

Orinoquia, Enero-Junio 2020;24(1): 32-41
 ISSN electrónico 2011-2629.
 ISSN impreso 0121-3709.
<http://doi.org/10.22579/20112629.598>

Expresión proteica del fluido folicular asociado a la calidad del oocito de vacas Cebú

Follicular fluid (FF) protein expression associated with oocyte quality in Zebu cattle

Expressão proteica do fluido folicular associado a qualidade do oócito de vacas Cebú

Eliana Neira-Rivera^{1}, Sonia L. Gutiérrez^{2*}, Lidy V. Castillo-Barón^{3*}, José G. Velásquez-Penagos^{4*}, Agustín Góngora-Orjuela^{5**}; Jaime A. Cardozo-Cerquera^{6*}*

¹ MVZ, MSc

² MVZ, Esp

³ MVZ, Esp

⁴ MV, MSc, PhD

⁵ MV, MSc, PhD

⁶ MVZ, MSc, PhD

* Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-AGROSAVIA, Grupo de investigación de Reproducción Animal Tropical

** Maestría en sistemas sostenibles de salud y producción animal tropical, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio-Meta

Email: eneira@agrosavia.co

Recibido: 22 de noviembre de 2017

Aceptado: 15 de octubre de 2019

Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar la expresión de proteínas del fluido folicular (FF) y su relación con la calidad del oocito. Se evaluaron 52 ovarios de planta de faenado de vacas Cebú comercial, mediante la técnica de disección y aspiración folicular se obtuvo FF y oocitos. Las evaluaciones realizadas fueron: calidad del oocito por aspecto citoplasmático y células del cúmulo y perfil de proteínas del FF mediante SDS-PAGE. Se realizó el análisis descriptivo, a través del procedimiento MEANS, análisis de varianza (PROC. ANOVA) y para las diferencias estadísticas significativas se usó la prueba de comparación de Bonferroni con un nivel de significancia del 5%, mediante el paquete estadístico SAS®. El 52% de los oocitos se categorizaron con calidad I-II. El análisis unidimensional de las proteínas del FF evidenció la presencia de 25 bandas de proteína entre 9 y 240 kDa. En folículos <3 mm se expresaron 23 bandas, en folículos de 3 y 6 mm 19 bandas y en folículos >6mm 20 bandas. Las bandas de peso molecular (PM) de 26kDa, 57kDa y 68kDa representan la mayor concentración en el FF; 4 bandas de PM 14 KDa, 34 KDa, 76 y 79 KDa, solo en folículos de <3mm, 2 bandas de PM 9 y 91 KDa

Como Citar (Norma Vancouver):

Neira-Rivera E, Gutiérrez SL, Castillo-Barón LV, Velásquez-Penagos JG, Góngora-Orjuela A, Cardozo-Cerquera JA. Expresión proteica del fluido folicular asociado a la calidad del oocito de vacas Cebú. Orinoquia, 2020;24(1): 32-41. DOI: <http://doi.org/10.22579/20112629.598>

solo en folículos de >3 mm. La banda de 32 KDa no se observó en folículos > de 6mm. Las bandas de mayor frecuencia de presentación fueron las de 26, 40, 42, 57, 68, 240 KDa. Las bandas de proteína que se asociaron con la calidad del oocito en forma significativa ($p<0,05$) fueron las de PM 24, 57, 68 y 164 KDa para FF de folículos <3mm y las bandas de PM 13, 26 y 38 kDa entre 3 y 6mm, y la de 26 kDa a folículos > de 6mm. Los resultados nos indican asociaciones de la calidad del oocito con algunas bandas de proteína.

Palabras clave: Folículo bovino; bandas de proteínas; oocito; perfiles proteicos

Abstract

This study was aimed at determining follicular fluid (FF) protein expression and its relationship with oocyte quality. FF and oocytes were obtained by dissection and follicular aspiration of the ovaries from fifty-two commercial Zebu from a slaughterhouse. Oocyte quality was measured by cytoplasmic aspect and cumulus cells and FF protein profile by SDS-PAGE. The SAS statistical package's PROC MEANS and analysis of variance (ANOVA) were used for descriptive analysis and the Bonferroni comparison test for assessing significant statistical differences (5% significance level); 52% of the oocytes were categorised as having I-II quality. One-dimensional SDS-PAGE analysis of FF proteins revealed 25 protein bands having 9 kDa to 240 kDa molecular weight (MW); 23 bands were expressed in <3 mm follicles, 19 bands in 3 and 6 mm follicles and 20 bands in >6 mm follicles. The 26kDa, 57kDa and 68kDa bands' MW represented the highest FF concentration whereas only four bands (14 kDa, 34 kDa, 76 and 79 kDa MW) were found in <3mm follicles and only 2 bands (9kDa and 91 kDa MW) in >3 mm follicles. The 32 kDa band was not observed in >6mm follicles. The 26, 40, 42, 57, 68 and 240 KDa bands occurred with the greatest frequency. The protein bands which were significantly associated with oocyte quality ($p<0.05$) were 24, 57, 68 and 164 kDa MW for <3mm follicles, 13, 26 and 38 kDa MW bands for 3 and 6mm follicles and 26 kDa for >6mm follicles. The results indicated oocyte quality association with some protein bands.

Key words: bovine follicle; protein band; oocyte; protein profile.

Resumo

Este estudo teve como objetivo determinar a expressão de proteínas do fluido folicular (FF) e sua relação com a qualidade do oócito. Avaliou-se 52 ovários de vacas Cebú comercial colhidos em abatedouro e através da técnica de dissecação e aspiração folicular obtiveram-se o FF e os oócitos. As avaliações realizadas foram: qualidade do oócito pelo aspecto citoplasmático e células do cúmulo e o perfil de proteínas do FF mediante SDS-PAGE. Realizou-se a análise descritiva, através do procedimento MEANS, análise de variância (PROC. ANOVA) e para identificar as diferenças estatísticas significativas, utilizou-se a prova de comparação de Bonferroni com um nível de significância de 5%, através do pacote estatístico SAS®. O 52% dos oócitos foram classificados como qualidade I e II. As análises unidimensionais das proteínas do FF evidenciaram a presença de 25 bandas de proteína entre 9 y 240 kDa. Em folículos <3 mm expressaram-se 23 bandas, em folículos entre 3 e 6 mm 19 bandas e em folículos >6mm 20 bandas. As bandas de peso molecular (PM) de 26kDa, 57kDa e 68kDa são as mais frequentes no FF; 4 bandas de PM 14 KDa, 34 KDa, 76 y 79 KDa, solo em folículos de <3mm, 2 bandas de PM 9 y 91 KDa solo em folículos de >3 mm. A banda de 32 KDa não foi observada em folículos > de 6mm. As bandas mais frequentes foram 26, 40, 42, 57, 68, 240 KDa. As bandas de proteína que se associaram à qualidade do oócito em forma significativa ($p <0,05$) foram as de PM 24, 57, 68 e 164 KDa para FF de folículos <3mm e as bandas de PM 13, 26 e 38 kDa entre 3 e 6mm, e a de 26 kDa a folículos >6mm. Os resultados indicam associações entre qualidade do oócito e algumas bandas de proteína.

Palavras-chave: Folículo bovino; fluido folicular; oócito; bandas de proteína

Introducción

Los procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento y degeneración de los folículos ováricos durante el ciclo estral en bovinos han sido tema de los grupos de investigación durante las últimas décadas. El desarrollo folicular es un proceso dinámico caracterizado por la proliferación y diferenciación celular, cuyo fin es proporcionar un medioambiente óptimo para la maduración del oocito y posterior preparación para su fecundación (Amstrong y Webb, 1996). El entendimiento de la dinámica y el proceso de maduración requiere del conocimiento de los diversos aspectos que lo influyen como la esteroideogénesis, la parti-

cipación de sustancias en el fluido folicular (FF) que intervienen en la diferenciación celular, el crecimiento del folículo y la ovulación (Petrucci *et al.*, 2014), así como su efecto en las diversas formas de competencia adquiridas por el oocito. Así mismo los estudios de la composición del FF han llegado a generar indicaciones de requerimientos celulares que pueden ser usados como una guía en la formulación de medios de cultivo celular en procesos de producción de embriones *in vitro* (Gerard *et al.*, 2002).

El FF contiene proteínas entre otras moléculas que inciden en los procesos de maduración nuclear y citoplasmática del oocito (Sirard *et al.*, 1998), es especí-

fico de cada especie y puede presentar variaciones en su composición, dependientes del estado fisiológico. Dentro los procesos de maduración oocitaria se encuentran modificaciones moleculares (Kubelka *et al.*, 2000), redistribución de organelos intracelulares (Stojkovic *et al.*, 2001) y los mecanismos de liberación de Ca²⁺ (Wang *et al.*, 2003).

Los cambios estructurales en el oocito están acompañados de una serie de procesos bioquímicos, que establecen una compleja cascada de eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas, que involucran el reinicio y la regulación de la meiosis (Sousa *et al.*, 2004, Dekel 2005 y Dumont *et al.*, 2005). La pérdida de sincronía de este tipo de eventos va a influir negativamente en el desempeño y calidad de los oocitos que originaría una baja de producción de embriones viables.

Los estudios adelantados en Colombia sobre dinámica folicular han empleado herramientas como el ultrasonido y la determinación de perfiles bioquímicos en sangre. Como se mencionó anteriormente la determinación de proteínas en el FF proporcionan una comprensión más profunda en los procesos de desarrollo folicular y maduración oocitaria por la cual el objetivo de este estudio fue determinar los cambios en los perfiles de las proteínas del fluido folicular relacionados con la calidad del oocito.

Materiales y métodos

En este estudio se utilizaron ovarios, folículos, FF y oocitos de tractos uterinos de vacas Cebú comercial obtenidos en el frigorífico-Friogan de Villavicencio, Meta. La recolección del FF, y la evaluación de folículos y oocitos y la cuantificación y separación electroforética de proteínas del fluido folicular se llevó a cabo en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), en el Laboratorio de Reproducción del centro de Investigación (CI) La Libertad, ubicado en el kilómetro 17 vía Puerto López, departamento del Meta a una altura de 467 mts sobre el nivel del mar y en el laboratorio de Proteómica del centro de Investigación (CI) Tibaitatá, ubicado en el kilómetro 14 vía Mosquera, del departamento de Cundinamarca.

Obtención de los Ovarios

Los ovarios fueron extraídos de tractos uterinos de 26 hembras bovinas cíclicas (presencia de cuerpo lúteo y folículos en el ovario), de la raza cebú comercial adultas. Una vez extraídos los tractos uterinos del animal, se depositaron en una bolsa de colecta, con so-

lución de tampón fosfato salino estéril (PBS) (por sus siglas en inglés), o con solución salina 0.9 % estéril a 36 ± 1 °C %.

Evaluación del fluido folicular

El fluido folicular se obtuvo por aspiración directa del folículo ovárico con aguja calibre 16 acoplada a una jeringa de 10 mL, su contenido se colocó en viales de 2 mL; posteriormente se realizó la búsqueda de oocitos y separación del fluido folicular.

La muestra de fluido folicular se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C, posteriormente se adicionó inhibidor de proteasas (fenilmetilsulfonil fluoruro) disuelto en dimetil sulfoxido (DMSO) (por sus siglas en inglés), 3 µl por cada 1 ml de muestra, y se almacenó a -20 °C para su sucesivo uso.

Las proteínas se cuantificaron mediante el método colorimétrico descrito por Bradford, 1976. La separación de las proteínas de fluido folicular se realizó mediante electroforesis 1D SDS-PAGE de tipo desnaturante y discontinuo, según protocolo de Laemmli (1970). Los geles se digitalizaron en el documentador de imágenes Molecular Imagen Gel Doc, de Bio-Rad®. El análisis de los geles se realizó con el software Quantity One ® de Bio-Rad.

Extracción de folículos y clasificación

Luego de la recuperación de los ovarios, se extrajeron los folículos, estos fueron puestos en una placa de petri con solución de tampón fosfato salino estéril (PBS) sobre una platina calentadora 36°C; siguiendo la técnica de Caixeta *et al.*, 2008.

Posterior a la disección de los folículos, la medición del tamaño se realizó con ayuda de una lupa con ocular graduado. (Estereoscopio, Olympus®). Los folículos se categorizaron según su tamaño así: Folículos con un tamaño entre 1 a 3,0 mm (TI), folículos con un tamaño entre 3,1 a 6 mm (TII) y folículos con un tamaño 6,1 a 8 mm (TIII).

Evaluación de la calidad oocito

La evaluación de la calidad del oocito se realizó con base en el aspecto de su citoplasma y las características del cúmulo que lo rodea, para ello nos apoyamos en lo descrito por Solís *et al.*, 2012 y la modificación que se consideró fue la integración del grado III y IV. Evaluando en este estudio los grados I (GI), II (GII) y III (GIII) (tabla 1).

Tabla 1. Criterios de selección de los COCs Fuente: Solís *et al.*, 2012.

Clasificación	Descripción
Grado I	Cúmulos con capas múltiples, Cúmulos compacto, La totalidad del cúmulo es clara y transparente, citoplasma homogéneo
Grado II	Cúmulos como grado uno o algo más oscuro y menos transparente, Citoplasma con granulación más gruesa y más oscura en la periferia que en grado uno
Grado III	Cúmulos menos compacto, más oscuro que en uno o dos, Citoplasma con manchas oscuras
Grado IV	Sin cúmulos o expandidos

Análisis estadístico

El análisis de la información se apoyó en estadística descriptiva, utilizando el paquete estadístico SAS®, procedimiento MEANS, ANAVA, y CORR. Para las diferencias estadísticas significativas se usó la prueba de comparación de Bonferroni con un nivel de significancia del 5%.

Resultados

Proteínas totales del FF en folículos de ovarios de bovinos

La concentración promedio de proteína total del FF en folículos (<3mm) fue de 60,6±16,6 µg/dl; de 50,6±21,0 µg/dl en folículos (3-6mm) y de 53,4±16,3 µg/dl en folículos mayores de 6mm. Al análisis estadístico, estos valores no presentan diferencias ($p>0,05$) en función del tamaño del folículo.

En el fluido de los folículos de 3-6 mm la concentración de proteína total correlacionó positivamente ($r=0,29$, $p<0,05$) con oocitos de buena calidad, y en oocitos de mala calidad ($r=0,27$, $p<0,05$). En folículos >6 mm la concentración de proteína total correlacionó ($r=0,39$, $p<0,05$) con oocitos GII.

En estos resultados, se pudo detectar una correlación ($r=0,43$, $p<0,05$) para la concentración de proteína de fluido folicular de folículos >6mm y oocitos GII en el lado derecho del ovario.

En el ovario izquierdo la concentración de proteína del fluido folicular de folículos de 3-6 mm correlacionó ($r=0,37$, $p<0,05$) con oocitos GII y ($r=0,39$, $p<0,05$) con oocitos GIII. Mientras que en el fluido de los folículos >6 mm se encontró una correlación ($r=0,40$, $p<0,05$) con la calidad oocito GII.

Perfiles electroforéticos unidimensionales SDS- PAGE de proteínas del FF en folículos de diferentes tamaños

El análisis de las imágenes de los geles unidimensionales permitió establecer a nivel general, un número de 25 bandas de proteína expresadas en el FF de los diferentes folículos evaluados, con pesos moleculares entre 9 y 240 kDa (figura 1). En folículos de tamaño I se expresaron un total de 23 bandas de proteína con pesos moleculares entre 13 a 240 kDa, 19 bandas de proteína entre 9 a 240 kDa se expresaron en FF de folículos de tamaño II, y 20 bandas de proteína entre 9 y 240 kDa se expresaron en FF de folículos con tamaño III.

Las proteínas de 14 kDa, 34 kDa, 76 kDa y 79 kDa únicamente se expresaron en el fluido folicular de folículos de tamaño I (<3mm), de igual forma la banda de proteína de 32 kDa se presentó en los folículos de tamaños I y II y las bandas de proteína de 24 y 98 kDa en los folículos de tamaño I y III, por otra parte las bandas de proteína de 9 y 91 kDa no se presentaron en los folículos de tamaño I (figura 2).

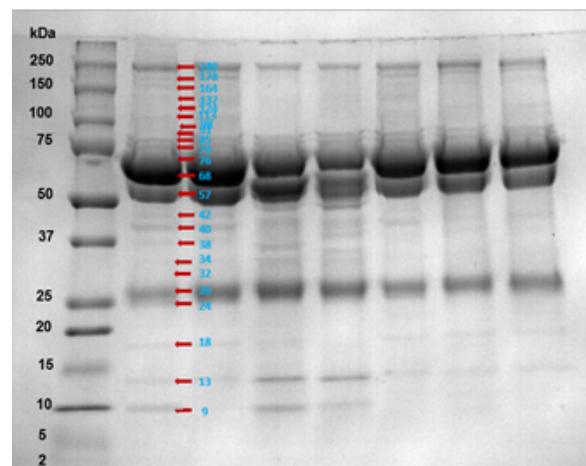


Figura 1. Perfil electroforético unidimensional de bandas de proteína de fluido folicular de ovarios de vacas Cebú comercial. El marcador de peso molecular, se ubicó al lado izquierdo de la imagen, el peso molecular de las bandas de proteínas se relacionaron en kilo Dalton (kDa). Con flechas café se señalan las bandas de proteínas presentes en este estudio.

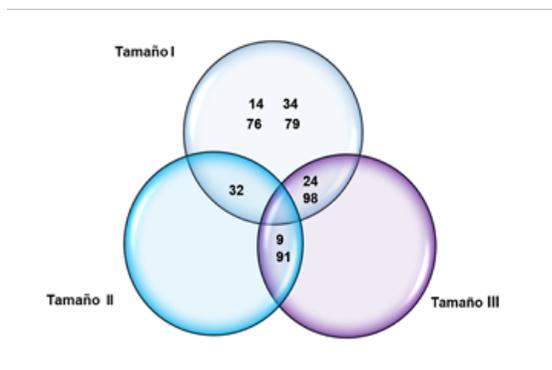


Figura 2. Análisis de expresión de bandas de proteínas de fluido folicular (peso molecular) presentes en el perfil electroforético en cada tamaño de folículo.

Concentración de las bandas de proteína de fluido folicular en folículos de tamaño I, II y III

La banda de proteína con peso molecular de 68 kDa, representa el 24,45% del total de la cantidad relativa de proteína del FF, la banda de 57 kDa el 13,65%, y la banda de 26 kDa el 20,81%, estas bandas son las que identifican a un grupo de proteínas del FF con un promedio de concentración relativo mayor, que constituyen el 58,91% de la concentración total. En contraste las bandas de proteínas de 210,164,98,91,79,76,34,32,24,14 y 9 kDa, representan solo el 7,38 %. Sobresalen en los resultados, la banda de 68 kDa como la de mayor concentración en el FF de los tres tamaños de folículo, seguida de la banda de 26 kDa y de 57 kDa. Es notorio que a medida que aumenta el tamaño folicular, aumenta la concentración de las bandas de 68 y 57 kDa, mientras es estable la concentración para la banda de 26 kDa. Se evidenció diferencia estadística ($p < 0,05$) en la concentración relativa de la banda de 164 kDa, entre el ovario derecho e izquierdo.

Frecuencia de presentación de las bandas de proteína de fluido folicular en folículos de tamaño I, II y III

Las bandas de proteínas con mayor frecuencia de presentación (80%) en folículos de tamaño I fueron las de 240 kDa, 68 kDa, 57 kDa, 26 kDa, 40 y 42 kDa y las bandas de 34, 24 y 14 kDa fueron las de menor frecuencia (20%). En folículos de tamaño II, las bandas de 240 kDa, 57 kDa, 26 kDa, 68 kDa, 85 kDa, 40 kDa, 137 kDa, 178 kDa, 42 kDa fueron las de mayor frecuencia y las de menor presentación fueron las bandas de 32 kDa, 9 kDa, 210 kDa, 91 kDa, y finalmente en folículos de tamaño III, las bandas por encima del 80% de presentación son las de 240 kDa, 210 kDa, 68 kDa, 57 kDa, 26 kDa, 85 kDa, 137 kDa, 40 kDa, y con

menor presentación las de 9 kDa, 42 kDa, 91 kDa, 124 kDa, 178 kDa, 24 kDa, 13 kDa, y 18 kDa.

Relación entre las bandas de proteínas del Fluido Folicular provenientes de folículos de diferentes tamaños y la calidad del oocito

Se observó correlación ($r = 0.66$, $p < 0.001$) entre la banda de 164 kDa y la calidad II del oocito, para el tamaño I del folículo. En este mismo tamaño de folículo se encontró que la proteína de 57 kDa se correlacionó inversamente ($r = -0.36$; $p < 0,05$) con el oocito de calidad III. En el FF del folículo de tamaño II, la proteína de 38 kDa se correlacionó ($r = 0.68$, $p < 0.003$) con la calidad I del oocito, en tanto que la banda de 26 kDa correlacionó ($r = -0.42$, $p < 0.02$) con oocitos de este mismo grado de calidad. En el tamaño III del folículo, la banda de 26 kDa correlacionó ($r = -0.53$, $p < 0.008$) con oocitos de calidad GII.

Asociación entre las proteínas del FF y la calidad del oocito en folículos de diferente tamaño en el ovario derecho

En fluido de folículos de tamaño I, la banda de 164 kDa correlacionó ($r = 0.8$, $p < 0,05$ con oocitos calidad GI, mientras que oocitos de calidad GIII correlacionaron con las bandas de 68 kDa, 57 kDa ($r = -0.45$ y -0.62 respectivamente, $p < 0.05$). En fluido de folículos de tamaño II, las bandas de 38 kDa y 26 kDa correlacionaron ($r = 0.74$ y -0.58 respectivamente, $p < 0.05$) con oocitos calidad GI. La calidad GII del oocito correlacionó ($r = 0.72$, $p < 0.05$) con la banda de 13 kDa. Las bandas de proteína de FF de folículos tamaño III, no presentaron correlaciones con la calidad del oocito del ovario derecho.

Asociación entre las proteínas del FF y la calidad del oocito en folículos de diferente tamaño en el ovario izquierdo

En fluido de folículos de tamaño I del folículo, la banda 164 kDa correlacionaron ($r = 0,62$, $p < 0,05$) con oocitos de buena calidad. La calidad GII del oocito, correlacionó ($r = 0.82$, $p < 0.02$) con la banda de 98 kDa, mientras que el oocito calidad GIII correlacionó ($r = 0.82$, $p < 0.023$) con la banda de 210 kDa. En el fluido del folículo de tamaño II, la banda de 124 kDa correlacionó ($r = 0.89$, $p < 0.05$) con el grado de calidad GIII del oocito, mientras que la banda de 68 kDa correlacionó ($r = 0.74$, $p < 0.05$). Finalmente, en el fluido del folículo tamaño III, las bandas de 68 kDa y 26 kDa se correlacionaron ($r = 0.71$ y -0.63 respectivamente, $p < 0.05$) con calidad del oocito grado II.

Calidad del oocito

Los 403 oocitos evaluados en esta investigación fueron colectadas 321 en folículos tamaño I, 69 folículos tamaño II y 13 folículos tamaño III. Se clasificaron en calidad GI (93), GII (115) y GIII (195) oocitos. Para el tamaño de los folículos <3 mm los oocitos fueron de calidad GI: 73, GII:52 y GIII: 158, en el tamaño II en calidad GI:20, GII:54, y en GIII:33 y finalmente en folículos definidos como mayores de 6 mm en calidad GII: 9 y GIII:4. En la tabla 2, se observa los promedios de oocitos obtenidos de folículos aislados del ovario derecho e izquierdo colectados de estructuras de matadero por grado de calidad (G I, GII, GIII) clasificados por la escala de Solís *et al.*, 2012, los resultados indican que para todos los tamaños determinados I, II, y III, en los grados de calidad (GI, GII, GIII) únicamente se encontró diferencia entre los oocitos de folículos de ovario derecho e izquierdo de tamaño II (3-6 mm) y clasificación de calidad GIII (Cúmulos como grado uno o algo más oscuro y menos transparente, citoplasma con granulación más gruesa y más oscura en la periferia que en grado uno) en forma significativa ($p < 0.05$).

Discusión

Las concentraciones de proteínas de fluido folicular de esta investigación se encuentran dentro de los rangos promedio de concentración de proteínas totales en fluido folicular (Villa *et al.*, 2009; Nandi *et al.*, 2007; Leroy *et al.*, 2004); sin embargo, nuestros resultados difieren de los de Aller *et al.*, 2013; Shabankareh *et al.*, 2013 en bovinos, que describen una disminución

en la concentración total de proteínas a medida que aumentaba el tamaño del folículo. Aspectos como el diámetro folicular, crecimiento oocitario y folicular conllevan a fluctuaciones en la concentración de las proteínas y otros metabolitos por una mayor capacidad de filtración en la estructura folicular en folículos grandes (Fortune y Hansel, 1985; Nandi *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2008; Tabatabaei *et al.*, 2011); y también es mayor en folículos sanos (folículos irrigados) a diferencia de folículos atresicos según Clarke *et al.*, 2006. Lo anterior respalda los resultados encontrados en esta investigación.

Para determinar la presencia de bandas de proteínas del fluido de folículos las muestras se sometieron a SDS-PAGE, evidenciándose un número de 25 bandas de proteínas similares a los descritos por Ribeiro *et al.*, 2012 e inferiores a los encontrados por Mortarino *et al.*, 1999 y Zachut *et al.*, 2016; y a los encontrados por Petrucci *et al.*, 2014 en folículos entre 15 y 40 mm; y en otros estudios de proteómica realizados en fluido folicular en búfalos (Fu *et al.*, 2016). Las bandas de proteínas detectadas en fluido folicular bovino denotan la presencia de albuminas, cadenas pesadas de inmunoglobulinas, alfa-1-antitripsina, alfa-2-macroglobulinas, angiotensinas, apolipoproteínas, antitrombinas, fibrinógeno, haptoglobulinas, lactoferrinas, transferrinas entre otras (Sunderland *et al.*, 1996; Driancourt, 2001; Fahiminiya *et al.*, 2011; Ambekar *et al.*, 2013).

Como se expresó anteriormente las bandas de proteínas con pesos moleculares de 14 y 34 kDa solo se detectaron en folículos menores 3 mm, su peso molecular sugiere que se trate de las haptoglobulinas α

Tabla 2. Promedios de oocitos clasificados por tamaño y calidad obtenidos de folículos de ovarios derecho e izquierdo.

Tamaño	Calidad	Oocitos de folículos del ovario derecho	Oocitos de folículos del ovario izquierdo
I (<3 mm)	G I	1,42±2,21a	1,38±1,79a
	GI I	2,15±2,37a	1,30±1,56a
	GIII	2,80±2,38a	3,26±3,40a
II (3-6 mm)	G I	0,61±1,16a	0,15±0,36a
	GI I	0,42±0,75a	0,19±0,49a
	GIII*	0,96±1,45a	0,30±0,78b
III (>6mm)	G I	-	-
	GI I	0,11±0,32a	0,23±0,65 ^a
	GIII	0,13±0,196a	0,11±0,32 ^a

Media \pm SEM; medias con letras diferentes indican diferencias entre grupos de tipo significativo * $p < 0,05$ o altamente significativo ** $p < 0.001$

1 chain; factores de crecimiento entre ellos IGFB2, caracterizados por aumentar la proliferación y diferenciación de células foliculares según Monget *et al.*, 1996; inmunoglobulinas con acciones en el espermatozoide y la interacción de este con el oocito, y síntesis en respuesta a agentes infecciosos (Fahiminiya *et al.*, 2011). Así mismo en este tamaño se encontraron las bandas de 76 y 79 kDa que pueden corresponder con la familia de las transferrinas (de Jong *et al.*, 1990) involucradas en el transporte de hierro, la reducción de ROS y procesos de atresia folicular. La banda de proteína de 32 kDa se identificó en los folículos de tamaño I y II, que puede corresponder a los factores de complemento C3 (31,84 PM aprox.) según Bianchi *et al.*, 2013; los genes de esta proteína tienen acción reguladora de hormonas tiroideas, glucocorticoides y de estrógenos entre otros (Fahiminiya *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2013). Las bandas 98 y 24 kDa se encontraron en el fluido de folículos de tamaño I y III, la primera puede ser una proteína de la familia de las gelatinasas, y la segunda corresponder a factores de crecimiento insulínico (tipo 4) de importancia en procesos de crecimiento y desarrollo folicular. Las bandas de 9 y 91 kDa detectadas en los tamaños II y III, podrían ser: la de 9 kDa una proteína relacionada con el factor de crecimiento como el epidermal, este tipo de proteínas son exclusivas de la interacción de las células granulosa, de la teca y el metabolismo folicular (Schweigert *et al.*, 2006, Hill 1989 y Jans *et al.*, 1998). La banda de proteína de 91 kDa identificada podría ser una proteína relacionada con la gelsolina, participa en procesos contráctiles y morfogenéticos que ocurren durante el desarrollo folicular, ovulación modulando la actividad de la actomiosina ATPasa (Teubner *et al.*, 1994).

En este estudio se encontró que las bandas 68 kDa, 57 kDa, 26 kDa son las que representan mayor concentración en los tres tamaños foliculares. Ribeiro *et al.*, 2012 y Gradela *et al.*, 1998 reportaron como bandas de mayor concentración las de 68 y 26 kDa. La concentración de las bandas de proteína de 68 y 57 kDa aumenta en forma progresiva a medida que el tamaño folicular es mayor. La banda de 68 kDa podría corresponder a la albumina sérica bovina que fuera reportada por Ribeiro *et al.*, 2012 como la de mayor frecuencia y concentración en fluido folicular, esta banda de proteína ha sido descrita igualmente en semen bovino (Oberst *et al.*, 2002) y en fluido uterino (Alavi *et al.*, 2006). Principal proteína del plasma, la cual es de fundamental importancia para la regulación de la presión oncótica, transporte de hormonas tiroideas, ácidos grasos, ácidos grasos libres, mantenimiento pH entre otras (Fahiminiya *et al.*, 2011; Ambekar *et al.*, 2013). Su concentración y presencia en los perfiles

podría explicar su expresión en este estudio. La banda de 57 kDa identificada en nuestro estudio puede corresponder bien sea a la serpina o a la cadena pesada de la inmunoglobulina G (IgG) Ulbrich *et al.*, 2009. La banda de 26 kDa posiblemente corresponda a la proteína ligante de IGF-4 (IGFBF-4) según Gradela *et al.*, (1998) y ha sido detectada en células de la teca, especialmente aislada de folículos de menor tamaño, dicha proteína aumenta su concentración dependiendo de los niveles de LH (Amstrong *et al.*, 1996).

De las 25 bandas detectadas solamente la banda de 164 kDa presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) en los diferentes tamaños del ovario derecho e izquierdo. Esta banda puede ser la descrita por Andersen *et al.*, 1976, como una proteína del grupo de las inmunoglobulinas o de la inhibina subunidad α (Austin *et al.*, 2001).

Como se describió anteriormente se encontraron correlaciones de las bandas de 164 kDa con oocitos de calidad regular y la banda 57 kDa con oocitos de mala calidad en los folículos < 3 mm, al respecto Tao *et al.*, 2014 reportaron una proteína de peso molecular aproximado 54,9 kDa como la vitamina D, la cual se asocia con atresia folicular durante la foliculogénesis (Tao *et al.*, 2014), lo cual explicaría el resultado encontrado en la presente investigación. La banda de proteína 164 kDa se ha relacionado con inhibinas con acción principal en la secreción FSH y en otros factores producidos localmente en la gónada (IGF-I; TGF- β , activina) (Colazo y Mapletoft, 2014).

Las bandas de 26 y 38 kDa que correlacionaron con oocitos de buena calidad en folículos de 3-6 mm pueden corresponder a proteínas identificadas como factores de crecimiento producidos en los oocitos, células tecales y de la granulosa en las diferentes etapas de desarrollo folicular, estas están involucrados en la proliferación y diferenciación de células foliculares mediante la activación de acciones de las gonadotropinas que ejercen funciones como la esteroidogénesis, maduración del oocito (Knight y Glister 2003). El anterior argumento explicaría los resultados de este trabajo. Llama la atención que en folículos > 6 mm la acción de la banda de 26 kDa tiene un efecto contrario al mencionado anteriormente con respecto a la calidad del oocito.

En el caso de la evaluación de calidad por cúmulos y citoplasma del oocito (Solís *et al.*, 2012), los oocitos calidad tipo I evaluados en nuestros estudios presentan porcentajes inferiores a los reportados en vacas y novillas (Rizos *et al.*, 2005); y en ovarios de hembras *Bubalus bubalis* utilizando la técnica de disección foli-

cular (Quintana *et al.*, 2012), pero fueron similares a los porcentajes descritos por Leal *et al.*, 2010 en esta misma especie.

El número de oocitos calidad grado GII fue mayor en folículos con tamaños <3 y 6 mm, del ovario derecho. En este mismo tamaño de folículos, el porcentaje de oocitos clasificados como calidad GIII es mayor ($p < 0.05$) en el ovario izquierdo. Los porcentajes reportados en el Grado II de calidad oocitaria son ligeramente inferiores a los obtenidos en búfalos en técnicas de aspiración y disección de folículos (Leal *et al.*, 2010; Quintana *et al.*, 2012) y en aspiración guiada por ultrasonido en vacas y novillas (Rizos *et al.*, 2005).

Este resultado sugiere existen diferencias entre los ovarios, asociadas con los oocitos de calidad mala (GIII) y el tamaño folicular clasificado como II, debido al fase de crecimiento del folículo en el ciclo estral. Por otra parte, al considerar los valores obtenidos por tamaño de folículos I, II, III y calidad buena (GI) y regular GII de los oocitos, su porcentaje es de 51% oocitos similar a los que se seleccionan para procesos *in vitro*.

Conclusiones

La concentración de proteína total en el fluido folicular es un indicador de la calidad del oocito.

Este trabajo permitió establecer la presencia de determinadas bandas de proteínas en etapas específicas del desarrollo folicular.

Los resultados de esta investigación demostraron la importancia del análisis proteómico en la búsqueda de bandas de proteínas asociadas en la calidad del oocito.

La expresión, presentación y concentración de bandas de proteína varían con el tamaño del folículo, y la composición del fluido influye en la calidad del oocito.

Recomendaciones

Los resultados encontrados ameritan realizar nuevas investigaciones que permitan aclarar la función de estas proteínas en el crecimiento folicular.

Es conveniente adelantar procedimientos más sensibles que permitan obtener información de las diferentes etapas del ciclo estral en bovinos y realizar la secuenciación las proteínas detectadas.

A partir de esta investigación se pueden adelantar estudios en búsqueda de marcadores de calidad oocitaria que permitan seleccionar hembras de mayor fertilidad.

Agradecimientos

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. AGROSAVIA

Frigorífico-Friogan Villavicencio

Dra. Shirley Flórez.

Referencias

- Alavi-Shoushtari S, 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. *Anim Reprod Sci*, 2006;96(1-2):10-20
- Aller JF, Callejas SS, Alberio RH. Biochemical and steroid concentrations in follicular fluid and blood plasma in different follicular waves of the estrous cycle from normal and superovulated beef cows. *Anim Reprod Sci*, 2013;142:113-120
- Ambekar A, Nirujogi R, Srikanth S, Chavan S, Kelkar D, Hinduja J, et al. Proteomic analysis of human follicular fluid: A new perspective towards understanding folliculogenesis. *J Proteomics*. 2013;87:68-77
- Andersen M, Kroll J, Byskov A, Faber M. Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. *J Reprod Fertil*. 1976;48(1):109-118
- Angelucci S, Ciavardelli D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, et al. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2006;1764(11):1775-1785
- Armstrong D, Hogg C, Campbell B, Webb R. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein production by primary cultures of ovine granulosa and theca cells. The effects of IGF-I, gonadotropin, and follicle size. *Biol Reprod*. 1996;55(5):1163-1171.
- Austin EJ, Mihm M, Evans ACO, et al. Alterations in Intrafollicular Regulatory Factors and Apoptosis During Selection of Follicles in the First Follicular Wave of the Bovine Estrous Cycle. *Biol Reprod*. 2001;64:839-848
- Bianchi L, Gagliardi A, Campanella G, Landi C, Capaldo A, Carleo A, et al. A methodological and functional proteomic approach of human follicular fluid en route for oocyte. *J Proteom*. 2013;90:61-76
- Bijttebier J, Tilleman K, et al. Comparative proteome analysis of porcine follicular fluid and serum reveals that excessive alpha (2)-macroglobulin in serum hampers successful expansion of cumulus-oocyte complexes. *Proteomics*, 2009;9:4554-4565
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254
- Briggs D, Sharp D, Miller D, Gosden R. Transferrin in the developing ovarian follicle: evidence for de-novo expression by granulosa cells. *Mol Hum Reprod*; 1999;5(12):1107-1114
- Clarke H, Hope S, Byers S, Rodgers RJ. Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. *Reprod*. 2006;132(1):119-131

- Colazo MG, Mapletoft RJ. Fisiología del ciclo estral bovino. Conference Paper. De Jong G, van Dijk JP, van Eijk HG. 1990. The biology of transferrin. *Clin Chim Acta*. 2014;190(1-2):1-46
- Dekel N. Cellular Biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol cell endocrinol*. 2005;235:19-25
- Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 2001;55(6):1211-1239
- Dumont J, Umbhauer M, et al. p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes. *J Cell Biol*. 2005;169:227-231
- Fahiminiya S, Reynaud K, Labas V, Batard S, Chastant-Maillard S, Gérard N. Steroid hormones content and proteomic analysis of canine follicular fluid during the preovulatory period. *Reprod Biol*. 2010;8(1):132
- Fahiminiya S, Labas V, Roche S, Dacheux J, Gérard N. Proteomic analysis of mare follicular fluid during late follicle development. *Proteome Sci*. 2011;9:54.
- Fortune JE, Hansel W. Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biol Reprod*. 1985;32:1069-1079
- Fu Q, Huang Y, Wang Z, Chen F, Huang D, Lu Y, et al. Proteome Profile and Quantitative Proteomic Analysis of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Follicular Fluid during Follicle Development. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5):618. Doi: 10.3390/ijms17050618
- Gérard N, Loiseau S, Duchamp G, Seguin F. Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (1H NMR). *Reprod*. 2002;124(2):241-248
- Gradela A, Roncoletta M, Morani C, Esper C, Franceschini P. Proteínas ligantes do insulin-like growth factor (IGFBPs) e dominância folicular em vacas *Bos taurus indicus puras e cruzadas*. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 1998;35(5):218-220
- Hill D J. Growth factors and the intracellular actions. *J Reprod Fertil*. 1989;85:723-734
- Jans D, Hassan G. Nuclear targeting by growth factors, cytokines and their receptors: a role in signaling?. *Bioessays*. 1998;20:400-411
- Knight P, Glistler C. Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci*. 2003;78:165-183
- Kubelka M, Motlik J, et al. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biol Reprod*. 2000;62:292-302
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(259):680-685
- Leal LS, Moya CF, Fernandes CB, Martins LR, Landim FC, Oba E. 2010. Evaluation of recovery, quality and in vitro nuclear maturation of oocytes obtained from Buffalo and Bovine Ovaries. 9no Congreso de búfalo, Argentina.
- Leroy J, Vanholder T, Delanghe J, Opsomer G, Van Soom A, Bols P, De Kruif A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 2004; 80(3-4):201-211
- Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C, Monniaux D. Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. *Horm Res*. 1996;45(3-5):211-217
- Mortarino M, Vigo D, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bovine ovarian fluid proteins. *Electrophoresis*. 1999;20:866-869
- Nandi S, Girish-Kumar V, Manjunatha BM, Gupta PSP. Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. *Dev.Growth Differ*. 2007;49:61-66
- Oberst E, Jobim M, Cimarosti H, Souza D, Salbego C, Wald V, Mattos R. Imunoidentificação de Albumina e Osteopontina no Plasma Seminal de Reprodutores Taurinos e Zebuínos. *Semina: Ciências Agrárias*, 2002;23(1):21-28
- Otsuka F. Multiple endocrine regulation by bone morphogenetic protein system. *Endocr J*. 2010;57(1):3-14
- Petrucchi BPL, Wolf CA, Arlas TR, Santos GO, Estanislau JF, Fiala S, Mattos RC. Proteomics of mare follicular fluid during follicle development. *J Equine Vet Sci*. 2014;34(1):115-116
- Psilopanagiotti A, Papadaki H, Kranioti EF, Alexandrides TK, Varakis JN. Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. *Neuroendocrinology*; 2009;1:38-47. doi: 10.1159/000151396
- Quintana MD, Campos PEC, Herrera P, Gallego C, Padrón E. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización *in vitro* FIV obtenidos de hembras *bubalus bubalis* enviadas a matadero. *Rev Salud Anim*. 2012;34(1):53-56
- Rahman Zia-Ur, Bukhari SA, Ahmad N, Akhtar N, Ijaz A, Yousaf MS, Haq IU. Dynamics of follicular fluid in one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Reprod Domes Anim*. 2008;43:664-671
- Ribeiro R, Santos A, Castilho C, Giometti J, Guaberto L, Ambiel A, Giometti I. Perfil proteico do líquido folicular coletado de ovários em diferentes fases do ciclo estral de bovinos. *Colloquium Agrariae*. 2012;8(2):65-74
- Rizos D, Burke L, Duffy P, Wade M, Mee JF, Farrel KO, et al. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. *Theriogenology*. 2005;63:939-949
- Rodríguez F, Martínez A, Tovar S, Pinilla L, Tena-Sempere M, Dieguez C, et al. Regulation of Pituitary Cell Function by Adiponectin. *Endocrinology*. 2007;148(1):401-410
- Shabankared HK, Kor NM, Hajarian H. The influence of the corpus luteum on metabolites composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 2013;140:109-114
- Shamay A, Homans R, Fuerman Y, Levin I, Barash H, Silanikove N, et al. Expression of Albumin in Nonhepatic Tissues and its Synthe-

- sis by the Bovine Mammary Gland. *J Dairy Sci.* 2005;88(2):569-576
- Schweigert FJ, Gericke B, Wolfram W, Kaisers U, Dudenhausen JW. Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF. *Human Reproduction.* 2006;21(11):2960-2968
- Sirard MA, Richard F, et al. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology.* 1998;49:483-497
- Solís CA, Guerra R, Sandoya G, De Armas R. Efecto de sincronización de la onda folicular y de la frecuencia de aspiración de folículos en novillas de la raza Brahman. *REDVET Rev Electrón Vet.* 2012;13(10):1-16
- Sousa PA, Silva SJM, et al. Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: A paradigm for cellular totipotency. *Cloning Stem Cells.* 2004;6:375-385
- Stojkovic M, Machado SA, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol Reprod.* 2001;64:904-909
- Sunderland SJ, Knight PG, et al. Alterations in Intrafollicular Levels of Different Molecular-Mass Forms of Inhibin During Development of Follicular-Phase and Luteal-Phase Dominant Follicles in Heifers *Biol of Reprod* 1996;54:453-462
- Tabatabaei S, Mamoei M, Aghaei A. Dynamics of ovarian follicular fluid in cattle. *Comp Clin Pathol.* 2011;20:591-595
- Tao J, Zhao G, Zhao X, Li F, Wu X, Hu J, Zhang Y. Proteomic analysis of the follicular fluid of Tianzhu white yak during diestrus. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):4481-4491
- Ulbrich S, Frohlich T, Schulke K, Englberger E, Waldschmitt N, Arnold G, et al. Evidence for Estrogen-Dependent Uterine Serpin (SERPINA14) Expression During Estrus in the Bovine Endometrial Glandular Epithelium and Lumen. *Biol Reprod.* 2009;81(4):795-805
- Valck SDM, De Bie J, Michiels ED, Goovaerts IG, Punjabi U, Ramos-Ibeas P, Leroy JL. The effect of human follicular fluid on bovine oocyte developmental competence and embryo quality. *Reproductive Bio Medicine Online.* 2015;30(2): 203-207
- Villa N, Pulgarín E, Tabares P, Angarita E, Ceballos A. Medidas corporales y concentración sérica y folicular de lípidos y glucosa en vacas Brahman fértiles y subfértiles. *Pesqui Agropecu Bras.* 2009;44(9):1198-1204
- Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem.* 2003;278(41):40352-40363
- Wang W, Day B N, et al., How does polyspermy happen in mammalian oocytes *Microsc Res Tech.* 2003;61:335-341
- Yoo S, Bolbot T, Koulova A, Sneeringer R, Humm K, Dagon Y, et al. Complement factors are secreted in human follicular fluid by granulosa cells and are possible oocyte maturation factors. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013;39(2):522-527
- Zachut M, Sood P, Levin Y, Moallem U. Proteomic analysis of preovulatory follicular fluid reveals differentially abundant proteins in less fertile dairy cows. *J Proteomics.* 2016;139:122-129

Eliana Neira:<https://orcid.org/0000-0002-8940-5885>
 José Velásquez:<https://orcid.org/0000-0001-8023-1367>
 Jaime Cardozo:<https://orcid.org/0000-0002-7744-2881>
 Agustín Gongora:<https://orcid.org/0000-0002-2915-683X>
 Sonia Gutierrez:<https://orcid.org/0000-0002-8329-8302>
 Lidy Castillo: <https://orcid.org/0000-0002-9437-0728>