PERFIL PROTEICO DO LÍQUIDO FOLICULAR COLETADO DE OVÁRIOS EM DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL DE BOVINOS.

Renato Weller Ribeiro[1], Francislaine Aneliza Garcia Santos[1], Caliê Castilho[2], José Giometti[3], Luciana Machado Guaberto[3], Ana Claudia Ambiel[3], Deyvid Parreira Vieira[1], Cyntia Monteiro dos Santos[1], Ines Cristina Giometti[2]

[1]Discente do Curso de Medicina Veterinária da UNOESTE – Presidente Prudente - SP. [2]Docente do Curso de Medicina Veterinária e Mestrado em Ciência Animal da UNOESTE – Presidente Prudente - SP.. [32]Docente do Curso de Medicina Veterinária da UNOESTE – Presidente Prudente - SP.

RESUMO

O microambiente do gameta feminino é o líquido folicular e, portanto, as proteínas ali presentes devem interferir na qualidade do oócito. Este experimento foi delineado com o objetivo de verificar o perfil proteico do líquido folicular de folículos em diferentes fases do ciclo estral de bovinos. Para tanto, os líquidos foliculares provenientes de ovários de vacas de abatedouro foram alocados em 5 diferentes fases do ciclo estral, levando em conta a presença ou ausência do corpo lúteo (CL) e sua caracterização morfológica. "Pools" de líquido folicular foram coletados de folículos de 2 a 7 mm de ovários em 5 diferentes fases do ciclo estral (1=CL inicial, hemorrágico; 2=CL em desenvolvimento; 3=CL maduro; 4=CL em regressão e 5=ausência de CL). O perfil proteico foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida e determinado em porcentagens nas amostras de cada fase. Os polipeptídeos de 35, 32, 30 e 18 KDa variaram consideravelmente nas amostras. O polipeptídeo de mesmo peso molecular que o IGFBP-2 está mais presente nas amostras de líquido folicular ao final do ciclo estral. Maior número de polipeptídeos foi observado em folículos antrais pequenos de ovários em que o CL está em regressão.

Palavras-chave: eletroforese; IGFBP; polipeptídeos; proteínas; SDS-PAGE.

PROTEIC PROFILE OF FOLLICULAR FLUID FROM OVARIES IN DIFFERENT PHASES OF BOVINE ESTROUS CYCLE.

ABSTRACT

The female gamete's microenvironment is the follicular fluid. The proteins in the follicular fluid must interfere in the oocyte quality. The objective of this study was to verify the protein profile in the follicular fluid of different phases of bovine estrous cycle. The follicular fluid was taken from follicles of bovine ovaries obtained at slaughterhouse. The ovaries were classified into five different phases of estrous cycle, according to presence or absence of corpus luteum (CL) and the morphologic characteristics. Pools of follicular fluid were collected from follicles ranging from 2 to 7mm in diameter from ovaries in five different phases of estrous cycle (1=initial CL, hemorrhagic; 2= developing CL; 3= mature CL; 4=regressing CL and 5=absence CL). The protein profile was evaluated by poliacrilamide eletrophoresis and determined by percentages of samples from each phase. The polypeptides with molecular weigh of 35, 32, 30 and 18 KDa changed considerably in samples from different phases of estrous cycle. The polypeptide with the same molecular weight of IGFBP-2 is more observed in samples from follicular fluid in the end of estrous cycle. The most polypeptides were observed in small follicles from ovaries with regressing CL.

Keywords: eletrophoresis; IGFBP; polipeptides; proteins; SDS-PAGE.

I

INTRODUÇÃO

Os oócitos utilizados na produção *in vitro* de embriões (PIV) (produção *in vitro* de embriões) são oriundos de vacas em diferentes fases do ciclo estral. Como o microambiente do oócito colhido para a PIV é o folículo antral, repleto de líquido folicular e como as células foliculares sintetizam algumas proteínas que são secretadas no líquido folicular, espera-se que este microambiente esteja alterado dependendo da fase do ciclo estral e dos hormônios que estão atuando sobre essas células.

O maior componente do folículo pré-ovulatório em bovinos é o líquido folicular (95%; RODGERS et al., 2001). O líquido folicular é o microambiente do oócito e contém substâncias implicadas na meiose oocitária, na ruptura da parede folicular (ovulação), na diferenciação das células ovarianas, do corpo lúteo funcional e, finalmente, na fecundação (RICHARDS, 1994; TSAFRIRI, 1995; TSAFRIRI; REICH, 1999). Portanto, a composição do líquido folicular reflete os estádios do desenvolvimento do oócito e o grau de maturação folicular (EPPIG et al., 2005; SUGIURA, 2005). Assim, alguns componentes do líquido folicular podem ser utilizados como indicadores da maturação e da qualidade do oócito (MIHM et al., 2000; ANAHORY et al., 2002; MENDOZA et al., 2002).

A composição do líquido folicular é similar à do soro com relação aos componentes de baixo peso molecular e a maioria dos eletrólitos tem as mesmas concentrações do soro (SHALGI, 1972). Entretanto, proteínas plasmáticas acima de 100KDa são encontradas em menor quantidade no líquido folicular que no plasma (SHALGI et al., 1973; ANDERSEN et al., 1976), pois a lâmina basal do folículo deve funcionar como uma barreira para a difusão das proteínas maiores que 100KDa (CLARKE, 2006). Proteínas com massa molecular maior que 500KDa não atravessam essa barreira e, além disso, a carga das proteínas plasmáticas também afeta a sua transferência para o líquido folicular (HESS, 1998).

Em adição às proteínas plasmáticas, o líquido folicular também contem proteínas produzidas por células da granulosa e da teca (NANDEDKAR et al., 1992). Schweigert et al. (2006) encontraram diferenças entre as proteínas e peptídeos do soro e do líquido folicular, demonstrando que os peptídeos e as proteínas do líquido folicular não são exclusivamente filtradas do soro, mas também localmente sintetizadas, pois alguns peptídeos selecionados (de aproximadamente 7,7KDa) estão em menores concentrações no líquido folicular que no soro e outros peptídeos (6,9 e 13,8KDa) estão presentes em maior quantidade no líquido folicular. Além disso, a concentração proteica observada no líquido folicular de folículos saudáveis é duas vezes maior que no folículo atrésico, e a pressão osmótica total não é diferente nesses folículos (CLARKE, 2006).

Numerosos estudos tem investigado proteínas selecionadas no líquido folicular (SPITZER et al., 1996; PELLICER et al., 1999; SCHWEIGERT et al., 2003), mas somente poucos tem descrito um padrão proteico para o líquido folicular (PELLICER et al., 1999; WUNDER, 2005; KIM et al., 2006). Porém, nenhum trabalho comparou o padrão proteico em diferentes fases do ciclo estral de bovinos.

A determinação da composição de proteínas e de peptídeos do líquido folicular em diferentes fases do ciclo estral não deve somente levar a um maior entendimento da fisiologia ovariana, especialmente do desenvolvimento folicular e maturação oocitária, mas também oferece novas possibilidades de usar proteínas como marcadores para otimizar processos de seleção para a fecundação *in vitro*.

O objetivo deste trabalho foi estudar o perfil proteico do líquido folicular de ovários de bovinos em diferentes fases do ciclo estral por meio de eletroforese.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ovários de bovinos foram obtidos no Frigorífico Bom-Mart de Presidente Prudente - SP. Foram colhidos somente ovários de vacas não prenhes. Imediatamente após a morte dos animais, os pares de ovários foram recuperados e armazenados separadamente em sacos plásticos com solução fisiológica a 35ºC, e transportados em recipiente térmico até o laboratório de Genética Molecular da UNOESTE, Presidente Prudente (SP).

No laboratório, os ovários foram classificados segundo a sua morfologia em 5 diferentes fases do ciclo estral, levando-se em consideração a presença ou ausência de CL e seu estádio de desenvolvimento, segundo a classificação de Ireland et al. (1980). Foram consideradas 5 diferentes fases do ciclo: fase 1 (do dia 1 ao dia 4 do ciclo estral) – coloração avermelhada externa e internamente, ponto de ruptura não recoberto por epitélio e sem vascularização visível em sua superfície (0,5 – 1,5 cm); fase 2 (do dia 5 ao 10 do ciclo estral) – ápice de cor vermelha ou marrom interna e externamente, ponto de ruptura coberto por epitélio, vascularização da superfície restrita a periferia do CL e restante do CL com coloração alaranjada (1,6 – 2,0 cm); fase 3 (do dia 11 ao 17 do ciclo estral) – cor alaranjada interna e externamente com presença de alguns vasos (1,6 – 2,0 cm); fase 4 (do dia 18 ao 20 do ciclo estral) – coloração amarelada (amarelo claro) e sem vascularização visível na superfície do CL e internamente com cor alaranjada ou amarelada (<1,0 cm; IRELAND, 1980) e fase 5 (dia 21 do ciclo estral) - ausência de CL e presença de folículo pré-ovulatório.

Após a classificação, os folículos de 2 a 7mm foram puncionados com agulha e seringa formando “pools” de líquido folicular. Foram colhidos 20 “pools” de líquido folicular de cada uma das fases.

O líquido folicular colhido foi centrifugado a 1500 rotações por 1 minuto para a separação de células e o sobrenadante estocado a -80°C. A extração de proteína foi realizada com a utilização de tampão composto por: 6,25mM Tris HCl, pH 6,8, 20% de glicerol, 5% de SDS, 2% de mercaptoetanol e água destilada (13,6 mL) na proporção 1:5 (v:v). As amostras foram aquecidas até a ebulição durante três minutos. As proteínas foram quantificadas segundo Bradford (1976). Foi utilizada a quantidade de 30µg de proteína por amostra de líquido folicular na eletroforese.

A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com Laemilli (1970) em um sistema composto de gel de funcionamento (10% de bisacrilamida, pH 8,8) e um gel de empilhamento (2,5% de bisacrilamida, pH 6,8), a corrida foi iniciada a 50V por 30 minutos, e posteriormente, a 16mA por 8 horas. Os géis foram fixados em isopropanol/ácido acético e água (4:1:5), e revelados em ácido acético a 10%, com 2% de Coomassie blue R-250 (USB, 1173, Amersham Life Science) até a visualização das bandas. As imagens foram capturadas com a utilização de transluminador e câmera digital CCD. As bandas das diferentes fases foram analisadas em porcentagens.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferenças individuais entre os perfis de SDS-PAGE das proteínas nas diferentes fases do ciclo estral foram observados nos géis corados (FIGURA 1), estando presentes cadeias peptídicas com pesos moleculares entre 16 e 118KDa. Foram observadas 16 diferentes bandas no gel de poliacrilamida. Quatro destas bandas

eram bem intensas e presentes em todas as amostras analisadas, estas amostras tinham aproximadamente 66KDa, 49KDa, 27KDa e 24KDa (FIGURA 1).

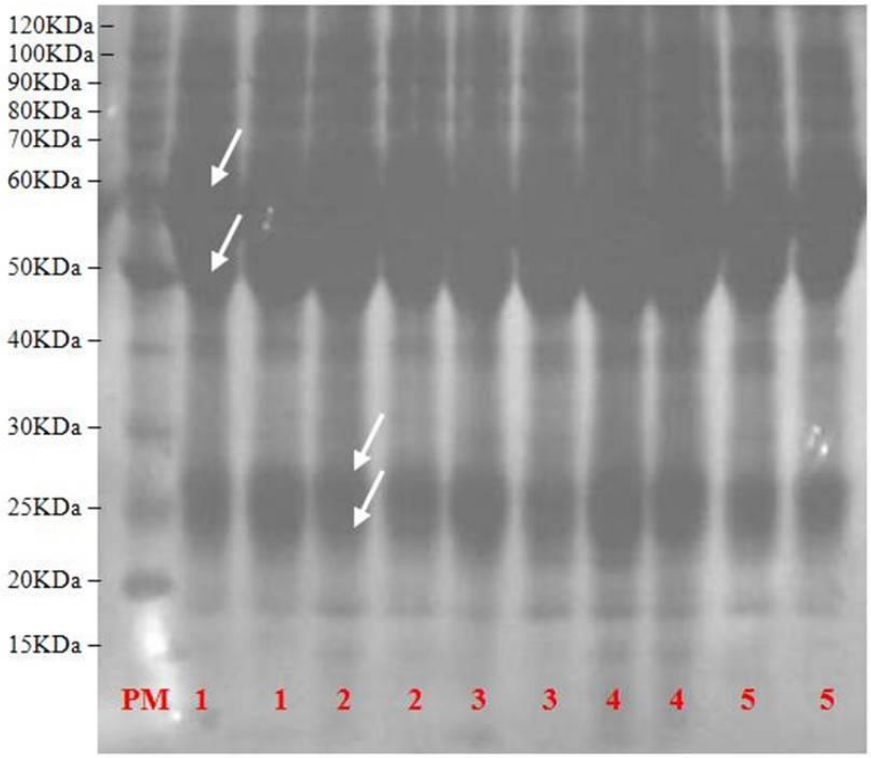

Figura 1. Gel de poliacrilamida demonstrando o perfil proteico de diferentes fases do ciclo estral. As setas indicam as bandas mais intensas no gel de aproximadamente 66KDa, 49KDa, 27KDa e 24KDa. PM = marcador de peso molecular; 1= amostras da fase 1; 2 = amostras da fase 2; 3 = amostras da fase 3; 4 = amostras da fase 4; 5 = amostras da fase 5.

Os resultados em porcentagens observados nos 6 géis estão apresentados na TABELA 1. Não foi observada diferença entre os grupos nas bandas avaliadas de 24KDa, 27KDa, de 40 a 80KDa e de 118KDa, estes peptídeos devem ser oriundos do soro ou de células foliculares, porém que sofrem pouca variação em sua síntese durante as fases do ciclo estral, conforme observação de Schweigert et al. (2006) de que as proteínas e peptídeos foliculares são o resultado da transferência dos constituintes do plasma e do metabolismo das células da granulosa (TABELA 1).

Tabela 1. Número de amostras e suas respectivas porcentagens para cada uma das 16 bandas de peso molecular visualizadas no SDS-PAGE em cada uma das 5 fases do ciclo estral de bovinos (n=20).

PM	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4	Fase 5
~118KDa	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)
~100KDa	16 (80%)	19 (95%)	18 (90%)	18 (90%)	20 (100%)
~90KDa	18 (90%)	14 (70%)	18 (90%)	20 (100%)	19 (95%)
~80KDa	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)
~70KDa	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)
~66KDa	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)
~49KDa	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)
~40KDa	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)
~35KDa	13 (65%)	8 (40%)	14 (70%)	19 (95%)	16 (80%)
~32KDa	12 (60%)	6 (30%)	5 (25%)	9 (45%)	10 (50%)
~30KDa	9 (45%)	7 (35%)	7 (35%)	12 (60%)	9 (45%)
~27KDa	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)
~24KDa	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)
~20KDa	14 (70%)	13 (65%)	14 (70%)	14 (70%)	13 (65%)
~18KDa	18 (90%)	15 (75%)	18 (90%)	19 (95%)	16 (80%)
~16KDa	15 (75%)	13 (65%)	13 (65%)	15 (75%)	12 (60%)

A banda de aproximadamente 66KDa, observada em todas as amostras de todos os géis como a banda mais intensa, é provavelmente a albumina sérica bovina, também encontrada por Jobim et al. (2002) trabalhando com sêmen bovino de alta congelabilidade. Alavi-Shoushtari et al. (2006) trabalhando com SDS-PAGE também relataram a presença da albumina no fluido uterino de vacas. A presença da albumina no líquido folicular era esperada já que há significativas similaridades entre as proteínas do líquido folicular e séricas (MANARANG-PANGAN; MENGE, 1971).

Polipeptídeos de aproximadamente 40 e 49KDa foram observados em 100% das amostras, e foram identificadas por De La Sota et al. (1996) como sendo a IGFBP-3 (proteína ligadora de fator de crescimento semelhante à insulina-3). De La Sota et al. (1996) não encontraram diferença na intensidade da banda do IGFBP-3 no Western Blotting quando compararam folículos subordinados e dominantes. Na maioria das espécies mamíferas, o desenvolvimento folicular é caracterizado por aumento de IGFBP-3, enquanto a atresia é caracterizada pela diminuição de IGFBP-3 (ARMSTRONG et al., 1996; BESNARD et al., 1996; De La SOTA et al., 1996; MONGET et al., 1996).

A observação de que todas as amostras analisadas apresentaram a banda referente ao IGBP-3 é consistente com o relato de Echternkamp et al. (1994), de que a maioria do IGBP-3 mensurado no líquido folicular bovino se origina do plasma ou dos tecidos extrafoliculares. Há ausência de transcrição e tradução do IGFBP-3 em folículos ovarianos de humanos (ZHOU; BONDY, 1993), ratos (NAKATANI et al., 1991) e porcos (SAMARAS et al., 1992) e também nas células da teca e da granulosa bovinas (ECHTERNKAMP et al., 1994).

O resultado do presente trabalho difere daqueles obtidos por Gradela et al. (1998) que não encontraram bandas de peso molecular entre 39 e 43KDa em folículos menores de 10mm, porém estes pesquisadores realizaram diálise com membrana de celulose por 24 e 48 horas, o que pode ter reduzido a quantidade destes polipeptídeos.

Outras bandas intensas localizadas nos líquidos foliculares foram de aproximadamente 24 e 27KDa em todas as amostras analisadas, de todas as fases do ciclo estral. Bandas como estas entre 22 e 28KDa também foram

localizadas em folículos de todos os tamanhos estudos por Gradela et al. (1998). Estas bandas foram identificadas como sendo IGBP-4 (ARMSTRONG et al., 1996; BESNARD et al., 1996; De La SOTA et al., 1996; MONGET et al., 1996). O IGFBP-4 é detectado em células da teca de folículos pequenos e o LH aumenta as concentrações desta proteína ligante na cultura de células (ARMSTRONG et al., 1996). Além disso, o IGFBP-6 que tem peso molecular similar ao IGFBP-4, 22KDa em humanos e 26,5KDa em ratos e não foi imunodetectado em bovinos (De La SOTA et al., 1996).

Quando comparados os perfis eletroforéticos das proteínas do líquido folicular de diferentes fases do ciclo estral, foram observadas diferenças no percentual de amostras entre as fases. Esta diferença era esperada, já que a síntese de proteínas que atuam de forma parácrina e autócrina no ovário deve ser mediada via hormônios endócrinos e a concentração sérica destes hormônios oscila consideravelmente durante as fases do ciclo estral. Além disso, como demonstrado por Schweigert et al. (2006) as proteínas do soro diferem das do líquido folicular, portanto as proteínas do líquido folicular não são exclusivamente filtradas do soro, mas também localmente sintetizadas. A diferença observada neste estudo foi nos fragmentos de peso molecular apresentados de forma decrescente de aproximadamente 100, 90, 35, 32, 30, 20, 18 e 16KDa (TABELA 1).

As bandas de polipeptídeos de 100 e 90KDa foram observadas na maioria das amostras, de 70 a 100%, durante as fases do ciclo estral, ou seja, pelo menos 14 amostras das 20 apresentaram estas bandas.

O polipeptídeo de peso molecular de aproximadamente 35KDa encontrado diferiu na porcentagem de amostras de cada fase do ciclo estral de bovinos. As porcentagens mais altas deste polipeptídeo foram encontradas em folículos de 5 a 7 mm de ovários nas fases 4 e 5, em que o corpo lúteo estava regredindo ou era ausente, na presença de um folículo pré-ovulatório. Este polipeptídeo apareceu em algumas amostras após a ovulação (65%), quando o CL hemorrágico estava presente e diminuiu conforme o corpo lúteo começou a desenvolver (40%) e aumentou no corpo lúteo maduro, terceira fase (70%) do ciclo estral, e aumentou ainda mais nas fases de regressão do corpo lúteo (90%) e (80%), quarta e quinta fases.

A banda de 35KDa foi identificada por De La Sota et al. (1996) como sendo a IGFBP-2. Este ligante está diminuído em folículos em desenvolvimento e aumenta na atresia folicular (ARMSTRONG et al.; 1996; BESNARD et al., 1996; De La SOTA et al., 1996; MONGET et al., 1996), que corresponderia a fases com corpo lúteo maduro (alta concentração de progesterona) e também na presença de um folículo dominante (folículo pré-ovulatório). O IGFBP-2 tem sido identificado por imunoprecipitação em folículos pré-ovulatórios de bovinos e é inversamente proporcional no líquido folicular às concentrações de estradiol no líquido folicular (ECHTERNKAMP et al., 1994). Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os dados de Armstrong et al. (1998) que observaram que o hormônio folículo-estimulante (FSH) inibe a expressão de IGFBP-2 pelas células da granulosa.

As bandas de 32 e 30KDa foram observadas em algumas amostras de todas as fases do ciclo estral, variando de 25 a 60%. Stanko et al. (1994) descreveu o IGFBP-5 no líquido folicular bovino por análise de “imunoblot” com peso molecular de 32 ou 31KDa, enquanto De La Sota et al. (1996) identificou o IGFBP-5 como uma proteína de 30KDa.

Foram identificadas pequenas variações nas bandas de 20 e 16 KDa durante as fases do ciclo estral. A banda de 20KDa foi identificada em 65 a 70% das amostras em todas as 5 fases

estudadas e a de 16KDa foi identificada em 65 a 75% das amostras. A banda de 18KDa foi identificada em 90% das amostras na fase 1, em 75% das amostras da fase 2, em 90% das amostras da fase 3, em 95% das amostras da fase 4 e em 80% das amostras da fase 5. Observa-se que na fase pré-ovulatória (fase 5) e de desenvolvimento do CL, estando o ovário sob a influência do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio do crescimento (GH, BERISHA et al., 2000; GIOMETTI et al., 2009), há uma redução na porcentagem de amostras que apresentam a banda de 16KDa. Provavelmente, os hormônios endócrinos estão interferindo na produção deste polipeptídeo.

No presente trabalho foram encontradas bandas proteicas semelhantes às encontradas em outros trabalhos que utilizaram eletroforese: De La Sota et al. (1996) detectaram proteínas de 49, 43, 35, 30, 28 e 22KDa; Echternkamp et al. (1994) observaram proteínas de 44, 40, 34, 29, 27 e 22KDa; Stanko et al. (1994) reportaram proteínas de 43, 39, 34, 32, 31 e 24KDa; Gradela et al. (1998) demonstraram proteínas de 66, 45, 33, 29, 24, e 17KDa. As bandas de 22KDa a 49KDa são identificadas como IGFBPs pelos autores. IGFBPs de peso molecular similar tem sido descritos no líquido folicular de humanos (GIUDICE, 1992; ZHOU; BONDY, 1993), ratos (GIUDICE, 1992; LIU et al., 1993; NAKATANI et al., 1991) e porcos (GIUDICE, 1992; GRIMES et al., 1994). A banda de 17KDa não é caracterizada por Gradela et al. (1998), porém neste trabalho também encontramos bandas com peso molecular similar.

Os IGBPs -2, -4 e -5, de peso molecular similar aos polipeptídeos visualizados neste trabalho, tem efeito antigonadotrófico na estimulação pelo FSH (GRIMES et al., 1994). O IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina) permanece constante no líquido folicular (De La SOTA et al., 1996), porém os IGFBPs sofrem mudanças durante o ciclo estral, como observado nas bandas neste trabalho. Então as proteínas ligadoras se ligam ao IGF-I e então inibem os efeitos do IGF-I no ovário (WALTERS et al., 2006). Contrariamente, menores concentrações deste IGFBPs devem levar a um aumento nas concentrações de IGF-I e IGF-II livres no líquido folicular e então potencialmente induzem a uma maior expressão gênica do P450scc (P450 “side chain cleavage”; ADASHI, 1994, URBAN et al., 1990) e da P450 aromatase (STEINKAMPF 1988), maior estímulo da biossíntese de andrógeno (HERNANDEZ et al., 1988), maior atividade da aromatase (ADASHI et al., 1985; BERGH et al. 1991) e maior produção de inibina (BICSAK et al., 1986). Os mecanismos que regulam as quantidades dos IGFBPs não estão claros, mas o FSH deve estimular a produção de proteases que clivam os IGFBPs em fragmentos de massa molecular menores que não se ligam aos IGFs no líquido folicular (LIU et al., 1993).

Conclui-se que os polipeptídeos de 35, 32, 30 e 18 KDa variam consideravelmente nas amostras de diferentes fases do ciclo estral. O polipeptídeo de mesmo peso molecular que o IGFBP-2 está mais presente nas amostras de líquido folicular ao final do ciclo estral. Maior número de polipeptídeos é observado em folículos antrais pequenos de ovários em que o CL está em regressão.

REFERÊNCIAS

ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; SVOBODA, M.; VAN WYK, J.J. Somatomedin-C synergizes with follicle-stimulating hormone in the acquisition of progestin biosynthetic capacity by cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, v.116, p.2135-2142, 1985. doi.org/10.1210/endo-116-6-2135

ADASHI, E.Y. The intraovarian IGF hypothesis: a 1994 perspective. **Journal of Reproduction and Fertility**, S3, 1994.

ALAVI-SHOUSHTARI, S.M.; ASRI-REZAI, S.; ABSHENAS, J. A study of the uterine protein variations during the estrus cycle in the cow: a comparison with the serum proteins. **Animal**

Reproduction Science, v.96, p.10-20, 2006. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.10.012

ANAHORY, T.; DECHAUD, H.; BENNES, R.; MARIN, P.; LAMB, N.J.; LAOUDJ, D. Identification of new proteins in follicular fluid of mature human follicles. **Electrophoresis**, v.23, p.1197–1202, 2002. doi.org/10.1002/1522-2683(200204)23:7/8<1197::AID-ELPS1197>3.0.CO;2-2

ANDERSEN, M.M.; KROLL, J.; BYSKOV, A.G.; FABER, M. Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. **Reproduction**, v.48, p.109–118, 1976. doi.org/10.1530/jrf.0.0480109

ARMSTRONG, D.G.; HOGG, C.O.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein production by primary cultures of ovine granulosa and theca cells. The effects of IGF-1, gonadotropin and size follicle. **Biology of Reproduction**, v.55, n.5, p.1163-71, 1996.

ARMSTRONG, D.G. et al. Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. **Endocrinology**, v.139, p.2146–2154, 1998. doi.org/10.1210/en.139.4.2146

BERGH, C., OLSSON, J.H., HILLENSJO, T. Effect of insulin-like growth factor-I on steroidogenesis in cultured human granulosa cells. **Acta Endocrinologica (Copenhagen)**, v.125, p.177-185, 1991.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER, R. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1106-1114, 2000. doi.org/10.1095/biolreprod63.4.1106

BESNARD, N.; PISSELET, C.; ZAPF, J.; HORNEBECK, W.; MONNIAUX, D.; MONGET, P. Proteolytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin-like growth factor-binding proteins levels during growth and atresia of ovine ovarian follicles. **Endocrinology**, v.137, n.5, p.1599-607, 1996. doi.org/10.1210/en.137.5.1599

BICSAK, T.A.; TUCKER, E.M.; CAPPEL, S.; VAUGHAN, J.; RIVIER, J.; VALE, W.; HSUEH, A.J.W. Hormonal regulation of granulosa cells inhibin biosynthesis. **Endocrinology**, v.119, p.2711-2719, 1986. doi.org/10.1210/endo-119-6-2711

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms of protein utilising the principle dye binding. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v.72, p.248-254, 1976.

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.119-131, 2006. doi.org/10.1530/rep.1.00960

De La SOTA, R.L.; SIMMEN, F. A.; DIAZ, T.; THATCHER, W.W. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, n.4, p.803-12, 1996. doi.org/10.1095/biolreprod55.4.803

ECHTERNKAMP, S.E.; HOWARD, H.J.; ROBERTS, A.J.; GRIZZLE, J.; WISE, T. Relationship among concentrations of steroids, insulin-like growth factor I and insulin-like factor binding protein in ovarian follicular fluid of beef cattle. **Biology of Reproduction**, v.51, p.971-981, 1994. doi.org/10.1095/biolreprod51.5.971

EPPIG, J.J., PENDOLA, F.L., WIGGLESWORTH, K., PENDOLA, J.K. Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. **Biology of Reproduction**, v.73, p.351–357, 2005. doi.org/10.1095/biolreprod.105.041798

GIOMETTI, I.C.; CASTILHO, A.C.S.; SÁ-FILHO, O.G.; PAPA, P.C.; BURATINI JR, J. Controle local e endócrino do desenvolvimento e da regressão do corpo lúteo bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.34-52, 2009.

GIUDICE, L.C. Insulin-like growth factor and ovarian follicular development. **Endocrine Reviews**, v.13, p.641-669, 1992. dx.doi.org/10.1210/edrv-13-4-641

GRADELA, A.; RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H. Proteínas ligantes do insulin-like growth factor (IGFBPs) e dominância folicular em vacas *Bos taurus indicus* puras e cruzadas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.35, n.5, p.218-220, 1998. doi.org/10.1590/S1413-95961998000500005

GRIMES, R.W. et al. Porcine ovarian granulosa cells secrete insulin-like growth factor-binding proteins-4 and -5 and express their messenger ribonucleic acids: regulation by follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I. **Biology of Reproduction,** v.50, p.695-701, 1994.

HERNANDEZ, E.R.; RESNICK, C.E.; SVOBODA, M.E.; VAN WYK, J.J.; PAYNE, D.W.; ADASHI, E.Y. Somatomedin-C/insulin-like growth factor I as

an enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. **Endocrinology**, v.122, p.1603-1612, 1988. doi.org/10.1210/endo-122-4-1603

HESS, K.A.; CHEN, L.; LARSEN, W.J. The ovarian blood follicle barrier is both charge- and size-selective in mice. **Biology of Reproduction** v.58, p.705–711, 1998. doi.org/10.1095/biolreprod58.3.705

IRELAND, J.J.; MURPHEE, R.L.; COULSON, P.B. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by cross appearance of corpus luteum. **Journal of Dairy Science,** v. 63, n.1, p. 155-160, 1980.

JOBIM, M.I.M. et al. Albumina e osteopontina – proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.136-141, 2002.

KIM, Y.S. et al. Proteomic analysis of recurrent spontaneous abortion: identification of na inadequately expressed set of proteins in human follicular fluid. **Proteomics**, v. 24, 2006.

LAEMILLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970. doi.org/10.1038/227680a0

LIU, X.J. et al. Development of specific antibodies to rat insulin-like growth factorbinding protein (IGFBP-2 to -6): analysis of IGFBP production by rat granulosa cells. **Endocrinology**, v.132, p.1176-1183, 1993.

MANARANG-PANGAN, S., MENGE, A.C. Immunologic studies on human follicular fluid. **Fertility and Sterility**, v.22, n.6, p.367-372, 1971.

MENDOZA, C.; RUIZ-REQUENA, E.; ORTEGA, E.; CREMADES, N.; MARTINEZ, F.; BERNABEU, R.; GRECO, E.; TESARIK, J. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. **Human Reproduction**, v.17, p.1017–1022, 2002. doi.org/10.1093/humrep/17.4.1017

MIHM, M.; E.J. AUSTIN, E.J.; T.E.M. GOOD, T.E.M.; IRELAND, J.L.H.; KNIGHT, P.G.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**, v.63, p.811–819. 2000. doi.org/10.1095/biolreprod63.3.811

MONGET, P.; BESNARD, N.; HUET, C.; PISSELET, C. Insulinlike growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. **Hormone Research (Basel),** v.45, n.3-5, p.211-7, 1996.

NAKATANI, A.; SHIMASAKI, S.; ERICKSON, G.F.; LING, N. Tissue specific expression of four insulin-like growth factor binding proteins (1, 2, 3, and 4) in the rat ovary. **Endocrinology**, v.129, p.1521-1529, 1991. doi.org/10.1210/endo-129-3-1521

NANDEDKAR, T.D.; SHAHID, J.K.; MEHTA, R.; MOODBIDRI, S.B.; HEGDE, U.C.; HINDUJA, I. Localization and detection of ovarian follicular fluid protein in follicles of human ovaries. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.30, n.4, p.271-275, 1992.

PELLICER, A.; ALBERT, C.; MERCADER, A.; BONILLA-MUSOLES, F.; REMOHI, J.; SIMON, C. The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin-1beta, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. **Fertility and Sterility**, v.71, p.482–489, 1999. doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00484-1

RICHARDS, J.S. Hormonal control of gene expression in the ovary. **Endocrine Reviews**, v.15, p.725–751, 1994. doi.org/10.1210/edrv-15-6-725

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. doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00430-5

SAMARAS, S.E.; HAGEN, D. R.; SHIMASAKI, S.; LING, N.; HAMMOND, J.M. Expression of insulin-like growth factor-binding protein-2 and 3 messenger ribonucleic acid in the porcine ovary: localization and physiological changes. **Endocrinology**, v.130, p.2739-2744, 1992. doi.org/10.1210/en.130.5.2739

SCHWEIGERT, F.J.; STEINHAGEN, B.; RAILA, J.; SIEMANN, A.; PEET, D.; BUSCHER, U. Concentrations of carotenoids, retinol and alpha-tocopherol in plasma and follicular fluid of women undergoing IVF. **Human Reproduction**, v.18, p.1259–1264, 2003. doi.org/10.1093/humrep/deg249

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, n.11, p.2960–2968, 2006. doi.org/10.1093/humrep/del257

SHALGI, R.; KRAICER, P.; RIMON, A.; PINTO, M.; SOFERMAN, N. Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier. **Fertility and Sterility**, v.24, p.429–434, 1973.

SHALGI, R.; KRAICER, P.F.; SOFERMAN, N. Gases and electrolytes of human follicular fluid. **Reproduction**, v.28, n.3, p.335–340, 1972. doi.org/10.1530/jrf.0.0280335

SPITZER, D.; MURACH, K.F.; LOTTSPEICH, F.; STAUDACH, A.; ILLMENSEE, K. Different protein patterns derived from follicular fluid of mature and immature human follicles. **Human Reproduction**, v.11, p.798–807, 1996. doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019257

STANKO, R.L.; COHICK, W.S.; SHAW, D.W.; HARVEY, R.W.; CLEMMONS, D.R.; WHITACRE, M.D.; ARMSTRONG, J.D. Effect of somatotropin and/or equine chorionic gonadotropin on serum and follicular insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding proteins in cattle. **Biology of Reproduction**, v.50, p.290-300, 1994. doi.org/10.1095/biolreprod50.2.290

STEINKAMPF, M.P., MENDELSON, C.R., SIMPSON, E.R. Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P-450 of human ovarian granulose cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.59, p.93-105, 1988. doi.org/10.1016/0303-7207(88)90199-2

SUGIURA, K., PENDOLA, F.L., EPPIG, J.J. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. **Developmental Biology**, v.279, p.20–30, 2005. doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.027

TSAFRIRI, A. Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.377, p.121–140, 1995.

TSAFRIRI, A., REICH, R. Molecular aspects of mammalian ovulation. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v.107, p.1–11, 1999. doi.org/10.1055/s-0029-1212066

URBAN,R.J; GARMEY, J.C.; SHUPNIK, M.A.; VELDHUIS, J.D. Insulin-like growth factor-I increases concentrations of messenger ribonucleic acid encoding P450 cholesterol-side chain cleavage enzyme in primary cell cultures of porcine granulosa cells. **Endocrinology**, v.127, p.2481-2488, 1990. doi.org/10.1210/endo-127-5-2481

WALTERS, K.A.; BINNIE, J.P.; CAMPBELL, B.K.; ARMSTRONG, D.G.; TELFER, E.E. The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. **Reproduction**, v.131, p.515-23, 2006. doi.org/10.1530/rep.1.00682

WUNDER, D.M., KRETSCHMER, R., BERSINGER, N.A. Concentrations of leptin and C-reactive protein in serum and follicular fluid during assisted reproductive cycles. **Human Reproduction**, v.20, p.1266–1271, 2005. doi.org/10.1093/humrep/deh767

ZHOU, J., BONDY, C. Anatomy of the human ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction,** v.48, p.467-482, 1993. doi.org/10.1095/biolreprod48.3.467