



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**VICTOR MACÊDO PAES**

**PROTEÔMICA DE FLUIDO FOLICULAR *IN VIVO* E O EFEITO DO MEIO DE  
BASE, DA INSULINA E DA TIROXINA NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS  
OVARIANOS**

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2020**

VICTOR MACÊDO PAES

PROTEÔMICA DE FLUIDO FOLICULAR *IN VIVO* E O EFEITO DO MEIO DE BASE,  
DA INSULINA E DA TIROXINA NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS  
OVARIANOS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Fisiológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas. Área de concentração: Fisiologia de órgãos e sistemas.  
Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo.  
Coorientador: Prof. Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira.

FORTALEZA - CEARÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Paes, Victor Macêdo.

Proteômica de fluido folicular in vivo e o efeito do meio de base, da insulina e da tiroxina no cultivo in vitro de folículos ovarianos [recurso eletrônico] / Victor Macêdo Paes. - 2020.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 199 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2020.

Área de concentração: Fisiologia de órgãos e sistemas.

Orientação: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo.

Coorientação: Prof. Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira.

1. Folículo ovariano. 2. Insulina. 3. Meio de base. 4. Proteômica. 5. Tiroxina. I. Título.

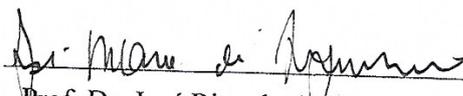
VICTOR MACÊDO PAES

PROTEÔMICA DE FLUIDO FOLICULAR *IN VIVO* E O EFEITO DO MEIO DE BASE,  
DA INSULINA E DA TIROXINA NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS  
OVARIANOS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Fisiológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

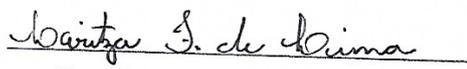
Aprovado em: 20 de fevereiro de 2020.

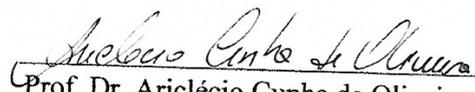
BANCA EXAMINADORA

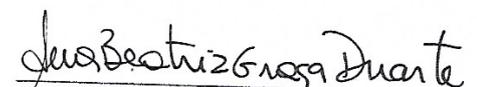
  
Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo

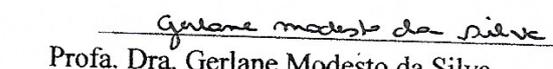
Orientador

(Universidade Estadual do Ceará)

  
Dra. Laritza Ferreira de Lima  
(Universidade Estadual do Ceará)

  
Prof. Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira  
Coorientador  
(Universidade Estadual do Ceará)

  
Profa. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte  
(Universidade Federal do Ceará)

  
Profa. Dra. Gerlane Modesto da Silva  
(Universidade Federal Rural do Semi-Árido)

Ao Deus Pai, agradeço a dádiva da vida.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) pela capacitação profissional que me proporcionaram. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo concedido na forma de bolsa de estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo pela paciência e entusiasmo no desenvolvimento tanto científico quanto humano de seus alunos. Ao Dr. Jean Feugang por ter me recebido na Mississippi State University como um pai e ter me orientado da melhor forma possível. A Dra. Ana Paula Rodrigues por ter me recebido muito bem no grupo. Ao Dr. Ariclécio Oliveira pela pronta disposição na coorientação do trabalho. Aos Dr. Luis Vieira e Dra. Laritza Lima por “pegarem a minha mão” e contribuírem de forma substancial na condução da pesquisa. Aos meus queridos amigos e parceiros de trabalho Dra. Anna Clara Acciolly, Dra. Naíza Sá, Dr. Jesus Cadenas e Dr. Hudson Correia. Ao “Chefe João” por sua amizade. A todos os membros do LAMOFOPA, que contribuem com o nosso aprimoramento contínuo. Aos amigos e companheiros de jornada Ms. Renato da Silva, Ms. Éverton Pimentel, Dra. Denise Guerreiro, Dr. Gildas Tetaping.

À minha família, suporte terreno. Ao meu pai Oscar Paes pela amizade e companheirismo. À parceria dos meus irmãos Caio Macêdo, Fernanda Monteiro e Júnior Paes. Ao meu padrasto Paulo Monteiro pela constituição de um novo ciclo familiar. À minha amada mãe Waléria Macêdo que mostrou-me o amor incondicional. À minha avó Terezinha Macêdo, a quem sempre incentivou o caminho da educação. A minha querida esposa Jéssica Macêdo por ser um anjo em minha vida.

Agradeço à Deus por toda a sua generosidade e bênçãos em minha vida.

“Ame o seu próximo como a si mesmo.”

(Mateus 22:39)

## RESUMO

Os objetivos da presente tese foram: verificar o efeito de diferentes meios de base suplementados com duas concentrações de insulina sobre o desenvolvimento de folículos secundários e terciários caprinos (Fase I); avaliar o efeito da associação entre tiroxina (T4) e insulina sobre as taxas de sobrevivência e desenvolvimento folicular, produção de estradiol e espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como a análise da expressão de genes responsáveis pela apoptose e relacionados aos receptores de insulina e tireóide em folículos primordiais caprinos (Fase II); avaliar a dinâmica do perfil proteico e as análises funcionais do fluido folicular (FF) recuperados de folículos porcino pequeno, médio e grande *in vivo* (Fase III); avaliar o proteoma do FF de folículos porcino pequeno e grande *in vivo*, utilizando duas abordagens proteômicas *shotgun* e baseada em gel (2-DE) (Fase IV). Na Fase I, folículos secundários e terciários foram cultivados *in vitro* isolados por 18 dias em meio  $\alpha$ MEM ou TCM199 suplementado com insulina 10 ng/mL ou 10  $\mu$ g/mL. Na Fase II, folículos primordiais foram cultivados *in vitro* inclusos em córtex ovariano por 1 ou 7 dias em meio  $\alpha$ MEM suplementado com insulina 10 ng/mL ou 10  $\mu$ g/mL na presença ou ausência de tiroxina 0,5, 1 ou 2  $\mu$ g/mL. Na Fase III, FF de folículos porcino pequeno, médio e grande foram destinados a uma análise proteômica livre de gel. Na Fase IV, apenas FF de pequenos e grandes folículos porcino foram submetidos a ambas abordagens proteômicas *shotgun* e 2-DE. Na Fase I, folículos secundários e terciários cultivados em meio  $\alpha$ MEM tiveram respectivamente, melhores taxas de sobrevivência e crescimento que os cultivados em TCM199. Além disso,  $\alpha$ MEM acrescido de insulina 10 ng/mL potencializou o crescimento oocitário. A Fase II demonstrou que a associação de insulina e T4 em baixa concentração foi melhor para a manutenção da integridade folicular e dos níveis de EROs. Além disso, os tratamentos que utilizaram insulina 10 ng/mL apresentaram melhores níveis de estradiol e da taxa Bcl2/Bax. Entretanto, a combinação de insulina e T4 em altos níveis aumentaram a ativação e crescimento folicular. A Fase III revelou um aumento no número de proteínas de acordo com o tamanho folicular com 60% das proteínas sendo estágio específica, 12% compartilhadas entre pares e 247 proteínas comuns entre as amostras. Além disso, foram observadas flutuações na categorização funcional de componente celular, função molecular e processo biológico. Na Fase IV, *shotgun* detectou 4245 proteínas, enquanto 2-DE revelou 2321 spots. Ambas as técnicas tiveram 6 proteínas diferencialmente expressas em pequenos e grandes folículos. As proteínas *up-regulated* em folículos pequenos estão envolvidas na maturação oocitária, enquanto grandes folículos tiveram uma *up-regulation* em proteínas que atuam no processo de

ovulação. Como conclusão, o meio de base  $\alpha$ MEM suplementado com insulina 10 ng/mL melhorou o crescimento de oócitos de folículos secundários e terciários (Fase I); altas concentrações de insulina e tiroxina melhoraram o desenvolvimento de folículos primordiais (Fase II); a Fase III e IV revelaram uma análise proteômica ampla e funcional do fluido folicular durante o final da foliculogênese.

**Palavras-chave:** Folículo ovariano. Insulina. Meio de base. Proteômica. Tiroxina

## ABSTRACT

The objectives of this study were: to investigate the effect of different base medium supplemented with two insulin concentrations on development of secondary and tertiary caprine follicles (Phase I); to evaluate the association between thyroxine (T4) and insulin on follicle survival and development, estradiol and reactive oxygen species (ROS) production, and gene expression related to apoptosis and both insulin and thyroid receptors in caprine primordial follicles (Phase II); to evaluate the proteome dynamic and functional analysis of follicular fluid (FF) from small, medium and large porcine follicles *in vivo* (Phase III); to investigate the proteome of small and large porcine follicles *in vivo*, using both proteomic approach shotgun and gel-based (2-DE) (Phase IV). In Phase I, isolated secondary and tertiary follicles were *in vitro* cultured for 18 days in  $\alpha$ MEM or TCM199 supplemented with insulin 10 ng/mL or 10  $\mu$ g/mL. In Phase II, primordial follicles were *in vitro* cultured enclosed in ovarian tissue for 1 or 7 days in absence or presence of T4 at 0.5, 1 or 2  $\mu$ g/mL. In Phase III, porcine FF from small, medium and large follicles were submitted to gel-free proteomic analysis. In Phase IV, only porcine FF from small and large follicles were evaluated by both shotgun and 2-DE. Phase I, secondary and tertiary follicles cultured in medium  $\alpha$ MEM improved respectively, survival and growth than using TCM199. Furthermore,  $\alpha$ MEM supplemented with insulin 10 ng/mL yielded greater oocyte diameter. Phase II shows that low levels of insulin and T4 was better to the maintenance of follicle integrity and ROS. Moreover, treatments using insulin 10 ng/mL present greatest estradiol levels and Bcl2/Bax ratio. However, higher levels of insulin and T4 enhance follicle growth and activation. Phase III revealed an increase in protein detection according follicle size, with 60% of total proteins specific to each sample, 12% were shared in pairwise comparisons, and 247 proteins were common across samples. In addition, functional categorization indicated fluctuations per cellular component, molecular function, and biological process categories across samples. In Phase IV, shotgun detected 4245 proteins, while 2321 spots were obtained by 2-DE. Both approach had six of these proteins being differently expressed between small and large follicles. The proteins up-regulated in small follicles were directed to oocyte maturation support, while those up-regulated in large follicles were involved in preparation for ovulatory process. As conclusion, base medium  $\alpha$ MEM supplemented with insulin 10 ng/mL improve oocyte growth of secondary and tertiary follicles (Phase I); higher levels of insulin and thyroxine enhance primordial follicle development (Phase II); the Phases

III and IV provides broad and functional analysis of the follicular fluid proteome during late folliculogenesis.

**Keywords:** Ovarian follicle. Insulin. Base medium. Proteomic. Thyroxine.