

## Perfil proteômico do fluido folicular bovino

José Jackson do Nascimento Costa<sup>1</sup>, Maria Amélia Araújo Soares<sup>2</sup>, Gisvani Lopes de Vasconcelos<sup>3</sup>,  
Antonia Moemia Lúcia Rodrigues Portela<sup>2</sup>, Rodrigo Maranguape Silva da Cunha<sup>3</sup>, José Roberto  
Viana Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doutorando em Biotecnologia – Renorbio, Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*  
[\\*jackson.costa@hotmail.com](mailto:*jackson.costa@hotmail.com)

<sup>2</sup>Mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*

<sup>3</sup>Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS – Universidade Federal do Ceará - *Campus Sobral*

O objetivo deste estudo foi determinar o perfil proteico do fluido folicular em folículos ovarianos antrais bovinos. Para alcançar esses objetivos, os ovários bovinos foram coletados, em seguida, os folículos antrais grandes foram aspirados e fluido folicular foi imediatamente centrifugado, em seguida, transferidas para tubos de polipropileno estéreis e congeladas a  $-80^{\circ}$  C até à análise. O oócito foi isolado e o fluido folicular centrifugado a  $1500 \times g$  por 10 minutos. A amostra foi armazenada a  $-80^{\circ}$  C até à análise. Para as análises, o FF foi precipitado com 2 volumes de acetona gelada e em seguida centrifugado a  $118,00 \times g$  por 15 min. O precipitado foi ressuspenso em uréia/tiouréia 9M. A amostra foi quantificada pelo método de Bradford (1976) e submetida à SDS-PAGE, com o objetivo de observar a integridade da amostra. Em seguida a amostra foi analisada por eletroforese bidimensional (2D). Foi possível identificar algumas proteínas com certa precisão utilizando os valores de pI e massa molecular do *spot* contra um banco de dados de proteínas no *ExPASy* (<http://www.expasy.ch/tools/#proteome>). Os resultados demonstram que foram identificadas 169 proteínas que participam de processos como transporte celular, transcrição e regulação da transcrição, sinalização celular, mecanismos de transdução de sinais, apoptose celular, adesão celular, diferenciação celular, controle do ciclo celular, sistema imune, homeostase, manutenção da estrutura celular, metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas. Em conclusão, este estudo descreve o perfil proteico do fluido folicular de folículos ovarianos antrais em bovinos.

**Palavras-chave:** bovinos, fluido folicular, folículo ovariano, proteômica

### Introdução

O fluido folicular (FF) é composto basicamente por água, eletrólitos, proteínas séricas e uma alta concentração de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa (BARNETT *et al.*, 2006), podendo servir como uma importante fonte de substâncias reguladoras ou moduladoras derivados do sangue ou secreções de células foliculares como gonadotrofinas, fatores de crescimento, enzimas e proteoglicanos (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). O FF acumula-se no

antro de folículos em crescimento, fornecendo um microambiente para que as células somáticas sofram um processo de proliferação e diferenciação, e o oócito amadureça. Estudos indicam que as proteínas do fluido folicular são provenientes de duas fontes: do sangue e das camadas de células somáticas circundantes (células da granulosa e da teca). Já foi demonstrado que a "barreira sangue/folículo" é permeável para proteínas abaixo de 500 kDa, além disso, proteínas e outros componentes são capazes de atravessar facilmente a lâmina basal indo formar o antro ou do antro fluem para os capilares sanguíneos (GOSDEN *et al.*, 1988). Durante o desenvolvimento do folículo, a produção de fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e da permeabilidade dos vasos sanguíneos, os quais estão fortemente relacionados com o aumento do tamanho folicular (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Com o aumento do grau de vascularização do folículo, na camada tecal e no início da formação antral, ocorre um acúmulo de líquido folicular. Moléculas com peso molecular inferior a 100kDa atravessam a membrana basal aumentando a pressão osmótica no interior do folículo, estimulando a entrada de água, iniciando a formação do fluido (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010). Além disso, os proteoglicanos também estão diretamente relacionados com a formação do fluido folicular, pois são moléculas que auxiliam no aumento do potencial osmótico, por serem fortemente hidrofílicos, carregados negativamente e exercerem forte atividade osmótica. As células da granulosa também estão relacionadas com a formação do fluido folicular, por secretarem moléculas de grande peso molecular, que não tem a capacidade de atravessar a membrana basal, permanecendo no interior do folículo, gerando um aumento da pressão osmótica (CLARK *et al.*, 2006). Ainda as células de ovário são capazes de produzir e secretar diversos fatores, tais como esteróides e fatores de crescimento no fluido folicular (FORTUNE; RIVERA; YANG 2004). A presença de todos estes fatores está relacionada com a atividade metabólica das células foliculares, sendo ainda que estas substâncias são essenciais para a maturação do oócito e fecundação, proliferação das células da granulosa e diferenciação celular, ovulação e a luteinização (RICHARDS, 1994).

Em algumas espécies, tais como ovinos, suínos, humanos e bovinos, o componente principal do folículo ovulatório é o fluido folicular, (estimada em >95% em bovinos) (RODGERS *et al.*, 2001). No antro, há ainda a presença de moléculas que contribuem para o potencial osmótico na cavidade antral, como os glicosaminoglicanos, tais como o ácido hialurônico, o sulfato de condroitina e o sulfato de dermatano. O DNA das células da granulosa degeneradas por estar associado a moléculas maiores também pode contribuir para a formação do fluido folicular (VAN WEZEL *et al.*, 1999; CLARKE *et al.*, 2006).

A proteômica é o estudo mais apropriado para se entender o produto final dos genes (PANDEY; MANN, 2000), isto é, refere-se à coleção de proteínas derivada da tradução do genoma

de um organismo ou tipo celular (HAYNES; YATES, 2000). Segundo HANRIEDER *et al.* (2008) a investigação sobre as proteínas presentes no fluido folicular podem fornecer informações úteis sobre sua função no processo foliculogênese. Análises proteômicas do fluido folicular já foram realizados em humanos (HANRIEDER *et al.*, 2008) e animais domésticos, como bovinos (5 proteínas identificadas; MORTARINO *et al.*, 1999), suínos (53 proteínas identificadas; BIJTTEBIER *et al.*, 2009) e cães (21 proteínas identificadas; FAHIMINIYA *et al.*, 2010). No entanto, todos os componentes de FF e a função ovariana desempenhada por muitos destes fatores ainda é desconhecida. Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar o perfil protéico do fluido folicular em folículos ovarianos antrais bovinos.

### **Material e Métodos**

Os ovários bovinos (n=20 ovários) foram coletados em abatedouro local. Após a coleta, os ovários foram imediatamente lavados em etanol 70% por cerca de 10 segundos, e depois duas vezes em solução salina à 0,9% e transportados ao laboratório a 4°C por até 1 hora. Então, os ovários foram cuidadosamente divididos ao meio e os folículos foram visualizados sob estereomicroscópio, em seguida, os folículos antrais grandes foram aspirados utilizando agulhas de calibre 26G acoplada a uma seringa. O oócito foi isolado e o fluido folicular (~1 mL) foi imediatamente centrifugado (1500 × g) durante 10 minutos, para que os componentes celulares fossem descartados. As amostras de fluido folicular foram então transferidas para tubos de polipropileno estéreis e congeladas a -80° C até à análise.

Para as análises por SDS-PAGE e eletroforese bidimensional (2D), 250 uL de FF foram precipitados pela adição de 2 volumes de acetona gelada. Em seguida, as proteínas foram coletadas por centrifugação a 118,00 × g por 15 min. O precipitado foi imediatamente ressuspensão em uma solução de 200µL de uréia/tiouréia 9M. As concentrações de proteína para todo o fluido folicular foram determinadas usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e submetidas ao perfil eletroforético (SDS-PAGE) onde foi possível observar a integridade das amostras. Para a segunda dimensão (2-D), 125µg de proteína da amostra foi misturada com tampão de reidratação (uréia7M/tiouréia2M, 1% CHAPS, 1% DTT; 0,5%(v/v), anfólitos (pH de 3-10) e azul de bromofenol) em um volume final de 125µL por amostra. A mistura de proteína foi então reidratada em *strip* de gradiente de pH imobilizado (IPG) de 7cm de comprimento e pH de 3-10 em temperatura ambiente por 16 horas. Posteriormente, foi realizada a Primeira Dimensão ou Focalização Isoelétrica - IEF usando o sistema de focalização *EttanIPGphor* III. A *strip* de IPG foi equilibrada com a solução de equilíbrio I (Uréia 6M, Tris 50mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol, e DDT) por 15 min e em seguida, com a solução de equilíbrio II (Uréia 6M, Tris

50mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol e iodoacetamida) por 15 min. Subsequentemente a *strip* foi transferida para um gel de poliacrilamida a 12%, e a separação na segunda dimensão foi realizada na unidade de eletroforese vertical *Hoefler SE 600 Ruby* por aproximadamente 4:30h. Após a corrida, o gel foi submerso na solução corante com *Comassie blue G-250* a 0,1% e deixada *overnight*, sob agitação. O gel foi digitalizado utilizando um *scanner* do modelo *LabScan* da *GE Healthcare*<sup>TM</sup>, através do *ImageScanner III* e estocado em solução de ácido acético a 5%. O ajuste da imagem e a detecção dos spots foram feitas pelo programa *ImageMaster*<sup>TM</sup> também desenvolvida pela *GE Healthcare*. Foi possível identificar algumas proteínas com certa precisão utilizando os valores de pI e massa molecular do spot em um banco de dados de proteínas no *Expasy* (<http://www.expasy.ch/tools/#proteome>).

### Resultados e Discussões

A extração das proteínas foi feita a partir do fluido folicular bovino aspirado de folículos antrais grandes. A concentração de proteínas na amostra foi mensurada pelo Método de Bradford (1976), sendo esta de 8,55 µg/µl. A amostra foi submetida à eletroforese bidimensional em triplicata (R1, R2 e R3) a fim verificar a reprodutibilidade do método. Para as proteínas extraídas foram encontradas 176, 78 e 68 spots nas replicatas 1, 2 e 3, respectivamente. Os géis do fluido folicular bovino das replicatas 2 e 3, apresentaram um coeficiente de correlação linear de 0,966 e 0,962, respectivamente, em comparação com o gel de referência (replicata 1). Os resultados de correlação linear obtidos nesse trabalho são válidos e mostram que a técnica utilizada não impactou negativamente nos resultados obtidos. Pois, de acordo com Vieira (1980) quanto mais próximo de 1 for o valor da correlação linear maior a chance de existir um maior grau de relação entre as variáveis em estudo, indicando nesse caso uma direção positiva do relacionamento. Caso o valor da correção linear for menor que 0,85 o grau de relação entre as variáveis é insatisfatório. O método utilizado para análise de confiabilidade e que atribui um valor limite para que sejam confiáveis tais resultados é chamado de correlação de Pearson. Mapas de referência de géis bidimensionais reprodutíveis de proteínas do fluido folicular bovino foram obtidos. No gel analisado, existe uma maior abundância de proteínas na faixa de pH de 3 a 5 (66%) e de massa entre 40 a 60 KDa (36%). Utilizando no *Expasy* a ferramenta *TagIdent*, foi possível identificar maioria das proteínas do fluido folicular bovino, sendo estas agrupadas em relação a sua função molecular.

A maioria das proteínas identificadas se localizam nos compartimentos intracelulares, incluindo membrana plasmática, citoesqueleto, citoplasma ou núcleo. Um total de 169 proteínas foram encontradas e distribuídas em 13 grupos de funções moleculares. Os dois mais abundantes incluem 11, 83% envolvidas no transporte celular ou na transcrição e regulação da transcrição. O grupo das

proteínas envolvidas na sinalização celular representam 8,87%, e as envolvidas nos mecanismos de transdução de sinais representam cerca de 8,87%, enquanto que as proteínas envolvidas no processo de apoptose celular correspondem a 6,5%. Além disso, as proteínas envolvidas com o metabolismo de lipídios e com o de carboidratos, equivalem a 4,1% e 1,18%, respectivamente, enquanto que as proteínas associadas ao metabolismo de proteínas são 4,14% do total identificado. Também foram identificadas proteínas com funções específicas nos processos de adesão celular (3,55%), diferenciação celular (2,36%) e no controle do ciclo celular (4,14%). O grupo de proteína envolvidas no sistema imune corresponde a 2,3% das proteínas, já aquelas associadas à manutenção da homeostase equivalem a 1,77% e na manutenção da estrutura celular correspondem a 4,14%. Além disso, 13% das proteínas identificadas desempenham outros processos biológicos como, quimiotaxia, biossíntese de neurotransmissores e outros, e 15,9% não foram identificadas.

### **Conclusões**

O estudo dos componentes do fluido folicular pode contribuir para uma compreensão dos mecanismos envolvidos na diferenciação e desenvolvimento folicular, além disso, pode fornecer informações úteis sobre os mecanismos de desenvolvimento folicular e maturação do oócito, que pode levar a melhorias nas condições de cultivo.

### **Referências Bibliográficas**

- BARNETT, K. R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C. R.; TOMIC, D.; FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v.12, p.537-55, 2006.
- BIJTTEBIER, J.; TILLEMANN, 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.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CLARK, A.R.; STOKES, Y. M.; LANE, M. THOMPSON, J. G. Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine *cumulus*-oocyte complexes. **Reproduction**, v. 131, p. 999-1006, 2006.

FAHIMINIYA, S.; REYNAUD, K.; LABAS, V.; BATARD, S.; CHASTANT-MAILLARD, S.; GERARD, N. Steroid hormones content and proteomic analysis of canine follicular fluid during the preovulatory period. *Reprod Biol Endocrinol* 8:132.2010,

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.

GOSDEN, R.G.; HUNTER, R.H.; TELFER, E.; TORRANCE, C.; BROWN, N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, p.813-825, 1988.

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, p. 443–449, 2008.

HAYNES, P.; YATES, J. R. Review article: Proteome profiling – pitfalls and progress. **Yeast**, v.17, p.81-87, 2000.

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.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p.837-846, 2000.

RICHARDS, J.S. Hormonal control of gene expression in the ovary. **Endocrine Reviews**, v.15, p.725-751, 1994.

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.171, p.41–48, 2001.

VAN den HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

VAN WEZEL, I. L. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. **Endocrinology**, v. 140, n. 6, p. 2602-2612, 1999.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 3. ed. Rio de Janeiro: Campus, 1980. p. 196.