

## Retrospectiva dos principais biomarcadores envolvidos no desenvolvimento folicular e oocitário em mamíferos

*Retrospective of the main biomarkers involved in follicular and oocyte development in mammals*

Renato Félix da Silva<sup>\*1</sup>, Laritza Ferreira de Lima<sup>1</sup>, José Ricardo de Figueiredo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-antrais, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

### Resumo

A análise da expressão das diversas proteínas relacionadas a foliculogênese e oogênese *in vivo* e *in vitro*, através da proteômica, tem demonstrado possíveis biomarcadores celulares. A descoberta desses biomarcadores pode ajudar na elucidação de mecanismos complexos como a foliculogênese (entendimento sobre o crescimento folicular e maturação oocitária), no tratamento de doenças relacionadas a infertilidade feminina, bem como, no aprimoramento de técnicas reprodutivas como a manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais. Desta forma, a presente revisão abordou as principais proteínas relatadas nos mais novos trabalhos referentes aos estudos proteômicos visando melhores esclarecimentos referentes ao desenvolvimento folicular e oocitário *in vivo* e *in vitro*. A escolha dos artigos foi realizada com base nas descobertas mais atuais e do impacto que determinadas proteínas poderiam trazer para melhorar o entendimento da foliculogênese e oogênese nas diferentes espécies de animais mamíferos.

**Palavras-chave:** foliculogênese, biomarcadores, técnicas reprodutivas, proteômica

### Abstract

*The analysis of the expression of several proteins related to folliculogenesis and oogenesis in vivo and in vitro, through proteomics, has demonstrated possible cellular biomarkers. The discovery of these biomarkers may help in the elucidation of complex mechanisms such as folliculogenesis (understanding of follicular growth and oocyte maturation), in the treatment of diseases related to female infertility, as well as in the improvement of reproductive biotechniques such as the manipulation of oocytes enclosed in preantral follicles. Thus, the present review addressed the main proteins reported in the newest works related to proteomic studies aiming at better clarifications regarding follicular and oocyte development in vivo and in vitro. The choice of articles was based on the most current discoveries and the impact that certain proteins could bring to improve the understanding of folliculogenesis and oogenesis in different species of mammalian animals.*

**Keywords:** folliculogenesis, biomarkers, reproductive biotechniques, proteomics

### Introdução

O estudo da expressão e do funcionamento das proteínas tem sido realizado por diversos trabalhos com o intuito de elucidar mecanismos celulares complexos, como a foliculogênese. A foliculogênese compreende os processos de formação, ativação, crescimento e maturação dos folículos ovarianos, que se inicia com a formação do folículo primordial e culmina no desenvolvimento do folículo pré-ovulatório. Esses processos são regulados por uma complexa interação de fatores de crescimento e hormônios proteicos que através de inúmeras vias de sinalização celular promovem a sobrevivência e diferenciação das células foliculares, gerando um oócito capaz de suportar o desenvolvimento embrionário (Figueiredo et al., 2019). Assim, o conhecimento sobre a participação de cada proteína, pode ajudar na elucidação da foliculogênese, ou seja, compreensão do funcionamento das diferentes proteínas em cada fase do desenvolvimento folicular, como a proliferação das células da granulosa, crescimento do oócito e maturação oocitária. Deste modo, a proteômica poderia contribuir no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas reprodutivas, como a manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA).

A análise da expressão e identificação das diversas proteínas que regem os mecanismos da foliculogênese e a oogênese *in vivo* e *in vitro*, através de tecnologias modernas como a proteômica, tem resultado no conhecimento de vários biomarcadores celulares. Os biomarcadores são proteínas

\*Correspondência: jrf.lamofopapapers@gmail.com

Recebido: 10 de abril de 2021

Aceito: 21 de maio de 2022

diretamente relacionadas as alterações moleculares em células ou tecidos normais ou lesionados (Oliveira *et al.*, 2021). As identificações desses biomarcadores podem ajudar no tratamento de doenças relacionadas a infertilidade feminina e no estabelecimento de diversas tecnologias de reprodução assistida que atualmente tem crescido em todo o mundo (Wang *et al.*, 2015). Deste modo, a presente revisão abordou alguns trabalhos relatando as principais proteínas, apresentadas como possíveis biomarcadores, com o objetivo de compilar os mais novos achados da literatura e facilitar o estudo da expressão proteica para compreensões de eventos celulares complexos como a foliculogênese. A escolha dos artigos foi realizada com base nas descobertas mais atuais e do impacto que determinadas proteínas poderiam trazer para melhorar o entendimento da foliculogênese e oogênese nas diferentes espécies de animais mamíferos. Os artigos técnicos utilizados na presente revisão foram pesquisados nas bases de dados: Scielo, Science direct e Pubmed, por meio das seguintes palavras-chave: Folículos ovarianos, proteômica, ovário, fluido folicular e oócitos. Como critérios de inclusão, foram utilizados artigos experimentais e revisões de literatura na língua portuguesa e inglesa. Já como critérios de exclusão, foram desconsiderados formatos de textos que não tiveram avaliação rigorosa.

### Oôgenese e Foliculogênese

A oogênese refere-se à sequência de eventos que se inicia com a formação das células germinativas primordiais, as quais diferenciam-se inicialmente em oogônias, seguindo para oócitos primários e posteriormente secundários, quando ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar. O processo é finalizado com a fecundação do ovócito maturo e a liberação do segundo corpúsculo polar (Figueiredo *et al.*, 2019).

No entanto, na maioria das espécies de mamíferos, durante a formação do oócito primário, o oócito inicia a meiose e para no estágio de prófase I. Durante essa fase, o oócito fica envolto por células pavimentosa da pré-granulosa formando o folículo primordial e iniciando a foliculogênese. Os folículos podem ser divididos em duas categorias os pré-antrais (primordiais, primário e secundários - FP) e antrais (terciário e pré-ovulatório - FA). Dos milhares de folículos presentes nos ovários, aproximadamente 90% são FPs. Os primordiais ficam quiescente, constituindo a reserva ovariana, e posteriormente entram no processo de ativação progredindo para o estágio de primários e secundários (Silva *et al.*, 2020). Posteriormente, durante a proliferação das células da granulosa irá aparecer uma camada repleta de líquido denominada de antro, iniciando a categoria de FA e finalizando com a ovulação de um oócito secundário, na maioria das espécies como ilustrado na fig. 1. Apesar da grande população folicular, a grande maioria (99,9%) dos folículos é eliminada no processo de atresia (Aerts e Bols, 2010). O destino do folículo, atresia ou ovulação depende de um fino balanço entre proteínas estimulatórias e inibitórias envolvidos na foliculogênese (Figueiredo *et al.*, 2019). Assim, embora os mecanismos que regulam a foliculogênese sejam estudados há bastante tempo, ainda não são conhecidas todas as proteínas envolvidas nesse processo, sendo necessário a busca por biomarcadores.

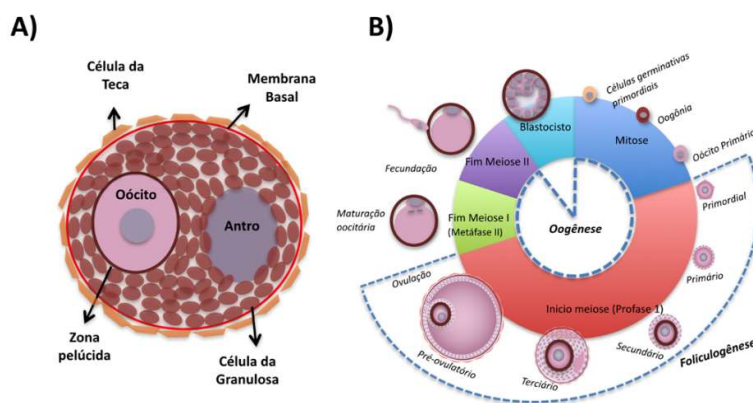


Figura 1. Ilustração esquemática do folículo ovariano e foliculogênese. Diagrama simplificado da ovogênese e foliculogênese. Em A) estrutura do folículo ovariano, demonstrando os constituintes como o oócito (cor rosa), a zona pelúcida (cor marrom escuro), cavidade antral (cor cinza), células da granulosa (cor marrom claro), membrana basal (cor vermelha) e as células da teca (cor amarela). Em B) formação das células germinativas primordiais, da oogonia e do oócito primário (durante as sucessivas mitoses), bem como as etapas do desenvolvimento folicular (início da meiose e parada meiótica em prófase I), culminando na maturação oocitária (finalização da meiose I), fertilização (finalização da meiose II) e posterior formação do blastocisto.

### Papel da proteômica na busca de biomarcadores da foliculogênese

Durante os últimos anos, o desenvolvimento de métodos invasivos e não invasivos para seleção de oócitos e foliculos, bem como as descobertas de substâncias que melhore os meios de cultivo utilizando tecnologias como a transcriptômica, proteômica e metabolômica tem gerado muito interesse na pesquisa. Dentre elas podemos destacar a proteômica, a qual estuda os produtos proteicos expressos pelo genoma (Cox e Mann, 2007). O estudo molecular por meio da análise proteômica permite a identificação, a quantificação e a avaliação dos tipos de modificações pós-traducionais sofridas pelas proteínas envolvidas em vários processos, permitindo a descoberta de novos alvos terapêuticos e moléculas bioativas. O estudo das modificações pós-traducionais é a principal vantagem da proteômica em relação as demais análises ômicas (Araújo *et al.*, 2022). Cada proteína é especializada para uma determinada função, assim, conhecê-la pode ser extremamente benéfico para a compreensão das complexas redes de proteínas reguladoras, envolvidas na fisiologia ovariana e na resposta à estimulação exógena, e para fornecer grupos relevantes de biomarcadores específicos em medicina reprodutiva (Jarkovska *et al.*, 2010), bem como para o aperfeiçoamento e o desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas (Fahiminiya *et al.*, 2011). Alguns exemplos de proteínas que já foram descobertas e estudadas nos diversos compartimentos foliculares são ilustrados na fig. 2.

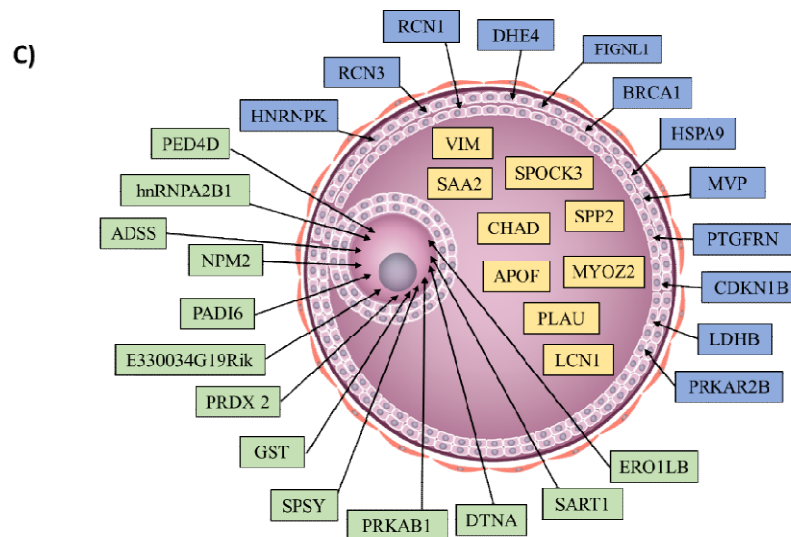


Figura 2. Ilustração esquemática do folículo ovariano e algumas das principais proteínas encontradas nos diversos compartimentos foliculares. Nas caixas em azul estão ilustradas as proteínas encontradas no folículo e células da granulosa. Nas caixas em amarelo estão ilustradas as proteínas encontradas no fluido folicular. Nas caixas em verde estão ilustradas as proteínas encontradas no oócito.

Desde seu desenvolvimento, existem muitas metodologias empregadas na proteômica, as quais podem ser classificadas nos tipos *bottom-up* ou *top-down*. O primeiro, também denominado *shotgun*, inclui separação por cromatografia líquida dos peptídeos obtidos após digestão triptica de soluções proteicas complexas, seguida de análise por espectrometria de massas (MS). O *top-down*, ao contrário, é um processo no qual as proteínas intactas (e não os peptídeos) são submetidas à análise por MS. Nessa metodologia, ocorre inicialmente a separação das proteínas por um gel, em geral por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE - Celis e Gromov, 1999), seguida da identificação através da espectrometria de massas (MS). As principais vantagens da realização da metodologia *bottom-up* são o menor custo e uma maior facilidade de encontrar espectrometros de massas compatíveis com a metodologia, enquanto no *top-down* existe um maior custo por exigir equipamentos mais sofisticados e de difícil acesso. Entretanto, na metodologia *top-down* existe a possibilidade de um estudo mais aprofundado das modificações pós-traducionais das proteínas, pois o mesmo é realizado com proteínas intactas.



### Proteínas envolvidas no desenvolvimento do folículo

Em estudo com folículos primordiais envelhecidos de ratas, Govindaraj e Rao (2015) demonstraram a alta expressão de proteínas relacionadas a apoptose como Bcl2 associada a proteína assassina ovariana (BOK) e a baixa expressão de proteínas relacionadas ao reparo do DNA como FIGL1, em relação a folículos de animais jovens. Para isso, os autores coletaram ovários de ratas imaturas com 20 dias de idade e ratas idosas com 450 a 540 dias. Os ovários foram fragmentados e expostos a colagenase tipo IV, filtrado em malha de 40 µm para visualização de folículos primordiais. Ao final do estudo os autores encontraram 13 proteínas diferencialmente expressas em folículos primordiais de ovários de ratas imaturas e idosas utilizando eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. Os mesmos autores, em estudo com folículos primordiais de búfalos, avaliaram a expressão da proteína de suscetibilidade ao câncer de mama e ovário 1 (BRCA1) em animais jovens e adultos. Essa proteína está fortemente relacionada a reparos de danos ao DNA, bem como apresenta funções conservadas ao gene ativador de transcrição (BRG1) que funciona como ativador do genoma do zigoto durante a fertilização (Bultman *et al.*, 2006). Desta forma, Govindaraj *et al.* (2016) observaram através de análise da expressão de RNAm por PCR e expressão proteica através de Western blot que a expressão desta proteína estava bastante reduzida em folículos de animais adultos em comparação com folículos de animais jovens. Os autores realizaram também análises por espectrometria de massas e observaram redução de expressão em proteínas importantes como HSPA9 uma proteína de choque térmico e desidrogenase específica de glutamato (DHE4) uma proteína energética.

Ainda estudando proteínas em folículos primordiais, Xu *et al.* (2017) coletaram 24 fragmentos de tecido ovariano fetal de 8 suínos prenhas, sendo 4 com idade gestacional 55 e 4 com idade 90. Para o estudo proteico foi realizada a extração das proteínas seguida das análises de eletroforese em gel e espectrometria de massas. Os autores estudaram as principais proteínas responsáveis para formação destes folículos em suínos e observaram alta expressão de reticulocalbina-1 (RCN1), reticulocalbina-3 (RCN3), actina e ribonucleoproteína nuclear heterogênea K (HNRNPK). As proteínas RCN1 e RCN3 estão bastante relacionadas a proliferação e diferenciação celular (Jin *et al.* 2016). A proteína actina está relacionada a formação do fuso meiótico e manutenção da estrutura celular (Van Blerkom, 1991). A proteína HNRNPK está diretamente envolvida nos eventos de remodelação da cromatina (Expert-Bezançon *et al.*, 2002) e processamento de RNAm (Ostareck *et al.*, 1997). Os autores também observaram as principais proteínas envolvidas na transição do folículo primordial para primário como a proteína de curvatura principal (MVP), envolvida na inibição da via de sinalização PTEN e receptores de estrógeno (Yu *et al.*, 2002) e a proteína de choque térmico 2 (HSPA2) diretamente envolvida na hidrólise de ATP (Wisniewska *et al.*, 2010).

Avaliando categorias foliculares mais avançadas como folículos secundários e antriais de ratas, Anastácio *et al.* (2017) realizaram o cultivo dos folículos secundários por 9 (para obtenção de folículos com membrana basal rompida) e 12 (para obtenção de folículos antriais) dias. Para a análise do perfil proteico os autores realizaram eletroforese em gel e espectrometria de massas, encontrando 1401 proteínas no total. Dentre estas proteínas, foi observada uma alta expressão da subunidade reguladora da proteína quinase dependente de cAMP (PRKAR2B) que é uma proteína altamente associada aos níveis de cAMP no oócito durante a maturação, cadeia L-lactato desidrogenase B (LDHB) que é uma proteína associada aos níveis energéticos celular e inibidor de quinase dependente de ciclina 1B (CDKN1B) que é uma proteína associada a proliferação celular. As proteínas PRKAR2B e CDKN1B estavam mais presentes nos folículos com membrana rompida, após o período de cultivo, do que nos folículos que formaram antro. No entanto, a proteína LDHB estava mais presente nos folículos secundários. Essa proteína, segundo os autores necessita ser sintetizada nesse período para posterior degradação nos estágios mais avançados da foliculogênese, sendo bastante requisitada na proliferação das células da granulosa e formação da cavidade antral (Anastácio *et al.*, 2017).

Objetivando identificar o perfil proteico e vias que podem estar envolvidas na atresia folicular em suínos, Shan *et al.* (2021) isolaram proteínas das células da granulosa coletadas de folículos saudáveis e atrésicos e encontraram um total de 4591 proteínas identificadas através de espectrometria de massas. Os autores observaram que as proteínas encontradas nos folículos atrésicos estavam relacionadas com as vias de sinalização do lisossomo, fagossomo, autofagia e



apoptose. Uma proteína em especial foi observada e o estudo mostrou que o regulador negativo do receptor de prostaglandina F2 (PTGFRN) é uma proteína potencialmente importante no desenvolvimento do folículo antral, e a uma menor expressão de PTGFRN em células da granulosa pode levar à atresia folicular.

### Proteínas envolvidas no desenvolvimento do oócito

Entre as proteínas envolvidas no desenvolvimento do oócito, estão a ribonucleoproteína heterogênea nuclear A2/B1 (hnRNPA2B1) que é uma proteína diretamente relacionada com a maturação meiótica do oócito e a subsequente formação de blastocisto (Lee *et al.*, 2018). Em estudo realizado com oócitos de gatas, Lee *et al.* (2018) analisou as proteínas diferencialmente expressas nos oócitos em vesícula germinativa (VG) derivadas de folículos pré-antrais (100 a 400  $\mu\text{m}$ ) e antrais (> 400  $\mu\text{m}$ ). Para isto, foi realizado imunofluorescência, Western blotting e espectrometria de massas, sendo identificados 174 proteínas nucleares. Os autores observaram que a proteína hnRNPA2B1 estava bastante expressa nas VGs dos oócitos derivados de folículos antrais. Em seguida foi realizado o processo de inibição desta proteína, através da transfecção do anticorpo para hnRNPA2B1, nos oócitos e estes oócitos foram maturados e fertilizados *in vitro*. Foi observado que a inibição de hnRNPA2B1 prejudicou a taxa de maturação oocitária, pois esta proteína está diretamente relacionada com a capacidade do oócito armazenar RNA mensageiro, e reduziu drasticamente a formação de blastocisto, demonstrando a importância da proteína hnRNPA2B1 para o desenvolvimento do oócito e formação embrionária.

Em estudo avaliando a presença de proteínas antes e após o processo de maturação *in vivo* em ratas, Cao *et al.* (2012) realizaram uma comparação dos perfis proteômicos entre oócitos de camundongos em vesícula germinativa e em estágio de metáfase II, através de eletroforese bidimensional, encontrando 63 proteínas. Foi observado a presença das proteínas adenilossuccinato sintetase (ADSS), nucleoplasmina-2 (NPM2) e proteína-arginina deiminase tipo-6 (PADI6). Todas essas proteínas estavam bastante expressas nos oócitos nos dois momentos da meiose, antes e após a maturação oocitária. Essas proteínas são cruciais para adquirir boas taxas de maturação. Além disso, os autores relataram a presença de uma nova proteína encontrada nos oócitos maduros, sendo esta nunca encontrada em nenhum tecido, a proteína E330034G19Rik. Essa proteína tem papel fundamental na segregação dos cromossomos e clivagem dos blastômeros durante o desenvolvimento inicial do embrião. Do mesmo modo, investigando as principais proteínas envolvidas no processo de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos suínos, Kim *et al.* (2011) realizaram estudo proteico através de eletroforese em gel e espectrometria de massas e encontraram proteínas que apresentaram maior expressão após a MIV: peroxiredoxina 2 (PRDX 2), glutationa S-transferase (GST), sintase de espermina (SPSY), miomegalina, fosfodiesterase 4D (PED4D), subunidade de proteína quinase ativada beta-2 (PRKAB 1) e distrobrevina alfa (DTNA). As proteínas PRDX 2, GST, SPSY estão relacionadas com a regulação dos níveis de espécies reativas de oxigênio e as proteínas miomegalina, PED4D, PRKAB 1 e DTNA estão funcionalmente envolvidas na regulação molecular de cAMP (Berendt *et al.*, 2009). Desta forma, foi observado que todas essas proteínas são essenciais para a sinalização intracelular envolvida na maturação oocitária (Kim *et al.*, 2011).

O entendimento do processo de envelhecimento do oócito por meio da expressão proteica pode ser uma das formas de estudo visando a compreensão de doenças relacionadas a infertilidade feminina como a falha ovariana prematura (Schwarzer *et al.*, 2014). Desta forma, analisando o proteoma sobre o impacto do envelhecimento nos oócitos de camundongos, Schwarzer *et al.* (2014) identificaram 2324 proteínas, através de espectrometria de massas, em oócitos maturados *in vivo* oriundos de camundongos fêmeas de 3, 8 e 10 semanas. Foram encontradas as seguintes proteínas relacionadas ao envelhecimento do oócito: fator associado ao spliceosoma 1 (SART1) e retículo endoplasmático oxidoreductase 1 beta (ERO1LB), essas proteínas são responsáveis pela regulação do estresse oxidativo. Além disso, os autores observaram as proteínas: fator de efeito materno (ZAR1) e PAPOLA, sendo esta última responsável pela adição da cauda poli-A na molécula de RNAm.

Realizando trabalho com o objetivo de estudar o proteoma de oócitos de camundongos e tentar compreender a função de determinadas proteínas que ajudam no processo de reprogramação celular, Pfeiffer *et al.* (2011) verificaram a existência de 28 proteínas presentes ao mesmo tempo nos oócitos de camundongos e em células troncos (Baz1b, Birc3, Carm1, Ccnb1, Chd4, Dnmt1, Dnmt3, Eed, Ep400, Hat1, Hdac1, Hdac2, Hdac6, Hells, Kdm1 (Lsd1), Kdm6a (Utx), Mll3, Prmt1, Prmt5, Prmt7, Rnf2, Rnf20,



Ruvbl1, Ruvbl2, Smarca4 (Brg1), Smarca5, Smarcal1, Usp16). Todas essas proteínas são proteínas nucleares e estão envolvidas em atividades catalíticas e modificações na cromatina. Destas proteínas, 17 (Brcc3, Ccnb1, Dnmt1, Dnmt3, Eed, Hat1, Hdac2, Hdac6, Hells, Kdm1, Prmt1, Prmt5, Prmt7, Rnf2, Ruvbl1, Ruvbl2 e Smarcal1) apresentavam alta expressão, ou seja, se expressavam mais no decorrer das modificações da cromatina em oócitos em metáfase II.

### Proteínas do fluido folicular

No fluido folicular estão presentes diversas proteínas que ajudam na finalização do crescimento folicular e maturação do oócito. Entre as muitas proteínas já encontradas no fluido folicular, a proteína Vimentina (VIM) foi caracterizada como indicadora da boa qualidade folicular. Essa proteína é constituinte do citoesqueleto e tem como principal função estabilidade deste sistema celular (Fu *et al.*, 2016). Em estudo realizado com fluido folicular (FF) de búfalos, através de espectrometria de massas e Western Blot, Fu *et al.* (2016) observaram que a proteína VIM estava bastante expressa no FF, caracterizando foliculos com oócitos aptos a maturação, sendo um possível candidato para biomarcador do desenvolvimento folicular. Do mesmo modo em estudo com FF de humanos, Ambekar *et al.* (2013) demonstraram a presença de proteínas nunca documentadas em estudos com fluido folicular como: testican 3 (SPOCK3), fosfoproteína secretada 2 (SPP2), condroitina (CHAD) e miozenina-2 (MYOZ2). Estas proteínas são constituintes da matriz extracelular (MEC). Segundo os autores a compreensão do papel destas novas proteínas poderia fornecer um melhor esclarecimento sobre vários processos incluindo a formação do fluido folicular e remodelação da MEC durante a foliculogênese, esteroidogênese e ovulação (Ambekar *et al.*, 2013). Além disso, este trabalho também revelou a presença de novas proteínas transportadoras no fluido folicular como: apolipoproteína F (APOF), lipocalina 1 (LCN1) e amiloide sérica A2 (SAA2). Estas proteínas estão envolvidas no transporte de pequenas moléculas hidrofóbicas e lipídios, podendo estar envolvidas no processo de esteroidogênese no foliculo (Wojnar *et al.* 2002; van der Westhuyzen *et al.*, 2007).

Ainda com relação ao FF humano, Pla *et al.* (2021) coletaram fluido de foliculos antrais pequenos de ovários que foram removidos cirurgicamente de 31 mulheres (~28,5 anos) submetidas a ovariectomia unilateral para preservação da fertilidade. No total, foram identificadas 2.461 proteínas através de espectrometria de massas, das quais 1.108 identificadas pela primeira vez em FF em humanos. Neste trabalho foi demonstrado que a análise por espectrometria de massa de FF derivados de foliculos antrais pequenos permite a identificação de um maior número de proteínas em comparação com os resultados obtidos em análises anteriores de foliculos maiores. A descoberta desta grande variedade de proteínas em foliculos antrais pequenos demonstra que a viabilidade do oócito pode ser determinada no início do desenvolvimento folicular (Pla *et al.*, 2021).

Com o objetivo de identificar, quantificar e descrever o proteoma do FF de acordo com a morfometria de foliculos ovarianos de búfalas, Marques *et al.* (2022) separaram os ovários em 6 grupos de acordo com o tamanho dos foliculos e presença ou ausência de corpo lúteo. Os autores observaram que a proteína alfa-glicosidase lisossomal e inibidor de serinoprotease E membro 2 estava mais presente nos foliculos grandes (5 - 8 mm e > 8 mm), as proteínas haptoglobina, histona H2A tipo 1, histona H2B, glutationa S-transferase A1 e inibidor de serina protease E membro 2 apresentaram maior abundância nos foliculos pequenos (< 5 mm). Desta forma, os autores perceberam que este trabalho pode melhorar os estudos com maturação oocitária *in vitro* visando a produção de embriões, uma vez que as proteínas encontradas em maior abundância em todos os grupos estão principalmente relacionadas ao crescimento e desenvolvimento folicular e maturação oocitária. Ainda trabalhando com a importância do impacto do tamanho folicular, Paes *et al.* (2019) compararam os proteomas do fluido folicular suíno obtido de foliculos pequenos (< 4 mm), médios (4-6 mm) e grandes (> 6-12 mm). Os ovários foram coletados e o tamanho dos foliculos analisados para realizar a aspiração. O perfil proteico foi estudado por meio de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. Foram encontradas proteínas específicas do estágio de desenvolvimento do foliculo que regulam a maturação do oócito em foliculos pequenos, como a proteína Inibidor da serina peptidase (SERPINA), médios, como a proteína Ativador de plasminogênio, uroquinase (PLAU) e grandes, como a proteína Ativador de plasminogênio, receptor de uroquinase (PLAUR) (Paes *et al.*, 2019). Um resumo das principais proteínas documentadas no presente trabalho é ilustrado na Tab. 1.



Tabela 1. Descrição resumida dos principais trabalhos utilizados no estudo

Espécie	Modelo experimental	Tipo celular	Metodologia proteômica	Autor
Ratas	Isolamento de foliculos primordiais de ratas jovens (20 dias) e idosas (450 a 540 dias)	Foliculos primordiais	Eletroforese bidimensional e espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Govindaraj e Rao, 2015
Búfalos	Isolamento de foliculos primordiais de búfalos jovens e adultos	Foliculos primordiais	Western blot e espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Govindaraj et al., 2016
Suíno	Isolamento de foliculos primordiais de tecido ovariano fetal oriundos de suínos com idade gestacional 55 e idade 90	Foliculos primordiais	Eletroforese em gel unidimensional e espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Xu et al., 2017
Ratas	Cultivo dos foliculos secundários por 9 (para obtenção de foliculos com membrana basal rompida) e 12 (para obtenção de foliculos antrais) dias	Foliculos secundários e antrais	Eletroforese em gel unidimensional e espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Anastácio et al., 2017
Suíno	Coleta de células da granulosa oriundas de foliculos saudáveis e atrésicos	Células da granulosa	Espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Shan et al., 2021
Gatas	Análise de oócitos em vesícula germinativa (VG) derivadas de foliculos pré-antrais (100 a 400 µm) e antrais (> 400 µm)	Oócito	Western blotting e espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Lee et al., 2018
Camundongos	Comparação dos perfis proteômicos entre oócitos de camundongos em vesícula germinativa e em estágio de metáfase II	Oócito	Eletroforese bidimensional ( <i>bottom-up</i> )	Cao et al., 2012
Suíno	Investigação das principais proteínas envolvidas no processo de maturação <i>in vitro</i> (MIV) após MIV.	Oócitos	Eletroforese em gel unidimensional e espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Kim et al., 2011
Camundongos	Realização de análises em oócitos maturados <i>in vivo</i> oriundos de camundongas de 3, 8 e 10 semanas.	Oócito	Espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Schwarzer et al., 2014
Camundongos	Realização de coleta e análise comparativa do perfil proteico de oócitos e células troncos.	Oócito	Eletroforese em gel unidimensional e espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Pfeiffer et al., 2011
Búfalos	Realização de coleta e análise do fluido folicular para estudo do perfil proteico.	Fluido folicular	Western blot e espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Fu et al., 2016
Humano	Coleta e análise do fluido folicular para estudo do perfil proteico.	Fluido folicular	Eletroforese em gel unidimensional e espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Ambekar et al., 2013
Humano	Coleta e análise do fluido folicular de foliculos antrais pequenos.	Fluido folicular	Espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Pla et al., 2021
Búfalos	Coleta e análise do fluido folicular de foliculos antrais de acordo com o tamanho e presença ou ausência de corpo lúteo.	Fluido folicular	Espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Marques et al., 2022
Suíno	Coleta e análise do fluido folicular de foliculos antrais de acordo com o tamanho, pequenos (< 4 mm), médios (4-6 mm) e grandes (> 6-12 mm).	Fluido folicular	Eletroforese bidimensional e espectrometria de massas ( <i>bottom-up</i> )	Paes et al., 2019



### Considerações finais

O conhecimento das diferentes proteínas envolvidas no desenvolvimento folicular pode ajudar na compreensão de inúmeros eventos relacionados a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células foliculares, bem como, elucidação de mecanismos complexos como a foliculogênese. A presente revisão abordou algumas das principais proteínas, identificadas através de análise proteômica, envolvidas na foliculogênese. A identificação e o estudo das interações destas proteínas podem ajudar no aperfeiçoamento de técnicas como o cultivo *in vitro*, bastante empregado em biotécnicas reprodutivas como a MOIFOPA. No entanto, o cultivo *in vitro* assim como outras técnicas, ainda apresentam deficiências metodológicas. Essas deficiências estão diretamente relacionadas a não compreensão do desenvolvimento folicular que está também relacionado a mecanismos moleculares como a função de proteínas em cada estágio do desenvolvimento folicular. Posteriores análises, envolvendo estratégias experimentais de validação de proteínas, por meio do bloqueio com anticorpos, silenciamento por RNA de interferência ou por meio de CRISPR, podem ser utilizadas durante as avaliações para melhor compreensão relacionada a foliculogênese. Entretanto, mais estudos são necessários, pois a cada trabalho realizado mais proteínas e vias de sinalização são descobertas, tornando mais complexo o estudo e o aprimoramento das biotécnicas aplicadas a reprodução das fêmeas.

### Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

### Referências

- Ambekar AS, Nirujogi RS, Srikanth SM, Chavan S, Kelkar DS, Hindujah I, Zaverih K, Prasad TSK, Harsha HC, Pandeyd A, Mukherjee S.** Proteomic analysis of human follicular fluid: A new perspective towards understanding folliculogenesis. *J Proteomics*, v.87, p.68–77, 2013.
- Anastácio A, Rodriguez-Wallberg KA, Chardonnet S, Pionneau C, Fédérici C, Santos TA, Poirot C.** Protein profile of mouse ovarian follicles grown *in vitro*. *Mol Hum Reprod*, v.23, p.827–841, 2017.
- Araujo MS, Otávio LOHP, Scott C, Paranzini CS, Codognoto VM, Dell'Aqua CPF, Papa FO, Souza FF.** Insights into the influence of canine breed on proteomics of the spermatozoa and seminal plasma. *J. Proteom*, v.257, p.104508, 2022.
- Berendt FJ, Frohlich T, Bolbrinker P, Boelhaue M, Gungor T, Habermann FA, Wolf E, Arnold GJ.** Highly sensitive saturation labeling reveals changes in abundance of cell cycle-associated proteins and redox enzyme variants during oocyte maturation *in vitro*. *Proteomics*, v.9, p.550-564, 2009.
- Bultman SJ, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda P, Schultz RM, Magnuson T.** Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes Dev*, v.20, p.1744-1754, 2006.
- Cadenas J, Leiva-Revilla J, Vieira LA, Apolloni LB, Aguiar FLN, Alves BG, Lobo CH, Rodrigues APR, Apgar GA, Smitz J, Figueiredo JR, Maside C.** Caprine ovarian follicle requirements differ between preantral and early antral stages after IVC in médium supplemented with GH and VEGF alone or in combination. *Theriogenology*, v.87, p.321–332, 2017.
- Cao S, Guo X, Zhou Z, Sha J.** Comparative proteomic analysis of proteins involved in oocyte meiotic maturation in mice. *Mol Reprod Dev*, v.79, p.413–422, 2012.
- Expert-Bezançon A, Le Caer JP, Marie J.** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K is a component of an intronic splicing enhancer complex that activates the splicing of the alternative exon 6A from chicken -tropomyosin pre-mRNA. *J Biol Chem*, v.277, p. 16614–16623, 2002.
- Figueiredo JR, Celestino JJH, Rodrigues APR, Silva JRV.** Importância da biotécnica de Moifopa para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.143-152, 2007.
- Figueiredo JR, Cadenas J, Lima LF, Santos RR.** Advances in *in vitro* folliculogenesis in domestic ruminants. *Anim Reprod*, v.16, p.52-65, 2019.
- Fu Q, Huang Y, Wang Z, Chen F, Huang D, Lu Y, Liang X, Zhang M.** Proteome profile and quantitative proteomic analysis of buffalo (*bubalus bubalis*) follicular fluid during follicle development. *Int J Mol Sci*, v.17, p.1-20, 2016.
- Galdos-Riveros AC, Piza AR, Resende L, Maria DA, Miglino MA.** Proteômica: novas fronteiras na





pesquisa clínica. Enciclopédia Biosfera, v. 6, n.11, 2010.

**Govindaraj V, Krishnagiri H, Chauhan MS, Rao AJ.** BRCA-1 gene expression and comparative proteomic profile of primordial follicles from young and adult buffalo (*bubalus bubalis*) ovaries. *Anim Biotechnol*, <http://dx.doi.org/10.1080/10495398.2016.1210613>, 2016.

**Govindaraj V, Rao AJ.** Comparative proteomic analysis of primordial follicles from ovaries of immature and aged rats. *Syst Biol Reprod Med*, v.61, p.367–375, 2015.

**Jin J, Li Y, Ren J, Man Lam S, Zhang Y, Hou Y, Zhang X, Xu R, Shui G, Ma RZ.** Neonatal respiratory failure with retarded perinatal lung maturation in mice caused by reticulocalbin 3 disruption. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.54, p.410–423, 2016.

**Kim J, Kim JS, Jeon YJ, Kim DW, Yang TH, Soh Y, Lee HK, Choi NJ, Park SB, Seo KS, Chung HM, Lee DS, Chae J.** Identification of maturation and protein synthesis related proteins from porcine oocytes during in vitro maturation. *Proteome Sci*, v.9, p.1–12, 2011.

**Lee PC, Wildt DE, Comizzoli P.** Proteomic analysis of germinal vesicles in the domestic cat model reveals candidate nuclear proteins involved in oocyte competence acquisition. *Mol Hum Reprod*, v.24, p.14–26, 2018.

**Marques NFS, Codognoto VM, de Souza FF, Scott C, Janini LCZ, Brochine S, Oba E.** Proteomics of follicular fluid from buffaloes (*Bubalus bubalis*): unraveling the secrets of follicular development. *Livest Sci*, p.104947, 2022.

**Oliveira ACA, Carmo CVQ, Silva GGC, Pereira KSM, Sousa YN, Abdalla DR.** Relações celulares na abordagem e prognóstico do câncer de mama: revisão integrativa da literatura. *Res Soc Dev*, v. 10, p. e139101421862-e139101421862, 2021.

**Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Wilm M, Thiele BJ, Mann M, Hentze MW.** mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell*, v.89, p.597–606, 1997.

**Paes VM, Liao SF, Figueiredo JR, Willard ST, Ryan PL, Feugang JM.** Proteome changes of porcine follicular fluid during follicle development. *J Anim Sci Biotechnol*, v.10, p.1–13, 2019.

**Pfeiffer MJ, Siatkowski M, Paudel Y, Balbach ST, Baeumer N, Crosetto N, Drexler HCA, Fuellen G, Boiani M.** Proteomic analysis of mouse oocytes reveals 28 candidate factors of the "reprogrammome". *J Prot Res*, v.10, p.2140–2153, 2011.

**Pla I, Sanchez A, Pors SE, Pawlowski K, Appelqvist R, Sahlin KB, Malm J.** Proteome of fluid from human ovarian small antral follicles reveals insights in folliculogenesis and oocyte maturation. *Hum Reprod*, v.36, p.756–770, 2021.

**Schwarzer C, Siatkowski M, Pfeiffer MJ, Baeumer N, Drexler HCA, Wang B, Fuellen G, Boiani M.** Maternal age effect on mouse oocytes: new biological insight from proteomic analysis. *Reproduction*, v.148, p.55–72, 2014.

**Shan X, Yu T, Yan X, Wu J, Fan Y, Guan X, Liu Y.** Proteomic analysis of healthy and atretic porcine follicular granulosa cells. *J Proteomics*, v.232, p.104027, 2021.

**Silva RF, Lima LF, Figueiredo JR.** Avanços na tecnologia do ovário artificial em ruminantes. *Ciênc Anim*, v.30, p.98–112, 2020.

**Van Blerkom J.** Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 88, p. 5031–5035, 1991.

**Van der Westhuyzen DR, de Beer FC, Webb NR.** HDL cholesterol transport during inflammation. *Curr Opin Lipidol*, v.18, p.147–51, 2007.

**Wang F, Pan J, Liu Y, Meng Q, Lv P, Qu F, Ding GL, Klausen C, Leung PCK, Chan HC, Yao W, Zhou CY, Shi B, Zhang J, Sheng J, Huang H.** Alternative splicing of the androgen receptor in polycystic ovary syndrome. *Pnas*, [doi/10.1073/pnas.1418216112](https://doi.org/10.1073/pnas.1418216112), 2015.

**Wisniewska M, Karlberg T, Lehtio L, Johansson I, Kotenyova T, Moche M, Schüler H.** Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS One*, v.5, Article ID e8625, 2010.

**Wojnar P, Dirnhofner S, Ladurner P, Berger P, Redl B.** Human lipocalin-1, a physiological scavenger of lipophilic compounds, is produced by corticotrophs of the pituitary gland. *J Histochem Cytochem*, v. 50, p.433–5, 2002.

**Xu M, Che L, Yang Z, Zhang P, Shi J, Li J, Lin Y, Fang Z, Che L, Feng B, Wu D, Xu S.** Proteomic analysis of fetal ovaries reveals that primordial follicle formation and transition are differentially regulated. *Biomed Res Int*, Article ID 6972030, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2017/6972030>, 2017.

**Yu Z, Fotouhi-Ardakani N, Wu L, Maoui M, Wang S, Banville D, Shen SH.** PTEN associates with the vault particles in HeLa cells. *J Biol Chem*, v.277, p.40247–40252, 2002.