

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

**INDUÇÃO DA OVULAÇÃO COM hCG E ACETATO DE DESLORELINA ALTERA O
PERFIL PROTEICO DO LÍQUIDO FOLICULAR DE ÉGUAS**

Autor: Gabriel de Oliveira Santos

PORTO ALEGRE

2013

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

**INDUÇÃO DA OVULAÇÃO COM HCG E ACETATO DE DESLORELINA ALTERA O
PERFIL PROTEICO DO LÍQUIDO FOLICULAR DE ÉGUAS**

Autor: Gabriel de Oliveira Santos

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Animal: equinos da
Faculdade de Medicina Veterinária
da UFRGS como requisito parcial
para obtenção de grau de Mestre

**Orientadora: Adriana Pires Neves
Co-orientadora: Caroline
Antoniuzzi Wolf**

PORTO ALEGRE

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Gabriel de Oliveira
Indução da ovulação com hCG e acetato de
deslorelina altera o perfil proteico do líquido
folicular de éguas. / Gabriel de Oliveira Santos. --
2013.
44 f.

Orientadora: Adriana Pires Neves.
Coorientadora: Caroline Antoniazzi Wolf.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,
Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Eletroforese. 2. 2D-PAGE. 3. proteínas. 4.
aspiração folicular. I. Neves, Adriana Pires, orient.
II. Wolf, Caroline Antoniazzi, coorient. III. Título.

GABRIEL DE OLIVEIRA SANTOS

**INDUÇÃO DA OVULAÇÃO COM HCG E ACETATO DE DESLORELINA ALTERA
O PERFIL PROTEICO DO LÍQUIDO FOLICULAR DE ÉGUAS**

APROVADO POR:

Profa. Dra. Adriana Pires Neves
Orientadora e Presidente da Comissão

Profa. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin
UFSM – Santa Maria RS

Prof. Dr. Fabrício Desconsi Mozzaquatro
UDESC – Lages- SC

Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho
UNIVATES – Lajeado RS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus pais, Luci e Alfredo, que sempre me apoiam incondicionalmente em todas as minhas escolhas, que vibram, mesmo que distantes, por cada passo dado e vitória conquistada e que compreendem (nem sempre tão bem) que esse foi o caminho que decidi traçar em minha vida.

Meu irmão, por ser meu irmão (ele que deveria agradecer, rs*), a minha tia e primo.

Ao Professor Rodrigo Costa Mattos e a Professora Maria Inês Mascarenhas Jobim, por apoiar a minha inserção neste grupo e me receberem de braços abertos. Pelos puxões de orelha e dicas muito preciosas durante a realização do mestrado.

A galera do ReproLab, estagiários e pós-graduandos pela convivência e amizade durante esses anos. Beta, Mica, Stalone, Gaby, Malu, Marcelo, Ana, Jú, Dudu, Vinícius, Vanessa, Gujo, Matheus, BÍbis, Tamarine, GÍgio e Nicolas, Henrique, Murilão (grandes companheiros de turma). Ao Ivan por ter nos acolhido no primeiro momento de chegada ao Lab, por ter me apresentando Porto Alegre e pela sua disposição em sempre ajudar quando solicitado.

A minha coorientadora Caroline Antoniazzi Wolf, por pacientemente me ensinar toda a técnica de eletroforese e pela companhia por muitas vezes até altas horas da noite enquanto rodava o experimento, “tamo junto Joe”.

Ao Professor Julio Cesar Ferraz Jacob, por todo início da minha relação com a pesquisa, por me passar seu conhecimento sobre reprodução equina, por exigir de mim durante os anos de convívio e orientação, ainda por disponibilizar todo o necessário para as coletas das amostras para esse trabalho.

Ao Professor Marco Roberto Bourg de Mello, pela amizade troca de conhecimento e ensinamentos para a vida toda.

Aos estagiários do setor de reprodução animal da UFRRJ, que mesmo quando eu não estava presente davam auxílio e permitiram a continuidade das coletas, Savinho, Marcella, Gabriel Dutra, Renatinho e Calabresa, valeu pela ajuda e amizade moçada.

Ao M.V. M.Sc. Marcus André Ferreira Sá, pela amizade durante esses anos, pelas infindáveis horas de bate papo e devaneios sobre reprodução e pela realização das aspirações mesmo durante o carnaval.

E por último, mas não menos importante à minha Orientadora Professora Adriana Pires Neves e ao Professor Sérgio Ivan dos Santos pela amizade construída ao longo desses anos, por viabilizar a minha vivência e adaptação ao Rio Grande, pelo direcionamento e bate papos sobre pesquisa e por toda a orientação. Sem vocês não seria possível, obrigado!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Proteínas solúveis de fígado fetal de camundongo, após separação por focalização isoeletrica seguida de eletroforese	21
Figura 2	Separação de proteínas de <i>Escherichia coli</i>	22
Figura 3	Mapa 2-DE de proteínas muito básicas de <i>Lactococcus lactis</i>	23
Figura 4	Organograma com as etapas realizadas na IPG-Dalt	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores das médias, erro padrão e valor de P da concentração do líquido folicular, diâmetro folicular e intervalo de tempo	35
Tabela 2	Análise computacional da frequência no número de <i>spots</i> e similaridade entre amostras	36

LISTA DE ABREVIÇÕES

°C – Grau Celsius

2D – Bidimensional

2-DE – Eletroforese bidimensional

2D-PAGE – Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

A – Ampère

CHAPS - S (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilammônio]-propano- sulfonato)

cm – Centímetro

DTT – Ditioneitol

eCG – Gonadotrofina coriônica equina

EGF – Fator de crescimento epidermal

FIV – Fertilização in vitro

G – Gauges

GnRH – Hormônio liberado de gonadotrofina

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística

IEF – Focalização isoeletrica

IETS – Sociedade internacional de transferência de embriões

IGF – Fator de crescimento semelhante a insulina

IGFBP – Proteína ligadora de fator de crescimento semelhante a insulina

IM – Intramuscular

IPG – Gradiente de pH imobilizado

IV – Intravenoso

KDa – Quilodaltons

Kg – Quilograma

LH – Hormônio luteinizante

M – Molar

mA – Miliampère

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

Mr – Massa molecular

OPU – Ovum pick up

pH – Potencial hidrogeniônico

pI – Ponto isoelétrico

pK – Potencial de dissociação

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta

TIF – Tagged image file

μ L – Microlitro

V – Volts

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

Vh – Volts hora

W – Watts

WNT – Proteínas da família das *wingless*

RESUMO

O líquido folicular é o microambiente do oócito durante sua maturação *in vivo* que é, em parte constituído por exsudato do soro sanguíneo e por substâncias produzidas localmente, que estão relacionados com a atividade metabólica das células ovarianas. Tais substâncias podem ser essenciais para a proliferação e diferenciação das células somáticas bem como na maturação e posterior fertilização de um oócito competente. A busca por biomarcadores capazes de predizer a saúde de um folículo ou a capacidade do oócito em se tornar um embrião saudável é objeto de estudo na medicina reprodutiva humana e veterinária. Para tanto é essencial o conhecimento a nível molecular dos constituintes do líquido folicular e suas funções. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil proteico do líquido folicular de éguas submetidas à indução de ovulação, com dois diferentes protocolos usuais na prática clínica, utilizando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. Para tanto 19 amostras de líquido folicular de éguas que tiveram sua ovulação induzida por dois diferentes protocolos (1000UI hCG IV, Grupo H, ou 1000UI hCG IV + 1,5mg de acetato de deslorelina IM, Grupo H + G) foram submetidos a eletroforese 2D e posterior análise dos géis no PDQuest. Os valores de proteína total foram significativamente diferente nos Grupo H e Grupo H+G, $63,97 \pm 6,97$ e $73,07 \pm 6,42$, respectivamente. O número máximo de spots em um mesmo gel foi de 157 e o mínimo de 34, com média de 90 spots para o Grupo H e 83 spots para o Grupo H+G. Os 19 géis foram avaliados e a porcentagem máxima de spots relacionados foi de 52% e a mínima de 0%. Com média de 37,8% de similaridade entre spots para o Grupo H e 22% para o Grupo H+G. Estes resultados são de grande importância devido à escassez de trabalhos com proteômica de líquido folicular de éguas induzidas a ovulação e demonstram que a associação entre hCG e acetato de deslorelina aumenta a concentração de proteínas no líquido folicular em folículos pré-ovulatórios (>35 mm).

Palavras-chave: hCG, deslorelina, 2D-PAGE, proteínas total

ABSTRACT

Follicular fluid is the oocyte microenvironment during its in vivo maturation. It is partly composed by blood serum exudate, and also by locally produced substances, related to ovarian cells metabolic activity. These substances may be essential for somatic cells proliferation and differentiation, as well as on the oocyte maturation and fertilization. The search for biomarkers able to predict oocyte ability to grow into a healthy embryo are targets on human and veterinary reproductive medicine. It is essential to know the components of follicular fluid and their functions. The aim of the present study was to evaluate protein profile of the follicular fluid in mares with induced ovulation, in two different protocols, using 2D electrophoresis in polyacrylamide gel. 19 follicular fluid samples from mares in which ovulation induction was performed with two different protocols (1000UI hCG IV or 1000UI hCG IV + 1,5mg deslorelin acetate IM), submitted to 2D electrophoresis, and gel analysis on PDQuest. Total protein values were significantly different in Group H and Group H+G, $63,97 \pm 6,97$ and $73,07 \pm 6,42$, respectively. The highest number of spots on a same gel was 157 and the minimum was 34, with a mean of 90 spots to Group H and 83 spots for Group H+G. All of the 19 gels were evaluated according to MasterGel and the highest percent of related spots was 52% and the lowest, 0%, with mean similarity between spots 37,8% to Group H and 22% to Group H+G. These results are of great importance, due to lack of works on follicular fluid proteomics using fluid from mares with induced ovulation, and demonstrate that the association hCG + deslorelin acetate increase proteins concentration on pre-ovulatory follicles fluid.

Keywords: hCG, deslorelin, 2D-PAGE, total proteins

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Foliculogênese	17
2.2 Aspiração Folicular	19
2.3 Eletroforese	20
2.4 Eletroforese Bidimensional	21
2.5 Líquido Folicular	25
2.6 Proteínas no Líquido Folicular	26
3. ARTIGO	28
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

O complexo do agronegócio cavalo (GUERRA; MEDEIROS, 2007) vem alcançando nos dias de hoje, patamares nunca atingidos pela equideocultura nacional. Muito influenciado pelo fortalecimento da economia brasileira, que se manteve estável e sofreu pouca influência das crises econômicas internacionais vivenciadas na Europa e Estados Unidos da América nos últimos anos, mas também pelo constante aprimoramento do rebanho nacional. Este cenário proporcionou que raças brasileiras e animais de elite com alto desempenho alcançassem reconhecimento internacional.

O Brasil detém o quarto maior rebanho de equinos do mundo, ficando atrás apenas de China, EUA e México. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2011 o rebanho era constituído de 5.508.546 cabeças de equinos. Somando-se os muares e asininos, alcança-se mais de sete milhões de cabeças de equídeos presentes no território nacional. Estes números estão claramente relacionados à produção pecuária, mas outros segmentos como o esporte e o lazer também ocupam fatias importantes deste mercado. Neste contexto do complexo do agronegócio cavalo, deve-se salientar um aspecto sócio econômico de alta relevância, que é a geração de empregos e renda para as famílias envolvidas com estas atividades. Segundo o estudo realizado por Lima et al. publicado em 2006, a equideocultura nacional gera mais de 642 mil empregos diretos e somando os empregos indiretos a equideocultura brasileira ocupa 3,2 milhões de pessoas, atingindo um faturamento anual na ordem de 7,5 bilhões de reais.

Simultaneamente, se faz necessário que técnicas de produção, sanidade, reprodução e nutrição voltadas às diferentes realidades encontradas pelo criador de cavalos em diversas regiões do Brasil, estejam mais atualizadas e disponíveis. Tais técnicas devem ser adequadas à realidade encontrada em cada região, influenciada pelos diversos climas, topografias, disponibilidade de alimento e aspecto cultural regional para que se atinja o máximo sucesso na criação de equídeos. Esta realidade somente será alcançada com o incentivo à pesquisa e desenvolvimento da ciência.

Em relação à aplicação de técnicas de reprodução assistida, o Brasil ocupa lugar de destaque no cenário internacional. Atualmente é o país que mais realiza

transferências de embriões (~16.800 lavados/ano), seguido de Argentina e Estados Unidos (IETS, 2012), evidenciando excelente tecnificação no sistema de criação nacional.

Diversos aspectos da reprodução equina têm sofrido evoluções marcantes nos últimos anos. Avanços no conhecimento da fisiologia, biologia celular e bioquímica da reprodução têm proporcionado grandes progressos na fertilidade nesta espécie (JOBIM et al., 2005). Por muitos anos os aspectos bioquímicos e biofísicos na ovulação de éguas foram áreas negligenciadas pela pesquisa (GINTHER, 1992). A partir da década de 90 houve um crescente interesse nos estudos de sequenciamento genético e hoje já se tem disponível as sequencias de genes de diversas espécies. Esta rápida e crescente disponibilidade de dados genômicos despertou grande interesse, porém, o conhecimento acumulado com os sequenciamentos de genomas, em diferentes organismos, demonstrou a necessidade de se caminhar mais adiante (PANDEY; MANN, 2000).

Estudos que determinassem como todos estes genes trabalham na célula e em que momentos e situações eles se tornam ativos, eram necessários. Neste contexto a genética inversa ganhou força, pois através dela é possível buscar diretamente os produtos gênicos e assim determinar os genes que os codificaram (SILVA, 2008). Para determinar a expressão destes genes, a quantidade expressa e o funcionamento dos seus produtos, foi necessário o desenvolvimento de abordagens que avaliassem o genoma funcional, como a transcriptômica e a proteômica (SILVA, 2008).

O termo proteoma foi introduzido primeiramente em 1995, para descrever todas as proteínas expressas por um genoma, através de um tipo de célula ou tecido em um determinado momento (WILKINS et al., 1996). A proteômica pode ser vista, também, como uma metodologia da biologia molecular, a qual tem como objetivo documentar a distribuição geral, identificar e caracterizar proteínas individuais de interesse e principalmente elucidar as suas funções na célula ou tecido. Para tanto, emprega-se princípios bioquímicos, biofísicos e de bioinformática para separar, quantificar, e identificar as proteínas expressas (DI CIERO; BELLATO, 2006).

A eletroforese bidimensional é hoje a principal técnica de separação de proteínas utilizada antes da aplicação da amostra no espectrômetro de massas. Sua vantagem em relação a outras tecnologias é a capacidade de separar com alta

resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa e a possibilidade de se realizar análise de expressão gênica por meio de comparação dos padrões de perfis proteicos (GALDOS-RIVEROS et al., 2010).

O hCG vem sendo utilizado por muitos anos para acelerar a ovulação, sua eficiência é amplamente demonstrada na indução da ovulação. A administração do hCG em éguas que apresentam um folículo de pelo menos 35mm é capaz de induzir a ovulação em até 48 horas em 80% dos casos (Bergfelt, 2000). Apesar de ser um agente indutor de ovulação rotineiramente utilizado, o hCG apresenta a inconveniência de induzir a formação de anticorpos após injeções sucessivas. Roser et al. (1979) encontraram que a formação de anticorpos se inicia após a segunda à quinta injeções de hCG. Sullivan et al. (1973) observaram refratariedade ao hCG após a terceira aplicação. Em um programa comercial de transferência de oócitos observou-se que algumas éguas falhavam em responder ao hCG impedindo a recuperação de oócitos durante o procedimento. Visando uma maturação folicular e oocitária mais confiável os autores passaram a utilizar a associação de hCG e acetato de deslorelina rotineiramente, no momento da indução (CARNEVALE et al., 2005). Trabalhos que demonstram os mecanismos de ação e alterações moleculares da indução de ovulação, bem como o efeito na maturação folicular e oocitária com a utilização de hCG ou associação com acetato de deslorelina, são escassos.

O objetivo do presente trabalho foi estudar o perfil proteico do líquido folicular de éguas submetidas à indução de ovulação, com dois diferentes protocolos utilizados na prática clínica, utilizando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Foliculogênese

Os folículos são as unidades funcionais do ovário. Cada folículo consiste em 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 série extensa e altamente coordenada dos estágios de desenvolvimento (KNIGHT et al., 2006).

A fisiologia do desenvolvimento folicular no equino demonstra algumas diferenças interessantes em relação às demais espécies domésticas. A exata estimulação hormonal que induz a ovulação na égua não é bem conhecida (HINRICHS, 2010). Os aspectos bioquímicos e biofísicos na ovulação de éguas são áreas negligenciadas pela pesquisa. A enorme quantidade de tecidos e fluidos em folículos pré-ovulatórios são recursos valiosos para estudos deste tipo (GINTHER, 1992).

Ao contrário das outras espécies domésticas, a égua não apresenta um pico de hormônio luteinizante (LH). Apresenta uma elevação gradual na concentração de LH durante o estro, atingindo o pico máximo após a ovulação e diminuindo gradualmente ao longo de vários dias (GINTHER et al., 2005; HINRICHS, 2010).

O processo de crescimento folicular e maturação (foliculogênese) envolve extensiva comunicação entre as células somáticas (teca, granulosa e cumulus) e das células somáticas com o oócito (DA SILVEIRA et al., 2012). O processo de comunicação celular no ovário e folículo é extremamente dinâmico, envolvendo diversas famílias de moléculas sinalizadoras como os fatores de transformações do crescimento Beta ($TGF-\beta$) durante o processo de desenvolvimento folicular (KNIGHT, 2006). A família das *Wingless* (WNT) é de suma importância para uma foliculogênese, esteroidogênese e luteogênese normal (BOYER, 2010). Como também a participação dos membros da família dos fatores de crescimento epidermal (EGF), que exercem papel na retomada da maturação oocitária e resposta ovulatória (ASHKENAZI, 2005). Tais mecanismos são complexos e necessitam estudos mais aprofundados para serem completamente elucidados na espécie equina.

Alguns fatores intrafoliculares já têm seu papel na fisiologia ovariana da égua

melhor esclarecidos, como é o caso do Fator de Crescimento Semelhante a Insulina tipo 1 (IGF-1), que se mostrou primordial em eventos iniciais da dominância folicular (GINTHER et al., 2004; GINTHER et al., 2007). A concentração presente no líquido folicular foi correlacionada com a capacidade de um folículo se tornar dominante ou ser o subordinado. Ainda o aumento de proteínas ligadoras de IGF do tipo 3 (IGFBP-3) no líquido folicular podem determinar a regressão do futuro folículo dominante, sendo substituído pelo segundo maior folículo (DONADEU, 2008). Da mesma maneira, Acosta et al. (2004) sugerem que a redução intrafolicular de níveis de IGF bioativo (IGF-Livre), durante a transição de primavera está relacionada com a deficiência de folículos atingirem competência ovulatória.

Outro fator que vem sendo explorado em relação a seu papel na foliculogênese é o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF). A quantificação da proliferação das células endoteliais mostra que a angiogênese começa no folículo pré-antral, aumenta com o desenvolvimento folicular e torna-se intensa no corpo lúteo inicial. Este fator angiogênico se mostrou necessário para o desenvolvimento folicular em outras espécies (FRASER; WULFF, 2002). Na espécie equina, níveis de VEGF aumentam em futuros folículos dominantes e este aumento parece ser mediado, pelo menos parcialmente, pelo IGF-1. O VEGF parece ser o principal fator envolvido no aumento da vascularização no futuro folículo dominante, durante a divergência, que presumivelmente aumenta a disponibilidade de gonadotrofinas circulantes a este folículo (ACOSTA et al., 2004). Um meio deficiente em LH pode predispor o desenvolvimento de folículos dominantes anovulatórios. Como resultado do retardo no desenvolvimento folicular, ocasionado por menores níveis de certos fatores intrafoliculares como: IGF-1, Inibina-A, VEGF e estradiol.

Cada vez mais é demonstrado a importância da elevação gradual do LH nos mecanismos de maturação folicular e oocitário e ainda ovulação. O progressivo aumento na concentração de LH circulante induz alterações morfofuncionais significativas em diversas células do folículo dominante, sendo as principais: o aumento progressivo na capacidade das células da teca em produzir andrógenos e das células da granulosa em aromatizar androgênio à estradiol (FORTUNE, 1994). Além da retomada da meiose pelo oócito e expansão das células do cumulus (PARK et al., 2004; RICHARDS et al., 2002).

2.2. Aspiração Folicular

A aspiração folicular em éguas vem sendo desenvolvida e utilizada desde a década de 1980 em diversos fins, incluindo pesquisas e aplicações clínicas. Diversas técnicas de aspiração foram utilizadas durante esses anos, como: laparotomia (VOLGESANG, 1986), punção transcutânea pelo flanco (PALMER et al., 1987), colpotomia (HINRICHS et al., 1990) e aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (BRUCK et al., 1992; CARNEVALE; GINTHER, 1995).

Ovum pick up (OPU), como é conhecida a técnica de aspiração folicular, é um método pouco invasivo, seguro e relativamente rápido. Não é necessário uso de anestesia geral e nem de centro cirúrgico. A OPU com a égua em estação foi primeiramente realizada por Palmer et al. (1987), fixando o ovário com a mão via transretal e guiando-o até o flanco para punção transcutânea. A técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom foi inicialmente desenvolvida para recuperação de oócitos em mulheres associada à fertilização *in vitro* (FIV) (DELLENBACH et al. 1984; FEICHTINGER; KEMETER, 1986; LENZ et al., 1987) e posteriormente, no decorrer dos anos 1980 foi adaptada para bovinos (PIETERSE et al., 1988). O primeiro relato de OPU transvaginal em éguas foi o de Bruck et al. (1992). Atualmente, a técnica mais utilizada é a aspiração transvaginal guiada por ultrassom (CARNEVALE et al., 2005).

A OPU transvaginal pode ser aplicada com propósitos clínicos ou experimentais com bastante eficiência (CARNEVALE; MACLELLAN, 2006). Diversos autores já relataram sucesso na aplicação da OPU transvaginal. Trata-se de uma técnica bastante versátil e vem sendo aplicada como uma ferramenta para a pesquisa com o intuito de estudar a fisiologia da dinâmica folicular em equinos e bovinos (GASTAL et al., 1997; GINTHER et al., 2003), administração intrafolicular de fármacos (GASTAL; KOT; GINTHER, 1995), indução da emergência da onda folicular e sincronização da ovulação entre os animais (AMIRIDIS et al., 2006; LIMA et al., 2007) e indução de função lútea (MONTECHIESI, 2009; MOZZAQUATRO et al., 2010). Além disso esta técnica deve ser utilizada na avaliação do líquido folicular (*in vivo*) e sua influência (HINRICHS; RAND; PALMER, 1991), pesquisas de hormônios e fatores de crescimento intrafoliculares (SIDDIQUI et al., 2009) e abordagens proteômicas (FAHIMINIYA et al., 2011). Ainda apresenta sucesso na obtenção de amostras para estudos, com oócitos (CARNEVALE et al., 2005;

SIDDIQUI et al., 2009) e como ferramenta para a coleta e isolamento de células ovarianas e foliculares (DA SILVEIRA et al., 2012).

2.3. Eletroforese

A técnica de eletroforese (do grego: transporte pela eletricidade) baseia-se na migração de íons submetidos à corrente elétrica, de tal forma que moléculas com carga positiva migrem para o polo negativo e moléculas com carga negativa, migrem para o polo positivo (O'FARRELL, 1975).

Durante a eletroforese de proteínas, a taxa de migração ou mobilidade eletroforética é influenciada pela carga proteica no meio eletroforético, assim como pela sua forma, tamanho e associação com outros compostos ionizáveis. Os componentes dos extratos proteicos migram com velocidades individuais em um campo elétrico (COSTA; SOUSA, 1999).

A eletroforese é conduzida, fixando-se como constante um dos seguintes parâmetros: corrente elétrica (A), diferença de potencial elétrico (V) ou potência (W). À medida que as moléculas migram no campo elétrico ocorre um aumento da resistência. Durante a corrida eletroforética, parte da energia proveniente da corrente elétrica é transformada em calor, o que tende a desnaturar as proteínas. Entretanto, o sistema eletroforético é mantido sob baixa temperatura através da utilização de uma coluna de água fria ou mesmo de uma câmara fria. As soluções tampão estabilizam o pH do meio e permitem fluxo da corrente elétrica, devendo ter acentuada condutividade elétrica (O'FARRELL, 1975).

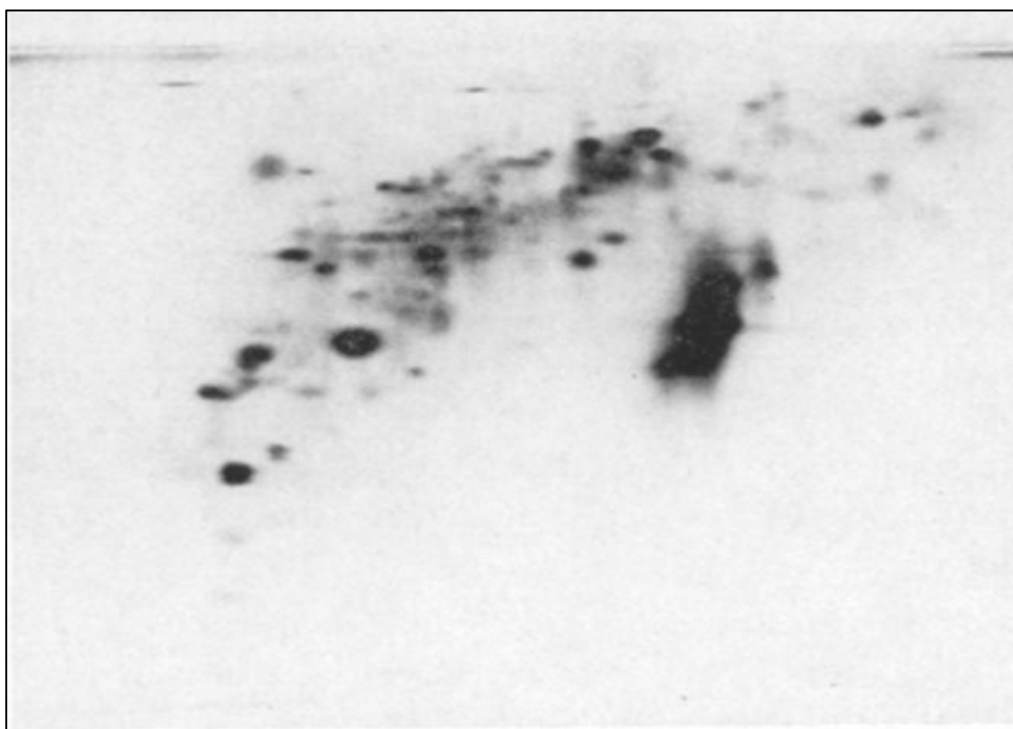
A eletroforese é considerada uma técnica versátil para a análise de proteínas, sendo de fácil aplicação em estudos que abordam a variação genética presente nos organismos. Essa técnica, foi desenvolvida inicialmente por Kunkel e Tiselius (1951), e mais tarde aperfeiçoada com a introdução de uma camada suporte, de amido (SMITHIES, 1955) e de poliacrilamida (ORNSTEIN, 1964). Este princípio é amplamente utilizado para estudos de proteínas nativas e desnaturadas (WEBER; OSBORN, 1975). A técnica do gel de poliacrilamida disponibiliza ao pesquisador um completo domínio sobre as condições de porosidade do gel, possibilitando fazer alterações para a separação das proteínas e, conseqüentemente, obter melhor padrão eletroforético (COSTA; SOUSA, 1999)

2.4. Eletroforese Bidimensional

Na eletroforese bidimensional, a união da focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão com a eletroforese em dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na segunda dimensão separa proteínas de acordo com dois parâmetros independentes. Nesta abordagem separa-se o ponto isoelétrico (pI) na primeira dimensão e a massa molecular (Mr) na segunda. Um alto poder de resolução na separação bidimensional pode ser alcançado, conseguindo-se separar até 5.000 proteínas simultaneamente (rotineiramente ~2.000) e ainda, detectar e quantificar < 1ng de proteína por *spot*. (WEISS; GÖRG, 2009).

Desde o final dos anos 1960 e início da década de 70, diversos grupos de pesquisa concentravam seus esforços em alcançar alto poder de resolução e a reprodutibilidade para separar soluções complexas de proteínas como extratos de plantas (MACKO; STEGEMANN, 1969; MACKO, STEGEMANN, 1970; WRIGLEY, 1970) ou soro humano (DALE; LATNER, 1969). Klose em 1975 propôs que a separação destas soluções complexas, dependente de duas diferentes propriedades, de uma mesma molécula de proteína, carga e peso molecular levaria a uma alta resolução (Figura 1).

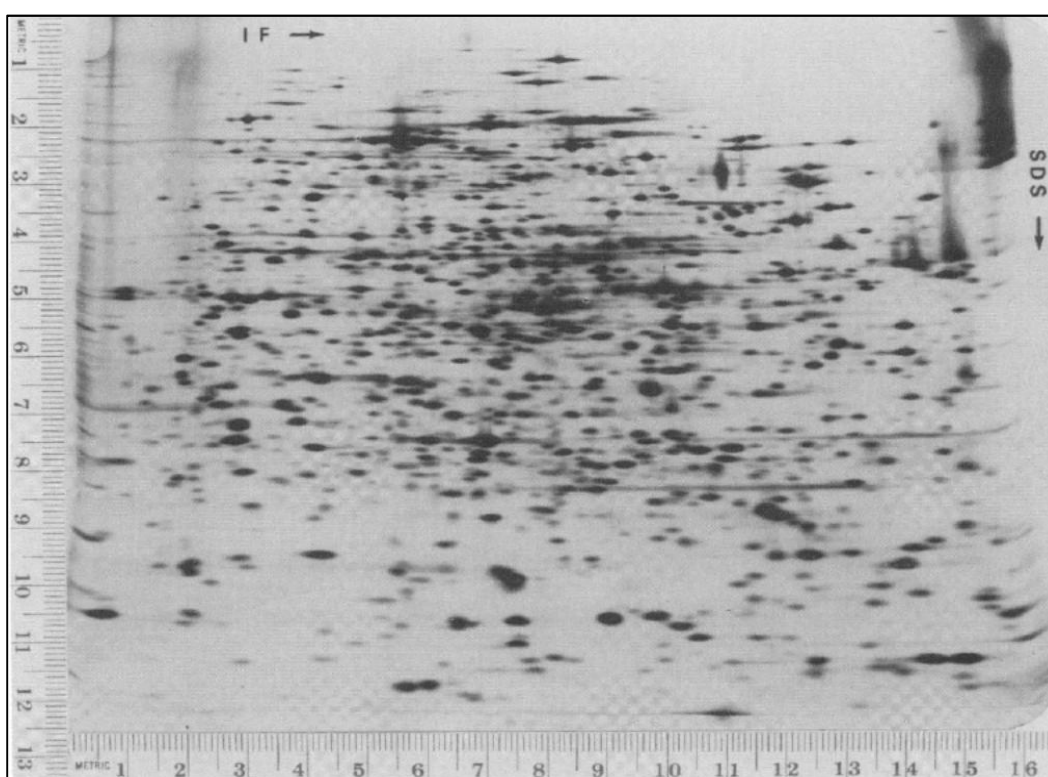
Figura 1 - Proteínas solúveis de fígado fetal de camundongo, após separação por focalização isoelétrica seguida de eletroforese e corado com Amido Black.



Fonte: Klose (1975)

A resolução na 2-DE foi dramaticamente aumentada por O'Farrell (1975), introduzindo agentes caotrópicos e detergentes para a solubilização das proteínas e separação em ambas as dimensões (IEF nativo e PAGE nativo), substituindo definitivamente os antigos mapas 2D, com resolução e número de *spots* limitados (Figura 1). Seus resultados (Figura 2) foram de encontro com os resultados alcançados por outros pesquisadores, que relatavam limitados números de *spots* de proteínas em mapas de 2-DE como: 275 em fígado fetal de rato e 230 *spots* em embriões de ratos (KLOSE, 1975).

Figura 2 - Separação de proteínas de *Escherichia coli*.



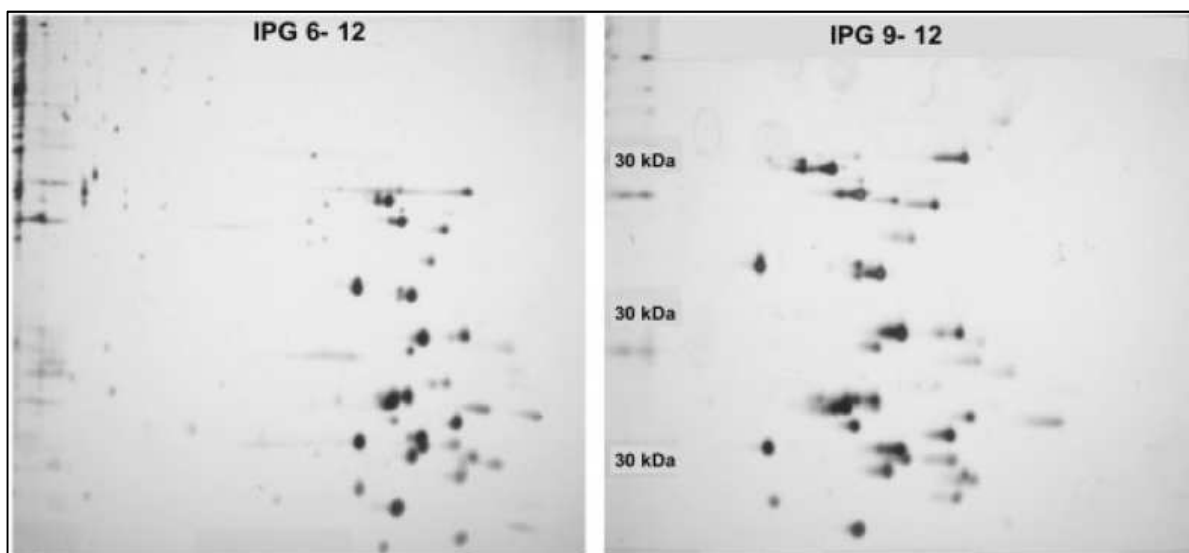
Fonte: O'Farrell (1975)

Apesar de amplamente utilizada no final da década de 70 e década de 80, a técnica de O'Farrell (1975), baseada no gradiente de pH gerado por anfólitos carregadores, na primeira dimensão, sofre com diversas limitações, principalmente no que diz respeito a reprodutibilidade, resolução, separação de proteínas muito ácidas ou muito básicas e capacidade limitada de carregamento das amostras (WEISS; GÖRG, 2009). De modo a superar as limitações do gradiente de pH gerado por anfólitos, a técnica de gradiente de pH imobilizado (IPG) começou a ser

desenvolvida no final da década de 1970. Entretanto, os primeiros resultados de 2-DE, com utilização de IPG, publicado por Bjellqvist et al. (1982), estava muito distante de ser competitiva em relação a alta resolução na 2-DE alcançada pela técnica por O'Farrell com anfólitos carregadores (GÖRG et al., 2009).

O gradiente de pH imobilizado é baseado no uso de reagentes bifuncionais (*Immobiline*[®]), que são uma série de compostos, quimicamente bem definidos, de derivados de acrilamida, com estrutura geral: $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{R}$, onde o R contém uma carboxila ou um grupo amino (BJELLQVIST et al., 1982). Estas modificações nos radicais formam uma série de tampões com valores diferentes de pK, variando de 1 a 13. Ao serem polimerizados na matriz de acrilamida geram um gradiente de pH extremamente estável, permitindo um real estado de equilíbrio durante a focalização isoeétrica (primeira dimensão), aumentando a reprodutibilidade da técnica (WEISS; GÖRG, 2009). A partir da década de 1990 a tecnologia de 2-DE com tiras de IPG (IPG-Dalt) foi amplamente utilizada, protocolos foram definidos e ajustados, superando os resultados atingidos na 2-DE baseada em anfólitos carregadores (GÖRG et al., 2009).

Figura 3 - Mapa 2-DE de proteínas muito básicas de *Lactococcus lactis*, IPG 6-12 e 9-12.



Fonte: Drews e Görg (2005).

Disponível em: <http://www.wzw.tum.de/proteomik/lactis/index.htm>.

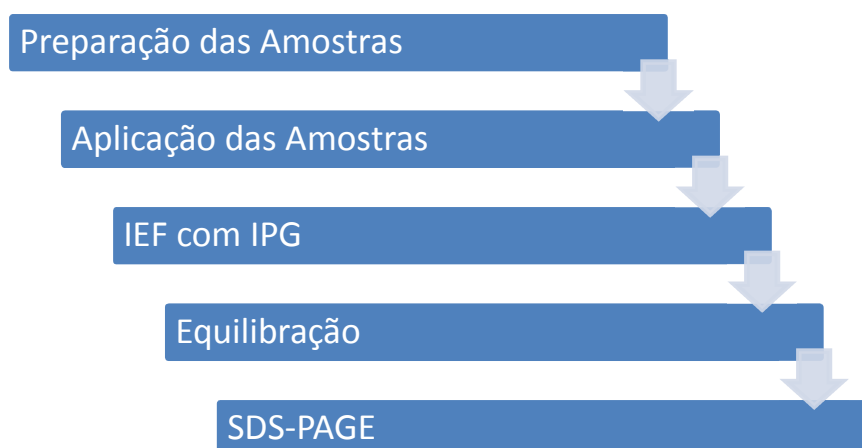
Os benefícios alcançados pela utilização de tiras de IPG na primeira dimensão compreendem: [1] aumento da reprodutibilidade na 2-DE entre

laboratórios (CORBETT et al., 1994; BLOMBERG et al. 1995); [2] aumento da resolução, pela possibilidade de gerar gradientes de pH (ultra) estreitos (e.g. IPG 4.9–5.2 ao longo de 24 cm, $\Delta pI=0.001$), em amostras muito complexas (GÖRG; WEISS; DUNN, 2004); [3] detecção de proteínas de baixa abundância após pré-fractionamentos em Sephadex IEF Gel[®] (GÖRG; LÜCK; WEISS, 2008) ou colunas de imunodepleção (FAHIMINIYA et al., 2012); [4] alta reprodutibilidade na separação de proteínas alcalinas (Figura 3) até pH 12 (DREWS et al., 2002; WILDGRUBER et al., 2004), [5] estado de equilíbrio verdadeiro nas condições de corrida da IEF em substituição a tecnologia de gradiente de pH não equilibrado de O'Farrell.

Conseqüentemente, IEF com IPG é hoje a técnica predominantemente utilizada para a primeira dimensão de 2-DE em análise proteômica. O protocolo IPG-Dalt (condições desnaturantes e redutoras) tornou-se de uso comum e foi estabelecido como o procedimento padrão, que hoje em dia é descrito nos manuais dos fabricantes ou aplicados em publicações científicas sem maiores detalhamentos (GÖRG et al., 2009).

O protocolo original de 2-DE com tiras de IPG, foi descrito por Görg et al. em 1988, atualizado em 1995 e posteriormente em 2000. Estes artigos relatam a experiência de mais de uma década em eletroforese bidimensional deste grupo de pesquisa, evidenciando os parâmetros críticos e as melhorias passo a passo em relação a IEF com IPG em diferentes condições experimentais e com diferentes tipos de amostras (GÖRG et al., 1995; GÖRG et al., 2000). Como resultado de toda essa experiência, um protocolo padrão foi estabelecido e suas etapas são resumidas na Figura 4.

Figura 4 - Principais etapas realizadas na IPG-Dalt.



2.5. Líquido Folicular

Na foliculogênese inicial, as células da granulosa proliferam-se e organizam-se em várias camadas ao redor do oócito, formando assim o folículo secundário. Nos folículos terciários iniciais várias pequenas bolsas se escavam, da espessura das células da granulosa, eventualmente elas se fundem para dar origem a uma única cavidade, o antro. O antro é então ampliado pelo acúmulo de líquido. Para muitas espécies de mamíferos estudadas, o antro é formado quando o folículo atinge 0,2 mm. No entanto, a duração do desenvolvimento de folículos antrais, o tamanho máximo do antro e o volume de líquido folicular variam de acordo com a espécie (MONNIAUX et al., 2009).

A maneira pela qual o líquido se acumula no antro não é precisamente conhecida. A hipótese proposta por Clarke et al. (2006) é de que secreções endógenas, água, eletrólitos e outras moléculas do plasma sanguíneo acumulam-se sob o efeito de um gradiente osmótico. Segundo esses autores proteo- e glicosaminoglicanos, ácido hialurônico, condroitina e sulfato de dermatan e suas moléculas associadas são suficientemente grandes para não saírem deste ambiente, sendo bons candidatos para criar um gradiente osmótico necessário para a formação e para o crescimento do antro.

In vivo, o líquido folicular é isolado da circulação pela barreira hematofolicular, composta pela parede dos capilares sanguíneos, das células da teca e da granulosa e pela membrana basal, que os separa. Esta barreira é permeável e permite a passagem rápida de aminoácidos e de certas proteínas da circulação para o antro. Entretanto a passagem de certos componentes com peso molecular mais elevado (> 100 kDa) é muito mais regulada (CLARK et al., 2006). Entretanto, outros autores afirmam que a barreira hematofolicular permite a livre difusão de proteínas abaixo de 500 kDa (PAYER, 1975; GOSDEN et al., 1988).

Apesar da grande importância do processo de formação do líquido e expansão do antro folicular, ocorre uma grande escassez de literatura disponível sobre estes temas para a espécie equina. O líquido folicular é um fluido extracelular complexo, semiviscoso, de cor amarela, que se acumula no antro dos folículos ovários durante a fase de crescimento. Ele fornece o microambiente necessário para o crescimento e a maturação das células ovarianas somáticas e germinativas e contém substâncias envolvidas na diferenciação celular, qualidade do gameta e

ruptura da parede folicular (FAHIMINIYA; GERARD, 2010).

O conhecimento sobre o perfil proteico, na égua, pode contribuir significativamente ao melhor entendimento da fisiologia ovariana e possibilitar o controle do crescimento e do desenvolvimento folicular (FAHIMINIYA, 2011). A composição do líquido folicular resulta da combinação de secreções das células da teca e da granulosa, e em menor quantidade do oócito, tanto quanto pela transferência de constituintes do plasma sanguíneo pela barreira hematofolicular pelos capilares da teca (FORTUNE, 1994). Em decorrência disto, existem similaridades notáveis entre a composição proteica do líquido folicular e do plasma sanguíneo (JARKOVSKA et al., 2010). Estes mesmos autores descrevem, ainda, que o líquido folicular é uma fonte rica em proteínas úteis como biomarcadores de prognóstico ou diagnósticos de doenças que atingem a fertilidade.

2.6. Proteínas do Líquido Folicular

A aplicação de poderosas tecnologias de proteômica na pesquisa médica reprodutiva pode contribuir significativamente para a compreensão global dos processos reprodutivos. Além disso, pode levar à descoberta e seleção de biomarcadores específicos, com valores diagnósticos e prognósticos, para uma ampla gama de problemas de fertilidade (GADHER, 2009). O conhecimento de que a ação hormonal é mediada por receptoras específicos, presentes nas células foliculares, cujo tipo e número variam com o desenvolvimento folicular, explicou como os folículos podem responder de forma diferente ao mesmo estímulo gonadotrófico (FORTUNE et al., 2004).

Fahiminiya et al. (2011) demonstraram que a maioria (83%) das proteínas presentes no líquido folicular estão localizadas na zona extracelular e que, provavelmente, estas proteínas se originam do sistema circulatório ou sejam secretadas pelas células foliculares. O restante das proteínas são originárias das células (citoplasma, citoesqueleto, núcleo ou membrana), sugerindo que durante o desenvolvimento folicular, células são danificadas e acabam por lançar seus componentes celulares no interior do folículo.

Em estudo sobre proteínas do líquido folicular de éguas, Fahiminiya et al. (2011) classificou as proteínas de acordo com suas funções moleculares em 18 grupos. Os dois grupos com maior quantidade de proteínas (25%), são compostos

por aquelas envolvidas na imunidade e defesa (14%), e em transporte (11%), As proteínas envolvidas no sistema complemento e na coagulação sanguínea, em conjunto, representam 17% das proteínas identificadas. Além disso, proteínas inibidoras de proteases séricas também foram identificadas. Em contraste proteínas envolvidas no metabolismo lipídico-esteroide ou com o sistema reprodutivo, representam apenas seis e dois por cento, respectivamente das proteínas identificadas. Em estudo para determinar a composição do líquido folicular em comparação as proteínas presente no plasma sanguíneo, de mulheres submetidas a *FIV*, foram identificadas. Diversas proteínas que apresentavam níveis relativamente altos no líquido folicular, principalmente proteínas da fase aguda e com funções oxidantes (ANGELUCCI et al., 2006).

De acordo com Jarkovska et al. (2010) é evidente que poucas informações têm sido disponibilizadas sobre o líquido folicular e que nem todos os seus componentes foram identificados até então. Além disso, é bastante claro que suas funções fisiológicas na reprodução e suas relações com algumas causas de infertilidade, permanecem absolutamente desconhecidas.

3. ARTIGO

Indução da ovulação com hcg e acetato de deslorelina altera o perfil proteico do líquido folicular de éguas

Gabriel de Oliveira Santos¹, Marcus Ferreira Sá², Henrique Boll de Araújo Bastos¹
Caroline Antoniazzi Wolf¹, Julio Cesar Ferraz Jacob², Adriana Pires Neves³

¹ REPROLAB – Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Instituto de Zootecnia, UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil.

³ Faculdade de Zootecnia, UNIPAMPA, Dom Pedrito, RS, Brasil; PPG em Medicina Animal: Equinos – UFRGS.

RESUMO

O líquido folicular é o microambiente do oócito durante sua maturação *in vivo* que é, em parte constituído por, um exsudato do soro sanguíneo e também por substâncias produzidas localmente, que estão relacionados com a atividade metabólica das células ovarianas. Tais substâncias podem ser essenciais para a proliferação e diferenciação das células somáticas bem como na maturação e posterior fertilização de um oócito competente. A busca por biomarcadores capazes de predizer a saúde de um folículo ou a capacidade do oócito em se tornar um embrião saudável, são alvos que vêm sendo buscados na medicina reprodutiva humana e veterinária. Para tanto é essencial o conhecimento a nível molecular dos constituintes do líquido folicular e suas funções. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil proteico do líquido folicular de éguas submetidas à indução de ovulação, em dois diferentes protocolos usuais na prática clínica, utilizando eletroforese bidimensional em gel de poliácridamida. Para tanto 19 amostras de líquido folicular de éguas induzidas a ovulação com dois diferentes protocolos (1000UI hCG IV ou 1000UI hCG IV + 1,5mg de acetato de deslorelina IM) foram submetidos a eletroforese 2D e posterior análise dos géis no PDQuest. Foram encontrados valores de proteína total significativamente diferente nos Grupo H e Grupo H+G, $63,97 \pm 6,97$ e $73,07 \pm 6,42$, respectivamente. O número máximo de spots em um mesmo gel foi de 157 e o

mínimo de 34, com média de 90 spots para o Grupo H e 83 spots para o Grupo H+G. Os 19 géis foram avaliados e a porcentagem máxima de *spots* relacionados foi de 52% e a mínima de 0%. Com média de 37,8% de similaridade entre *spots* para o Grupo H e 22% para o Grupo H+G. Estes resultados são de grande importância devido à escassez de trabalhos com proteômica de líquido folicular de éguas induzidas a ovulação e demonstram que a associação entre hCG e acetato de deslorelina aumenta a concentração de proteínas no líquido folicular em folículos pré-ovulatórios.

Palavras-chave: hCG, deslorelina, 2D-PAGE, proteínas total

ABSTRACT

Follicular fluid is the oocyte microenvironment during its in vivo maturation. It is partly composed of blood serum exudate, and by locally produced substances, related to ovarian cells metabolic activity. These substances may be essential to somatic cells proliferation and differentiation, as well as on the oocyte maturation and fertilization. Search for biomarkers able to predict oocyte ability to grow into a healthy embryo are targets on human and veterinary reproductive medicine. It is essential to know the components of follicular fluid and their functions. The aim of the present study was to evaluate protein profile of the follicular fluid in mares with induced ovulation, in two different protocols, using bi-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gel. To it, 19 follicular fluid samples from mares in which ovulation induction was performed with two different protocols (1000UI hCG IV or 1000UI hCG IV + 1,5mg deslorelin acetate IM), submitted to 2D electrophoresis, and gel analysis on PDQuest. Total protein values were significantly different in Group H and Group H+G, $63,97 \pm 6,97$ and $73,07 \pm 6,42$, respectively. The highest number of spots on a same gel was 157 and the minimum was 34, with a mean of 90 spots to Group H and 83 spots for Group H+G. All of the 19 gels were evaluated according to MasterGel and the highest percent of related spots was 52% and the lowest, 0%, with mean similarity between spots 37,8% to Group H and 22% to Group H+G. These results are of great importance, due to lack of works on follicular fluid proteomics using fluid from mares with induced ovulation, and demonstrate that the association hCG + deslorelin acetate increases proteins concentration on pre-ovulatory follicles fluid.

Key-words: hCG, deslorelin, 2D-PAGE, total Protein

INTRODUÇÃO

Estudos a nível molecular são fundamentais para a compreensão da fisiologia reprodutiva da égua, especialmente no sentido de elucidar os mecanismos relacionados a dinâmica ovariana, por exemplo: crescimento e atresia folicular, maturação e qualidade do oócito, o mecanismo de ovulação, formação do corpo lúteo. Tipicamente, na égua, um folículo é selecionado a partir de um grupo de folículos recrutados. Este folículo continua a crescer e se torna um folículo dominante enquanto o restante dos folículos do grupo sofrem atresia (GINTHER et al., 2004).

O líquido folicular é o ambiente do oócito durante sua maturação *in vivo*. Sabe-se que o líquido folicular é em parte um exsudato do soro sanguíneo, devido as células da parede folicular permitirem a livre difusão de proteínas abaixo de 500 kDa (PAYER, 1975). Este líquido também é constituído por substâncias produzidas localmente, que estão relacionadas com a atividade metabólica das células ovarianas. Além disso, vários estudos realizados em diferentes espécies de mamíferos demonstram claramente que o líquido folicular contém substâncias essenciais envolvidas na maturação e fertilização do oócito. O líquido também contém moléculas implicadas na proliferação e diferenciação das células foliculares (GERARD, 2002).

A composição química do líquido dos folículos dominantes é importante por ser um bom indicador da atividade secretória e do metabolismo das células foliculares e, assim, poderia estar relacionada com a qualidade folicular. Pode também fornecer uma indicação útil das exigências das células foliculares, para o crescimento e a maturação do oócito. A composição pode ainda ser utilizada como um guia provisório para formulação de condições ideais de cultura celular (FAHIMINIYA et al., 2011). Estas informações podem ser de particular interesse para o estudo da fisiologia reprodutiva da espécie, pois na égua, os requisitos para a maturação do oócito *in vitro* parecem ser diferentes de outras espécies domésticas. A maturação *in vitro* pode ser facilmente realizada através da colocação de oócitos imaturos em cultura. No entanto, muitas variáveis afetam tanto a velocidade de maturação nuclear e a aquisição da maturação citoplasmática como mostrado pela competência do desenvolvimento do oócito (capacidade de formação de blastocistos, *in vitro*), após a fertilização. Ovócitos com morfologia do cumulus

expandido têm uma taxa significativamente mais elevada (65%) de maturação de metáfase II, no entanto oócitos com cumulus compacto apresentam baixa taxa de maturação (25%) (HINRICHS, 2010).

Atualmente, a avaliação da qualidade do oócito é em grande parte baseado na aparência morfológica do complexo cumulus-oócito, no entanto, a precisão de métodos morfológicos, como preditivo de competência do oócito, ainda está abaixo do ideal.

Em recente trabalho Fahiminiya e colaboradores (2011), apresentaram os primeiros relatos de abordagem proteômica por eletroforese bidimensional do líquido folicular em éguas e traçaram um perfil proteico, com a identificação de diversas proteínas e suas classificações funcionais.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil proteico do líquido folicular de éguas submetidas à indução de ovulação, em dois diferentes protocolos usuais na prática clínica, utilizando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE).

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos Gerais

Animais foram manejados de acordo com as diretrizes internacionais para pesquisa envolvendo animais. Amostras de líquido folicular foram coletados de éguas adultas não lactantes da raça Mangalarga Marchador, de três a 12 anos de idade, e pesando entre 260–470 kg. As amostras foram coletadas durante os meses de janeiro, fevereiro e março, no hemisfério sul. Todas as éguas estavam cíclicas no momento do procedimento de aspiração indicado pela ovulação anterior.

O líquido folicular foi coletado, centrifugado e congelado em nitrogênio líquido. Subsequentemente, as proteínas foram quantificadas por espectrofotometria e submetidas a eletroforese bidimensional (2-DE). Todos os géis foram corados com Azul de Comassie coloidal e suas imagens digitalizadas e analisadas utilizando o Programa PDQuest (versão 7.0; Bio-Rad, São Paulo, Brasil)

Animais

Éguas (n=14) eram mantidas em regime de pastejo e diariamente eram suplementadas com concentrado 1%PV, dispunham de sal mineral e água *ad*

libitum. Eram rufiadas diariamente e quando apresentavam sinais de cio eram submetidas a palpação e exame ultrassonográfico diário.

Quando detectado folículo maior ou igual a 35mm e edema endometrial > 2 (SAMPER et. al. 2007), a égua era submetida a um dos dois protocolos de indução, por sorteio: Grupo H ou Grupo H + G, no ciclo subsequente era submetida ao tratamento diferente do inicial. Os tratamentos eram: Grupo H 1000UI IV hCG (Chorulon[®], MSD, São Paulo, Brasil) e Grupo H+G, 1000UI hCG IV + 1,5mg IM de Acetato de Deslorelina. As amostras para o estudo de proteínas foram selecionadas levando-se em consideração o volume obtido (>5mL) e ausência de traços de sangue, evidenciado por coloração avermelhada do líquido obtido.

Coleta das Amostras

As amostras foram coletadas por aspiração transvaginal guiada por ultrassom (Mindray DP2200, DPS, São Paulo, Brasil) equipado com transdutor microconvexo e guia plástica (WTA, Cravinhos, SP, Brasil). O conteúdo do folículo foi aspirado com uma agulha de duplo lúmen de 12G (Minitub, Tiefenbach, Germany) o procedimento foi realizado conforme preconizado por Carnevale et al. (2005), de 30 a 36 horas após a indução de ovulação.

Para realização do procedimento, as éguas foram sedadas utilizando 0,5mg/kg, IV, de Cloridrato de Xilazina a 10%, 0,01mg/kg, IV, de Cloridrato de Detomidina. Para obtenção de relaxamento retal foi utilizado 0,2mg/kg de Hyoscina N-butyl bromide (Butilescolamina). As éguas receberam duas doses de 1mg/kg, de Flunixin Meglumine, IV, sendo a primeira dose administrada antes do procedimento de aspiração e a segunda 24 horas após, visando ação analgésica e anti-inflamatória. Foi realizada antibioticoterapia com Enrofloxacin 10% (5mg/kg), por 3 dias, a cada 24 horas, IM.

O líquido folicular aspirado foi mantido em banho-maria por um tempo máximo de cinco minutos, após completar o procedimento de aspiração. Foi investigado a presença ou ausência do complexo cumulus oócito ou oócito. Em seguida, o líquido foi centrifugado (1000 x g, 5 min), e o sobrenadante foi dividido em alíquotas de 2mL em criotubos e congelados em nitrogênio líquido.

Análise do Líquido Folicular

Todas as amostras foram novamente centrifugadas (10,000 x g, 60min) a 4 °C

e imediatamente estocadas em freezer -80 °C. Num total de 19 amostras que foram utilizadas para o presente estudo, uma alíquota de cada amostra de líquido folicular puro foi submetida a quantificação de proteínas, pelo método de Bradford. Após as amostras foram submetidas a eletroforese bidimensional. Amostras contendo 200 µg de proteína total foram misturadas com tampão (7 M ureia, 2 M tiourea, 2% anfólitos livres [IPG buffer, pH 3-10 (GE LifeSciences)], 2% DTT, 2% CHAPS e traços de azul de bromofenol) suficientes para fazer 125µL. As amostras foram incubadas em tiras 7cm (IPG Strips pH 3 – 10 linear [GE LifeSciences, Piscataway, NJ, USA]), e deixadas para reidratar por 16 horas.

A focalização isoeétrica foi realizada em um PROTEAN IEF CELL[®] (Bio-Rad, São Paulo, Brasil). O sistema de focalização isoeétrica foi mantido a 18°C de acordo com o protocolo a seguir: 100 Volts (V) (100 Volts hora (Vh)), 500V (250Vh), 1000 V (250Vh), 4000 V (2000 Vh), 4000 V (20000 Vh), totalizando 22650 Vh. Em seguida à focalização, as tiras contendo as proteínas do líquido folicular foram incubadas em tampão de equilíbrio I (6 M urea, 50 mM TRIS-HCl pH 8.8, 29.3% glicerol, 2% SDS, 1% DTT), por 20 minutos e reequilibradas em tampão II (similar ao tampão I com 2,5% iodoacetamida em vez de DTT), por mais 20 minutos. As tiras foram então fixadas com agarose (2% em tampão de corrida SDS-PAGE), no topo dos géis homogêneos de poliacrilamida 12% e a corrida se deu à 250 V em 20 mA por gel.

Os géis foram corados com azul de Comassie coloidal conforme Candiano et al. (2004) modificado por Tilburg et al. (2013). Os géis foram corados em três passos sequenciais: [1] lavados três vezes (20 minutos cada) em uma solução contendo 2% ácido fosfórico e 30% etanol. [2] mais três lavagens em solução a 2% de ácido fosfórico. Por último [3] colocados em uma solução a 2% de ácido fosfórico, 18% de etanol e 15% de sulfato de amônio por 20 minutos e após adicionado 2ml de solução de Comassie G 250 (2%) por 36 horas, sob agitação branda. Reagentes utilizados para eletroforese foram adquiridos da Bio-Rad, GE HealthCare e/ou Sigma Aldrich.

Géis bidimensionais foram digitalizados em 300 dpi (HP 2000), salvo como formato *Tagged Image File* (TIFF). Os arquivos foram analisados usando o software PDQuest[®] (versão 7.0; Bio-Rad), de acordo com as estratégias previamente relatadas (MOURA et al., 2006; SOUZA et al., 2010; SOUZA et al., 2012; MOURA et al., 2012). Todos os mapas de 2-D foram avaliados separadamente e um gel mestre

foi gerado, com base no gel mais representativo. Além disso, os pontos consistentemente presentes nas restantes dos géis foram adicionados ao mestre, de modo que ele pudesse ser combinados para todas as amostras, sendo representativo do conjunto amostral. Proteínas em regiões-chave do gel mestre foram usadas como pontos de referência e partidas finais locais foram organizados pela verificação de cada local, em cada gel, com o respectivo padrão no mestre.

RESULTADOS

As médias das concentrações de proteína total das amostras de líquido folicular do Grupo H e Grupo H+G, bem como o diâmetro médio do maior folículo no momento da indução e o intervalo de tempo entre o momento da indução da ovulação e o momento da realização da aspiração folicular, estão apresentados abaixo, tabela 1.

Tabela 1 - Valores das médias, erro padrão e valor de P da concentração do líquido folicular, diâmetro folicular e intervalo de tempo.

	GrupoH	GrupoH+G	
	Concentração de proteína total (mg/ml; média ± SEM)		
Líquido folicular	63,97 ± 6,97	73,07 ± 6,42	P < 0,01
	Diâmetro no momento da indução (mm; média ± SEM)		
Ø folicular	36,45 ± 1,88	35,56 ± 1,61	P= 0,2940
	Intervalo entre indução e aspiração (horas; média ± SEM)		
Δ de tempo	32,23 ± 1,57	32,93 ± 0,72	P= 0,2589

Foram observadas diferenças significativas (P<0,01) entre o Grupo H e o Grupo H+G, para a concentração de proteína total enquanto para as variáveis diâmetro folicular e intervalo de tempo entre a indução e a aspiração não foram observadas diferenças entre os grupos.

Na análise computacional dos géis, foram encontrados os resultados demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 - Análise computacional da frequência no número de *spots* e similaridade entre amostras.

	GrupoH	GrupoH+G
Número de <i>spots</i> detectados automaticamente		
Máximo	157	115
Mínimo	38	34
Média	91	84
Porcentagem de similaridade com o MasterGel		
Máximo	51,00	52,00
Mínimo	18,00	0,00
Média	37,80	22,00

DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou existir uma diferença significativa em relação a concentração de proteínas total do líquido folicular entre os grupos. Esta alteração na concentração de proteínas se deve à associação entre hCG e acetato de deslorelina, causando um provável aumento na produção de proteínas intrafoliculares ou permitindo um maior influxo de proteínas para o antro, devido ao maior fluxo sanguíneo ao redor do folículo (SIDDIQUI et al., 2009) e a maior permeabilidade folicular (GERARD, 2002). Nossos resultados estão de acordo com o último relato disponível de concentração de proteínas total em líquido folicular de éguas, onde foi encontrado valor médio de $57,74 \pm 1,74$ mg/ml de três amostras coletadas 34 horas após a aplicação de eCG (FAHIMINIYA et al., 2011). Outros fatores que poderiam influenciar na alteração da concentração de proteínas, como: tamanho folicular, intervalo de tempo entre indução e aspirações e peso corporal dos animais foram testados e se mostraram constantes entre os grupos, não influenciando os resultados obtidos.

Este resultado pode explicar, pelo menos em parte, o motivo pelo qual a associação entre hCG e acetato de deslorelina é a abordagem farmacológica mais

utilizada por clínicos que trabalham com aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões. Entretanto, não existe até o presente momento publicações que demonstrem o efeito da associação destes fármacos na maior recuperação e melhor qualidade do oócito, tão pouco na produção de embriões *in vitro*.

Siddiqui et al. (2009), demonstraram que a presença de anticorpos anti-hCG, influenciariam negativamente na qualidade e na maturidade dos oócitos coletados 30 horas após a indução. Estes autores explicam tal acontecimento devido a incompetência das moléculas de hCG em se ligarem aos receptores foliculares, pois os mesmos estariam neutralizados pela ligação ao anticorpo, ocasionando menor fluxo sanguíneo na parede folicular e menor concentração de estrógenos e IGF-1 intrafolicular. Ainda, afirmam que aplicações prévias de hCG devem ser levadas em consideração para o uso de hCG em programas de coletas de oócitos.

CONCLUSÃO

1) A associação entre hCG e deslorelina aumenta a concentração de proteínas totais no líquido folicular em relação ao tratamento somente com hCG.

4) Trabalhos com imunodepleção ou enriquecimento fracionado das amostras são necessários para estudos mais acurados em relação a proteínas de baixa abundância.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T. J.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. **Biol Reprod**, v. 71, n. 2, p. 637-42, Aug 2004.

AMIRIDIS, G. S.; TSILIGIANNI, T.; VAINAS, E. Follicle ablation improves the ovarian response and the number of collected embryos in superovulated cows during the early stages of lactation. **Reprod Domest Anim**, v. 41, n. 5, p. 402-7, Oct 2006.

ANGELUCCI, S. et al. Proteome analysis of human follicular fluid. **Biochim Biophys Acta**, v. 1764, n. 11, p. 1775-85, Nov 2006.

ASHKENAZI, H. et al. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 77-84, Jan 2005.

BERGFELT, D.R. Estrous synchronization. mare. In: **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. Philadelphia: Saunders, p.195-228, 2000.

BJELLQVIST, B. et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. **J Biochem Biophys Methods**, v. 6, n. 4, p. 317-39, Sep 1982.

BLOMBERG, A. et al. Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 16, n. 10, p. 1935-45, Oct 1995a.

_____. Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 16, n. 10, p. 1935-45, Oct 1995b.

BOYER, A.; GOFF, A. K.; BOERBOOM, D. WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 1, p. 25-32, Jan 2010.

BRÜCK, I. et al. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. **Equine Vet J**, v. 24, n. 1, p. 58-9, Jan 1992.

CARNEVALE, E. M. et al. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 519-27, Aug 2005.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, p.331-333, 1993.

CARNEVALE, E. M.; MACLELLAN, L. J. Collection, evaluation, and use of oocytes in equine assisted reproduction. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 22, n. 3, p. 843-56, Dec 2006.

CLARKE, H. G. et al. Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. **Reproduction**, v. 132, n. 1, p. 119-31, Jul 2006.

CORBETT, J. M. et al. Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. **Electrophoresis**, v. 15, n. 8-9, p. 1205-11, 1994 Aug-Sep 1994.

COSTA, M. R.; SOUSA, C. N. D. S. M. **Manual de Eletroforese de Isoenzimas em Gel de Poliacrilamida**. Belém, PA. 1999.

DA SILVEIRA, J. C. et al. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. **Biol Reprod**, v. 86, n. 3, p. 71, Mar 2012.

DALE, G.; LATNER, A. L. Isoelectric focusing of serum proteins in acrylamide gels followed by electrophoresis. **Clin Chim Acta**, v. 24, n. 1, p. 61-8, Apr 1969.

DICIERO, L.; BELLATO, C.M. Proteoma avanços recentes em eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 158, 2006.

DONADEU, F. X.; PEDERSEN, H. G. Follicle development in mares. **Reprod Domest Anim**, v. 43 Suppl 2, p. 224-31, Jul 2008..

DREWS, O. et al. Setting up standards and a reference map for the alkaline proteome of the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis*. **Proteomics**, v. 4, n. 5, p. 1293-304, May 2004.

DUCHAMP, G.; BOUR, B.; COMBARNOUS, Y.; PALMER, E. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. **J Reprod Fertil**. 1987;35 Suppl:221-8.

FAHIMINIYA, S.; GÉRARD, N. [Follicular fluid in mammals]. **Gynecol Obstet Fertil**, v. 38, n. 6, p. 402-4, Jun 2010.

FAHIMINIYA, S. et al. Proteomic analysis of mare follicular fluid during late follicle development. **Proteome Sci**, v. 9, p. 54, 2011.

FEICHTINGER, W.; KEMETER, P. Transvaginal sector scan sonography for needle guided transvaginal follicle aspiration and other applications in gynecologic routine and research. **Fertil Steril**, v. 45, n. 5, p. 722-5, May 1986.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol Reprod**, v. 50, n. 2, p. 225-32, Feb 1994.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 109-26, Jul 2004.

FRASER, H. M.; WULFF, C. Angiogenesis in the primate ovary. **Reprod Fertil Dev**, v. 13, n. 7-8, p. 557-66, 2001.

GADHER, S. J.; JARKOVSKA, K.; KOVAROVA, H. Reproductive therapies and a need for potential biomarkers for prognostic and diagnostic screening of women desperate to conceive. **Expert Rev Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 591-3, Dec 2009.

GALDOS-RIVEROS A.C.; PIZA, A.R.T.; RESENDE, L.C. et al. Proteômica: novas fronteiras na pesquisa clínica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, p. 1, 2010.

GASTAL, E. L. et al. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biol Reprod**, v. 57, n. 6, p. 1320-7, Dec 1997.

GASTAL, E. L.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Ultrasound-guided intrafollicular treatment in mares. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 1027-37, Nov 1995.

GÉRARD, N. et al. Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR). **Reproduction**, v. 124, n. 2, p. 241-8, Aug 2002.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: basics and applied aspects**. Madison: Cross Plains Equiservices, 1992.

_____. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: horses**. Cross Madison: Cross Plains Equiservices Plains, 1995.

GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim Reprod Sci**, v. 78, n. 3-4, p. 239-57, Oct 2003.

_____. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biol Reprod**, v. 73, n. 2, p. 315-23, Aug 2005.

_____. Intrafollicular effect of IGF1 on development of follicle dominance in mares. **Anim Reprod Sci**, v. 105, n. 3-4, p. 417-23, May 2008.

_____. Relationships of follicle versus oocyte maturity to ultrasound morphology, blood flow, and hormone concentrations of the preovulatory follicle in mares. **Biol Reprod**, v. 77, n. 2, p. 202-8, Aug 2007.

_____. Follicle dynamics and selection in mares. **Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 45-63, 2004.

GOSDEN, R. G. et al. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. **J Reprod Fertil**, v. 82, n. 2, p. 813-25, Mar 1988.

GÖRG, A. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. **Electrophoresis**, v. 16, n. 7, p.

1079-86, Jul 1995.

_____. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1037-53, Apr 2000.

_____. 2-DE with IPGs. **Electrophoresis**, v. 30 Suppl 1, p. S122-32, Jun 2009.

GÖRG, A.; LÜCK, C.; WEISS, W. Sample prefractionation in granulated sephadex IEF gels. **Methods Mol Biol**, v. 424, p. 277-86, 2008..

GÖRG, A.; POSTEL, W.; GÜNTHER, S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 9, n. 9, p. 531-46, Sep 1988.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-85, Dec 2004.

GUERRA, P.; MEDEIROS, S. A. F. O agronegócio da equideocultura no Brasil. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE EQUIDEOCULTURA, 1, 2007, Viçosa. **Anais...** P. 188.

HINRICHS, K. The equine oocyte: factors affecting meiotic and developmental competence. **Mol Reprod Dev**, v. 77, n. 8, p. 651-61, Aug 2010.

HINRICHS, K.; KENNEY, D. F.; KENNEY, R. M. Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. **Theriogenology**, v. 34, n. 1, p. 107-12, Jul 1990.

HINRICHS, K.; RAND, W. M.; PALMER, E. Effect of aspiration of the preovulatory follicle on luteinization, corpus luteum function, and peripheral plasma gonadotropin concentrations in the mare. **Biol Reprod**, v. 44, n. 2, p. 292-8, Feb 1991.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. 39. ed. Rio de Janeiro, 2011.

INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY. **The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals**. Disponível em: <www.iets.org>. Acesso em: 21 out. 2013.

JARKOVSKA, K. et al. Proteome mining of human follicular fluid reveals a crucial role of complement cascade and key biological pathways in women undergoing in vitro fertilization. **J Proteome Res**, v. 9, n. 3, p. 1289-301, Mar 2010.

JOBIM, M. I. M. et al. Equine seminal plasma proteins related with fertility. **Anim Reprod Sci**, v. 89, n. 1-4, p. 305-8, Oct 2005.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v. 26, n. 3, p. 231-43, 1975.

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

KUNKEL, H. G.; TISELIUS, A. Electrophoresis of proteins on filter paper. **J Gen Physiol**, v. 35, n. 1, p. 89-118, Sep 1951.

LENZ, S.; LEETON, J.; RENOU, P. Transvaginal recovery of oocytes for in vitro fertilization using vaginal ultrasound. **J In Vitro Fert Embryo Transf**, v. 4, n. 1, p. 51-5, Feb 1987.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C.. **Complexo do Agronegócio Cavalos**. Piracicaba: USP, 2006.

MACKO, V.; STEGEMANN, H. Mapping of potato proteins by combined electrofocusing and electrophoresis identification of varieties. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, v. 350, n. 7, p. 917-9, Jul 1969.

_____. Free electrofocusing in a coil of polyethylene tubing. **Anal Biochem**, v. 37, n. 1, p. 186-90, Sep 1970.

MONNIAUX, D.; CARATY, A.; CLEMENT, F.; DALBIES-TRAN, R.; DUPONT, J.; FABRE, S. et al. Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. **Inra Prod Anim**, v. 22, p. 59-76, 2009.

MONTECHIESI, D. F.. **Efeito da aspiração folicular sobre a concentração de progesterona plasmática em éguas cíclicas**. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

MOURA, A. A. et al. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **J Androl**, v. 27, n. 2, p. 201-11, 2006 Mar-Apr 2006.

_____. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **J Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 2006-20, Sep 2010.

MOZZAQUATRO, F. D. et al. Luteal function induced by transvaginal ultrasonic-guided follicular aspiration in mares. **Anim Reprod Sci**, v. 119, n. 1-2, p. 56-62, May 2010.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**, v. 250, n. 10, p. 4007-21, May 1975.

ORNSTEIN, L. DISC ELECTROPHORESIS. I. BACKGROUND AND THEORY. **Ann N Y Acad Sci**, v. 121, p. 321-49, Dec 1964. ISSN 0077-8923.

PALMER, E.; DUCHAMP, G.; BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; KING, W.; BOUSQUET, D.; BETTERIDGE, K. J. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes mares. **Journal of reproduction and fertility: Abstract Series**, v. 35, p. 689-690, 1987

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 837-46, Jun 2000.

PARK, J. Y. et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 682-4, Jan 2004.

PAYER, A. F. Permeability of ovarian follicles and capillaries in mice. **Am J Anat**, v. 142, n. 3, p. 295-317, Mar 1975.

PIETERSE, M. C. et al. Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 35, n. 2, p. 401-13, Feb 1991.

RICHARDS, J. S. et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Recent Prog Horm Res**, v. 57, p. 195-220, 2002.

ROSER, J. F.; KIEFER, B. L.; EVANS, J. W.; NEELY, D. P.; PACHECO, C. A. The development of antibodies to human chorionic gonadotrophin following its repeated injections in the cyclic mare. **J Reprod Fertil**. 1979;27 Suppl:173-9.

SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. **Current Therapy in Equine Reproduction**. 1. St. Louis: Saunders, Elsevier, 2007.

SIDDIQUI, M. A. et al. Effect of HCG in the presence of HCG antibodies on the follicle, hormone concentrations, and oocyte in mares. **Reprod Domest Anim**, v. 44, n. 3, p. 474-9, Jun 2009.

SILVA, C.L.S.P. Eletroforese bidimensional: princípios e aplicações. **Ciências Agrárias e Saúde**, v. 2, p. 74-78, 2008

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochem J**, v. 61, n. 4, p. 629-41, Dec 1955.

SOUZA, C. E. et al. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **J Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4436-56, Jul 2012a.

_____. Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reprod Domest Anim**, v. 45, p. 644-53, 2010.

SULLIVAN JJ, PARKER WG, LARSON LL. Duration of estrus and ovulation time in non-lactating mares given human chorionic gonadotropin during three successive estrous periods. **J Am Vet Med Assoc**. 1973;162:895-8.

WEBER, K.; OSBORN, M. Proteins and sodium dodecylsulfate, molecular weight determinations on polyacrylamide gels and other procedures. In: NEURATH, H.; HILL, R. (Ed.). **The Proteins**. 3. ed. Academic Press, 1975. p. 179-223.

WEISS, W.; GÖRG, A. High-resolution two-dimensional electrophoresis. **Methods Mol Biol**, v. 564, p. 13-32, 2009.

WILDGRUBER, R. et al. Web-based two-dimensional database of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using immobilized pH gradients from pH 6 to pH 12 and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. **Proteomics**, v. 2, n. 6, p. 727-32, Jun 2002.

WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev**, v. 13, p. 19-50, 1996.

WRIGLEY, C. W. Protein mapping by combined gel electrofocusing and electrophoresis: application to the study of genotypic variations in wheat gliadins. **Biochem Genet**, v. 4, n. 4, p. 509-16, Aug 1970.

VOGELSANG, M.M.; KRAEMER, D.C.; BOEWN, M.J. Recovery of equine follicular oocytes by surgical and non-surgical techniques. **Theriogenology**, v. 25, p. 208, 1986.