



Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Veterinária
Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária



Relação entre o folículo e a maturidade ovocitária de acordo com a morfologia ultrassonográfica, fluxo sanguíneo e concentrações hormonais de folículos pré-ovulatórios em éguas.

Biology of Reproduction
FI 3,4

Apresentadores: Igor Santa Bárbara Araújo e Lucas Hax
Orientadores: Augusto Schneider e Liziane Lemos Vianna

Introdução



Égua...



✓ *Poliéstrica estacional*

✓ *Ciclo de 21 dias de duração média*

✓ *14 dias de fase luteínica*

✓ *7 dias de fase folicular*

Introdução



X



➤ Folículo dominante ≥ 30 mm

➤ Folículo ovula com 40-45mm

➤ Estro de aproximadamente 7 dias

➤ Ovulação 1 a 2 dias antes do final do estro

➤ 1 a 2 ondas foliculares

➤ Fossa ovulatória

➤ Folículo dominante ≥ 8 mm

➤ Folículo ovula com aproximadamente 15 mm

➤ Estro de 12 a 24h

➤ Ovulação de 8 a 15h após o final do estro

➤ 2 a 4 ondas foliculares

➤ Córtex no exterior do ovário

Introdução

□ Aspiração folicular em éguas

Éguas com folículo $\geq 32\text{mm}$



Administração de hCG



Recuperação de ovócito 24-36h pós hCG



Introdução



Em éguas...

FIV eficiente



Dificuldade na recuperação de ovócitos

- ✓ *Lavagem folicular*
- ✓ *Ovócito fortemente aderido à parede folicular*
- ✓ *Relação com o estágio de maturidade folicular e ovocitária*

Introdução



□ *Iminência da ovulação* → *Maturidade folicular*

- ✓ Serrilhamento da Granulosa
- ✓ Turgidez da parede folicular
- ✓ Fluxo sanguíneo
- ✓ Área apical
- ✓ Pontos ecóicos flutuantes no *antrum*



Maturidade ovocitária

Objetivo



Caracterizar fatores estruturais, vasculares e hormonais do folículo pré-ovulatório, associados com a recuperação versus não recuperação de ovócitos 30h após a administração de hCG e maturidade versus imaturidade dos oócitos recuperados

Material e Métodos



- ✓ Experimento conduzido no hemisfério norte entre agosto e setembro
- ✓ 37 éguas solteiras
- ✓ 3-20 anos
- ✓ 260-480 kg
- ✓ Ciclando
- ✓ Sob Luz natural
- ✓ Em potreiro recebendo feno de alfafa e sal mineral

Material e Métodos



Éguas 15 dias pós-ovulação

Com folículos de 28mm em crescimento

Escaneadas até o folículo atingir diâmetro $\geq 32\text{mm}$

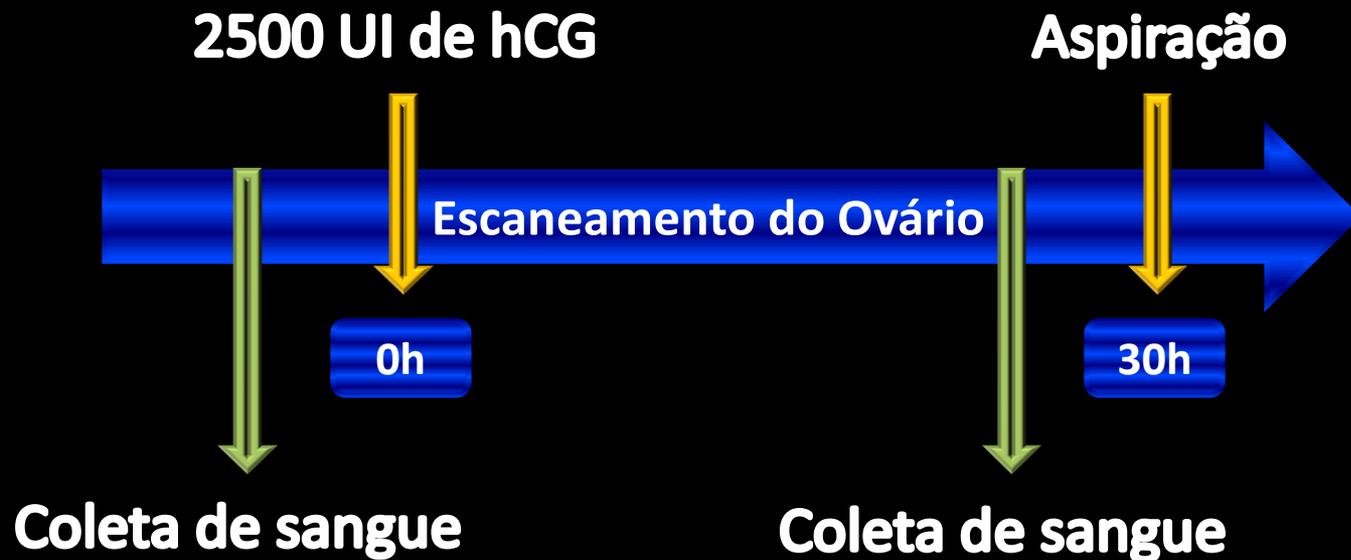
❖ Folículos sem sinais de ovulação iminente

Total de 60 folículos avaliados

Material e Métodos



➤ Éguas com folículo de diâmetro $\geq 32\text{mm}$



❖ Coleta de sangue \longrightarrow E₂ plasmático

Material e Métodos



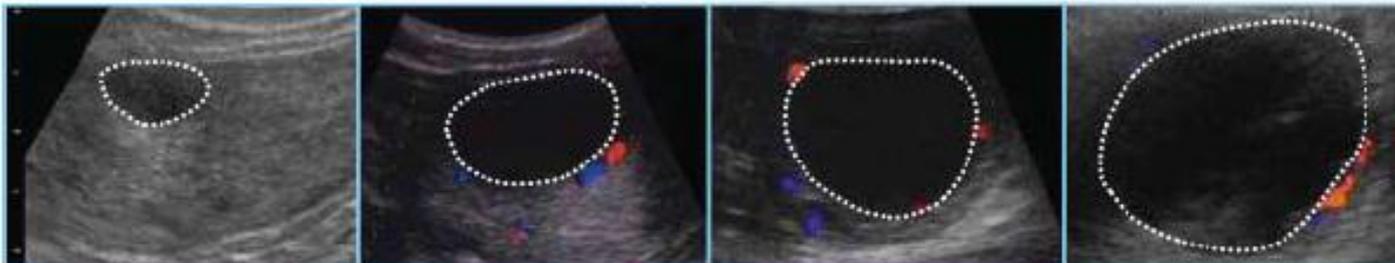
Ultrassonografia

✓ B-mode

- *Serrilhamento da granulosa*
- *Diâmetro folicular*
- *Guia da aspiração*
- *Área apical*
- *Pontos ecóicos flutuantes*

✓ Doppler

- *Fluxo sanguíneo*
- *Velocidade do pico sistólico (PSV)*
- *Tempo médio de velocidade máxima*
- *Velocidade diastólica final (EDV)*
- *Indicador de resistência (RI)*
- *Indicador de pulsatilidade (PI)*
- *Percentual de parede folicular irrigada*



Material e Métodos



➤ Aspiração folicular transvaginal

Aspira líq. Folicular

Lava o folículo de 6 a 10 vezes

Lavagem com 180ml de PBS a 37°C



☐ Líquido folicular e lavado folicular armazenados em banho-maria a 37°C por no máximo 5 min

Material e Métodos



Líquido folicular



✓ Pesquisa do ovócito e COC



✓ Centrifugação

10ml armazenados a -20°C para análise hormonal

☐ E_2 , P_4 , testosterona e IGF-I livre

Radioimunoensaio

Material e Métodos



Lavado folicular

✓ Filtrado

Remoção de células sanguíneas

✓ Pesquisa do ovócito e COC



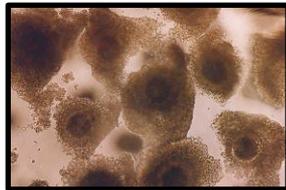
Material e Métodos



➤ Após avaliação do COC, o cumulus foi removido

✓ *COC compacto*

✓ *COC expandido*



Hialuronidase 0,05%

Pipetando continuamente



Material e Métodos



Classificação do ovócito

Maduro → com corpúsculo polar

Imaturo → sem corpúsculo polar



Material e Métodos



Células da Granulosa

- ✓ Lavadas 3X em PBS
- ✓ Fixadas com paraformalina 2%
- ✓ Estocadas a 4°C
- ✓ Avaliação da apoptose



Indicador de
maturidade folicular

- ✓ Escore para o número de
cél. e desenvolvimento



Resultados e Discussão



□ Recuperação de ovócito

- ✓ De 60 folículos foram recuperados 37 ovócitos (62%)
- ✓ Todos os ovócitos estavam no lavado folicular
- ✓ Nenhum ovócito estava no líquido folicular

Grupo ovócito recuperado  **Menor diâmetro folicular com 30h**

Resultados e Discussão



□ Recuperação de ovócito

Grupo ovócito recuperado



Menor RI com 30h

Folículo maduro



Reduz o fluxo sanguíneo



Cessa o crescimento

Favorece o desprendimento do ovócito

Resultados e Discussão



□ Recuperação de ovócito

O restante dos parâmetros circulatórios não diferiu estatisticamente

P_4 e IGF-I livre



Não diferiram quanto ao fator recuperação

E_2 reduziu da 0h até a 30h no grupo ovócito recuperado



Resultados e Discussão

□ Maturidade ovocitária

**Dos 37 ovócitos recuperados 29 (78%)
estavam maduros**

**Da 0h até a 30h E₂ reduziu mais no grupo
ovócito maduro**

**Diâmetro folicular na 30h foi menor no
grupo ovócito maduro**

Resultados e Discussão



□ Maturidade ovocitária

Grupo ovócito maduro com 30h



Serrilhamento da granulosa



Turgidez folicular



Quantidade de céls. da granulosa no liq. folicular



**Desenvolvimento das céls. da granulosa do líq.
folicular**

Resultados e Discussão



□ Maturidade ovocitária

Grupo ovócito maduro com 30h



Percentual de células em apoptose



Percentual de ovócitos com COC
expandido



Percentual de ooplasma com grânulos

Resultados e Discussão



□ Maturidade ovocitária

Grupo ovócito maduro com 30h



Concentração de P_4 no líq. folicular



Concentração de E_2 no líq. folicular



Concentração de IGF-I livre no líq.
folicular

Resultados e Discussão



TABLE 1. Relationships of oocyte-recovery rates and oocyte-maturity rates on characteristics of the preovulatory follicle 30 h after hCG treatment given when the follicle was ≥ 32 mm.

Characteristic	Oocyte recovery ^a		Oocyte maturity ^a	
	Recovered	Not recovered	Mature	Immature
Number of follicles	37 (62%)	23 (38%)	29 (78%)	8 (22%)
Follicle structure (frequency)				
Granulosa serration	27/35 (77%)	12/23 (52%)	25/28 (89%)	2/7 (29%)
Decreased turgidity	27/37 (73%)	17/23 (74%)	24/29 (83%)	3/8 (38%)
Loss of shape	8/37 (22%)	2/23 (9%)	7/29 (24%)	1/8 (13%)
Apical area	13/37 (35%)	3/23 (13%)	12/29 (41%)	1/8 (13%)
Echoic spots in antrum	6/37 (16%)	4/23 (17%)	6/29 (21%)	0/8 (0%)
Granulosa cells				
Amount (score)	2.6 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	2.8 \pm 0.1	2.0 \pm 0.3
Expansion (score)	2.8 \pm 0.0	2.0 \pm 0.2	3.0 \pm 0.0	1.9 \pm 0.2
Apoptosis (frequency)	6.8 \pm 0.7	6.3 \pm 0.7	7.4 \pm 0.8	4.6 \pm 0.8
COC Expansion (frequency)	33/37 (89%)	—	29/29 (100%)	4/8 (50%)
Ooplasm granulation (% of area)	79.8 \pm 2.4	—	76.7 \pm 2.7	90.9 \pm 3.3
Hormones in follicular fluid				
Estradiol (ng/ml)	876 \pm 55	919 \pm 48	799 \pm 49	1126 \pm 146
Progesterone (ng/ml)	1039 \pm 103	969 \pm 159	1156 \pm 119	604 \pm 91
Testosterone (ng/ml)	15.6 \pm 0.1	15.4 \pm 0.1	15.5 \pm 0.1	15.6 \pm 1.6
Free IGF1 (ng/ml)	15.1 \pm 1.8	19.0 \pm 3.3	12.2 \pm 1.5	25.9 \pm 4.6

^a Within oocyte recovery groups and within oocyte maturity groups, means are significantly different or approach being significantly different as follows: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; # $P < 0.1$.

Resultados e Discussão



Folículo maduro...

Diminui o fluxo sanguíneo



Diminui o crescimento



Vasos sanguíneos se posicionam na face medular do folículo



Fragilização da parede folicular



Formação de área apical na face externa da parede folicular

Resultados e Discussão

Folículo maduro...

IGF-I livre

Apoptose das cél da granulosa

Diminui E₂ intrafolicular

Desfaz as *gap junctions* entre cumulus e zona pelúcida

Corta o fluxo de fatores inibidores da meiose cumulus → zona pelúcida

Ovócito retoma o processo de divisão e maturação

Resultados e Discussão



Folículo maduro...

Granulosa vai se desprendendo



**Pontos ecogênicos
flutuantes no antrum**

Início do processo de luteinização



P₄ no líq. folicular



Aderência do ovócito na parede do folículo



Melhora a taxa de recuperação de ovócito

Conclusão



Maturidade folicular



Maturidade ovocitária



Recuperação de ovócito



Conclusão

- ✓ Folículos pré-ovulatórios $\geq 32\text{mm}$ diferem quanto ao estágio de maturação

Líqu. folicular de folículo com ovócito maduro...



P₄



E₂



IGF-I livre

Conclusão

✓ P_4 e IGF-I interferem na maturação ovocitária, mas não na maturação folicular

Muito Obrigado!

igor_sba@hotmail.com
lucashax@hotmail.com