UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

PERFIL PROTEICO DO FLUIDO FOLICULAR DURANTE A FOLICULOGÊNESE DA ÉGUA

Autor: Bianca do Prado Lima Petrucci Rocha

PORTO ALEGRE
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

PERFIL PROTEICO DO FLUIDO FOLICULAR DURANTE A FOLICULOGÊNESE DA ÉGUA

Autor: Bianca do Prado Lima Petrucci Rocha

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos - UFRGS como requisito para obtenção de grau de Doutor na área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

PORTO ALEGRE
2014

CIP - Catalogação na Publicação

DO PRADO LIMA PETRUCCI ROCHA, BIANCA
PERFIL PROTEICO DO FLUIDO FOLICULAR DURANTE A FOLICULOGÊNESE DA ÉGUA / BIANCA DO PRADO LIMA PETRUCCI ROCHA. -- 2014.
76 f.

Orientador: RODRIGO COSTA MATTOS.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. PROTEÔMICA. 2. APOLIPOPROTEÍNA A-1. 3. GELSOLINA. 4. TRANSFERRINA. 5. ALFA-1-ANTIPROTEINASE 2. I. COSTA MATTOS, RODRIGO, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BIANCA DO PRADO LIMA PETRUCCI ROCHA

PERFIL PROTEICO DO FLUIDO FOLICULAR DURANTE A FOLICULOGÊNESE DA ÉGUA

APROVADO POR:

_____

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos
Orientador

_____

Profa. Dra. Maria Inês Mascarenhas Jobim

_____

Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

_____

Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos Eugênio e Carmen Lúcia, pelos valores e princípios, que me acompanham desde a infância, e me fazem enxergar a vida de forma humana e a todas as pessoas como iguais. Agradeço também ao amor incondicional. Não há legado de maior valor.

Ao meu marido Dimas Rocha e a minha filha, Martina Rocha, por fazerem a minha vida mais alegre e meus dias mais alegres e minha vida mais colorida. Meus queridos e fiéis companheiros em todos os momentos.

A minha irmã, Ana Carolina, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos importantes da minha vida, prestando um apoio que é só dela.

Ao meu prezado orientador, Rodrigo Mattos, por todos os ensinamentos ao longo destes anos que me proporcionaram não apenas crescimento profissional, mas também me tornaram um ser humano melhor. Um exemplo a ser seguido.

À professora Maria Inês Jobim por me mostrar que, com dedicação, aquilo que inicialmente parece assustador pode ser o caminho para a plena realização. Com ela aprendi que o mundo é proteico!

Aos meus amigos e colegas Tamarini Arlas, Henrique Bastos e Gabriel Santos, pela grande contribuição científica, pelos momentos indispensáveis de descontração e pela parceria em todas as horas.

À colega Anita Pimentel pela grande contribuição na fase final do desenvolvimento desta tese, fundamental para conclusão da mesma.

À Márcia Oliveira Ferreira pela fundamental contribuição na produção das artes gráficas presentes neste trabalho.

A todos os demais amigos e colegas do Reprolab, de minha convivência diária, com suas qualidades e individualidades que se somam e fazem deste laboratório um ambiente rico e produtivo e, por isso, também são de grande importância para mim.

A minha amiga e colega Caroline Wolf pela parceria durante toda a realização da parte prática deste experimento.

Os autores agradecem ao CNPQ, CAPES e FAPERGS por financiarem este experimento.

"A hidden factor should be considered nature's challenge to open-minded biologists but a pitfall for the close-minded."

O.J. Ginther

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação gráfica do total de spots encontrados nos géis do FF bruto de éguas utilizando o PDQuest software..... 49

Figura 2 Imagem tridimensional produzida pelo PDQuest software, referente à albumina e à alpha-1-antiproteinase 2..... 51

Figura 3 Expressão (%) da gelsolina, albumina, apolipoproteína A-1, albumina, transferrina, albumina e alfa-1-antiprotease 2, no maior folículo (F1), nos diferentes grupos experimentais..... 52

Figura 4 A. Expressão proteica (%) da POMZP3 no maior e no segundo maior folículo, nos diferentes grupos experimentais. B. Expressão proteica (%) da A1AT2 no maior e no segundo maior folículo, nos diferentes grupos experimentais..... 52

Figura 5 Esquema ilustrativo demonstrando as interações entre algumas das proteínas, que demonstraram diferença significativa na expressão nos diferentes grupos experimentais, e outros compostos envolvidos..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição das éguas em seus respectivos grupos e os parâmetros utilizados para a classificação (tamanho F1, EU e dimensão do CL) e dosagem de progesterona plasmática..... 48

Tabela 2 Proteínas identificadas no FF bruto de éguas, separadas por 2D-PAGE..... 50

Tabela 3 Ontologia gênica e definição de processos biológicos, funções moleculares e localização das proteínas identificadas no FF de éguas, que demonstraram diferença significativa durante as diferentes fases do desenvolvimento folicular, realizada através da utilização da ferramenta STRAP..... 53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **12**

2 REVISÃO DA LITERATURA..... **13**
2.1 Ciclo reprodutivo..... **13**
2.2 Dinâmica folicular..... **15**
2.3 Ultrassonografia e Dinâmica Folicular..... **20**
2.4 Foliculogênese..... **21**
2.5 Fluido folicular..... **23**
2.6 Proteínas do Fluido Folicular..... **27**
2.6.1 Albumina..... 29
2.6.2 Alfa-1-antiprotease 2..... 30
2.6.3 Apolipoproteína A-1..... 31
2.6.4 Gelsolina..... 33
2.6.5 POM 121-ZP3 Fusion..... 34
2.6.6 Transferrina..... 35

3 ARTIGO..... **39**

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... **64**

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... **65**

PERFIL PROTEICO DO FLUIDO FOLICULAR DURANTE A FOLICULOGÊNESE DA ÉGUA

RESUMO

O fluido folicular (FF) é um líquido extracelular complexo que se acumula no antro dos folículos ovarianos durante o seu desenvolvimento. É o meio essencial para o crescimento e a maturação das células ovarianas somáticas e germinativas e contém substâncias envolvidas na diferenciação celular, maturação do oócito, qualidade do gameta, ruptura da parede folicular e luteinização. O estudo de seus componentes é fundamental para um melhor entendimento dos mecanismos que envolvem a dinâmica folicular na espécie equina. O objetivo deste trabalho foi comparar o perfil proteico do maior folículo, e entre o maior e o segundo maior folículo, em diferentes momentos do desenvolvimento folicular. Para este estudo, quarenta ovários, oriundos de vinte éguas Crioulas, não gestantes e cíclicas, foram coletados durante a estação reprodutiva, em um abatedouro. Antes do abate, as éguas foram divididas em quarto grupos de acordo com o diâmetro folicular, ecotextura uterina (EU) e presença de corpo lúteo (CL): G 15 (emergência) (n = 3) folículos até 15 mm, EU $\geq$ 1, CL $\geq$ 20 mm; G 20 (divergência) (n = 9) folículos entre 20 e 25 mm, EU 1-2, CL 15-20 mm; G 30 (dominância) (n = 4) folículos entre 30 e 35 mm, EU $\geq$ 2, CL $\leq$ 15 mm; G 40 (pré-ovulatória) (n = 4) folículos $\geq$ 40 mm, EU 2-3, CL $\leq$ 15 mm. Após o abate, os ovários foram coletados e o FF dos dois maiores folículos foi aspirado. A técnica de 2D-PAGE foi realizada, em duplicata, utilizando gel de acrilamida a 12%. Os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue R-250, escaneados e analisados, utilizando o PDQuest software, para determinar a densidade óptica dos spots. A identificação proteica foi realizada através de espectometria de massa (MS). Um total de 43 spots foi observado. Sete spots, representando cinco proteínas (albumina, apolipoproteína A-1, gelsolina, transferrina e α-1-antiproteinase 2), apresentaram diferenças (P<0,05) na expressão, no FF do maior folículo, nos diferentes grupos. Um spot, representado pela proteína POMZP3, demonstrou diferença (P=0,018) em sua expressão, entre o maior e o segundo maior folículo, nos diferentes grupos. E, por fim, um spot, identificado como a proteína α-1-antiproteinase 2, apresentou interação (P=0,047) entre o maior e o

segundo maior folículo e as diferentes fases da foliculogênese. Os resultados deste trabalho demonstram que o perfil proteico do FF difere durante o desenvolvimento folicular e que, as maiores alterações, são observadas a partir da dominância. Além disso, provavelmente, algumas destas proteínas, bem como suas correlações, tenham grande importância nos eventos que ocorrem durante a foliculogênese.

Palavras-chave*: proteômica; albumina; apolipoproteína A-1; gelsolina; transferrina; alfa-1-antiprotease 2; POMZP3.*

PROTEIN PROFILE OF FOLLICULAR FLUID DURING FOLLICULOGENESIS OF THE MARE

ABSTRACT

The follicular fluid (FF) is a complex extracellular fluid that accumulates in the antrum follicles during the follicular development. It is the essential medium for the growth and maturation of somatic and germ ovarian cells and contains substances involved in cell differentiation, oocyte maturation, gamete quality, rupture of the follicle wall and luteinization. The study of its components is crucial for a better understanding of the mechanisms involved in follicular dynamics in mares. The objective of this study was to determine the protein profile of the largest follicle and among the largest and the second largest follicle at different stages of follicular development. In this study, 40 ovaries from 20 non pregnant Criollo cycling mares were collected during the breeding season in an abattoir. Before slaughter, the mares were divided into four groups according to follicular diameter, uterine ecotexture (UE) and the presence of corpus luteum (CL): G 15 (emergence) (n = 3), follicles up to 15mm, EU ≥ 1, CL ≥ 20 mm; G 20 (deviation) (n = 9), follicles between 20 and 25 mm, EU 1-2, CL 15-20 mm; G 30 (dominance) (n = 4), follicles between 30 e 35 mm, EU ≥ 2, CL ≤ 15 mm; G 40 (ovulation) (n = 4), follicles ≥ 40 mm, EU 2-3, CL ≤ 15 mm. After slaughter, the ovaries were collected and the FF of the two largest follicles was aspirated. The technique of 2D-PAGE was performed in duplicate using 12% acrylamide gel. Gels were stained with Comassie Brilliant Blue R-250, scanned and analyzed using the PDQuest software to determine the optical density of the spots. Protein identification was performed by mass spectrometry (MS). A total of 43 spots was observed. Seven spots representing five proteins (albumin, apolipoprotein A-1, gelsolin, transferrin e α-1-Antitrypsin 2) showed differences ($P<0.05$) in expression, the FF of the largest follicle in the different groups. One spot, represented by POMZP3 protein showed a difference ($P=0.018$) in expression between the largest and second largest follicle in the different groups. Finally, one spot, identified as the protein α-1-antitrypsin 2, showed interaction ($P=0.047$) between the largest and second largest follicle. The results of this study demonstrated that the protein profile of FF differs during follicular development

and that the largest changes are observed from the dominance. Also probably some of these proteins, as well as their correlations, have great importance in the events that occur during folliculogenesis.

Keywords*: proteomic; albumin; apolipoproteín A-1; gelsolin; transferrin; alfa-1-antitrypsin 2; POMZP3.*

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o terceiro maior rebanho equino do mundo, fazendo da equinocultura uma atividade de grande importância econômica e social para o País. No RS, o crescimento da comercialização de cavalos crioulos superou 1000% na última década (SARMENTO, 2011). No Brasil, o agronegócio do cavalo é responsável pela geração de aproximadamente 3,2 milhões de empregos, superando de forma notável a indústria automotiva e de aviação, atingindo um faturamento anual próximo a 7,5 bilhões de Reais (LIMA et al., 2006).

Apesar do progresso no desempenho reprodutivo observado nas últimas décadas, resultado da pesquisa e da aplicação de novas técnicas, alguns gargalos na reprodução equina ainda se fazem presentes. A fertilização *in vitro*, por exemplo, ainda não apresenta a repetibilidade desejada (HINRICHS, 2010). O insucesso desta técnica está diretamente relacionado à falha do espermatozóide em penetrar a zona pelúcida (ZP) *in vitro*, possivelmente pela capacitação espermática incompleta ou alterações na ZP que impedem a reação acrossomal e a passagem do espermatozóide através da zona (HINRICHS, 2012). Desta forma, a fertilização é realizada através de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (HINRICHS, 2010).

O fluido folicular (FF) é o meio essencial para o crescimento e a maturação das células ovarianas, somáticas e germinativas, e contém substâncias envolvidas na diferenciação celular, na qualidade do gameta e na ruptura da parede folicular. A determinação do seu perfil proteico irá contribuir para um melhor entendimento da fisiologia ovariana, possibilitar o controle do crescimento e desenvolvimento folicular e o aperfeiçoamento e desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas tanto na égua (FAHIMINIYA et al., 2011), quanto na mulher (JARKOVSKA, 2010). A similaridade entre estas espécies, em diversas características da dinâmica folicular, faz da égua um modelo experimental útil para o estudo da foliculogênese da mulher, com a vantagem de apresentar folículos maiores (GINTHER et al., 2004). Além disso, a descoberta de proteínas presentes no FF e a seleção de biomarcadores específicos, com valores de diagnóstico e prognóstico, podem contribuir para a prevenção e tratamento de uma ampla gama de problemas de fertilidade (JARKOVSKA et al., 2010).

A aplicação de técnicas proteômicas na pesquisa médica reprodutiva pode contribuir significativamente para a compreensão dos processos reprodutivos. Desde seu desenvolvimento, a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) tem sido a técnica de escolha para a pesquisa de proteínas em células, tecidos e líquidos, já que promove uma análise de alta resolução (CELIS e GROMOV, 1999). A 2D-PAGE é hoje o um método de grande valia em pesquisa proteômica e, seguido da digestão proteica em gel e identificação pela espectrometria de massa (MS), provou ser uma ferramenta confiável para o rastreio de proteínas (HANRIEDER et al., 2008). O avanço destas técnicas tem permitido a realização de análises proteômicas do fluido folicular de bovinos (MORTARINO et al., 1999), suínos (BIJTTEBIER et al., 2009), caninos (FAHIMINIYA et al., 2010), equinos (FAHIMINIYA et al., 2011), e outras espécies. Entretanto, no equino, o perfil proteico do FF nas diferentes fases do desenvolvimento folicular ainda permanece pouco estudado.

Seguindo esta idéia, este trabalho tem como objetivo comparar o perfil proteico do FF do maior folículo e entre o maior e o segundo maior folículo, em diferentes momentos do desenvolvimento folicular. Este experimento baseia-se na hipótese de que o perfil protéico do FF do maior folículo é diferente nas diversas fases do desenvolvimento folicular e que existe variação entre o perfil proteico do maior e do segundo maior folículo, durante seu desenvolvimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo Reprodutivo

O ciclo reprodutivo das éguas pode ser definido em duas estações distintas: ovulatória e anovulatória, interligadas por períodos denominados transicionais (BAKER E KENNEY, 1980). A estação anovulatória geralmente compreende os meses de inverno e início da primavera (HUGHES; STABENFELDT; EVANS et al., 1972) e, neste período, menos de 25% das éguas chegam à ovulação (SHARP, 1980). Durante a primavera, observa-se uma fase transicional da atividade ovariana, caracterizada pela formação de múltiplos folículos e pela ocorrência de ciclos prolongados, nos quais o grau de receptividade sexual varia até o estro ser evidente (HUGHES et al., 1980). Estros anovulatórios normalmente ocorrem neste período. A estação ovulatória, por sua vez, que compreende o final da primavera e verão, caracteriza-se por receptividade sexual, ciclos em intervalos regulares e estros ovulatórios (OSBORNE, 1966).

O ciclo estral pode ser determinado como o período entre duas ovulações consecutivas, acompanhadas por sinais de estro (HUGHES et al., 1980). É dividido em duas fases: uma de estro, que compreende apenas 20% do ciclo e caracteriza-se pela receptividade sexual, crescimento folicular, maior secreção de estrógeno e concentrações plasmáticas de progesterona abaixo de 1ng/mL, e outra luteal que inicia logo após a ovulação e caracteriza-se pela resistência ao garanhão, formação do corpo lúteo e maior secreção de progesterona (HUGHES; STABENFELDT; EVANS et al., 1972).

A duração diária de horas de luz, denominada de fotoperíodo, tem importante papel na reprodução dos mamíferos. O fotoperíodo longo estimula e o curto inibe a espermatogênese e ocorrência de estro nas espécies cujo acasalamento ocorre na primavera e verão (HANSEN, 1985). Isto explica o acréscimo das taxas ovulatórias observado durante a primavera, atingindo incidências máximas no verão, e a redução do número de ovulações durante os meses de outono e inverno (GINTHER, 1992).

A glândula pineal é responsável pela síntese e secreção da melatonina (N-acetil 5-metoxitriptofano) que, nos animais que acasalam durante o fotoperíodo positivo, exerce efeito depressor ou antigonadal nos ovários, inibindo a secreção do

Hormônio Liberador de Gonadotropinas (GnRH) pelo hipotálamo. As taxas da síntese de melatonina são inversamente proporcionais à duração da luminosidade ambiental diária. Assim, durante o estímulo luminoso, fotorreceptores oculares da égua reconhecem o aumento da duração do dia, que é neurologicamente transmitido para a glândula pineal, inibindo a síntese e secreção da melatonina e promovendo a liberação do GnRH pelo hipotálamo. Este, por sua vez, estimula a liberação dos Hormônios Folículo Estimulante (FSH) e Luteinizante (LH), a ovulação e a formação do corpo lúteo (GINTHER, 1992).

A fase folicular do ciclo estral, que tem início logo após a luteólise, é controlada pelo hipotálamo, lobo anterior da hipófise e ovários, através da produção de estrógeno na ausência de progesterona. Este momento envolve quatro principais eventos: liberação maciça de gonadotropinas pelo lobo anterior da hipófise, crescimento folicular, receptividade sexual e ovulação (ADASHI e ROHAN, 1992). Na ausência do corpo lúteo, observa-se um grande decréscimo nas concentrações séricas de progesterona. A interrupção do feedback negativo exercido por ela no hipotálamo tem como resultado a liberação de GnRH em altas amplitudes e frequências até o final da fase folicular, ovulação e formação de um novo corpo lúteo (GINTHER et al., 1997).

Inicialmente, a elevação dos níveis de GnRH promove a liberação de grandes concentrações de FSH e LH, pelo lobo anterior da hipófise, e o desenvolvimento de folículos que, imediatamente, passam a produzir estrógeno. Esta sequência de eventos caracteriza o período de diestro (GINTHER, 1992). Quando os folículos recrutados começam a desenvolver dominância, nos momentos finais da fase folicular, e passam a secretar estrógeno e inibina, ambos envolvidos no feedback negativo com o lobo anterior da hipófise, ocorre a supressão da liberação de FSH. Juntamente com a elevada secreção de estrógeno verificada neste momento, dá-se início um pico pré-ovulatório de LH, responsável pela ovulação. Os demais folículos, chamados subordinados, acabam por sofrer atresia (GINTHER et al., 1997).

2.2 Dinâmica Folicular

Compreender os mecanismos do desenvolvimento folicular das diferentes espécies é de grande importância para o estudo da reprodução uma vez que é o

folículo quem proporciona um ambiente ótimo para a maturação do oócito, preparando-o para a fertilização, após a ovulação. O conhecimento pleno destes mecanismos fisiológicos é fundamental para que ocorra o aperfeiçoamento ou desenvolvimento de novas técnicas para manipular a função reprodutiva dos animais domésticos (FAHIMINIYA e GERARD, 2010).

Como onda folicular entende-se a emergência de diversos folículos que, inicialmente, crescem e se desenvolvem em sincronia até o momento em que apenas um, ou o número específico de cada espécie, continua crescendo até a ovulação, enquanto os demais tendem a sofrer atresia e regredir (GINTHER et al., 2004). A égua é uma espécie monovular, ou seja, apresenta apenas uma ovulação por cada ciclo reprodutivo que, particularmente, ocorre através de uma estrutura denominada fossa ovulatória (GINTHER et al., 2007).

Em éguas, as ondas foliculares foram divididas em menores, nas quais não ocorre divergência e o maior folículo não se torna dominante, e maiores, quando ocorre divergência e o desenvolvimento de dominância (GINTHER; BERGFELT, 1992). As ondas maiores são ainda subdivididas em primárias, quando dão origem ao folículo que irá ovular durante o período de estro, e secundárias, quando existe dominância, mas a ovulação não ocorre, ou se dá após a onda primária ou estro, caracterizando uma ovulação secundária ou de diestro. Estas últimas ocorrem com maior frequência durante o período transicional de primavera (GINTHER, 1993).

Na espécie equina, a única onda que se desenvolve de forma consistente é a onda primária maior, que emerge durante o intervalo interovulatório (IOI) e dá origem ao folículo que irá ovular. A incidência de ondas maiores anovulatórias, durante um IOI, é de aproximadamente 24% em éguas Quarto de Milha (GINTHER, 1993). Em contrapartida, nenhuma onda maior secundária foi observada durante o estudo do IOI de éguas Minipôneis (GASTAL et al., 2008).

A dinâmica folicular envolve quatro processos distintos: a emergência, a seleção, a dominância e a atresia. Este último caracteriza-se pelo encerramento ou desaparecimento do antro folicular, seguido de degeneração. Em qualquer momento durante o período reprodutivo pós-púbere a proporção de folículos em algum estágio de atresia é bastante alta (SENGER, 2003).

A emergência folicular, também chamada de recrutamento folicular, refere-se ao primeiro dia em que é possível observar o crescimento dos folículos de uma onda, através da ultrassonografia (BERGFELT; GINTHER, 1993). Ela ocorre quando

o folículo atinge 6 mm de diâmetro (GASTAL et al., 1997) e é definida como o momento em que os folículos em crescimento tornam-se suscetíveis à ação das gonadotropinas e iniciam a produção de pequenas concentrações de estrógeno (DRIANCOURT, 2001). Juntamente com a emergência da onda folicular, observa-se um aumento progressivo nas taxas de FSH, que atinge a concentração máxima cerca de três dias antes da divergência, quando o maior folículo mede cerca de 13 mm. A diminuição da produção deste hormônio é uma função dos múltiplos folículos, antes do inicio da divergência, e do folículo dominante, após ela ocorrer (GINTHER et al., 2005).

Após a emergência da onda folicular ovulatória, os folículos apresentam uma fase de crescimento comum (GINTHER et al., 2007) até que as taxas de crescimento entre os dois maiores folículos se tornem discrepantes, caracterizando o início da divergência (GINTHER et al., 1996). Neste momento, o folículo dominante continua o seu crescimento e os folículos subordinados iniciam a regressão. Em éguas, o processo de divergência inicia-se quando o futuro folículo dominante atinge 22,5 mm de diâmetro (GINTHER et al., 2007). O folículo que irá ovular apresenta um desenvolvimento mais avançado no momento da divergência, medindo 21-23 mm, e é o primeiro a atingir um estágio decisivo de desenvolvimento, enquanto o maior subordinado tem seu crescimento inibido antes que ele atinja o mesmo estágio, em média um dia depois. O início da divergência entre as curvas de crescimento desses dois folículos ocorre, em média, no dia 17-18 do ciclo (GASTAL, 1999).

Uma vez recrutados os folículos, inicia-se a produção e secreção de pequenas concentrações de estrógeno e inibina que, a partir do momento da seleção, acabam elevando-se. Desta forma, acentua-se o feedback negativo com o lobo anterior da hipófise e os níveis de FSH começam a decrescer e, quando atingem valores mínimos, o recrutamento chega ao fim. Neste momento (aproximadamente no 16º dia do ciclo), o LH torna-se mais importante para o crescimento dos folículos maiores e os demais folículos, até então recrutados, começam a sofrer o processo de atresia (GINTHER et al., 1998).

Durante uma onda folicular, um dos folículos é “escolhido” para se tornar o folículo ovulatório. A este fenômeno, dá-se o nome de seleção folicular (GINTHER et al., 2007). A seleção é o processo que resulta na redução do número de folículos ovulatórios de uma onda e varia de acordo com o número específico de ovulações apresentado por cada espécie animal (GINTHER et al., 1996). É considerado um

dos mistérios mais duradouros na biologia reprodutiva das espécies monovulares e tem despertado interesse há pelo menos cinquenta anos (GINTHER et al., 2007).

Os fatores locais responsáveis pelo aumento da capacidade de resposta do futuro folículo dominante às gonadotrofinas podem ser fundamentais para o mecanismo de seleção folicular (GINTHER et al., 2002). Aparentemente, a supressão final da onda de FSH, juntamente com o acréscimo dos níveis de LH, tem importante papel na divergência das taxas de crescimento entre o futuro folículo dominante e os demais (GINTHER et al., 1998). Sugere-se que um determinado nível de LH seja capaz de alterar a sensibilidade do maior folículo frente às gonadotropinas, próximo à divergência, e seja necessário para o crescimento folicular após este momento (GINTHER et al., 1996).

A dominância é o processo pelo qual um ou mais folículos maiores exercem efeito inibitório sobre os demais e, em éguas, ocorre quando o futuro folículo dominante atinge cerca de 28 mm (JACOB et al., 2009). A partir disto, o dominante é o único que continua a se desenvolver (GINTHER, 1993). Seu número é específico em cada espécie e está diretamente relacionado com o tamanho da progênie (GINTHER, 1992). O futuro folículo dominante é o primeiro a se tornar apto a elevar a concentração intrafolicular e sistêmica de estradiol, reduzir os níveis sistêmicos de FSH, impedindo que novos folículos sejam recrutados, responder ao aumento dos níveis de LH e, assim, estabelecer dominância (GASTAL, 1999). Este aumento da razão LH:FSH acentua o crescimento do folículo dominante, que apresenta receptores para o LH nas células da teca e da granulosa, e induz a atresia dos pequenos, que são desprovidos desse recurso (SENGER, 2003).

A produção de grandes concentrações de estrógeno e inibina pelo folículo dominante, é responsável pela redução do aporte sanguíneo aos demais folículos que, juntamente com as baixas taxas de FSH circulante, acabam sofrendo atresia. Somente aqueles que mantiverem um adequado suprimento circulatório e, por consequência, estiverem sujeitos a altos níveis de gonadotropinas, continuarão a crescer até a ovulação (ACOSTA et al., 2004). O aumento do aporte sanguíneo ao folículo dominante, em relação ao seu maior subordinado, inicia cerca de dois dias antes da divergência entre suas taxas de crescimento (ACOSTA et al., 2004) e continua até a ovulação (GINTHER, 2007). Fatores angiogênicos, de crescimento endotelial, foram encontrados em grande quantidade no fluído do folículo dominante,

demonstrando sua capacidade de controlar o próprio aporte sanguíneo (ACOSTA et al., 2004).

Após definir a dominância, o folículo continua a crescer, ainda que os níveis de FSH encontrem-se reduzidos e passa a secretar níveis elevados de estradiol (GINTHER et al., 1998). As concentrações intrafoliculares e sistêmicas de estradiol continuam a aumentar paralelamente ao aumento do tamanho do folículo dominante e alcançam a concentração máxima 1 a 2 dias antes da ovulação, quando o folículo atinge seu maior diâmetro. Assim, estabelece-se um feedback positivo hipotalâmico-pituitário resultando no aumento das concentrações de LH, necessário para a ovulação (BERGFELT, 2009).

A ovulação é um complexo processo que resulta na reorganização do tecido folicular e ovariano. A estrutura original do ovário equino, o grande tamanho do folículo pré-ovulatório, a migração para a fossa de ovulação e a subsequente ovulação requerem um profundo remodelamento tecidual. Sobre a migração, sugere-se que o grande tamanho do folículo ovulatório resulta em pressão que o obriga a deslocar-se ao longo da linha de menor resistência até a fossa, ou ainda, que mudanças na matriz extracelular ocasionem uma linha de menor resistência onde a migração possa ocorrer (RILEY et al., 2001).

O folículo ovulatório, de uma onda primária maior, emerge 6 ou 7 dias após a última ovulação e ovula, em média, 15 dias depois, com aproximadamente 45 mm de diâmetro (GINTHER, 1993). À medida que a ovulação se aproxima, a onda de LH pré-ovulatória causa profundas alterações nas funções do folículo dominante, reduzindo de forma abrupta a produção de estradiol (GINTHER e BERGFELT, 1993). A partir disso, as células ovarianas da teca interna passam a produzir progesterona. A elevação das concentrações deste hormônio estimula a síntese local da colagenase (MMP1), enzima que degrada o colágeno, maior componente do tecido conjuntivo entre o folículo e o ovário. Neste mesmo momento, ocorre a síntese e secreção local de PGF2α e PGE2. A primeira é responsável por contrair a musculatura lisa ovariana, ocasionando uma superficialização ainda maior do folículo. A segunda tem a função de reorganizar o tecido folicular em corpo lúteo após a ovulação, ativando uma enzima denominada plasminogênio, responsável pela formação de um coágulo após a ruptura do folículo e pela reorganização celular (SENGER, 2003).

O fluxo sanguíneo no ovário é controlado pelos níveis teciduais de histamina e PGE2. Um grande aporte sanguíneo já está previamente estabelecido em decorrência da presença do folículo dominante. O aumento da permeabilidade vascular, causado pela histamina, torna a teca interna bastante edematosa e, desta forma, o aumento da pressão hidrostática ao redor do folículo fará com que ele se torne mais frágil e suscetível à ruptura (SENGER, 2003). Além disso, a onda pré-ovulatória de LH causa uma reação inflamatória aguda na parede apical do folículo e epitélio superficial ovariano, mediado por citocinas produzidas localmente e prostaglandinas, capaz de induzir a ovulação (YOUNG et al., 2002).

O corpo lúteo (CL) é uma estrutura que produz progesterona. Sua presença implica na supressão do comportamento de estro, mantendo a égua não receptiva ao garanhão. A progesterona prepara o trato reprodutivo para receber o embrião, mas, quando a prenhez não ocorre, o CL tende a regredir e um novo estro deverá ocorrer (GINTHER, 1995).

2.3 Ultrassonografia e Dinâmica Folicular

O fenômeno da dinâmica folicular foi descoberto e descrito através da ultrassonografia, observando-se as mudanças de tamanho e número dos folículos. Esta técnica está entre as mais importantes utilizadas nas pesquisas reprodutivas e tem grande importância como meio de diagnóstico. É minimamente invasiva, não requer a utilização de técnicas cirúrgicas e pode ser utilizada para o diagnóstico de gestação, idade e crescimento embrionário e fetal, para detectar mudanças das estruturas ovarianas, anormalidades fetais e gestações gemelares (GINTHER, 1995).

A dinâmica folicular pode ser precisamente analisada através da ultrassonografia transretal. Esta técnica permite a visualização frequente e de forma não invasiva da dinâmica da população de folículos, do processo ovulatório e do desenvolvimento, manutenção e regressão do corpo lúteo (GINTHER e BERGFELT, 1992). Além disso, torna viável a pesquisa sobre os folículos menores, com diâmetro entre 2 e 10 mm (GINTHER e BERGFELT, 1993).

Em estudos realizados em éguas, através da ultrassonografia, foi observado um crescimento folicular médio de 3 mm por dia, sete dias antes da ovulação, e um diâmetro folicular médio de 45 mm, um dia antes de ela ocorrer. Em 82% dos casos,

o folículo pré-ovulatório tornou-se o maior cerca de seis dias antes da ovulação e, 85%, sofreram alterações de suas formas esféricas para cônicas devido ao aumento da flutuação e ação da PGF2α (REDMER; REYNOLDS, 1996). As alterações no formato dos folículos ocorrem de forma marcante durante as três horas que antecedem a ovulação. Os folículos adjacentes, por sua vez, mudam o formato no sentido oposto (não-esférico para esférico) quando a ovulação se aproxima (GINTHER, 1992).

Atraves do uso do doppler, verificou-se que o desvio entre o fluxo sanguíneo das paredes do maior e do segundo maior folículo ocorreu 1 ou 2 dias antes do desvio no diâmetro entre eles, durante a seleção folicular em éguas. Entretanto, embora seja provável que a dominância de um folículo significativamente maior que os demais (dominância morfológica) seja precedida de alterações que ocorrem enquanto ele ainda tem o mesmo tamanho dos outros (dominância bioquímica), a ausência de diferença no tamanho torna difícil estudar o folículo dominante antes da dominância morfológica (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004).

Mudanças na vascularização dos folículos pré-ovulatórios têm sido estudadas em várias espécies. A alteração morfológica mais marcante ocorre com o sistema microcirculatório da teca interna que, durante a onda pré-ovulatória de gonadotropinas, é seguida de hiperemia, edema e extravasamento de eritrócitos para o seu interior. Em decorrência das elevadas concentrações de estrógeno, próximo ao momento da ovulação, o folículo pré-ovulatório torna-se mais vascularizado (CAVENDER E MURDOCH, 1998). Ecograficamente, observa-se uma camada anecóica na granulosa folicular atribuída à hipervascularização e edema da teca interna (RITCHIE, 1986). Estas alterações podem ser utilizadas para determinar o momento prévio à ovulação em mulheres (JAFFE; ABRAMOWICZ; BEN-ADERET, 1987) e éguas (GASTAL et al., 1999). Em éguas, nota-se também, o aumento da espessura e ecogenicidade da parede do folículo (PIERSON e GINTHER, 1985).

Em éguas, a divergência é morfologicamente identificada, através do uso do ultrassom, pelo aumento da espessura da camada anecóica que circunda a teca interna do folículo dominante (ACOSTA et al., 2004). Esta alteração da ecotextura folicular permite a distinção entre o futuro dominante e seu maior subordinado cerca de um dia antes de iniciar o processo de divergência, e é atribuída ao aumento da vascularização (GASTAL et al., 1999).

O CL, no ovário das éguas, pode ser facilmente visualizado até o dia 17, para um ciclo de 22 dias. O diâmetro do maior folículo no dia em que o CL é identificado pela última vez pode auxiliar a distinção entre as éguas cíclicas e as que se encontram durante a estação anovulatória. Se o maior folículo medir 20 mm ou menos e o CL não estiver presente, considera-se a égua não cíclica. Em contrapartida, se o folículo dominante apresentar diâmetro maior do que 20 mm, no momento em que o CL não pode mais ser identificado, caracteriza-se a estação ovulatória (GINTHER, 1995).

2.4 Foliculogênese

O folículo é a unidade funcional do ovário e, cada um, contém um oócito circundado por uma ou mais lâminas de células somáticas. Para o potencial esteroidogênico e ovulatório ser plenamente realizado, o folículo deve progredir através de uma extensa e altamente coordenada série de eventos que compreendem o seu desenvolvimento (KNIGHT; GLISTER, 2006).

Antes da senescência reprodutiva, os ovários dos mamíferos contêm um reservatório de folículos primordiais e, cada um deles, é constituído por um oócito, na prófase I da meiose, e uma única camada achatada de células da granulosa. Este reservatório inicia o seu desenvolvimento durante a vida fetal em várias espécies. Uma vez que o grupo de folículos primordiais tenha sido estabelecido, os folículos, gradual e continuamente, deixam o reservatório para iniciar o crescimento quando, então, encontram um dos dois destinos: a ovulação ou a atresia (FORTUNE, 1994).

A foliculogênese ovariana é um processo dinâmico caracterizado por uma marcante proliferação e diferenciação de componentes e células no qual o folículo adquire, progressivamente, algumas propriedades essenciais para seu futuro desenvolvimento (CAMPBELL; SCARAMUZZI; WEBB; 1995). O crescimento do folículo é extremamente importante, uma vez que, só os folículos grandes tornam-se aptos a ovular. Este processo envolve tanto a replicação das células foliculares quanto a formação e expansão de um antro folicular (CLARKE et al., 2006).

No início da foliculogênese, as células da granulosa se multiplicam e se organizam em várias camadas à volta do oócito formando uma cavidade, denominada antro que, em seguida, passa a acumular líquido e expandir. Na maioria

das espécies, o antro é formado quando o folículo atinge o tamanho de 0,2 mm, mas seu tamanho máximo e a quantidade de FF variam entre as espécies (FAHIMINIYA e GERARD, 2010). O FF o é principal componente (95 % em bovinos) nas espécies que apresentam grandes folículos ovulatórios, (RODGERS et al., 2001).

Entretanto, a maneira pela qual o fluido acumula-se no antro ainda não é conhecida claramente (FAHIMINIYA e GERARD, 2010). O FF contém moléculas osmoticamente ativas, produzidas pelas células da granulosa, suficientemente grandes para não sairem livremente desse ambiente, que podem gerar um diferencial osmótico e então recrutar fluidos, eletrólitos e moléculas sanguíneas do estroma vascularizado que circunda o antro. Proteoglicanos, glicosaminoglicanos, ácido hialurônico e sulfato de condroitina são fortes candidatos para a criação deste gradiente osmótico necessário para a formação e o crescimento do antro (CLARKE et al., 2006).

O desenvolvimento folicular ocorre com bastante facilidade, em condições endócrinas basais, até que os folículos estejam quase totalmente desenvolvidos. Isto sugere que, antes da fase de recrutamento, o crescimento folicular pode ser regulado por fatores internos do ovário e não somente através de interações hipotálamo-pituitárias. No entanto, os folículos não parecem ter a capacidade de se desenvolver definitivamente a menos que sejam expostos a sinais específicos no momento em que, normalmente, se tornariam atrésicos (HIRSHFIELD, 1991).

A incidência de folículos em atresia não é distribuída uniformemente ao longo do desenvolvimento folicular e, ocorre com mais freqüência, durante um curto período, pouco antes do crescimento final do folículo, antes de atingir o tamanho ovulatório. Em outras palavras, os folículos parecem "esbarrar em uma barreira" que apenas alguns conseguem ultrapassar. O tamanho em que eles se deparam com essa parede tem relação direta com o tamanho ovulatório de cada espécie (HIRSHFIELD, 1991).

O papel de algumas proteínas envolvidas no processo da foliculogênese já tem sido descrito por alguns autores e pode variar desde a regulação da liberação de gonadotropinas (DE AGOSTINI, 2006), sinalização do oócito e função das células do *cumulus* em folículos pré-ovulatórios (WATSON et al., 2012), atividades biológicas relevantes para o desenvolvimento embrionário como adesão celular, ligação a fatores de crescimento e regulação da apoptose (FARACH-CARSON; CARSON, 2007) e, ainda, a fertilização do oócito (BAYASULA et al., 2013).

Apesar da grande importância do processo de formação do FF, expansão do antro e crescimento folicular, há uma grande escassez de literatura sobre estes temas (RODGERS et al., 2001).

2.5 Fluido Folicular

O FF é um fluido extracelular complexo, semi-viscoso, de cor amarela, que se acumula no antro dos folículos ovarianos durante a sua fase de crescimento. É o único ambiente ao qual são expostas as células do compartimento avascular do folículo (células da granulosa e oócito), onde o complexo *cumulus*-oócito amadurece e as células da granulosa se diferenciam (FAHIMINIYA e GÉRARD, 2010). É o meio essencial para o crescimento e a maturação das células ovarianas somáticas e germinativas e contém substâncias envolvidas na diferenciação celular, qualidade do gameta, ruptura da parede folicular (FAHIMINIYA et al., 2011) e luteinização (RICHARDS; GADSBY; ALMOND, 1994).

A composição do FF resulta da combinação de secreções das células da teca, da granulosa, em menor contribuição do oócito, bem como a partir da transferência de constituintes do plasma sanguíneo que atravessam a barreira hemato-folicular pelos capilares da teca e pelo compartimento vascular na parede do folículo (FORTUNE, 1994). Em decorrência disto, existem similaridades notáveis entre a composição proteica do FF e do plasma sanguíneo (JARKOVSKA et al., 2010).

O FF contém fatores produzidos localmente pelas células foliculares (FAHIMINIYA e GÉRARD, 2010) que produzem e secretam esteróides, fatores de crescimento e outros fatores peptidérgicos no interior do folículo (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). A produção destas substâncias varia durante os diferentes estágios reprodutivos (FAHIMINIYA e GÉRARD, 2010) e está diretamente relacionada à atividade metabólica das células ovarianas, refletindo o status fisiológico do folículo (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). Além disso, pode ser uma fonte rica em proteínas úteis como biomarcadores de prognóstico e diagnóstico de patologias que atingem a fertilidade (JARKOVSKA et al., 2010).

A composição do fluido de folículos dominantes é um fiel indicador da atividade secretora e do metabolismo das células foliculares e, portanto, pode estar relacionada com a maturação e qualidade folicular (KIM et al., 2006). Em 1993,

Spitzer et al., utilizando 2D-PAGE, compararam pela primeira vez o perfil proteico do FF humano em folículos maduros e imaturos. Com o avanço das técnicas de abordagem proteômica, cada vez mais elas têm sido utilizadas na pesquisa reprodutiva para este fim.

Além disso, o FF é encontrado, após a ovulação, no local de fertilização (FAHIMINIYA e GÉRARD, 2010). *In vitro*, ele é capaz de aumentar a motilidade espermática, especialmente quando é oriundo de folículos maduros, e de estimular a capacitação e reação acrossomal. Favorece ainda a chegada dos espermatozoides ao local da fecundação através da presença de agentes quimiotáticos (EISENBACH, 1999).

O aumento da utilização das técnicas de reprodução assistida, como a produção de embriões *in vitro*, se dá através da utilização de meios de cultura que melhor reproduzam as condições fisiológicas. A seleção de oócitos de qualidade necessita da identificação de marcadores moleculares presentes no FF. Entretanto, a complexidade de sua composição, bem como as características fisiológicas individuais, torna esta tarefa bastante difícil (FAHIMINIYA e GÉRARD, 2010).

A quantidade de oxigênio dissolvido no FF, por exemplo, está fortemente relacionada à qualidade do oócito e sua capacidade de produzir um embrião, o que justifica o aumento da vascularização do folículo dominante até a ovulação (FAHIMINIYA e GÉRARD, 2010). A glicose, por sua vez, representa a maioria dos carboidratos do FF e é a principal fonte de energia para o metabolismo ovariano pela via anaeróbica. Sua concentração aumenta com o crescimento do folículo (ORSI et al., 2005). A composição lipídica do FF (triglicerídeos, fosfolipídios, colesterol) é menor em relação ao plasma e decresce durante o crescimento folicular, mas aumenta na fase pré-ovulatória (SUCHANEK et al., 1988). A lipoproteína de alta densidade (HDL) está presente em grande quantidade no FF e sua concentração tem relação com o status fisiológico do folículo (REVELLI et al., 2009).

O FF também contém inúmeros aminoácidos que podem ser utilizados pelas células foliculares e oócitos como fonte de energia e em diversas rotas metabólicas. Suas concentrações costumam ser superiores ou semelhantes as do plasma (GÉRARD et al., 1998). Vários destes aminoácidos são agentes redutores e protegem as células da ação de radicais livres e, frequentemente, são adicionados aos meios de cultura de oócitos para acelerar o processo de maturação (KOBAYASHI; LEE; FUKUI, 2006).

In vivo, o FF encontra-se isolado da circulação através da barreira hemato-folicular, composta pela parede dos capilares sanguíneos, pela espessura das camadas das células da granulosa e teca e pela membrana basal que as separa. Esta barreira é permeável e permite a passagem rápida de aminoácidos e algumas proteínas da circulação sanguínea para o antro (FAHIMINIYA e GERARD, 2010). As proteínas plasmáticas com peso molecular de até 500 kDa são capazes de difundir-se livremente para o interior do folículo (PAYER, 1975). Entretanto, a passagem de componentes que apresentam peso molecular acima de 100 kDa torna-se progressivamente mais restrita (CLARKE et al., 2006).

Nos folículos antrais de mamíferos, o oócito é envolto por compactas camadas de células do *cumulus*, formando o complexo *cumulus*-oócito (COC) que, quando é destinado à ovulação, se expande em resposta ao aumento das gonadotropinas. Neste momento, as células do *cumulus* começam a proliferar e tornam-se uma extensa matriz extracelular viscoelástica. A matriz do *cumulus* expandido tem demonstrado facilitar a extrusão de oócitos dos folículos, durante a ovulação, e proporcionar um microambiente essencial durante a fertilização de oócitos *in vivo* (TANGHE et al., 2002). Observa-se uma correlação positiva entre a área de expansão do *cumulus* e a taxa de maturação de oócitos, bem como entre o grau de expansão do *cumulus in vitro* e a capacidade de desenvolvimento do oócito em várias espécies animais (SCHOEVER; COLENBRANDER; ROELEN; 2007).

Durante a produção de embriões suínos *in vitro*, a adição de fluido folicular porcino ao meio de cultura de maturação favorece a expansão do *cumulus*, contribuindo para o sucesso da maturação de oócitos. Isto não surpreende, uma vez que, a expansão do COC ocorre no interior do antro folicular, que é preenchido com FF (BIJTTEBIER et al., 2009). A expansão do *cumulus in vitro* pode também ser alcançada através da substituição do FF pelo plasma sanguíneo, porém em menor escala. O ácido hialurônico, produzido pelas células do *cumulus*, é o principal componente da matriz e, o equilíbrio entre várias proteínas de ligação, é indispensável para que a expansão ocorra (BIJTTEBIER et al., 2008).

O oócito amadurece em meio ao FF rico em hormônios, fatores de crescimento, citocinas, fatores anti-apoptóticos, polissacarídeos, proteínas diversas, entre outros fatores. Entretanto, até agora, o estudo de moléculas individuais não revelou marcadores confiáveis de maturação do oócito e fertilização bem sucedida (JARKOVSKA et al., 2010). Provavelmente, a qualidade dos oócitos não está

relacionada com uma única molécula, mas sim com o equilíbrio entre inúmeros componentes (FAHIMINIYA; GÉRARD, 2010).

Sendo assim, a implementação de técnicas como a proteômica pode ser extremamente benéfica para monitorar as complexas redes reguladoras, envolvidas na fisiologia do ovário e na resposta à estimulação exógena, e para fornecer grupos relevantes de biomarcadores específicos em medicina reprodutiva (JARKOVSKA et al., 2010). A determinação do perfil protéico do FF da égua irá contribuir significativamente ao melhor entendimento da fisiologia ovariana e possibilitar o controle do crescimento e do desenvolvimento folicular (FAHIMINIYA et al., 2011).

2.6 Proteínas do Fluido Folicular

A descoberta de que a ação hormonal é mediada por receptores específicos, presentes nas células foliculares, cujo tipo e número variam com o desenvolvimento folicular, pode explicar como folículos em diferentes estágios podem responder, de forma diferente, ao mesmo estímulo gonadotrófico. Mais recentemente, o foco das pesquisas voltou-se para o microambiente dos folículos e as mudanças necessárias para proporcionar a regulação folicular (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004).

O início do crescimento folicular é uma das fases do desenvolvimento que parece depender de alterações no microambiente do folículo. O ovário apresenta um reservatório de folículos primordiais que se esgota, gradual e regularmente, quando os folículos iniciam o crescimento. Os mecanismos envolvidos nesse processo são pouco conhecidos. A maneira com que um folículo individual "sabe" que deve iniciar o crescimento é um exemplo disto. Sugere-se que essa ativação pode ser controlada pelo equilíbrio entre os fatores inibidores e estimuladores e depende de mudanças no equilíbrio interno do microambiente de cada folículo (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). A relação entre o oócito e as células da granulosa do *cumulus* é outro exemplo da importância desse microambiente. Os sinais provenientes do oócito causam a diferenciação deste subconjunto de células por uma via de desenvolvimento diferente das células da granulosa murais (EPPIG, 2001).

O FF acumula-se no antro folicular desde a fase inicial do seu desenvolvimento. Durante a foliculogênese, os folículos tornam-se mais permeáveis às proteínas do plasma, resultando em um número maior de proteínas do sangue

atravessando a barreira hemato-folícular. Assim, são bastante notáveis as semelhanças entre a composição proteica do FF e do sangue, apesar dos processos seletivos de transporte (MOOS et al., 2009).

A maioria (83%) das proteínas presentes no FF apresenta localização extracelular. Provavelmente, estas proteínas sejam provenientes do sistema circulatório ou secretadas pelas células foliculares. Entretanto, as demais, encontram-se na região intracelular (citoplasma, citoesqueleto, núcleo ou membrana) sugerindo que, durante o desenvolvimento folicular, algumas das células do folículo são danificadas e acabam por lançar seus componentes celulares no interior do FF (FAHIMINIYA et al., 2011). Outras evidências sugerem ainda que a formação da cavidade folicular pode ser resultante da morte de células da granulosa, através da força osmótica exercida pelo DNA e, seu acúmulo, também pode causar alguns danos celulares (RODGERS e IRVING-RODGERS, 2010).

Em estudo sobre as proteínas presentes no FF de éguas, Fahiminiya et al. (2011) classificam as proteínas em 18 grupos, segundo suas funções moleculares. Os dois grupos mais abundantes, que compreendem 25% das proteínas, são compostos por aquelas envolvidas na imunidade e defesa (14%), e as relacionadas com processos de transporte (11%). Além disso, um número substancial de proteínas inibidoras de proteases séricas (por exemplo, alfa-1-antiprotease) também foi identificado. Em contraste, as proteínas envolvidas no metabolismo lipídico-esteroidal, ou com o sistema reprodutivo, representam apenas 6% e 2%, respectivamente.

A maioria das proteínas encontradas no FF são proteínas plasmáticas e, a maior parte delas, são proteínas da fase aguda da inflamação (APPs). Elas são secretadas pelo fígado em resposta fisiológica à inflamação como, por exemplo, amilóide A-4, fatores do sistema complemento, fatores de coagulação (fibrinogênio, plasminogênio, protrombina), Alfa-1-antiprotease, Alfa-1-antiquimotripsina, Alfa-2 antiplasmina, Alfa-2 macroglobulina, ceruloplasmina, haptoglobina, heparina cofator 2 e hemopexina (HANRIEDER et al., 2008).

Os níveis elevados de APPs, identificados no FF de mulheres, suportam a hipótese de que o sistema imunológico está crucialmente envolvido na foliculogênese e que a ovulação pode ser considerada como uma reação inflamatória (HANRIEDER et al., 2008). As doze proteínas de maior abundância no FF humano são: albumina, IgG, transferina, fibrinogênio, IgA, R2-macroglobulina,

IgM, R1-antitripsina, haptoglobina, glicoproteína R1-ácida e apolipoproteína A-I e A-II (JARKOVSKA et al., 2010). Além disso, a apolipoproteína A-IV (LEE et al., 2005) e a haptoglobina (SCHWEIGERT et al., 2006), também foram identificadas no FF de mulheres. Verificou-se a presença de picos de peptídeos relacionados com diferentes fases de desenvolvimento folicular, entre os quais, estava a apolipoproteína A-I (LIU et al., 2007).

É evidente que apenas informações limitadas têm sido descobertas sobre o FF e que nem todos os seus componentes foram identificados até então. Além disso, e ainda mais importante, é bastante claro que suas funções fisiológicas na reprodução, bem como suas relações com algumas causas de infertilidade, permanecem absolutamente desconhecidas (JARKOVSKA et al., 2010).

2.6.1 Albumina

A albumina é um polipeptídeo, sintetizado no fígado, composto de 585 aminoácidos e com peso molecular aproximado de 66 kDa (SHAMAY et al., 2005; TOUSSAINT et al., 2005). É a proteína extracelular mais abundante do sangue (SHAMAY et al., 2005) e apresenta importante papel na ligação e transporte de várias moléculas biologicamente ativas (PETERS, 1985). Sua expressão extra-hepática foi descrita em outros tecidos como nas células epiteliais ovarianas humanas (VARRICCHIO; STROMBERG, 1994).

Em búfalas, sua concentração no plasma sanguíneo é significativamente menor do que no FF. Isto sugere uma importante atividade no transporte de componentes do plasma para o interior dos folículos, necessários para a ligação de alguns compostos químicos, como minerais, envolvidos em várias funções fisiológicas, tais como crescimento e maturação folicular (ARSHAD et al., 2005) e na transferência de alguns produtos específicos, como esteróides, para a circulação geral (DUCOLOMB et al., 2013).

A albumina sérica, quando associada à queratina, ou mesmo separadamente, pode favorecer a quebra da vesícula germinativa, contribuindo com melhores resultados na técnica de fertilização *in vitro* (DUCOLOMB et al., 2013). Além disso, a albumina no FF parece ainda desempenhar um papel importante na proteção dos oócitos ao dano oxidativo, também contribuindo com o melhor desempenho dessa mesma técnica (OTSUKI et al., 2012).

2.6.2 Alfa-1-antiprotease 2 (A1AT2)

A A1AT2 é uma proteína composta por 394 aminoácidos com um ácido glutâmico no terminal amino, um c-terminal de lisina e um único resíduo de cisteína. Esta estrutura incomum deve-se ao fato de que, em sua forma natural, a A1AT2 pode apresentar-se em um estado reduzido, com seu grupo tiol livre, servindo como um protetor contra oxidantes que podem inativar sua função inibitória (TRAVIS; SALVESEN, 1983).

No FF de mulheres, a A1AT2 apresenta um importante papel na regulação da maioria das proteases. Considera-se que esta proteína seja capaz de realizar um acurado balanço na atividade proteases/antiproteases no FF, controlando a degradação da ECM, inflamação, cicatrização e coagulação durante a maturação folicular, a ovulação e a formação do CL (BIANCHI et al., 2013). A A1AT2 apresenta menores níveis no FF de folículos com oócitos maduros e, por esse motivo, pode ser considerada um marcador negativo da qualidade oocitária (REVELLI et al., 2009).

A ocorrência de polímeros de A1AT2 em folículos maduros, associados a lesões de espécies reativas de oxigênio (ROS), está intimamente relacionada aos processos inflamatórios que ocorrem durante ovulação, já que, a polimerização da A1AT2 e sua consequente inativação como inibidor de protease, resultam na perda fisiológica do balanço proteólise/inibição da proteólise resultando na ruptura do folículo e liberação do oócito. Assim, a A1AT2 pode exercer um papel central na maturação folicular e na regulação do momento do lançamento do oócito maduro (BIANCHI et al., 2013).

A interação direta entre proteínas inibidoras da tripsina, como a A1AT2, e o ácido hialurônico (HA) desempenha um importante papel na organização e estabilização da expansão da matriz extracelular do *cumulus* (cECM) após um estímulo ovulatório (CHEN et al., 1996). Apesar disto, o preciso envolvimento da A1AT na maturação folicular e oocitária e na ovulação tem sido pouco investigado e, assim, análises futuras serão necessárias para esclarecer a contribuição desta proteína para a fertilidade (BIANCHI et al., 2013).

2.6.3 Apolipoproteína A-1 (APOA-1)

A Apolipoproteina é a principal lipoproteína integrante do colesterol de alta densidade, o HDL (BRESNIHAN et al., 2004), apresenta peso molecular de aproximadamente 30 KDa (UniProtKB/Swiss-Prot), e é descrita como uma APP negativa (BRESNIHAN et al., 2004). A APOA-1, juntamente com enzimas antioxidantes, possui importante papel na determinação das propriedades anti-inflamatórias do HDL, que evita a oxidação do colesterol de baixa densidade (LDL), cujos produtos são altamente pró-inflamatórios (NAVAB et al., 2001).

A APOA-1 é considerada como um inibidor específico da ativação de monócitos e da interleucina-1β (IL1β), uma potente citocina pró-inflamatória, mediada por contato (HYKA et al., 2001). Geralmente, durante a inflamação não tratada, os níveis séricos da APOA-1 e HDL diminuem rapidamente a valores mínimos, mais baixos do que os apresentados por indivíduos normais (PARK et al., 1999) e, desta forma, correlacionam-se inversamente com a atividade inflamatória (BRESNIHAN et al., 2004). Em contrapartida, no local da inflamação, os níveis de APOA-1 geralmente tendem a aumentar (ANANTH; PRETE; KASHYAP, 1993). Adicionalmente, as lipoproteínas podem inibir a ligação do complemento em membranas-alvo (TOUSSAINT et al., 2005).

Em estudo sobre o papel do FF e de subfrações de HDL na capacitação de espermatozoides humanos, Hamdi et al. (2010) demonstraram que as partículas de HDL estão envolvidas na hiperativação dos espermatozoides e efluxo de colesterol e as sugerem como sendo os primeiros receptores de colesterol celular. A capacitação espermática desempenha um papel fundamental na fertilização. As alterações lipídicas aumentam a fluidez da membrana e induzem a exteriorização de sítios de ligação para zona pelúcida, permitindo a reação acrossomal e fertilização (GAMZU et al., 1997). O FF humano é considerado um eficiente agente de capacitação (KULIN et al., 1994), induzindo a primeira etapa do transporte reverso de colesterol, também chamado de efluxo de colesterol celular, a partir dos espermatozoides, no qual as partículas de HDL desempenham um papel-chave (HAMDI et al., 2010).

O principal fator de ativação espermática é mediado por uma fração específica de macromoléculas, com massa molecular de aproximadamente 250 kDa, denominada de SPAP (“proteína ativadora de esperma”), descrita como um complexo composto pela apolipoproteína A1, imunoglobulinas e albumina, que desempenha importante papel na fecundação natural e no tratamento da infertilidade (AKERLOF et al., 1991).

Todas as proteínas que compõem o SPAP, quando analisadas separadamente, demonstram efeitos menores sobre a motilidade espermática. Entretanto, o mecanismo pelo qual o SPAP induz a ativação espermática permanece desconhecido. As pequenas quantidades desse complexo, necessárias para a ativação, sugerem um mecanismo mediado por um receptor ou enzima de ligação. O SPAP age sobre o conteúdo de ATP espermático, porém, não está claro que o aumento da motilidade ocorra através desta via (AKERLOF et al., 1991).

Ao estudar o efeito do tratamento com APOA1 em pacientes com aterosclerose, Wang et al. (2013) concluíram que esta proteína exerce um efeito inibidor, *in vivo* e *in vitro*, sobre a MMP2 e outras citocinas inflamatórias, diminuindo sua expressão e liberação. As MMPs são responsáveis pela degradação da ECM e consequente ruptura da placa aterosclerótica, processo que agrava a doença e resulta em trombose. Assim, as propriedades antioxidantes da APOA1, demonstram ter importante papel de proteção contra esta doença.

O receptor de progesterona (RPG), nas células da granulosa dos folículos pré ovulatórios, é ativado pelo hormônio luteinizante (LH) e, sua isoforma RPG-A, tem papel fundamental para a ovulação. Sabe-se que a expressão gênica de APOA-1 é primariamente regulada pelo RPG-A. Uma vez que a APOA-1 tem papel conhecido na regulação da angiogênese, sugere-se que a relação APOA1/RPG pode estar envolvida no processo de neovascularização dos folículos, necessário para dar início à ovulção (SRIRAMAN; SINHA; RICHARDS, 2010).

As apolipoproteínas, presentes em muitos complexos proteicos e lipoproteicos, têm demonstrado ter uma relação direta com a reprodução (VON WALD et al., 2010). Sua ação no FF parece ir além da relação com o tráfico de colesterol e triglicerídios, mas compreende também estímulo mitogênico e angiogênico, com consequente relação no desenvolvimento folicular (VON OTTE et al., 2006), transporte de precursores de esteroides e, ainda, importante papel na proteção e consequente maturação do oócito (VON WALD et al., 2010).

O mecanismo de maturação do oócito mediado pela APOA ainda não está bem compreendido. Sua complexa distribuição pode sugerir uma função folicular específica. Sabe-se que o conteúdo de apolipoproteínas no FF está diretamente relacionado com a concentração de gonadotrofinas. A APOA1 apresenta efeitos antioxidantes que protegem o oócito de injúrias tóxicas, através da ação anti-inflamatória local, semelhantes aos sistêmicos, inibindo a formação de lipídios

oxidados pró-inflamatórios, favorecendo o desenvolvimento fisiológico dos oócitos e melhorando o potencial de fertilização. Desta forma, o conteúdo de apolipoproteína no FF pode ser considerado um marcador para a produção de oócitos maduros (VON WALD et al., 2010).

2.6.4 Gelsolina

A gelsolina é uma proteína de aproximadamente 80 KDa, cuja principal fonte são os músculos esqueléticos e, em menor quantidade, músculos lisos e fígado. É a única proteína de vertebrados que está presente tanto no citoplasma quanto na forma secretada (KWIATKOWSKI et al., 1988). É membro da superfamília das proteínas de ligação da actina, que exibem uma ampla gama de funções regulatórias desta proteína (YIN et al., 1981) e, por isso, é considerada como um regulador multifuncional da dinâmica da actina (NAG et al., 2013). Foi identificada pela primeira vez como um agente capaz de transformar extratos de macrófagos, a partir de géis viscosos, em fluidos solúveis, posteriormente creditado a sua capacidade cálcio-sensível de romper a actina (YIN et al., 1981).

Existem oito proteínas da superfamília Gelsolina conhecidas em mamíferos, entre elas, a própria gelsolina (NAG et al., 2013). Esta proteína está presente no citoplasma e mantem-se em estado inativo até ser necessária para a regulação da actina (DOS REMÉDIOS et al., 2003). A ligação de íons cálcio ativa a gelsolina abrindo as travas que estabilizam sua estrutura inativa (NAG et al., 2013). O cálcio é o regulador mais bem estudado da atividade da gelsolina e provoca grandes rearranjos conformacionais durante sua ativação (WANG et al., 2009).

A gelsolina plasmática é um importante componente do sistema de eliminação da actina, e tem a capacidade de remover os filamentos de actina extracelular, que podem causar obstruções de pequenos vasos, coágulos, inflamação, ativação de proteases e levar à lesão endotelial (LEE; GALBRAITH, 1992). A gelsolina é clivada e degradada pela maioria das MMPs. Este processo resulta em uma perda considerável da sua atividade de despolimerização dos filamentos. Isto sugere que as MMPs têm a capacidade de enfraquecer o sistema de eliminação de actina extracelular e, portanto, estão envolvidos em condições patológicas induzidas pelo acúmulo desta proteína (PARK et al., 2006). Além disso,

alterações na dinâmica da actina podem tanto aumentar, quanto diminuir os níveis de ROS (GOURLAY; AYSCOUGH, 2005).

No FF, a gelsolina foi previamente identificada em humanos, onde também está relacionada com a remoção da actina (LEE; GALBRAITH, 1992). Este processo pode explicar as baixas concentrações de gelsolina neste meio quando comparadas ao plasma sanguíneo em cadelas (FAHIMINIYA et al., 2010). No ovário de camundongos, a gelsolina é encontrada predominantemente nas células da teca externa e estroma, e participa do processo contrátil e morfogenético que ocorre durante o desenvolvimento folicular e ovulação, modulando a atividade da actomiosina ATPase (TEUBNER et al., 1994).

2.6.5 POM 121-ZP3 Fusion (POMZP3)

A POMZP3 humana é um curioso transcrito bipartido de RNA, derivado de um gene homólogo ao POM 121 do rato (uma proteína de poro de membrana nuclear) e da ZP3 (receptor de ligação espermática à zona pelúcida). A região 5' desta fusão é 77% idêntica ao final 5' da região codificadora da POM 121 no rato e aparece representada como uma duplicação parcial do gene codificador humano homólogo ao gene deste roedor. O final 3' da POM-ZP3 transcrita é 99% idêntica à ZP3 e parece ter surgido a partir de uma duplicação dos últimos quatro exons desta proteína (KIPERSZTOK et al., 1995).

As glicoproteínas da zona pelúcida (ZP) apresentam importante papel no desenvolvimento do oócito e biologia do gameta. A ZP é uma matriz sulfatada glicoproteica acelular translúcida que circunda os oócitos dos mamíferos e executa um importante papel mediando passos críticos durante a fertilização. Ela age de forma espécie-específica para ligação do espermatozoide ao oócito, induzindo a exostose acrossomal dos espermatozoides ligados à zona, previne a poliespermia e apresenta importante papel na proteção do blastocisto pré-implantado (BUKOVSKY, et al., 2008).

A zona pelúcida consiste de longos filamentos compostos por duas glicoproteínas, chamadas de ZP2 e ZP3, que são ligadas através de uma terceira proteína, chamada de ZP1. A presença de ambas (ZP2 e ZP3) é essencial para a arquitetura da ZP durante o crescimento do oócito e fertilização (WASSARMAN et al., 2004). A ZP3 possui um receptor responsável pela ligação do espermatozoide

com a zona pelúcida em oócitos de ratos não fertilizados (BLEIL; WASSARMAN, 1980).

A POM 121 é um dos componentes que integram o complexo de poros nucleares (CPN) em células de vertebrados (FUNAKOSHI et al., 2007). O CPN consiste em uma união de grandes proteínas que mediam o tráfico molecular entre o citoplasma e o núcleo. Isto ocorre duas vezes durante o ciclo celular dos metazoários: após a mitose e durante a interfase. A POM 121 é uma proteína de poro de membrana indispensável para a fase inicial da interfase (FUNAKOSHI et al., 2011).

Estas duplicações parciais, de ZP3 humana e do gene POM121, tiveram como resultado uma fusão de transcrição, POMZP3, que é expressa em vários tecidos humanos, incluindo ovário e testículos (KIPERSZTOK et al., 1995). Entretanto, a proteína resultante desta alteração gênica não apresenta funções descritas até então.

2.6.6 Transferrina

A transferrina plasmática pertence à família de glicoproteínas de ligação a metais, com peso molecular entre 76 e 81 kDa, cuja função principal é o transporte de ferro no plasma de vertebrados (BAILEY, 1988). A transferrina humana é composta por uma única cadeia polipeptídica, contendo 679 resíduos de aminoácidos, estabilizados por 19 pontes dissulfureto. É organizada em dois lóbulos homólogos. Cada um deles contém um sítio de ligação de alta afinidade ao íon ferro, compostos por cerca de 330 resíduos de aminoácidos, ligados por um curto peptídeo espaçador flexível (PARKKINEN et al., 2002).

Como a maioria das proteínas plasmáticas, o principal local de síntese da transferrina é o fígado (SCHAEFFER et al., 1987). Outros locais extra-hepáticos importantes de expressão desta proteína também já foram relatados, tais como, células de Sertoli (SKINNER; GRISWOLD, 1980), cérebro (TU et al., 1991), músculo, linfócitos, medula óssea, glândula salivar, baço, gânglios linfáticos, placenta, coração e pulmão (ALDRED et al., 1987) e ovários (BRIGGS et al., 1999). Além disso, são descritas, ainda, a lactotransferrina, secretada no leite pela glândula mamária (MAZURIER et al., 1983), a ovotransferrina, proteína da clara do ovo expressa e secretada pelo oviduto (JELTSCH; CHAMBON, 1982) e a

melanotransferrina, proteína que se liga à membrana dos melanócitos (ROSE et al., 1986). Possivelmente, enquanto a transferrina plasmática, produzida a partir das fontes hepáticas, atinge a maioria dos tecidos transportando o ferro, em outras zonas alvo, de difícil acesso pelo plasma, a transferrina é produzida localmente (BRIGGS et al., 1999).

As células da granulosa são capazes de sintetizar sua própria transferrina, que é translocada para o oócito por endocitose (BRIGGS et al., 1999). De maneira semelhante, os espermatócitos capturam a transferrina ligada ao ferro, sintetizada pelas células de Sertoli, de forma a compensar o crítico transporte de ferro através da barreira hemato-testicular (SKINNER; GRISWOLD, 1980). Considerando o papel crucial da transferrina no desenvolvimento da célula germinativa masculina, não é surpreendente que esta proteína também possa desempenhar importante papel no desenvolvimento folicular, uma vez que, durante a espermatogênese, ela é produzida pelas células de Sertoli, homólogas às células da granulosa (BRIGGS et al., 1999).

Nos folículos, a transferrina desempenha funções além do transporte de ferro. Esta proteína influencia o desenvolvimento folicular agindo como um fator de crescimento (DE JONG; DIJK; EIJK, 1990) uma vez que, como quelante do ferro, é capaz de reduzir a geração de ROS, que causam atresia folicular (TILLY, 1998). Existem evidências que relacionam as concentrações de transferrina no FF com o grau de maturidade folicular e esteroidogênese (ENTMAN et al., 1987). Desta forma, é frequente a utilização desta proteína em meios de cultura (EPPIG; SCHROEDER, 1989).

A transferrina e seu receptor são expressos no ovário de mulheres e camundongos. Observa-se um aumento gradual da transferrina no interior das células da granulosa e oócitos, em estágios mais avançados do desenvolvimento folicular. No *cumulus*, a presença desta proteína aumentou juntamente com a ampliação da cavidade antral e foi inexpressiva nas células da granulosa murais. Nos folículos primordiais, nem os oócitos nem as células da pré-granulosa apresentaram evidências da expressão da transferrina (BRIGGS et al., 1999).

A transferrina é uma proteína que apresenta alta afinidade com o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (OESTERREICHER et al., 2005). O sistema IGF apresenta um importante papel na foliculogênese, uma vez que altera as concentrações de fatores intrafoliculares, entre o futuro folículo dominante e os

subordinados, e conduz a dominância folicular (seleção) e a ovulação nas éguas (GINTHER et al., 2004). Além disso, o aumento dos níveis celulares de ferro reforça a expressão de algumas MMPs (MAIRUAE; CONNOR; CHEEPSUNTHORN, 2011). Em éguas, as MMPs são secretadas no FF durante o desenvolvimento folicular e imediatamente antes da ovulação e parecem ser fundamentais para que ela ocorra (RILEY et al., 2004).

Na circulação, a maior parte dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), proteínas de ligação ao IGF (IGFBP), e proteases IGFBP estão ligadas em complexos de alto peso molecular (BAXTER; MARTIN; BENIAC, 1989), capazes de modular as propriedades de ligação a IGF e a estabilidade das IGFBPs (OESTERREICHER et al., 2005), prolongar a meia-vida do IGF e controlar o seu transporte para tecidos alvo, agindo como um reservatório circulante de IGFs (BAXTER; MARTIN; BENIAC, 1989).

A interação entre a transferrina, o plasminogênio e a IGFBP-3 está presente em muitos destes complexos, que podem apresentar peso molecular de até 440 kDa (OESTERREICHER et al., 2005). Estas estruturas podem interferir na sobrevivência celular, no controle do crescimento celular e, ainda, aumentar a absorção celular de IGFBP-3, através de receptores de transferrina (ZWAD et al., 2002). Além disso, estes complexos circulantes protegem a IGFBPs da proteólise e evitam a perda de IGF por filtração glomerular, além de modular a migração, proliferação e apoptose de células extravasculares (WEINZIMER et al., 2001).

3 ARTIGO

PERFIL PROTEICO DO FLUIDO FOLICULAR DURANTE A FOLICULOGÊNESE DA ÉGUA

Bianca do Prado Lima Petrucci Rocha[1], Henrique Boll de Araujo Bastos[1], Tamarini Rodrigues Arlas[1], Gabriel de Oliveira Santos[1], Sandra Fiala Rechsteiner[2], Maria Inês Mascarenhas Jobin[1], Rodrigo Costa Mattos[1]

1- REPROLAB, FAVET-UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil

PERFIL PROTEICO DO FLUIDO FOLICULAR DURANTE A FOLICULOGÊNESE DA ÉGUA

RESUMO

O fluido folicular (FF) é um líquido extracelular complexo que se acumula no antro dos folículos ovarianos durante o seu desenvolvimento. É o meio essencial para o crescimento e a maturação das células ovarianas somáticas e germinativas e contém substâncias envolvidas na diferenciação celular, maturação do oócito, qualidade do gameta, ruptura da parede folicular e luteinização. O estudo de seus componentes é fundamental para um melhor entendimento dos mecanismos que envolvem a dinâmica folicular na espécie equina. O objetivo deste trabalho foi comparar o perfil proteico do maior folículo, e entre o maior e o segundo maior folículo, em diferentes momentos do desenvolvimento folicular. Para este estudo, quarenta ovários, oriundos de vinte éguas Crioulas, não gestantes e cíclicas, foram coletados durante a estação reprodutiva, em um abatedouro. Antes do abate, as éguas foram divididas em quarto grupos de acordo com o diâmetro folicular, ecotextura uterina (EU) e presença de corpo lúteo (CL): G 15 (emergência) (n = 3) folículos até 15 mm, EU $\geq$ 1, CL $\geq$ 20 mm; G 20 (divergência) (n = 9) folículos entre 20 e 25 mm, EU 1-2, CL 15-20 mm; G 30 (dominância) (n = 4) folículos entre 30 e 35 mm, EU $\geq$ 2, CL $\leq$ 15 mm; G 40 (pré-ovulatória) (n = 4) folículos $\geq$ 40 mm, EU 2-3, CL $\leq$ 15 mm. Após o abate, os ovários foram coletados e o FF dos dois maiores folículos foi aspirado. A técnica de 2D-PAGE foi realizada, em duplicata, utilizando

gel de acrilamida a 12%. Os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue R-250, escaneados e analisados, utilizando o PDQuest software, para determinar a densidade óptica dos spots. A identificação proteica foi realizada através de espectometria de massa (MS). Um total de 43 spots foi observado. Sete spots, representando cinco proteínas (albumina, apolipoproteína A-1, gelsolina, transferrina e α-1-antiproteinase 2), apresentaram diferenças (P<0,05) na expressão, no FF do maior folículo, nos diferentes grupos. Um spot, representado pela proteína POMZP3, demonstrou diferença (P=0,018) em sua expressão, entre o maior e o segundo maior folículo, nos diferentes grupos. E, por fim, um spot, identificado como a proteína α-1-antiproteinase 2, apresentou interação (P=0,047) entre o maior e o segundo maior folículo e as diferentes fases da foliculogênese. Os resultados deste trabalho demonstram que o perfil proteico do FF difere durante o desenvolvimento folicular e que, as maiores alterações, são observadas a partir da dominância. Além disso, provavelmente, algumas destas proteínas, bem como suas correlações, tenham grande importância nos eventos que ocorrem durante a foliculogênese.

Palavras-chave*: proteômica; albumina; apolipoproteína A-1; gelsolina; transferrina; alfa-1-antiprotease 2; POMZP3.*

PROTEIN PROFILE OF FOLLICULAR FLUID DURING FOLLICULOGENESIS OF THE MARE

ABSTRACT

The follicular fluid (FF) is a complex extracellular fluid that accumulates in the antrum follicles during the follicular development. It is the essential medium for the growth and maturation of somatic and germ ovarian cells and contains substances involved in cell differentiation, oocyte maturation, gamete quality, rupture of the follicle wall and luteinization. The study of its components is crucial for a better understanding of the mechanisms involved in follicular dynamics in mares. The objective of this study was to determine the protein profile of the largest follicle and among the largest and the second largest follicle at different stages of follicular development. In this study, 40 ovaries from 20 non pregnant Criollo cycling mares were collected during the breeding season in an abattoir. Before slaughter, the mares were divided into four groups according to follicular diameter, uterine ecotexture (UE) and the presence of corpus luteum (CL): G 15 (emergence) (n = 3), follicles up to 15mm, EU ≥ 1, CL ≥ 20 mm; G 20 (deviation) (n = 9), follicles between 20 and 25 mm, EU 1-2, CL 15-20 mm; G 30 (dominance) (n = 4), follicles between 30 e 35 mm, EU ≥ 2, CL ≤ 15 mm; G 40 (ovulation) (n = 4), follicles ≥ 40 mm, EU 2-3, CL ≤ 15 mm. After slaughter, the ovaries were collected and the FF of the two largest follicles was aspirated. The technique of 2D-PAGE was performed in duplicate using 12% acrylamide gel. Gels were stained with Comassie Brilliant Blue R-250, scanned and analyzed using the PDQuest software to determine the optical density of the spots. Protein identification was performed by mass spectrometry (MS). A total of 43 spots was observed. Seven spots representing five proteins (albumin, apolipoprotein A-1, gelsolin, transferrin e α-1-Antitrypsin 2) showed differences ($P<0.05$) in expression, the FF of the largest follicle in the different groups. One spot, represented by POMZP3 protein showed a difference ($P=0.018$) in expression between the largest and second largest follicle in the different groups. Finally, one spot, identified as the protein α-1-antitrypsin 2, showed interaction ($P=0.047$) between the largest and second largest follicle. The results of this study demonstrated that the protein profile of FF differs during follicular development

and that the largest changes are observed from the dominance. Also probably some of these proteins, as well as their correlations, have great importance in the events that occur during folliculogenesis.

Keywords*: proteomic; albumin; apolipoproteín A-1; gelsolin; transferrin; alfa-1-antitrypsin 2; POMZP3.*

2. INTRODUÇÃO

Compreender o desenvolvimento folicular das diferentes espécies é de grande importância para o estudo da reprodução uma vez que é o folículo quem proporciona um ambiente ótimo para a maturação do oócito, preparando-o para a subsequente fertilização, após a ovulação. O conhecimento pleno destes mecanismos fisiológicos é fundamental para que ocorra o aperfeiçoamento ou desenvolvimento de novas técnicas para manipular a função reprodutiva dos animais domésticos (FAHIMINIYA e GERARD, 2010).

O fluido folicular (FF) é um líquido extracelular complexo, semi-viscoso, de cor amarela, que se acumula no antro dos folículos ovarianos durante a sua fase de crescimento. É o único ambiente ao qual são expostas as células do compartimento avascular do folículo (células da granulosa e oócito), onde o complexo *cumulus*-oócito amadurece e as células da granulosa se diferenciam (FAHIMINIYA e GÉRARD, 2010), contém substâncias envolvidas na diferenciação celular, qualidade do gameta, ruptura da parede folicular (FAHIMINIYA et al., 2011) e luteinização (RICHARDS; GADSBY; ALMOND, 1994).

O FF é caracterizado por uma grande complexidade proteica e uma ampla e dinâmica gama de proteínas que dificultam sua análise (BIANCHI et al., 2013). Até então, o estudo de moléculas individuais não revelou marcadores confiáveis de qualidade e maturação do oócito e fertilização bem sucedida (JARKOVSKA et al., 2010). É bastante provável que estes fatores não estejam relacionados, isoladamente, com uma única molécula, mas com o equilíbrio entre inúmeros componentes (FAHIMINIYA; GÉRARD, 2010).

Técnicas como a proteômica podem ser extremamente benéficas para a compreensão das complexas redes reguladoras, envolvidas na fisiologia ovariana e na resposta à estimulação exógena, e para fornecer grupos relevantes de biomarcadores específicos em medicina reprodutiva (JARKOVSKA et al., 2010). Além disso, possibilitam o aperfeiçoamento e o desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas, tanto na espécie equina (FAHIMINIYA et al., 2011) quanto em humanos, uma vez que, devido à similaridade em diversas características da dinâmica folicular, a égua demonstrou ser um modelo experimental útil para o estudo da foliculogênese da mulher, com a vantagem de apresentar folículos maiores (GINTHER et al., 2004).

Desde seu desenvolvimento, a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) tem sido a técnica de eleição para a pesquisa de proteínas em células, tecidos e líquidos, uma vez que promove uma análise proteica de alta resolução (CELIS e GROMOV, 1999). O avanço desta técnica tem permitido a realização de análises proteômicas do FF de espécies como bovinos (MORTARINO et al., 1999), suínos (BIJTTEBIER et al., 2009), caninos (FAHIMINIYA et al., 2010) e equinos (FAHIMINIYA et al., 2011). A 2D-PAGE é hoje um valioso método em pesquisa proteômica e, seguida de digestão proteica em gel e identificação através da espectrometria de massa (MS), provou ser uma ferramenta confiável para o rastreio de proteínas (HANRIEDER et al., 2008).

Na espécie equina, o perfil proteico do FF, nas diferentes fases do desenvolvimento folicular, ainda é pouco estudado. Este trabalho objetivou comparar o perfil proteico do FF do maior folículo e entre o maior e o segundo maior folículo, em diferentes fases do desenvolvimento folicular (emergência, divergência, dominância e fase pré-ovulatória), e estabelecer possíveis correlações entre as proteínas identificadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 20 éguas da raça Crioula, não gestantes, cíclicas, com idade entre 3 e 12 anos e condição corporal (ECC) ≥ 3 (MALSCHITZKY et al., 2001), selecionadas após a chegada em um abatedouro comercial de equinos, com inspeção federal, localizado em Pelotas, RS. O projeto (Nº 13378) foi aprovado pela Comissão de Pesquisa Favet UFRGS.

Exame clínico

Antes do abate, todas as éguas foram submetidas à palpação retal e ultrassonografia para avaliação do útero e dos ovários. Foi mensurada a dimensão dos dois maiores folículos, para posterior aspiração, e do corpo lúteo (CL), e avaliado o escore de ecotextura uterina (EU), segundo Ginther (1995), em 1 (ausência de edema/diestro), 2 (edema intermediário) ou 3 (edema máximo/estro).

As éguas que apresentavam acúmulo de líquido intrauterino não foram utilizadas no experimento. Foi considerado acúmulo a presença de área hipoecóica maior que 10 mm de diâmetro (ADAMS et al, 1987).

Classificação das éguas

As éguas foram classificadas em quatro grupos, de acordo com os achados ultrassonográficos, especificados abaixo:

G15 (emergência)* (n = 6)*: Éguas com folículos de até 15mm, EU < 2 e CL ativo (≥ 20 mm).

G20 (divergência)* (n = 7)*: Éguas com folículos entre 20 e 26 mm, EU 2 – 2.5 e CL identificável (entre 16 a 26 mm).

G30 (dominância)* (n = 4)*: Éguas com folículos entre 30 e 38 mm, EU > 2.5 e CL de difícil identificação (≤16 mm).

G40 (pré-ovulatória)* (n = 3)*: Éguas com folículos ≥40 mm, EU > 2.5 e CL de difícil identificação (≤16 mm).

Coleta de sangue e dosagem de progesterona

Após a avaliação reprodutiva, foi coletada uma amostra de sangue de cada égua, através da venopunção da veia jugular, com auxílio de uma agulha 25 x 0,8 e um tubo a vácuo (Becton, Dickinson Vacutainer) sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas a 500 X *g* durante 20 minutos e, o soro, armazenado em tubos criogênicos estéreis, com capacidade para 2 mL (Techno Plastic Products AG, Suíça), a uma temperatura de -20°C, para posterior dosagem hormonal.

A concentração de progesterona (PG) plasmática foi determinada através da técnica de quimioluminescência utilizando o aparelho de automação IMMULITE 1000 Systems, SIEMENS. A sensibilidade foi de 0,13 mg/mL. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 16% (0,93 mg/mL), 7,9% (1,9mg/mL), 8,1% (4,3mg/mL) e 6,3% (7,9mg/mL) respectivamente, enquanto o coeficiente de variação inter-ensaio foi de 16% (0,8 mg/mL), 10% (1,7 mg/mL), 7,9% (3,9mg/mL) e 7,2% (5,8mg/mL) respectivamente.

Abate e coleta do trato reprodutivo e coleta de Líquido Folicular

As éguas foram abatidas de forma humanitária e, o trato reprodutivo, recuperado em cerca de 10 minutos após o abate. Os ovários foram separados do útero, identificados quanto ao lado (esquerdo ou direito), e dissecados.

Os folículos foram medidos através do uso de um paquímetro e, com o auxílio de uma seringa e de uma agulha 25 x 0,8, os dois maiores folículos foram aspirados para a obtenção do FF. As amostras foram colocadas em frascos criogênicos e armazenadas em nitrogênio líquido para o transporte até o laboratório, onde foram submetidas à centrifugação a 1.500 X *g*, durante uma hora, a 4°C e, imediatamente, armazenadas em um freezer -80°C.

Eletroforese Bi-dimensional

Antes de realizar a eletroforese, as amostras foram descongeladas e novamente centrifugadas a 10.000 x *g*, por 1 hora, a 4°C. O sobrenadante foi armazenado em frascos criogênicos, em alíquotas de 50 μl, também em freezer a -80°C, até a utilização. A quantidade de proteínas totais foi determinada, segundo o método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão. A eletroforese bi-dimensional foi realizada de acordo com O'Farrell et al. (1977), modificada por Rodnight, Zamani, Tweedale (1988).

Primeira Dimensão

A eletroforese de primeira dimensão, para determinar a focalização isoelétrica, foi realizada em gradiente de pH não equilibrado (NEPHGE) em gel tubular de acrilamida a 3,5%. Os géis foram confeccionados em capilares de vidro de 15 cm de comprimento e 1 mm de diâmetro interno. Para produzir 50 mL de gel, 27,6 g de uréia foram diluídas em 15 mL de água ultra pura (Milli-Q®, Millisul, Porto Alegre, Brasil) a 60°C. A esta solução, foram adicionados 5,65 mL de acrilamida (solução estoque a 30%), 0,250 mL de anfólitos 2-4 (Servalyt®, SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Alemanha), 0,250 mL de anfólitos pH 5-7 (Ampholine™, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia), 2 mL de anfólitos pH 3-10

(Pharmalyte^{TM}), 1mL de Igepal (CA-630, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 0,083 mL de TEMED (TEMED 100%, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) e água ultra pura q.s.p. Imediatamente após a adição de persulfato de amônio a 10%, os capilares foram preenchidos com a solução do gel até 3,5 cm da extremidade, através de sucção realizada com uma seringa de 1 mL, acoplada a um cilindro de látex, conectado na extremidade do capilar. Os géis permaneciam em banho-maria a 37°C por 2 horas para polimerização. Em cada capilar foram aplicados 100 µg de proteína, adicionados de uma solução de preparo da amostra (uréia a 9 M, lisina a 12,5 nM, SDS a 7 nM, Igepal a 4% e 2β-mercaptoetanol a 2%) e marcador de corrida (Cytochrome C, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As corridas foram realizadas utilizando uma fonte EPS 3501 (Amersham Pharmacia), com voltagem máxima de 800 V, amperagem máxima de 10 mA e potência de 0,125 W por capilar e eram interrompidas quando o marcador (banda de citocromo C) atingia 7,5 cm de migração (2-3 horas). Os tubos capilares eram retirados da cuba, identificados e estocados em freezer a -20°C, até a realização da etapa de segunda dimensão.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a realização da segunda dimensão, a eletroforese foi realizada em placas de gel (SDS-PAGE), com sistema de tampão descontínuo, que separa as proteínas pelo seu peso molecular. Os géis tubulares foram retirados do capilar, 30 segundos após a retirada do freezer, sob aplicação de leve pressão, utilizando uma seringa de 5 mL acoplada a um tubo de látex, conectado em uma das extremidades do capilar. Os géis foram colocados, sob agitação, em tampão de equilibração de SDS adicionado de 2β-mercaptoetanol, por 20 minutos, em temperatura ambiente. Os géis de segunda dimensão foram confeccionados entre placas de vidro de 20 x 18 cm. A solução do gel de corrida SDS-PAGE era composta de 12% de acrilamida, 1% de SDS, 0,375 M de Tris-HCl pH 8,8 e 10% de persulfato de amônio. A confecção dos géis em placas de vidro foi realizada segundo a técnica descrita por O'Farrell (1975). A corrida foi realizada com máximo de 125 V e 20 mA por placa, até o marcador (Bromophenol Blue, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), adicionado ao tampão superior de corrida, atingir 3 cm do final da placa (6-7 horas).

Coloração e Secagem

Os géis foram corados por aproximadamente 18 horas em uma solução de Comassie (Comassie Brilliant Blue R-250, Affymetrix/USB, Cleveland, EUA) (0,15%), metanol (53%) e ácido acético glacial (7%). Para a evidenciação das bandas proteicas, a descoloração era realizada, sob agitação, em solução fixadora (metanol a 53%, ácido acético glacial a 7%), pelo mínimo de 4 horas, ou até obter transparência suficiente. A equilibração era realizada em solução de secagem (metanol a 50%, ácido acético glacial a 1%) por 2 horas, aproximadamente. Os géis foram estocados entre duas lâminas de celofane, em duplicata.

Quantificação das Bandas Proteicas

Os géis foram escaneados (Hewlet-Packard 6100C, Palo Alto, EUA) e analisados por um *software* (PDQuest®, versão 8.0.1; Bio-Rad) para a verificação da frequência e da densidade óptica relativa das bandas proteicas, medida em pixels. A medição foi expressa pela porcentagem relativa de pixels, sendo que 100% representa o total de uma área definida, constante para cada gel e cada banda corresponde a uma porcentagem do total.

Espectrometria de Massa (MS)

A identificação das proteínas foi realizada pela técnica de MS. As bandas proteicas que apresentaram diferença significativa, quanto à densidade óptica relativa e/ou à frequência foram recortadas do gel e digeridas com tripsina, de acordo com Shevchenko et al. (1996). O sequenciamento dos peptídeos foi realizado no Laboratório Uniprote-MS, do Centro de Biotecnologia da UFRGS, através do sistema de separação de partículas em escala nano (UPLC nanoACQUITY®, Waters, Milford, EUA), acoplado a um espectrômetro de massa (Q-TOF Micro™, Waters, Milford, EUA). As sequências obtidas foram comparadas para correspondência com o banco de dados disponível na internet, no sítio http://www.swissprot.com.

Análise Ontológica das Proteínas

Foi realizada a análise ontológica das proteínas do FF que demonstraram diferença significativa, no maior folículo, entre os diferentes grupos, com a finalidade de verificar suas funções moleculares, seus processos biológicos e suas localizações. Para isso, utilizou-se o programa Strap 1.5 (Cardiovascular Proteomics Center; Boston University School of Medicine).

Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando ANOVA. As densidades ópticas de cada banda proteica foram transformadas em arco-seno, sendo a variável dependente. As variáveis independentes foram grupo, maior folículo (F1), segundo maior folículo (F2) e suas interações. O efeito do diâmetro folicular sobre o perfil proteico do FF foi testado. Cada gel foi considerado como uma unidade experimental. Foram realizados 2 géis por égua (F1 e F2). As diferenças entre as médias foram calculadas através do teste Student-Newmann-Keuls e considerou-se significativa a diferença de $P < 0,05$. Utilizou-se o modelo linear generalizado (GLM) do pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System).

4. RESULTADOS

A Tabela 1 expressa a distribuição das éguas conforme os grupos e as respectivas variações do diâmetro do maior folículo, do Corpo Lúteo (CL), do escore uterino (EU) e da concentração plasmática de progesterona (PG).

Tabela 1. Distribuição das éguas em seus respectivos grupos e parâmetros utilizados para a classificação (tamanho F1, EU e dimensão do CL) e dosagem de progesterona plasmática.

GRUPO	n	F1 (mm)	CL (mm)	EU	P4 (ng/mL)
15	6	8-15	28-56	1 – 2	8,1-12,7
20	7	22-26	17-26	2 – 2.5	6,7-12,6
30	4	33-38	10-16	2 – 3	0,6-7,3
40	3	41-55	< 15	2.5 – 3	0,6-0,7

n: número de animais por grupo; F1: diâmetro do maior folículo (mm); CL: diâmetro do corpo lúteo (mm), P4: progesterona plasmática.

Foi avaliado um total de 48 géis do FF do F1 (5 do G15, 17 do G20, 8 do G30 e 8 do G40). Dois géis que não apresentaram boa resolução não foram avaliados e foram retirados do experimento (um gel do G15 e um gel do G20). Um

total de 43 spots foi observado nos géis. Destes, nove foram submetidos à MS e representaram seis proteínas (Figura 1).

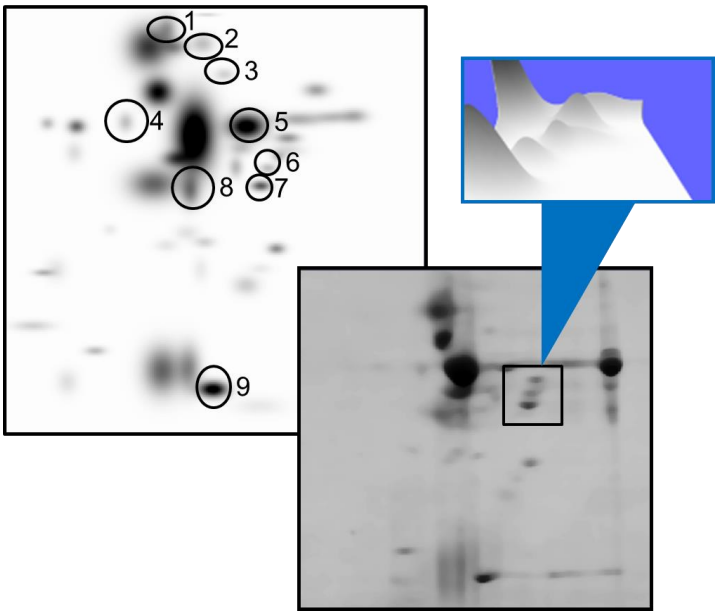

Figura 1. A imagem superior, à esquerda, produzida pelo software PDQuest, representa o máster gel, com o número total de spots encontrados nos géis de FF bruto de éguas e, os spots circulados, são aqueles que demonstraram diferença na expressão em qualquer um dos grupos ou folículos. São eles: 1. albumina (spot 5904), 2. gelsolina (spot 3902); 3. transferrina (spot 6901); 4. POMZP3 (spot 1801); 5. albumina (spot 7801); 6. α-1-antiprotease 2 (spot 8601); 7. α-1-antiprotease 2 (spot 8501); 8. albumina (spot 4501); 9. apolipoproteína A1 (spot 5101). As proteínas que foram identificadas estão denominadas segundo suas abreviações presentes na base de dados www.swissprot.com. Os spots estão numerados de acordo com os dados fornecidos pelo PDQuest software. A imagem inferior, à direita representa um dos géis produzidos durante este experimento e, apenas para fins ilustrativos, a imagem tridimensional, também produzida pelo PDQuest software, demonstra os picos das proteínas que compõem a cadeia de α-1-antiprotease 2.

O nome de cada proteína e de seu respectivo gene, bem como a frequência de aparecimento em todos os géis, está expresso na Tabela 2.

Tabela 2. Proteínas identificadas no FF bruto de éguas, separadas por 2D-PAGE (pI: 3-10; PM: 10-200 KDa).

SPOT	Gene	N° de Acesso	Nome da Proteína	Frequencia (%)			
				G15	G20	G30	G40
4501	ALBU	P35747	Serum albumin	100	82	100	100
5904	ALBU	P35747	Serum albumin	60	47	38	63
7801	ALBU	P35747	Serum albumin	100	100	100	100
5101	APOA1	P02648	Apolipoprotein A-1	80	76	50	100
8501	A1AT2	P38029	α-1-antiprotease 2	80	53	75	38
8601	A1AT2	P38029	α-1-antiprotease 2	100	82	100	88
3902	GELS	Q28372	Gelsolin	00	59	50	63
6901	TRFE	P27425	Serotransferrin	60	53	63	38
1801	POZP3	Q6PJE2	POM121-ZP3 fusion	80	88	88	100

O número do spot foi produzido pelo PDQuest software. Gene, N° de acesso e nome da proteína referem-se ao nome do gene, ao número de acesso e nome presentes na base de dados www.swissprot.com, respectivamente. A Frequência refere-se ao aparecimento dos spots nos géis, nos diferentes grupos, expressa em %.

Sete spots, representando cinco proteínas (albumina, apolipoproteína A-1, gelsolina, transferrina e α-1-antiproteinase 2), apresentaram diferenças ($P < 0,05$) na expressão, no fluido do maior folículo, nos diferentes grupos (Figura 3). Um spot, representado pela proteína POMZP3, demonstrou diferença ($P = 0,018$) em sua expressão, entre o maior e o segundo maior folículo, a partir da divergência (Figura 4A). E, por fim, um spot, identificado como a proteína alfa-1-antiprotease 2, apresentou interação ($P = 0,047$) entre o maior e o segundo maior folículo, nos diferentes grupos (Figura 4B).

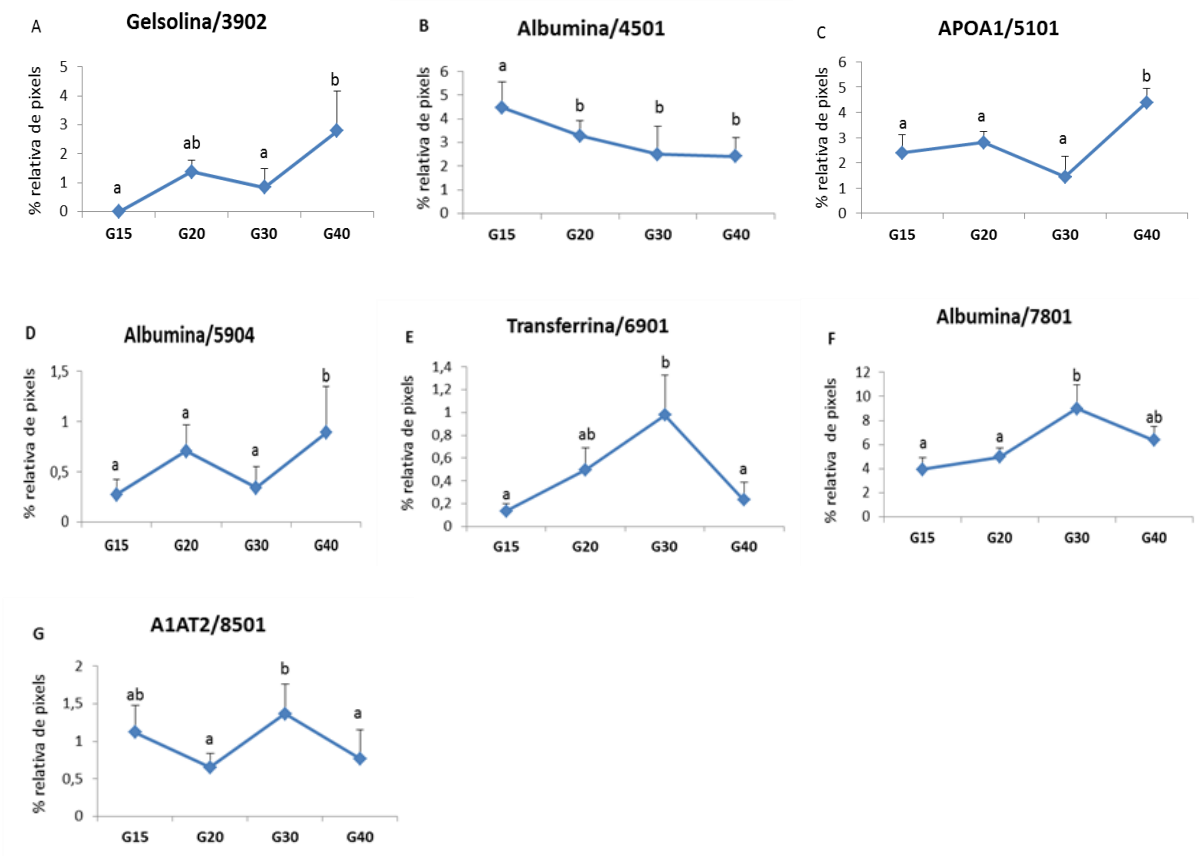

Figura 3. Expressão (%) da A: gelsolina, B: albumina, C: apolipoproteína A-1, D: albumina, E: transferrina, F: albumina e G: alfa-1-antiprotease 2, no maior folículo (F1), nos diferentes grupos experimentais (G15, G20, G30 e G40). a, b (P < 0,05), letras diferentes representam diferenças significativas.

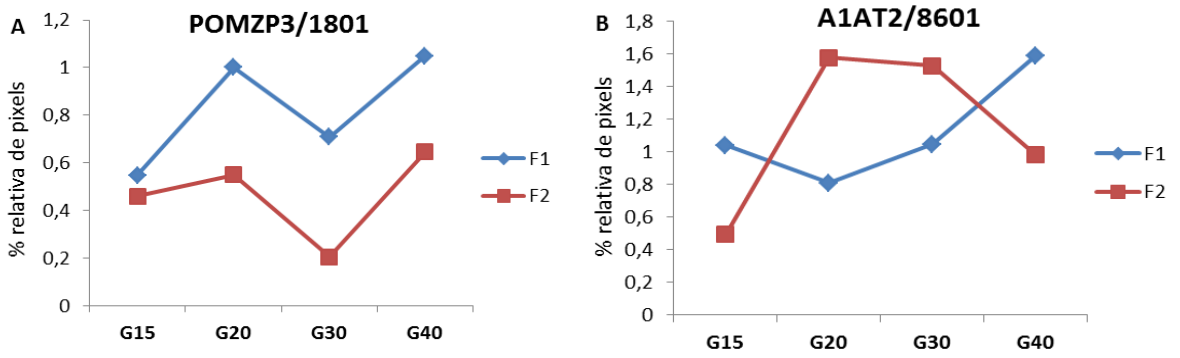

Figura 4A e 4B. Expressão proteica (%) da POMZP3 (P = 0,018) e da A1AT2 (P = 0,047), respectivamente, no maior (F1) e no segundo maior (F2) folículo, nos diferentes grupos experimentais (G15, G20, G30 e G40).

Ontologia gênica das proteínas do FF

Verificou-se que as proteínas que demonstraram diferença significativa entre o F1, nos diferentes grupos, participam em processos biológicos envolvendo regulação (27%), localização (27%), processos celulares (18%), resposta a estímulos (10%), processos metabólicos (9%), entre outros (9%). A maior parte destas proteínas está envolvida em funções moleculares de ligação (80%) e, as demais, de regulação enzimática (20%). Da mesma forma, grande parte das proteínas encontradas apresenta localização extracelular (80%), enquanto apenas uma (20%) apresenta localização intracelular, conforme demonstra a Tabela 3.

Tabela 3. Ontologia gênica e definição de processos biológicos, funções moleculares e localização celular das proteínas identificadas no FF de éguas, que demonstraram diferença significativa durante as diferentes fases do desenvolvimento folicular, realizada através STRAP (Software Tool for Rapid Annotation of Proteins).

Proteína	Processos biológicos	Função molecular	Localização
Albumina	Processos celulares Localização Regulação	Ligação	Extracelular Complexo macromolecular
Gelsolina	Regulação Organização de componentes celulares	Ligação	Intracelular Citoesqueleto
ApoA-1	Processo metabólico Localização Processo celular	Ligação	Extracelular
Transferrina	Regulação Localização	Ligação	Extracelular
A1AT2	Resposta a estímulos	Regulação enzimática Inibição enzimática	Extracelular

5. DISCUSSÃO

Comparar as características de folículos dominantes e subordinados pode fornecer informações valiosas sobre os importantes mecanismos para a seleção bioquímica do folículo dominante (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). Além disso, pode contribuir para a identificação de proteínas com potencial capacidade de influenciar a qualidade do oócito e o desenvolvimento folicular, contribuindo para o sucesso das técnicas de fertilização (JARKOVSKA et al., 2010).

A maioria das proteínas identificadas no fluido folicular (FF) deste estudo também está presente no plasma sanguíneo. Durante o processo de maturação, verifica-se um aumento progressivo da permeabilidade da barreira hemato-folicular e uma maior difusão de proteínas plasmáticas para o interior do folículo (HANRIEDER et al., 2008). São também encontradas no FF proteínas específicas, de produção local, muitas das quais ainda não foram associadas com maturação folicular ou oocitária. Todas estas proteínas, juntamente com suas vias de regulação, podem desempenhar um papel fundamental no processo reprodutivo (JARKOVSKA et al., 2010).

O aumento do aporte sanguíneo ao folículo dominante, em relação ao seu maior subordinado, inicia cerca de dois dias antes da divergência entre suas taxas de crescimento (ACOSTA et al., 2004) e continua até a ovulação (GINTHER, 2007). A presença de fatores angiogênicos, de crescimento endotelial, no fluido do folículo dominante, demonstra sua capacidade de controlar o próprio aporte sanguíneo (ACOSTA et al., 2004). Entretanto, embora seja provável que a dominância morfológica seja precedida da bioquímica (alterações que ocorrem enquanto ele ainda tem o mesmo tamanho dos demais), a ausência de diferença entre suas dimensões torna difícil estudar o folículo dominante antes da divergência (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004).

Corroborando com nossos achados, grande parte das proteínas plasmáticas encontradas no FF são proteínas da fase aguda (APP), secretadas em excesso pelo fígado como resposta fisiológica à inflamação. Os níveis elevados destas proteínas no FF suportam a hipótese de que o sistema imunológico está crucialmente envolvido na foliculogênese e que a ovulação pode ser considerada como uma reação inflamatória (HANRIEDER et al., 2008). O processo associado à ovulação tem uma reação de síntese de citocinas inflamatórias no interior do folículo, já que, a

ruptura da parede folicular necessita da presença de enzimas proteolíticas que degradem a matriz extracelular (ECM) (FAHIMINIYA; GÉRARD, 2010). Os resultados encontrados neste experimento suportam a hipótese inflamatória, uma vez que foram identificadas oito APPs no FF das éguas e, destas, quatro demostraram ter importância durante a foliculogênese (transferrina, albumina, alfa-1-antiprotease (A1AT2) e apolipoproteína A-1 (APOA1)). Além disso, a gelsolina, proteína que também está envolvida em eventos inflamatórios, e a POMZP3, também apresentaram importantes papéis durante este processo.

A transferrina plasmática, produzida a partir de fontes hepáticas, tem como função primária o transporte de ferro para a maioria dos tecidos (BAILEY, 1988). Entretanto, em zonas alvo de difícil acesso pelo plasma, a transferrina é produzida localmente (BRIGGS et al., 1999). No presente estudo, esta proteína apresentou maior expressão no G30, momento em que se estabelece a dominância e o folículo começa a se preparar para os eventos ovulatórios.

A inflamação é acompanhada por alterações profundas na distribuição de ferro (WEISS, 2009), demonstrando que a homeostase de ferro e a imunidade estão intimamente relacionadas e que o ferro pode ser considerado um imunomodulador. Sua presença potencializa a resposta inflamatória e, por sua vez, seus agentes quelantes atenuam a inflamação (ZAGER; JOHNSON; HANSON, 2004). Estes efeitos são atribuídos, principalmente, à sua capacidade de potencializar ou reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KOHCHI, et al., 2009). O ROS é gerado durante o metabolismo oxidativo mitocondrial como resposta celular à xenobióticos, citocinas e invasão bacteriana. O estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio causado pelo excesso de ROS devido à incapacidade da célula em produzir um antioxidante eficaz (RAY; HUANG; TSUJI, 2012).

Nos folículos, a transferrina desempenha funções diretamente relacionadas com o desenvolvimento folicular (DE JONG; DIJK; EIJK, 1990). Como quelante do ferro, esta proteína reduz a geração de ROS, que causam atresia folicular, agindo então como um fator de crescimento (TILLY, 1998). Por este motivo, as concentrações de transferrina no FF estão intimamente relacionadas com o grau de maturidade folicular e esteroidogênese (DE JONG; DIJK; EIJK, 1990). As células da granulosa sintetizam sua própria transferrina, que é transportada para o oócito através da endocitose (BRIGGS et al., 1999).

A albumina é uma proteína que apresenta níveis mais elevados no FF do que no plasma sanguíneo. Isto sugere um transporte ativo, a partir do sangue para os folículos, de compostos que podem ser necessários para várias funções fisiológicas, como o crescimento e a maturação folicular (ARSHAD et al., 2005). Assim, não foi surpreendente que nesta pesquisa esta proteína, em suas diferentes isoformas, tenha aparecido com grande intensidade durante quase todas as fases do desenvolvimento folicular (G15, G30 e G40). Isso sugere que o crescimento folicular não parece ter efeito sobre o conteúdo de albumina no FF (ARSHAD et al., 2005).

Além disso, a albumina desempenha um papel importante na proteção dos oócitos ao dano oxidativo (OTSUKI et al., 2012) e, quando associada à queratina ou separadamente, pode favorecer a quebra da vesícula germinativa, contribuindo com melhores resultados na técnica de fertilização *in vitro* (DUCOLOMB et al., 2013). O aumento da permeabilidade vascular do folículo próximo à ovulação, resulta no aumento das concentrações desta proteína no FF (OTSUKI et al., 2012) o que poderia explicar o aumento da expressão da albumina nos momentos que precedem a ovulação (G40), verificado em nossos achados.

No FF, a alfa-1-antiprotease 2 (A1AT2) foi destacada por ter um importante papel no balanço da atividade proteases/antiproteases, controlando a degradação da ECM, inflamação, cicatrização e coagulação durante a maturação folicular, a ovulação e a formação do CL (BIANCHI et al., 2013). O microambiente do complexo *cumulus*-oócito (COC), bem como os eventos específicos que ocorrem no interior de COCs de folículos pré-ovulatórios, são essenciais para a formação adequada da ECM, rica em ácido hialurônico (HA), crítica para a ovulação. Assim, proteínas de ligação ao HA, como inibidores da tripsina, e fatores associados, parecem ser componentes essenciais para a formação e estabilização da matriz expandida que, por sua vez, é imprescindível para a liberação do COC (RICHARDS, 2005). Isto pode explicar o aumento da A1AT2 a partir da dominância folicular (G30).

As apolipoproteínas, presentes em muitos complexos proteicos e lipoproteicos, têm demonstrado uma relação direta com a reprodução (VON WALD et al., 2010). A apolipoproteína A-1 (APOA-1) é considerada como um inibidor específico da ativação de monócitos e da interleucina-1β (IL1β) mediada por contato (HYKA et al., 2001). Geralmente, durante uma inflamação não tratada, os níveis séricos da APOA-1 e HDL diminuem rapidamente a valores mínimos, mais baixos do

que os apresentados por indivíduos normais (PARK et al., 1999). Em contrapartida, no local da inflamação, os níveis de APOA-1 geralmente tendem a aumentar (ANANTH; PRETE; KASHYAP, 1993).

No FF, a ação da APOA1 parece ir além da relação com o tráfego de colesterol e triglicerídios, mas compreende também estímulo mitogênico e angiogênico, com consequente relação com o desenvolvimento folicular (VON OTTE et al., 2006), transporte de precursores de esteroides e, ainda, importante papel na proteção ao dano oxidativo, através da ação anti-inflamatória local, e consequente maturação do oócito. Desta forma, o conteúdo de apolipoproteína no FF pode ser considerado um marcador para a produção de oócitos maduros (VON WALD et al., 2010). Nossos achados corroboram com esta ideia já que, a maior expressão desta proteína na fase pré-ovulatória (G40), em relação a todos os demais grupos deste trabalho, pode estar relacionada com o processo inflamatório que ocorre no folículo dominante, em decorrência da ovulação, e com a proteção do oócito neste momento.

In vitro, o FF é capaz de aumentar a motilidade espermática e estimular a capacitação e reação acrossomal, especialmente quando é oriundo de folículos maduros. Além disso, favorece a chegada dos espermatozoides ao local da fecundação através da presença de agentes quimiotáticos (EISENBACH, 1999). No momento da ruptura do folículo, o FF é transportado juntamente com o COC e atinge o local da fecundação (FAHIMINIYA e GÉRARD, 2010). As partículas de HDL presentes no FF, como a APOA1, estão envolvidas na hiperativação dos espermatozoides e efluxo de colesterol da membrana plasmática e são consideradas os primeiros receptores de colesterol celular (HAMDI et al., 2010). De acordo com nossos resultados, é possível que isso aconteça pela presença, em maior quantidade, da APOA1 no FF dos folículos próximo ao momento da ovulação, justificando sua maior expressão no G40.

A gelsolina foi previamente identificada no FF humano e está relacionada com a organização dos filamentos de actina, cuja presença causa dano tecidual (LEE; GALBRAITH, 1992). No ovário de camundongos, foi encontrada predominantemente nas células da teca externa e estroma e apresenta importante papel no processo contrátil e morfogenético que ocorre durante o desenvolvimento folicular e ovulação (TEUBNER et al., 1994). Este trabalho é o primeiro relato da presença da gelsolina no FF de éguas. Esta proteína apresentou-se em maior

quantidade no folículo dominante próximo à ovulação (G40), reforçando sua íntima relação com o processo inflamatório, necessário para a ovulação ocorrer.

A POMZP3 humana é um curioso transcrito bipartido de RNA, derivado de um gene homólogo ao da POM 121 (uma proteína de poro de membrana nuclear) e da ZP3 (receptor de ligação espermática à zona pelúcida), e é expressa em vários tecidos humanos, incluindo ovário e testículos (KIPERSZTOK et al., 1995). Isoladamente, a POM121 é uma proteína indispensável para a fase inicial da interfase (FUNAKOSHI et al., 2011), enquanto a ZP3 possui um receptor responsável pela ligação do espermatozoide à zona pelúcida (BLEIL; WASSARMAN, 1980). Entretanto, a proteína resultante desta alteração gênica não apresenta funções descritas até então. Este é o primeiro relato da presença da POMZP3 no FF de éguas. A maior expressão desta proteína no fluido do folículo dominante em relação ao seu maior subordinado, encontrada neste trabalho, pode sugerir esta proteína como um possível marcador do folículo dominante.

O estudo de moléculas individuais não foi capaz de revelar marcadores confiáveis de maturação do oócito e fertilização bem sucedida (JARKOVSKA et al., 2010). Provavelmente, a qualidade dos oócitos não está relacionada com uma única molécula, mas sim com o equilíbrio entre inúmeros componentes (FAHIMINIYA; GÉRARD, 2010). Sendo assim, técnicas como a proteômica são de extrema importância e de grande contribuição para monitorar as complexas redes reguladoras, envolvidas na fisiologia do ovário e na resposta ao estímulo exógeno. Além disso, pode contribuir para a elucidação de biomarcadores específicos em medicina reprodutiva (JARKOVSKA et al., 2010).

Seguindo esta ideia, o estudo das possíveis interações entre as proteínas que demonstraram ter importância em qualquer uma das fases do desenvolvimento folicular, foi considerado um fator relevante neste estudo. A utilização de ferramentas e bases de dados contribuiu para a melhor compreensão das possíveis vias de ação entre cada uma das proteínas, que corroboraram com os achados deste trabalho. São eles STRING, STRAP, METACORE E SWISSPROT. Com o auxílio da bioiformática, foi possível concluir que algumas proteínas estão fortemente correlacionadas e que estas interações são de suma importância para muitos dos processos que envolvem o desenvolvimento folicular, conforme ilustrado na Figura 5.

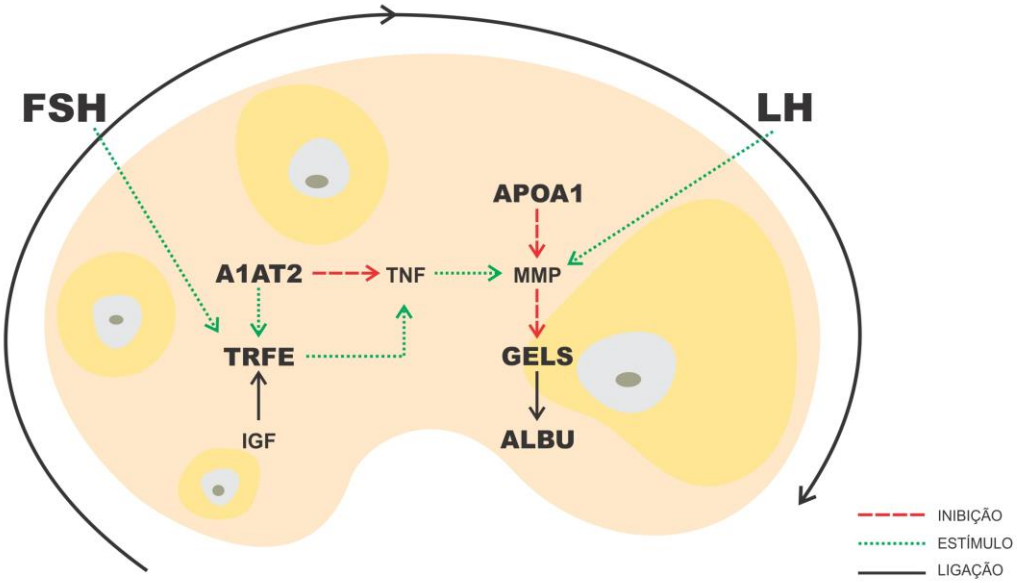

Figura 5. Modelo hipotético que ilustra as interações entre algumas das proteínas que demonstraram diferença significativa na expressão, nas diferentes fases do desenvolvimento folicular, e outros compostos envolvidos durante a foliculogênese. FSH (hormônio folículo estimulante), LH (hormônio luteinizante), ALBU (albumina), APOA1 (apolipoproteína A1), A1AT2 (α-1-antiproteinase 2), GELS (gelsolina), TRFE (transferrina), IGF (fator de crescimento semelhante à insulina), MMP (metaloproteinase), TNF (fator de necrose tumoral).

Segundo os achados desta pesquisa, é possível que, uma das vias que dê início ao processo de maturação folicular seja o estímulo do FSH na produção de transferrina. Considerando a homologia entre as células da granulosa e as células de Sertolli (BRIGGS et al., 1999), é possível supor que, assim como o FSH desempenha importante papel na regulação da produção de transferrina pelas células de Sértoli, resultando no aumento da produção desta proteína por estas células (KARZAI; WRIGHT, 1992), ele também possa apresentar ação semelhante em relação às células da granulosa, durante o desenvolvimento folicular.

A transferrina apresenta alta afinidade com o IGF (OESTERREICHER et al., 2005), que desempenha importante papel na dominância folicular e ovulação em éguas (GINTHER et al., 2004). Na circulação, a maior parte das IGFs encontram-se ligadas em complexos de alto peso molecular (BAXTER; MARTIN; BENIAC, 1989), capazes de modular suas propriedades de ligação, estabilidade (OESTERREICHER et al., 2005), meia-vida e transporte para tecidos alvo, agindo como um reservatório

circulante (BAXTER; MARTIN; BENIAC, 1989). A transferrina e o plasminogênio estão presentes em muitos destes complexos, com peso molecular de até 440 kDa (OESTERREICHER et al., 2005). Desta forma, a transferrina ligada à IGF é capaz de controlar a ação e aumentar a absorção deste fator de crescimento através de receptores para a transferrina (ZWAD et al., 2002). Além disso, evita a perda das IGFs por proteólise ou filtração glomerular (WEINZIMER et al., 2001).

Em decorrência de sua função primária de transporte do ferro (BAILEY, 1988), e a consequente relação com os eventos inflamatórios, a transferrina tem a capacidade de potencializar a ação do fator de necrose tumoral (TNF) (PANDEY et al., 2007), que regula a produção das metaloproteinases (MMPs), através do estímulo à expressão gênica destas proteínas (MURDOCH; MCDONNEL, 2002). O aumento dos níveis celulares de ferro reforça a expressão de algumas MMPs (MAIRUAE; CONNOR; CHEEPSUNTHORN, 2011). Isto também pode ser resultado da ligação entre a transferrina e outras moléculas, como as IGFs, por exemplo, aumentando a quantidade de ferro livre no interior do folículo. Em éguas, as MMPs são secretadas no FF durante o desenvolvimento folicular e imediatamente antes da ovulação e parecem ser fundamentais para que ela ocorra (RILEY et al., 2004). A expressão gênica da MMP-1 e MMP-2 também foi verificada no ovário equino durante toda a foliculogênese (BASTOS et al., 2014).

A gelsolina plasmática tem a capacidade de remover filamentos extracelulares de actina, evitando obstruções de pequenos vasos, coágulos, inflamação, ativação de proteases, e lesão endotelial (LEE; GALBRAITH, 1992). A gelsolina é clivada e degradada pela maioria das MMPs, processo que resulta em uma perda considerável da sua atividade. Isto sugere que as MMPs têm a capacidade de enfraquecer o sistema de eliminação de actina extracelular e, portanto, estão envolvidas em condições induzidas pelo acúmulo desta proteína, como eventos inflamatórios (PARK et al., 2006). Além disso, alterações na dinâmica da actina podem tanto aumentar quanto diminuir os níveis de ROS (GOURLAY; AYSCOUGH, 2005).

Os componentes proteicos do fluido cerebrospinal (CSF) são mantidos a uma concentração específica, através de um gradiente dinâmico, imposto pela barreira hemato-cefalorraquidiana (BCB), no qual a albumina apresenta importante participação. A permeabilidade às proteínas aumenta quando há dano estrutural à BCB, como em casos de meningite, por exemplo. As MMPs, responsáveis por

degradar a ECM, estão diretamente ligadas à maioria dos danos inflamatórios e, sua concentração no CSF parece ter relação positiva com a concentração da albumina, que pode ser considerada como um indicador útil do grau de dano à BCB (KANOH et al., 2008). É possível que isso ocorra de maneira semelhante no FF e, assim, de acordo com nossos achados, a albumina poderia atuar como um indicador de folículos pré-ovulatórios.

O comportamento das diferentes moléculas, presentes no FF, apresenta-se de forma dinâmica e necessita manter um equilíbrio para o perfeito desempenho de suas funções. Neste contexto, é possível observar que algumas proteínas podem desempenhar ações distintas, em diferentes fases do desenvolvimento folicular e foram identificadas em mais de um spot no decorrer deste trabalho. Isto pode ser explicado por uma alteração nos pontos isoelétricos, devido à perda de parte da sequência de aminoácidos ou a uma mudança no estado de glicosilação da proteína (DUCOLOMB et al., 2013). Muitos peptídeos biologicamente ativos são produzidos durante os processos de maturação e degradação de proteínas e são conhecidos como fatores peptidérgicos (PIMENTA; LEBRUN, 2007).

Seguindo esta lógica, ao mesmo tempo em que a A1AT2 aumenta a síntese de receptores para a tranferrina e, com isso, tem a capacidade de atuar no metabolismo do ferro (JANCIAUSKIENE et al., 2011), ela também tem importante papel na proteção dos tecidos contra a ação do TNF, um potente mediador da inflamação (DENG et al., 2005), suprimindo a liberação desta substância e impedindo sua subsequente infiltração nas células (CHURG et al., 2007). Além disso, soma-se à relação de efeitos da A1AT2, a capacidade de inibir tanto a trombina quanto a plasmina e, com isso, impedir a liberação de algumas MMPs, agindo como um inibidor de protease, o que requer moléculas intactas, já que, neste caso, suas formas oxidadas e polimerizadas são ineficazes (CHURG et al., 2007).

Por outra via, a ocorrência de polímeros de A1AT2 em folículos maduros, associados a lesões provocadas por ROS, está intimamente ligada aos processos inflamatórios que ocorrem durante ovulação, já que, a polimerização da A1AT2 e sua consequente inativação como inibidor de protease, resultam na perda fisiológica do balanço proteólise/inibição da proteólise atuando na ruptura do folículo e liberação do oócito. Assim, a A1AT2 pode exercer um papel central na maturação folicular e ovulação (BIANCHI et al., 2013).

A APOA1 também contribui com o equilíbrio entre os fatores pró e anti-inflamatórios. Esta proteína exerce um efeito inibidor, *in vivo* e *in vitro*, sobre a MMP2, e outras citocinas inflamatórias, diminuindo sua expressão e liberação, agindo como um importante agente anti-oxidante (WANG et al., 2013).

6. CONCLUSÃO

O FF apresenta uma grande complexidade e dinamicidade de suas moléculas, tornando sua análise uma tarefa bastante difícil. Entretanto, o estudo aprofundado de seus componentes é de suma importância para uma melhor compreensão dos mecanismos que envolvem a foliculogênese. Os resultados deste trabalho demonstram que o estudo das proteínas presentes no FF torna-se mais conclusivo ao analisarmos as interações entre elas e, também, suas possíveis relações com o processo de desenvolvimento folicular.

Os principais achados deste experimento foram encontrados a partir da fase de dominância folicular, reforçando a hipótese da necessidade de eventos específicos para que o folículo tenha a capacidade de continuar seu desenvolvimento no momento em que, normalmente, se tornaria atrésico. Além disso, foram identificadas pela primeira vez no FF equino a gelsolina e a POMZP3. A primeira trata-se de uma proteína intimamente relacionada com o processo inflamatório que precede a ovulação e, a segunda, de acordo com nossos resultados, poderia ser considerada como um marcador de folículos dominantes.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É notável a importância do estudo das proteínas do FF no que diz respeito à elucidação dos fatores envolvendo a foliculogênese da égua. Muitas destas proteínas demonstram ser fundamentais para eventos importantes, tais como maturação do oócito e ovulação, e, por esta razão, podem servir como relevantes biomarcadores das funções reprodutivas, contribuindo para o maior sucesso de técnicas como a fertilização *in vitro*. A POMZP3 é um exemplo disso e, segundo nossos achados, poderia ser considerada como um marcador para folículos dominantes. Este foi o primeiro relato desta proteína no FF equino. Além disso, a gelsolina também foi identificada pela primeira vez no FF equino e está intimamente relacionada com o processo inflamatório que envolve a ovuação.

Entretanto, o estudo do papel individual de proteínas e outras moléculas não tem contribuído efetivamente com a melhor compreensão dos processos que envolvem o desenvolvimento folicular. Por este motivo, esse trabalho buscou correlacionar as possíveis funções das proteínas que demonstraram ser importantes durante qualquer uma das fases da foliculogênese. Neste contexto, foi possível concluir que muitas destas proteínas estão fortemente relacionadas entre si e que o pleno cumprimento de suas funções depende de uma ampla e dinâmica gama de fatores. Desta forma, é de suma importância que estudos envolvendo a proteômica do FF da égua sejam permanentemente realizados e, assim, permitam que o conjunto destas informações possam indicar novos rumos para a ciência reprodutiva.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in mares. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 2, p. 502-7, 2004.

ADAMS, G. P.; KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 445-54, 1987.

ADASHI, E. Y.; ROHAN, R. M. Intraovarian regulation: peptidergic signaling systems. **Trends in Endocrinology & Metabolism,** v. 3, n. 7, p. 243-8, 1992.

AKERLÖF, E.; JÖRNVALL, H.; SLOTTE, H.; POUSETTE, A. Identification of apolipoprotein A1 and immunoglobulin as components of a serum complex that mediates activation of human sperm motility. **Biochemistry**, v. 30, n. 37, p. 8986-90, 1991.

ALDRED, A. R.; DICKSON, P. W.; MARLEY, P. D.; SCHREIBER, G. Distribution of transferrin synthesis in brain and other tissues in the rat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 11, p. 5293-5297, 1987.

ANANTH, L.; PRETE, P. E.; KASHYAP, M. L. Apolipoproteins A-I and B and cholesterol in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. **Metabolism,** v. 42, p. 803-806, 1993.

ANDERSEN, M. M.; KROLL, J.; BYSKOV, A. G.; FABER, M. Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 48, n. 109–118, 1976.

ARSHAD, H. M.; AHMAD, N.; ZIA-UR-RAHMAN, SAMAD, H. A.; AKHTAR, N.; ALI, S. Studies on some biochemical constituents of ovarian follicular fluid and peripheral blood in buffaloes. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 25, n. 4, p. 189-93, 2005.

BAILEY, S.; EVANS, R. W.; GARRATT, R. C.; GORINSKY, B.; HASNAIN, S.; HORSBURGH, C.; JHOTI, H.; LINDLEY, P. F.; MYDIN, A.; SARRA, R.; WATSON, J. L. Molecular Structure of Serum Transferrin at 3.3-A resolution. **Biochemistry**, v. 27, n. 15, p. 5804-58, 1988.

BAKER, C. B.; KENNEY, R. M. Systemathic approach to the diagnosis of the intertile and subfertil mare. In: MORROW, D. A. **Current Therapy in Theriogenology**. Phyladelphia: W. B. Saunders Co., 1980. p. 721-736.

BASTOS, H. B. A.; KRETZMANN, N. A.; SANTOS, G. O.; ESMERALDINO, A. T.; FIALA RECHSTEINER, S.; MATTOS, R. C.; NEVES, A. P. Gene expression of matrix metalloproteinases and lh receptors in mare follicular development. DOI: 10.1016/j. **Theriogenology**, 2014.

BAXTER, R. C.; MARTIN, J. L.; BENIAC, V. A. High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. Purification and properties of the acid-labile subunit from human serum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 20, p. 11843-8. 1989.

BAYASULA, IWASE, A.; KOBAYASHI, H.; GOTO, M.; NAKAHARA, T.; NAKAMURA, T.; KONDO, M.; NAGATOMO, Y.; KOTANI, T.; KIKKAWA, F. A proteomic analysis of human follicular fluid: comparison between fertilized oocytes and non-fertilized oocytes in the same patient. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 9, p. 1231-8, 2013.

BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 39, n. 4, p. 781-796, 1993.

BERGFELT, D. R. Anatomy and Phisiology of the Mare. In: SAMPER, J. C. 4. ed. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. St. Louis: Missouri: Sanunders Elsevier. 2009. cap. 11, p. 113 – 131.

BIANCHI, L.; GAGLIARDI, A.; CAMPANELLA, G.; LANDI, C.; CAPALDO, A.; CARLEO, A.; ARMINI, A.; DE LEO, V.; PIOMBONI, P.; FOCARELLI, R.; BINI, L. A methodological and functional proteomic approach of human follicular fluid en route for oocyte quality evaluation. **Journal of Proteomics**, v. 2, n. 90, p. 61-76, 2013.

BIJTTEBIER, J.; VAN SOOM, A.; MEYER, E.; MATEUSEN, B.; MAES, D. Preovulatory follicular fluid during in vitro maturation decreases polyspermic fertilization of cumulus-intact porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 70, p. 715–724, 2008.

BIJTTEBIER, J.; TILLEMAN, K.; DHAENENS, M.; DEFORCE, D.; VAN SOOM, A.; MAES, D. Comparative proteome analysis of porcine follicular fluid and serum reveals that excessive alpha (2) macroglobulin in serum hampers successful expansion of cumulus-oocyte complexes. **Proteomics**, v. 9, p. 4554-4565, 2009.

BLEIL, J. D.; WASSARMAN, P. M. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. **Developmental Biology**, v. 76, n. 1, p. 185-202, 1980.

BRESNIHAN, B.; GOGARTY, M.; FITZGERALD, O.; DAYER, J. M.; BURGER, D. Apolipoprotein A-I infiltration in rheumatoid arthritis synovial tissue: a control mechanism of cytokine production? **Arthritis Research Therapy**, v. 6, n. 6, p. 563-566, 2004.

BRIGGS, D. A.; SHARP, D. J.; MILLER, D.; GOSDEN, R. G. Transferrin in the developing ovarian follicle: evidence for de-novo expression by granulosa cells. **Molecular Human Reproduction**. v. 5, n. 12, p. 1107-14, 1999.

BUKOVSKY, A.; GUPTA, S. K.; BANSAL, P.; CHAKRAVARTY, S.; CHAUDHARY, M.; SVETLIKOVA, M.; WHITE, R. S.; COPAS, P.; UPADHYAYA, N. B.; VAN METER, S. E.; CAUDLE, M. R. Production of monoclonal antibodies against recombinant human zona pellucida glycoproteins: utility in immunolocalization of respective zona proteins in ovarian follicles. **Journal of Reproductive Immunology,** v. 78, n. 2, p. 102-14, 2008.

CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R. J.; WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 335-350, 1995.

CAVENDER, J. L.; MURDOCH, W. J. Morphological studies of the circulatory system of preovulatory ovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 989-997, 1998.

CELIS, J. E.; GROMOV, P. 2D protein electrophoresis: can it be perfected? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 16-21, 1999.

CHEN, L.; ZHANG, H.; POWERS, R. W.; RUSSELL, P. T.; LARSEN, W. J. Covalent linkage between proteins of the inter-alpha-inhibitor family and hyaluronic acid is mediated by a factorproduced by granulosa cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19409-19414, 1996.

CHURG, A.; DAI, J.; ZAY, K.; KARSAN, A.; HENDRICKS, R.; YEE, C.; MARTIN, R.; MACKENZIE, R.; XIE, C.; ZHANG, L.; SHAPIRO, S.; WRIGHT, J. L. Alpha-1-Antitrypsin and a broad spectrum metalloprotease inhibitor, RS113456, have similar acute anti-inflammatory effects. **Laboratory Investigation**, v. 81, n. 8, p. 1119-1131, 2001.

CHURG, A.; WANG, X.; WANG, R. D.; MEIXNER, S. C.; PRYZDIAL, E. L.; WRIGHT, J. L. Alpha1-antitrypsin suppresses TNF-alpha and MMP-12 production by cigarette smoke-stimulated macrophages. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 144-151, 2007.

CLARKE, H. G.; HOPE, S. A.; BYERS, S.; RODGERS, R. J. Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. **Reproduction**, v. 132, p. 119–31, 2006.

DE AGOSTINI, A. An unexpected role for anticoagulant heparan sulfate proteoglycans in reproduction. **Swiss Medical Weekly**, v. 136, n. 37–38, p. 583–90, 2006.

DE JONG, G.; VAN DIJK, J. P.; VAN EIJK, H. G. The biology of transferrin. **Clinica Chimica Acta**, v. 190, n. 1-2, p. 1-46, 1990.

DENG, G. M.; ZHENG, L.; CHAN, F. K.; LENARDO, M. A melioration of inflammatory arthritis by targeting the pre-ligand assembly domain of tumor necrosis factor receptors. **Nature Medicine,** v. 11, n. 10, p. 1066-72, 2005.

DOS REMEDIOS, C. G.; CHHABRA, D.; KEKIC, M.; DEDOVA, I. V.; TSUBAKIHARA, M.; BERRY, D. A.; NOSWORTHY, N. J. Actin binding proteins:

regulation of cytoskeletal microfilaments. **Physiological Reviews,** v. 83, n. 2, p. 433-73, 2003.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in farm animals. Implication for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

DUCOLOMB, Y.; GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, H.; FIERRO, R.;, JIMÉNEZ, I.; CASAS, E.; FLORES, D.; BONILLA, E.; SALAZAR, Z.; BETANCOURT. M. Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 79, n. 6, p. 896-904, 2013.

EISENBACH, M. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. **Developmental Genetics,** v. 25, p. 87–94, 1999.

ENTMAN, S. S.; MAXSON, W. S.; BRADLEY, C. A.; OSTEEN, K.; WEBSTER, B. W.; VAUGHN, W. K.; WENTZ, A. C. Follicular fluid transferrin levels in preovulatory human follicles. **Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer,** n. 4, v. 2, p. 98-102, 1987.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829-38, 2001.

EPPIG, J. J.; SCHROEDER, A. C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. **Biology of Reproduction,** v. 41, n. 2, p. 268-76, 1989.

FAHIMINIYA, S.; GÉRARD, N. Follicular fluid in mammals. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité,** v. 38, n. 6, p. 402-4, 2010.

FAHIMINIYA, S.; REYNAUD, K.; LABAS, V.; BATARD, S.; CHASTANT-MAILLARD, S.; GÉRARD, N. Steroid hormones content and proteomic analysis of canine follicular fluid during the preovulatory period. **Reproductive Biology and Endocrinology,** v. 8, n. 132, 2010.

FAHIMINIYA, S.; LABAS, V.; ROCHE, S.; DACHEUX, J. L.; GÉRARD, N. Proteomic analysis of mare follicular fluid during late follicle development. **Proteome Science,** v. 9, n. 54, 2011.

FARACH-CARSON, M. C.; CARSON, D. D. Perlecan - a multifunctional extracellular proteoglycan scaffold. **Glycobiology**, v. 17, n. 9, p. 897–905, 2007.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225–32, 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. 82-83, p. 109-126, 2004.

FUNAKOSHI, T.; MAESHIMA, K.; YAHATA, K.; SUGANO, S.; IMAMOTO, F.; IMAMOTO, N. Two distinct human POM121 genes: requirement for the formation of nuclear pore complexes. **FEBS Letters,** v. 581, n. 25, p. 4910-6, 2007.

FUNAKOSHI, T.; CLEVER, M.; WATANABE, A.; IMAMOTO, N. Localization of Pom121 to the inner nuclear membrane is required for an early step of interphase nuclear porecomplex assembly. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 7, p. 1058-1069, 2011.

GAMZU, R.; YOGEV, L.; PAZ, G.; YAVETZ, H.; LICHTENBERG, D. Reduction of sperm cholesterol: phospholipid ratio is a possible mechanism for enhancement of human sperm binding to the zona pellucida following incubation with phosphatidylcholine liposomes. **Biology of Reproduction,** v. 57, p. 539 – 546, 1997.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biology of Reproduction,** v. 57, n. 6, p.1320-7, 1997.

GASTAL, E. L.; DONADEU, F. X.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. Echotextural changes in the follicular wall during follicle deviation in mares. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 803-14, 1999.

GASTAL, E. L.; NEVES, A. P.; MATTOS, R. C.; PETRUCCI, B. P.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. Miniature ponies: 1. Follicular, luteal and endometrial dynamics during the oestrous cycle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 3, p. 376-85, 2008.

GASTAL, E. L. **Selection of the dominant follicle in mares: role of follicle-diameter differences, gonadotropins, and estradiol**. 1999. 258 f. Tese (Doctor of Physiology) – University of Wisconsin-Madison.

GERARD, N.; DUCHAMP, G.; GOUDET, G.; BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. A highmolecular-weight preovulatory stage-related protein in equine follicular fluid and granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 551–7, 1998.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R. Associations between FSH concentrations and major and minor follicular waves in pregnant mares. **Theriogenology**, v. 38, n. 5, p. 807-21, 1992.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 99, n. 1, p. 105-11, 1993.

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. 1187-94, 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, n. 2, p.181-6, 1997.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. **Theriogenology**, v. 50, n. 4, p. 507-19, 1998.

GINTHER, O. J.; MEIRA, C.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R. Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 3, p. 862-7, 2002.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BERGFELT, D. R.; BAERWALD, A. R.; PIERSON, R. A. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1195-201, 2004.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 2, p. 315-23, 2005.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; SIDDIQUI, M. A.; BEG, M. A. Relationships of follicle versus oocyte maturity to ultrasound morphology, blood flow, and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mares. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 2, p. 202-8, 2007.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects,** 2 Ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1992, 642 pp.

GINTHER, O. J. Major and Minor follicular waves during the equine estrous cycle. **Journal of Equine Veterinarian Science**, v. 13, p. 18-25, 1993.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Horses. Book 2**. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1995.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Doppler. Book 4**. Cross Plains: WI: Equiservices Publishing; 2007.

GOURLAY, C. W.; AYSCOUGH, K. R. The actin cytoskeleton in ageing and apoptosis. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 12, p. 1193-8, 2005.

HAMDI, S. M.; VIEITEZ, G.; JASPARD, B.; BARBARAS, R.; PERRET, B.; MIEUSSET, R.; PARINAUD, J.; COLLET, X. Effects of human follicular fluid and high-density lipoproteins on early spermatozoa hyperactivation and cholesterol efflux. **The Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 6, p.1363-9, 2010.

HANRIEDER, J.; NYAKAS, A.; NAESSÉN, T.; BERGQUIST, J. Proteomic analysis of human follicular fluid using an alternative bottom-up approach. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 1, p. 443-9, 2008.

HANSEN, P. J. Photoperiodic regulation of reproduction in mammals breeding during long days versus mammal breeding during short days. **Animal Reproduction Science**, v. 9, p. 301-315, 1985.

HINRICHS, K. In vitro production of equine embryos: state of the art. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, 2010.

HINRICHS, K. Assisted reproduction techniques in the horse. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 1, p. 80-93, 2012.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary**. International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. Estrous cycle and ovulation in the mare. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n. 1, v. 11, p. 1367-74, 1972.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G, H.; KENNEDY, P. C. The estrous cycle and selected functional and pathologic ovarian abnormalities in the mare. **The Veterinary Clinics of North America — Large Animal Practice**, v. 2, n. 2, p. 225-39, 1980.

HYKA, N.; DAYER, J. M.; MODOUX, C.; KOHNO, T.; EDWARDS, C. K. 3rd, ROUX-LOMBARD, P.; BURGER, D. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. **Blood**, v. 15, n. 8, p. 2381-9, 2001.

JACOB, J. C.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; CARVALHO, G. R.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Temporal relationships and repeatability of follicle diameters and hormone concentrations within individuals in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 1, p. 92-9, 2009.

JAFFE, R.; ABRAMOWICZ, J.; BEN-ADERET, N. Correlation between the endocrine profile of ovulation and the ultrasonically detected 'double contour' of the preovulatory follicle. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 24, n. 2, p. 119-24, 1987.

JANCIAUSKIENE, S. M.; BALS, R.; KOCZULLA, R.; VOGELMEIER, C.; KÖHNLEIN, T.; WELTE, T. The discovery of α1-antitrypsin and its role in health and disease. **Respiratory Medicine**, v. 105, n. 8, p. 1129-39, 2011.

JARKOVSKA, K.; MARTINKOVA, J.; LISKOVA, L.; HALADA, P.; MOOS, J.; REZABEK, K.; GADHER, S. J.; KOVAROVA, H. Proteome mining of human follicular fluid reveals a crucial role of complement cascade and key biological pathways in women undergoing in vitro fertilization. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 3, p. 1289-301, 2010.

JELTSCH, J. M.; CHAMBON, P. The complete nucleotide sequence of the chicken ovotransferrin mRNA. **European Journal of Biochemistry**, v. 122, n. 2, p. 291-5. 1982.

KANOH, Y.; OHARA, T.; KANOH, M.; AKAHOSHI, T. Serum matrix metalloproteinase-2 levels indicate blood-CSF barrier damage in patients with infectious meningitis. **Inflammation**, v. 31, n. 2, p. 99-104, 2008.

KARZAI, A. W.; WRIGHT, W. W. Regulation of the synthesis and secretion of transferrin and cyclic protein-2/cathepsin L by mature rat Sertoli cells in culture. **Biology of Reproduction**, v. 47, n. 5, p. 823-31, 1992.

KIM, Y. S.; KIM, M. S.; LEE, S. H.; CHOI, B. C.; LIM, J. M.; CHA, K. Y.; BAEK, K. H. Proteomic analysis of recurrent spontaneous abortion: Identification of an inadequately expressed set of proteins in human follicular fluid. **Proteomics**, v. 6, n. 11, p. 3445-54, 2006.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 191-206, 2006.

KIPERSZTOK, S.; OSAWA, G. A.; LIANG, L. F.; MODI, W. S.; DEAN, J. POM-ZP3, a bipartite transcript derived from human ZP3 and a POM121 homologue. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 354-9, 1995.

KOBAYASHI, M.; LEE, E. S.; FUKUI, Y. Cysteamine or b-mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v. 1, n. 6, p. 1191-9, 2006.

KOHCHI, C.; INAGAWA, H.; NISHIZAWA, T.; SOMA, G. ROS and innate immunity. **Anticancer Research**, v. 29, n. 3, p. 817-21, 2009.

KULIN, S.; BASTIAANS, B. A.; HOLLANDERS, H. M.; JANSSEN, H. J.; GOVERDE, H. J. Human serum and follicular fluid stimulate hyperactivation of human spermatozoa after preincubation. **Fertility and Sterility**, v. 62, n. 6, p. 1234-7, 1994.

KWIATKOWSKI, D. J.; MEHL, R.; IZUMO, S.; NADAL-GINARD, B.; YIN, H. L. Muscle is the major source of plasma gelsolin. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 15, n. 17, p. 8239-43, 1988.

LEE, H. C.; LEE, S. W.; LEE, K. W.; LEE, S. W.; CHA, K. Y.; KIM, K. H.; LEE, S. Identification of new proteins in follicular fluid from mature human follicles by direct sample rehydration method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Korean Medical Science**, v. 20, n. 3, p. 456-60, 2005.

LEE, W. M.; GALBRAITH, R. M. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. **The New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 20, p. 1335-41, 1992.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. O estudo do complexo do Agronegócio Cavalo. **Relatório Final**. Piracicaba: CEPEA, ESALQ, USP, Piracicaba, 2006.

LIU A. X.; ZHU Y. M.; LUO, Q.; WU, Y. T.; GAO, H. J.; ZHU X. M.; XU, C, M, ; HUANG, H. F. Specific peptide patterns of follicular fluids at different growth stages analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1770, p. 29-38, 2007.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, J. W.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAIRUAE, N.; CONNOR, J. R.; CHEEPSUNTHORN, P. Increased cellular iron levels affect matrix metalloproteinase expression and phagocytosis in activated microglia. **Neuroscience Letters**, v. 500, p. 36-40, 2011.

MALSCHITZKY, E.; SCHILELA, A.; MEIRELLES, L. S.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Artificial photoperiod in pregnant mares and its effect on pregnancy length and postpartum reproductive performance. **Pferdeheilkunde**, v. 17, p. 565-569, 2001.

MAZURIER, J.; METZ-BOUTIGUE, M. H.; JOLLÈS, J.; SPIK, G.; MONTREUIL, J.; JOLLÈS, P. Human lactotransferrin: molecular, functional and evolutionary comparisons with human serum transferrin and hen ovotransferrin. **Experientia**, v.15, p.135-41, 1983.

MOOS, J.; FILOVA, V.; PAVELKOVA, J.; MOOSOVA, M.; PEKNICOVA, J.; REZABEK, K. Follicular fluid and serum levels of inhibin A and pregnancy-associated plasma protein A in patients undergoing IVF. **Fertility and Sterility**. v. 91, p.1739-1744, 2009.

MORTARINO, M.; VIGO, D.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bovine ovarian fluid proteins. **Electrophoresis**, v. 20, p. 866-869, 1999.

MURDOCH, W. J.; MCDONNEL, A. C. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. **Reproduction**, v. 123, p. 743-750, 2002.

NAG, S.; LARSSON, M.; ROBINSON, R. C.; BURTNICK, L. D. Gelsolin: the tail of a molecular gymnast. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 70, p. 360-384, 2013.

NAVAB, M.; BERLINER, J. A.; SUBBANAGOUNDER, G.; HAMA, S.; LUSIS, A. J.; CASTELLANI, L. W.; REDDY, S.; SHIH, D.; SHI, W.; WATSON, A. D.; VAN LENTEN, B. J.; VORA, D.; FOGELMAN, A. M. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology,** v. 21, p. 481-488, 2001.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4021,1975.

O'FARRELL, P. Z.; GOODMAN, H.M.; O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell,** v. 12, p. 1133-41, 1977.

OESTERREICHER, S.; BLUM, W. F.; SCHMIDT, B.; BRAULKE, T.; KÜBLER, B. Interaction of insulin-like growth factor II (IGF-II) with multiple plasma proteins: high affinity binding of plasminogen to IGF-II and IGF-binding protein-3. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 280, p. 9994-10000, 2005.

ORSI, N. M.; GOPICHANDRAN, N.; LEESE, H. J.; PICTON, H. M.; HARRIS, S. E. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. **Reproduction**, v. 129, p. 219-228, 2005.

OSBORNE, V. E. An analysis of the pattern of ovulation as it occurs in the annual reproductive cycle of the mare in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 42, p. 149-154, 1966.

OTSUKI, J.; NAGAI, Y.; MATSUYAMA, Y.; TERADA, T.; ERA, S. The influence of the redox state of follicular fluid albumin on the viability of aspirated human oocytes. **Systems Biology Reproductive Medicine**, v. 58, p. 149-153, 2012.

PANDEY, M. K.; SUNG, B.; AHN, K. S.; KUNNUMAKKARA, A. B.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Gambogic acid, a novel ligand for transferrin receptor, potentiates TNF-induced apoptosis through modulation of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. **Blood**, v. 110, p. 3517-3525, 2007.

PARK, Y. B.; LEE, S. K.; LEE, W. K.; SUH, C. H.; LEE, C. W.; LEE, C. H.; SONG, C. H.; LEE, J. Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 26, p. 1701-1705, 1999.

PARK. S. M.; HWANG, I. K.; KIM, S. Y.; LEE, S. J.; PARK, K. S.; LEE, S. T. Characterization of plasma gelsolin as a substrate for matrix metalloproteinases. **Proteomics,** v. 6, p. 1192-1199, 2006.

PARKKINEN, J.; VON BONSDORFF, L.; EBELING, F.; SAHISTED, T. Function and therapeutic development of apotransferrin. **Vox Sanguinis,** v. 83, p. 321-326, 2002.

PAYER, A. F. Permeability of ovarian follicles and capillaries in mice. **American Journal of Anatomy**, v. 142, p. 295-317, 1975.

PETERS, T. JR. Serum albumin. **Advances in Protein Chemistry,** v. 37, p. 161-245, 1985.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic evaluation of the preovulatory follicle in the mare. **Theriogenology,** v. 24, p. 359-368, 1985.

PIMENTA, D. C.; LEBRUN, I. Cryptides: buried secrets in proteins. **Peptides**, v. 28, p. 2403-2410, 2007.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, p. 981-990, 2012.

REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 182-192, 1996.

REVELLI, A.; DELLE PIANE, L.; CASANO, S.; MOLINARI, E.; MASSOBRIO, M.; RINAUDO, P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. **Reproduction Biology Endocrinology**, v. 7, 2009

RICHARDS, R. G.; GADSBY, J. E.; ALMOND, G. W. Differential effects of LH and PGE2 on progesterone secretion by small and large porcine luteal cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 27-34, 1994.

RICHARDS, J. S. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 29, p. 75-79, 2005.

RILEY, S. C.; GIBSON, A. H.; LEASK, R.; MAUCHLINE. D. J.; PEDERSEN, H. G.; WATSON, E. D. Secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases into follicular fluid during follicle development in equine ovaries. **Reproduction**, v. 121, p. 553-560, 2001.

RILEY, S. C.; THOMASSEN, R.; BAE, S. E.; LEASK, R.; PEDERSEN, H. G.; WATSON, E. D. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion by the equine ovary during follicular growth and prior to ovulation. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 329-339, 2004.

RITCHIE, W. G. Sonographic evaluation of normal and induced ovulation. **Radiology**, v. 161, p. 1-10, 1986.

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.

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. 22, p. 41-48, 2001.

RODNIGHT, R.; ZAMANI, R.; TWEEDALE, A. An investigation of experimental conditions for studying phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 24, p. 27-38, 1988.

ROSE, T. M.; PLOWMAN, G. D.; TEPLOW, D. B.; DREYER, W. J.; HELLSTRÖM, K. E.; BROWN, J. P. Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 1261-1265, 1986.

SARMENTO, M. L. B. Uma época para celebrar e registrar na história. In: TEIXEIRA, A. L. **Cavalo crioulo. O símbolo do Rio Grande do Sul.** 2 ed. 2011, Porto Alegre, Brasil, p. 13.

SCHAEFFER, E.; LUCERO, M. A.; JELTSCH, J. M.; PY, M. C.; LEVIN, M. J.; CHAMBON, P.; COHEN, G. N.; ZAKIN, M. M. Complete structure of the human

transferrin gene. Comparison with analogous chicken gene and human pseudogene. **Gene**, v. 56, p. 109-116, 1987.

SCHOEVERS, E. J.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A. Developmental stage of the oocyte during antral follicle growth and cumulus investment determines in vitro embryo development of sow oocytes. **Theriogenology**, v. 67, p. 1108-1122, 2007.

SCHWEIGERT, F. J.; GERICKE, B.; WOLFRAM, W.; KAISERS, U.; DUDENHAUSEN, J. W. Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF. **Human Reproduction**, v. 21, p. 2960-2968, 2006.

SENGER, P. L. Reproductive Ciclicity- The Follicular Phase- In: **Pathways to Pregnancy and Parturition**, 2nd ed. Pullman: Current Conceptions, Inc, 2003. p. 164-187.

SHAMAY, A.; HOMANS, R.; FUERMAN, Y.; LEVIN, I.; BARASH, H.; SILANIKOVE, N.; MABJEESH, S. J. Expression of albumin in nonhepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p 569-576, 2005.

SHARP, D. C. Environmental influences on reproduction in horses. **The Veterinary Clinics of North America - Large Animal Practice**, v. 2, p. 207-223, 1980.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver- stained polyacrilamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M.D. Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. **Journal of Biology Chemistry**, v. 255, p. 9523-9525, 1980.

SRIRAMAN, V.; SINHA, M.; RICHARDS, J. S. Progesterone receptor-induced gene expression in primary mouse granulosa cell cultures. **Biology of Reproduction,** v. 82, p. 402-412, 2010.

SUCHANEK, E.; SIMUNIĆ, V.; KOPJAR, B.; MAĆAS E.; GRIZELJ, V.; SALZER, B.; STAVLJENIĆ, A. Lipid and lipoprotein contents of human follicular fluid. **Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry**, v. 26, p. 543-547, 1988.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction Device**, v. 61, p. 414-424, 2002.

TEUBNER, A.; SOBEK-KLOCKE, I.; HINSSEN, H.; EICHENLAUB-RITTER, U. Distribution of gelsolin in mouse ovary. **Cell and Tissue Research***,* v. 276, p. 535-544, 1994.

TILLY, J. L. Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. **Toxicology Letters**, v. 102, p. 407-501, 1998.

TOUSSAINT, M. J. M.; CAMPBELL, F. M.; PIÑEIRO, M.; GRUYS, E. Measuring negative acute phase proteins to assess acute phase response and starvation. In:

International colloquium on animal acute phase proteins. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 14, 2005.

TRAVIS, J.; SALVESEN, G. S. Human plasma proteinase inhibitors. **The Annual Review of Biochemistry,** v. 52, p. 655-709, 1983.

TU, G. F.; ACHEN, M. G.; ALDRED, A. R.; SOUTHWELL, B. R.; SCHREIBER, G. The distribution of cerebral expression of the transferrin gene is species specific. **Journal of Biology Chemistry**, v. 266, p. 6201-6208, 1991.

VARRICCHIO, F.; STROMBERG, K. An albumin-like protein is the major secretory protein of ovarian epithelial cells in vivo and in vitro. **International Journal of Gynecological Cancer,** v. 4, p. 328-332*,* 1994.

VON OTTE, S.; PALETTA, J. R.; BECKER, S.; KÖNIG, S.; FOBKER, M.; GREB, R. R.; KIESEL, L.; ASSMANN, G.; DIEDRICH, K.; NOFER, J. R. Follicular fluid high density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate is a novel mediator of ovarian angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry,** v. 281, p. 5398-5405, 2006.

VON WALD, T.; MONISOVA, Y.; HACKER, M. R.; YOO, S. W.; PENZIAS, A. S.; REINDOLLAR, R. R.; USHEVA, A. Age-related variations in follicular apolipoproteins may influence human oocyte maturation and fertility potential. **Fertility and Sterility**, v. 93, p. 2354-2361, 2010.

WANG, H.; CHUMNARNSILPA, S.; LOONCHANTA, A.; LI, Q.; KUAN, Y. M.; ROBINE, S.; LARSSON, M.; MIHALEK, I.; BURTNICK, L. D.; ROBINSON, R. C. Helix straightening as an activation mechanism in the gelsolin superfamily of actin regulatory proteins. **Journal of Biology Chemistry**, v. 284, p. 21265-21269, 2009.

WANG, X.; LI, L.; LI, M.; DANG, X.; WAN, L.; WANG, N.; BI, X.; GU, C.; QIU, S.; NIU, X.; ZHU, X.; WANG, L. Knockdown of mTOR by lentivirus-mediated RNA interference suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques via a decrease of macrophages by autophagy in apolipoprotein E-deficient mice. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 32, p. 1215-1221, 2013.

WASSARMAN, P. M.; JOVINE, L.; LITSCHER, E. S.; QI, H.; WILLIAMS, Z. Egg-sperm interactions at fertilization in mammals. **European Journal of Obstetrics *&* Gynecology *and* Reproductive Biology**, v. 1, p. 57-60*,* 2004.

WATSON, L. N.; MOTTERSHEAD, D. G.; DUNNING, K. R.; ROBKER, R. L.; GILCHRIST, R. B.; RUSSELL, D. L. Heparan sulfate proteoglycans regulate responses to oocyte paracrine signals in ovarian follicle morphogenesis. **Endocrinology**, v. 153, p. 4544-4555, 2012.

WEINZIMER, S. A.; GIBSON, T. B.; COLLETT-SOLBERG, P. F.; KHARE, A.; LIU, B.; COHEN, P. Transferrin is an insulin-like growth factor-binding protein-3 binding protein. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 1806-1813, 2001.

WEISS, G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. **Biochimica et Biophysica Acta***,* v. 1790*,* p. 682-693*,* 2009.

YIN, H. L.; HARTWIG, J. H.; MARUYAMA, K.; STOSSEL, T. P. Ca2+ control of actin filament length. Effects of macrophage gelsolin on actin polymerization. **Journal of Biology Chemistry**, v. 256, p. 9693-9697, 1981.

YOUNG, P. Y. K.; HARLOW C.; THONG, K. J.; HILLIER, S. G. Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression in human ovarian surface epitelial cells by interleukin-1. **Human Reproduction**, v. 17, p. 2300–2306, 2002.

ZAGER, R. A.; JOHNSON, A. C.; HANSON, S. Y. Parenteral iron therapy exacerbates experimental sepsis. **Kidney International**, v. 65, p. 2108-2112, 2004.

ZWAD, O.; KÜBLER, B.; ROTH, W.; SCHARF, J. G.; SAFTIG, P.; PETERS, C.; BRAULKE, T. Decreased intracellular degradation of insulin-like growth factor binding protein-3 in cathepsin L-deficient fibroblasts. **FEBS Letters**, v. 510, p. 211-215, 2002.