularização deve ser padronizada em todo o experimento.

A associação de algoritmos computacionais a ultrassonografia já vem sendo utilizada para a análise quantitativa da ecotextura das imagens, permitindo assim a avaliação mais objetiva dos resultados (Siqueira et al., 2009, Arashiro et al., 2010). Mais recentemente, a associação da ultrassonografia com algoritmos computacionais de reconstrução tridimensionais vem sendo testada como uma nova ferramenta na pesquisa em Reprodução Animal. Utilizando a tecnologia 3D associada à ultrassonografia, pesquisadores avaliaram o desenvolvimento fetal em equinos (Kotoyori et al., 2012) e a vascularização placentária em gestações de fetos bovinos clonados (Le C'lech et al., 2012). Em seres humanos, o efeito do tratamento com hCG sobre a hemodinâmica na região perifolicular foi avaliada em imagens tridimensionais geradas a partir de imagens ultrassonográficas (Vlaisavljevic et al., 2010). Nos exames ultrassonográficos convencionais em modo-B, a avaliação do órgão é realizada a partir da observação contínua de imagens bidimensionais, e uma reconstrução mental tridimensional por parte do técnico responsável (Singh et al., 2003). Com auxílio da tecnologia 3D, além da possibilidade de mensurações volumétricas, todo órgão ou tecido pode ser visualizado por inteiro em uma única imagem, permitindo sua avaliação a partir de diferentes ângulos e planos. Além disso, a arquitetura do órgão ou tecido, assim como sua relação anatômica com outras estruturas, pode ser observada com mais facilidade. A associação de algoritmos computacionais de reconstrução

tridimensional com a ultrassonografia com Doppler colorido para avaliar quantitativamente a vascularização folicular ainda não foi avaliada.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T. J.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicle in mares. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 637-642, 2004.

ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. *Journal of Reproduction and Development*, v. 51, n. 2, p. 273-280, 2005.

ACOSTA, T. J. Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. *Journal of Reproduction and Development*, v. 53, p. 39-44, 2007.

ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology*, v. 43, p. 113-120, 1995.

ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, v. 69, p. 72-80, 2008.

AGCA, C.; RIES, J. E.; KOLATH, S. J.; KIM, J. H.; FORRESTER, L. J.; ANTONIOU, E.; WHITWORTH, K. M.; MATHIALAGAN, N.; SPRINGER, G. K.; PRATHER, R. S.; LUCY, M. C. Luteinization of porcine preovulatory follicles leads to systematic changes in follicular gene expression. *Reproduction*, v. 132, p. 133-145, 2006.

ARASHIRO, E. K.; FONSECA, J. F.; SIQUEIRA, L. G. B.; FERNANDES, C. A.; BRANDAO, F. Z.; OBA, E.; VIANA, J. H. Assessment of luteal function in goats by ultrasonographic image attribute analysis. *Small Ruminant Research*, v. 94, p. 176-179, 2010.

ARASHIRO, E. K. N.; WOHLRES-VIANA, S.; PALHÃO, M. P.; RABELO, N. A.; CAMARGO, L. S. A.; SIQUEIRA, L. G. B.; PAIM, C. A. S.; VIANA, J. H. M. Follicular fluid and granulosa cell recovery from bovine follicles of different diameters using an adapted transvaginal-guided follicular aspiration system. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 24, p. 174-174, 2012.

BAO, B.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding

luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, v. 56, p. 1158-1168, 1997a.

BAO, B.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta4, delta5 isomerase (3beta-HSD) during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3beta-HSD mRNA within the granulosa cell layer. *Biology of Reproduction*, v. 56, p. 1466-1473, 1997b.

BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *Journal of Animal Science*, v. 76, p. 1903-1921, 1998.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPIANIER, R. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, v. 167, p. 371-382, 2000.

BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B.; XU, K. P.; KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 38, p. 87-98, 1989.

BILEZIKJIAN, L. M.; BLOUNT, A. L.; CORRIGAN, A. Z.; LEAL, A.; CHEN, Y.; VALE, W. W. Actions of activins, inhibins and follistatins: Implications in anterior pituitary function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 28, p. 244-248, 2001.

BLEACH, E. C. L.; GLENCROSS, R. G.; FEIST, S. A.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Plasma inhibin A in heifers: Relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 743-752, 2001.

BONNET, A.; DALBIÈS-TRAN, R.; SIRARD, M. A. Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals. *Reproduction*, v. 135, p. 119-128, 2008.

BOSSAERT, P.; DE COCK, H.; LEROY, J. L.; DE CAMPENEERE, S.; BOLS, P. E.; FILLIERS, M.;

- OPSOMER, G. Immunohistochemical visualization of insulin receptors in formalin-fixed bovine ovaries post mortem and in granulosa cells collected in vivo. *Theriogenology*, v. 73, n. 9, p. 1210-1219, 2010.
- BRÄNNSTRÖM, M.; ZACKRISSON, U.; HAGSTRÖM, H. G.; JOSEFSSON, B.; HELLBERG, P.; GRANBERG, S.; COLLINS, W. P.; BOURNE, T. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertility and Sterility*, v. 69, n. 3, p. 435-442, 1998.
- CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. Inhibin A is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep. *Journal of Endocrinology*, v. 169, p. 333-345, 2001.
- CARROL, R. S.; CORRIGAN, A. Z.; GHARIB, S. D.; VALE, W.; CHIN, W. W. Inhibin, activin and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acid levels. *Molecular Endocrinology*, v. 3, p. 1969-1976, 1989.
- CHUI, D. K. C.; PUGH, N. D.; WALKER, S. M.; GREGORY, L.; SHAW, R. W. Follicular vascularity – the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in vitro fertilization programme: a preliminary study. *Human Reproduction*, v. 12, n. 1, p. 191-196, 1997.
- DISSEN, G.A.; LARA, H.E.; FAHRENBACH, W.H.; COSTA, M.E.; OJEDA, S.R. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology*, v.134, p.1146-1154, 1994.
- DOYLE, L. K.; WALKER, C. A.; DONADEU, F. X. VEGF modulates the effects of gonadotropins in granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 38, p. 127-137, 2010.
- DUNCAN, W. C.; VAN DEN DRIESCHE, S.; FRASER, H. M. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the primate ovary up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha in the follicle and corpus luteum. *Endocrinology*, v. 149, p. 3313-3320, 2008.
- EDWARDS, R. G. Follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 37, p. 189-219, 1974.
- EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, p. 829-838, 2001.
- FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*, v. 195, p. 327-336, 1997.
- FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, v. 9, p. 669-676, 2003.
- FIGUEIREDO, JR.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. *Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA*. In: Gonsalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas a reprodução animal*. 1.ed. São Paulo: Varela editor e livraria ltda, p.227-260, 2002.
- FORTUNE, J. E.; QUIRK, S. M. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *Journal of Animal Science*, v. 66, n. 2, p. 1-8, 1988.
- FORTUNE, J. E.; SIROIS, J.; TURZILLO, A. M.; LAVOIR, M. Follicle selection in domestic ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 43, p. 187-198, 1991.
- FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, v. 83, p. 109-126, 2004.
- FREDRIKSSON, L.; LI, H.; ERIKSSON, U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 15, n. 4, p. 197-204, 2004.
- GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, v. 14, n. 2, p.159-177, 2008.
- GINTHER, O. J. *Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare*. Equiservices Publishing, Cross Plains, WI, 1986.
- GINTHER, O. J.; KNOPFT, L.; KASTELIC, J. P. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biology of Reproduction*, v. 41, n. 2, p. 247-254, 1989.
- GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R. Ultrasonic characterization of follicular waves in mares without maintaining identity of individual follicles. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 12, n. 6, p. 349-354, 1992.

- GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.
- GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. Sampling follicular fluid without altering follicular status in cattle: oestradiol concentrations early in a follicular wave. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.109, p.181-186, 1997.
- GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; MEIRA, C.; KOT, K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor I on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. *Biology of Reproduction*, v. 70, n. 1, p. 99-105, 2004.
- GLISTER, C.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A, and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. *Journal of Endocrinology*, v. 188, n. 2, p. 215-225, 2006.
- GRAZUL-BILSKA, A. T.; NAVANUKRAW, C.; JOHNSON, M. L.; VONNAHME, K. A.; FORD, S. P.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *Journal of Animal Science*, v. 85, n. 8, p. 1914-1922, 2007.
- HAZZARD, T. M.; STOUFFER, R. L. Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 14, n. 6, p. 883-900, 2000.
- HILLER, S. G. Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries. *Journal of Endocrinology*, v. 131, n. 2, p. 171-175, 1991.
- HONNENS, A.; NIEMANN, H.; PAUL, V.; MEYER, H. H.; BOLLWEIN, H. Doppler sonography of the uterine arteries during a superovulatory regime in cattle. Uterine blood flow in superovulated cattle. *Theriogenology*, v. 70, n. 5, p. 859-867, 2008.
- JIANG, J. Y.; MACCHIARELLI, G.; MIYABAYASHI, K. Follicular microvasculature in the porcine ovary. *Cell Tissue Research*, v. 310, p. 93-101, 2002.
- KLINGER, F. G.; DE FELICI, M. In vitro development of growing oocytes from fetal mouse oocytes: stage-specific regulation by stem cell factor and granulosa cells. *Developmental Biology*, v. 244, n. 1, p. 85-95, 2002.
- KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 165-183, 2003.
- KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, v. 132, p. 191-206, 2006.
- KOTOYORI, Y.; YOKOO, N.; ITO, K.; MURASE, H.; SATO, F.; KOROSUE, K.; NAMBO, Y. Three-dimensional ultrasound imaging of the equine fetus. *Theriogenology*, v. 77, p. 1480-1486, 2012.
- LAVON, Y.; LEITNER, G.; KLIPPER, E.; MOALLEM, U.; MEIDAN, R.; WOLFENSON, D. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 40, p. 98-109, 2011.
- LE CLEAC'H, N.; RICHARD, C.; KIEFER, H.; LECARPENTIER, E.; HALLÉ, V.; MOREL, O.; LE BOURHIS, D.; JAMMES, H.; CHAVATTE-PALMER, P. Ultrasound evaluation of fetal and placental development in somatic cell nuclear transfer and artificial insemination bovine pregnancies. *Reproduction Fertility and Development*, v. 24, n. 1, p. 118-118, 2012.
- LUCK, M. R.; YE, J.; ALMISLIMANI, H.; HIBBERD, S. Follicular fluid rheology and the duration of the ovulatory process. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 120, p. 411-421, 2000.
- LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science*, v. 70, n. 11, p. 3615-3626, 1992.
- MACCHIARELLI, G.; MARTELLI, A.; RUSSO, V.; BERARDINELLI, P.; PALMERINI, M. G.; NOTTOLA, S. A.; JIANG, J. Y.; SATO, E. Ovarian follicle vascularization in mammals with special regard to domestic animals. *Microscopy and Microanalysis*, v. 13, (Suppl 2), p. 486-487, 2007.
- MANOVA, K.; HUANG, E.J.; ANGELES, M.; DE LEON, V.; SANCHEZ, S.; PRONOVOST, S.M.; BESMER, P.; BACHVAROVA, R.F. The expression. Pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Developmental Biology*, v.157, p.85-99, 1993.
- MARTELLI, A.; PALMERINI, M. G.; RUSSO, V.; RINALDI, C.; BERNABÒ, N.; DI GIACINTO, O.; BERARDINELLI, P.; NOTTOLA, S. A.;

- MACCHIARELLI, G.; BARBONI, B. Blood vessel remodeling in pig ovarian follicles during the periovulatory period: an immunohistochemistry and SEM-corrosion casting study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 7, p. 72, 2009.
- MATTI, N.; IRVING-RODGERS, H. F.; HATZIRODOS, N.; SULLIVAN, T. R.; RODGERS, R. J. Differential expression of focimatrix and steroidogenic enzymes before size deviation during waves of follicular development in bovine ovarian follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 321, p. 207–214, 2010.
- MCNATTY, K. P.; SMITH, D. M.; MAKRIS, A.; OSATHANONDH, R.; RYAN, K. J. The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 49, n. 6, p. 851–860, 1979.
- MEI, C.; LI, M. Y.; ZHONG, S. Q.; LEI, Y.; SHI, Z. D. Enhancing embryo yield in superovulated holstein heifers by Immunization against inhibin. *Reproduction of Domestic Animals*, v. 44, p. 735-739, 2009.
- MIHM, M.; BAKER, P. J.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; COUSSENS, P. M.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 74, p. 1051–1059, 2006.
- MINGOTI, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA-E-SILVA, A. A. M. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus–oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. *Animal Reproduction Science*, v. 69, p. 175–186, 2002.
- MIRÓ, F.; HILLIER, S. G. Relative effects of activin and inhibin on steroid hormone synthesis in primate granulosa cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 75, n. 6, p. 1556-1561, 1992.
- MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; HAYASHI, K.G.; KAMADA, D.; KAWASHIMA, C.; KANECO, E.; ACOSTA, T.J.; MATSUI, M. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. *Journal of Reproduction and Development*, v. 52, n. 1, p.153-160, 2006.
- NAKAMURA, M.; MINEGISHI, T.; HASEGAWA, Y.; NAKAMURA, K.; IGARASHI, S.; ITO, I.; SHINOZAKI, H.; MIYAMOTO, K.; ETO, Y.; IBUKI, Y. Effect of an activin A on follicle-stimulating hormone (FSH) receptor messenger ribonucleic acid levels and FSH receptor expressions in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, v. 133, n. 2, p. 538-544, 1993.
- NDIAYE, K.; FAYAD, T.; SILVERSIDES, D. W.; SIROIS, J.; LUSSIER, G. Identification of downregulated messenger RNAs in bovine granulosa cells of dominant follicles following stimulation with human chorionic gonadotropin. *Biology of Reproduction*, v. 73, p. 324-333, 2005.
- NILSSON, E. E.; DETZEL, C.; SKINNER, M. K. Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition. *Reproduction*, v. 131, n. 6, p. 1007–1015, 2006.
- OLIVER, J.E.; AITMAN, T.J.; POWELL, J.F.; WILSON, C.A.; CLAYTON, R.N. Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of the developing follicles. *Endocrinology*, v.124, p.2671-2679, 1989.
- PACKER, A. I.; HSU, Y. C.; BESMER, P.; BACHVAROVA, R. F. The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Developmental Biology*, v. 161, n. 1, p. 194-205, 1994.
- PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, A. M.; TAVERNE, M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, v. 30, n. 4, p. 751-762, 1988.
- PORTELA, V. M.; GONÇALVES, P. D. B.; VEIGA, A. M; NICOLA, E.; BURATINI, J.; PRICE, C. A. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. *Endocrinology*, v. 149, p. 5004-5011, 2008.
- PRESTA, M.; DELL'ERA, P.; MITOLA, S.; MORONI, E.; RONCA, R.; RUSNATI, M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 16, p. 159–178, 2005.
- RAUCH, A.; KRÜGER, L.; MIYAMOTO, A.; BOLLWEIN, H. Colour Doppler sonography of cystic ovarian follicles in cows. *Journal of Reproduction and Development*, v. 54, n. 6, p. 447-453, 2008.
- REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. *Reviews of Reproduction*, v. 1, n. 3, p. 182-192, 1996.

- RICHARDS, J. S.; JAHNSEN, T.; HEDIN, L.; LIFKA, J.; RATOOSH, S.; DURICA, J. M.; GOLDRING, N. B. Ovarian Follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Progress in Hormone Research*, v. 43, p. 231-276, 1987.
- ROBINSON, R. S.; WOAD, K. J.; HAMMOND, A. J.; LAIRD, M.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E. Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction*, v. 138, p. 869-881, 2009.
- RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F.; VAN WEZEL, I. L.; KRUPA, M.; LAVRANOS, T. C. Dynamics of the membrana granulosa during expansion of the ovarian follicular antrum. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 171, p. 41-48, 2001.
- RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction*, v. 139, p. 309-318, 2010a.
- RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction*, v. 82, p. 1021-1029, 2010b.
- ROSALES-TORRES, A. M.; ALONSO, I.; VERGARA, M.; ROMANO, M. C.; CASTILLO-JUÁREZ, H.; ÁVALOS, A.; ROSADO, A.; GUTIÉRREZ, C. G. Vascular endothelial growth factor isoforms 120, 164 and 205 are reduced with atresia in ovarian follicles of sheep. *Animal Reproduction Science*, v. 122, p. 111-117, 2010.
- SALUSTRI, A.; FULOP, C.; CAMAIONI, A. *Oocyte-granulosa cell interaction*. In: Lesung, P.C.; Adashi, E.Y. The Ovary, 2nd edition, United Kingdom, Elsevier, p.131-143, 2004.
- SENGER, P.L. *Pathways to pregnancy and parturition*. 2nd edition, Cadmus Professional Communications, 381p, 2003.
- SHUKOVSKI, L.; FINDLAY, J. K.; ROBERTSON, D. M. The effect of follicle-stimulating hormone-suppressing protein or follistatin on luteinizing bovine granulosa cells in vitro and its antagonistic effect on the action of activin. *Endocrinology*, v. 129, n. 6, p. 3395-3402, 1991.
- SIDDIQUI, M. A. R.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O. J. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 113, p. 287-292, 2009a.
- SIDDIQUI, M. A. R.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; ALMAMUN, M.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Relationship of vascular perfusion of the wall of the preovulatory follicle to in vitro fertilisation and embryo development in heifers. *Reproduction*, v. 137, p. 689-697, 2009b.
- SILVA, L. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. *Animal Reproduction*, v. 3, n. 3, p. 339-346, 2006.
- SINGH, J.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Animal Reproduction Science*, v. 78, n. 3-4, p. 371-399, 2003.
- SIQUEIRA, L. G.; TORRES, C. A.; AMORIM, L. S.; SOUZA, E. D.; CAMARGO, L. S.; FERNANDES, C. A.; VIANA, J. H. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, v. 115, n. 1-4, p. 18-28, 2009.
- STACEY, C. C.; KENNY, H.A.; WOODRUFF, T.K. *Activin, inhibin, and follistatin in ovarian physiology*. In: Lesung, P.C.; Adashi, E.Y. The Ovary, 2nd edition, United Kingdom, Elsevier, p.273-287, 2004.
- STOUFFER, R. L.; MARTÍNEZ-CHEQUER, J. C.; MOLSKNESS, T. A.; XU, F.; HAZZARD, T. M. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Archives of Medical Research*, v. 32, p. 567-575, 2001.
- SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction*, v. 9, n. 1, p. 35-48, 2003.
- TAMANINI, C.; DE AMBROGI, M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reproduction of Domestic Animals*, v. 39, p. 206-216, 2004.
- TAKEDOMI, T.; KISHI, H.; MEDAN, M. S.; AOYAGI, Y.; KONISHI, M.; ITOH, T.; YAZAWA, S.; WATANABE, G.; TAYA, K. Active immunization against inhibin improves superovulatory response to exogenous FSH in cattle. *Journal of Reproduction and Development*, v. 51, p. 341-346, 2005.
- UENO, S.; TAKAHASHI, M.; MANGANARO, T.F.; RAGIN, R.C.; DONAHOE, P.K. Cellular

localization of mullerian inhibiting substance in the developing rat ovary. *Endocrinology*, v.124, p.1000-1006, 1989.

VAN WEZEL, I. L.; UMAPATHYSIVAM, K.; TILLEY, W. D.; RODGERS, R. J. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 115, n. 2, p. 133-140, 1995.

VAN WEZEL, I. L.; RODGERS, R. J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biology of Reproduction*, v. 55, n. 5, p. 1003-1011, 1996.

VAN WEZEL, I. L.; KRUPA, M.; RODGERS, R. J. Development of the membrana granulosa of bovine antral follicles: structure, location of mitosis and pyknosis, and immunolocalization of involucrin and vimentin. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 11, n. 1, p. 37-48, 1999.

VIÑALES, C. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Doctoral thesis (Department of Clinical Chemistry) – Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, 2003.

VLAISAVLJEVIC, V.; BORKO, E.; RADAKOVIC, B.; ZAZULA, D.; DOSEN, M. Changes in perifollicular vascularity after administration of human chorionic gonadotropin measured by quantitative three-dimensional power Doppler ultrasound. *The Middle European Journal of Medicine*, v. 122, n. 2, p. 85-90, 2010.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; WEBB, R.; GONG, J. G.; LAW, A. S.; RUSBRIDGE, S. M. Control of ovarian function in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, suppl 45, p. 141-156, 1992.

WEBB, R.; ARMSTRONG, D. G. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livestock Production Science*, v. 53, p. 95-112, 1998.

WEBB, R.; GARNSWORHTY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, v. 82, p. 63-74, 2004.

WEISS, J.; HARRIS, P. E.; HALVORSON, L. M.; CROWLEY JR, W. F.; JAMESON, J. L. Dynamic regulation of follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid levels by activin and

gonadotropin-releasing hormone in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology*, v. 131, n. 3, p. 1403-1408, 1992.

WEISS, J.; CROWLEY JR, W. F.; HALVORSON, L. M.; JAMESON, J. L. Perfusion of rat pituitary cells with gonadotropin-releasing hormone, activin, and inhibin reveals distinct effects on gonadotropin gene expression and secretion. *Endocrinology*, v. 132, n. 6, p. 2307-2311, 1993.

YOSHIDA, H.; TAKAKURA, N.; KATAOKA, H.; KUNISADA, T.; OKAMURA, H.; NISHIKAWA, S. I. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology*, v. 184, n. 1, p. 122-137, 1997.

ZLOTKIN, T.; FARKASH, Y.; ORLY, J. Cell-specific expression of immunoreactive cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*, v.119, p.2809-2820, 1986.

Capítulo I

Utilização da modelagem tridimensional a partir de imagens ultrassonográficas: uma nova abordagem para o estudo da vascularização folicular

RESUMO

A ultrassonografia com Doppler colorido vem se tornando uma importante ferramenta no estudo da vascularização do sistema genital. Contudo, a avaliação e a mensuração dos parâmetros vasculares são complicadas nos vasos sanguíneos presentes nos folículos ovarianos devido às reduzidas dimensões. O presente estudo teve como objetivo desenvolver uma metodologia quantitativa, associando a tecnologia 3D e a ultrassonografia com Doppler colorido, para a avaliação da vascularização folicular. No experimento I, o crescimento do folículo dominante (FD) de uma vaca holandesa foi diariamente acompanhado por ultrassonografia em Modo B. Em cada avaliação, um vídeo de 20s do FD foi gravado. A partir do vídeo, uma sequência de imagens do FD foi gerada, sendo posteriormente utilizada para gerar o modelo tridimensional em um programa de computador específico, onde o volume do folículo foi calculado (VC). Para validação, o VC foi comparado com o volume esperado (VE) calculado pela fórmula: $4/3\pi r^3$. No experimento II, o desenvolvimento do FD foi acompanhado diariamente por ultrassonografia modo-B e Doppler colorido em novilhas Holandesas e Gir. Utilizando a mesma metodologia do experimento I, o volume da vascularização do FD foi calculado em cada avaliação ultrassonográfica. No experimento I, a diferença entre o VC e o VE não foi superior a 7%. No experimento II, o volume da vascularização folicular aumentou progressivamente ao longo do desenvolvimento do FD nas duas raças. Uma correlação positiva entre o volume de vascularização e o diâmetro folicular foi observada na raça Holandesa e Gir (0,56 e 0,54; respectivamente). A distribuição da vascularização ao longo da parede folicular também foi avaliada. O fluxo sanguíneo foi mais intenso na região basal e lateral do folículo. Estes resultados demonstram o potencial da associação da ultrassonografia com Doppler colorido com algoritmos computacionais de reconstrução tridimensional para quantificar a vascularização do folículo ovariano ao longo do seu desenvolvimento.

Palavras-chave: Doppler colorido, ultrassonografia, vascularização, folículo.

ABSTRACT

Color Doppler ultrasound is a very important tool on vascular assessment of the reproductive tract. However, the measurement of vascular parameters is difficult due to reduced dimensions of the blood vessels located within the follicular wall. The aim of the present study was to develop a quantitative methodology, associating 3D technology and volume, to evaluate the follicular vascularization. In experiment I, the growth of dominant follicle (DF) from a Holstein cow was tracked by B Mode ultrasonography. In each sonogram, a 20s video of the DF was recorded. From this video, a sequence of images was generated and posteriorly used to create the three-dimensional model in specific software, in which the volume of the follicle (CV) was calculated. To validate the methodology, the CV was compared to the expected volume (EV) calculated by the formula: $4/3\pi r^3$ (EV). In experiment II, DF development was daily tracked by B-mode and color Doppler ultrasonography in Holstein and Gyr heifers. Using the same methodology previously described, the volume of vascularization was calculated in each exam. In experiment I, the difference between CV and EV was not greater than 7%. In experiment II, the volume of follicular vascularization progressively increased with DF development in both breeds. A positive correlation between follicular diameter and volume of vascularization was observed in Holstein and Gyr heifers (0.56 and 0.54, respectively). The distribution of the vascularization along the follicular wall was also evaluated. Blood flow was more intense in the basal and lateral region of the follicle. These results demonstrate the potential of association of a three-dimensional algorithm with ultrasonography technology to quantitatively measure the vascularization of the follicle throughout its development.

Keywords: Color Doppler, ultrasonography, vascularization, follicle.

1. INTRODUÇÃO

A vascularização presente na parede do folículo está diretamente relacionada ao seu desenvolvimento e crescimento, sendo muito importante no processo de seleção, regressão e ovulação (Matsui e Miyamoto, 2009). Além disso, a vascularização participa diretamente na formação do fluido folicular (Rodgers e Irving-Rodgers, 2010), influenciando sua composição, e conseqüentemente afetando o desenvolvimento do oócito (Sutton et al., 2003). Na medicina humana a vascularização folicular vem sendo utilizada como um importante parâmetro de avaliação nos programas de fertilização *in vitro* (Chui et al., 1997; Huey et al., 1999). Em bovinos, foi demonstrada uma correlação positiva entre a vascularização folicular e os resultados obtidos na FIV e estabelecimento da gestação (Siddiqui et al., 2009a; Siddiqui et al., 2009b).

Dentro desse contexto, a ultrassonografia com Doppler colorido vem se tornando uma importante ferramenta no estudo da vascularização das estruturas ovarianas de fêmeas bovinas. Entretanto, a avaliação e mensuração dos parâmetros vasculares nos folículos e corpos lúteos se deparam com alguns obstáculos. Como não é possível determinar o ângulo entre os vasos sanguíneos presentes na parede folicular e o feixe de onda sonora (ângulo Doppler ou de insonação), o cálculo da velocidade de fluxo não é possível (Acosta et al., 2003; Acosta et al., 2005; Siddiqui et al., 2009a). Alternativamente, a vascularização foi avaliada por metodologias subjetivas, onde escalas de graduação foram criadas a partir da simples observação (Chui et al., 1997; Silva et al., 2006). Entretanto, como toda avaliação subjetiva, é mais sujeita a erros e dificulta sua utilização por outros pesquisadores. Devido a estas limitações, a avaliação da vascularização folicular em alguns estudos ficou restrita apenas na identificação da presença ou ausência de sinais coloridos na parede dos folículos (Acosta et al., 2005; Pancarci et al., 2012).

A utilização de algoritmos computacionais e modelos matemáticos para avaliações quantitativas de atributos de imagens ultrassonográficas já é uma realidade. O cálculo do valor médios dos pixels de imagens ultrassonográficas vem sendo utilizadas para uma avaliação mais objetiva da função folicular e luteal nas espécies domésticas (Siqueira et al., 2009; Arashiro et al., 2010). Com auxílio de programas de computador específicos, a área da parede folicular com sinais coloridos tem sido utilizada como forma quantitativa de avaliação da vascularização folicular (Acosta et al., 2004; Ginther, 2007, Rauch et al., 2008). No exame ultrassonográfico, o vaso sanguíneo, assim como qualquer estrutura tubular, pode ser observado como

um simples ponto (corte transversal) ou então como uma faixa (corte longitudinal). Nestas duas situações, a área calculada pode sofrer grandes variações. Assim observa-se que a avaliação da vascularização folicular por metodologias quantitativas ainda permanece um desafio.

A associação das ferramentas de diagnóstico por imagem com algoritmos computacionais de reconstrução tridimensional, além de possibilitar mensurações volumétricas, permite que a estrutura ovariana seja avaliada em diferentes planos (Singh et al., 2003). A tecnologia 3D já vem sendo utilizada para o estudo do desenvolvimento fetal e diagnóstico de malformações (Werner et al., 2010; Kotoyori et al., 2012). Mais recentemente foi utilizada na medicina humana para medir o volume da vascularização perifolicular (Vlaisavljevic et al., 2010). Não há relatos na literatura a respeito da utilização desta tecnologia para a avaliação quantitativa da vascularização folicular em bovinos.

O objetivo do presente estudo foi descrever o uso da modelagem tridimensional a partir de imagens ultrassonográficas com Doppler colorido para avaliar quantitativamente a vascularização do folículo dominante ao longo do seu desenvolvimento em duas raças de bovinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANIMAIS

O presente estudo foi conduzido no Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco – MG. Todos os procedimentos realizados nos animais experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (Protocolo CEUA-CNPGL nº: 2/2011). A associação entre um algoritmo de reconstrução tridimensional e a ultrassonografia com Doppler colorido foi avaliada em dois experimentos. Inicialmente, um estudo preliminar (Experimento I) foi conduzido para validar a utilização do algoritmo computacional para mensurações volumétricas a partir das imagens ultrassonográficas. Um segundo experimento (Experimento II) foi realizado para quantificar o volume de vascularização presente na parede do folículo dominante durante seu desenvolvimento utilizando o algoritmo computacional. No Experimento I uma vaca Holandesa foi utilizada. No Experimento II, novilhas Holandesas (n=6) e Gir (n=6) foram utilizadas. Todos os animais apresentavam atividade ovariana cíclica e nenhuma anormalidade reprodutiva detectável pela

ultrassonografia foi observada. A vaca e novilhas holandesas foram permanentemente mantidas em sistema de confinamento (tipo *free-stall*) alimentadas com silagem de milho e ração. As novilhas da raça Gir foram mantidas em sistema de pastejo (*Brachiaria decumbens*) com suplementação a base de silagem de milho e ração. Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*.

2.2 EXPERIMENTO I: VALIDAÇÃO DO USO DO ALGORITMO COMPUTACIONAL

2.2.1 Avaliações ultrassonográficas

O crescimento da onda folicular foi sincronizado em uma vaca Holandesa com um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest, Ourofino), sendo no mesmo momento, administrado 2mg de benzoato de estradiol por via intramuscular (Sincrodiol, Ourofino, Ribeirão Preto, Brasil). O início do protocolo foi considerado como Dia 0 (D0). Com auxílio de um aparelho portátil (MyLab 30vet Gold, Esaote, Itália) acoplado a um transdutor de 7,5 MHz, exames ultrassonográficos em modo B foram realizados a cada 24 horas até o D10 com o objetivo de identificar o início da onda e acompanhar o crescimento folicular até o momento em que a fase de dominância já se encontrava plenamente estabelecida. Durante os exames ultrassonográficos, o diâmetro de cada folículo foi mensurado e, com um movimento lento, contínuo e unidirecional, a varredura de todo o ovário foi realizada e gravada em vídeo com aproximadamente 20 segundos. Antes da divergência folicular, a identificação do folículo dominante foi realizada retrospectivamente a partir das análises dos dados da dinâmica de crescimento folicular. Apenas os dados relativos ao folículo dominante foram utilizados.

2.2.2 Captura e processamento das imagens para modelagem tridimensional

Com auxílio do próprio equipamento de ultrassonografia, o vídeo foi decomposto em uma sequência de imagens (quadros) e apenas aquelas imagens onde era possível visualizar o folículo dominante foram utilizadas. Para cada dia de avaliação, uma sequência de imagens do folículo dominante foi criada. O número de quadros em cada sequência de imagens utilizada em cada avaliação pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Número de quadros na sequência de imagens utilizada para realizar a modelagem tridimensional do folículo dominante (FD) ao longo do seu desenvolvimento.

Momento do ciclo*	Diâmetro do FD (mm)	Número de quadros
D5	5,0	42
D6	7,4	73
D7	9,4	100
D8	10,9	89
D9	12,9	94
D10	13,6	133

*D0 – início do protocolo hormonal de sincronização da emergência de uma nova onda de crescimento folicular.

Em um programa de computador específico (Mimics 8.13), os modelos tridimensionais foram gerados a partir das sequências de imagens. Para manter a resolução espacial do folículo, a distância entre cada imagem foi calculada a partir da razão entre o diâmetro do folículo e o número de imagens. Com auxílio da régua presente na imagem ultrassonográfica, foi possível perceber que a distância calculada pelo programa era quatro vezes maior do que a escala da régua, ou seja, cada 1 cm da régua era calculado pelo programa como sendo 4 cm. Portanto, para a manutenção da resolução espacial da estrutura, a distância entre cada imagem foi multiplicada por quatro.

Em cada quadro, a região do antro folicular foi selecionada e o modelo 3D do folículo foi gerado (Figura 1). O volume do folículo foi calculado utilizando as ferramentas do próprio programa. Como a distância entre cada quadro foi multiplicada por 4, o diâmetro folicular foi aumentado 4 vezes, e consequentemente o volume folicular calculado pelo programa foi 64 vezes maior do que o volume real. Para obter o volume real, o volume calculado pelo programa foi dividido por 64. Para avaliar a eficiência desta metodologia, o volume do folículo calculado (VC) pelo programa de computador foi comparado com o volume esperado (VE) determinado pela fórmula $4/3\pi r^3$ (onde, r corresponde ao diâmetro folicular dividido por 2). Todo o processo de modelagem tridimensional foi realizado no Laboratório de Modelos Tridimensionais (LAMOT) do Instituto Nacional de Tecnologia (INT), localizado no Rio de Janeiro.

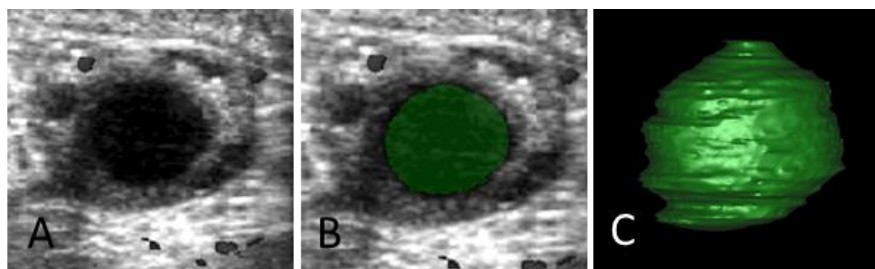


Figura 1. **A**, Um dos quadros mostrando a região do antro folicular (em preto). **B**, No programa de computador específico (Mimics 8.13) a região do antro folicular foi selecionada (verde). **C**, Após a seleção ser realizada em todos os quadros, o modelo tridimensional foi gerado e o volume do folículo pode então ser calculado.

2.3 EXPERIMENTO II: AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA VASCULARIZAÇÃO FOLICULAR

2.3.1 Avaliações ultrassonográficas

A onda de crescimento folicular foi sincronizada nas novilhas Holandesas (n=6) e Gir (n=6) com um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest, Ourofino) associado a administração intramuscular de 2mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ourofino, Ribeirão Preto, Brasil). Para detecção do início da nova onda de crescimento folicular, após o início do protocolo, avaliações ultrassonográficas foram realizadas a cada 24 horas nos animais utilizando-se um aparelho de ultrassonografia portátil com Doppler colorido (MyLab30 Vet Gold, Esaote, Genova, Itália) equipado com um transdutor retal de 7,5 MHz. Após o início da nova onda de crescimento folicular (Dia 0 – D0), avaliações ultrassonográficas em modo-B e Doppler colorido foram realizadas a cada 12 horas para avaliar a vascularização folicular até o completo estabelecimento da fase de dominância (D6). Durante cada exame ultrassonográfico, o diâmetro de todos os folículos foi registrado. Após a

mensuração dos folículos, a função Doppler colorido foi ativada e com um movimento lento, contínuo e unidirecional, a varredura de todo o ovário foi realizada e gravada em vídeo (duração aproximada de 20 segundos). As avaliações com Doppler colorido foram realizadas com frequência de repetição de pulso (PRF) de 0,7 KHz e um filtro de ondas baixo, onde fluxos sanguíneos com velocidade superior a 0,05 m/s foram observados como sinais coloridos. Para permitir que a vascularização fosse avaliada em todas as fases do desenvolvimento folicular, apenas os dados do folículo dominante, incluindo os dados retrospectivos captados pelas imagens gravadas, foram utilizados.

2.3.2 Captura e processamento das imagens para modelagem tridimensional

A captura, o processamento das imagens e a modelagem tridimensional foram realizadas da mesma forma descrita anteriormente (item 2.2.2). O número de quadros utilizado para a modelagem tridimensional do folículo dominante pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Número de quadros na sequência de imagens utilizada para realizar a modelagem tridimensional do folículo dominante (FD) ao longo do seu desenvolvimento nas raças Gir e Holandesa (média±EPM).

Momento (horas)*	Holandesa		Gir	
	Diâmetro FD (mm)	Número de quadros	Diâmetro FD (mm)	Número de quadros
-24	6,8±0,3	59,2±4,0	5,3±0,2	37,2±1,2
-12	8,2±0,1	71,5±10,7	6,2±0,3	42,2±3,4
0	8,8±0,1	68,8±9,0	6,9±0,2	45,2±2,7
12	10,1±0,2	94,8±6,8	7,6±0,3	69,3±7,6
24	11,0±0,4	98,5±9,1	8,3±0,4	69,2±7,2
36	12,0±0,3	105,7±16,3	8,8±0,3	81,2±4,7
48	12,6±0,3	120,5±10,6	9,2±0,3	82,8±12,6

*Momento em relação a divergência folicular (Hora 0 = momento da divergência).

Considerando que o algoritmo computacional utilizado não reconhecia cores, antes da geração do modelo 3D, as áreas coloridas presentes na parede do folículo dominante foram pintadas de branco (Figura 2) com auxílio de um programa de edição de imagem (Adobe Photoshop 5.5). Sinais coloridos considerados como artefatos foram desconsiderados. Após a construção do modelo 3D (Figura 2), o volume da vascularização foi calculado. Assim

como descrito anteriormente, o volume calculado pelo programa foi dividido por 64 e utilizado como resultado final. No presente estudo, o volume da vascularização foi calculado apenas utilizando os sinais coloridos detectados pelo aparelho de ultrassonografia, ou seja, onde o fluxo sanguíneo apresentou velocidade superior a 0,05 m/s. Nas regiões onde o fluxo sanguíneo era muito lento, nenhum sinal colorido pode ser observado.

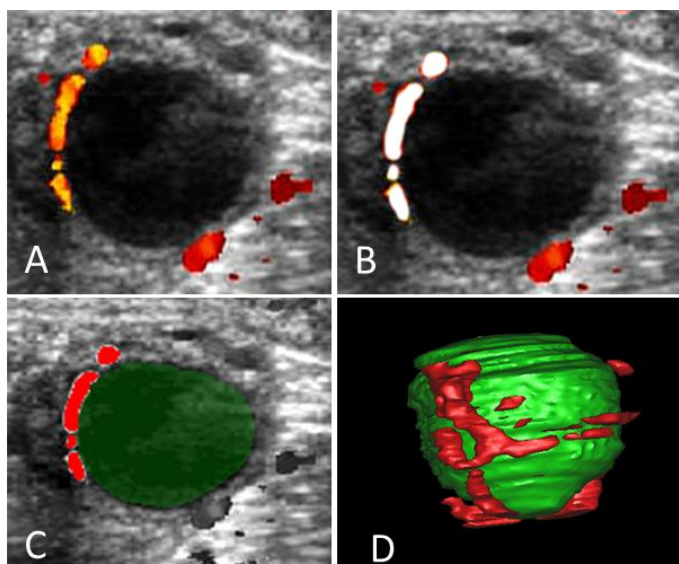


Figura 2. Processamento das imagens ultrassonográficas para a modelagem tridimensional. **A**, Folículo dominante (D6) com presença de vascularização detectável pela ultrassonografia com Doppler colorido na parede. **B**, Mesma imagem após o processamento no Adobe Photoshop 5.5 mostrando que a região da vascularização da parede folicular foi pintada de branco. **C**, No programa de computador (Mimics 8.13), a região do antro folicular (verde) e a vascularização folicular (vermelho) foram selecionados em cada quadro para posterior modelagem tridimensional. **D**, Modelo tridimensional do folículo dominante mostrando a região do antro folicular (verde) e a presença de fluxo sanguíneo detectado pelo aparelho de ultrassonografia na parede folicular (vermelho).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis, diâmetro folicular e volume de vascularização, foram avaliadas para normalidade e homocedasticidade utilizando os testes de Lilliefors e Cochran & Barlett. O volume de vascularização folicular ao longo do desenvolvimento folicular foi por análise de regressão linear. A associação entre o volume de vascularização e o diâmetro folicular foi avaliada por meio da correlação de Pearson. Uma probabilidade de 5% foi utilizada para expressar diferença significativa. Os resultados estão apresentados como média±EPM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Experimento I teve como objetivo avaliar a associação entre uma ferramenta de diagnóstico por imagem (ultrassonografia) e um algoritmo de reconstrução tridimensional para a realização de mensurações volumétricas. Na Tabela 3 é possível observar que a variação do volume do folículo calculado pelo programa em relação ao volume esperado ao longo do desenvolvimento folicular não foi superior a 7%. Esses resultados demonstraram que a metodologia aplicada para captura e processamento das imagens e posterior modelagem tridimensional foi eficiente para a realização de mensurações volumétricas.

Tabela 3 Volume esperado (VE) e volume calculado (VC) por reconstrução tridimensional do folículo dominante ao longo do seu desenvolvimento.

Dia	Diâmetro folicular (mm)	VE (mm ³)	VC (mm ³)	Varição em relação ao VE (%)
D5	5,0	65,45	65,47	0,01
D6	7,4	212,18	220,44	3,89
D7	9,4	434,89	408,27	6,12
D8	10,9	678,08	649,63	4,20
D9	12,4	998,31	941,26	5,71
D10	13,6	1317,09	1263,21	4,09

VE = Volume esperado determinado pela fórmula $4/3\pi r^3$, onde r corresponde ao raio do folículo (diâmetro/2) e $\pi = 3,1416$.

VC = Volume calculado por reconstrução tridimensional pelo programa de computador (Mimics 8.13)

No Experimento II, a metodologia desenvolvida no primeiro experimento foi utilizada para avaliar quantitativamente a vascularização do folículo dominante ao longo da primeira onda de crescimento folicular em novilhas Holandesas e Gir. Um aumento progressivo do volume da vascularização folicular foi observado nas duas raças (Figura 3). Nas novilhas Holandesas, o volume da vascularização folicular variou de $25,6 \pm 4,8$ mm³ (D0) a $41,8 \pm 5,3$ mm³ (D6), no momento da divergência o volume da vascularização do folículo dominante foi de $27,5 \pm 4,1$ mm³. Nas novilhas Gir, este volume variou de $12,7 \pm 7,31$ mm³ (D0) a $32,16 \pm 13,13$ mm³ (D6), no momento da divergência o volume da vascularização folicular foi de $18,12 \pm 7,40$ mm³. Além disso, uma correlação positiva significativa entre o diâmetro folicular e o volume da vascularização do folículo dominante foi observada nas duas raças (0,56 e 0,54; para Holandês e Gir, respectivamente).

Esses resultados corroboram com estudos anteriores onde foi demonstrado um aumento da atividade angiogênica durante o crescimento folicular em bovinos (Jiang et al., 2003). O VEGF é um fator de angiogênico importante para a formação do plexo vascular na camada de células da teca, fundamental para a manutenção da funcionalidade e crescimento do folículo ovariano (Redmer e Reynolds, 1996). A concentração intrafolicular de VEGF, assim como a expressão desse fator angiogênico pelas células da granulosa e da teca, foi maior nos folículos esteroideogenicamente ativos (Grazul-Bilska et al., 2007). Estudos anteriores demonstraram uma correlação positiva entre a vascularização folicular e a atividade esteroideogênica (Mattioli et al., 2001; Grazul-Bilska et al., 2007). Assim, observa-se a importância da vascularização folicular na manutenção da atividade folicular e sua associação com a seleção do folículo dominante (Jiang et al., 2003; Acosta et al., 2007).

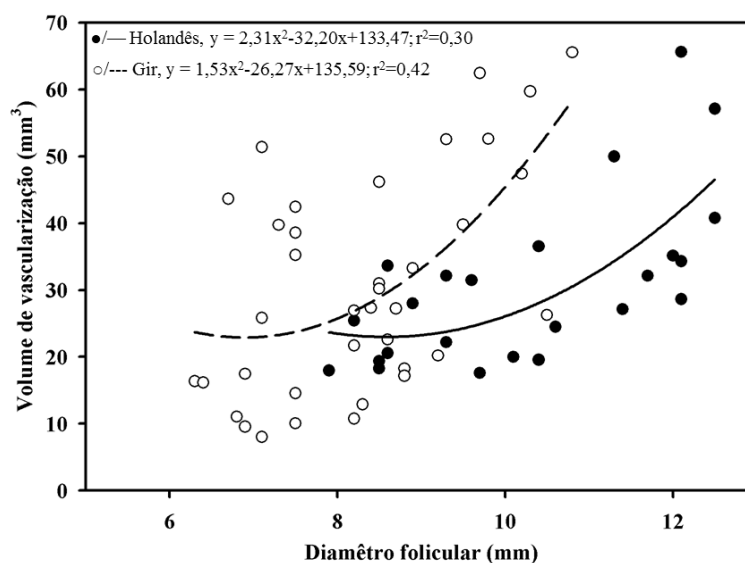


Figura 3. Crescimento progressivo ($P < 0,05$) do volume da vascularização folicular ao longo do desenvolvimento do folículo dominante nas novilhas Holandesas e Gir calculado com auxílio da modelagem tridimensional.

A ultrassonografia com Doppler colorido vem sendo empregada na Medicina Veterinária para a avaliação da hemodinâmica do sistema genital de grandes animais (Miyamoto et al., 2006). Em diversos estudos a avaliação da vascularização folicular foi realizada por meio de metodologias qualitativas, onde se observa apenas a presença ou ausência da vascularização, ou então por metodologias subjetivas onde a vascularização folicular foi classificada, pela simples visualização das imagens, dentro uma escala de graduação previamente determinada (Chui et al, 1997; Silva et al., 2006, Pancarci et al., 2012).

Metodologias quantitativas com base no cálculo da área de sinal colorido na parede folicular com auxílio de programas de computador específicos foram descritos em estudos anteriores (Rauch, et al., 2008; Pancarci et al., 2011). Ao utilizarem moldes de corrosão, Jiang et al. (2002) mostraram que as características morfológicas (densidade e diâmetro) dos capilares sanguíneos não são uniformes ao longo da parede folicular. Essas diferenças, provavelmente refletem na velocidade do fluxo sanguíneos nestes capilares, que por sua vez também não é igual em toda a parede folicular. Assim, a distribuição da vascularização observada com auxílio da ultrassonografia com Doppler colorido também não é uniforme. Desta forma, embora a quantificação da área de vascularização tenha sido realizada sempre no maior diâmetro do folículo (Pancarci et al., 2011), essa região pode não ser representativa. Alternativamente, a média das áreas calculadas em três imagens ultrassonográficas foi utilizada para quantificar a vascularização folicular (Gastal et al., 2007; Rauch et al., 2008). Há que se salientar ainda, que área é a quantidade de espaço bidimensional, ou seja, uma superfície plana. Quando mais de uma imagem é utilizada, a quantificação passa a ser em um espaço tridimensional, e nesse caso o volume seria o

conceito matemático de eleição. A utilização da modelagem tridimensional no presente estudo permitiu que todos os sinais coloridos presente na parede folicular fossem avaliados e quantificados por mensurações volumétricas. Assim, observa-se que a metodologia proposta no presente estudo é uma alternativa para avaliar quantitativamente *in vivo* e de forma seriada a vascularização presente na parede folicular.

Utilizando a ultrassonografia em modo-B, a avaliação do órgão é realizada a partir da observação contínua de imagens bidimensionais, de forma a permitir uma reconstrução mental tridimensional por parte do médico veterinário (Singh et al., 2003). A metodologia descrita no presente estudo permitiu que todas as áreas coloridas (representado o fluxo sanguíneo) presentes na parede folicular fossem observadas em uma única imagem tridimensional. Conforme discutido anteriormente, as características morfológicas dos capilares sanguíneos presentes na parede folicular não é uniforme (Jiang et al., 2002), refletindo na velocidade do fluxo sanguíneos, e conseqüentemente na distribuição da vascularização folicular observada na ultrassonografia. Em seres humanos, foi observado um fluxo sanguíneo mais intenso na região basal e lateral do folículo pré-ovulatório (Brännström et al., 1998). No presente estudo, utilizando a ultrassonografia Doppler, observou-se que o fluxo sanguíneo na parede do folículo dominante foi detectado na região basal e lateral do folículo (Figura 4). Esses resultados demonstram que o fluxo sanguíneo foi mais intenso nestas duas regiões da parede folicular, sendo consistente com as diferenças morfológicas observadas no plexo vascular do folículo ovariano dominante (Jiang et al., 2002; Jiang et al., 2003). Dessa forma, observa-se o potencial da aplicação da tecnologia tridimensional para o estudo da arquitetura vascular do folículo ovariano.

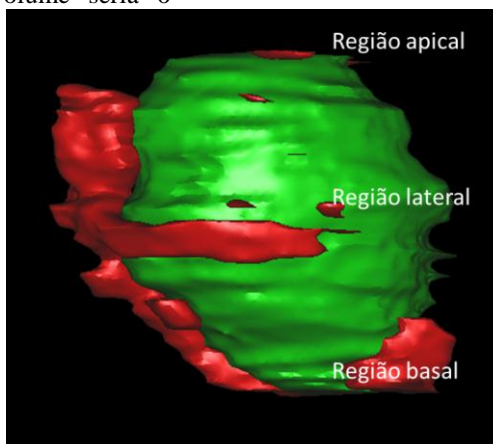


Figura 4. Modelo tridimensional de um folículo dominante (9,7 mm de diâmetro) gerado a partir de imagens ultrassonográficas. O fluxo detectado pelo aparelho de ultrassonografia está presente na região basal e lateral do folículo, indicando assim a presença de um fluxo sanguíneo mais intenso nestas regiões.

A metodologia proposta no presente estudo, associando a ultrassonografia com Doppler colorido e um algoritmo computacional de reconstrução tridimensional, apresentou algumas dificuldades de execução e exigiu determinadas condições para seu correto emprego. Antes da construção do modelo tridimensional do folículo ovariano e sua vascularização, o vídeo teve que ser decomposto em quadros, posteriormente estes quadros foram processados em um editor de imagens e apenas depois destas duas etapas o modelo 3D pode ser gerado e as mensurações volumétricas realizadas. Dessa forma, observa-se que não é possível ter os resultados no momento do exame ultrassonográfico.

Assim como em qualquer avaliação ultrassonográfica com Doppler colorido, a colaboração do paciente é fundamental. Durante a avaliação ultrassonográfica, o animal deve estar bem contido e principalmente, calmo. Qualquer movimentação mais acentuada do animal causava a formação de artefatos de imagens, prejudicando a qualidade da imagem e consequentemente do vídeo. Em novilhas e pôneis, foi demonstrado que o uso de sedativos pode ser utilizado sem causar alterações significativas na perfusão vascular dos órgãos reprodutivos (Araujo e Ginther, 2009). Entretanto, não há informações sobre os efeitos destes sedativos sobre a hemodinâmica e, sobretudo sobre o bem estar do animal, caso o experimento exija avaliações seriadas em um intervalo de tempo muito curto.

A gravação do vídeo deve ser realizada com um movimento lento, contínuo e unidirecional, caso contrário a resolução espacial da estrutura não será mantida e o volume calculado pelo programa não será confiável. Outro fator importante para a manutenção da resolução espacial da estrutura a ser avaliada é a distância entre os quadros. Como o exame ultrassonográfico foi realizado manualmente, não foi possível padronizar uma quantidade de quadro para cada diâmetro folicular. Contudo, o programa utilizado para reconstrução do modelo tridimensional permite que essa distância seja configurada manualmente pelo operador. Dessa forma, a distância entre os quadros foi individualmente calculada e utilizada, mantendo assim a resolução espacial de cada folículo avaliado. É importante ressaltar também que os valores observados para o volume de vascularização folicular estão associados a sensibilidade do equipamento de ultrassonografia utilizado. Outros fatores como a frequência do transdutor, a frequência de repetição de pulso (PRF) e filtros de ondas também influenciam a intensidade e a quantidade de sinais coloridos observados no monitor.

A associação de algoritmos computacionais de

reconstrução tridimensional é um avanço natural dentro da área de diagnóstico por imagem. A tecnologia 3D já vem sendo utilizada em seres humanos no estudo da vascularização folicular (Vlaisavljevic et al., 2010) e também no estudo do desenvolvimento fetal e no diagnóstico de malformação fetal (Werner et al., 2010). Na Medicina Veterinária, estudos recentes utilizaram esta tecnologia para avaliar o desenvolvimento fetal em equinos (Kotoyori et al., 2012) e a vascularização placentária de fetos bovinos clonados (Le Cleac'h et al., 2012). Assim, além de permitir uma avaliação quantitativa da vascularização folicular, como demonstrado no presente estudo, a associação da tecnologia 3D com as ferramentas de diagnóstico por imagem apresenta um grande potencial no estudo do desenvolvimento fetal e das malformações associadas a fertilização *in vitro* e a técnica de clonagem.

4. CONCLUSÃO

A associação da ultrassonografia com algoritmos computacionais de reconstrução tridimensional, foi eficiente para a realização de mensurações volumétricas.

O uso da ultrassonografia com Doppler colorido associado a um algoritmo computacional de reconstrução tridimensional mostrou ser viável no estudo da vascularização de folículos em fase de crescimento. O aumento no volume da vascularização folicular observada nas duas raças estudadas é consistente com a variação fisiológica esperada ao longo do desenvolvimento folicular.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*, v. 125, p. 759-767, 2003.
- ACOSTA, T. J.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicle in mares. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 637-642, 2004.
- ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. *Journal of Reproduction and Development*, v. 51, n. 2, p. 273-280, 2005.
- ACOSTA, T. J. Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. *Journal of Reproduction and Development*, v.

53, p. 39-44, 2007.

ARASHIRO, E. K.; FONSECA, J. F.; SIQUEIRA, L. G. B.; FERNANDES, C. A.; BRANDAO, F. Z.; OBA, E.; VIANA, J. H. Assessment of luteal function in goats by ultrasonographic image attribute analysis. *Small Ruminant Research*, v. 94, p. 176-179, 2010.

ARAUJO, R. R.; GINTHER, O. J. Vascular perfusion of reproductive organs in pony mares and heifers during sedation with detomidine or xylazine. *American Journal of Veterinary Research*, v. 70, n. 1, p. 141-148, 2009.

BRÄNNSTRÖM, M.; ZACKRISSON, U.; HAGSTRÖM, H. G.; JOSEFSSON, B.; HELLBERG, P.; GRANBERG, S.; COLLINS, W. P.; BOURNE, T. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertility and Sterility*, v. 69, n. 3, p. 435-442, 1998.

CHUI, D. K. C.; PUGH, N. D.; WALKER, S. M.; GREGORY, L.; SHAW, R. W. Follicular vascularity – the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in vitro fertilization programme: a preliminary study. *Human Reproduction*, v. 12, n. 1, p. 191-196, 1997.

GASTAL., E.L.; GASTAL, M.O; DONADEU, F.X.; ACOSTA, T.J.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Temporal relationship among LH, estradiol, and follicle vascularization preceding the first compared with later ovulations during the year in mares. *Animal Reproduction Science*, v.102, p.314-321, 2007.

GHINTER, O.J. *Ultrasonic imaging and animal reproduction: color Doppler ultrasonography*. Book 4. Cross Plain: Equiservices Publishing, 258p, 2007.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; NAVANUKRAW, C.; JOHNSON, M. L.; VONNAHME, K. A.; FORD, S. P.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *Journal of Animal Science*, v. 85, n. 8, p. 1914-1922, 2007.

HUEY, S.; ABUHAMAD, A.; BARROSO, G.; HSU, M.; KOLM, P.; MAYER, J.; OEHNINGER, S. Perifollicular blood flow Doppler indices, but not pO₂, pCO₂ or pH, predict oocyte developmental competence in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, v.72, n. 4, p.707-712, 1999.

JIANG, J. Y.; MACCHIARELLI, G.; MIYABAYASHI, K. Follicular microvasculature in the porcine ovary. *Cell Tissue Research*, v. 310, p.

93-101, 2002.

JIANG, J. Y.; MACCHIARELLI, G.; TSANG, B. K.; SATO, E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction*, v. 125, p. 211-223, 2003.

KOTOYORI, Y.; YOKOO, N.; ITO, K.; MURASE, H.; SATO, F.; KOROSUE, K.; NAMBO, Y. Three-dimensional ultrasound imaging of the equine fetus. *Theriogenology*, v. 77, p. 1480-1486, 2012.

LE CLEAC'H, N.; RICHARD, C.; KIEFER, H.; LECARPENTIER, E.; HALLÉ, V.; MOREL, O.; LE BOURHIS, D.; JAMMES, H.; CHAVATTE-PALMER, P. Ultrasound evaluation of fetal and placental development in somatic cell nuclear transfer and artificial insemination bovine pregnancies. *Reproduction Fertility and Development*, v. 24, n. 1, p. 118-118, 2012.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; ZANNONI, A.; CASTELLANI, G.; BERARDINELLI, P.; SCAPOLO, P. A. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 1014-1019, 2001.

MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: practical use for reproductive management in the cow. *The Veterinary Journal*, v. 181, p. 232-240, 2009.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; HAYASHI, K.G.; KAMADA, D.; KAWASHIMA, C.; KANECO, E.; ACOSTA, T.J.; MATSUI, M. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. *Journal of Reproduction and Development*, v. 52, n. 1, p.153-160, 2006.

PANCARCI, S. M.; GÜNGÖR, Ö.; ATAKISI, O.; CIGREMIS, Y.; ARI, U. C.; BOLLWEIN, H. Changes in follicular blood flow and nitric oxide levels in follicular fluid during follicular deviation in cows. *Animal Reproduction Science*, v. 123, p. 149-156, 2011.

PANCARCI, S. M.; ARI, U. C.; ATAKISI, O.; GÜNGÖR, Ö.; CIGREMIS, Y.; BOLLWEIN, H. Nitric oxide concentrations, estradiol-17 β progesterone ratio in follicular fluid, and COC quality with respect to perifollicular blood flow in cows. *Animal Reproduction Science*, v. 130, p.9-15, 2012.

- PORTELA, V. M.; MACHADO, M.; BURATINI JR, J.; ZAMBERLAM, G.; AMORIM, R. L.; GONÇALVES, P.; PRICE, C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 83, n. 3, p. 339-346, 2010.
- RAUCH, A.; KRÜGER, L.; MIYAMOTO, A.; BOLLWEIN, H. Colour Doppler sonography of cystic ovarian follicles in cows. *Journal of Reproduction and Development*, v. 54, n. 6, p. 447-453, 2008.
- REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. *Reviews of Reproduction*, v. 1, n. 3, p. 182-192, 1996.
- RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction*, v. 82, p. 1021-1029, 2010.
- SIDDIQUI, M. A. R.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; ALMAMUN, M.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Relationship of vascular perfusion of the wall of the preovulatory follicle to in vitro fertilization and embryo development in heifers. *Reproduction*, v. 137, p. 689-697, 2009a.
- SIDDIQUI, M. A. R.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O. J. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 113, p. 287-292, 2009b.
- SILVA, L. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. *Animal Reproduction*, v. 3, n. 3, p. 339-346, 2006.
- SINGH, J.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Animal Reproduction Science*, v. 78, n. 3-4, p. 371-399, 2003.
- SIQUEIRA, L. G.; TORRES, C. A.; AMORIM, L. S.; SOUZA, E. D.; CAMARGO, L. S.; FERNANDES, C. A.; VIANA, J. H. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, v. 115, n. 1-4, p. 18-28, 2009.
- SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction*, v. 9, n. 1, p. 35-48, 2003.
- VLAISAVLJEVIC, V.; BORKO, E.; RADAKOVIC, B.; ZAZULA, D.; DOSEN, M. Changes in perifollicular vascularity after administration of human chorionic gonadotropin measured by quantitative three-dimensional power Doppler ultrasound. *The Middle European Journal of Medicine*, v. 122 (suppl 2), p. 85-90, 2010.
- WERNER, H.; DOS SANTOS, J. R. L.; FONTES, R.; DALTRO, P.; GASPARETTO, E.; MARCHIORI, E.; CAMPBELL, S. Additive manufacturing models of fetuses built from three dimensional ultrasound, magnetic resonance imaging and computed tomography scan data. *Ultrasound Obstetrics and Gynecology*, v. 36, p. 355-361, 2010.

Capítulo II

Aspiração folicular guiada por ultrassonografia utilizando um sistema adaptado para coleta *in vivo* de fluido folicular e células da granulosa de folículos bovinos de diferentes tamanhos

RESUMO

A análise de expressão gênica tem sido amplamente utilizada nos estudos sobre a fisiologia do folículo ovariano. A maioria dos estudos sobre a função das células da granulosa (CG) foi realizada *in vitro*, utilizando fluido folicular (FF) e células foliculares recuperadas de ovários de matadouro ou oriundos de ovariectomia. Esta abordagem não permite a análise sequencial da mesma doadora e não considera as condições reprodutivas da doadora e o estágio de desenvolvimento do folículo, limitando assim a interpretação dos resultados. O objetivo do presente estudo foi desenvolver um sistema adaptado para aspiração folicular guiada pela ultrassonografia para a coleta *in vivo* de FF e CG de folículos ovarianos bovinos de menor diâmetro. Um ensaio preliminar *in vitro* foi realizado para calcular a perda de fluido folicular causado pelo circuito de Teflon usado no procedimento convencional de aspiração folicular. Uma ou duas palhetas de sêmen de 0,25mL foi adaptada ao sistema de aspiração para a punção de folículos com diâmetro inferior a 10 mm. Um experimento *in vivo* foi realizado para testar a eficiência desta adaptação na recuperação de FF. Folículos com diâmetros variando entre 4 e 16 mm (n=108) foram aspirados individualmente utilizando o sistema convencional (diâmetro ≥ 10 mm) ou o sistema adaptado. Em um terceiro experimento, folículos de 4, 6, 8, 10 e 12 mm foram aspirados em fêmeas bovinas para avaliar a recuperação de CG e mRNA. No ensaio preliminar *in vitro*, as perdas no volume esperado foram de 12,7 \pm 1,1; 19,9 \pm 2,5; 54,4 \pm 4,0; 87,6 \pm 4,3 e 100% para folículos com diâmetro de 12, 10, 8, 6 e 4 mm, respectivamente. Após a adaptação do sistema de aspiração folicular as perdas no volume esperado para folículos de 8, 6 e 4 mm de diâmetro reduziram para 21,7 \pm 3,3; 24,4 \pm 4,0 e 26,1 \pm 5,0%; respectivamente. No experimento *in vivo*, utilizando o sistema adaptado, o volume de FF recuperado de folículos ≤ 8 mm não diferiu do volume esperado. Com o sistema convencional, de 9 até 11 mm de diâmetro, o volume de FF recuperado não diferiu do volume esperado. Uma perda significativa de volume foi observada em folículos ≥ 12 mm. No terceiro experimento, o número de CG não diferiu entre as categorias foliculares. Não foi observado efeito do tamanho do folículo na quantidade de mRNA extraída das amostras. Em conclusão, o sistema adaptado permitiu a aspiração e coleta individual de material biológico (FF, CG e mRNA) de folículos pequenos. Adicionalmente, as amostras forneceram material suficiente para posteriores análises endócrinas e de expressão gênica.

Palavras-Chave: Células da granulosa, fluido folicular, bovino.

ABSTRACT

Gene expression analysis is being widely used in studies on ovarian follicles physiology. Most studies of granulosa cell (GC) function have been performed in vitro, using follicular fluid (FF) and cells recovered from slaughterhouse ovaries or from ovariectomy. This approach does not allow sequential analysis in the same donor; do not consider the donor's reproductive status and follicular developmental stage, limiting data interpretation and usefulness. The aim of the present study was to develop an adapted ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration (TVFA) procedure to recover FF and mural GC from small follicles of live cows donors. A preliminary in vitro trial was performed to calculate fluid losses using a conventional TVFA Teflon circuit. One or two 0.25mL semen straw was adapted to the TVFA system to aspirate follicles with diameter <10mm. An in vivo experiment was performed to test the adapted TVFA system. Follicles ranging from 4 to 16 (n=108) mm in diameter were aspirated individually using the conventional system (for follicle of ≥ 10 mm diameter) or the adapted TVFA system for smaller follicles. In a third experiment, follicles of 4, 6, 8, 10 and 12 mm were aspirated from live cows donors. GC samples were submitted to RNA extraction. In the preliminary in vitro trial, the losses of expected volume were 12.7 \pm 1.1, 19.9 \pm 2.5, 54.4 \pm 4.0, 87.6 \pm 4.3 and 100% for follicles of 12, 10, 8, 6 and 4 mm in diameter, respectively. Using the adapted TVFA system the losses of expected volume for follicles of 8, 6 and 4 mm in diameter decreased to 21.7 \pm 3.3; 24.4 \pm 4.0 e 26.1 \pm 5.0%, respectively. In the in vivo trial, using the adapted system, the volume of FF recovered from follicles ≤ 8 mm was not different from the expected volume. Using the conventional system, from 9 to 11 mm in diameter the volume of FF recovered was not different from the expected volume. A significant volume loss was observed in follicles ≥ 12 mm. In the third experiment, the number of GC recovered was not different among follicular category in. A follicle size effect was not observed in the amount of mRNA extracted from GC samples. In conclusion, the adapted TVFA system successfully allowed individually aspiration and sample collection of

biological material (FF, GC and mRNA) form small follicles. Moreover, the samples provided enough biological material for further endocrine and gene expression analyses.

Keywords: Granulosa cells, follicular fluid, bovine.

1. INTRODUÇÃO

Estudos envolvendo as células da granulosa e o fluido folicular estão sendo conduzidos para compreender melhor a ação destes importantes componentes no processo de desenvolvimento folicular. Como a coleta *in vivo* de amostras de material biológico para os protocolos de biologia molecular ainda é um desafio (Bonnet et al., 2008), a maioria dos estudos utilizou amostras de fluido folicular e células da granulosa recuperadas a partir de ovários obtidos em matadouros (Glister et al., 2006; Sisco e Pfeffer, 2007; Monniaux et al., 2008; Tabandeh et al., 2010) ou após ovariectomia (Valdez et al 2005; Canty et al., 2006; Luo et al., 2011). Embora seja prática, neste tipo de abordagem, em geral existe pouca ou nenhuma informação a respeito das condições reprodutivas da doadora ou eventuais efeitos ambientais sobre este animal, e a funcionalidade e a fase do desenvolvimento do folículo são indiretamente estimadas pelo seu diâmetro, aparência ou pela relação E2/P4 (Hayashi et al., 2004; Nishimoto et al., 2009). Além disso, coletas sequenciais de amostras em um mesmo animal não são possíveis utilizando ovários de matadouro ou ovariectomia. O cultivo *in vitro* de células da granulosa altera o padrão de esteroidogênese das células, principalmente induzindo o processo de luteinização (Mingoti et al., 2002). Todos esses fatores limitam a interpretação dos resultados obtidos a partir de ovários de matadouro e sua extrapolação para a condição *in vivo*.

A coleta *in vivo* de amostras de fluido folicular e células da granulosa abre um leque enorme de possibilidades nas pesquisas sobre fisiologia ovariana. Para a coleta *in vivo* dessas amostras, comumente utilizados os procedimentos e equipamentos da aspiração folicular guiada pela ultrassonografia, referenciada apenas como aspiração folicular. No entanto, a técnica de aspiração folicular convencional não foi desenvolvida para a aspiração individual de folículos e nem para a recuperação de amostras de pequenos volumes. Estudos anteriores reportaram o uso da aspiração folicular convencional para coleta *in vivo* de amostras de fluido folicular e células da granulosa, no entanto apenas folículos pré-ovulatórios foram aspirados (Leroy et al., 2004; White et al., 2008; Bossaert et al., 2010; Lavon et al., 2011). Em outro experimento, as amostras foram

recuperadas *in vivo* de folículos menores, porém não foi possível obter uma amostragem individual, e pequenos *pools* de amostras foram utilizados (Robert et al., 2003). A dinâmica folicular apresenta algumas diferenças nas raças zebuínas, como por exemplo, menor diâmetro no momento da divergência (Sartorelli et al., 2005; Viana et al., 2010) e ovulação (Gimenes et al., 2008). Assim, o estudo da função folicular em animais zebu por meio da coleta *in vivo* de amostras de fluido folicular e células da granulosa necessitaria de aspirações de folículos menores quando comparados aos estudos com raças taurinas. Além disso, a possibilidade de aspirar individualmente folículos de menor diâmetro permitiria o estudo *in vivo* do desenvolvimento folicular em todas as suas fases. A eficiência do sistema aspiração folicular para coleta individual de material biológico para posteriores análises hormonais e moleculares a partir de folículos menores ainda não foi avaliada.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi (1) adaptar o sistema de aspiração folicular convencional e avaliar sua eficiência na coleta *in vivo* individual de amostras de fluido folicular e células da granulosa de folículos ovarianos de menor diâmetro; (2) avaliar a quantidade de mRNA extraída das amostras de células da granulosa coletadas de folículos menores.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANIMAIS

O presente estudo foi realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite em Coronel Pacheco – MG. Todos os procedimentos experimentais realizados nos animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (Protocolo CEUA-CNPGL nº: 2/2011). Com o objetivo de desenvolver um sistema adaptado de aspiração folicular e avaliar sua eficiência na coleta *in vivo* de amostras individuais de fluido folicular e células da granulosa de folículos ovarianos de diferentes diâmetros, três experimentos foram realizados. Inicialmente, um estudo preliminar *in vitro* (Experimento I) foi conduzido para desenvolver o sistema adaptado de aspiração folicular. Um segundo experimento foi realizado (Experimento II) *in vivo* para avaliar a eficiência do

sistema convencional e adaptado de aspiração folicular na recuperação de amostras individuais de fluido folicular a partir de folículos de diferentes diâmetros. No Experimento III, foi avaliada a eficiência do sistema convencional e adaptado de aspiração folicular na recuperação de amostras individuais de células da granulosa a partir de folículos de aproximadamente 4, 6, 8, 10 e 12 mm de diâmetro. No experimento III, a quantidade de mRNA extraída das amostras foi quantificada. Nos experimentos II e III foi utilizado um total de 60 fêmeas bovinas, sendo 30 em cada experimento. Todos os animais apresentavam atividade ovariana cíclica e nenhuma anormalidade reprodutiva detectável pela ultrassonografia foi observada.

2.2 EXPERIMENTO I: ADAPTAÇÃO DO SISTEMA DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Um estudo preliminar *in vitro* foi realizado para calcular a perda de volume ao utilizar um circuito de Teflon de 80 cm de comprimento e 1,0 mm de diâmetro interno (WTA Tecnologia Aplicada, Cravinhos, Brasil) normalmente utilizado no sistema convencional de aspiração folicular. Um volume conhecido de plasma sanguíneo, idêntico ao volume esperado de fluido folicular presente em folículos ovarianos de 4, 6, 8, 10 e 12 mm de diâmetro (0,03; 0,11; 0,27; 0,52 e 0,90 mL, respectivamente – volume determinado pela fórmula $\frac{4}{3}\pi r^3$, onde r é a metade do diâmetro folicular) foi colocado em tubo de 1,5 mL (Figura 1).

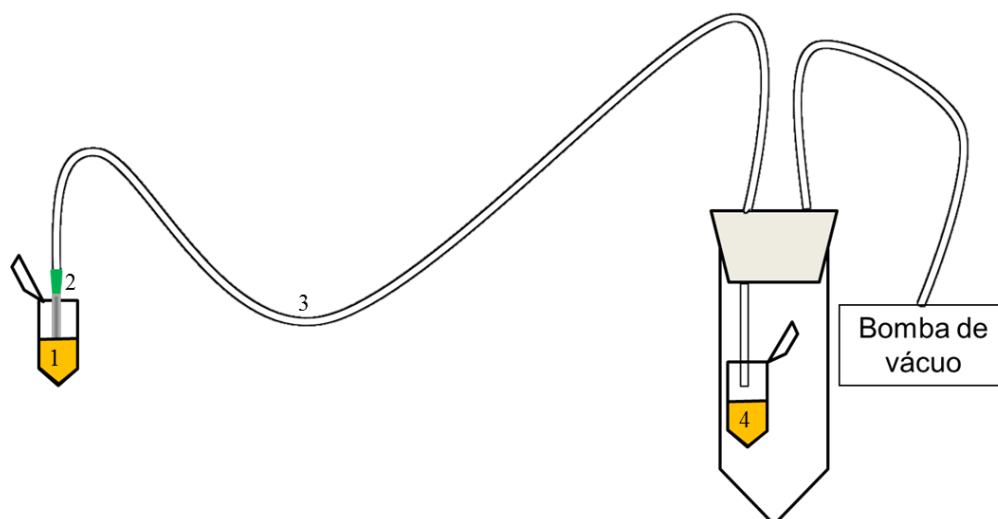


Figura 1. Esquema do ensaio *in vitro* de aspiração de plasma sanguíneo para determinação da perda de volume causada pelo circuito de teflon. **1**, Tubo de 1,5 mL; **2**, Agulha de 20G; **3**, Circuito de Teflon; **4**, Tubo de 1,5 mL para recuperação da amostras após a aspiração.

Posteriormente, este volume foi aspirado, utilizando-se uma agulha 20G conectada ao circuito de teflon, e recuperado em um segundo tubo de 1,5 mL. O volume de plasma sanguíneo recuperado foi pesado e o volume foi calculado pela diferença entre o peso do tubo com a amostra e o peso do tubo vazio (previamente pesado), considerando a densidade do plasma sanguíneo igual a 1,06 g/mL. Para cada diâmetro folicular, a aspiração do volume esperado foi repetida cinco vezes. Em virtude das elevadas perdas observadas para os folículos de 4, 6 e 8 mm de diâmetro, o sistema convencional de aspiração folicular foi adaptado conectando-se uma palheta estéril de sêmen (0,25 mL) entre a agulha e o

circuito de teflon (Figura 2). Dessa forma o volume de fluido folicular foi recuperado diretamente na palheta, evitando que o fluido percorresse todo o circuito de teflon. Utilizando o sistema adaptado de aspiração folicular, o ensaio *in vitro* foi repetido para os folículos de 4, 6 e 8 mm de diâmetro. Para a determinação do volume recuperado, o plasma sanguíneo presente na palheta de sêmen foi transferido para um tubo de 1,5 mL. Na aspiração do volume esperado para folículos de 4 e 6 mm, apenas uma palheta de sêmen foi utilizada. Para os folículos de 8 mm, duas palhetas foram adaptadas ao circuito de teflon, sendo que em uma das palhetas o tampão de algodão foi retirado.

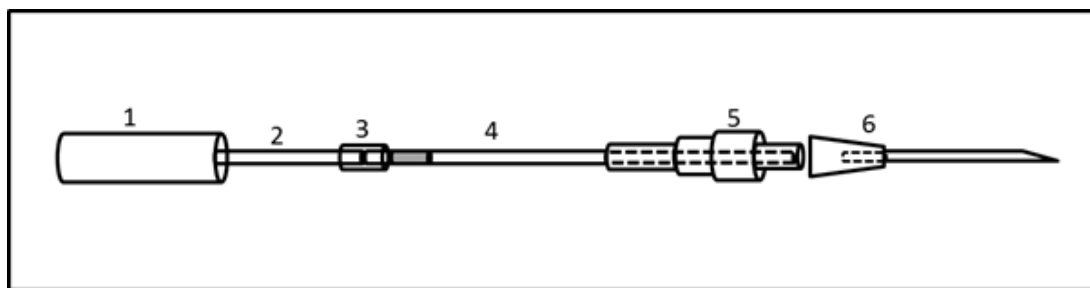


Figura 2. Ilustração do sistema adaptado de aspiração folicular. Uma palheta de sêmen de 0,25 mL (4) foi colocada entre o circuito de Teflon (2) e a agulha (6); um pequeno tubo de silicone (3) foi utilizado para manter unidos a palheta de sêmen e o circuito de Teflon, além de selar o circuito e permitir a formação da pressão negativa durante a aspiração. Quando o folículo tinha 8 mm de diâmetro, uma segunda palheta de sêmen era adicionada entre a primeira palheta (4) e a agulha (6). O tampão de algodão da segunda palheta era removido e outro tubo de silicone era utilizado para manter as duas palhetas de sêmen unidas. **1**, Guia da agulha; **2**, Circuito de Teflon; **3**, Tubo de silicone; **4**, Palheta de sêmen (0,25 mL); **5**, Adaptador da agulha; **6**, Agulha 20G.

2.3 EXPERIMENTO II: RECUPERAÇÃO *IN VIVO* DE FLUIDO FOLICULAR UTILIZANDO O SISTEMA ADAPTADO DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR

O segundo experimento foi realizado *in vivo* para avaliar o sistema adaptado de aspiração folicular descrito anteriormente (item 2.2). A emergência da onda folicular foi sincronizada em 30 fêmeas bovinas por meio da inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest, Ourofino), no mesmo momento foi administrada por via intramuscular 2mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ourofino, Ribeirão Preto, Brasil). Exame ultrassonográfico a cada 24 horas (transdutor de 7,5 MHz) foi realizado para identificar a emergência da onda folicular. Folículos da nova onda folicular, com diâmetros variando entre 4,0 e 16,8 mm de diâmetro (n=108), foram visualizados, mensurados e individualmente aspirados. Para a análise dos dados, os folículos foram divididos em 12 categorias de acordo com o diâmetro (categorias 4 a 15). Na categoria 4, foram alocados os folículos com 4 a 4,9 mm de diâmetro, na categoria 5 os folículos com 5,0 a 5,9 mm, e assim por diante até a categoria 15 onde foram alocados os folículos com diâmetro superior a 15 mm.

A aspiração folicular foi realizada utilizando um aparelho portátil de ultrassonografia (Mylab30 VetGold, Esaote, Genova, Itália) equipado com um transdutor vaginal micro convexo de 7,5 MHz conectado ao guia da agulha (WTA, tecnologia Aplicada). A preparação das doadoras para os procedimentos de aspiração folicular seguiu o protocolo previamente descrito (Viana et al., 2004). Para folículos maiores do que 8 mm de diâmetro, a agulha foi conectada ao circuito de teflon e as amostras foram recuperadas em tubos de 1,5 mL colocadas dentro de tubos de 50 mL. Para evitar contaminação cruzada, o circuito de Teflon e a

agulha eram substituídos após cada aspiração folicular. Folículos com diâmetros menores ou iguais a 8 mm foram aspirados utilizando o sistema adaptado descrito na seção anterior. Duas palhetas de sêmen foram utilizadas apenas na aspiração de folículos com 8 mm de diâmetro. Tanto no sistema convencional como no sistema adaptado, a pressão negativa no momento da aspiração foi criada com o auxílio de uma seringa descartável de 10 mL. Imediatamente após o colapso do folículo a agulha era rapidamente retirada do ovário e o sistema verificado para a presença do fluido folicular e eventual contaminação com sangue. Como descrito anteriormente (item 2.2), o volume de fluido folicular recuperado foi determinado com base no peso da amostra (considerando a densidade do fluido folicular igual a 1,03 g/mL).

2.4 EXPERIMENTO III: RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS DA GRANULOSA UTILIZANDO O SISTEMA ADAPTADO DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR

O Experimento III teve como objetivo avaliar o número de células da granulosa e a quantidade de mRNA recuperados *in vivo* de folículos de diferentes diâmetros utilizando o sistema adaptado de aspiração folicular. Com o mesmo protocolo hormonal descrito anteriormente (item 2.3), a emergência da onda folicular foi sincronizada em 30 fêmeas bovinas. Avaliação ultrassonográfica foi realizada a cada 24 horas para identificar a emergência da nova onda folicular. Após a emergência da nova onda, folículos de 4 (n=12), 6 (n=21), 8 (n=21), 10 (n=34) e 12 (n=12) mm de foram individualmente aspirados. Os procedimentos de aspiração folicular foram os mesmos descritos na seção anterior. Para reduzir a probabilidade de contaminação com sangue, apenas dois folículos por ovário foram aspirados.

O volume da amostra de fluido folicular foi determinado (com base no peso da amostra; considerando a densidade do fluido folicular igual a 1,03 g/mL). Em seguida, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 600x g. O fluido folicular (sobrenadante) foi separado e armazenado a -20° C até a determinação da concentração de estradiol e progesterona por radioimunoensaio. O pellet de células da granulosa foi ressuspenso com 200 µL de solução de hialuronidase a 0,1% e agitado em vortex durante 5 minutos para desfazer os aglomerados de células. A amostra foi então lavada duas vezes com PBS (200 µL) e ressuspenso em 100 µL de PBS. Para a contagem de células da granulosa em câmara de Neubauer, 10 µL da amostra foram diluídos em 90 µL de PBS. O número médio de células contado nos dois campos da câmara foi multiplicado por 500.000, obtendo-se assim o número de células por mL. Esse resultado foi corrigido para um volume final de 90 µL, obtendo-se assim a quantidade de células na amostra. Mesmo após o tratamento das amostras com hialuronidase, ainda foi possível observar a presença de aglomerados de células da granulosa. Na câmara de Neubauer, cada aglomerado de células foi contado como uma célula.

Ensaio preliminares realizados no laboratório demonstraram que a extração de mRNA utilizando Rneasy Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) foi mais eficiente em alíquotas com 100 mil células. Assim, alíquotas com no mínimo 100 mil células foram transferidas para criotubos e preservadas em RNA later (Ambion, Austin, Estados Unidos) durante o transporte até o laboratório, sendo posteriormente congeladas a -20° C até o processo de extração de mRNA. Quando presente o complexo *cumulus*-oócito era removido da amostra antes da primeira centrifugação. Estudos anteriores mostraram que folículos saudáveis e em crescimento apresentaram uma relação estradiol:progesterona (E2:P4) maior do que 1 (Glistler et al., 2006; Nishimoto et al., 2009). Assim, todas as amostras de fluido folicular e células da granulosa utilizadas na análise estatística foram recuperadas de folículos saudáveis e em crescimento, i.e, razão E2:P4 > 1. As amostras contaminadas com sangue ou com menos de 100.000 células foram consideradas amostras perdidas e não foram utilizadas para extração de mRNA.

2.4.1 Extração de mRNA, transcrição reversa e PCR

Os protocolos de extração de RNA e transcrição reversa foram realizados no Laboratório de Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG. Inicialmente, o mRNA

total foi extraído utilizando o Rneasy Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante e tratadas com Dnase. O RNA total foi quantificado utilizando 1 µL da amostra e um espectrofotômetro ND-100 (NanoDrop, Wilmington, Estados Unidos). As amostras de mRNA total foram submetidas a transcrição reversa (RT) usando o SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) e um primer oligodT, de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi submetido a PCR convencional com o primer para os genes endógenos GAPDH (F–5'CCAACGTGTCTGTTCTGGATCTGA3'; R–5'GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG3') e B-ACTIN (F–5' GACATCCGCAAGGACCTCTA3'; R–5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3') para avaliar se a quantidade de RNA foi suficiente. Após a PCR, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2% para confirmar o tamanho do fragmento. A contaminação das amostras com de células da teca foi avaliada por meio da identificação de mRNA para a enzima CYP17A1 (P45017α) por PCR em tempo real (o protocolo tempo real está descrito no Capítulo III – item 2.5).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis (perda de volume, volume de fluido folicular, número de células da granulosa e quantidade de RNA recuperada) foram avaliadas para normalidade e homocedasticidade por meio dos testes de Lilliefors e Cochran e Bartlett. O efeito da categoria folicular sobre a quantidade total de mRNA extraída foi analisado por ANOVA e as diferenças entre as médias foram comparadas por meio do Teste de Tukey. A eficiência na recuperação *in vivo* de fluido folicular foi determinada pela análise de regressão.. A probabilidade de 5% foi utilizada para expressar diferença significativa. Os resultados são apresentados como média±erro padrão da média (EPM).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio preliminar *in vitro*, as perdas no volume recuperado aumentaram paralelamente com a redução do diâmetro folicular (Tabela 1), atingindo 100% no volume esperado para folículos de 4 mm de diâmetro (30µL). Quando o sistema adaptado foi utilizado, as perdas no volume recuperado para folículos de 8, 6 e 4 mm de diâmetro diminuíram, não sendo observada diferença significativa em relação às perdas observadas quando volumes esperados de folículos de 12 e 10 mm foram aspirados com o sistema convencional (Tabela 1).

Tabela 1. Perdas na aspiração simulada *in vitro* do volume esperado em folículos com 4, 6, 8, 10 e 12 mm de diâmetro (média±EPM).

Diâmetro folicular (mm)	Volume esperado* (mL)	Método de aspiração folicular	
		Sistema convencional	Sistema adaptado
		Perda de volume (%)	Perda de volume (%)
12	0,90	12,7±1,1 ^a	NR
10	0,52	19,9±2,5 ^a	NR
8	0,27	54,4±4,0 ^b	21,7±3,3
6	0,11	87,6±4,3 ^c	24,4±4,0
4	0,03	100±0,0 ^d	26,1±5,0

*Volume calculado pela fórmula $(4/3\pi r^3)$ ^{a,b,c,d} Médias sobrescritas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

NR – Não realizado

O fluido folicular, assim como o plasma sanguíneo, é composto por inúmeros componentes, incluindo proteínas coloides e mucopolissacarídeos (Edwards, 1974), conseqüentemente apresenta um grau variado de viscosidade (Luck et al., 2000). A viscosidade faz com que se formem gradientes de velocidades quando o fluido passa através de um sistema tubular. O fluxo na parte interna do tubo se torna mais rápido do que o fluxo na periferia (Horne et al., 1996). Esse fenômeno faz com que o fluido se espalhe pela superfície interna do circuito de aspiração, e conseqüentemente faz com que a perda do volume aspirado seja proporcionalmente maior quando o volume aspirado é menor. A adaptação realizada no sistema de aspiração folicular contornou esse

problema, tornando viável a recuperação de pequenos volumes contidos em folículos menores (Tabela 1).

No experimento realizado *in vivo* (Experimento II), um total de 108 folículos variando de 4 a 16,8 mm de diâmetro foram aspirados. As taxas de recuperação de volume de fluido folicular para cada grupo folicular estão demonstradas na Tabela 2. A coleta de fluido folicular foi obtida em 96,3% das tentativas (104/108), com eficiência geral de recuperação do volume de 89,1%. Foi observada uma perda progressiva no volume recuperado de fluido folicular (Figura 3), sendo significativa a partir de 12 mm de diâmetro (Tabela 2).

Tabela 2. Volume esperado e volume recuperado de fluido folicular de folículos de 4 a 16 mm de diâmetro aspirados *in vivo* pela técnica convencional (folículos com diâmetro > 8 mm) ou pela técnica adaptada (folículos diâmetro ≤ 8mm). (média±EPM).

Grupo	Ø Foliculo (mm)	Volume esperado* (mL)	Volume recuperado (mL)	Recuperação (%)
4 (8)	4,45±0,21	0,05±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	75,16±8,68
5 (8)	5,21±0,07	0,07±0,00 ^a	0,09±0,01 ^a	126,76±13,99
6 (9)	6,26±0,08	0,13±0,01 ^a	0,11±0,01 ^a	82,14±8,85
7 (7)	7,33±0,13	0,21±0,01 ^a	0,12±0,02 ^a	55,79±9,65
8 (10)	8,38±0,08	0,31±0,01 ^a	0,20±0,02 ^a	64,69±6,58
9 (10)	9,18±0,06	0,41±0,01 ^a	0,42±0,04 ^a	102,44±11,10
10 (11)	10,20±0,05	0,56±0,01 ^a	0,51±0,02 ^a	92,10±4,03
11 (11)	11,35±0,11	0,77±0,02 ^a	0,68±0,07 ^a	82,5±9,25
12 (10)	12,27±0,07	0,97±0,02 ^a	0,76±0,08 ^b	78,23±7,61
13 (9)	13,22±0,08	1,21±0,02 ^a	1,01±0,05 ^b	83,17±4,37
14 (7)	14,52±0,13	1,60±0,04 ^a	1,17±0,12 ^b	72,94±7,11
15 (9)	15,98±0,57	2,56±0,14 ^a	1,48±0,13 ^b	57,81±6,54

^{a,b} Médias acompanhadas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)*Volume calculado pela fórmula $(4/3\pi r^3)$, onde $\pi=3,1416$ e r é a metade do diâmetro folicular.

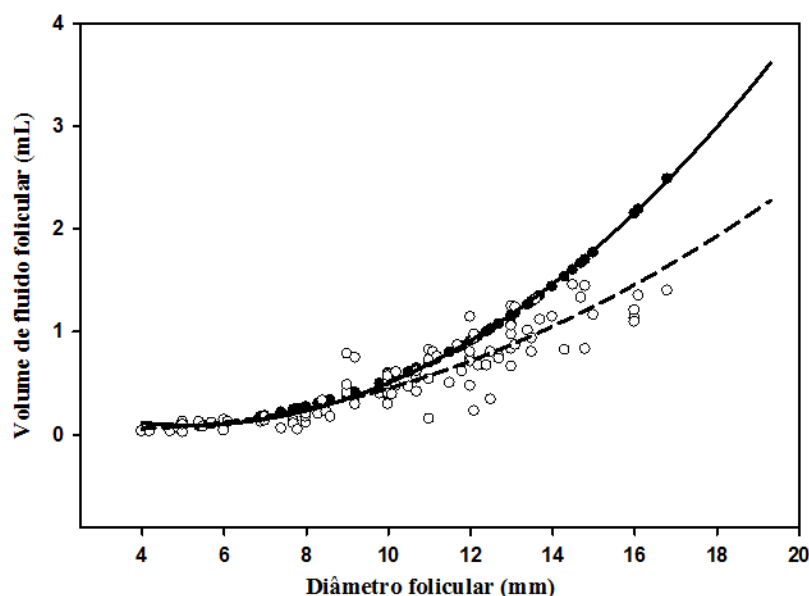


Figura 3. Volume esperado* (●) e volume recuperado (○) de fluido folicular a partir de folículos de diferentes diâmetros aspirados *in vivo* utilizando o sistema convencional de aspiração folicular (fóliculo com diâmetro > 8 mm) e o sistema adaptado (folículos com diâmetro ≤ 8 mm). $y=0,008x^2-0,05x+0,014$; $r^2=0,72$. * Volume calculado pela fórmula $(4/3\pi r^3)$, onde $\pi=3,1416$ e r é a metade do diâmetro folicular.

O volume de fluido folicular recuperado de folículos de 4 a 8 mm de diâmetro, quando utilizou-se o sistema adaptado de aspiração folicular, foi similar ao volume esperado. Esses resultados mostram que a adaptação realizada no sistema de aspiração permitiu que o fluido folicular de folículos com tamanho reduzido fosse individual e eficientemente recuperado. Quando o sistema convencional de aspiração foi utilizado para aspirar folículos maiores que 8 mm de diâmetro, uma perda progressiva no volume recuperado de fluido folicular foi observada (Tabela 2). Essa perda não pode ser atribuída ao sistema de aspiração, ou mesmo ao procedimento, utilizados uma vez que a visualização destes folículos no monitor, e consequentemente sua aspiração, foram mais fáceis. Durante a aspiração folicular, o volume do foliculo reduz progressivamente até que todo seu conteúdo tenha sido aspirado, ocorrendo o colapamento total de sua parede. Em folículos maiores, esse colapamento da parede folicular sobre o bisel da agulha pode acontecer antes que todo o fluido folicular tenha sido aspirado, acarretando assim uma perda maior no volume recuperado. Dentro deste contexto, um estudo demonstrou que a recuperação do complexo-*cumulus*-oócito foi menor em folículos maiores em relação ao observado nos folículos menores (Seneda et al., 2001).

O sistema de aspiração folicular foi desenvolvido para a recuperação de complexo-*cumulus*-oócito (Pieterse et al., 1988), porém células da granulosa estão presentes no fluido folicular recuperado (Bossaerts et al., 2010). No Experimento III, a utilização do sistema de aspiração folicular (adaptado e convencional) também foi avaliada para a recuperação individual de amostras de células da granulosa a partir de folículos de diferentes diâmetros. O número de células da granulosa recuperado em cada categoria folicular pode ser observado na Tabela 3. A quantidade de mRNA extraída das amostras não foi afetada pelo diâmetro folicular. As células da granulosa encontram-se bastante aderidas umas as outras, e após a aspiração foi possível observar a presença de aglomerados de células. A presença desses aglomerados foi reportada em outro estudo (Bossaerts et al., 2010). Embora as amostras tenham sido submetidas a agitação em vortex, com solução de hialuronidase 0,1%, alguns aglomerados de células não se desfizeram. A presença destes grupos de células não permitiu uma contagem exata do número de células, e consequentemente, as células da granulosa podem não ter sido igualmente distribuídas quando as diferentes alíquotas de células foram preparadas. Dessa forma, não foi possível comparar o número de células coletadas entre as categorias foliculares. Portanto os dados apresentados servem apenas como indicativo de recuperação.

Tabela 3. Número de células da granulosa recuperadas *in vivo* a partir de folículos de diferentes diâmetros (média±EPM).

Categoria folicular (mm)	Número aproximado de CG recuperadas	mRNA total (ng)
4	316.750,00±41.764,15	249,91±49,96
6	556.023,81±71.717,03	538,37±138,42
8	590.357,14±80.855,60	553,76±129,22
10	526.308,82±58.279,87	799,67±204,15
12	487.291,67±70.955,64	426,56±91,03

À medida que o folículo ovariano desenvolve e cresce, as células da granulosa presentes na parede folicular se multiplicam. Contudo, contrariando as expectativas deste estudo, as amostras obtidas de folículos maiores não apresentaram um número de células muito maior do que as amostras obtidas de folículos menores. Provavelmente, em razão do pequeno volume, a pressão de sucção exercida sobre a camada de células da granulosa durante a aspiração seja maior quando comparada com folículos maiores. Adicionalmente, quando há o colapamento completo do folículo, uma porção proporcionalmente maior da parede folicular sofre uma escarificação ao entrar em contato com o bisel da agulha. Por outro lado, quando o folículo é maior, uma menor pressão de sucção é exercida sobre a camada de células da granulosa e uma porção menor da parede folicular sofre escarificação quando há o colapamento sobre o bisel da agulha. No entanto, o fato do folículo ter uma quantidade maior de células pode ter um efeito compensatório. Assim, apesar de terem menos células, uma proporção maior destas células é aspirada durante a punção de folículos pequenos. Contrariamente, os folículos maiores têm mais células, porém uma proporção menor destas células é aspirada.

Estudos anteriores sugerem que a taxa de multiplicação das células da granulosa e a taxa de

expansão do antro folicular não é coordenado (Rodgers et al., 1999a; Rodgers et al., 1999b). Isso significa que diferenças nessas taxas influenciam diretamente o número de camadas de células da granulosa e sua acomodação sobre a membrana basal do folículo. Caso a expansão do antro seja mais rápida do que a taxa de multiplicação das células da granulosa, o número de camadas de células será menor e as camadas serão mais compactas. Na situação oposta, se a expansão do antro for mais lenta, o número de camadas será maior e as camadas menos compactas (Rodgers e Irving –Rodgers, 2010), e provavelmente seu destacamento será mais fácil durante o processo de aspiração folicular. Esse fenômeno poderia explicar a ausência de diferença observada no número de células da granulosa recuperadas em função do diâmetro folicular.

Além do número de células da granulosa, a quantidade total de mRNA extraída de cada amostra também foi avaliada. A quantidade total de mRNA total não foi diferente em função da categoria folicular (Tabela 3). Pela PCR convencional foi possível detectar a presença de quantidade suficiente de mRNA para os genes endógenos GAPDH e β -ACTINA (Figura 4).

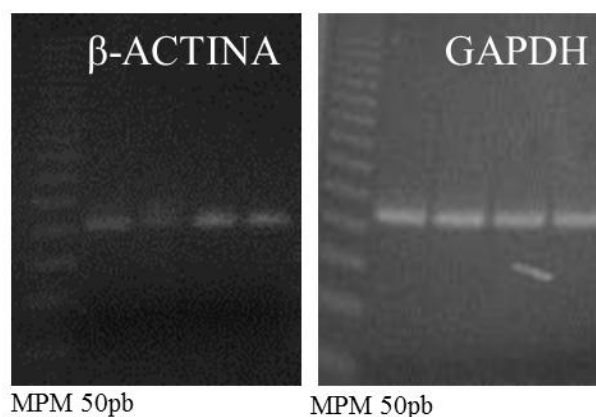


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose (2%) demonstrando a identificação do mRNA dos genes endógenos GAPDH (peso molecular: 237pb) e β -ACTINA (peso molecular: 224pb) nas amostras de CG. MPM, Marcador de peso molecular; pb, pares de bases.

A contaminação com sangue leva a um erro na contagem do número de células e interfere na eficiência da extração de mRNA utilizando os kits comerciais. Em função disto, foram excluídas do estudo as amostras onde foi observada a contaminação com sangue. Das amostras coletadas no Experimento III, 16% precisaram ser descartadas em função da contaminação com sangue e 4% foram excluídas por apresentarem uma quantidade de células da granulosa inferior a 100 mil (Tabela 4).

Tabela 4. Número de amostras de fluido folicular perdidas devido a contaminação por sangue ou quantidade insuficiente de células da granulosa (< 100 mil).

Categoria folicular (mm)	Folículos aspirados (n)	Amostras perdidas (n)	
		Sangue	< 100 mil células
4	19	5	2
6	23	2	0
8	25	3	1
10	38	4	0
12	15	2	1

Foi observado que quando a aspiração do folículo não é bem sucedida na primeira tentativa, em função da movimentação do animal ou dificuldade em visualizar e aspirar o folículo (menor diâmetro), eventuais lesões no ovário podem ocorrer e aumentar a probabilidade de contaminação da amostra com sangue em uma segunda tentativa. Por esta razão, o número de folículos aspirados no presente experimento foi limitado a apenas dois por ovário. A contaminação com sangue foi observada em todas as categorias foliculares, indicando que o risco de contaminação com sangue não está relacionado ao diâmetro folicular. Folículos de dimensões reduzidas (≤ 6 mm) são mais difíceis de serem aspirados, e lesões no estroma ovariano são mais prováveis de ocorrerem. Por outro lado, os folículos maiores, são mais fáceis de serem visualizados e aspirados, no entanto apresentam um plexo vascular mais desenvolvido na camada de células da teca.

O descarte de amostras por quantidade insuficiente de células também não esteve associado ao diâmetro folicular, uma vez que amostras com menos de 100 mil células foram coletadas de folículos grandes (12 mm), médios (8 mm) e pequenos (4 mm). Assim, os resultados sugerem que a perda de amostras quer seja por contaminação com sangue ou devido a quantidade insuficiente de células da granulosa não foi influenciada pela categoria folicular.

A presença de células da teca foi observada em 41% das amostras coletadas. Na análise de PCR em tempo real, houve a formação de um pico de

amplificação na temperatura de dissociação em algumas amostras. O valor (média \pm EPM) de Ct nas categorias foliculares de 4, 6, 8, 10 e 12 mm de diâmetro foi de 33,3 \pm 0,9; 34,6 \pm 0,8; 30,2 \pm 1,2; 31,3 \pm 0,8 e 32,6 \pm 1,4; respectivamente. No entanto, não foi possível observar a formação de bandas na eletroforese em gel de agarose 2%. Na curva de dissociação, também possível observar também a presença de picos referentes dímeros de *primers*. Esses resultados indicam que apesar de ter ocorrido a contaminação das amostras com células da teca, a quantidade foi considerada insignificante.

A presença de células da teca foi observada em amostras coletadas de folículos de todas as categorias foliculares. Assim como observado na contaminação com sangue, a presença de células da teca nas amostras foi considerada accidental. Quando a coleta é feita *in vivo* por meio da aspiração folicular, a agulha atravessa toda a parede folicular, incluindo a camada de células da teca. E eventualmente, algumas células da teca podem ser carregadas para dentro do folículo, sendo então aspiradas juntamente com o fluido folicular. A contaminação com células da teca também foi observada em amostras de células da granulosa coletadas de ovários de matadouro, mesmo com os folículos sendo dissecados e a sua parede interna levemente escarificada (Portela et al., 2010). Caso o gene a ser estudado seja específico para células da granulosa (p.ex., aromatase, receptor para FSH), a utilização da metodologia descrita no presente estudo é possível. Caso o gene seja expresso também em outros tipos celulares, recomenda-se a purificação das amostras ou a exclusão das amostras contaminadas com o tipo celular indesejado para que os resultados obtidos sejam mais confiáveis.

4. CONCLUSÃO

A adaptação realizada no sistema convencional de aspiração folicular, incluindo no início do circuito de aspiração um reservatório para pequenos volumes, contornou a perda de fluido observada na aspiração de folículos menores do que 10 mm; a quantidade de células coletadas permitiram realizar os protocolos de extração mRNA e obter quantidades suficientes de mRNA para realizar a transcrição reversa e posteriormente a PCR convencional, indicando o potencial desta metodologia em fornecer material biológico para análises moleculares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BONNET, A.; DALBIÈS-TRAN, R.; SIRARD, M. A. Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animal. *Reproduction*, v. 135, p. 119-128, 2008.
- BOSSAERT, P.; DE COCK, H.; LEROY, J. L.; DE CAMPENEERE, S.; BOLS, P. E.; FILLIERS, M.; OPSOMER, G. Immunohistochemical visualization of insulin receptors in formalin-fixed bovine ovaries post mortem and in granulosa cells collected in vivo. *Theriogenology*, v. 73, n. 9, p. 1210-9, 2010.
- CANTY, M. J.; BOLAND, M. P.; EVANS, A. C.; CROWE, M. A. Alterations in follicular IGFBP mRNA expression and follicular fluid IGFBP concentrations during the first follicle wave in beef heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 93, n. 3-4, p. 199-217, 2006.
- EDWARDS, R. G. Follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 37, n. 1, p. 189-219, 1974.
- EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, p. 829-838, 2001.
- GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A.; TORRES-JÚNIOR, J. R.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v. 69, n. 7, p. 852-858, 2008.
- GLISTER, C.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. *Journal of Endocrinology*, v. 188, n. 2, p. 215-225, 2006.
- HAYASHI, K. G.; BERISHA, B.; MATSUI, M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Expression of mRNA for the angiotensin system in granulosa cells during follicular development in cows. *Journal of Reproduction and Development*, v. 50, n. 4, p. 477-480, 2004.
- HORNE, R.; BISHOP, C. J.; REEVES, G.; WOOD, C.; KOVACS, G. T. Aspiration of oocytes for in-vitro fertilization. *Human Reproduction Update*, v. 2, n. 1, p. 77-85, 1996.
- LAVON, Y.; LEITNER, G.; KLIPPER, E.; MOALLEM, U.; MEIDAN, R.; WOLFENSON, D. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 40, p. 98-109, 2011.
- LEROY, J. L.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P. E.; DE KRUIF, A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 80, n. 3-4, p. 201-211, 2004.
- LUCK, M. R.; YE, J.; ALMISLIMANI, H.; HIBBERD, S. Follicular fluid rheology and the duration of the ovulatory process. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 120, n. 2, p. 411-421, 2000.
- LUO, W.; GUMEN, A.; HAUGHIAN, J. M.; WILT BANK, M. C. The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 84, n. 2, p. 369-378, 2011.
- MINGOTI, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA-E-SILVA, A. A. M. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. *Animal Reproduction Science*, v. 69, p. 175-186, 2002.
- MONNIAUX, D.; CLEMENTE, N.; TOUZÉ, J. L.; BELVILLE, C.; RICO, C.; BONToux, M.; PICARD, J. Y.; FABRE, S. Intrafollicular steroids and anti-mullerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biology of Reproduction*, v. 79, n. 2, p. 387-396, 2008.
- NISHIMOTO, H.; HAMANO, S.; HILL, G. A.; MIYAMOTO, A.; TETSUKA, M. Classification of bovine follicles based on the concentrations of steroids, glucose and lactate in follicular fluid and the status of accompanying follicles. *Journal of Reproduction and Development*, v. 55, n. 2, p. 219-224, 2009.
- PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, A. M.; TAVERNE, M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, v. 30, n. 4, p. 751-762, 1988.
- PORTELA, V. M.; MACHADO, M.; BURATINI JR, J.; ZAMBERLAM, G.; AMORIM, R. L.; GONÇALVES, P.; PRICE, C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian

- follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 83, n. 3, p. 339-346, 2010.
- ROBERT, C.; GAGNÉ, D.; LUSSIER, J. G.; BOUSQUET, D.; BARNES, F. L.; SIRARD, M. A. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction*, v. 125, p. 437-446, 2003.
- RODGERS, R. J.; LAVRANOS, T. C.; VAN WEZEL, I. L.; IRVING-RODGERS, H. F. Development of the ovarian follicular epithelium. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 151, n. 1-2, p. 171-179, 1999a.
- RODGERS, R. J.; VAN WEZEL, I. L.; IRVING-RODGERS, H. F.; LAVRANOS, T. C.; IRVINE, C. M.; KRUPA, M. Roles of extracellular matrix in follicular development. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 54, p. 343-352, 1999b.
- RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F.; VAN WEZEL, I. L.; KRUPA, M.; LAVRANOS, T. C. Dynamics of the membrana granulosa during expansion of the ovarian follicular antrum. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 171, p. 41-48, 2001.
- RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction*, v. 139, p. 309-318, 2010.
- SANTIAGO, C. A.; VOGEL, J. L.; AAD, P. Y.; ALLEN, D. T.; STEIN, D. R.; MALAYER, J. R.; SPICER, L. J. Pregnancy-associated plasma protein-A and insulin-like growth factor binding protein mRNAs in granulosa cells of dominant and subordinate follicles of preovulatory cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 28, n. 1, p. 46-63, 2005.
- SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, v. 63, n. 9, p. 2382-2394, 2005.
- SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, v. 67, p. 37-43, 2001.
- SISCO, B.; PFEFFER, P. L. Expression of activin pathway genes in granulosa cells of dominant and subordinate bovine follicles. *Theriogenology*, v. 68, n. 1, p. 29-37, 2007.
- TABANDEH, M. R.; HOSSEINI, A.; SAEB, M.; KAFI, M.; SAEB, S. Changes in the gene expression of adiponectin and adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in ovarian follicular cells of dairy cow at different stages of development. *Theriogenology*, v. 73, n. 5, p. 659-669, 2010.
- VALDEZ, K. E.; CUNEO, S. P.; GORDEN, P. J.; TURZILLO, A. M. The role of thecal androgen production in the regulation of estradiol biosynthesis by dominant bovine follicles during the first follicular wave. *Journal of Animal Science*, v. 83, n. 3, p. 597-603, 2005.
- VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SA, W. F.; FERNANDES, C. A. C.; MARQUES JR., A. P. Short intervals between ultrasonographically-guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 84, p. 1-12, 2004.
- VIANA, J. H. M.; PALHAO, M. P.; SIQUEIRA, L. G. B.; FONSECA, J. F.; CAMARGO, L. S. A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, v. 73, n. 7, p. 966-972, 2010.
- WHITE, F. J.; RUBIO, I.; LENTS, C. A.; CICCIOLO, N. H.; WETTEMANN, R. P.; SPICER, L. J. Effect of days after calving on insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding proteins, progesterone, androstenedione, estradiol, and aromatase mRNA in dominant follicles of postpartum beef cows. *Animal Reproduction Science*, v. 108, n. 3-4, p. 364-374, 2008.

Capítulo III

Caracterização da concentração intrafolicular de estradiol e progesterona e da expressão gênica de células da granulosa em novilhas Holandesas e Gir utilizando um modelo *in vivo*

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo caracterizar *in vivo* a concentração intrafolicular de estradiol e progesterona e o padrão da expressão gênica de fatores envolvidos no desenvolvimento folicular nas raças Holandesa e Gir. A onda de crescimento folicular foi sincronizada em novilhas Holandesas (HPB) e Gir utilizando benzoato de estradiol e um implante intravaginal de progesterona. Folículos com aproximadamente 6, 8 e 10 mm e 4, 6, 8 e 10 mm de diâmetro foram individualmente aspirados *in vivo* nas novilhas Holandesas e Gir, respectivamente. Amostras de FF e CG de cada folículo aspirados foram recuperadas e utilizadas para dosagem de esteroides e análise de expressão gênica (IGF-1r, FSHr, P450arom e INHA), respectivamente. Nas duas raças, um aumento progressivo na concentração de estradiol no FF foi observado ao longo do crescimento folicular. No que se refere ao diâmetro esperado nos períodos de pré-divergência, divergência e pós-divergência (4 e 6, 6 e 8, e 8 e 10 mm em Gir e HPB, respectivamente) as amostras de FF das novilhas Holandesas apresentaram maior concentração de E2 do que nas novilhas Gir. Contudo, quando folículos de mesmo diâmetro foram comparados entre as duas raças, tais diferenças não foram observadas quanto a concentração intrafolicular de E2. O padrão de expressão relativa da P450arom não diferiu entre as duas raças, aumentando significativamente quando o folículo passou de 6 para 8 mm de diâmetro. O mesmo comportamento foi observado quanto a expressão relativa do FSHr. Em relação aos demais genes, não foi observada diferença na expressão dos receptores de IGF-I na raça Holandesa. Na raça Gir, a expressão do gene IGF-1r apresentou-se sobre-regulada nos folículos de 6 mm quando comparado com os folículos de 4 e 10 mm. A expressão relativa da INHA aumentou progressivamente ao longo do desenvolvimento folicular na raça Gir, enquanto que na Holandesa foi observado um aumento apenas nos folículos de 10 mm. Embora a divergência folicular nas duas raças ocorra em folículos de diâmetros diferentes, observou-se um padrão similar na expressão da P450arom e FSHr.

Palavras-chave: Expressão gênica, células da granulosa, esteroidogênese, Gir.

ABSTRACT

The present study aimed to characterize in vivo the progress of follicular steroidogenesis in Holstein and Gir cattle. Follicular wave was synchronized in Holstein and Gir heifers using estradiol benzoate and an intravaginal implant of progesterone. Follicles with approximately 6, 8 and 10 mm, and 4, 6, 8 and 10 mm in diameter were individually aspirated in Holstein and Gir animals, respectively. Samples of FF and GC of each aspirated follicle were used to determine intrafollicular steroid concentration and to evaluate relative gene expression of IGF-1r, FSHr, P450arom and INHA. In both breeds, a progressive increase of intrafollicular concentration of E2 was observed along follicular development. In the expected follicle size corresponding to the periods of pre-deviation, deviation, and pos-deviation (4 and 6, 6 and 8, 8 and 10, for Gir and Holstein, respectively) intrafollicular concentration of E2 was greater in Holstein. However, when follicles of the same diameter were compared between breeds, no difference was observed. The expression pattern of P450arom was similar in both breeds, showing an increase when follicle grow from 6 to 8 mm in diameter. Similar results were observed for FSHr. In Holstein, expression of IGF-1r did not vary. In contrast, gene expression for IGF-1r was up-regulated in 6 mm follicles when compared with follicles of 4 and 10 mm. Expression of INHA progressively increased in Gir cattle, while in Holstein a significant increase was observed only in 10 mm follicles. In conclusion, it was observed a similar P450m and FSHr expression pattern in Holstein and Gir animals, despite follicular deviation occurs when follicles presents different diameters.

Keywords: Gene expression, granulosa cell, steroidogenesis, Gir

1. INTRODUÇÃO

Conhecer as condições originais do ambiente intrafolicular, assim como a dinâmica temporal dos eventos fisiológicos e os fatores envolvidos no controle do desenvolvimento folicular, é fundamental para mimetizar em cultivo as condições originais do desenvolvimento oocitário utilizado na produção *in vitro* de embriões (Gilchrist et al., 2006), assim como para aperfeiçoar os protocolos hormonais associados a outras biotecnologias.

A camada de células da granulosa e o fluido folicular são componentes muito importantes na fisiologia ovariana. Juntamente com o oócito, as células da granulosa sintetizam e secretam fatores de crescimento locais que vão atuar na regulação do desenvolvimento folicular (Eppig, 2001; Sugiura et al., 2007; Gilchrist et al., 2008). As células da granulosa também sintetizam o estradiol, um hormônio esteroide que vai atuar no controle do desenvolvimento folicular, além de agir no sistema genital e no comportamento do animal, preparando-o para a reprodução. O fluido folicular é importante no transporte do oócito para dentro da tuba uterina durante o processo de ovulação (Edwards, 1974). Além disso, a composição do fluido folicular fornece o ambiente intrafolicular adequado para o desenvolvimento do oócito (Sutton et al., 2003).

A maioria dos estudos utilizou amostras de fluido folicular e células da granulosa recuperadas a partir de ovários obtidos em matadouros (Glistler et al., 2006; Sisco e Pfeffer, 2007; Monniaux et al., 2008; Tabandeh et al., 2010) ou após ovariectomia (Valdez et al 2005; Canty et al., 2006; Luo et al., 2011). O desconhecimento da condição reprodutiva da doadora e a impossibilidade de coletas seriadas no mesmo animal limitam a interpretação dos resultados obtidos a partir de ovários de matadouro e, conseqüentemente, sua extrapolação para a condição *in vivo*.

A dinâmica folicular e os fatores envolvidos no controle do desenvolvimento folicular vêm sendo extensivamente estudados em bovinos, no entanto grande parte destes estudos utilizou como modelo animal bovinos de raças taurinas (Evans et al., 1997; Matti et al., 2010; Portela et al., 2010; Lavon et al., 2011). Comparativamente, informações dessa natureza em bovinos de raças zebuínas são relativamente escassas (Sartorelli et al., 2005). Estudos anteriores já evidenciaram diferenças marcantes na dinâmica folicular entre estes dois grupos raciais, como: número de ondas foliculares, taxa de crescimento folicular, diâmetro do folículo dominante no momento da divergência e da ovulação (Figueiredo et al., 1997; Viana et al.,

2000; Bó et al., 2003). Essas diferenças observadas na fisiologia ovariana podem afetar a eficiência dos protocolos hormonais utilizados na IATF e nos programas MOET (Baruselli et al., 2006).

O objetivo do presente estudo foi caracterizar a síntese de estradiol e progesterona pelo folículo e avaliar a expressão de genes (aromatase [P450arom], receptor de FSH [FSHR], receptor tipo 1 de IGF [IGF-1r] e inibina A [INHA]) envolvidos no controle do crescimento folicular em duas raças de bovinos (Gir e Holandesa) utilizando para isto o modelo *in vivo* previamente descrito no Capítulo I.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANIMAIS

Este experimento foi conduzido no campo experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de leite em Coronel Pacheco – MG da Embrapa Gado de Leite. Todos os procedimentos utilizados nos animais experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite (Protocolo CEUA-CNPGL n°02/2011). Foram utilizadas novilhas das raça Holandesa (n=10) mantidas em sistema de confinamento e alimentadas com silagem de milho (25kg/dia/animal) e concentrado (2 kg/dia/animal); e novilhas da raça Gir (n=10) mantidas a pasto e suplementadas com silagem de milho (16 kg/dia/animal) e concentrado (1,5 kg/dia/animal). Água e sal mineral foram fornecidos *Ad libitum*. Todas as novilhas utilizadas apresentavam atividade ovariana cíclica e nenhuma patologia reprodutiva detectável ao exame ultrassonográfico foi observada.

2.2 COLETA DE CÉLULAS DA GRANULOSA E FLUIDO FOLICULAR

A onda de crescimento folicular foi sincronizada nas novilhas Holandesas e Gir por meio da inserção de implante de intravaginal de progesterona (Sincrogest, Ouro Fino, Ribeirão Preto, Brasil) associado a administração intramuscular de 2 mL de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ouro Fino, Ribeirão Preto, Brasil). Para a detecção do início da nova onda de crescimento folicular, avaliações ultrassonográficas (MyLab 30 VetGold, com transdutor retal de 7,5 MHz) foram realizadas a cada 24 horas. Após o início da nova onda de crescimento folicular (presença de um novo grupo de folículos com diâmetro superior a 4 mm), estas avaliações foram realizadas a cada 12 horas, e no momento em que os folículos atingiram o diâmetro desejado eles foram individualmente aspirados para

a coleta de amostras de fluido folicular e células da granulosa. Nas novilhas Holandesas foram aspirados individualmente folículos com aproximadamente 6 (n=11; variando de 5,3 a 6,9; $X=6,0\pm 0,5$ mm), 8 (n=5; variando de 8,3 a 8,9; $X=8,6\pm 0,4$ mm) e 10 mm de diâmetro (n=8; variando de 10,0 a 10,5; $X=10,2\pm 0,2$ mm), enquanto que nas novilhas Gir foram individualmente aspirados folículos com diâmetro de aproximadamente 4 (n=10; variando de 4,0 a 4,8; $X=4,6\pm 0,2$ mm), 6 (n=8; variando de 6,0 a 6,6; $X=6,3\pm 0,2$ mm), 8 (n=23 variando de 7,5 a 8,9; $X=8,5\pm 0,6$ mm) e 10 mm de diâmetro (n=19; variando de 9,1 a 10,4 $X=9,8\pm 0,5$ mm). As categorias foliculares de 6, 8 e 10 mm de diâmetro na raça Holandesa, foram consideradas como pré-divergência, momento da divergência e pós-divergência, respectivamente. Nas novilhas da raça Gir, foram consideradas pré-divergência, momento da divergência e pós-divergência os grupos foliculares de 4, 6 e 8 mm de diâmetro, respectivamente. Os procedimentos de aspiração folicular utilizados foram os mesmos descritos nos Experimento II e III do Capítulo II. O processamento das amostras de fluido folicular e células da granulosa seguiram os mesmo protocolos descritos anteriormente. As amostras de fluido folicular foram acondicionadas a -20° C até a análise da concentração de estradiol e progesterona por radioimunoensaio. As amostras de células da granulosa foram acondicionadas sob as mesmas condições até o processo de extração de RNAm, transcrição reversa e PCR em tempo real. Para dosagem dos hormônios esteroides, todas as amostras de fluido folicular foram utilizadas. No entanto, apenas cinco amostras de cada grupo folicular em cada raça foram utilizadas para extração de RNAm, transcrição reversa e PCR em tempo real.

2.3 DOSAGEM DE ESTRADIOL E PROGESTERONA NO FLUIDO FOLICULAR

As análises da concentração de estradiol e progesterona nas amostras de fluido folicular foram realizadas em contador gama de fase sólida utilizando-se kits comerciais de análise por I^{125} (Coat-a-Count, Medlab), no Laboratório de Endocrinologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP campus de

Botucatu – SP (matrícula CNEN 14542). Em função das elevadas concentrações de estradiol e progesterona presentes no fluido folicular, as amostras foram diluídas em PBS para adequação à curva padrão do kit de radioimunoensaio utilizado. Para a dosagem de estradiol, as amostras de fluido folicular provenientes de folículos de 4, 6 e 8 mm de diâmetro foram diluídas 100 vezes (1:100) e as amostras de folículos de 10 mm foram diluídas 1000 vezes (1:1000). Para a dosagem de progesterona, todas as amostras foram diluídas 50 vezes (1:50). O resultado fornecido pelo aparelho de radioimunoensaio foi posteriormente corrigido de acordo com a diluição realizada. A sensibilidade do kit utilizado foi de 0,02 ng/mL e 10 pg/mL para progesterona e estradiol, respectivamente. Na dosagem de progesterona, os coeficientes de variação inter e intra-ensaio foram 2,75% e 1,87%, respectivamente; para estradiol, os coeficientes foram 6,0% e 12,7%, respectivamente. Apenas amostras com E2:P4 > 1 foram utilizadas para extração de mRNA e PCR em tempo real.

2.4 EXTRAÇÃO DE mRNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA

A extração de mRNA e a transcrição reversa foram realizadas seguindo os mesmos procedimentos, kits e protocolos descritos no Experimento III (item 2.4.1) do Capítulo II.

2.5 PCR EM TEMPO REAL

As avaliações por PCR em tempo real foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG. As quantificações relativas do cDNA das amostras de células da granulosa coletadas de folículos de 4, 6, 8 e 10 mm de diâmetro (Gir) e 6, 8 e 10 mm de diâmetro (Holandês) foram realizadas utilizando a metodologia de PCR em Tempo-Real. As reações foram feitas utilizando-se o kit comercial SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade de RNA e a concentração de primer utilizados foram estabelecidas previamente por PCR convencional. A sequência dos primers utilizados está descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Sequência dos *primers* específicos utilizados para o estudo de expressão gênica em células da granulosa bovinas, temperaturas de ligação, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no GenBank e/ou referência bibliográfica.

Produto	Sequência do <i>primer</i>	Temp. de pareamento	Tamanho do produto (pb)	Nº de acesso no GenBank/ Referência
β -ACTINA (endógeno)	F 5'GACATCCGCAAGGACCTCTA3' R 5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3'	53°C	205	NM_173979
GAPDH (endógeno)	F 5'GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG3' R 5'CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA 3'	53°C	237	NM_001034034.1 Mourot <i>et al.</i> , (2006)
IGF1R	F 5'CGCTGGATGTCCCCTGAGT3' R 5'GTTGTCCGGCTTGTCCAGAA3'	53°C	179	NM203322.2
P450arom (CYP19A1)	F 5'CGCCACTGAGTTGATTTTTGCTGAGA3' R 5'TAAGGCTTTCGCGATGACCAGGTC3'	60°C	300	NM_174305.1 Kayani <i>et al.</i> , 2009
FSHr	F 5' AGCCCCTTGTCCACAACCTCTATGTC3' R 5' GTTCCTCACCGTGAGGTAGATGT3'	60°C	104	NM_174061.1 Luo & Wiltbank, 2006
INHA	F 5' CCTCGGATGGAGGTTACTCTTTT3' R 5' CGGGATTCCCTTAGATGCAA3'	56°C	83	NM_174094.3 Mihn <i>et al.</i> , 2006
CYP17A1	F 5' GAATGCCTTTGCGCTGTTC3' R 5' CGCGTTTGAACACAACCCTT3'	56°C	329	NM_174304.1 Lehmann <i>et al.</i> , 2000

A reação contendo cDNA, par de primers, Master Mix (dNTPs, referência passiva, SYBR® Green) e 0,1 U Taq DNA Polimerase, em um volume final de 25 μ L, foi incubada a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, ligação na temperatura específica para cada primer por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Controles negativos nos quais o cDNA foi omitido durante a reação de PCR em Tempo-Real foram preparados. Cada amostra de células da granulosa foi avaliada em duplicata em placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems), seladas com filme adesivo óptico (Applied Biosystems) e amplificadas no aparelho ABI PRISM® 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). Ao final dos 40 ciclos de amplificação, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, no intuito de verificar a presença ou ausência de produtos não específicos e/ou dímeros de *primer*, sendo aquecidas com incremento de 1°C durante 30 segundos, partindo de 60°C até atingir o limite de 95°C.

A quantificação foi realizada usando-se o método do C_T (*cycle threshold*) comparativo, com os resultados expressos relativos a genes de referência endógena e um grupo controle. O C_T corresponde ao ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de

detecção (*threshold*), servindo como base para comparação entre as amostras. O *threshold* pode ser automático, ou seja, determinado pelo próprio aparelho, ou estabelecido pelo usuário, sendo posicionado na região de amplificação exponencial ou geométrica das curvas de amplificação onde a eficiência da PCR é maior, e serve como uma referência do ponto no qual todas as amostras possuem uma mesma intensidade de fluorescência, ou seja, uma mesma quantidade de produto da PCR.

A quantificação relativa se baseia na frequência relativa dos transcritos do gene alvo em relação a um gene de expressão constitutiva. Neste experimento os genes de referência endógena foram GAPDH e β -ACTINA, sendo este último utilizado nas análises, pois apresentou um coeficiente de variação no C_t menor. Apenas as amostras onde não foi detectada a presença de células da teca (expressão do gene CYP17A1) foram utilizadas. As comparações entre as categorias foliculares foram realizadas dentro de cada raça. Na raça Holandesa, o grupo controle foi formado pelos folículos de 8 mm, e na raça Gir pelos folículos de 6 mm na raça Gir, sendo a expressão mostrada como N vezes o controle. Os valores de expressão relativa são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

2.5.1 Análise dos resultados

A análise para quantificação relativa da expressão dos genes IGF1R, P450arom, FSHR, INHA e CYP17A1 foi realizada de acordo com o método descrito por Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002) que utiliza o seguinte modelo matemático:

$$\text{Expressão Relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta Ct_{\text{alvo}} (\text{Ct do controle} - \text{Ct da amostra})}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta Ct_{\text{Ref}} (\text{Ct do controle} - \text{Ct da amostra})}}$$

Onde:

Ealvo = Eficiência da PCR dos genes alvo.

Ct do Controle = Cycle threshold do grupo controle.

Ct da Amostra = Cycle threshold do grupo teste.

Eref = Eficiência da PCR do gene controle endógeno.

A partir deste método foi desenvolvido o *software* REST® (Pfaffl, Horgan e Dempfle, 2002), que foi utilizado neste estudo. O modelo estatístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST*® presente no *software* REST® foi utilizado para comparar as expressões diferenciais. Este modelo foi desenvolvido com base em testes de permutação, que são uma alternativa a ser utilizada quando os testes paramétricos não podem ser usados. Estes testes obtêm resultados a partir de permutações

aleatórias dos dados do experimento. De forma sucinta, uma estatística de teste, baseada na probabilidade de um efeito ser maior do que o observado na hipótese nula (H0) de ausência de efeito de um tratamento, que no caso deste trabalho seria a categoria folicular, é calculada para os dados experimentais. Então os dados de C_T são permutados (ou rearranjados) repetidamente e a estatística de teste é calculada para cada uma das permutações resultantes. Como o número de permutações necessárias para a realização do teste aumenta à medida que o tamanho da amostra cresce, impossibilitando a obtenção de todas elas, serão consideradas pelo menos 2.000 permutações, que é o número recomendado por Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002) para obtenção de uma estimativa satisfatória do valor de significância (p).

Após a avaliação da expressão relativa, os produtos amplificados por PCR em tempo real para todos os genes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (Figura 1), utilizando uma voltagem constante de 120v por um período de 2h, e corado com brometo de etídio para observação dos fragmentos correspondentes aos transcritos amplificados e confirmação da especificidade da reação (ausência de amplificações inespecíficas). Foram utilizados 20µl de amostra com 4µl de tampão de corrida. Para a identificação do peso molecular foi usado um marcador de 50 pares de base (pb).

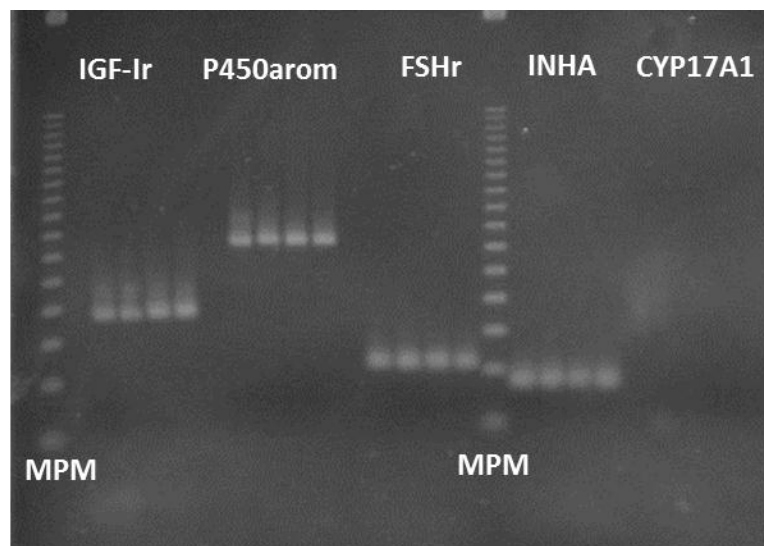


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose (2%) demonstrando a identificação do mRNA dos genes IGF-1r (peso molecular: 179pb), P450arom (peso molecular: 300pb), FSHr (peso molecular: 104pb), INHA (peso molecular: 83pb) e CYP17A1 (peso molecular: 329pb). MPM, Marcador de peso molecular (50pb); pb, pares de bases.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A concentração de estradiol e progesterona no fluido folicular ao longo do desenvolvimento folicular foi avaliada por análise de regressão linear. E sua associação com o diâmetro folicular foi avaliada por meio do método de Correlação de Pearson. Uma probabilidade de 5% foi utilizada para expressar diferença significativa entre categorias foliculares. Os resultados são apresentados como média±EPM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de estradiol no fluido folicular aumentou progressivamente nas duas raças, acompanhando o aumento do diâmetro folicular (Figura 2). Entretanto, na raça Gir observou-se uma maior dispersão dos valores no momento pós-divergência (categoria folicular de 8 mm). Ainda, foi possível observar que essa maior dispersão se manteve quando uma categoria folicular adicional (10mm) foi avaliada na raça Gir (Figura 3). Uma correlação positiva significativa entre a concentração de estradiol no fluido folicular e o diâmetro folicular foi observada nas duas raças (0,89 e 0,50 para Holandês e Gir, respectivamente; $P < 0,05$); e corroborando com os resultados

apresentados anteriormente (Figs. 2 e 3), a associação entre estas duas variáveis foi mais forte no Holandês. Em relação a progesterona, não foi observado um aumento significativo no fluido folicular ao longo do crescimento folicular.

A elevação na concentração intrafolicular de estradiol é uma característica importante para a continuação do desenvolvimento do folículo dominante. Além de estimular o pico de LH no momento da ovulação, o estradiol é considerado um importante fator de crescimento, diferenciação e anti-apoptótico para o folículo ovariano (Rosenfeld et al., 2001; Quirk et al., 2001). O estradiol também é responsável por induzir a expressão de receptores para LH, importante no momento da seleção do folículo dominante (Ginther et al., 1996; Mihn et al., 2006). O desenvolvimento de um plexo vascular na camada de células da teca está positivamente correlacionado com a atividade esteroidogênica das células foliculares (Mattioli et al., 2001; Grazul-Bilska et al., 2007). Os resultados obtidos nos capítulos II (Figura 4) e III (Figura 2) demonstraram que o crescimento folicular esteve associado ao aumento na produção de esteroide (estradiol e progesterona) e ao aumento no volume de vascularização da parede folicular.

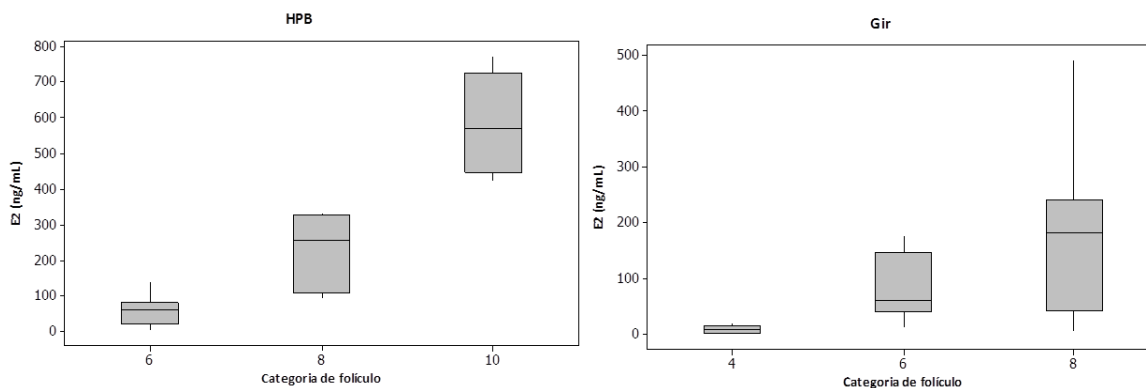


Figura 2. Concentração intrafolicular de estradiol (E2) em função categoria folicular nas raças Holandesa (HPB) e Gir.

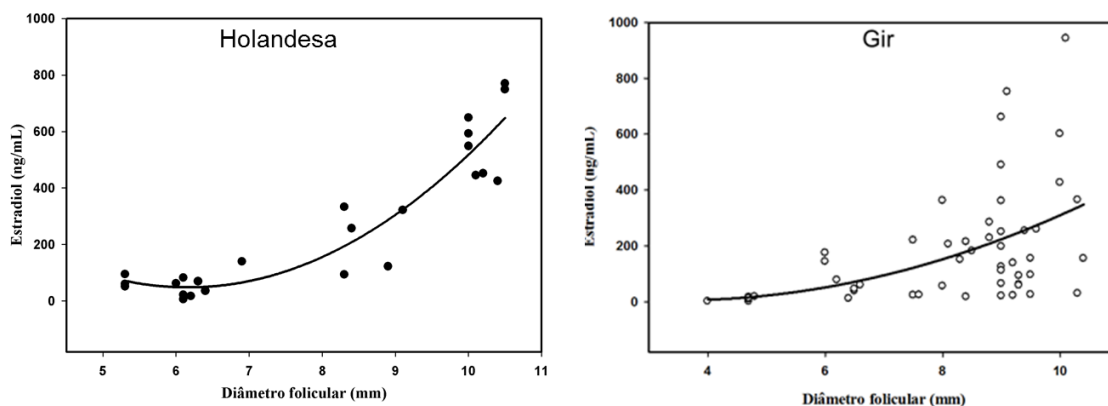


Figura 3. Concentração intrafolicular de estradiol nas raças Holandesa e Gir em função do diâmetro folicular ($y=31,9x^2-392,8x+1257,7$; $r^2=0,86$ e $y=7,1x^2-48,7+88,8$; $r^2=0,23$; para raça Holandesa e Gir respectivamente).

A quantidade de fluido folicular recuperado em todas as categorias foliculares foi considerada suficiente para posterior dosagem da concentração de estradiol e progesterona por radioimunoensaio. A concentração de esteroides no fluido folicular é muito elevada, chegando a ser 1000x maior do que no plasma (Nishimoto et al., 2009). Dessa forma, a dosagem de esteroides no fluido folicular utilizando os kits comerciais de radioimunoensaio requer uma diluição prévia das amostras (Leroy et al., 2004). Mesmo nas amostras obtidas de folículos pequenos, o volume recuperado de fluido folicular no presente estudo foi suficiente para a diluição e posterior dosagem dos esteroides. Contudo, ao utilizar o modelo *in vivo*, o volume de fluido folicular pode ser um fator limitante para a avaliação individual do folículo dependendo do componente a ser dosado (p.ex., lipídeos, carboidratos, gases), e também do protocolo e da sensibilidade do ensaio que será utilizado.

Embora no modelo *in vivo* utilizado apenas os folículos em crescimento tenham sido aspirados, 4,5% (2/44) e 3,9% (3/77) das amostras coletadas apresentaram uma relação E2:P4 menor do que 1; nas raças Holandesa e Gir, respectivamente. A concentração de esteroides no fluido folicular pode ser utilizada como um parâmetro bioquímico para a classificação funcional do folículo ovariano como saudável ou atresico (Nishimoto et al., 2009). Apesar de um consenso geral em classificar os folículos saudáveis como aqueles com E2:P4 maior do 1 (Glistler et al., 2006; Nishimoto et al., 2009), foi observada uma grande variação na concentração de estradiol no fluido folicular (26 a 1.776 ng/mL) e E2:P4 (1.2 a 106) em folículos com mais de 8 mm

de diâmetro classificados como saudáveis (Bosschaerts et al., 2010). Essa variação na concentração intrafolicular de estradiol também foi observada nos folículos maiores (diâmetro ≥ 8 mm) na raça Gir. Essas diferenças sugerem uma possível variação no status funcional destes folículos, e que a E2:P4 possui um potencial limitado como parâmetro de seleção de folículos para o estudo *in vivo* com células da granulosa. No presente estudo, o crescimento folicular foi monitorado por ultrassonografia, e mesmo assim alguns folículos apresentaram E2:P4 menor do que 1. Dos folículos que apresentaram E2:P4 < 1, apenas 1 tinha o diâmetro maior do que 6 mm. Nos folículos menores a concentração de estradiol esperada é baixa, e estudos anteriores mostram que uma relação E2:P4 menor do que 1 em folículos pequenos não necessariamente é indicativo de atresia (Hayashi et al. 2004; Nishimoto et al., 2009).

A concentração intrafolicular de estradiol e progesterona foi maior na raça Holandesa na pré-divergência, no momento da divergência e na pós-divergência (Tabela 2). Esses resultados são coerentes com a diferença no diâmetro folicular nestas três fases do desenvolvimento folicular entre animais das raças Holandesa e Gir (Kulick et al., 2001; Viana et al., 2010). Contudo, quando a comparação entre as duas raças foi realizada em função da categoria folicular, observou-se que a concentração intrafolicular de estradiol e progesterona nos folículos com 6 mm de diâmetro não foi diferente entre as duas raças (Tabela 2). O mesmo resultado foi observado quando os folículos atingiram 8 mm de diâmetro.

Tabela 2. Concentração de estradiol (E2) e progesterona (P4) no fluido folicular de folículos de diferentes tamanhos na raça Holandesa e Gir (média±EPM).

Momento	Raça	Categoria Folicular (mm)	E2 (ng/mL)	P4 (ng/mL)	E2:P4
Pré-divergência	Holandesa	6	58,5±11,7 ^{a,A}	21,9±4,9 ^{a,A}	3,8±0,9 ^{a,A}
	Gir	4	8,8±2,0 ^b	6,6±0,3 ^b	1,5±0,3 ^b
Divergência	Holandesa	8	226,0±49,9 ^{a,B}	29,5±8,0 ^{a,B}	8,5±2,0 ^{a,B}
	Gir	6	78,9±21,0 ^{b,A}	10,3±1,0 ^{b,A}	7,9±2,4 ^{a,A}
Pós-divergência	Holandesa	10	579,1±45,0 ^a	21,9±1,6 ^a	29,0±4,7 ^a
	Gir	8	185,0±34,9 ^{b,B}	15,4±1,7 ^{b,B}	11,3±1,7 ^{b,B}

^{a,b} No mesmo momento, médias acompanhadas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

^A Dentro da mesma categoria folicular (6 mm), médias acompanhadas pela mesma letra não difere entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

^B Dentro da mesma categoria folicular (8 mm), médias acompanhadas pela mesma letra não difere entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

Na raça Gir, a avaliação por PCR em tempo real demonstrou que o gene P450arom (aromatase) nas células da granulosa dos folículos da categoria de 8 mm estava sobre-regulado quando comparado a categoria folicular de 6 mm (Figura 4). Na raça Holandesa, o mesmo gene na categoria folicular de 6 mm estava sub-regulado quando comparado a categoria de 8 mm (Figura 4). Dessa forma, observa-se que nas duas raças um aumento na expressão do gene P450arom foi evidenciado quando o folículo

aumentou de 6 para 8 mm de diâmetro. Em vacas Holandesas e mestiças (Holandês x Hereford) não foi observado um aumento na expressão do gene P450arom nas células da granulosa coletadas de folículos com diâmetro variando de 7,7 a 16,4 mm (Minh et al., 2006), corroborando com os dados do presente estudo, onde um aumento na expressão deste gene não foi observado após o folículo atingir aproximadamente 8 mm de diâmetro (Figura 4).

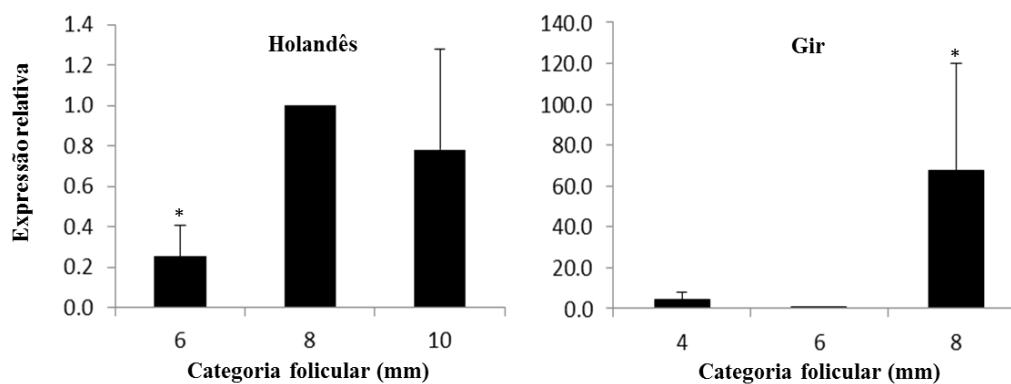


Figura 4. Expressão relativa do gene P450arom nas células da granulosa coletada nas diferentes categorias foliculares de novilhas Holandesa e Gir. Na raça Holandesa o grupo controle foi formado pelos folículos da categoria de 8 mm, e na raça Gir pelos folículos da categoria de 6 mm. Dentro de cada raça, o asterisco indica uma diferença significativa na expressão relativa do gene P450arom entre as demais categorias e o grupo controle.

Os resultados observados no presente estudo sugerem que, durante o crescimento folicular, a sequência temporal dos eventos fisiológicos envolvidos na síntese dos esteroides pelos folículos ovarianos segue o mesmo padrão nas duas raças. No entanto, a divergência folicular na raça Gir ocorre quando o folículo dominante tem em média 6,3 mm de diâmetro (Viana et al., 2010); e na raça Holandesa a divergência vai ocorrer apenas quando o folículo dominante tiver em média 8,5 mm de diâmetro (Kulick et al., 2001). Embora os folículos com diâmetro semelhantes nas duas raças apresentem a mesma capacidade de produção de esteroides (Tabela 2), isso não necessariamente significa que a concentração circulantes destes hormônios na corrente sanguínea seja a mesma nas duas raças. Dentro da raça Holandesa, foi observado que a concentração intrafolicular de estradiol no folículo dominante não foi diferente entre novilhas, vacas no início da lactação e vacas no final da lactação (Roth et al., 2008). No entanto, Sartori et al. (2004) demonstraram que a concentração sérica de estradiol foi maior nas novilhas holandesas ($7,9 \pm 0,8$ vs $11,3 \pm 0,6$ pg/mL), apesar do diâmetro do folículo dominante ter sido maior nas vacas em lactação ($16,8 \pm 0,5$ vs $14,9 \pm 0,2$ mm). Foi observado também em vacas holandesas, que uma elevada ingestão de matéria seca resultou em um aumento no fluxo sanguíneo hepático (Sangsrivong et al., 2002). Esse maior fluxo levou a um maior metabolismo de estradiol e progesterona pelo fígado e conseqüentemente a uma redução nos níveis circulantes destes esteroides (Sangsrivong et al., 2002). Até onde sabemos, não há na raça Gir estudos avaliando o efeito da categoria animal, nem mesmo do metabolismo hepático, sobre a concentração intrafolicular e sanguínea de esteroides.

Dessa forma, os resultados do presente estudo sugerem que a diferença no diâmetro folicular, no momento da divergência, observada nas raças Holandesa e Gir não está associada a capacidade de produção de estradiol pelo folículo. Assim, tanto na raça Gir quanto na raça Holandesa, quando o folículo atingiu 6 mm de diâmetro, a concentração de estradiol no fluido folicular não diferiu (Tabela 2). Embora os níveis circulantes de estradiol e FSH não tenham sido mensurados no presente estudo, sugere-se que em função da diferença de tamanho e, talvez, no metabolismo hepático entre as duas raças, no momento em que o folículo atinge 6 mm de

diâmetro, a concentração sanguínea de estradiol seja maior na raça Gir. Assim, uma maior quantidade de estradiol chegaria até a hipófise causando redução nos níveis plasmáticos de FSH, de forma a permitir o início do processo de divergência folicular.

Durante a fase de dominância, as concentrações circulantes de FSH diminuem (Ginther et al., 1996); contudo, o folículo dominante mantém sua integridade funcional e o seu desenvolvimento. O folículo dominante passa por alterações que permitem que ele continue produzindo estradiol em quantidades suficientes para manter seu desenvolvimento e estimular o pico de LH no momento da ovulação (Fortune et al., 2001). Além da avaliação do gene P450arom, o presente estudo avaliou nas duas raças por PCR em tempo real, a expressão de mais três genes nas células de granulosa importantes para o desenvolvimento folicular: inibina A (INHA), receptor de FSH (FSHr) e receptor de IGF-I (IGF1r). A análise da curva de dissociação para cada gene testado não apresentou picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos (ANEXOS I, II e III). Os resultados na raça Holandesa e Gir podem ser observados na Figura 5.

Na raça Holandesa, a expressão relativa do gene FSHr nas células da granulosa provenientes de folículos das categorias de 6 e 10 mm de diâmetro apresentou-se sub-regulado quando comparada com a expressão nas células da granulosa provenientes de folículos da categoria de 8 mm. Assim, observa-se que houve um aumento na expressão relativa do gene FSHr a medida que o folículo cresceu de 6 para 8 mm de diâmetro; na sequência, uma redução foi observada quando o folículo atingiu aproximadamente 10 mm de diâmetro. Corroborando com os resultados obtidos no presente estudo para a raça Holandesa, um aumento na expressão de FSHr nas células da granulosa foi observado durante o processo de seleção já foi previamente reportado em bovino (Xu et al., 1995). A redução na expressão de FSHr já era esperada, uma vez que o folículo dominante começa a expressar receptores para LH (Mihn et al., 2006) e passa a ser menos dependente de FSH. Contudo, estudos anteriores mostraram que a expressão de FSHr nas células da granulosa continua a aumentar após a seleção do folículo dominante (Xu et al., 1995).

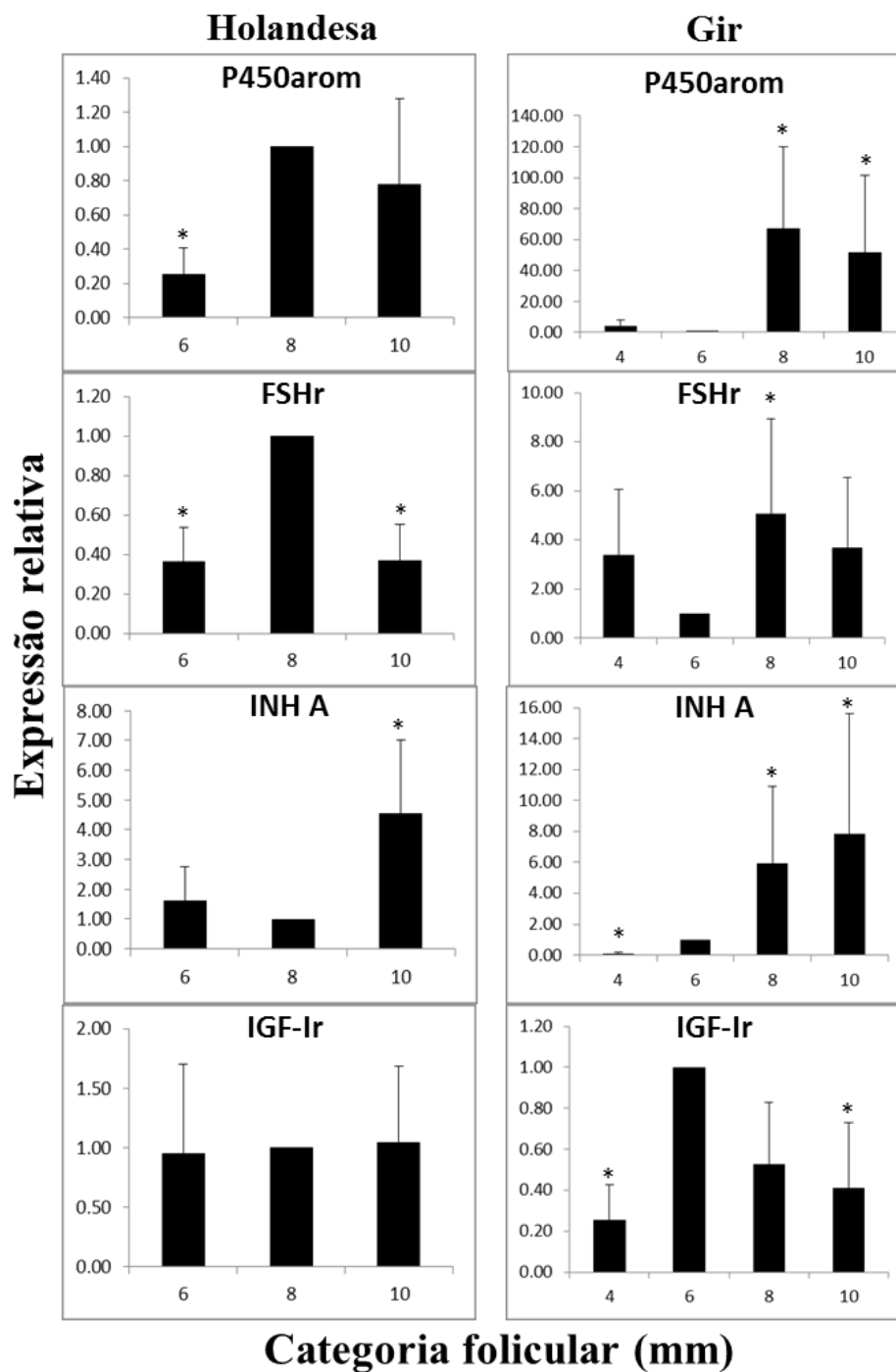


Figura 5. Expressão relativa dos genes P450arom, FSHr, INHA e IGF-1r nas células da granulosa coletada nas diferentes categorias foliculares de novilhas Holandesas e Gir. O grupo controle foi formado pelos folículos da categoria de 8 mm na raça Holandesa. Na raça Gir, o grupo controle foi formado pelos folículos da categoria de 6 mm. Dentro de cada raça, o asterisco indica uma diferença significativa na expressão relativa do gene entre as demais categorias e o grupo controle.

Diferentemente, na raça Gir a expressão para FSHr não aumentou no momento esperado da divergência, quando os folículos têm em média 6,5 mm de diâmetro (Viana et al., 2010). Nas novilhas Gir, assim como observado nas Holandesas, a expressão de FSHr aumentou apenas quando os folículos atingiram em média 8 mm de diâmetro. Os presentes resultados mostram, assim como observado para P450arom, o padrão de expressão do FSHr não foi diferente nas duas raças.

A expressão do receptor tipo 1 de IGF (IGF-1) na raça Holandesa não foi diferente nas fases de pré-divergência, no momento da divergência e após a divergência. Os presentes resultados na referida raça mostram que o IGF1r não foi um fator limitante para a seleção do folículo dominante. E provavelmente, também não foi um fator limitante para a ação do IGF-I sobre as células da granulosa. Resultados semelhantes foram observados com células da granulosa obtidos de ovários de matadouro. Nessas células, a expressão do receptor IGF-1r não foi influenciada pelo diâmetro folicular (Perks et al., 1999). Diferentemente, na raça Gir, um aumento na expressão do receptor IGF-1r foi observado no momento esperado da divergência (Figura 5). Esse resultado sugere que o sistema IGF, assim como sua participação na seleção do folículo dominante, funciona de forma diferente entre bovinos zebuínos e taurinos.

Apesar do IGF-I estimular a esteroidogênese folicular (Nani et al., 2010), a concentração intrafolicular de IGF-I total (livre e ligada a IGFBP) não foi diferente entre o folículo dominante e o subordinado (de la Sota et al., 1996). Assim, observa-se que a ação do IGF-I no folículo ovariano na raça Holandesa não está nem limitada pela concentração de IGF-I total no fluido folicular nem pela expressão do IGF-1r nas células da granulosa. De fato, estudos mais recentes sugeriram que a biodisponibilidade do IGF-I no fluido folicular (i.e., concentração de IGF livre) é mais importante no processo de seleção do folículo dominante (Beg et al., 2002; Ginther et al., 2004). Estudos anteriores observaram que a maior parte do IGF-I encontrado no fluido folicular é derivada da circulação sanguínea (Perks et al., 1999). Estudos com gado de corte mostraram que a concentração circulante de IGF-I foi maior nos animais zebuínos quando comparado a animais de raças europeias (Alvarez et al., 2000). No presente estudo não foi possível determinar a concentração de IGF-I no fluido folicular coletado. No entanto, com base nos dados observados na literatura acredita-se que a concentração intrafolicular de IGF-I seja maior nos animais zebuínos. Mais estudos devem ser realizados para compreender melhor o

funcionamento do sistema IGF nesses dois grupos raciais.

Na raça Holandesa, a expressão relativa do gene INHA nas células da granulosa provenientes de folículos da categoria de 10 mm apresentou-se sobre-regulada em relação a expressão observada nos folículos das demais categorias (6 e 8 mm). Na raça Gir, a expressão relativa do gene INHA na categoria folicular de 4 mm apresentou-se sub-regulada em comparação a expressão nos folículos da categoria de 6 mm. Nos folículos da categoria de 8 e 10 mm a expressão relativa do gene INHA apresentou-se sobre-regulada quando comparada nos folículos da categoria de 6 mm. Entretanto, quando as categorias foliculares de 8 e 10 mm foram comparadas entre si nenhuma diferença foi observada.

Nas novilhas Gir, foi observado um aumento na expressão relativa do gene INHA no momento esperado da divergência (6 mm de diâmetro). A expressão relativa do gene INHA continuou aumentando progressivamente até a fase de dominância, quando o folículo dominante atingiu 8 mm de diâmetro. Uma elevada expressão relativa do gene foi mantida no folículo dominante até atingir 10 mm de diâmetro. Diferentemente, na raça Holandesa não foi observado um aumento da expressão relativa do gene INHA no momento esperado da divergência (categoria folicular de 8 mm), no entanto a expressão relativa aumentou após a seleção do folículo dominante (categoria folicular de 10 mm).

O folículo dominante é aquele que primeiramente diminuir sua dependência do FSH e, ao adquirir receptores de LH, passar a ser capaz de responder também aos estímulos do LH (Mihn et al., 2006). Uma relação inversa entre a concentração circulante de inibina e FSH foi previamente demonstrada em bovinos (Kaneko et al., 1995; Bleach et al., 2001). Assim, observa-se que a inibina A produzida pelo folículo dominante promove uma redução nos níveis de circulantes de FSH, comprometendo o desenvolvimento dos folículos subordinados (Bao et al., 1997).

No presente estudo, o aumento na expressão relativa do gene INHA ao longo do desenvolvimento folicular foi acompanhado por um aumento na concentração intrafolicular de estradiol (Figura 2). Na fase final do desenvolvimento folicular, a inibina estimula a produção de andrógenos mediada pelo LH nas células da teca, fornecendo para as células da granulosa uma quantidade suficiente de precursor para a manutenção da síntese de estradiol (Campbell e Baird, 2001), importante para a manutenção do crescimento folicular. Na raça Gir, apesar de ter sido

observada um aumento na concentração intrafolicular de estradiol no momento esperado da divergência (Tabela 2), a expressão do gene aromatase não aumentou. Contudo, nesse mesmo momento, a expressão do gene INHA apresentava-se sobre-regulada. Assim, a elevação na concentração intrafolicular de estradiol pode ter sido mediada por um maior aporte de andrógenos estimulado pela inibina-A. Corroborando com resultados anteriores, os resultados do presente experimento mostram a importância da inibina A no processo de seleção e manutenção do crescimento do folículo dominante nas duas raças estudadas.

Juntos, os resultados obtidos no presente capítulo demonstram que a expressão relativa dos genes P450arom, FSHr e INHA estão positivamente relacionados com a manutenção do desenvolvimento folicular após a seleção do folículo dominante. Apesar de um aumento na expressão relativa destes genes e de outros (p.ex., LHR e P450scc) ser observado durante o processo de divergência folicular (Xu et al., 1995), a seleção do futuro folículo dominante não pode ser determinado com base na expressão diferencial destes genes, uma vez que antes da seleção do folículo dominante não se observa diferença na expressão relativa destes genes entre os folículos da onda de crescimento (Bao et al., 1997).

4. CONCLUSÃO

Embora o diâmetro do folículo dominante no momento da divergência seja diferente entre as raças Gir e Holandês, a concentração intrafolicular de estradiol nos folículos de 6 e 8 mm de diâmetro não foi diferente entre as duas raças. Assim, sugere-se que a diferença de diâmetro observada no momento da divergência não esteja associada a capacidade de produção de estradiol pelo folículo.

Na raça Holandesa, a expressão do gene P450arom aumentou no momento esperado da divergência, diferentemente, na raça Gir, esse aumento foi observado apenas depois do momento esperado da divergência. Nas duas raças, o aumento na expressão do gene P450arom ocorreu quando o folículo atingiu 8 mm de diâmetro, mostrando que a sequência temporal dos eventos fisiológicos envolvidos na síntese de estradiol pelos folículos ovarianos segue a mesma dinâmica nas duas raças.

O crescimento folicular após a fase de dominância foi acompanhado por um aumento na expressão relativa dos genes FSHr e INHA, mostrando a importância destes dois fatores para a manutenção do crescimento e desenvolvimento do folículo dominante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE Jr.; C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTEMANN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal of Animal Science*, V.78, P.1291–1302, 2000.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, v. 56, p. 1158-1168, 1997.
- BARUSELLI, P. S.; SA FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v. 65, p. 77-88, 2006.
- BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biology of Reproduction*, v. 66, n. 1, p. 120-126, 2002.
- BLEACH, E. C. L.; GLENCROSS, R. G.; FEIST, S. A.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Plasma inhibin A in heifers: Relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 743-752, 2001.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 307–326, 2003.
- BOSSAERT, P.; DE COCK, H.; LEROY, J. L.; DE CAMPENEERE, S.; BOLS, P. E.; FILLIERS, M.; OPSOMER, G. Immunohistochemical visualization of insulin receptors in formalin-fixed bovine ovaries post mortem and in granulosa cells collected in vivo. *Theriogenology*, v. 73, n. 9, p. 1210-9, 2010.
- CANTY, M. J.; BOLAND, M. P.; EVANS, A. C.; CROWE, M. A. Alterations in follicular IGF1 mRNA expression and follicular fluid IGF1 concentrations during the first follicle wave in beef heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 93, n. 3-4, p. 199-217, 2006.

- DE LA SOTA, R. L.; SIMMEN, F. A.; DIAZ, T.; THATCHER, W. W. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biology of Reproduction*, v. 55, n. 4, p. 803-812, 1996.
- EDWARDS, R. G. Follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 37, n. 1, p. 189-219, 1974.
- EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, p. 829-838, 2001.
- EVANS, A. C. O.; FORTUNE, J. E. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology*, v. 138, n. 7, p. 2963-2971, 1997.
- FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in Cattle. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 648-654, 2001.
- GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; MYLLYMAA, S.; KAIVO-OJA, N.; DRAGOVIC, R. A.; HICKEY, T. E.; RITVOS, O.; MOTTERSHEAD, D. G. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *Journal of Cell Science*, v. 119, p. 3811-3821, 2006.
- GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, v. 14, n. 2, p. 159-177, 2008.
- GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.
- GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; 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. *Biology of Reproduction*, v. 70, n. 1, p. 99-105, 2004.
- GLISTER, C.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. *Journal of Endocrinology*, v. 188, n. 2, p. 215-225, 2006.
- GLISTER, C.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. *Journal of Endocrinology*, v. 188, n. 2, p. 215-225, 2006.
- HAYASHI, K. G.; BERISHA, B.; MATSUI, M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Expression of mRNA for the angiotensin-converting enzyme system in granulosa cells during follicular development in cows. *Journal of Reproduction and Development*, v. 50, n. 4, p. 477-480, 2004.
- KANEKO, H.; KISHI, H.; WATANABE, G.; TAYA, K.; SASAMOTO, S.; HASEGAWA, Y. Changes in plasma concentrations of immunoreactive inhibin, estradiol and FSH associated with follicular waves during the estrous cycle of the cow. *Journal of Reproduction and Development*, v. 41, n. 4, p. 311-320, 1995.
- KAYANI, R. A.; GLISTER, C.; KNIGHT, P. G. Evidence for an inhibitory role of bone morphogenetic protein(s) in the follicular-luteal transition in cattle. *Reproduction*, v. 137, n. 1, p. 67-78, 2009.
- KULICK, L. J.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle: follicle deviation and codominance within sequential waves. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 3, p. 839-846, 2001.
- LAVON, Y.; LEITNER, G.; KLIPPER, E.; MOALLEM, U.; MEIDAN, R.; WOLFENSON, D. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 40, p. 98-109, 2011.
- LEHMANN, T.; BIERNACKA-LUKANTY, J.; TRZECIAK, W. H. Expression of three negative regulators of CYP17 gene transcription in adrenocortical cells. *Endocrine Research*, v. 26, n. 4, p. 1019-1026, 2000.
- LEROY, J. L.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P. E.; DE KRUIF, A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 80, n. 3-4, p. 201-211, 2004.

- LUO, W.; WILTBANK, M. C. Distinct Regulation by Steroids of Messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in Bovine Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*, v. 75, p. 217-225, 2006.
- LUO, W.; GUMEN, A.; HAUGHIAN, J. M.; WILTBANK, M. C. The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 84, n. 2, p. 369-378, 2011.
- MATTI, N.; IRVING-RODGERS, H. F.; HATZIRODOS, N.; SULLIVAN, T. R.; RODGERS, R. J. Differential expression of focimatrix and steroidogenic enzymes before size deviation during waves of follicular development in bovine ovarian follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 321, p. 207-214, 2010.
- MIHM, M.; BAKER, P. J.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; COUSSENS, P. M.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 74, p. 1051-1059, 2006.
- MONNIAUX, D.; CLEMENTE, N.; TOUZÉ, J. L.; BELVILLE, C.; RICO, C.; BONTOUX, M.; PICARD, J. Y.; FABRE, S. Intrafollicular steroids and anti-mullerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biology of Reproduction*, v. 79, n. 2, p. 387-396, 2008.
- MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M. A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Molecular Reproduction and Development*, v. 73, n. 11, p. 1367-1379, 2006.
- NISHIMOTO, H.; HAMANO, S.; HILL, G. A.; MIYAMOTO, A.; TETSUKA, M. Classification of bovine follicles based on the concentrations of steroids, glucose and lactate in follicular fluid and the status of accompanying follicles. *Journal of Reproduction and Development*, v. 55, n. 2, p. 219-224, 2009.
- PERKS, C.M.; PETERS, A.R.; WATHES, D.C. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.116, p.157-165, 1999.
- PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST®) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nuclei Acids Research*, v.30, n9, e36.
- QUIRK, S. M.; COWAN, R. G.; HARMAN, R. M. Estradiol inhibits apoptosis of granulosa cells induced by fas ligand. *Biology of Reproduction*, v. 64(Suppl. 1), p. 291, 2001.
- ROSENFELD, C. S.; WAGNER, J. S.; ROBERTS, R. M.; LUBAHN, D. B. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction*, v. 122, p. 215-226, 2001.
- ROTH, Z.; INBAR, G.; ARAV, A. Comparison of oocyte developmental competence and follicular steroid content of nulliparous heifers and cows at different stages of lactation. *Theriogenology*, v. 69, p. 932-939, 2008.
- SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L. E.; WILTBANK, M. C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 2831-2842, 2002.
- SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 4, p. 905-920, 2004.
- SHUKOVSKI, L.; FINDLAY, J. K.; ROBERTSON, D. M. The effect of follicle-stimulating hormone-suppressing protein or follistatin on luteinizing bovine granulosa cells in vitro and its antagonistic effect on the action of activin. *Endocrinology*, v. 129, n. 6, p. 3395-3402, 1991.
- SISCO, B.; PFEFFER, P. L. Expression of activin pathway genes in granulosa cells of dominant and subordinate bovine follicles. *Theriogenology*, v. 68, n. 1, p. 29-37, 2007.
- SUGIURA, K.; SU, Y.Q.; DIAZ, F. J.; PANGAS, S. A.; SHARMA, S.; WIGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, M. J.; MATZUK, M. M.; SHIMASAKI, S.; EPPIG, J. J. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*, v. 134, n. 14, p. 2593-2603, 2007.
- SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction*, v. 9, n. 1, p. 35-48, 2003.

TABANDEH, M. R.; HOSSEINI, A.; SAEB, M.; KAFI, M.; SAEB, S. Changes in the gene expression of adiponectin and adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in ovarian follicular cells of dairy cow at different stages of development. *Theriogenology*, v. 73, n. 5, p. 659-669, 2010.

VALDEZ, K. E.; CUNEO, S. P.; GORDEN, P. J.; TURZILLO, A. M. The role of thecal androgen production in the regulation of estradiol biosynthesis by dominant bovine follicles during the first follicular wave. *Journal of Animal Science*, v. 83, n. 3, p. 597-603, 2005.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SA, W. F.; CAMARGO, L.S. A. Follicular dynamics in Zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n. 12, p. 2501-2509, 2000.

VIANA, J. H. M.; PALHAO, M. P.; SIQUEIRA, L. G. B.; FONSECA, J. F.; CAMARGO, L. S. A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, v. 73, n. 7, p. 966-972, 2010.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A., YOUNGQUIST, R.S. Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome P450 17 α -hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology*, v. 136, n. 3, p. 981-989, 1995.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento folicular é um complexo processo biológico difícil de ser estudado devido sua natureza dinâmica a qual envolve diferentes tipos celulares e a interação entre eles. O uso de técnicas moleculares e de diagnóstico por imagem permitiram grandes progressos na compreensão dos eventos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento

folicular. Entretanto, a aplicação destes avanços tecnológicos na maioria das vezes geram mais perguntas do que respostas, e juntamente novos desafios surgem.

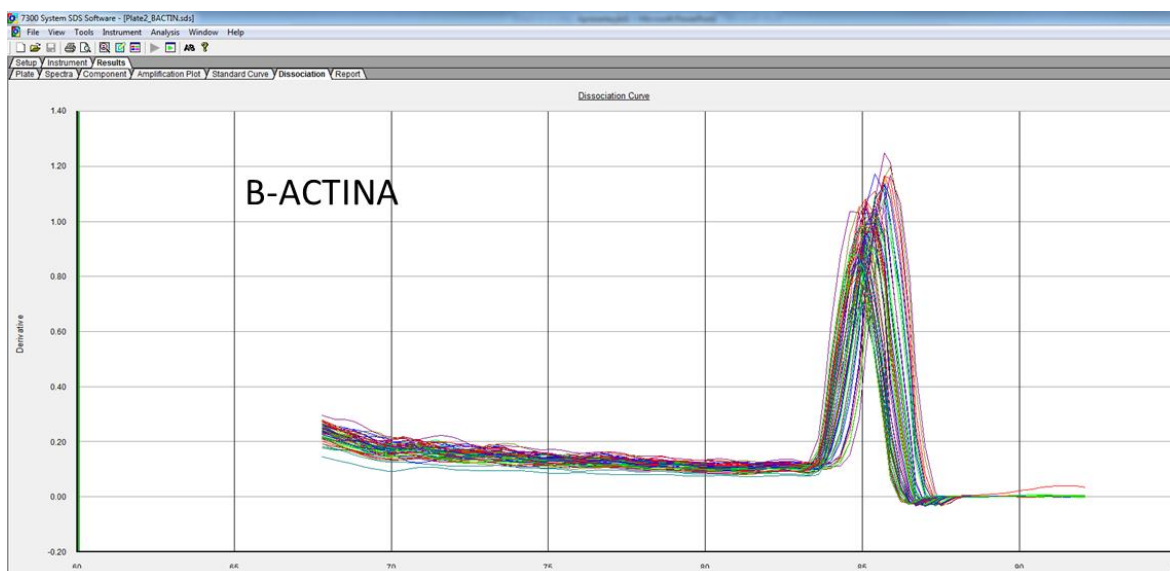
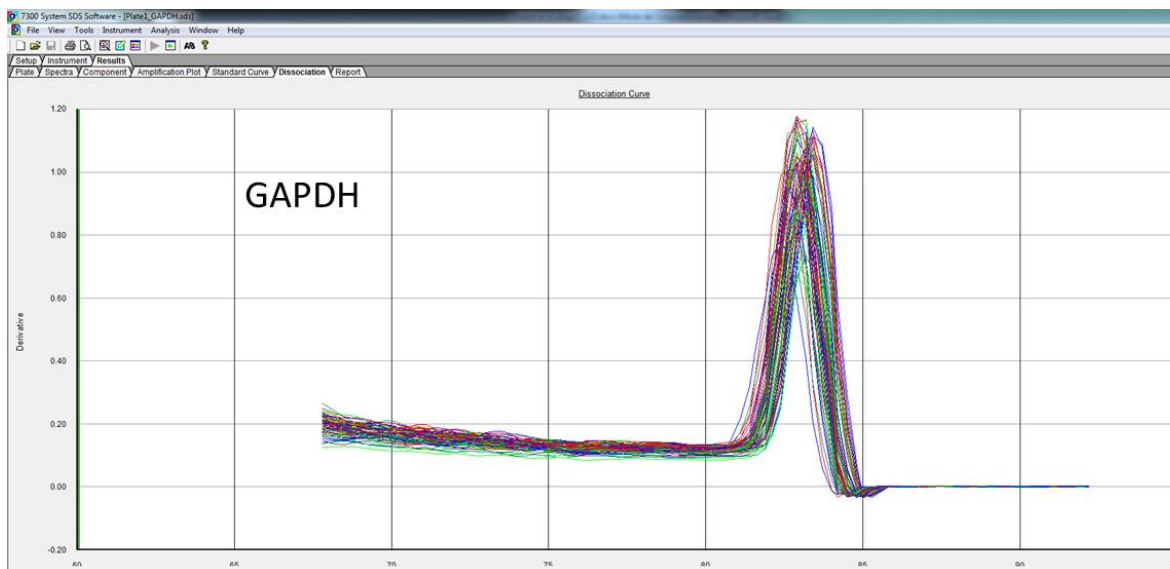
A maioria dos estudos que visam avaliar os fatores envolvidos no crescimento folicular utiliza material biológico (fluido folicular e células da granulosa) obtidos de ovários coletados em matadouros. Ainda não foi encontrada na literatura a descrição de uma metodologia capaz de permitir a coleta *in vivo* de material biológico de folículos ovarianos, em todas as suas fases de desenvolvimento, suficiente para a realização de análises moleculares e endócrinas.

O uso da ultrassonografia em modo-B no estudo do crescimento folicular limita-se a avaliações morfométricas dos folículos ovarianos. O uso do Doppler colorido permite a avaliação do fluxo sanguíneo, um parâmetro diretamente relacionado à funcionalidade do folículo ovariano. No entanto, a avaliação quantitativa do leito vascular presente na parede folicular ainda é um desafio dentro desta tecnologia.

Este é o primeiro estudo a descrever uma metodologia onde foi possível realizar aspirações individuais *in vivo* de folículos ovarianos em diferentes fases do seu desenvolvimento e recuperar individualmente quantidade suficiente de material biológico (fluido folicular e células da granulosa) para posteriores análises endócrinas e moleculares. Adicionalmente, a associação entre a ultrassonografia com Doppler colorido e algoritmos computacionais de reconstrução tridimensional permitiu que todo o fluxo sanguíneo na parede folicular detectado pelo aparelho de ultrassonografia fosse quantificado. As metodologias descritas no presente estudo abrem um leque enorme de possibilidades nas pesquisas sobre a fisiologia ovariana, que permitirão uma melhor compreensão de todos os fatores envolvidos no processo de recrutamento, seleção, dominância folicular e ovulação.

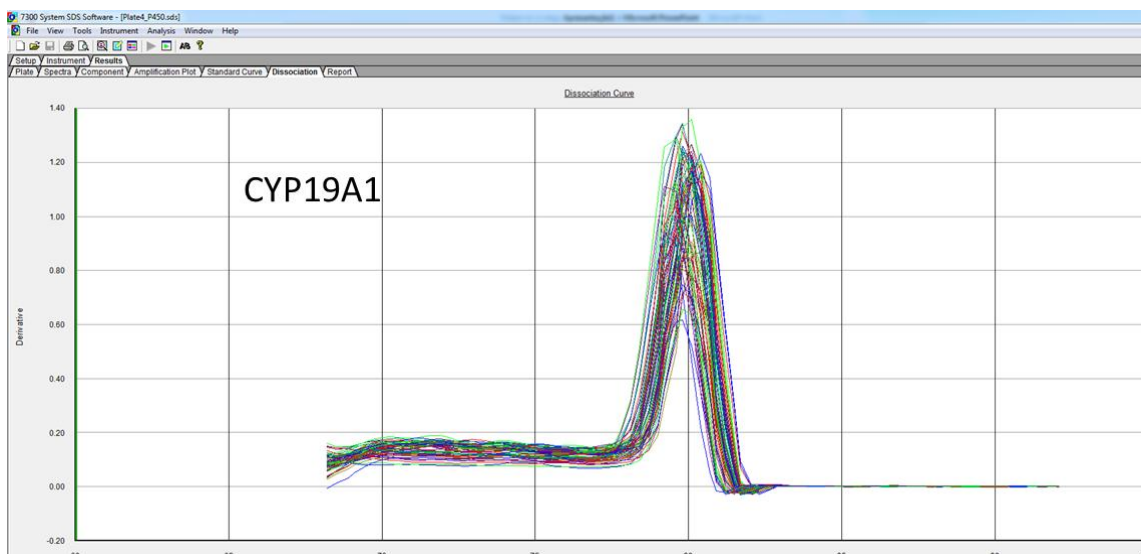
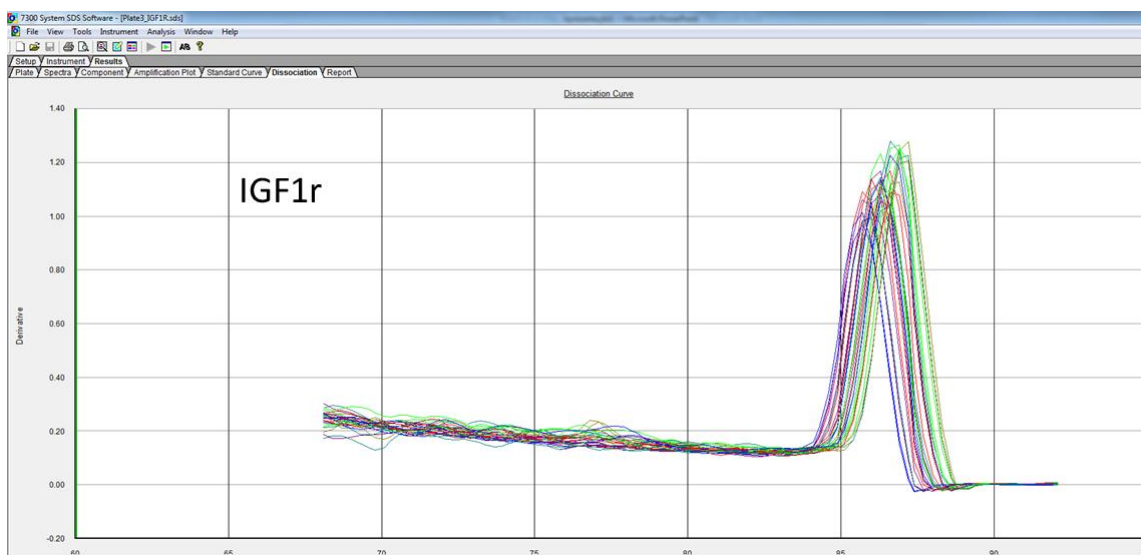
ANEXO I

Curvas de dissociação dos genes avaliados no capítulo III (GAPDH, B-ACTINA) mostrando que em cada gene houve apenas uma única amplificação no ponto da temperatura de dissociação.



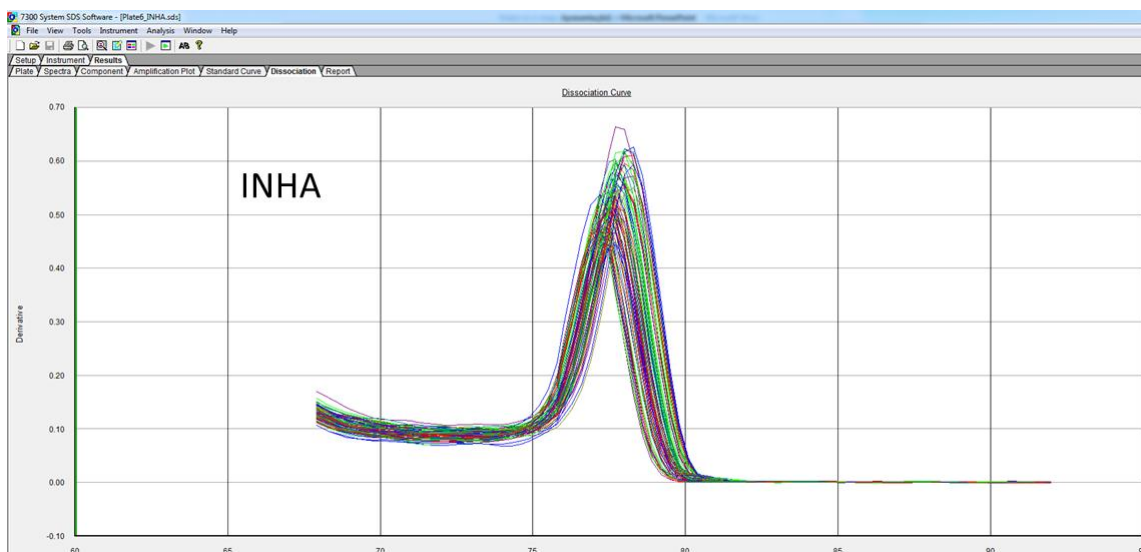
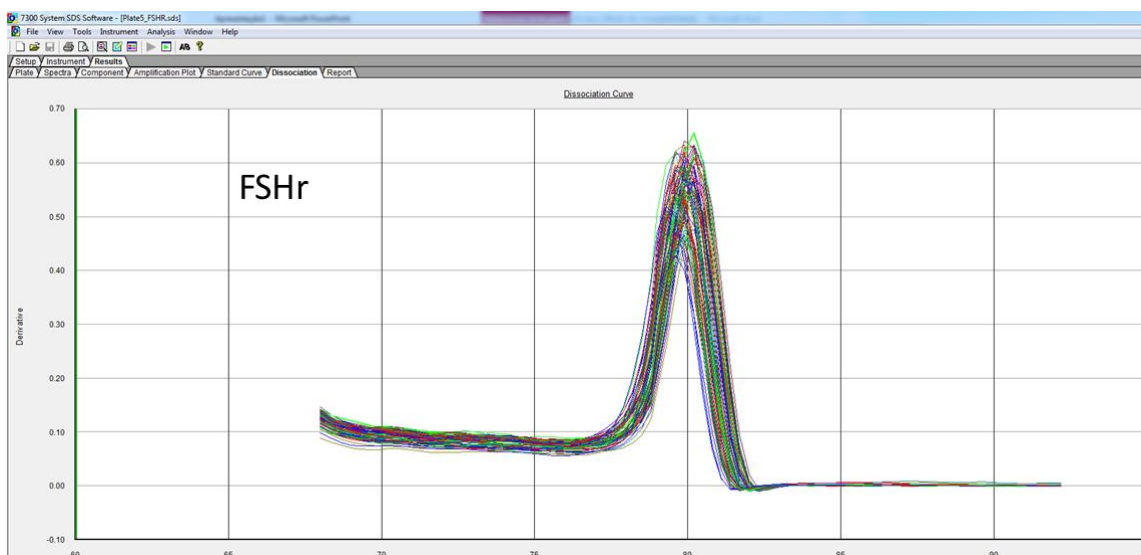
ANEXO II

Curvas de dissociação dos genes avaliados no capítulo III (IGF1r e CYP19A1) mostrando que em cada gene houve apenas uma única amplificação no ponto da temperatura de dissociação.



ANEXO III

Curvas de dissociação dos genes avaliados no capítulo III (FSHr e INHA) mostrando que em cada gene houve apenas uma única amplificação no ponto da temperatura de dissociação.



ANEXO IV

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Efeito da categoria folicular (diâmetro) sobre a recuperação de fluido folicular (Capítulo II, Experimento II).

Análise de Variância					
Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	P
Categoria folicular	11	78.45431	7.132210	125.951	0.00000
Resíduo	274	15.51571	0.5662667E-01		
Coeficiente de Variação: 40,762%					

Correlação entre o volume de vascularização e o diâmetro do folículo dominante nas novilhas da raça Gir.

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
Vascularização	Diâmetro	37	0,5595	3,9934	0,0002

Correlação entre o volume de vascularização e o diâmetro do folículo dominante nas novilhas da raça Holandesa.

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
Vascularização	Diâmetro	48	0,5651	4,6450	0,0000

Correlação entre a concentração intrafolicular de estradiol (E2) e progesterona (P4) e o diâmetro do folículo nas novilhas da raça Gir

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
E2	Diâmetro	59	0,4903	4,2477	0,0000
P4	Diâmetro	58	0,2057	1,5731	0,0607

Correlação entre a concentração intrafolicular de estradiol (E2) e progesterona (P4) e o diâmetro do folículo nas novilhas da raça Holandesa

Correlação de Pearson					
Variável	Variável	Observações	Correlação	T	Significância
E2	Diâmetro	24	0,8905	9,1823	0,0000
P4	Diâmetro	24	0,0953	0,4491	0,3289