

Artículo original:

FOLÍCULOS PREANTRALES, EMERGENCIA FOLICULAR Y APLICACIONES **Preantral follicles, follicular emergency and applications**

P. Alvares-Lunardelli, S. Miguez-González, F. Zandonadi-Machado, L. Simões Rafagnin-Marinho, M. Marcondes-Seneda

*Departamento de Clínicas Veterinárias -
Universidade Estadual de Londrina, Londrina,
Paraná, Brasil
86051-990 Fone (43) 3371-4064 fax (43)
3371-4063*

Email:
mseneda@uel.br

*Palabras Clave:
Bovino, folículos, oocyte*

INTRODUCCIÓN

Se considera que la capacidad de reproducción máxima total de una hembra es la mayor población de folículos presentes en los ovarios toda la vida. En los animales domésticos, tal potencial se alcanza durante la vida fetal con la formación de un grupo de folículos primordiales quiescentes (no activados). De acuerdo con el presente concepto, el número de folículos que poseerá una hembra ya se determinó antes del nacimiento (Zuckerman, 1951; Franchi *et al.*, 1962). En 110 días de gestación el número medio de folículos en el ovario de un feto bovino es de aproximadamente 2.700.000, reducido a aproximadamente 130.000 folículos preantrales hasta el nacimiento (Erickson, 1966). Esta reducción en el número de folículos ocurre a través de procesos degenerativos o de apoptosis.

Aunque miles de folículos presentes en los ovarios de una hembra adulta, se estima que el 99,9% de ellos no llegan hasta la ovulación y sufren un proceso degenerativo o apoptótico conocido como atresia. Esto hace del ovario un órgano con una productividad muy baja, si se considera el número potencial de folículos formados en la etapa fetal.

Por lo tanto, ha habido una búsqueda constante para una mejor comprensión de los diversos factores que intervienen en la foliculogénesis en la etapa pre-antral y en el proceso de pérdida folicular. La recuperación de estos ovocitos para la posterior producción *in vitro* de embriones sin duda podría aumentar la eficiencia reproductiva de los animales de alto valor genético.

Por otra parte, lo perfeccionamiento continuo de los conocimientos de la fisiología de las hembras puede asegurar el avance tecnológico de biotecnologías como la recolección y transferencia de embriones, la producción *in vitro* de embriones, la inseminación artificial de tiempo fijo y las técnicas asociadas, como la medicina regenerativa.

ACTIVACIÓN FOLICULAR

Los mecanismos responsables del inicio del crecimiento folicular son aún enigmáticos y representan una de las principales cuestiones relacionadas con la biología del ovario. También conocido como "la activación de los folículos primordiales", este evento puede ocurrir días, meses o incluso años después de la formación de los folículos.

La selección del folículo implica varios mecanismos y factores conocidos y desconocidos que se interrelacionan en los procesos de causa y efecto, aún difíciles de comprender. Entre estos factores están implicadas variaciones en los niveles de gonadotropinas y sus receptores y se sospecha de una serie de factores producidos localmente tales como el sistema IGF. Además, los factores ambientales, tales como la nutrición, pueden influir en

el desarrollo folicular y en la calidad de los ovocitos (Garnsworthy & Webb, 1999). Aunque el factor de activación real de todo el proceso de selección sigue siendo poco claro, se sabe que el conjunto de eventos que actúan en este proceso se organiza gradualmente.

El crecimiento de los folículos antrales iniciales hasta un diámetro de aproximadamente 4 mm en ausencia de FSH apoya la hipótesis de que la etapa pre-antral de la foliculogénesis es predominantemente gobernada por factores intraovarios (Gong *et al.*, 1996). Así como la regulación de la activación, el mecanismo de control del crecimiento continuo posterior de los folículos primordiales sigue vagamente comprendido. Sin embargo, el crecimiento folicular probablemente depende de las interacciones que se producen entre el ovocito y las células de la granulosa.

El papel de las gonadotropinas en el control del desarrollo folicular es controvertido. Receptores de FSH (FSHR) se pueden detectar en los folículos primarios bovinos (Wandji *et al.*, 1992) y la estimulación del desarrollo de folículos preantrales se puede lograr por la adición del FSH al medio de cultivo. Sin embargo, se supone que el FSH desempeña un papel permisivo en lugar de regulador en esta etapa del desarrollo (McNatty *et al.*, 1999).

CRECIMIENTO FOLICULAR

El desarrollo de folículos antrales en el ganado vacuno se puede dividir en dos fases distintas. En primer lugar, existe un crecimiento "lento", que dura alrededor de 30 días, comenzando con la adquisición del antró (folículos con un diámetro medio de 300 μ M) y posterior desarrollo hasta la etapa de pequeños folículos antrales (Lussier *et al.*, 1987). La segunda fase, de crecimiento "rápido", puede durar de cinco a siete días y por lo general se describe como onda folicular. La onda folicular tiene algunas peculiaridades como: 1) la aparición de un grupo de folículos de 2-3 mm; 2) etapas finales del proceso de selección folicular, que generalmente permiten que sólo un folículo siga creciendo y aumente la síntesis de estradiol y 3) período variable de dominancia folicular que puede conducir al desarrollo de folículos preovulatorios y la ovulación (Sunderland *et al.*, 1994). Se considera que el folículo dominante tiene diámetro de aproximadamente 8,5 mm en los *Bos taurus* (Sartorelli *et al.*, 2005) y 6.2 mm en los *Bos indicus* (Gimenes *et al.*, 2008).

El estándar de ondas foliculares en los bovinos puede ocurrir con la formación de una, dos (Rhodes *et al.*, 1995) o tres (Figueiredo *et al.*, 1997) ondas de crecimiento folicular por ciclo. En cebú, la ocurrencia predominante es de tres ondas, pero se informó de la presencia de hasta cuatro ondas de crecimiento folicular por ciclo estral (Figueiredo *et al.*, 1997). Estas variaciones pueden ocurrir debido a diversos factores como la dieta, la gestión, la producción de leche, la lactancia y el posparto inmediato (Ginther *et al.*, 1996).

La etapa antral del desarrollo folicular depende de las gonadotropinas, que inducen el reclutamiento y crecimiento sincronizado de los folículos antrales en ondas foliculares. Además de las gonadotropinas, péptidos sintetizados localmente también desempeñan un papel clave en la regulación de la fase antral, ya sea a través de mecanismos endocrinos o paracrinós. El aumento de las concentraciones plasmáticas de FSH es la estimulación necesaria para el reclutamiento y la emergencia de la onda folicular (Adams *et al.*, 1992).

En las especies de única ovulación, sólo un folículo se selecciona entre los reclutados para seguir creciendo y diferenciarse en folículo ovulatorio, mientras que otros están destinados a atresia. El folículo seleccionado (folículo dominante) suprime activamente el crecimiento de los subordinados mediante la secreción de estradiol y la inhibina (Fortune, 1994).

La supresión selectiva de las gonadotropinas endógenas usando agonistas de GnRH era un modelo interesante para la evaluación de las necesidades de FSH y LH en el desarrollo antral de folículos en los bovinos (Gong *et al.*, 1996). Por lo tanto, folículos antrales bovinos crecieron hasta un diámetro de 4 mm en ausencia de FSH y LH, indicando que las etapas pre-antral y antral inicial dependen principalmente de estimulación local. El crecimiento entre 4 y 8 mm era dependiente de FSH y independiente de LH, mientras que folículos mayores que 9 mm sólo fueron observados en presencia de LH endógeno o FSH exógeno. Por lo tanto, los folículos se consideran FSH dependientes hasta la ocurrencia de la dominancia, cuando se vuelven dependientes de LH (Fortune *et al.*, 2001).

La emergencia folicular se define por el menor diámetro utilizado para generar perfiles de crecimiento folicular en el ultrasonido. La tecnología de ultrasonido transrectal ha permitido un gran avance en la comprensión de la transición entre las fases de selección y dominancia folicular, así como las asociaciones temporales entre las mudanzas en la dinámica folicular y concentraciones de hormonas periféricas (Ireland *et al.*, 2000).

Sin embargo, el mecanismo exacto de la selección y dominancia aún no ha sido elucidado. Algunos de los factores y características parecen estar estrechamente relacionados con la dominancia folicular, pero no necesariamente son los iniciadores del proceso. Entre estos factores son el tamaño folicular, la esteroidogénesis (especialmente la producción de estradiol), la capacidad de respuesta al FSH y LH (número de receptores para dichas gonadotropinas) y diversos factores locales, tales como el IGF-I, por ejemplo.

TEORÍA DE LA NEOFOLICULOGÉNESIS

Nuevas teorías se han propuesto sobre la reserva folicular del ovario, desafiando los conceptos de más de 150 años acerca de la origen y el crecimiento de los gametos femeninos. De acuerdo con el actual concepto, el número de ovocitos se establece de forma permanente en los ovarios fetales (Zuckerman, 1951). En la última década, sin embargo, esta hipótesis ha sido objeto de debate. Un grupo de Harvard describió la presencia de marcadores específicos de la meiosis en ovarios de hembras adultas de pequeños ratones adultos (Johnson *et al.*, 2004). También se ha reportado la aparición de folículos viables después de la transfusión de médula ósea y sangre periférico en hembras previamente esterilizadas (Johnson *et al.*, 2005).

Desde entonces, se han realizado una serie de estudios para probar la nueva hipótesis, algunos reforzando (Dyce *et al.*, 2006; Woods *et al.*, 2013) y otros contrariando (Eggen *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012) la teoría de la neofoliculogénesis. Independientemente de la opinión personal sobre el tema, la neofoliculogénesis se presenta como una hipótesis que requiere de un trabajo profundo y sólido, sea para demostrar su existencia, definitivamente refutarla, o incluso mostrar la coexistencia de ambos los conceptos.

FOLÍCULOS MULTIOVOCITOS

Folículos que contienen más de un ovocito se han descrito en los ovarios de hembras adultas en varias especies de mamíferos (revisado por Silva-Santos & Seneda, 2011). Los folículos con dos o más ovocitos son comunes durante el desarrollo fetal, pero la presencia de estas estructuras en los ovarios de las hembras adultas es un fenómeno fisiológico bastante intrigante. Aún no se conoce la contribución de los folículos multiovocitos para la fertilidad de hembras adultas. Por lo tanto, se queda por determinar si las estructuras son simplemente restos de la etapa fetal o tienen un papel en el desarrollo folicular en hembras adultas.

Hembras indicus tienen un promedio de cuatro veces más folículos antrales que hembras taurus, pero el número de folículos primordiales no difiere entre las dos subespecies (Silva-Santos *et al.*, 2011). Por esta razón, los folículos multiovcitos en hembras *Bos indicus* pueden ser vistos como un hecho particularmente intrigante.

CONCLUSIONES

A pesar de los grandes progresos alcanzados en los últimos años en el campo de la foliculogénesis, esto sigue siendo un gran universo por explorar, especialmente en relación con la etapa pre-antral. La neo-ovogénesis se puede considerar una hipótesis, y se hace necesario discutir que las formaciones folicular pueden contener conceptos que aún no se entienden. La importancia de los folículos multiovocitos, así como la razón de las hembras indicus teneren más ovocitos que las hembras taurus, necesitan de una mejor comprensión.

REFERENCIAS

- Adams, G.P.; R.L. Matteri; J.P. Kastelic; J.C.H. Ko; O.J. Ginther. 1992. Associations between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 94: 177-88.
- Dyce P.W.; W. Lihua; J. Li. 2006. *In vitro* germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature Cell Biology*, 8: 384-90.
- Eggan K.; S. Jurga; R. Gosden; I.M. Min, A.J. Wagers. 2006. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*, 441: 1109-114.
- Erickson B.H. 1966. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction & Fertility* 10: 97-105.
- Figueiredo, R.A.; C.M. Barros; O.L. Pinheiro; J.M.P. Soler. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* 47(8): 1489-505.
- Fortune, J.E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction* 50(2): 225-32.
- Fortune, J.E.; G.M. Rivera; A.C.O. Evans; A.M. Turzillo. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction* 65(3): 648-54.
- Franchi, L.L.; M.A. Mandl; S. Zuckerman. 1962. The development of the ovary and the process of oogenesis. In: *The Ovary* (S. Zuckerman ed.) Academic press: New York 1: 1-88.
- Garnsworthy P. C.; R. Webb. 1999. The influence of nutrition on fertility in dairy cows. In: *Recent Advances in Animal Nutrition*. (P.C. Garnsworthy & J. Wiseman ed.) Nottingham University Press: 39-58.
- Gimenes, L.U.; M.F. Sá Filho; N.A.T. Carvalho; J.R. Torres-Júnior; A.H. Souza; E.H. Madureira; L.A. Trinca; E.S. Sartorelli; C.M. Barros; J.B. Carvalho; R.J. Mapletoft; P.S. Baruselli. 2008. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* 69(7): 852-8.
- Ginther, O.J.; M.C. Wiltbank; P.M. Fricke; J.R. Gibbons; K. Kot. 1996. Selection of dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction* 55(6): 1187-94.
- Gong J.G.; B.K. Campbell; T.A. Bramley; C.G. Gutierrez; A.R. Peters, Webb R. 1996. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biology of Reproduction* 55:68-74.
- Ireland, J.J.; M. Mihm; E. Austin; M.G. Diskin; J.F. Roche. 2000. Historical Perspective of Turnover of Dominant Follicles during the Bovine Estrous Cycle: Key Concepts, Studies, Advancements, and Terms. *Journal of Dairy Science* 83: 1648-1658.
- Johnson J.; J. Canning; T. Kaneko; J.K. Pru; J.L. Tilly. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 428: 145-50.
- Johnson J.; J. Bagley; M. Skaznik-Wikiel; H.J. Lee; G.B. Adams; Y. Niikura; K.S. Tschudy; J.C. Tilli; M.L. Cortes; R. Forkert; T. Spitzer; J. Iacomini; D.T. Scadden; J.L. Tilly. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, 122: 303-315.
- Lussier J.G.; P. Matton; I.J. Dufour. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 81(2): 301-7.
- McNatty K.P.; D.A. Heath, T. Lundy, A.E. Fidler; L. Quirke; A. O'Connell; P. Smith; N. Groome; D.J. Tisdall. 1999. Control of early ovarian follicular development. *Journal of Reproduction and Fertility* 54 (Suppl.): 3-16.
- Rhodes F.M.; G. Death; K.W. Entwistle. 1995. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Animal Reproduction Science* 38: 265-77.
- Sartorelli E.S.; L.M. Carvalho; D.R. Bergfelt; O.J. Ginther; C.M. Barros. 2005. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* 63(9): 2382-94.
- Silva-Santos K.C.; G.M.G. Santos; L.S. Siloto; M.F. Hertel; E.R. Andrade; M.I.B. Rubin; L. Sturion; F.A.M. Sterza; M.M. Seneda. 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* females. *Theriogenology* 76: 1051-7.
- Silva-Santos K.C.; M.M. Seneda. 2011. Multioocyte follicles in adult mammalian ovaries. *Animal Reproduction* 8: 58-67.
- Sunderland, S.J.; M.A. Crowe; M.P. Boland; J.F. Roche; J.J. Ireland. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction*

and Fertility 101(3): 547-555

22. Wandji S.A. ; G. Pelletier ; M.A. Sirard. 1992. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled basic fibroblast growth factor and 125I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. *Biology of Reproduction* 47: 807-13.
23. Woods D.C.; Y.A.R. White; Y. Niikura; S. Kiatpongsan; H. Lee; J.L. Tilly. 2013. Embryonic stem cell-derived granulosa cells participate in ovarian follicle formation *in vitro* and *in vivo*. *Reproductive Sciences* 20(5): 524-35.
24. Zhang H.; W. Zheng; Y. Shen; D. Adhikari; H. Ueno; K. Liu. 2012. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109(31): 12580-5.
25. Zuckerman S. 1951. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Progress in Hormon Research* 6: 63-108.