

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO LÍQUIDO FOLICULAR DE VACAS
GESTANTES**

Diego Souza Moura

Botucatu - SP
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO LÍQUIDO FOLICULAR DE VACAS
GESTANTES**

DIEGO SOUZA MOURA

Dissertação de Defesa apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista como pré-requisito para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Botucatu – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Moura, Diego Souza.

Análise proteômica do líquido folicular de vacas
gestantes / Diego Souza Moura. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia

Orientador: Fabiana Ferreira de Souza

Coorientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Bovino - Reprodução. 2. Vaca. 3. Prenhez. 4. Proteômica.
5. Foliculo ovariano. 6. Veterinária - Pesquisa.

Palavras-chave: Bovinos; Fluido folicular; Foliculo;
Prenhez; Proteínas.

Nome do autor: Diego Souza Moura

Título: ANÁLISE PROTEÔMICA DO LÍQUIDO FOLICULAR DE VACAS GESTANTES

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu /SP

Prof. Dra Eunice Oba

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu /SP

Prof^a. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos

Membro

Departamento de Física e Biofísica - IBB - UNESP – Botucatu /SP

Data da Defesa: 29 de Março de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe Mara, meus irmãos Daniel e Debora e a minha Tia Justa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus amigos Tarcisio e Carol, que acompanharam e ajudaram.

Ao Frigorífico Vale do Paraíso e ao Rafael Médico Veterinário Responsável Técnico no Controle de Qualidade pelo fornecimento das peças anatômicas que foram tão necessárias para o projeto e pela paciência da minha ausência.

Também a Professora Dra. Thaís Regiani Cataldi, responsável pelo Laboratório Max Feffer Genética de Plantas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. (ESALQ Piracicaba).

A Professora Dra. Eunice Oba pelo auxílio e principalmente a Professora Dra. Fabiana Ferreira de Souza que sempre me orientou desde a graduação.

“Nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos em Deus”

Aristóteles

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO 1.....	9
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. <i>Fisiologia do ciclo estral das vacas</i>	2
2.2. <i>Proteômica do líquido folicular</i>	7
2.3. <i>Considerações finais</i>	12
3. REFERÊNCIAS.....	13
4. HIPÓTESE E OBJETIVO.....	24
4.1. <i>Hipótese</i>	24
4.2. <i>Objetivo principal</i>	24
4.3. <i>Objetivo específico</i>	24
CAPÍTULO 2.....	50
RESUMO.....	26
1. Introdução.....	27
2. Materiais e métodos.....	28
2.1. <i>Colheita e preparação das amostras</i>	28
2.2. <i>Concentração de proteínas totais no líquido folicular</i>	29
2.3. <i>Concentração hormonal do líquido folicular</i>	30
2.5. <i>Espectrometria de massas</i>	31
2.5.1. <i>Digestão de In-gel de proteínas</i>	31
2.5.2. <i>Purificação das amostras</i>	32
2.5.3. <i>LC-MS^E</i>	32
2.5.4. <i>Análise dos dados</i>	33
3. Resultados.....	33
4. Discussão.....	50
4. Referências.....	26

RESUMO

MOURA, D.S. ANÁLISE PROTEÔMICA DO LÍQUIDO FOLICULAR DE VACAS GESTANTES. Botucatu – SP. 2015. 46 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

No ciclo estral das vacas ocorre uma série de eventos que se repetem até o impedimento da luteólise, pela presença do embrião no útero, que provoca alterações no organismo materno de ordens hormonais, anatômicas e comportamentais. Apesar disso, a colheita de oócitos em vacas gestantes é uma alternativa para a produção *in vitro* de embriões. No entanto, em vista do perfil hormonal durante a gestação, os fatores envolvidos no desenvolvimento folicular podem ser comprometidos. Em vista disso, este estudo objetivou descrever o perfil proteico do líquido folicular de vacas gestantes. Foram colhidos ovários de 36 vacas gestantes em terço inicial de gestação. O líquido folicular foi puncionado e o diâmetro de cada folículo foi mensurado pela ultrassonografia, sendo classificados em três categorias $\leq 6,4\text{mm}$, $6,5\text{mm}$ a $8,9\text{mm}$ e ≥ 9 . Após duas centrifugações para remoção dos componentes celulares, as proteínas totais foram mensuradas e a eletroforese unidimensional realizada sob condições desnaturantes e redutoras. As bandas foram recortadas e a digestão *in gel* realizada objetivando a espectrometria de massas. A concentração de estrógeno e progesterona foi mensurada no líquido folicular para determinar a viabilidade dos folículos. Foram encontradas 46 bandas de proteínas na eletroforese em 67 amostras de líquido folicular. A média da concentração \pm desvio padrão da progesterona foi de $71,32 \pm 80,06$ ng/mL e estrógeno de $27,57 \pm 30,62$ ng/mL, considerando todos os folículos. Houve expressão diferenciada de proteínas nas diferentes categorias de folículos. Na espectrometria de massas foram encontradas diversas proteínas, sendo as principais apolipoproteína, angiotensinogênio, *heat shock protein*, glutatona e suas isoformas.

Palavras-chave: folículo, proteínas, fluído folicular, bovinos, prenhez , OPU.

ABSTRACT

MOURA, D.S. PROTEOMIC ANALYSIS OF FOLLICULAR FLUID FROM PREGNANT COWS. Botucatu – SP. 2015. 46 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Estrous cycle of cows has a series of events that are repeated until the luteolysis impediment, because the presence of embryo in the uterus, which causes hormonal, anatomical and behavioral orders, changes in the maternal organism. Nevertheless, the ovum pick-up in pregnant cows is an alternative to the *in vitro* production of embryos. However, in view of the hormonal profile during pregnancy, the factors involved in follicular development may be impaired. Thus, this study aimed to describe the protein profile of follicular fluid from pregnant cows. Ovaries were collected from 36 pregnant cows with gestational age 1-4 months. Follicular fluid was punctured and the diameter of each follicle was measured by ultrasonography, classified into three categories ≤ 6.4 mm, 6.5 to 8.9 mm and ≥ 9 . After two centrifugation to remove the cellular components, total protein were measurement and unidimensional electrophoresis was performed under denaturing and reducing conditions. The bands were cut and digestion in gel was carried out aiming to mass spectrometry. The concentration of estrogen and progesterone in follicular fluid was measured to determine the viability of follicles. We found 46 protein bands in electrophoresis in 67 follicular fluid samples. The mean \pm standard deviation of progesterone concentration was 71.32 ± 80.06 considering all follicles. There was differential expression of proteins in different categories of follicles. In mass spectrometry were found many proteins, being main apolipoprotein, angiotensinogen, heat shock protein, glutathione and their isoforms.

Key words: follicular, protein, follicular fluid, bovine, OPU.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os bovinos são animais domesticados de origem indiana e europeia provenientes de seleções e adaptados para o uso e o bem-estar do homem (DARWIN, 2009). A pecuária é uma das principais atividades econômicas (LEMOS et al., 2008). Atualmente, o Brasil possui o segundo maior rebanho do mundo com cerca de 200 milhões de cabeças e exporta para mais de 180 países (MAPA, 2015),

O rebanho bovino brasileiro e a exportação de carne crescem a cada ano e incrementos nos processos de produção são necessários para a manutenção do mercado. Uma das principais ferramentas utilizadas para aumentar a eficiência da produção e reprodução são as biotécnicas da reprodução como a inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embriões (TE), maturação de oócitos *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e a produção de embriões *in vitro* (PIVE). A FIV e a PIVE desenvolveram-se muito (GINTHER et al., 2003a) e desde então a taxa de maturação oocitária e de produção de embriões viáveis tem aumentado. Ainda assim, esforços são necessários para a aplicação mais rentável destas técnicas na pecuária.

A aspiração folicular guiada por ultrassom para a colheita de oócito (OPU) combinada com PIVE é um método aplicável na reprodução bovina (HASLER et al., 1995). A colheita de oócitos, utilizando esta técnica apresenta a vantagem de ser menos invasiva, possui alta repetibilidade e é considerada segura, apesar de impor alguns riscos as fêmeas. Esta técnica tem sido usada com sucesso em vacas doadoras com problemas reprodutivos, clinicamente inférteis, com idade avançada, novilhas, em lactação e pós-parto (LOONEY et al., 1994; BUNGARTZ et al., 1995; RIDELL et al., 1997; FRY et al., 1998; KENDRICK et al., 1999; ALLER et al., 2010). Pode ainda ser um método alternativo de obtenção de gametas de fêmeas gestantes e geneticamente valiosas (RYAN et al., 1993).

Em vacas gestantes a OPU pode ser comprometida devido às mudanças na posição anatômica dos ovários, menor número de folículos e oócitos recuperados a partir do 5º mês de gestação, comparados com os recuperados do 2º ao 4º mês (EIKELMANN et al., 2000). Outro problema é a tendência de diminuição dos folículos grandes a partir da segunda metade da gestação (REXROAD; CASIDA, 1975). Nestes animais, a estimulação hormonal antes da OPU, utilizando gonadotrofinas exógenas, tem sido um método para aumentar o número de folículos disponíveis para aspiração, aumentando o rendimento de oócitos, com qualidade superior e embriões com maior

viabilidade (MEINTJES, et al., 1995).

Desta forma, a colheita de oócitos de vacas gestantes pode levar a comprometimentos na FIV e PIVE. A presença de um corpo lúteo parece exercer um controle local sobre o crescimento dos folículos e aparentemente, tem influência negativa para o crescimento de folículos maiores que 7 mm a partir dos dias 21/22 até o dia 60 da gestação (PIERSON, GINTHER, 1987; DRIANCOURT et al., 1991). O corpo lúteo pode regular o desenvolvimento folicular ovariano inibindo a resposta às gonadotrofinas exógenas, de forma a ajudar a evitar a luteólise durante a gestação, já que o estradiol está envolvido na produção de prostaglandinas pelo útero (THATCHER et al., 1986).

A produção de embriões FIV e PIVE de melhor qualidade está ligada a melhorias no sistema de maturação oocitária. É necessário entender o completo metabolismo folicular para determinar a qualidade oocitária e com isto desenvolver sistemas eficientes de maturação para aquisição da competência dos oócitos (KRISHER et al., 2007).

Neste sentido, em humanos, vários estudos foram desenvolvidos a fim de entender a interação das proteínas presentes nas secreções (fluido folicular) das células da granulosa e teca e suas interações/funções com oócito, na espécie bovina. Apesar de muitos estudos a respeito da FIV e PIVE, os resultados relacionados à expressão de proteínas no fluido folicular e suas relações com o gameta feminino são raros (MURANAKA et al., 1986). Em bovinos as interações proteicas provavelmente são movimentadas pelas alterações hormonais durante o ciclo estral e durante a gestação (SENGER et al., 2003).

Em vista da ausência de estudos sobre o perfil proteômico do fluido folicular durante a foliculogênese de vacas gestante, visando à melhoria da reprodução bovina de meios de cultivo e processos como MIV e a FIV, o presente estudo se justifica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fisiologia do ciclo estral das vacas

A vaca é considerada uma espécie poliéstrica anual, o ciclo estral tem uma duração de 17 a 25 dias (STEVENSON, 2003). Está dividido em fase folicular (predominantemente estrogênica) e luteal (predominantemente progesterônica). Durante estas fases ocorrem ondas de crescimento folicular, que podem ser de 2 a 4 ondas, a depender da subespécie considerada. A população de folículos no ovário das vacas ao

nascimento é estimada em 235.000 folículos entretando, o número pode variar de 0 a 720.000, em vista de vários fatores, incluindo raça, idade, níveis hormonais e *status* reprodutivo (GONÇALVES et al., 2002), a maioria dos folículos entra em atresia e raros serão ovulados (Figura 1, YANG et al., 1998), sendo que a cada onda de crescimento folicular três a seis folículos são recrutados (SAVIO et al., 1988; SIROIS, FORTUNE, 1988; SUNDERLAND et al., 1994).

A emergência de uma nova onda de crescimento folicular é precedida pelo aumento do FSH (ADAMS et al., 1992). A supressão do hormônio folículo estimulante (FSH) previne crescimento posterior dos folículos de 3-5 mm (TURZILLO, FORTUNE, 1990). Os folículos de 1-3 mm crescem similarmente em resposta ao aumento da concentração plasmática de FSH. O pico da onda de FSH ocorre em média quando o maior folículo possui cerca de 5 mm, a concentração então diminui com um intervalo aproximado de 3 dias entre o pico da concentração e o começo da divergência, onde um dos folículos se torna dominante (JAISWAL et al., 2004). As concentrações séricas de estradiol começa a aumentar no início da divergência folicular em bovinos. O folículo dominante emerge 6 horas antes que os outros folículos da onda e é maior do que estes no final da fase de crescimento comum (GINTHER et al., 2003a).

Entre o pico de FSH e o início da divergência, todos os folículos da onda continuam a requerer FSH e mais de um folículo contribui para a diminuição do FSH (JAISWAL et al., 2004). Somente o folículo dominante continua a crescer apesar das baixas concentrações de FSH e este declínio é necessário para o estabelecimento da divergência (ADAMS et al., 1992; EVANS et al., 1997; AUSTIN et al., 2001). Com a diminuição da concentração de FSH, os outros folículos diminuem a produção de estrógenos, redução nos níveis de inibinas no soro e aumento de proteínas de ligação para o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), culminando com apoptose das células da granulosa (SUNDERLAND et al., 1996; MIHM et al., 1997).

Estradiol (E2) e inibina atuam de forma reduzindo a concentração sanguínea de FSH. A inibina produzida por múltiplos folículos antes da divergência e pelo folículo dominante após o início da divergência suprime o FSH, promovendo a atresia dos folículos subordinados (EVANS et al., 1997; AUSTIN et al., 2001). Mecanismo de desvio folicular em bovinos envolve a aquisição seletiva de resposta ao hormônio luteinizante (LH) pelo folículo dominante. No desvio folicular o número de receptores de FSH nas células da granulosa não se altera no folículo dominante e o de LH aumenta (GINTHER et al., 1996).

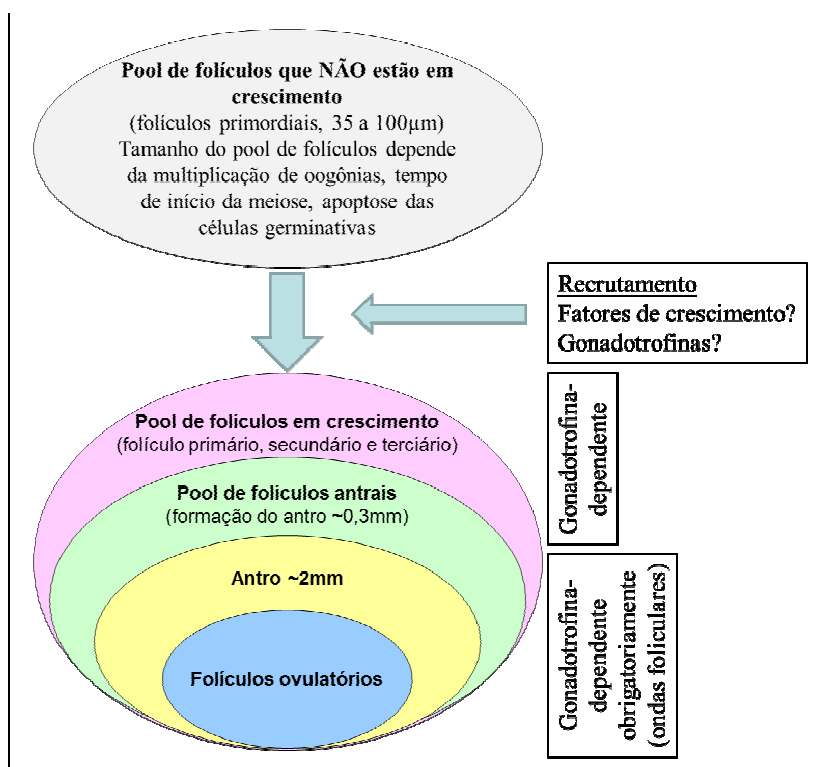


Figura 1. Diagrama da população de folículos na vaca. Fonte: KANITZ, 2003.

O crescimento folicular dominante foi associado com aumento da concentração de (E2) e progesterona (P4) no fluído folicular. Já nos folículos subordinados a relação entre as concentrações de E2: P4 são menores. O destino do folículo dominante depende da função do corpo lúteo. Concentrações elevadas de progesterona o folículo dominante torna-se atrésico devido à influência negativa da progesterona na pulsatilidade de secreção de LH (IRERLAND et al., 2000).

Na baixa pulsatilidade de LH pela influência de elevadas concentrações de progesterona, o folículo dominante começa a regredir e desencadeia o recrutamento de uma nova onda de crescimento folicular (HYTTEL et al., 1986; 1989; BAO, GARVERICK, 1998; IRERLAND et al., 2000; BEG et al., 2001; 2002). Contudo, com o pico de LH o folículo dominante continua a crescer culminando com a ruptura do folículo e ovulação (VAN DE LEEMPUT et al., 1999; RIZOS et al., 2002). A Figura 2 ilustra as ondas de crescimento folicular nos bovinos.

A capacidade do ócito em sofrer a maturação, ser fertilizado e se desenvolver em um embrião viável é adquirido gradualmente durante a foliculogênese e é denominada de competência oocitária (MERMILLOD et al., 1999). Essas modificações são influenciadas pelo folículo e aumentam conforme ocorre o desenvolvimento folicular;

apesar disso a relação entre o crescimento folicular e a competência oocitária não está bem estabelecida. A atresia folicular pode alterar a competência oocitária e seu potencial de desenvolvimento *in vitro*, contudo sua competência não pode ser modificada quando adquirida (MERMILLOD et al., 1999). Os folículos em apoptose aumentam durante a fase de dominância e a competência oocitária tende a aumentar em relação ao tamanho do folículo (BLONDIN, SIRARD, 1995; LONERGAN et al., 1994; PAVLOK et al., 1992; YANG et al., 1998). Nas fêmeas gestantes ou não, a progesterona suprime a secreção de LH e crescimento do folículo dominante; (BEG et al., 2002). Estudos demonstram que o ambiente folicular reflete as condições metabólicas materna (ROBKER et al., 2009). Também foi demonstrado que suplementação de progesterona durante a superovulação melhora a qualidade de oócitos e embriões (NASSER et al., 2011), e a inibição da síntese de progesterona durante a maturação folicular afeta negativamente a competência do oócito sugerindo efeitos durante o período lúteo (APARICCIO et al., 2011).

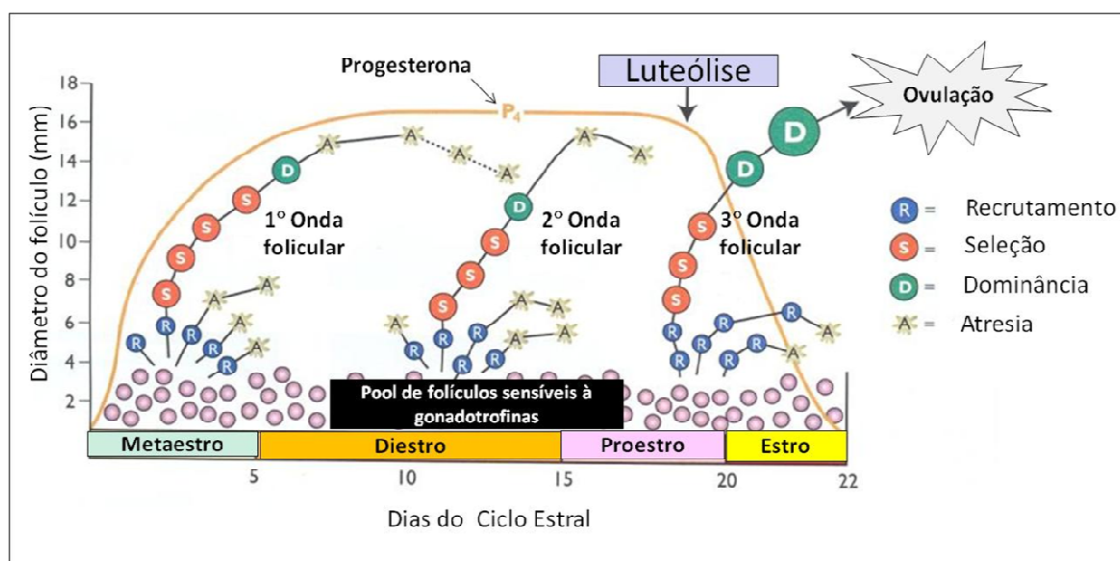


Figura 2. Esquema segundo SENGHER et al., (2003) do ciclo estral bovino composto por três ondas foliculares. As primeiras duas ondas foliculares ocorrem durante o período de elevação da progesterona (metaestro) ou durante o pico de produção da progesterona (diestro). Os folículos recrutados e selecionados durante estas fases do ciclo se tornam atresícos. A última onda folicular ocorre após a luteólise e resulta em um folículo dominante que ovulará. Somente os folículos recrutados durante ou após a luteólise se tornaram aptos à ovulação.

Em vacas superovuladas observam oócitos aberrantes, maturações reduzidas e menor competência dos oócitos (HYTTEL et al., 1989; SIRARD et al., 2001), que pode ser causada por uma perda de comunicação entre as células de *cumulus* e oócito. Em ratos a superovulação resultou em embriões ruins, retardamento no crescimento fetal, e perda pós-implantação (AUWERA et al., 2001).

Na Figura 3 (SENGER, 2003) a secreção e a concentração plasmática de progesterona apresentam variação cíclica e refletem a funcionalidade do corpo lúteo entre a fase de crescimento, manutenção e regressão. Concentrações abaixo de 1 ng/mL são encontradas no estro, aumenta até o décimo dia chegando em torno de 4,5 ng/mL em vacas de raças zebuínas (ADEYEMO, HEATH, 1980) e 16,0 ng/mL em vacas holandesas (BADINGA et al., 1994). Caso não ocorra gestação, o CL regride e as concentrações de progesterona reduzem até valores compatíveis para a manifestação de um novo estro (BORGES et al., 2003). Com a presença do embrião no útero, onde provoca alterações no organismo materno de ordem hormonal, anatômica e comportamental, tem-se o início da gestação com liberação de interleucinas pelos trofoblastos sinalizando sua presença que são as células do embrião, inibindo os receptores endometriais de estrógenos, consequentemente inibindo os receptores endometriais de ocitocina, assim a ocitocina liberada pela hipófise não agirá em seus respectivos receptores, impedindo a produção de prostaglandinas pelo útero evitando assim a luteólise. (GONÇALVES et al., 2002).

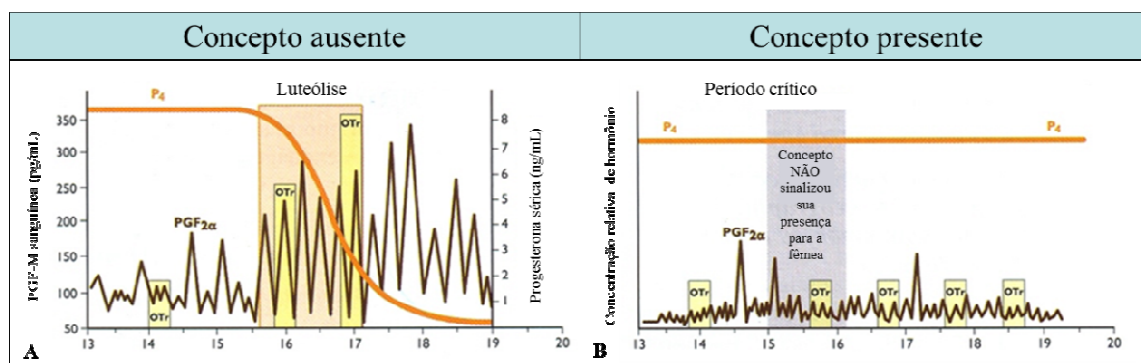


Figura 3. Comparação entre a condição endócrina da vaca com conceito ausente (A) ou presente (B). Na fêmea que o conceito está presente, não há episódios de liberação de PGF_{2α} que causam a luteólise e concentrações elevadas de progesterona são mantidas. Há um bloqueio da síntese de receptores da ocitocina, o qual é denominado reconhecimento materno. O reconhecimento materno deve ocorrer antes do início da luteólise para a manutenção da gestação. Fonte: SENGER, 2003.

2.2. Proteômica do líquido folicular

O folículo em crescimento requer ambiente endócrino para a maturação oocitária; esteroides e vários peptídeos produzidos localmente ou em locais distantes, os quais são responsáveis por fornecer o meio nutritivo ideal (XIA, YOUNGLAI, 2000). O contato e a interação entre o oócito e o ambiente influenciam no estabelecimento dos principais componentes deste meio (BROWER, SHULTZ, 1982; VOZZI et al., 2001; LINGENFELTER, et al., 2008). O ambiente folicular é influenciado pelo tipo de gonadotrofina a que o folículo é exposto durante a fase folicular. O uso de agentes luteinizantes altera este ambiente (AL-INANY et al., 2005), contudo oócitos recuperados durante a fase lútea possuem competência meiótica semelhante à de oócitos recuperados durante a fase folicular (MACHATKOVA et al., 2004). A influência das gonadotrofinas irá se refletir na produção hormonal, e conseqüentemente sobre a produção de bioelementos do fluído folicular. Exemplo disto é a maior expressão de genes associados a apoptose quando há menor concentração de estrógeno intra-folicular (EVANS et al., 2004). A maior qualidade oocitária também está associada com a quantidade de estradiol no líquido folicular (SMITZ et al., 2007).

Células da teca, células da granulosa, células do *cumulus* e oócito participam de uma complexa interação de sinalização para controlar o crescimento folicular e a competência do oócito formando o ambiente folicular modificando e caracterizando para a maturação oocitária; o oócito também secreta fatores que regulam as funções das células do *cumulus*, e o desenvolvimento folicular, (Figura 4) e as moléculas para o crescimento do oócito e o sucesso na maturação dependem dessa interação, tanto nuclear, assim como a citoplasmática (GILCHRIST et al., 2004; EPPIG et al., 2001).

O oócito está contido no líquido folicular, onde sofre maturação e desenvolvimento (IWATA et al., 2006; KIM, et al., 2006; BIANCHI et al., 2013). O líquido folicular é formado a partir do metabolismo das células da granulosa e teca e apresenta componentes semelhantes ao do soro sanguíneo. A barreira hemato-folicular é permeável a proteínas com massa menor a 500 kDa sendo esse um dos fatores determinantes na constituição folicular (HESS et al., 1998).

A importância do líquido folicular pode ser encontrada em vários estudos (GILCHRIST et al., 2004; LI et al., 2006; KRUIP, DIELEMAN, 1982), Ali et al., (2004) estudaram os efeitos do líquido folicular de novilhas sobre a MIV. Esses autores verificaram que a competência oocitária foi maior quando adicionou-se 5% de líquido folicular proveniente de folículos medindo entre 5 a 15 mm, comparada com a adição de

fluido oriundo dos folículos de 2 a 5 mm ou de 10% de líquido dos folículos maiores. Além disso, observaram que há um sinergismo entre os hormônios incluídos no meio de cultivo e a fonte de líquido folicular sobre o desenvolvimento oocitário.

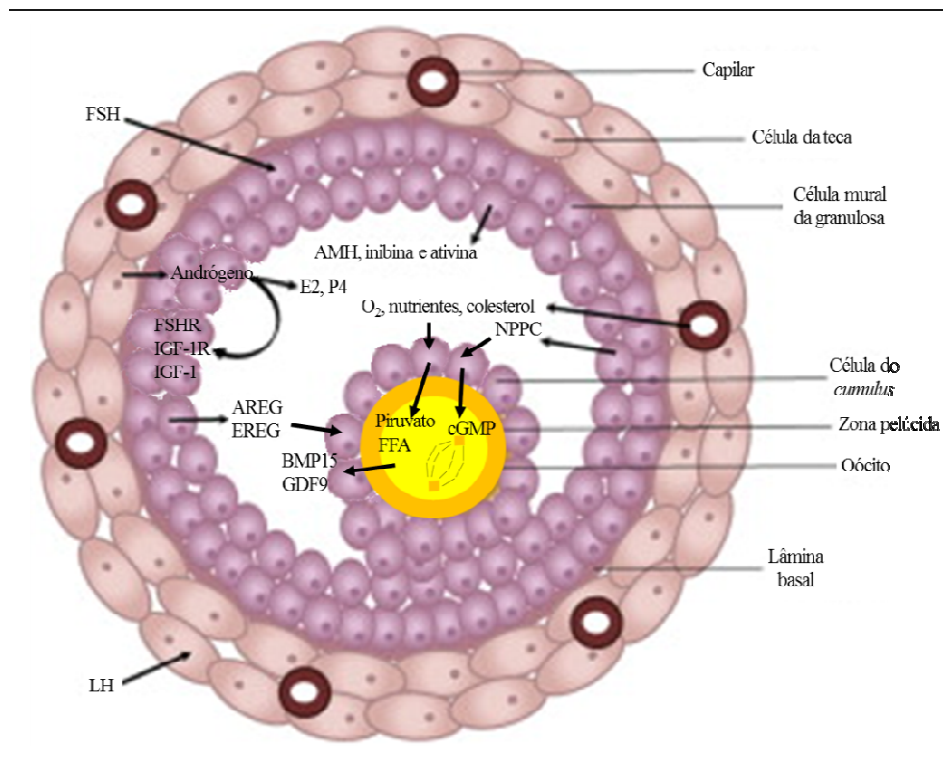


Figura 4. Diagrama do folículo pré-ovulatório descrevendo a influência das células somáticas sobre a competência oocitária via esteroidogênese, sinalização celular e metabolismo. AREG: *amphiregulin*; BMP15: *bone morphogenetic protein 15*; EREG: *epiregulin*; FSHR: receptor de FSH; IGF-1R = receptor de IGF-1; NPPC: *natriuretic peptide precursor type C*; O₂: oxigênio. Fonte: KRISHER 2013; DUMESIC et al., 2015.

A ligação funcional entre oócito e as células que o envolvem, especialmente as células do *cumulus* desempenha papel importante no processo de maturação (GILCHRIST et al., 2004; LI et al., 2006). A ausência das células do *cumulus* promove uma deficiência na síntese de proteínas, a qual reflete na regulação do ciclo celular (COMBELLES et al., 2005). Estas células fornecem um microambiente com baixas concentrações de glicose e uma elevada concentração de lactato, e regula a homeostase para oócito e posteriormente para o embrião (MORI et al., 2000; TANGHE et al., 2002). Qualquer alteração neste microambiente pode promover a formação de embriões com alterações morfológicas (XIA et al., 2000). Neste contexto, a produção de diferentes macromoléculas, incluindo proteínas, por este tipo celular, está intimamente

relacionada à competência oocitária (IWATA et al., 2006; KIM et al., 2006; BIANCHI et al., 2013).

O complexo *cumulus*-oócito é a última estrutura do folículo a ser afetada pela atresia (KRUIP, DIELEMAN, 1982), ou seja, este tipo celular possui um papel de proteção oocitária contra o estresse oxidativo durante a maturação, aumentando a síntese de glutatona citoplasmática do oócito e a capacidade de síntese proteica com intuito de fornecer termoproteção (LUCIANO et al., 2005).

As concentrações de estradiol no líquido folicular são mais elevadas em folículos grandes do que em pequenos (GASTAL et al., 1999; BELIN et al., 2000). As células do *cumulus* mantêm o metabolismo em cooperação com os oócitos via fatores parácrinos e também por moléculas de baixa massa molecular distribuídas por comunicação bidirecional entre as células do *cumulus* e oócito via junções comunicantes (*gap junctions*); GANDOLFI et al., 2005; OZAWA et al., 2008), tal cooperação é crucial para a regulação da maturação e remodelamento da cromatina em oócitos bovinos, para a total competência e condução da embriogênese (CAIXETA et al., 2009; TESFAYE et al., 2009).

Toda esta interação entre as células que envolvem o oócito é mediada por diferentes macromoléculas, sendo as proteínas os principais elementos envolvidos no desenvolvimento folicular, fertilização do oócito e o desenvolvimento embrionário (IWATA et al., 2006; KIM et al., 2006; BIANCHI et al., 2013). Tais elementos são considerados uma fonte abundante de biomarcadores (BALABAN et al., 2006; SCHWEIGERT et al., 2006) e pode revelar a fase do desenvolvimento folicular, o estado geral do folículo, a qualidade do oócito (REVELLI et al., 2009) e até a saúde do indivíduo (KIM et al., 2006).

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células. O conhecimento da estrutura das proteínas envolvidas nos processos celulares desempenha papel fundamental para o aprimoramento de processos laboratoriais, como as biotecnologias da reprodução. As proteínas são organizadas em vários níveis que incluem estrutura primária, secundária, terciária e quaternária, e tipos de ligações sendo aspectos importantes para prever suas funções (KLEIN, DELISI, 1986; CHOU, 2006; LEVITT, CHOTHIA, 1976; ANDREEVA et al., 2004; MURZIN et al., 1995; FERRAGINA et al., 2007; DAÍ, WANG, 2008; KURGAN et al., 2008). A classe estrutural das proteínas está relacionada à composição de seus aminoácidos (ZHOU, 1998; CAI, 2002; KLEIN, DELISI, 1986; CHOU, 1999; CHOU, SHEN, 2007) Após a

transcrição e tradução, as proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais (GOBBETTI et al., 2002), desta forma resultados da expressão gênica podem ser restritos, sendo necessária a caracterização das proteínas e dos peptídeos do líquido folicular, a fim de permitir a identificação do seu papel na fisiologia folicular e maturação oocitária (DUCOLOMB et al., 2013).

Os vários elementos que compõe este fluído pode promover a elaboração de meios mais apropriados para a MIV (ANGELUCCI et al., 2006), haja visto que o principal componente proteico é a albumina, a qual já faz parte dos meios para o cultivo de oócitos (BAVISTER, 1969).

Em camundongos, durante a maturação oocitária há mudanças qualitativas na síntese proteica e mais da metade do RNAm é degradada. Os oócitos são incapazes de transcrever proteínas quando a cromatina encontra-se condensada e a síntese proteica apresenta um ligeiro aumento nas 12 horas iniciais do processo de maturação e diminui 10% após 40 horas de cultivo (TOMEK et al., 2002). A investigação em larga escala de proteínas nos organismos (WILKINS et al., 1996) é importante, uma vez que fornece informações sobre os processos metabólicos (WILLIAMS et al., 1997; SMITH et al., 2006).

Vários estudos investigaram a concentração de proteínas no líquido folicular (SCHWEIGERT et al., 2006), porém poucos têm descrito sua composição peptídica (KIM et al., 2006; SCHWEIGERT et al., 2006; HANRIEDER, 2008), os meios de cultura tentam mimetizar as condições fisiológicas naturais é importante conhecer todas as características químicas naturais na qual o oócito está submetido (FAHIMINIYA et al., 2010).

O desenvolvimento oocitário nos mamíferos é um processo longo, acompanhado de reorganizações estruturais e funcionais do nucléolo, o qual desempenha um papel chave na biogênese do ribossomo (HERNANDEZ-VERDUN et al., 2010; DUNDR, 2012; SHAW, BROWN, 2012; GRUMMT, 2013). Além de RNAs (principalmente, rRNA e snoRNAs) a biogênese no ribossomo requer inúmeros fatores proteicos para garantir a transcrição rDNA, processamento de rRNA e a exportação de partículas para o ribossomo no citoplasma (CISTERNA, BIGGIOGERA, 2010).

Mortarino et al. (1999) encontraram 200 *spots* no líquido de cistos foliculares e folículos em diferentes estágios de desenvolvimento. Nove spots diferenciais foram identificados pelo sequenciamento do N-terminal, sendo encontradas a α -1-antitripsina, albumina, sorotransferrina e apolipoproteína A-I e A-IV. Foram encontrados diferentes

padrões de proteínas entre os diferentes diâmetros foliculares e nos cistos.

Posteriormente, Maniwa et al. (2005) estudaram as proteínas contidas no fluído de cistos foliculares a fim de correlacionar estes elementos à etiologia e patogenia da alteração. Diferente dos achados de Mortarino et al. (1999), este estudo encontrou uma expressão elevada de 8 spots de proteínas nas amostras de líquido de cistos foliculares: f1-atpase mitocondrial bovina (BMFA), fator associado à eritróide (EAF), metionina sintase (MeS), receptor-VEGF, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), proteína 70 de choque térmico (HSP70), β -lactoglobulina (BLG) e subunidade Ip da succinato desidrogenase (SD).

Ducolomb et al. (2013) viram a adição de frações proteicas e peptídicas do fluído folicular ao meio de cultivo para maturação (MIV) e fertilização in vitro (FIV) de suínos. As amostras de líquido folicular foram separadas em 5 frações (F1-F5) e identificadas por espectrometria de massa. A adição da F1, a qual continha 12 proteínas (fragmentos de imunoglobulinas e imunoglobulinas, albumina, citoqueratina, queratina, α -1-antiquimitripsina 2, transferrina e precursor do plasminogênio) elevou as taxas de MIV e FIV. Já as frações F2 (6 proteínas, fragmentos de imunoglobulinas e imunoglobulinas, pré-albumina), F3 (6 proteínas, fragmentos de imunoglobulinas e imunoglobulinas, 2 isoformas da pré-albumina) e F4 (14 proteínas, proteína da família do inibidor da inter- α -tripsina, α -1-antiquimiotripsina, haptoglobina, endopina 1 β , transtiretina, componente C8G do complemento, precursor da albumina sérica, fator-B, properdina, fragmento da fumarato hidratase, inibidor da anidrase carbônica, fator de coagulação XII e 3 imunoglobulinas) reduziram a porcentagem de oócitos na metáfase I. Já a fração F5 (2 proteínas, albumina sérica e queratina) favoreceu a quebra da vesícula germinativa e favoreceu a MIV. Estudos anteriores demonstraram efeitos mencionados em suínos, mas não identificou diferentes frações contidas no líquido folicular. Romero-Arredondo et al. (1994) investigaram a inclusão de líquido folicular ao meio de cultivo. Quando o fluído foi colhido 0 e 4 horas após a onda pré-ovulatória de LH houve efeito inibitório da meiose, contudo quando colhido 8 horas ou mais após o pico de LH este efeito foi ausente e induziu a expansão do *cumulus* e a maturação meiótica.

Em humanos, as proteínas do fluído folicular estão envolvidas em diferentes processos oocitários e há uma variação nas funções celulares do gameta de acordo com o tipo proteico (NAYUDU et al., 1989).

Nas vacas foram analisados componentes químicos do fluido folicular em relação

ao soro sanguíneo. No fluido folicular se observou maiores concentrações de sódio, potássio, albumina, progesterona e menores concentrações de proteína total, gama-globulina, colesterol total, colesterol livre e glicose. No soro sanguíneo teve ausência de albumina. A coloração do fluido folicular amarelada teve concentrações de proteína total superiores comparadas ao amarronzado, este estudo concluiu que os principais componentes químicos do fluido folicular são transferidos a partir do sangue por capilares da parede folicular através de um mecanismo seletivo (MURANAKA et al., 1986).

2.3. Considerações finais

Vários estudos da expressão gênica têm sido conduzidos, porém são escassas as informações na literatura sobre a análise proteômica do fluido folicular bovino (HATZIRODOS et al., 2014), o que pode fornecer respostas quanto ao desenvolvimento folicular nos grupos de folículos e diferentes estados fisiológicos em bovinos. A identificação global dos peptídeos é uma impressão digital da célula, da sua função e do seu *status*. A expressão de diferentes genes no líquido folicular já foi descrita em muitas espécies (ANGELUCCI et al., 2006), incluindo bovinos (KRISHER et al., 2007). Contudo, após a transcrição e tradução, as proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais (GOBBETTI et al., 2002), desta forma resultados da expressão gênica podem ser restritos, sendo necessária a caracterização das proteínas e dos peptídeos do líquido folicular, a fim de permitir a identificação do seu papel na fisiologia folicular e maturação oocitária, além de permitir o seu uso como aditivo do meio de cultivo no processo de maturação *in vitro* (DUCOLOMB et al., 2013). Ademais a análise proteômica pode identificar marcadores da competência oocitária, o que pode ser uma ferramenta para a fertilização *in vitro* (ANGELUCCI et al., 2006).

Estudos comprovaram que o fluido folicular não-fracionado pode influenciar no cultivo oocitário em bovinos (ROMERO-ARREDONDO et al., 1994); frações do líquido folicular podem modificar a maturação ou a fertilização *in vitro* em suínos (DUCOLOMB et al., 2013). Estes achados levam a hipótese de que o líquido folicular contém fatores que podem ser utilizados para o cultivo oocitário, contudo é necessário que estes fatores sejam conhecidos e estudados em bovinos, durante o desenvolvimento folicular.

Melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na foliculogênese permitirá maior controle sobre a função reprodutiva e novas abordagens no tratamento

da infertilidade. Poderá ainda, servir como uma ferramenta para a melhor exploração do potencial reprodutivo de fêmeas bovinas e obtenção de melhores resultados na aplicação de biotécnicas da reprodução.

3. REFERÊNCIAS*

- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.94, p.177-188, 1992.
- ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v.14, n.6, p.411-420, 1980.
- ALI, A.; COENEN, K.; BOUSQUET, D.; SIRARD, M.A. Origin of bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.62, p.1596–1606. 2004.
- AL-INANY, H.; ABOULGHAR, A.M.; MANSOUR R.T. Proctor M. Recombinant versus urinary gonadotrophins for triggering ovulation in assisted conception. *Human Reproduction*, v.20 p.2061–73. 2005.
- ALLER, J.F. Early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.119, p.1–8, 2012.
- ANDREEVA, A.; HOWORTH, D.; BRENNER, S.E.; HUBBARD, T.J., CHOTHIA, C.; MURZIN, A.G. Refinements integrate structure and sequence family data. *Nucleic Acids Research*, v.32, p.226-229, 2004.
- ANGELUCCI, S.; CIAVARDELLI, D.; Di GIUSEPPE, F.; ELEUTERIO, E.; SULPIZIO, M.; TIBONI, G.M. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochimical and Biophysics Acta*, v.1764 p.1775–85, 2006.
- AUSTIN, E.J.; MIHM, M.; EVANS, A.C.O.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.L.H.; IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles of the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v.64, p.839-848, 2001.
- AUWERA, I. V.; HOOGHE, T.D. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Human Reproduction*, v.16, p.1237–1243, 2001.
- BADINGA, L.; THATCHER, W.W.; WILCOX, C.J. Effect of season on follicular

* Referências organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, NBR 6023, 2002).

- dynamics and plasma concentrations of estradiol-17 β , progesterone and luteinizing hormone in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v.42, p.1263-1274, 1994.
- BALADA, B.; URMAN, B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive BioMedicine Online*, v.12, p.608–15, 2006.
- SISSON, S.; GROSMAN, J.D. Anatomia dos animais domésticos, Editora Guanabara Koogan, 5ª Edição, v.1, p.691, 887-889, 1986.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *Journal of Animal Science*, v.76, p.1903-1921, 1998.
- BAVISTER, B.D. Environmental factors important for in vitro fertilisation in the hamster. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.18, p.544–545, 1969.
- BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biology of Reproduction*, v.66 p.120-126, 2002.
- BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, v.64, 2001, p.432-441.
- BELIN, G.; GOUDET, G.; DUCHAMP, N. GERARD, Intrafollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. *Biology of Reproduction*, v.62, p.1335–1343, 2000.
- BIANCHI, L.; GAGLIARDI, A.; CAMPANELLA, G.; LANDI, C.; CAPALDO, A.; CARLEO, A.; ARMINI, A.; DE LEO, V.; PIOMBONI, P.; FOCARELL, R.; BINI, L. A methodological and functional proteomic approach of human follicular fluid en route for oocyte quality evaluation. *Journal of Proteomics*, v.90, p.61-76, 2013.
- BLONDIN P.; SIRARD M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v.41 p.54-62, 1995.
- BORGES, A.M.; TORRES C.A.A.; RUAS, J.R.M.; JUNIOR, V.R.R.; CARVALHO, G.R.; Desenvolvimento Luteal e Concentrações Plasmáticas de Progesterona em Vacas das Raças Gir e Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, p.276-283, 2003.
- BROWER P.T.; SCHULTZ R.M. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Developmental Biology*, v.9, p.144–153, 1982.
- BUNGARTZ, L.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, D.; NIEMANN, H. Collection of

oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, v.43, p.667–675, 1995.

CAI, Y.D.; LIU, X.J.; XU, X.B.; CHOU, K.C. Prediction of protein structural classes by support vector machines, *J. Computers & Chemical Engineering Journal*, v.26, p.293–296, 2002.

CAIXETA, E.S. *Regulação da expressão de fatores secretados pelo oócito (FSOs) e seus receptores durante a maturação in vitro (MIV) bovina e ações no controle da expansão do cumulus*. 2012. 94F. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) ‘Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho’, Botucatu.

CHOU, K.C. Structural bioinformatics and its impact to biomedical science and drug discovery. *Frontiers in Medicinal Chemistry*, v.3, p.455–502, 2006.

CHOU, K.C., A key driving force in determination of protein structural classes. *Biochemical and Biophysical Research*, v.264 p.216–224, 1999.

CHOU, K.C.; SHEN, H.B. Recent progress in protein subcellular location prediction. *Analytical Biochemistry*, v.370, p.1–16, 2007.

CISTERNA, B.; BIGGIOGERA, M. Ribosome biogenesis: from structure to dynamics. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v.284, p.67–111, 2010.

COMBELLES, M.H.; FISSORE R.A.; ALBERTINI D.F.; RACOWSKY C. In vitro maturation of human oocytes and cumulus cells using a coculture three-dimensional collagen gel system. *Human Reproduction*, v.20 p.1349–58, 2005.

DAI, Q.; WANG, T.M.. Comparison study on k-word statistical measures for protein: from sequence to sequence space. *BMC Bioinformatics*, v.9, p.394, 2008.

DARWIN, C.; A origem das espécies, Editora Escala; p28-36, 2009.

DRIACOURT, M. A.; THUEL, B. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. *Reproduction Nutrition Development*, v.38, p.345-362, 1998.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, v.35, p.55-68, 1991.

DUCOLOMB, Y.; GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, H.; FIERRO, R.; JIMÉNEZ, I.; CASAS, E.; FLORES, D.; BONILLA, E.; SALAZAR, Z.; BETANCOURT, M. Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on in vitro fertilization. *Theriogenology*, v.79, p.896-904, 2013.

DUMESIC, D.A.; MELDRUM, D.R.; KATZ-JAFFE, M.G.; KRISHER, R.L.;

- SCHOOLCRAFT, W.B. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and Sterility*, v.103, p.303-316, 2015.
- DUNDR, M. Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome. *Current Opinion in Cell Biology*, v.24, p.415–422, 2012.
- EIKELMANN, E.; FRANK, K.U.; SCHINDLER, L.; NIEMANN, H. Repeated ultrasound-guided follicular aspiration in pregnant heifers and cows. *Theriogenology*, v.53, p.351, 2000.
- EVANS, A.C.; IRELAND, J.L.; WINN, M.E.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; COUSSENS, P.M.; IRELAND, J.J. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biology of Reproduction*, v.70, p.1475-1484, 2004.
- EVANS, A.C.; KOMAR, C.M.; WANDJI, S.A.; FORTUNE, J.E. Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v.57, p.394-401, 1997.
- FAHIMINIYA S.; REYNAUD, K.; LABAS, V.; BATARD, S.; CHASTANT, M. S.; Gerard, N. Steroid hormones content and proteomic analysis of canine follicular fluid during the preovulatory period. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.8, p.132, 2010.
- FERRAGINA, P.; GIANCARLO, R.; GRECO, V.; MANZINI, G.; VALIENTE, G. Compressionbased classification of biological sequences and structures via the universal similarity metric: experimental assessment, *BMC Bioinformatics*, v.8, p.252, 2007.
- FRY, R.C.; SIMPSON, T.L.; SQUIRES, T.J. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology*, v.49, p.1077–1082, 1998.
- GANDOLFI, F.; PAFFONI, A.P.; PAPASSO, S.B.; BRAMBILLA, E.B.; BONETTI, M.S.; TIZIANA, A.L.; BREVINI, D.; PHARM, D.A.; GUIDO, P.H.; RAGNI, A.; Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertility and Sterility*, v.85 p.1150-1156, 2006.
- GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; WILTBANK, M.C. Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. *Biology of Reproduction*, v.61, p.31–39, 1999.
- GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte–somatic cell

- interaction during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science*, v.82, p.431–46, 2004.
- GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v.55, p.1187-1194, 1996.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Sciences*, v.78, p.239-257, 2003.
- GOBBETTI, M.; STEPANIAK, L.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; DI CAGNO, R. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*, v.42, p.223–239, 2002.
- GONÇALVES, P.B.; FIGUEIREDO R.F.; FREITAS V.F.; Biotécnicas Aplicadas à Reprodução, Varela, p.3 e 307. 2002.
- GRUMT, I. The nucleolus-guardian of cellular homeostasis and genome integrity. *Chromosoma*, v.122, p.487–497, 2013.
- HANRIRDER, J.; NYAKAS, A.; NAESSEN, T.; BERGQUIST, J. Proteomic analysis of human follicular fluid using an alternative bottom-up approach. *Journal of Proteome Research*, v.7 p.443–9. 2008.
- HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HUTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B., SHUEY, S., STOKES, E., TRIMMER, S.A., Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, v.43, p.141–152, 1995.
- HATZIRODOS, N.; HUMMITZSCK, K.; RODGERS, H.I.; HARLAND, M.; MORRIS, S.E.; TODGERS, R. Transcriptome profiling of granulosa cells from bovine ovarian follicles during atresia, *Biomed Central Genomics*, v.15, p.40, 2014.
- HESS, K.A.; CHEN, L.; LARSEN, W.J. The ovarian blood follicle barrier is both charge- and size-selective in mice. *Biology of Reproduction*, v.58, p.705–711, 1998.
- HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.76, p.645- 656, 1986.
- IRELAND, J.J.; MIHM, M.; AUSTIN, E.; DISKIN, M.G.; ROCHE, J.F. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, *Journal of Dairy Science*, v.83, p.1648-1658, 2000.
- IWATA, H.; INOUE, J.; KIMURA, K.; KUGE, T.; KUWAYAMA, T.; MONJI, Y. Comparison between the characteristics of follicular fluid and the developmental

- competence of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*, v.91, p.215–223, 2006.
- IZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, v.61, p.234-248, 2002.
- JAISSWAL, M.K.; AGRAWAL, V.; JAISSWAL, Y.K.; Lipopolysaccharide drives alternation of heat shock proteins and induces failure of blastocyst implantation in mouse, *Biology of Reproduction*. v.88, p.162. 2013.
- EPPIG, J.J.. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals , *Reproduction. The Journal of the Society for Reproduction and Fertility*, v.122, p.829–838, 2001.
- KENDRICK, K.W.; BAILEY, T.L.; GARST, A.S.; PRYOR, A.W.; AHMADZADEH, A.; AKERS, R.M.; EYESTONE, W.E.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. *Journal of Dairy Science*, v.82, p.1731–1740, 1999.
- KIM, Y.S.; KIM, M.S.; LEE, S.H.; CHOI, B.C.; LIM, J.M.; CHA, K.Y. Proteomic analysis of recurrent spontaneous abortion: identification of an inadequately expressed set of proteins in human follicular fluid. *Proteomics*, v.6, p.3445–54, 2006.
- KLEIN, P.; DELISI, C. Prediction of protein structural class from the amino-acid sequence. *Biopolymers*, v.25, p.1659–1672, 1986.
- KRISHER, R.L. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. *Annual Review of Animal Biosciences*, v.1, p.393-417, 2013.
- BRITT, J.H. Oocyte development in cattle: physiological and genetic aspects. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, p.110-115, 2008.
- KRISHER, R.L.; BRAD, A.M.; HERRICK, J.R.; SPARMAN, M.L.; SWAIN, J.E. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during in vitro maturation. *Animal Reproduction Science*, v.98, p.72-96, 2007.
- KRUIP, T.A.M.; DIELEMAN, S.J. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reproduction Nutrition Development*, v.22, p.465–473, 1982.
- KURGAN, L.A.; ZHANG, T.; ZHANG, H.; SHEN, S. RUAN, J. Secondary structure-based assignment of the protein structural classes. *Amino Acids*, v.35 p.551–564, 2008.
- LEMOS, R.A.A.; Doenças de impacto econômico em bovinos de corte, *Editora UFMS*,

p 7, 2008.

LEVITT, M.; CHOTHIA, C. Structural patterns in globular proteins. *Nature*, v.261, p.552-558, 1976.

LI, G.P.; BUNCH, T.D.; WHITE, K.L.; RICKORDS, L.; SESSION, B.R. Denuding and centrifugation of maturing bovine oocytes alters oocyte spindle integrity and viability of cytoplasm to support parthenogenetic and nuclear transfer embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, v.73 p.446–51, 2006.

LINGENFELTER, B.M.; DAILEY, R.A.; INSKEEP, E.K.; VERNON, M.W.; POOLE D.H.; RHINEHART, J.D. Microarray analysis of gene expression in granulosa cells from persistent follicles in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.13, p.104-405, 2008.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v.37 p.48-53, 1994.

LOONEY, C.R.; LINDSEY, B.R.; GONSETH, C.L.; JOHNSON, D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, v.41, p.67–72, 1994.

LUCIANO, A.M.; LODDE, V.; BERETTA, M.S.; COLLEONI, S.; LAURIA, A.; MODINA, S. Developmental Capability of Denuded Bovine Oocyte in a Co- Culture System With Intact Cumulus-Oocyte Complexes: Role of Cumulus Cells, Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate, and Glutathione. *Molecular Reproduction and Development*, v.71, p.389-397, 2005.

MACHATKOVA M.; KRAUSOVA K.; JOKESOVA. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology*, v.61, p.329–335, 2004.

MANIWA, J.; IZUMI, S.; ISOBE, N.; TERADA, T. Studies on substantially increased proteins in follicular fluid of bovine ovarian follicular cysts using 2-D PAGE and MALDI-TOF MS. *Reproduction Biology and Endocrinology*, v.8, p.1-9, 2006.

MAPA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 08 set. 2015.

MEINTJES, M.; BELLOW, M.S.; BROUSSARD, J.R.; PAUL, J.B.; GODKE, R.A. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for in

- vitro fertilization. *Journal of Animal Reproduction Science*, v.73, p.967–974, 1995.
- MERMILLOD, P.; OUSSAID, B.; COGNIÉ, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.54, p.449-460, 1999.
- MIHM, M.; GOOD, T.E.M.; IRELAND, J.L.H.; IRELAND, J.J.; KNIGHT, P.G.; ROCHE, J.F. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. *Biology of Reproduction*, v.57, p.1328-1337, 1997.
- MORI, T.; AMANO, T.; SHIMIZU, H. Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. *Biology of Reproduction*, v.62, p.913- 919, 2000
- MORTARINO, M.; VIGO, D.; MAFFEO, G.; RONCHI, S. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bovine ovarian fluid proteins. *Electrophoresis*, v.20, p.866-869, 1999.
- MURANAKA, K.; MORIYOSHI, M.; NAKAO, T.; KAWATA, K. Chemical components of bovine follicular fluid and peripheral blood serum. *Journal of College Dairying*, v.11, p.423-435, 1986.
- MURZIN, A.G.; BRENNER S.E.; HUBBARDD, T.; CHOTHIA, C.; SCOP, C. A structural classification of protein database for the investigation of sequence and structures. *Journal of Molecular Biology*, v.247, p.536-540, 1995.
- NAYUDU, P.; LOPOTA, A.; JONES, G.M.; GOOK, D.A.; BOURNE, H.M.; SHEATHER, S.J. An analysis of human oocytes and follicles from stimulated cycles: oocyte morphology and associated follicular fluid characteristics. *Human Reproduction*, v.4, p.558–67, 1989.
- OZAWA, M.; NAGAI, T.; SOMFAI, T.; NAKAI, M.; MAEDOMARI, N.; FAHRUDIN, M.; KARJA, N.W.K.; KANEKO, H.; NOGUCHI, J.; OHNUMA, K.; YOSHIMI, N.; MIYAZAKI, H.; KIKUCHI K. Comparison between effects of 3-isobutyl-1-methylxanthine and FSH on gap junctional communication, LH-receptor expression, and meiotic maturation of cumulus-oocyte complexes in pigs. *Molecular Reproduction and Development*, v.75, p.857-866, 2008.
- PARICIO, V.A. Effects of high-whey-protein intake and resistance training on renal, bone and metabolic parameters in rats. *British Journal of Nutrition*, v.105, n.6, p.836-845, 2011.
- PAVALOK, A.; HAHN, L.A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental

- competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*; v.31 p.63-67, 1992.
- PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Intraovarian effect of the corpus luteum on ovarian follicles during early pregnancy in heifers. *Animal Reproduction Science*, v.15, p.53–60, 1987.
- REVELLI, A.; DELLE, D.; PIANE, L.; CASANO, S.; MOLINARI, E.; MASSOBRIO, M.; RINAUDO, P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.7, p.40, 2009.
- REXROAD, C.E.; CASIDA, L.E. Ovarian follicular development in cows, sows and ewes in different stages of pregnancy as affected by number of corpora lutea in the same ovary. *Journal of Animal Reproduction Science*, v.41, p.1090–1097, 1975.
- RIDELL, J.R.; CARSON, M.G., , RIDELL, R.L.; K.P.; GALIK, P.K.; STRINGFELLOW, D.A. Use of exogenous FSH to increase the yield of oocytes collected from aged cows: case reports. *Theriogenology*, V.47, p.162, 1997.
- ROBKER R.L.; AKISON, L.K.; BENNETT, B.D.; THRUUPP, P.N.; CHURA, L.R.; RUSSELL, D.L. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *Journals Impact Factors*, v.94, p.1533–40, 2009.
- ROMERO,-ARREDONDO, A.; SEIDEL JR, G.E. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.41, p.383-394, 1994.
- SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.: Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility Archive*, v.83, p.663-671, 1988.
- SCHWEIGERT, F.J.; GERICKE, B.; WOLFRAM, W.; KAISERS, U. DUDENHAUSEN J.W. Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF. *Human Reproduction*, v.21, p.2960–8, 2006.
- SENGER, P. L. Pathways to pregnancy and parturition. 2. ed. Ephrata: Current Conceptions, p.371. 2003.
- SHAW, P.; BROWN, J. Nucleoli: composition, function, and dynamics. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.158, p.44–51, 2012.
- SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v.55, p.1241–1254, 2001.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle

monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction*, v.39, p.308-317 1988.

SMITH, L.C.; OLIVEIRA, ANGEL, M. GROME, N.P. BATHIA B, PRICE CA. oocyte quality in small antral follicle in the presence and absence of a large dominant follicle in cattle, *Journal of Reproduction Fertility*, v.106, p.193-199, 1996.

SMITZ, J.; ANDERSEN, A.N.; DEVROEY, P.; ARCE J.C. Endocrine profile in serum and follicular fluid differs after ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH in IVF patients. *Human Reproduction*, v.22, p.676–87, 2007.

STEVENSON, J.S. YOUNQUIST, R. S.; THRELFALL, W. R. Clinical reproductive physiology of the cow. Current Therapy in Large Animal. 2^a Edição *Theriogenology*, p.258-270, 2007.

SUNDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility Archive*, v.101, p.547-555, 1994.

SUNDERLAND, S.J.; KNIGHT, P.G.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular- and luteal-phase dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction*, v.54, p.453-462, 1996.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYCK, H. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, v.61, p.414–424, 2002.

TESFAYE, D.; GHANEM, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; SIRARD, M.A.; HOELKER, M.; SCHELLANDER, K.; LONERGAN, P. Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus–oocyte complexes matured either in vivo or in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, v.21, p.451-461, 2009.

THATCHER, W.W.; TERQUI, M.; THIMONIER, J.; MAULEON, P. Effect of estradiol-17 on peripheral plasma concentration of 15-keto 13, 14-dihydro PGF₂ and luteolysis in cyclic cattle. *Prostaglandins*, v.31, p.745–756, 1986.

TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative Analysis of Protein Synthesis, Transcription and Cytoplasmic Polyadenylation of mRNA during Maturation of Bovine Oocytes in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, v.37, p.86-91, 2002.

TURZILLO, A.M.; FORTUNE, J.E. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.89, p.643-653, 1990.

VAN DE LEEMPUT, E.E.; VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology*, v.52, p.335-349, 1999.

VOZZI, C.; FORMENTON, A.; CHANSON, A.; SENN, A.; SAHLI, R.; SHAW, P. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. *Reproduction*, v.28, p.122-619, 2001.

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.A.; APPEL, R.D.; HUMPHEY, SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D.F. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, V.13, p.19–50, 1996.

WILLIAMS, K.; HOCHSTRASSER, D.; WILKINS, M.R.; WILLIAMS, K.L.; APPEL, R.D.; HOCHSTRASSER, D.F. Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics Editora Springer, v.3, p.540, 1997.

XIA, P.; YOUNGLAI, E.V. Relationship between steroid concentrations in ovarian follicular fluid and oocyte morphology in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment. *Journal of Reproduction Fertility*, v.118, p.229–33, 2000.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, PE.; PRESICCE, G.A. Control of oocyte maturation in cows-biological factors. *Theriogenology*, v.49, p.471-482, 1998.

ZHOU, G.P. An intriguing controversy over protein structural class prediction, *Journal of Protein Chemistry*, v.17, p.729–738, 1998.

.

4. HIPÓTESE E OBJETIVO

4.1. Hipótese

Há expressão diferenciada de proteínas no líquido folicular em vista do desenvolvimento dos folículos ovarianos de vacas zebuínas gestantes?

4.2. Objetivo principal

Caracterizar o perfil proteico do líquido folicular de vacas zebuínas gestantes em diferentes tamanhos de folículos saudáveis, transicionais e atrésicos.

4.3. Objetivo específico

Caracterizar as proteínas do líquido de folículos saudáveis, folículos pequenos (<6,4 mm), médios (6,5mm a 8,9mm e) e grandes ($\geq 9,0$ mm) de folículos saudáveis, transicionais e atrésicos de vacas zebuínas gestantes, pela eletroforese unidimensional associada à abordagem ESI TOF/TOF MS/MS e ontologia gênica.

CAPÍTULO 2

Análise proteômica do líquido folicular de vacas gestantes

Proteomic analysis of follicular fluid from pregnant cows

(Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, disponível em <http://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>))

RESUMO

No ciclo estral das vacas ocorre uma série de eventos que se repetem até o impedimento da luteólise, pela presença do embrião no útero, que provoca alterações no organismo materno de ordens hormonais, anatômicas e comportamentais. Apesar disso, a colheita de oócitos em vacas gestantes é uma alternativa para a produção *in vitro* de embriões. No entanto, em vista do perfil hormonal durante a gestação, os fatores envolvidos no desenvolvimento folicular podem ser comprometidos. Em vista disso, este estudo objetivou comparar o perfil proteico do líquido folicular de vacas gestantes. Foram colhidos ovários de 36 vacas gestantes em terço inicial de gestação. O líquido folicular foi puncionado e o diâmetro de cada folículo foi mensurado pela ultrassonografia, sendo classificados em três categorias $\leq 6,4$ mm, 6,5mm a 8,9mm e ≥ 9 . Após duas centrifugações para remoção das células, as proteínas totais foram mensuradas e a eletroforese unidimensional realizada sob condições desnaturantes e redutoras. As bandas foram recortadas e a digestão *in gel* realizada objetivando a espectrometria de massas. A concentração de estrógeno e progesterona foi mensurada no líquido folicular para determinar a viabilidade dos folículos. Foram encontradas 46 bandas de proteínas na eletroforese em 67 amostras de líquido folicular. A média da concentração \pm desvio padrão da progesterona foi de $71,32 \pm 80,06$ ng/mL e estrógeno de $27,57 \pm 30,62$ ng/mL, considerando todos os folículos. Houve expressão diferenciada de proteínas nas diferentes categorias de folículos. Na espectrometria de massas foram encontradas diversas proteínas, sendo as principais apolipoproteína, angiotensinogênio, *heat shock* e glutatona.

Palavras-chave: proteínas, fluido folicular, bovinos, prenhez, OPU.

1. Introdução

Os bovinos são animais domesticados de origem indiana e europeia provenientes de seleções e adaptados para o uso e o bem estar do homem (DARWIN 2009).

O rebanho bovino mundial e a produção de carne crescem a cada ano e incrementos nos processos de produção são necessários para a manutenção do mercado. Uma das principais ferramentas utilizadas para a produção são as biotécnicas da reprodução, como a inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embriões (TE), maturação de oócitos *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e a produção de embriões *in vitro* (PIVE). A FIV e a PIVE se desenvolveram e desde então a taxa de maturação oocitária e de produção de embriões viáveis tem aumentado (GINTHER et al., 2003). Ainda assim, esforços são necessários para a aplicação mais rentável destas técnicas.

A aspiração folicular guiada por ultrassom para a colheita de oócito (OPU) combinada com a PIVE é um método aplicável na reprodução bovina (HASLER et al., 1995), apresentando a vantagem de não ser invasiva, possuir alta repetibilidade, e é considerada segura, apesar de impor alguns riscos às fêmeas. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso em vacas doadoras com problemas reprodutivos, clinicamente inférteis, com idade avançada, novilhas, em lactação e pós-parto (LOONEY et al., 1994; BUNGARTZ et al., 1995; RIDELL et al., 1997; FRY et al., 1998; KENDRICK et al., 1999; ALLER et al., 2010). Pode ainda ser um modo alternativo de obtenção de gametas de fêmeas gestantes e geneticamente valiosas (RYAN et al., 1993).

Em vacas gestantes a OPU pode ser comprometida devido às mudanças na posição anatômica dos ovários, menor número de folículos e oócitos recuperados a partir do 5º mês de gestação, comparados com os recuperados do 2º ao 4º mês (EIKELMANN et al., 2000). Outro problema é a tendência de diminuição dos folículos grandes a partir da segunda metade da gestação (REXROAD; CASIDA, 1975). Nestes animais, a estimulação hormonal antes da OPU, utilizando gonadotrofinas exógenas, tem sido um método utilizado para aumentar o número de folículos disponíveis para aspiração, aumentando o rendimento de óocitos, com qualidade superior e embriões com maior viabilidade (MEINTJES et al., 1995).

Desta forma, a colheita de oócitos de vacas gestante pode levar a comprometimentos na FIV e PIVE. A presença de um corpo lúteo parece exercer um controle local sobre o crescimento dos folículos e aparentemente, ter uma influência negativa para o crescimento de folículos maior do que 7 mm, entre os dias 21/22 até os

60 dia da gestação (PIERSON; GINTHER, 1987; DRIANCOURT et al., 1991). O corpo lúteo pode regular o desenvolvimento folicular ovariano inibindo a resposta às gonadotrofinas exógenas evitando a luteólise durante a gestação, já que o estradiol está envolvido na produção de prostaglandinas pelo útero (THATCHER et al., 1986).

A produção de embriões FIV e PIVE de melhor qualidade está ligada a melhorias no sistema de maturação oocitária. Ainda não se conhece totalmente a interação do oócito com o líquido folicular, meio que o mantém até sua completa maturação no ovário. É necessário entender o completo metabolismo folicular para determinar a qualidade oocitária e com isto desenvolver sistemas eficientes de maturação para aquisição da competência dos oócitos (KRISHER et al., 2007). Em bovinos as interações proteicas, provavelmente, são movimentadas pelas alterações hormonais durante o ciclo estral e durante a gestação (SENGER et al., 2003).

Neste sentido vários estudos foram desenvolvidos em humanos a fim de entender a interação das proteínas presentes nas secreções (fluido folicular) das células da granulosa e teca e suas interações/funções com oócito. Os bovinos, apesar de muitos estudos a respeito da FIV e PIVE, os resultados relacionados à expressão de proteínas no fluido folicular e suas relações com o gameta feminino os estudos são raros.

Em vista da ausência de estudos sobre o perfil proteômico do fluido folicular durante a foliculogênese de vacas gestante, visando à melhoria de processos como MIV e a FIV, o presente estudo objetivou descrever as proteínas diferenciais do líquido folicular de vacas gestantes colhidos de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento.

2. Materiais e métodos

2.1. Colheita e preparação das amostras

Foram colhidos os ovários de 36 vacas de 1 a 4 meses de idade gestacional em um abatedouro local. A gestação foi confirmada pela presença de feto no útero durante o abate. Os ovários foram armazenados individualmente/vaca em frascos de 50 mL contendo solução salina 0,9% de NaCl, a 37°C e transportados em caixas térmicas até o laboratório, num período máximo de 3,5 horas.

No laboratório, os ovários foram colocados em um recipiente contendo solução salina 0,9% NaCl e submetidos a avaliação ultrassonográfica (Figura 1, DOMED Sone Scape A6, MedWrench, LLC, Peachtree City, GA, USA) para mensuração dos folículos. As estruturas foram classificadas de acordo com o diâmetro e separadas em 3

grupos, folículos pequenos ($\leq 6,4\text{mm}$), médios ($6,5\text{mm}$ a $8,9\text{mm}$) e grandes ($\geq 9,0\text{mm}$) ver figura 1, seguida da aspiração do líquido folicular dos mesmos, utilizando-se seringa de 3 ml e agulha 25x7 e a presença de corpo lúteo também foi anotado.

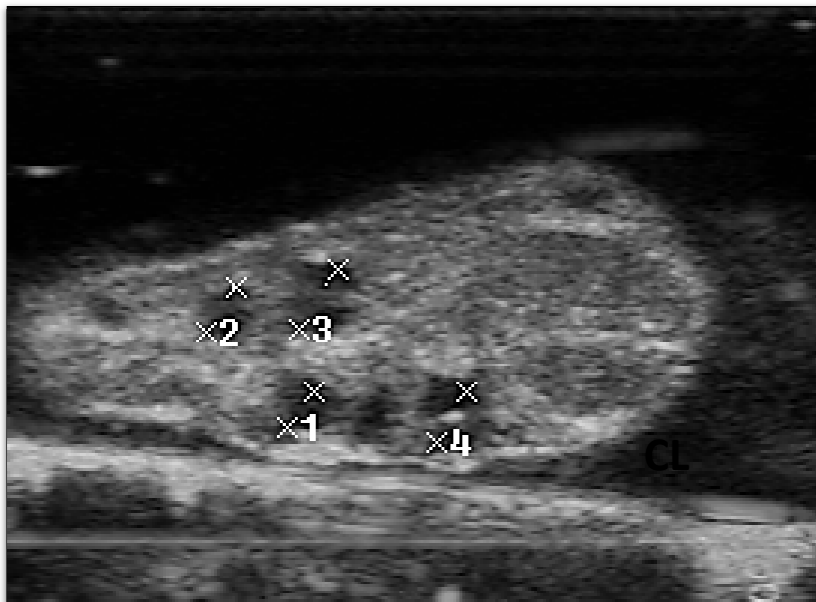


Figura 1. Imagem ultrassonográfica de ovário com vários folículos, alguns identificados pelo numero 1, 2, 3 e 4 e com presença de corpo lúteo (CL)

O fluido folicular foi depositado em tubos plásticos e centrifugados a $600\times g$, durante 10 minutos, para a separação do conteúdo celular. Então, o sobrenadante foi colhido armazenados a -20°C .

2.2. Concentração de proteínas totais no líquido folicular

A concentração de proteínas totais no líquido folicular foi determinada pelo método de Bradford (Bradford Reagent, B6916, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA). As amostras foram diluídas a 1: 60 em água ultra-pura e $25\mu\text{L}$ da diluição foram acrescidos de $750\mu\text{L}$ da solução de Bradford. Todas as amostras foram preparadas em duplicata. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, num comprimento de onda de 595 nm. O equipamento foi zerado com uma amostra denominada branco, a qual continha $25\mu\text{L}$ de água ultra-pura e $750\mu\text{L}$ da solução de Bradford. As absorvâncias foram anotadas e a concentração foi determinada de acordo com uma curva padrão.

2.3. Concentração hormonal do líquido folicular

As concentrações de progesterona do líquido folicular foram determinadas por radioimunoensaio (RIA Progesterone, ref. IM 1188, Beckman Coulter, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX, USA), de acordo com as indicações do fabricante. A sensibilidade do ensaio foi de 0,03 ng/mL e o coeficiente de variação intraensaio foi de 1%. A curva padrão variou de 1,5 a 5,6 ng/mL. Antes do ensaio, as amostras foram diluídas na proporção de 1: 50 em tampão fosfato salina pH 7,0 (PBS). A leitura foi efetuada em contador gama (WIZARD2 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). As concentrações de progesterona nas amostras foram determinadas pelo equipamento de acordo com a curva padrão.

As concentrações de estradiol foram determinadas por ensaio imunoenzimático, ELISA (Estradiol EIA Kit, ref. 582251, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante e de acordo com Gasperin et al. (2012). As leituras dos resultados foram efetuadas em leitor de ELISA e os resultados determinados por software específico.

Baseados nas concentrações de progesterona e estradiol (GRIMESE; IRELAND, 1986), os folículos foram classificados em saudáveis ($E2: P4 > 1$), transicionais ($E2: P4 > 0,01 < 1$) altamente atresícos ($E2: P4 < 0,01$).

2.4. Eletroforese unidimensional

A eletroforese unidimensional do líquido folicular foi realizada de acordo com Laemmli (1970) e adaptado por Bollag et al. (1996). Foram utilizados mini-géis confeccionados em cuba vertical (Hoefer MiniVE Vertical Electrophoresis System, GE HealthCare, São Paulo, SP, Brasil), com gel de separação de 12% e de empilhamento de 5% de poliacrilamida. As amostras foram diluídas numa concentração de 1: 60 em água ultra pura em cada poço da cuba foi aplicado um total de 7 uL sendo assim 70 µg de proteína. A eletroforese foi efetuada sob corrente constante de 15 mA/gel e voltagem máxima de 300V.

Após a corrida, o gel foi fixado com solução de 40% de etanol e 10% de ácido acético por 60 minutos e corado com coomassie coloidal (NEUHOFF et al., 1985 adaptado por NEUHOFF et al., 1988 e LUO et al., 2006). O coomassie concentrado foi preparado com 2% de ácido fosfórico, 10% de sulfato de amônia, e 0,1 de coomassie G250 e solução trabalho foi preparada com uso de 80% da solução trabalho acrescida de 20% de metanol. Após a coloração os géis foram descorados em água destilada e

mantidos em ácido acético 10% até serem fotodocumentados. As imagens dos géis foram lidas em software específico (Image Master v.3.0, GE HealthCare, São Paulo, SP, Brasil) para se estimar as massas moleculares e as densidades ópticas integradas (IOD) das bandas, de cada amostra no gel. As massas moleculares foram estimadas no marcador de massa molecular (Full Range Rainbow RPN800N, Recombinant Protein Molecular Weight Markers, 12 a 225 kDa, GE HealthCare, São Paulo, SP, Brasil).

2.5. Espectrometria de massas

2.5.1. Digestão de In-gel de proteínas

As bandas principais que apareceram em todos os géis e com intensidade forte de coloração e as diferenciais foram selecionadas, recortadas dos géis e fragmentadas em tamanhos de aproximadamente 1 mm³, com auxílio de uma lâmina de bisturi. Os fragmentos foram transferidos pra microtubos e foi adicionada solução de descoloração (50% v/v acetonitrila [ACN] e 25 mM bicarbonato de amônio) até total retirada descoloração.

A seguir os fragmentos foram desidratados com ACN 100% a seguir realizada a redução e a alquilação dos géis. Os fragmentos foram reduzidos com 20 mM de DTT em 50 mM de bicarbonato de amônio, incubados por 40 min a 55°C. O líquido excedente foi removido e substituído por 55 mM de iodoacetamida em 50 mM de bicarbonato de amônio, no escuro, por 30 minutos à temperatura ambiente. O líquido excedente foi novamente removido e os fragmentos lavados com 25 mM de bicarbonato de amônio. Após serem novamente desidratados com 100 % de ACN, os fragmentos foram reidratados com solução de 20 ng/μL de tripsina (Promega V5111) em 50 mM de bicarbonato de amônio. Após a reidratação total, os fragmentos de gel foram parcialmente cobertos com 25 mM de bicarbonato de amônio e a digestão, realizada a 37°C por 16 horas.

A ação da tripsina foi bloqueada pela adição de solução bloqueadora (50% ACN, 5% ácido fórmico em água ultrapura) e os peptídeos eluídos dos fragmentos por lavagens sucessivas com solução de eluição I (60% metanol, 1% ácido fórmico, em água ultrapura), solução de eluição II (50% ACN, 1% ácido fórmico, em água ultrapura), seguidas da lavagem final com 100% de ACN. Os sobrenadantes de cada banda foram transferidos para tubo de microcentrífuga e o volume foi reduzido em concentrador a vácuo, à temperatura ambiente.

2.5.2. Purificação das amostras

Às amostras secas a vácuo foram adicionados 10µL de solução 0,1% ácido trifluoroacético (TFA), diluído em água ultrapura. Após esse passo cada uma foi purificada utilizando microcolunas de fase reversa (Reverse phase Zip-Tip C18, Millipore). Para isso, as colunas foram equilibradas em solução A (100% ACN, 0,1% v/v TFA), solução B (50% v/v ACN, 0,1% v/v TFA em água ultrapura) e solução C (100% ACN, 0,1% v/v TFA em água ultrapura). Após o equilíbrio, as amostras proteicas puderam ser ligadas à coluna, seguindo-se lavagem com solução D (5% v/v metanol, 0,1% v/v TFA em água ultrapura). Para a eluição dos peptídeos, 10µL de solução B foram aspirados e acondicionados em tubos de vidro borossilicato (Waters Total Reco very vials). Seguiu-se nova concentração a vácuo.

2.5.3. LC-MS^E

As amostras foram ressuspensas em 20 uL de formiato de amônio 20 mM pH 10,0. Os peptídeos foram sequenciados no espectrômetro de massas *Synapt G2 HDMS* (Waters), acoplado ao sistema *Acquity UPLC MClass*, com tecnologia 1D Simulado (Waters). Os peptídeos foram capturados por uma coluna Trap 2D Symmetry C18 (5 µm, 180 µm x 20 mm) (Waters). A separação foi realizada com uma coluna de primeira dimensão *Acquity UPLC M-Class peptide BEH C18* (5 µm, 300 µm x 50 mm) (Waters) e uma coluna analítica *Acquity UPLC M-Class peptide CSH C18* (1.7 µm, 75 µm x 150 mm) (Waters). As fases móveis da primeira dimensão são: solução de formiato de amônio 20 mM pH 10 e acetonitrila. Já na segunda dimensão os dois eluentes foram: A (0,1% de ácido fórmico em água ultrapura) e B (100% ACN contendo 0,1% ácido fórmico).

O gradiente da primeira dimensão se inicia com 97% de formiato de amônio e 3% de ACN. Em 4,6 minutos foi atingido 55% de formiato de amônio e 45% de acetonitrila e até completar 10 minutos a condição inicial foi restabelecida. O fluxo foi de 2 µL/min.

O gradiente da fase móvel analítico se iniciou com 93% de A e 7% de B e por 92 minutos o gradiente mudou linearmente para 60% de A e 40% de B e, após 2 minutos foi atingido 15% de A e 85% de B. Em dois minutos a coluna restabeleceu a condição inicial. O fluxo foi de 0,300 µL/min. Foi injetado 9 µL da amostra.

A aquisição dos dados foi realizada em um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) *Synapt G2 MS*, equipado com uma fonte

nanolockspray operando no modo positivo (Waters, Manchester, UK), com *ion mobility*. Para todas as análises, o espectrômetro de massas operou no modo “V”, com poder de resolução típico mínimo de 12500, com a cela de *ion mobility* ativada. O espectrômetro de massas foi calibrado com [Glu1] fibrinopeptídeo B (GFP) humana 1 pmol.µL⁻¹ e a mesma solução foi empregada para o "lock mass" utilizando o íon de dupla carga com uma amostragem a cada 30 segundos. Os experimentos foram realizados no modo HDMS^E (análise independente de dados) que consiste na aquisição alternada, entre espectros obtidos à baixa (3 eV) e alta (15-50 eV) energia de colisão, aplicadas ao módulo *trap* do ‘*T-wave*’ CID, em presença de gás argônio, que produz íons precursores e produtos em sequência. O tempo de varredura foi de 0,8 segundos em cada modo, no intervalo de *m/z* entre 50 e 2000.

2.5.4. Análise dos dados

Os espectros de massas foram processados utilizando o *software ProteinLynx GlobalServer* (PLGS) versão 3.1, com o banco de dados reverso de Bos Taurus UNIPROT (data do download: 19 de fevereiro de 2016; 43705 proteínas). Os parâmetros de processamento incluíram: tolerância automática para precursores e íons-produto; mínimo de três íons-fragmento correspondentes por peptídeo; mínimo de 7 íons-fragmento correspondentes por proteína; mínimo de 2 peptídeos correspondentes por proteína; um possível erro de clivagem pela tripsina; carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável; taxa máxima de descoberta de falso positivo (FDR) a 4%.

Após identificação proteica a anotação da ontologia gênica de cada proteína foi obtida no UniprotKB (www.uniprot.org.br) usando as categorias função molecular, processo biológico e componente celular. As figuras referentes à ontologia gênica foram obtidas *online* no endereço <http://www.pantherdb.org> e os interatomos no endereço <http://string-db.org/>.

3. Resultados

As Tabelas 1, 2 e 3 representam os resultados obtidos na determinação das concentrações de progesterona, do estradiol e da eletroforese, considerando as amostras obtidas de todos os ovários, dos ovários com e sem corpo lúteo. Foi encontrado um total de 46 bandas nas diferentes categorias de tamanhos foliculares (Figura 2). Contudo, nem todas as bandas estavam presentes em todas as amostras. No grupo de folículos

>6,5 a 8,9 mm apareceu uma banda de 282,95 kDa, a qual não estava presente nas outras categorias. Nas amostras contidas em ovários com corpo lúteo, as bandas 161,0 kDa e 9,02 kDa estavam presentes apenas nas categorias de folículos $\leq 6,4$ mm. Considerando os ovários sem corpo lúteo, o grupo $\leq 6,4$ mm, apresentou exclusivamente as bandas 232,54 kDa, 165,00 kDa, 130,82 kDa, 96,71 kDa, 10,15 kDa e 8,95 kDa; os de 6,5 a 8,9 mm, a banda 283,95 kDa e os $\geq 9,0$ mm as bandas 152,59 kDa e 95,21 kDa.

Tabela 1. Resultados da média e desvio padrão das concentrações de progesterona (P4), estradiol (E2) e da eletroforese do líquido folicular de vacas gestantes, de diferentes tamanhos de folículos.

Categoria	n	P4 (ng/mL)	E2 (pg/mL)	n° bandas	Massa mol. máx. e mín. (kDa)
Todas	63	71,32 \pm 80,06	27,57 \pm 30,62	48	282,95 a 6,72
$\leq 6,4$ mm	45	64,68 \pm 71,41	28,49 \pm 32,49	45	261,73 a 6,72
6,5 a 8,9 mm	6	129,62 \pm 126,16	17,63 \pm 12,30	40	282,95 a 8,95
$\geq 9,0$ mm	12	68,51 \pm 76,96	21,45 \pm 24,87	42	258,62 a 6,72

Tabela 2. Resultados da média e desvio padrão das concentrações de progesterona (P4), estradiol (E2) e da eletroforese do líquido folicular de vacas gestantes com presença de corpo lúteo ovariano, de diferentes tamanhos de folículos.

Categoria	n	P4 (ng/mL)	E2 (pg/mL)	n° bandas	Massa mol. máx. e mín. (kDa)
Todas	31	92,53 \pm 89,82	33,24 \pm 36,70	48	261,73 a 6,72
$\leq 6,4$ mm	23	91,60 \pm 89,21	34,08 \pm 38,28	48	261,73 a 6,72
6,5 a 8,9 mm	4	122,93 \pm 129,88	20,39 \pm 14,88	41	261,73 a 8,95
$\geq 9,0$ mm	4	49,34 \pm 51,38	40,48 \pm 54,50	40	250,5 a 6,72

As Tabelas 4 a 9 representam todas as proteínas encontradas nas classes foliculares estudadas. Já as Figuras 4 a 8 representam os interatomos formados nas classes foliculares estudadas.

Na Figura 9, estão representados os folículos saudáveis de vacas gestantes, foram encontrados 117 espectros obtidos pelo LC MS/MS ESI-TOF dos quais geraram 40 proteínas e as principais (Tabela 4) foram albumina sérica, apolipoproteína A, complemento C3, fibrinogênio, IGK, proteínas de choque térmico, serotransferrina, serpina e tubulina. As principais funções moleculares nesta classe foram atividade catalizadora, atividade reguladora de enzimas e moléculas de atividades estruturais. Os

principais processos biológicos foram processo metabólico, localização, regulação biológica e processo celular. Os componentes celulares que se destacaram foram região extracelular, complexo macromolecular e parte celular. As classes de proteínas mais comuns foram proteases, citoesqueleto, enzima moduladora e proteínas de transferir/carrear.

Tabela 3. Resultados da média e desvio padrão das concentrações de progesterona (P4), estradiol (E2) e da eletroforese do líquido folicular de vacas gestantes sem presença de corpo luteo ovariano, de diferentes tamanhos de folículos.

Categoria	n	P4 (ng/mL)	E2 (pg/mL)	n° bandas	Massa mol. máx. e mín. (kDa)
Todas	32	53,03 ± 65,00	21,39 ± 23,49	48	282,95 a 9,46
≤6,4 mm	22	36,54 ± 26,94	25,78 ± 26,38	46	261,73 a 9,46
6,5 a 8,9 mm	2	143,00 ± 168,64	12,10 ± 0,67	28	282,95 a 9,52
≥9,0 mm	8	75,91 ± 93,30	16,01 ± 13,20	40	258,62 a 9,86

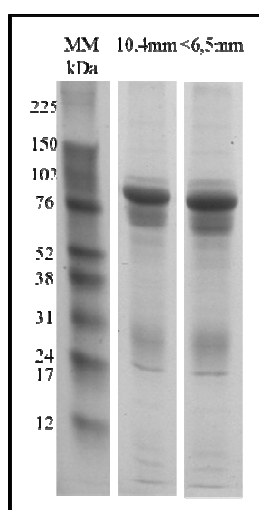


Figura 2. Gel de eletroforese em poliacrilamida do líquido folicular de vacas gestantes. A coluna 1 representa o marcador de massa molecular, a 2 o líquido de uma folículo medindo 10,4 mm e a 3 de um folículo medindo <6,5mm.

Na Figura 10 estão representados os folículos transicionais de vacas gestantes, nos quais foram encontrados 21 espectros obtidos pelo LC MS/MS ESI TOF e geraram 12 proteínas, sendo as principais a IGK e o cloreto intracelular (Tabela 5). Os principais processos biológicos foram regulação biológica, processo celular, localização, processo metabólico e organismo multicelular. Quanto à função molecular, as mais observadas

foram de atividade catalizadora, atividade molecular estrutural e atividade de transporte. Os componentes celulares que se destacaram foram região extracelular, seguida com menor expressão de partes celulares, complexo molecular e organelas e as classes de proteínas mais comuns foram de transferir/carrear.

Na Figura 11 estão representados os folículos atrésicos de vacas gestantes, nos quais foram encontrados 51 espectros obtidos pelo LC MS/MS ESI TOF que geraram 22 proteínas e as principais foram a α -proteína, apolipoproteína, complemento C3, gelsolina, fibrinogênio, serpinas e tubulinas (Tabela 6). As principais funções moleculares observadas foram as de enzimas com atividade de regulação, enzimas catalizadoras e com menor expressão as enzimas de ligação. O processo biológico de maior destaque foi de regulação biológica e processo metabólico seguido de processo celular e localização. O componente celular com maior expressão foi na região extracelular e as classes de proteínas mais encontradas foram às enzimas moduladoras seguida das proteínas carreadoras/transferência.

Na Figura 12 estão representados os folículos saudáveis de vacas gestantes com presença de corpo lúteo. Foram encontrados 42 espectros obtidos pelo LC MS/MS ESI TOF os quais geraram 11 proteínas. As principais foram albumina, α -proteína, apolipoproteína, complemento C3, serpinas e endorfinas (Tabela 7). A função molecular com maior destaque foram enzimas catalizadoras e reguladoras de atividade seguida, com menor expressão pelas proteínas de ligação. O processo biológico com maior destaque foi de regulação biológica, seguido por processo metabólico. O componente celular mais encontrado foi na região extracelular. As classes de proteínas com maior presença foram proteases, seguidas com menor expressão de proteínas ligadas a imunidade, as moléculas de sinalização e proteínas de transferir/carrear.

Na Figura 13 estão representados os resultados dos folículos transicionais de vacas gestantes com presença de corpo lúteo. Foram encontrados 23 espectros obtidos pelo LC MS/MS ESI TOF que geraram 12 proteínas e as principais foram a apolipoproteína e proteínas de choque térmico (Tabela 8). A função molecular com maior destaque foi atividade estrutural seguida por enzima com atividade reguladora, moléculas de atividade estrutural, proteínas com atividade de transporte e com atividades antioxidantes. O processo biológico de maior destaque foi o processo metabólico e processo celular seguidos com menor expressão por processo multicelular. As classes de proteínas em semelhante destaque foram partes celulares, região extracelular, complexo macromolecular e organelas a classe de proteínas de maior

destaque foram as chaperone.

A Figura 14 representa os folículos atrésicos de vacas gestantes com presença de corpo lúteo. Foram encontrados 75 espectros obtidos pelo LC MS/MS ESI TOF, os quais geraram 23 proteínas. As principais foram a fibrinogênio, serpinas, alpha proteínas, apolipoproteína, tubulinas e proteínas de choque térmico (Tabela 9). As funções moleculares de maior destaque foram atividade catalizadora e as enzimas com atividade regulatórias. O processo biológico com maior destaque foram processo biológico e regulação biológica seguida por processo celular e localização. O componente celular com maior expressão foi na região extracelular seguida com complexo macromolecular. As classes de proteínas com maior destaque foram as proteases seguida pelas proteínas de citoesqueleto.

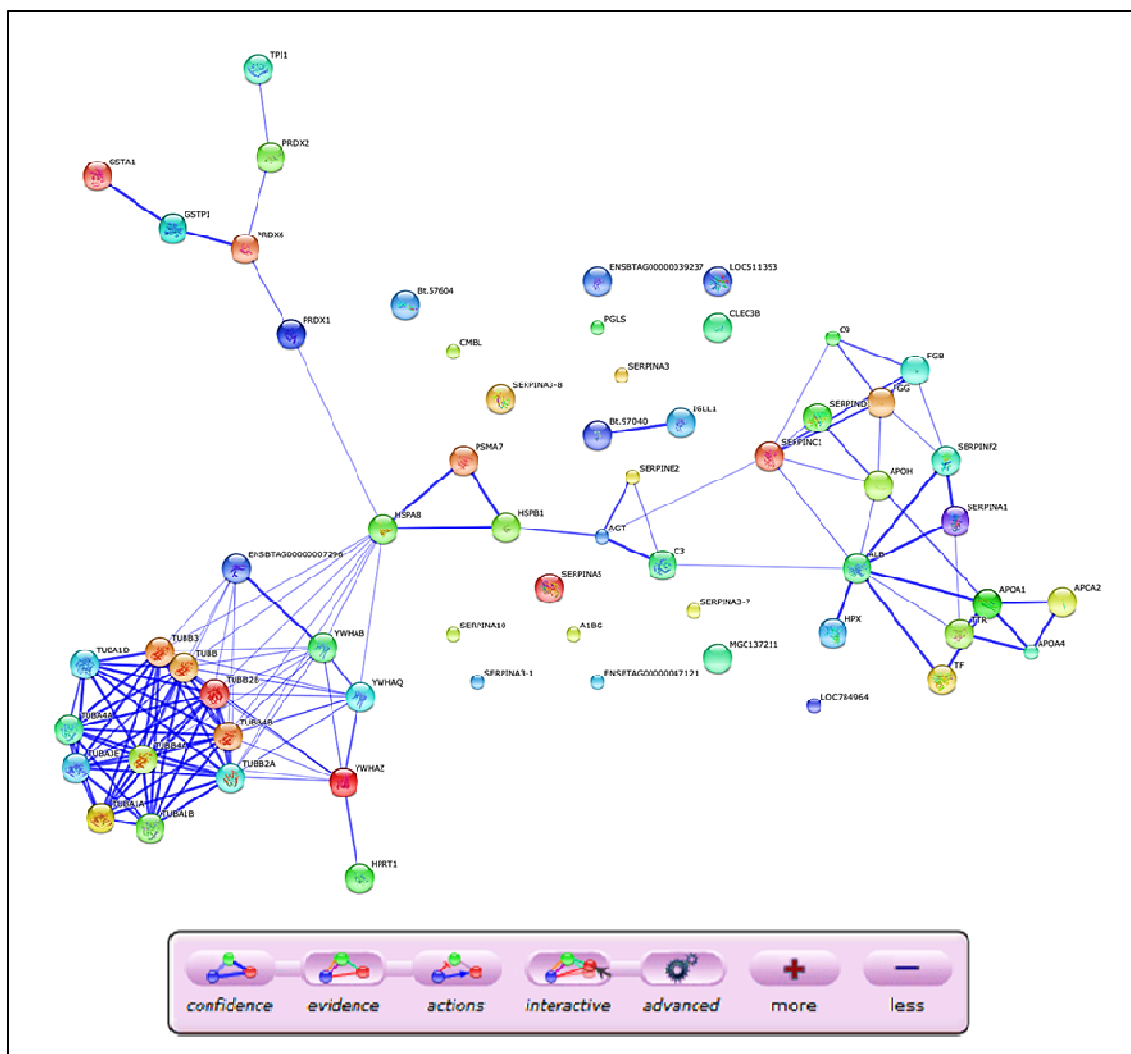


Figura 3. Interatoma das proteínas obtidas do líquido de folículos saudáveis de ovários sem corpo lúteo de vacas gestantes (<http://string-db.org/>)

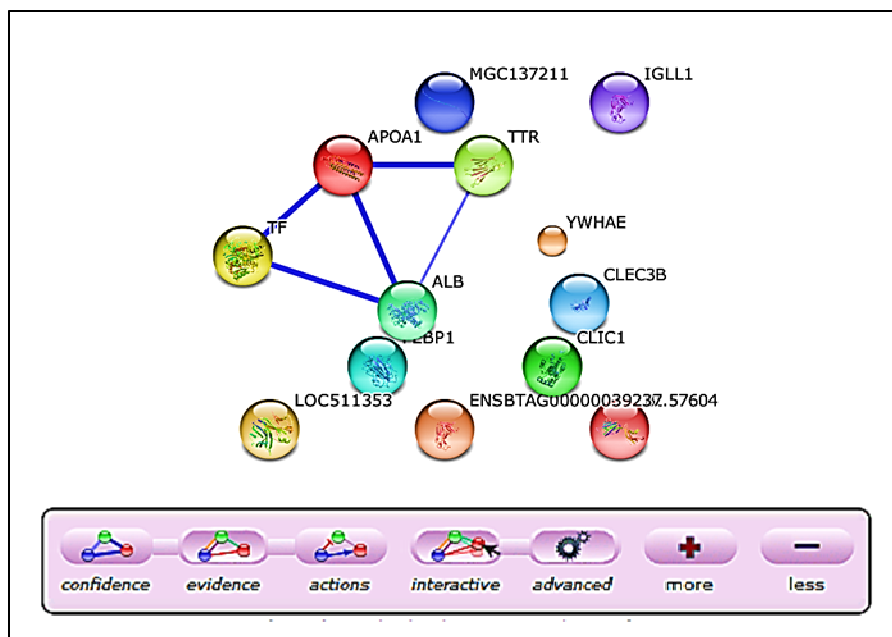


Figura 4. Interatoma das proteínas obtidas do líquido de folículos transicionais de ovários sem corpo lúteo de vacas gestantes (<http://string-db.org/>)

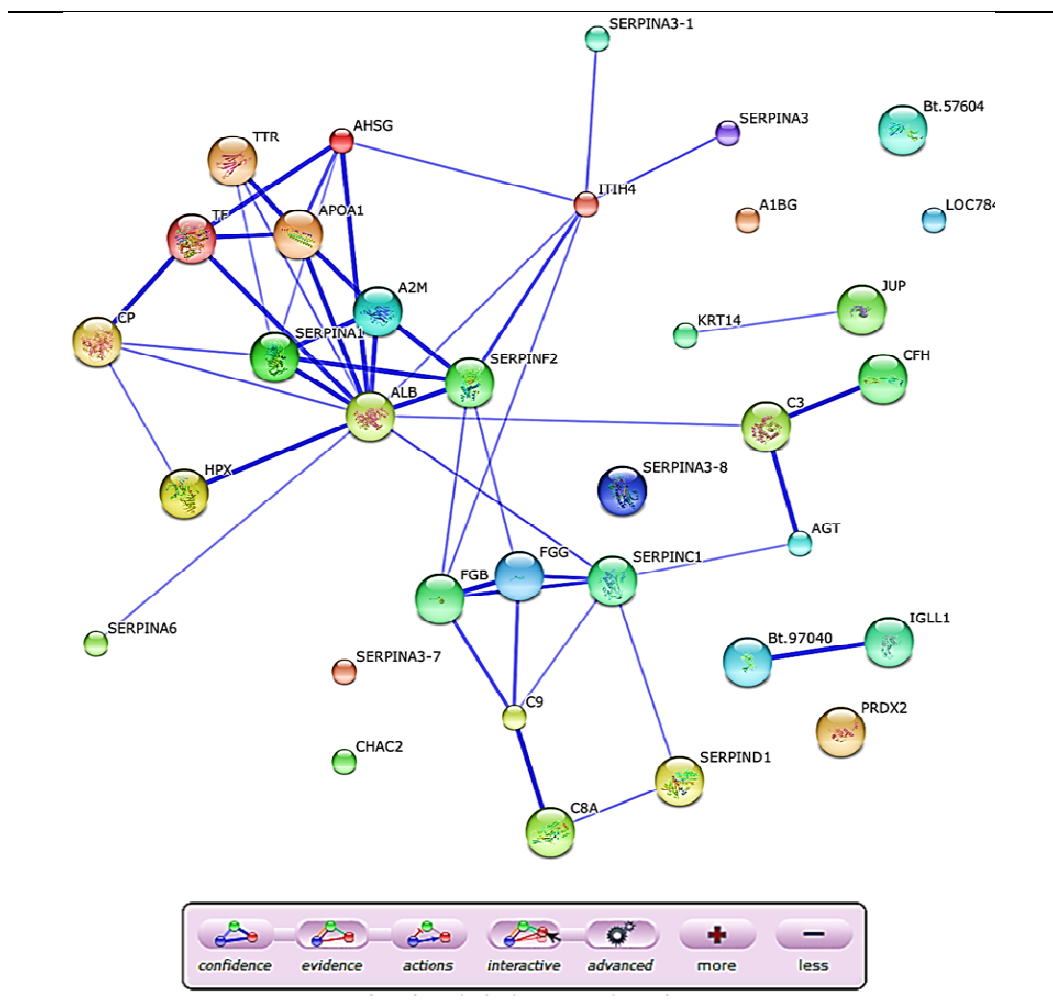


Figura 5. Interatoma das proteínas obtidas do líquido de folículos atresicos de ovários sem corpo lúteo de vacas gestantes (<http://string-db.org/>)

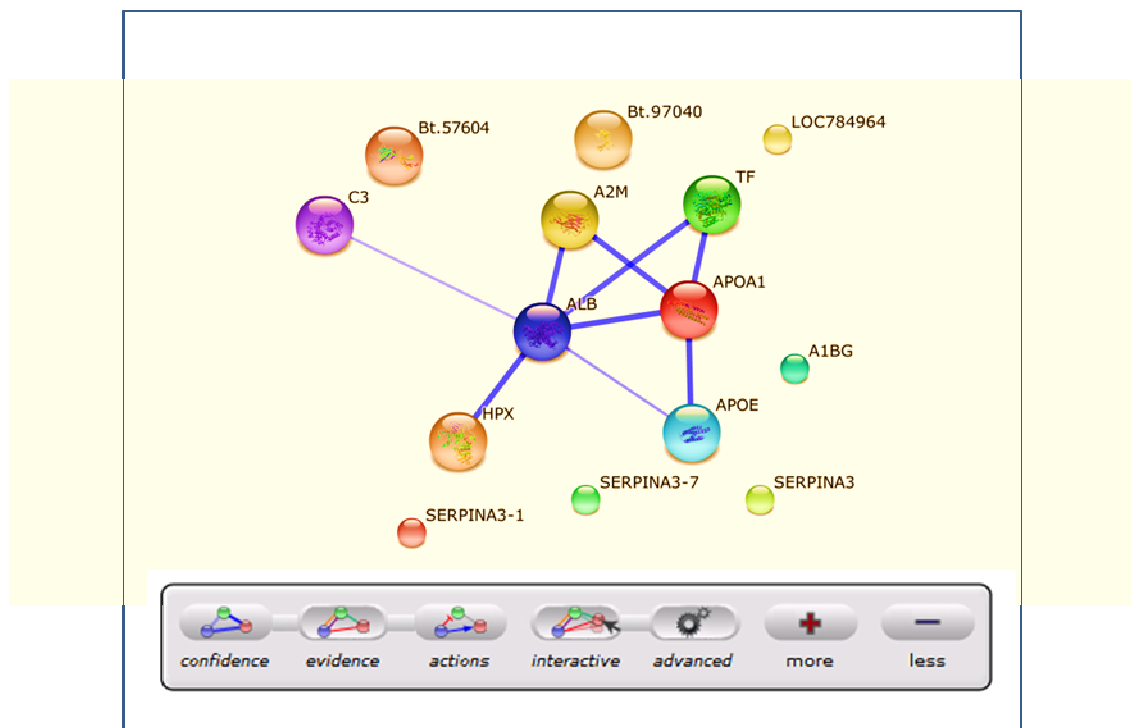


Figura 6. Interatoma das proteínas de folículos saudáveis de vacas gestantes com presença de corpo lúteo. Fonte: <http://string-db.org/>

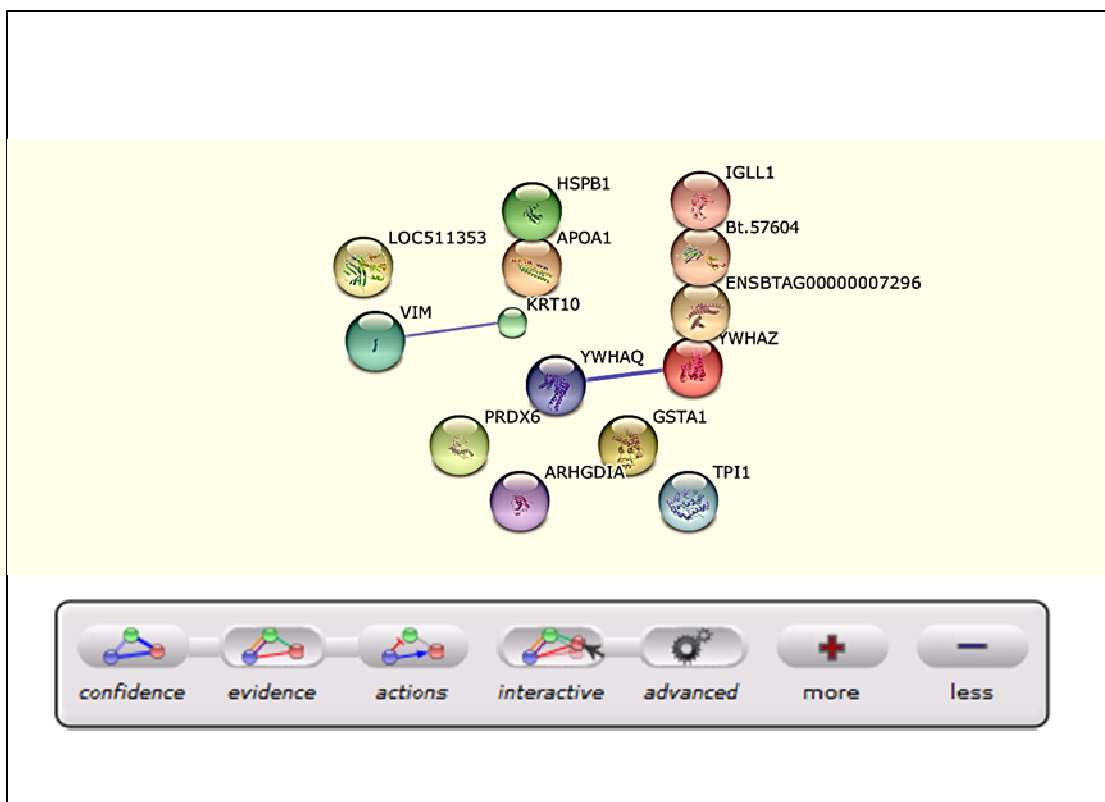


Figura 7. Interatoma das proteínas de folículos transicionais de vacas gestantes com presença de corpo lúteo. Fonte: <http://string-db.org/>

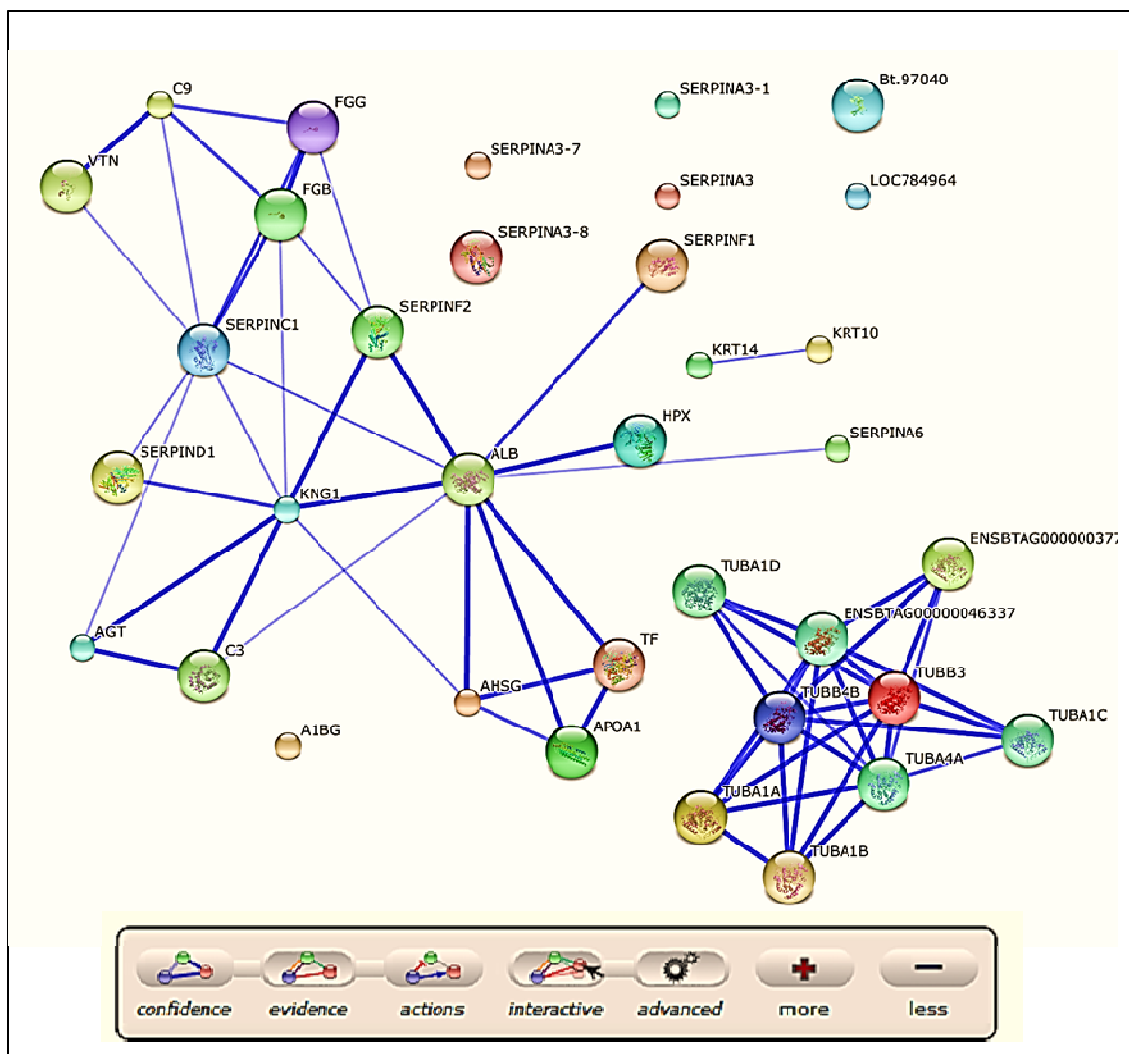


Figura 8. Interatoma das proteínas de folículos atrécicos de vacas gestantes com presença de corpo lúteo. Fonte: <http://string-db.org/>

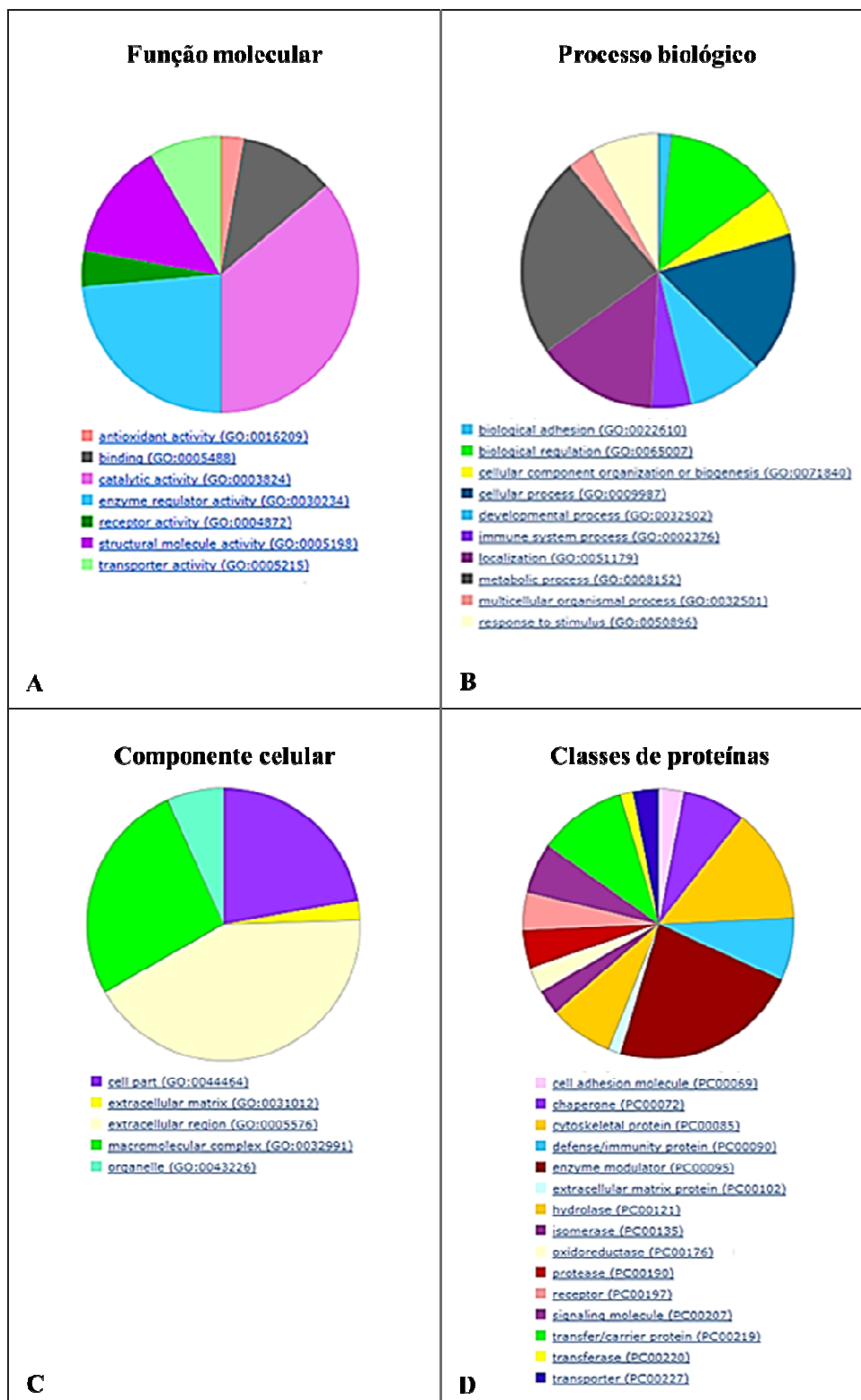


Figura 9. Ontologia gênica das proteínas do líquido de folículos saudáveis de ovários sem corpo lúteo de vacas gestantes. A. Função molecular (51 genes com 72 funções moleculares). B. Processo biológico (51 genes envolvidos em 126 processos biológicos). C. Componente celular (51 genes em 45 componentes celulares). D. Classe de proteínas (51 genes distribuídos em 66 classes de proteínas) (<http://www.pantherdb.org>)

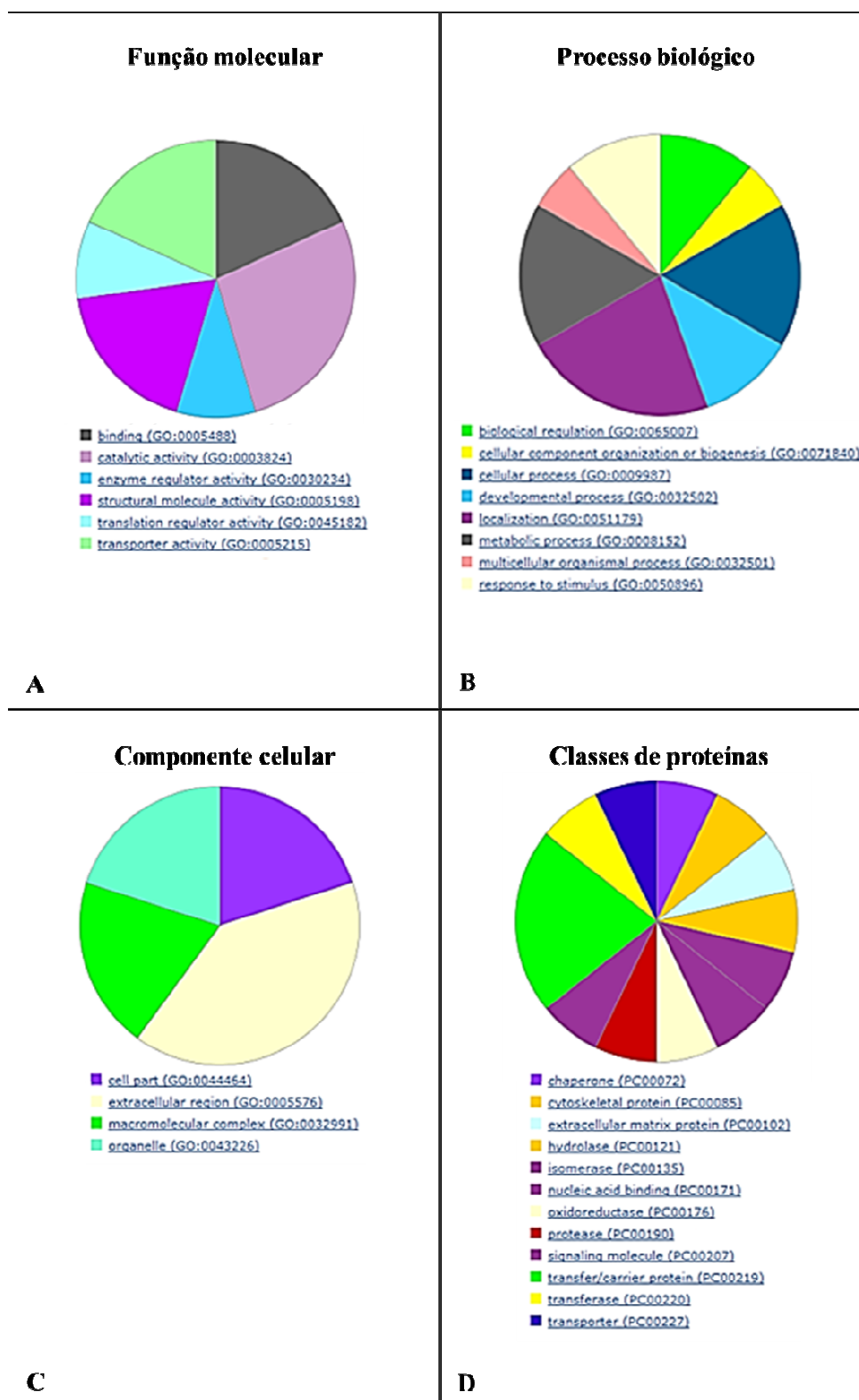


Figura 10. Ontologia gênica das proteínas do líquido de folículos transicionais de ovários sem corpo lúteo de vacas gestantes. A. Função molecular (18 genes com 11 funções moleculares). B. Processo biológico (8 genes envolvidos em 18 processos biológicos). C. Componente celular (8 genes em 5 componentes celulares). D. Classe de proteínas (8 genes distribuídos em 14 classes de proteínas) (<http://www.pantherdb.org>)

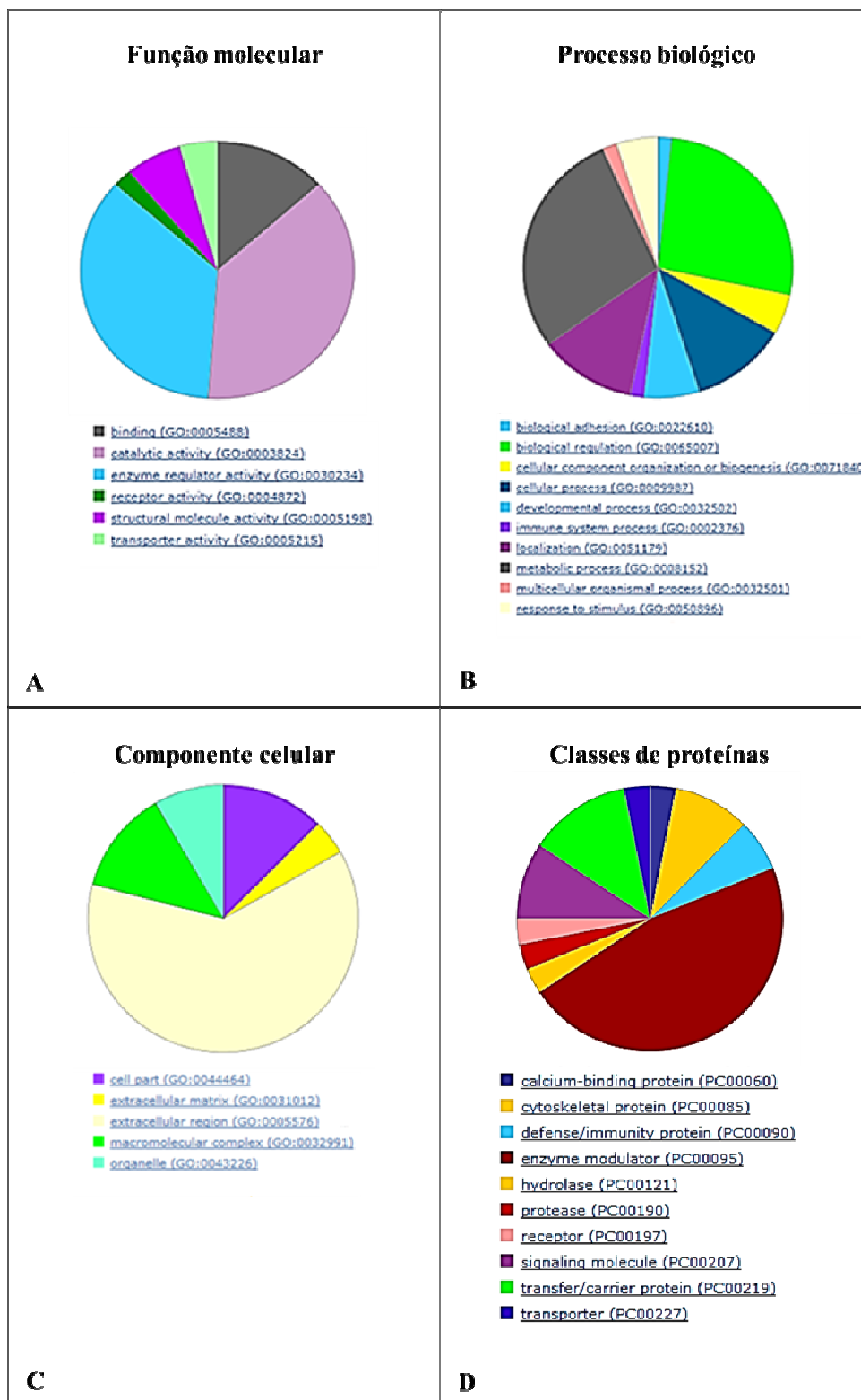


Figura 11. Ontologia gênica das proteínas do líquido de folículos atréticos de ovários sem corpo lúteo de vacas gestantes. A. Função molecular (25 genes com 45 funções moleculares). B. Processo biológico (25 genes envolvidos em 60 processos biológicos). C. Componente celular (25 genes em 24 componentes celulares). D. Classe de proteínas (25 genes distribuídos em 32 classes de proteínas) (<http://www.pantherdb.org>)

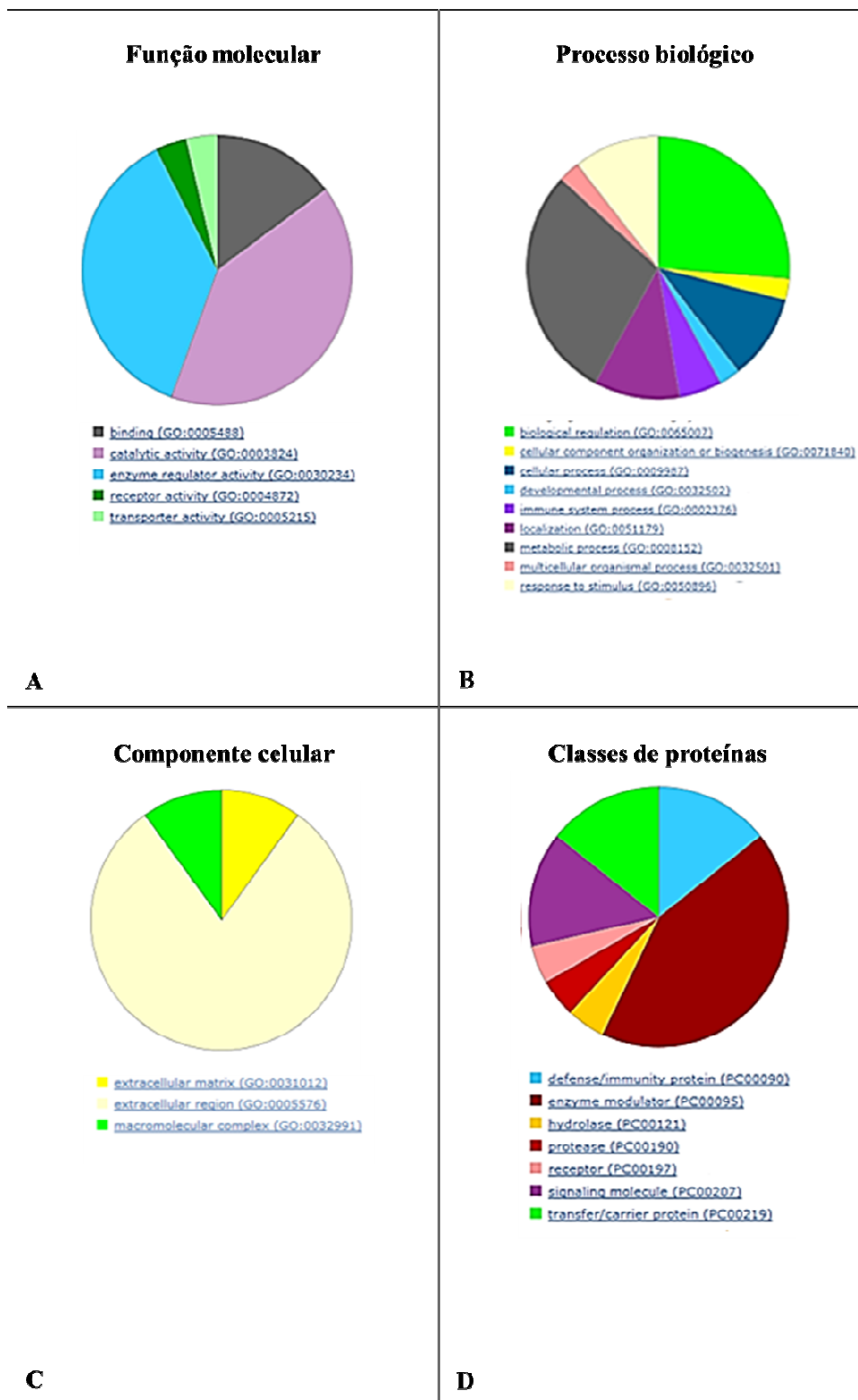


Figura 12. Ontologia gênica das proteínas do líquido de folículos saudáveis de ovários com corpo lúteo de vacas gestantes. A. Função molecular (14 genes com 27 funções moleculares). B. Processo biológico (14 genes envolvidos em 38 processos biológicos). C. Componente celular (14 genes em 10 componentes celulares). D. Classe de proteínas (14 genes distribuídos em 21 classes de proteínas) (<http://www.pantherdb.org>)

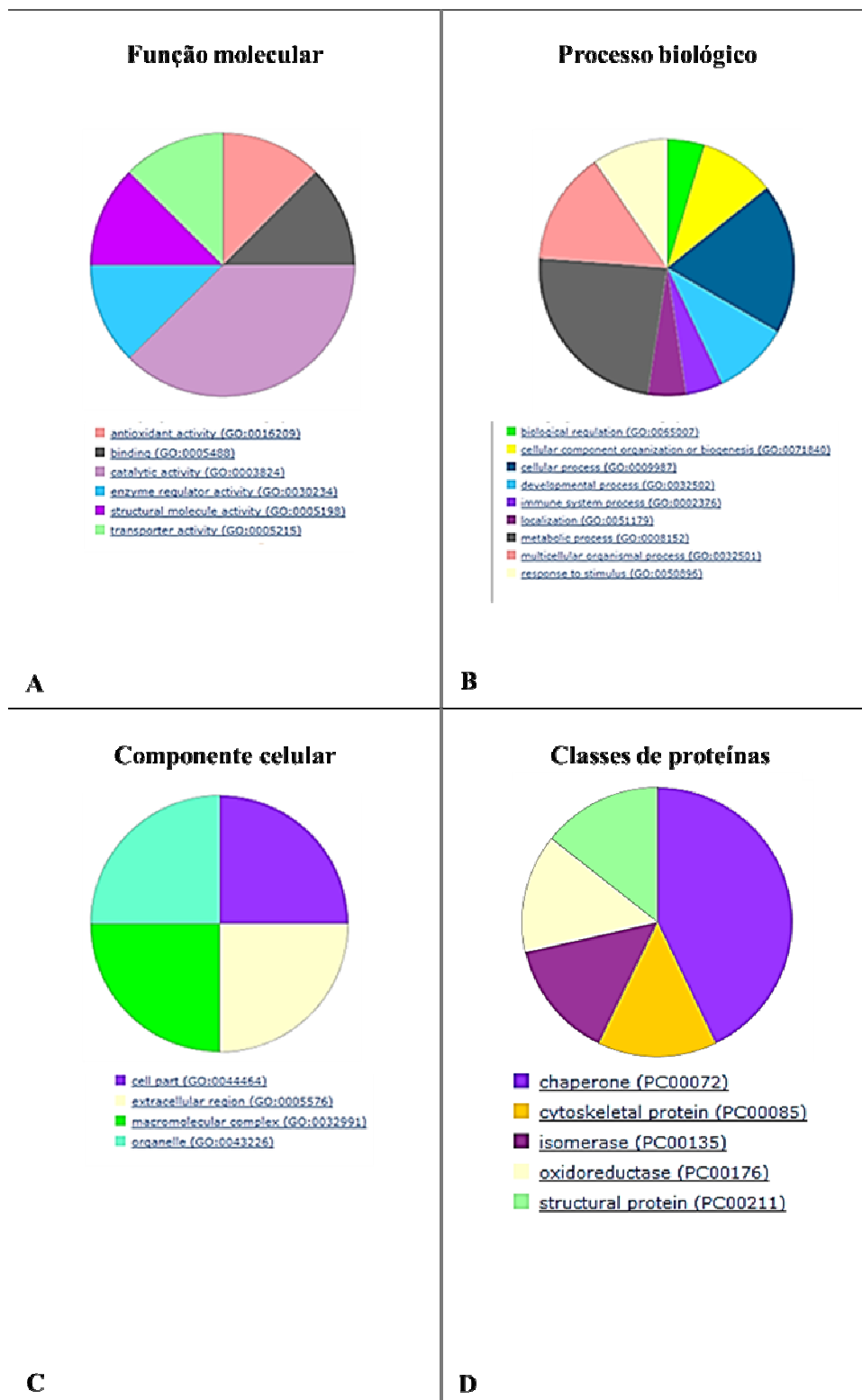


Figura 13. Ontologia gênica das proteínas do líquido de folículos transicionais de ovários com corpo lúteo de vacas gestantes. A. Função molecular (8 genes com 8 funções moleculares). B. Processo biológico (8 genes envolvidos em 21 processos biológicos). C. Componente celular (8 genes em 4 componentes celulares). D. Classe de proteínas (8 genes distribuídos em 7 classes de proteínas) (<http://www.pantherdb.org>)

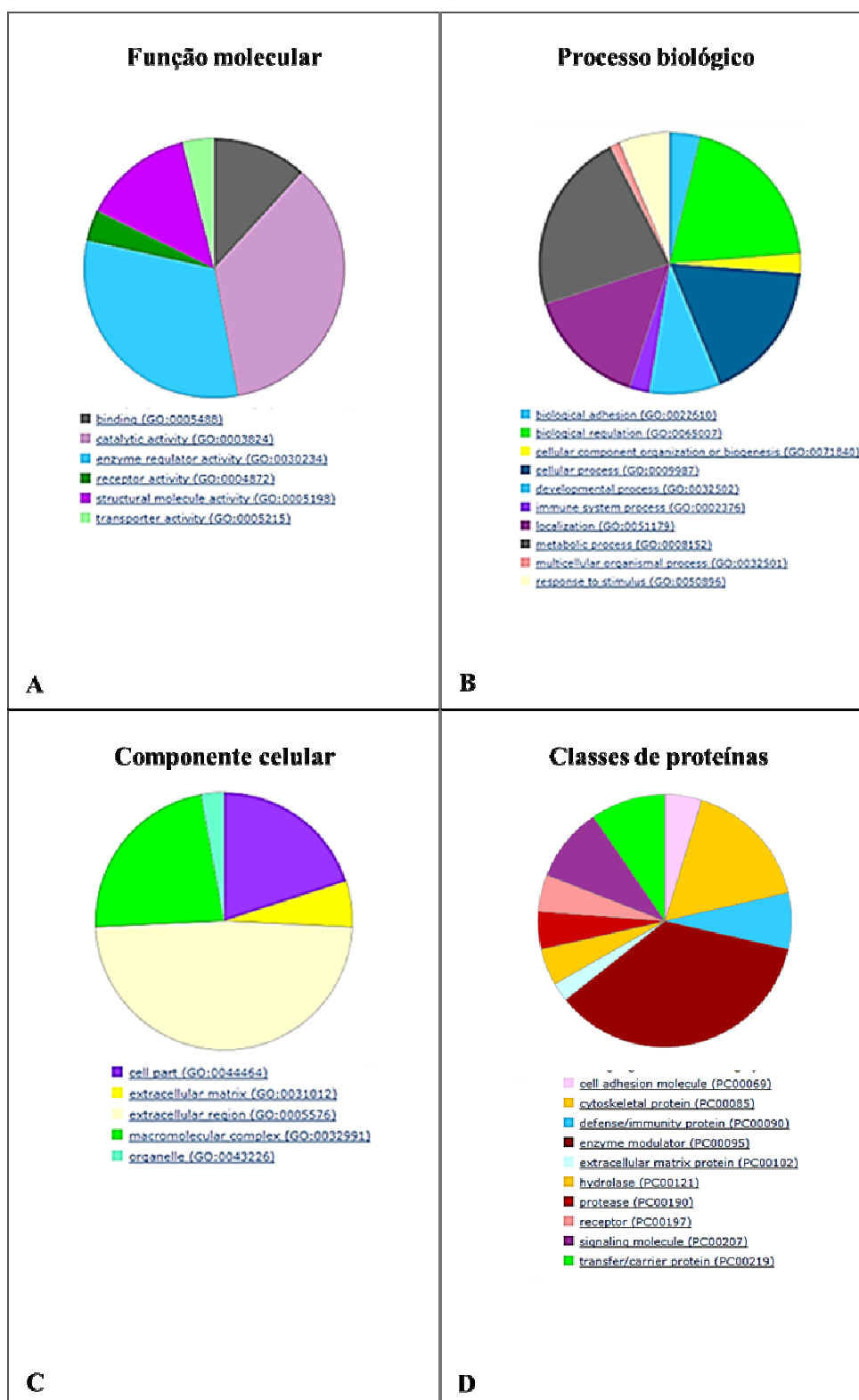


Figura 14. Ontologia gênica das proteínas do líquido de folículos atrécicos de ovários com corpo lúteo de vacas gestantes. A. Função molecular (31 genes com 51 funções moleculares). B. Processo biológico (31 genes envolvidos em 80 processos biológicos). C. Componente celular (31 genes em 35 componentes celulares). D. Classe de proteínas (31 genes distribuídos em 42 classes de proteínas) (<http://www.pantherdb.org>)

4. Discussão

No presente estudo foram encontradas várias proteínas em 6 grupos estudados pela eletroforese, cujas massas moleculares variaram entre 282,95 kDa a 6,72 kDa. Resultados semelhantes foram descritos por Ribeiro et al. (2012) os quais ainda identificaram uma proteína de 22 a 28kDa e hipotetizaram como sendo a IGFBP-3 ou IGFBP-4. Tais proteínas não foram identificadas no presente estudo, provavelmente devido à ausência de análise de todas as bandas.

No presente estudo a serpina foi uma proteína identificada nos grupos estudados, a qual já foi descrita no líquido folicular de carpas (*Cyprinus carpio*) como uma das principais proteínas inibidoras de proteases (Minin et., 2015; Tirloni et al., 2016).

O cininogênio foi encontrado apenas no líquido de folículos atrésicos em ovários com corpo lúteo e o fibrinogênio observado nos folículos saudáveis e atrésicos de ovários sem corpo lúteo e nos folículos atrésicos de ovários com corpo lúteo. Esta proteína já foi relacionada à síndrome do ovário policístico e pré-eclâmpsia em humanos (Khan et al., 2014). Nesta situação, os altos níveis de progesterona produzidos durante a gestação, podem modificar o controle local da foliculogênese, já que o fibrinogênio regula positivamente a atividade das enzimas ERK1 e ERK2. A enzima ERK foi relacionada à seleção do folículo dominante e seu desenvolvimento (Ryan et al., 2007) e a inibição da ERK aumenta a atividade de uma enzima pró-apoptótica (*Bad*) nas células da granulosa (Shiota et al., 2003). Ademais, a inibição da ERK reduz a expressão da ciclina D2 que está envolvida na progressão do ciclo celular (Kayampilly; Menon, 2004). Considerando estas informações, acreditamos que os ovários com corpo lúteo podem sofrer uma inibição do desenvolvimento folicular. Tal fato foi também suportado por Ginther et al. (2013), em outro tipo de estudo, que determinaram que a localização ipsilateral ao CL do futuro folículo ovulatório está associada com menor produção de P4 e curto intervalo interovulatório. Ainda, Ginther et al. (2016) determinaram que durante a luteólise, mais folículos subordinados continuam a regredir no ovário ipsilateral ao CL e que mais folículos se recuperam (voltam a aumentar em tamanho) na próxima onda de crescimento folicular no ovário contralateral ao CL. Em outro estudo, o mesmo grupo de autores também encontraram resultados semelhantes (Ginther; Hoffman, 2016).

A proteína ALB, uma albumina, foi a principal proteína observada nos interatomas, na maioria dos grupos. A albumina é uma proteína cuja principal função é de transporte, o que pode justificar sua interação com as várias outras proteínas

encontradas no líquido folicular. Neste estudo, esta proteína foi uma das principais identificadas no líquido folicular, incluindo suas isoformas, independente do grupo.

A trombina é uma enzima chave na cascata da coagulação e é inibida por moléculas como as serpinas e a anti-trombina 3 (Saito, 2015) que no presente estudo foi encontrada no grupo de folículos saudáveis de vacas gestantes sem presença de corpo lúteo e no grupo de folículos atresícos com presença de corpo lúteo. Já as serpinas e suas isoformas foram encontradas em todos os grupos de folículos saudáveis e atresícos independente da presença do corpo lúteo. As serpinas atuam como um inibidor da serina protease e está relacionada à resposta inflamatória e também envolvida na coagulação e fibrinólise. É a classe de proteínas mais observadas no fluido folicular de mulheres submetidas à FIV, ou seja, com problemas de infertilidade (Bianchi et al., 2013). Apesar disto, nenhuma relação específica foi encontrada no presente estudo, nas diferentes classes foliculares.

A apolipoproteína foi uma das principais proteínas identificadas no fluido folicular das vacas estudadas. Em suínos, um polipeptídeo, de 8,6 kDa foi caracterizado no líquido folicular, cuja função foi atração das células espermáticas, atuando como um guia para os espermatozoides até o local da fertilização. Baseado no sequenciamento do seu N-terminal, esta proteína foi determinada como homóloga a apolipoproteína B2, cuja principal função é o transporte lipídico e sua ação é compartilhada com a progesterona (Serrano et al., 2001). As vacas do presente estudo possuíam elevadas concentrações séricas de progesterona, o que pode ser um estímulo à produção deste tipo proteico, mas não especulamos sua função, a qual deve ser múltipla, já que a fertilização nestas fêmeas não ocorre durante a gestação, embora a foliculogênese continua.

Ademais as apolipoproteínas possuem como principal função o transporte, efluxo e homeostase do colesterol, o qual está relacionado à síntese de hormônios esteroides (Regenass-Lechner, 2016). Esta proteína, apesar da atresia folicular, ainda é observada e nesta classe de folículos, o que contribui para a produção de hormônios esteroides no tecido ovariano. A influência de outros compostos, além da progesterona sobre a produção de proteínas no líquido folicular já foi verificada em mulheres tratadas com ácido fólico previamente a FIV e ICSI. Este efeito foi observado, especialmente uma maior abundância das apolipoproteínas, principalmente A-I e C-I e menor da proteína C-reativa, concluindo que nesta situação houve uma supressão do processo inflamatório e um estímulo maior da produção de apolipoproteínas-HDLs, a quais estão relacionadas a

fonte preferencial de colesterol para produção de hormônios esteroides (Twigt et al., 2015). Esta hipótese pode ser uma das explicações da apolipoproteína ser a principal encontrada nas fêmeas estudadas, já que durante a gestação é necessária produção de altas concentrações de progesterona pelo ovário (McDonald et al., 1953).

A angiotensina foi identificada em folículos saudáveis de ovários sem corpo lúteo e atresicos de ovários com corpo lúteo. A angiotensina já está presente em folículos pré-antrais, até mesmo durante o desenvolvimento fetal ovariano de bovinos nas células da granulosa e teca (Portela et al., 2016). Ademais, esta proteína modula a produção *in vitro* de hormônios esteroides pelas células da granulosa, bem como a proliferação deste tipo celular. Outra função associada à angiotensina é a capacidade de aumentar a razão de estrógeno em relação a progesterona e que pode ser importante para reduzir o domínio das gonadotrofinas nos folículos (Montreal et al., 2015). Também de acordo com Siqueira et al. (2013) a angiotensina II tem papel no início do processo ovulatório, no qual os folículos pré-ovulatórios e a concentração no fluido folicular aumentaram drasticamente (8X), 24 horas após tratamento com GnRH. Também foi associada uma ação sinérgica da angiotensina e LH, contribuindo para o aumento da produção de progesterona. O aumento gradual da angiotensina II no fluido folicular sugere um papel nas fases posteriores do processo ovulatório, neste caso, também durante a gestação.

Outra proteína encontrada no líquido folicular das vacas estudadas foi a transtiretina, a qual já foi descrita em suínos, cuja função é de ligação aos hormônios da tireoide (Ducolomb et al., 2013). A transtiretina foi identificada no líquido folicular humano de mulheres submetidas a FIV e pode ser considerada candidata potencial as funções específicas durante a foliculogênese e pode ser útil como marcadora da maturação folicular/oocitária (Anahory et al., 2002). No presente estudo foi encontrada nos grupos de folículos saudáveis, transicionais e atresicos de ovário sem corpo lúteo.

As proteínas de choque térmico foram encontradas nos grupos de folículos saudáveis de ovários sem corpo lúteo e de transicionais e atresicos de ovários com corpo lúteo. Estas proteínas são produzidas durante as condições de estresse (Zylicz et al., 2001) e já foram identificadas no líquido de folículos císticos de vacas (Maniwa et al., 2005). Estão associadas ao aumento da sobrevivência celular protegendo da desagregação de proteínas de estresse-lábil. Em condições de não estresse, as proteínas de choque térmico têm múltiplas funções de limpeza, tais como dobrar a translocação de proteínas resintetizadas (Jolly et al., 2000). Neste estudo, a função destas proteínas

nas classes foliculares não foi esclarecida, haja vista que foi encontrada nos folículos saudáveis, transicionais e atresícos, contudo pode haver algum controle local pela liberação de progesterona, já que apenas os folículos saudáveis contidos em ovários sem corpo lúteo apresentaram esta proteína nos seus perfis. Além disso, o início da atresia nos folículos transicionais e a atresia nos atresícos, pode promover estresse o que justificaria a presença desta proteína nas amostras destas classes foliculares. Estas hipóteses podem indicar as diferentes funções nas classes de folículos, especialmente induzida pela presença ou ausência de produção local de progesterona. Assim, sugerimos que nos saudáveis, a produção de proteínas de choque térmico está relacionada às funções de limpeza (Jolly et al., 2000) e nos transicionais e atresícos às funções de proteção contra o estresse (Jolly et al., 2000; Zylicz et al., 2001).

Ademais, as proteínas de choque térmico foram expressas nas células da granulosa cultivadas *in vitro*, de ovários de mulheres (Benifla et al., 2002), por oócitos e células do *cumulus* de vacas e por células da granulosa de folículos de ratas (Yoon et al., 2002). Além de suas funções na proteção contra os fatores estressantes, estas proteínas foram relacionadas à fertilização e ao desenvolvimento embrionário precoce. Recentemente, a capacidade de inibir a apoptose tem sido amplamente reconhecida como uma das funções dessas proteínas, e esta capacidade pode contribuir para o seu efeito protetor contra a morte celular, via neutralização de várias interações efetoras pró-apoptóticas (Maniwa et al., 2005). Vacas com cistos foliculares expressam diferentes tipos de proteínas de choque térmico o que pode ser justificado pelo estresse aos quais estes folículos são expostos, como o oxidativo (Maniwa et al., 2005), balanço energético negativo, má função hepática e baixa circulação de *insulin-like growth factor-I* (Zulu et al., 2002).

Várias proteínas (fibrinogênio, toll-like receptor 2, apolipoproteína, complemento C3, glicoproteína α -2-HS e angiotensinogênio) relacionadas a resposta inflamatória foram observadas nas diferentes classes de folículos, o que indica uma proteção local contida no líquido folicular.

O complemento C3 ainda tem sido relacionado ao envelhecimento folicular, pois foi mais expresso no líquido folicular de mulheres idosas, quando comparado ao fluído folicular de mulheres jovens, podendo ser atribuído a causa da infertilidade (Hashemitabar et al., 2014). Neste estudo, não houve um padrão de expressão específico, sendo que o complemento C3 foi encontrado em folículos saudáveis e atresícos, com e sem corpo lúteo, o que poderia indicar diferentes funções deste tipo

proteico, nas diferentes classes foliculares, já que está proteína possui multifunções. Além disso, nosso estudo não quantificou as proteínas encontradas, o que poderia ser um dado a ser considerado para cada tipo folicular estudado.

Outras proteínas foram observadas apenas nos folículos saudáveis contidos em ovários sem corpo lúteo, tais como a nexina e triosefosfato isomerase. A IGK também foi encontrada neste grupo e no grupo dos folículos transicionais em ovários sem corpo lúteo.

A nexina é uma proteína conhecida como inibidora das serinas-proteases, incluindo o *urokinase plasminogen activator* e a plasmina (Cao et al., 2006). A produção de plasminogênio é estimulada pelas gonadotrofinas (Reich et al., 1985) e modula a atividade de enzimas proteolíticas, processos relacionados à ovulação (Beers, 1975) nos folículos saudáveis.

A proteína IGK está relacionada com ao sistema imunológico especificamente as imunoglobulinas e foi encontrada nos folículos saudáveis e transicionais de ovários sem corpo lúteo. Parece existir algum mecanismo de proteção diferencial nos folículos saudáveis, o qual ainda se mantém nos transicionais, e ainda há algum controle hormonal local sobre a resposta imunológica, já que a progesterona está relacionada à menor atividade imunológica (Minnich et al., 2016).

A triosefosfato isomerase foi encontrada apenas no grupo de folículos saudáveis e esta enzima esta relacionada a gliconeogênese, mecanismo de produção de energia, cujo folículo encontra-se em atividade máxima justificando sua presença (Bandyopadhyay et al., 2016).

A glutatona foi positivamente correlacionada ao número de embriões de superior qualidade em mulheres. É uma proteína de regulação antioxidante que impede o estresse oxidativo e previne o dano celular (Choi et al., 2015) protegendo os oócitos contra níveis excessivos de espécies reativas ao oxigênio durante a ovulação, ajudando a garantir a fertilização bem sucedida (Hashimoto et al., 2000). A glutatona desempenha um papel importante durante os processos de maturação e pós-fertilização de oócitos bovinos (Hashimoto et al., 2000). No presente estudo foram encontradas várias isoformas em folículos saudáveis nos ovários sem corpo lúteo e transicionais de ovários com corpo lúteo. Esta relação aos folículos saudáveis e em início de atresia justifica seu mecanismo de proteção, o qual ainda é mantido mesmo nos folículos transicionais, mas ausente nos atrésicos.

A hipoxantina foi verificada apenas no grupo de folículos saudáveis. Apesar disto,

esta proteína está relacionada à inibição da maturação do oócito de ratos *in vitro* e foi associada a maior parte da atividade inibitória do fluido folicular. A hipoxantina comercial imitou a ação de supressão transitória da maturação. Além disso, estudos preliminares demonstraram que o fluido folicular de ratas inibe a maturação do oócito e contém níveis elevados de hipoxantina (Downs et al., 1985). No presente estudo, esta ação nos folículos saudáveis pode estar relacionada à ação inibitória da progesterona, como principal hormônio produzido pelos ovários durante a gestação, o qual está em altos níveis séricos circulantes, justificando as menores taxas quando estes oócitos são fertilizados *in vitro*.

5. Conclusão

Baseado neste estudo, concluiu-se que a ação da progesterona sérica, produzida durante a gestação pode contribuir para a irregular produção de proteínas quando comparados aos estudos em fêmeas não gestantes. Além disso, também sugerimos um controle local de fatores que contribuem para conclusão, especialmente promovido pela produção de progesterona no ovário que possui o CL.

Tabela 4. Proteínas indentificadas na espectrometria de massas e suas respectivas ontologias gênicas (função molecular, processo biológico e componente celular) das amostras do grupo de folículos saudáveis, de ovários sem corpo lúteo de vacas gestantes

Descrição proteína	ID Acesso	Match	Nº Peptídeos	% Cobertura sequência	Ontologia gênica		
					Função molecular	Processo biológico	Componente celular
14-3-3 protein beta/alpha OS=Bos taurus GN=YWHAB PE=1 SV=2	1433B_BOVIN	9	22	44,31	Protein domain specific binding	Protein targeting	Cytoplasm; Melanosome; Perinuclear region of cytoplasm
14-3-3 protein theta OS=Bos taurus GN=YWHAQ PE=1 SV=1	B0JYM5_BOVIN	8	24	38,37	Monoxygenase activity	Negative regulation of transcription, DNA-templated; Substantia nigra development	Cytoplasm; Extracellular exosome; Focal adhesion; Membrane; Protein complex
14-3-3 protein theta OS=Bos taurus GN=YWHAQ PE=2 SV=1	1433T_BOVIN	8	24	38,37	--	Negative regulation of transcription, DNA-templated; Substantia nigra development	Cytoplasm; Extracellular exosome; Focal adhesion; Membrane; Protein complex
14-3-3 protein zeta/delta OS=Bos taurus GN=YWHAZ PE=1 SV=1	1433Z_BOVIN	9	25	38,37	--	--	Melanosome
6-phosphogluconolactonase OS=Bos taurus GN=PGLS PE=2 SV=1	6PGL_BOVIN	7	18	42,64	6-phosphogluconolactonase activity	Carbohydrate metabolic process; Pentose-phosphate shunt	Cytoplasm
6-phosphogluconolactonase OS=Bos taurus GN=PGLS PE=4 SV=1	F1MM83_BOVIN	6	18	38,37	6-phosphogluconolactonase activity	Carbohydrate metabolic process; Pentose-phosphate shunt	Extracellular exosome
ALB protein OS=Bos taurus GN=ALB PE=2 SV=1	B0JYQ0_BOVIN	26	59	46,13	--	Transport	Extracellular space; Extracellular space
ALB protein OS=Bos taurus GN=ALB PE=2 SV=1	B0JYQ0_BOVIN	26	59	46,13	--	Transport	Extracellular space
Alpha-1-antitrypsin OS=Bos taurus GN=SERPINA1 PE=1 SV=1	A1AT_BOVIN	16	28	37,98	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Endoplasmic reticulum; Extracellular exosome; Extracellular space; Golgi apparatus
Alpha-1B-glycoprotein OS=Bos taurus GN=A1BG PE=1 SV=1	A1BG_BOVIN	16	24	53,88	--	--	Blood microparticle; Extracellular exosome

Continua Tabela 4

Alpha-2-antiplasmin OS=Bos taurus GN=SERPINF2 PE=1 SV=2	A2AP_BOVIN	10	32	35,98	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Acute-phase response; Blood vessel morphogenesis; Collagen fibril organization; Negative regulation of endopeptidase activity; Negative regulation of fibrinolysis; Negative regulation of plasminogen activation; Positive regulation of cell differentiation; Positive regulation of collagen biosynthetic process; Positive regulation of erk1 and erk2 cascade; Positive regulation of jnk cascade; Positive regulation of smooth muscle cell proliferation; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of transcription from rna polymerase ii promoter; Positive regulation of transforming growth factor beta production; Regulation of blood vessel size by renin-angiotensin	Blood microparticle; Cell surface; Extracellular exosome; Extracellular space; Fibrinogen complex
Angiotensinogen OS=Bos taurus GN=AGT PE=2 SV=1	Q3SZH5_BOVIN	14	23	49,06	Sodium channel regulator activity	Activation of NF-kappaB-inducing kinase activity; Angiotensin mediated vasoconstriction involved in regulation of systemic arterial blood pressure; Astrocyte activation; Blood vessel development; Brain renin-angiotensin system; Branching involved in ureteric bud morphogenesis; Cell-matrix adhesion; Drinking behavior; Establishment of blood-nerve barrier; Excretion; Extracellular matrix organization; G-protein coupled receptor signaling pathway; Hormone metabolic process; Negative regulation of cell proliferation; Negative regulation of neuron apoptotic process; Negative regulation of neurotrophin TRK receptor signaling pathway; Ovarian follicle rupture; Peristalsis; Positive regulation of activation of JAK2 kinase activity; Positive regulation of branching involved in ureteric bud morphogenesis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of endothelial cell migration; Positive regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway; Positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of gap junction assembly; Positive regulation of MAPK cascade; Positive regulation of membrane hyperpolarization; Positive regulation of multicellular organism growth; Positive regulation of organ growth; Positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation; Positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling; Positive regulation of protein kinase C activity; Positive regulation of protein tyrosine kinase activity; Positive regulation of transcription, DNA-templated; Regulation of cardiac conduction; Regulation of extracellular matrix assembly; Inflammatory response; Regulation of renal output by angiotensin; Renal response to blood flow involved in circulatory renin-angiotensin regulation of systemic arterial blood pressure; Renin-angiotensin regulation of aldosterone production; Response to cold response to salt stress; Smooth muscle cell differentiation; Smooth muscle cell proliferation	Blood microparticle; Extracellular exosome; Intracellular
Antithrombin-III OS=Bos taurus GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	F1MSZ6_BOVIN	30	38	58,71	Heparin binding; Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Regulation of blood coagulation, intrinsic pathway	Blood microparticle; Extracellular exosome
Antithrombin-III OS=Bos taurus GN=SERPINC1 PE=1 SV=2	ANT3_BOVIN	30	38	58,71	Heparin binding; Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Blood coagulation; Negative regulation of endopeptidase activity; Regulation of blood coagulation, intrinsic pathway	Extracellular space

Continua Tabela 4

Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=1	V6F9A2_BOVIN	37	32	76,23	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity; Phospholipid binding	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of hydrolase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride homeostasis; Vitamin transport	Blood microparticle; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle
Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=1	V6F9A2_BOVIN	37	32	76,23	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity; Phospholipid binding	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling ; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of hydrolase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride homeostasis; Vitamin transport	Blood microparticle; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle

Continua Tabela 4

Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=1	V6F9A2_BOVIN	37	32	76,23	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; Phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity; Phospholipid binding; source	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of hydrolase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride homeostasis; Vitamin transport	Blood microparticle; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle
Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=3	APOA1_BOVIN	37	32	76,23	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; High-density lipoprotein particle receptor binding; Phosphatidylcholine binding; Phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Lipoprotein metabolic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Neuron projection regeneration; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phosphatidylcholine metabolic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of lipoprotein lipase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Positive regulation of triglyceride catabolic process; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride catabolic process; Triglyceride homeostasis; Very-low-density lipoprotein particle remodeling; Vitamin transport	Blood microparticle; Chylomicron; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; High-density lipoprotein particle; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle

Continua Tabela 4

Apolipoprotein A-1 OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=3	APOA1_BOVIN	37	32	76,23	<p>Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; High-density lipoprotein particle receptor binding; Phosphatidylcholine binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity</p>	<p>Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Lipoprotein metabolic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Neuron projection regeneration; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phosphatidylcholine metabolic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of lipoprotein lipase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Positive regulation of triglyceride catabolic process; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of CDC42 protein signal transduction ; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride catabolic process; Triglyceride homeostasis; Very-low-density lipoprotein particle remodeling; Vitamin transport</p>	<p>Blood microparticle; Chylomicron; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; High-density lipoprotein particle; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle</p>
Apolipoprotein A-1 OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=3	APOA1_BOVIN	37	32	76,23	<p>Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; High-density lipoprotein particle receptor binding; Phosphatidylcholine binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity</p>	<p>Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Lipoprotein metabolic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Neuron projection regeneration; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phosphatidylcholine metabolic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of lipoprotein lipase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Positive regulation of triglyceride catabolic process; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride catabolic process; Triglyceride homeostasis; Very-low-density lipoprotein particle remodeling; Vitamin transport</p>	<p>Blood microparticle; Chylomicron; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; High-density lipoprotein particle; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle</p>

Continua Tabela 4

Apolipoprotein A-II OS=Bos taurus GN=APOA2 PE=1 SV=2	APOA2_BOVIN	3	9	50,00	Apolipoprotein receptor binding; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; High-density lipoprotein particle receptor binding; Lipase inhibitor activity; Phosphatidylcholine binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity; Protein heterodimerization activity; Triglyceride binding	Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol metabolic process; Defense response to bacterium; Diacylglycerol catabolic process; High-density lipoprotein particle assembly; High-density lipoprotein particle clearance; High-density lipoprotein particle remodeling; Lipoprotein metabolic process; Low-density lipoprotein particle remodeling; Negative regulation of cholesterol import; Negative regulation of cholesterol transporter activity; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of lipase activity; Negative regulation of lipid catabolic process; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phospholipid catabolic process; Phospholipid efflux; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of interleukin-8 biosynthetic process; Positive regulation of lipid catabolic process; Protein folding; Protein oxidation; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein stability; Response to glucose; Reverse cholesterol transport; Triglyceride-rich lipoprotein particle remodeling	Blood microparticle; Chylomicron; Extracellular exosome; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle
Apolipoprotein A-II OS=Bos taurus GN=APOA2 PE=1 SV=2	APOA2_BOVIN	3	9	50,00	Apolipoprotein receptor binding; Cholesterol binding; cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; High-density lipoprotein particle receptor binding; Lipase inhibitor activity; Phosphatidylcholine binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity; Protein heterodimerization activity; Triglyceride binding	Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol metabolic process; Defense response to bacterium; Diacylglycerol catabolic process; High-density lipoprotein particle assembly; High-density lipoprotein particle clearance; High-density lipoprotein particle remodeling; Lipoprotein metabolic process; Low-density lipoprotein particle remodeling; Negative regulation of cholesterol import; Negative regulation of cholesterol transporter activity; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of lipase activity; Negative regulation of lipid catabolic process; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phospholipid catabolic process; Phospholipid efflux; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of interleukin-8 biosynthetic process; Positive regulation of lipid catabolic process; Protein folding; Protein oxidation; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein stability; Response to glucose; Reverse cholesterol transport; Triglyceride-rich lipoprotein particle remodeling	Blood microparticle; Chylomicron; Extracellular exosome; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle
Apolipoprotein A-I-like OS=Bos taurus GN=LOC100297695 PE=4 SV=1	V6F869_BOVIN	18	23	55,29	Lipid binding	Lipid transport lipoprotein metabolic process	Extracellular region
Apolipoprotein A-I-like OS=Bos taurus GN=LOC100297695 PE=4 SV=1	V6F869_BOVIN	18	23	55,29	Lipid binding	Lipid transport lipoprotein metabolic process	Extracellular region
Apolipoprotein A-IV OS=Bos taurus GN=APOA4 PE=2 SV=1	APOA4_BOVIN	12	36	36,05	Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; Phosphatidylcholine binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity	Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; High-density lipoprotein particle assembly; Lipoprotein metabolic process; Neuron projection regeneration; Phosphatidylcholine metabolic process; Phospholipid efflux; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of lipoprotein lipase activity; Positive regulation of triglyceride catabolic process; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Reverse cholesterol transport; Triglyceride catabolic process; Triglyceride homeostasis; Very-low-density lipoprotein particle remodeling	Blood microparticle; Chylomicron; High-density lipoprotein particle

Continua Tabela 4

Apolipoprotein A-IV OS=Bos taurus GN=APOA4 PE=4 SV=1	F1N3Q7_BOVIN	21	36	36,05	Antioxidant activity; Cholesterol transporter activity; Copper ion binding; Phosphatidylcholine binding; Phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity	Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol metabolic process; Hydrogen peroxide catabolic process; Innate immune response in mucosa; eukocyte cell-cell adhesion; Lipoprotein metabolic process; Multicellular organismal lipid catabolic process; Negative regulation of plasma lipoprotein particle oxidation; Phosphatidylcholine metabolic process; Phospholipid efflux; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of lipoprotein lipase activity; Positive regulation of triglyceride catabolic process; Protein-lipid complex assembly; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Removal of superoxide radicals; Response to lipid hydroperoxide; Response to stilbenoid; Reverse cholesterol transport; Very-low-density lipoprotein particle remodeling	Blood microparticle; Cell surface; Chylomicron; Extracellular exosome; High-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle
Beta-2-glycoprotein 1 OS=Bos taurus GN=APOH PE=1 SV=4	APOH_BOVIN	10	22	50,14	Heparin binding	--	Extracellular region
CMBL protein (Fragment) OS=Bos taurus GN=CMBL PE=2 SV=1	Q3T141_BOVIN	3	6	44,44	Hydrolase activity		
Complement C3 OS=Bos taurus GN=C3 PE=1 SV=1	G3X7A5_BOVIN	57	154	44,13	Endopeptidase inhibitor activity	Complement activation; Inflammatory response; Positive regulation of activation of membrane attack complex; Positive regulation of angiogenesis; Positive regulation of apoptotic cell clearance; Positive regulation of glucose transport; Positive regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway; Positive regulation of lipid storage; Positive regulation of protein phosphorylation; Positive regulation of type iia hypersensitivity; Positive regulation of vascular endothelial growth factor production; Regulation of triglyceride biosynthetic process	Blood microparticle; Extracellular exosome
Complement C3 OS=Bos taurus GN=C3 PE=1 SV=2	CO3_BOVIN	59	154	46,18	C5L2 anaphylatoxin chemotactic receptor binding Source: uniprokb Endopeptidase inhibitor activity	Complement activation, alternative pathway; Complement activation, classical pathway; Fatty acid metabolic process; Inflammatory response; Positive regulation of glucose transport; Positive regulation of g-protein coupled receptor protein signaling pathway; Positive regulation of lipid storage; Positive regulation of protein phosphorylation; Regulation of triglyceride biosynthetic process	Extracellular space
Complement component 3 OS=Bos taurus GN=C3 PE=2 SV=1	A0A0F6QNP7_BOVIN	58	156	45,09	Endopeptidase inhibitor activity	Complement activation Source: interpro	Extracellular space
Complement component 3d (Fragment) OS=Bos taurus PE=2 SV=1	Q693V9_BOVIN	10	35	35,31	--	Inflammatory response	Extracellular space
Complement component C9 OS=Bos taurus GN=C9 PE=2 SV=1	CO9_BOVIN	20	42	39,05	--	Complement activation, alternative pathway; Complement activation, classical pathway; Cytolysis	Blood microparticle; Cytoplasm; Extracellular exosome; Membrane attack complex
Endopin 2 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-7 PE=2 SV=1	Q3SZQ8_BOVIN	18	29	49,40	--	--	Extracellular space
Endopin 2B OS=Bos taurus PE=2 SV=1	Q5J801_BOVIN	18	29	42,69	--	--	Extracellular space

Continua Tabela 4

FGB protein (Fragment) OS=Bos taurus GN=FGB PE=2 SV=1	A6QPX7_BOVIN	36	28	72,42	--		Platelet activation; Protein polymerization; Signal transduction	Fibrinogen complex
FGG protein OS=Bos taurus GN=FGG PE=1 SV=1	Q3SZZ9_BOVIN	16	35	46,44	--		Platelet activation Source: interpro; Protein polymerization Source: interpro; Signal transduction	Fibrinogen complex
Fibrinogen beta chain OS=Bos taurus GN=FGB PE=1 SV=2	F1MAV0_BOVIN	43	43	65,66	Structural molecule activity		Blood coagulation, fibrin clot formation; Cell-matrix adhesion; Fibrinolysis; Induction of bacterial agglutination; Negative regulation of endothelial cell apoptotic process; Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors; Plasminogen activation; Platelet aggregation; Positive regulation of erk1 and erk2 cascade; Positive regulation of exocytosis; Positive regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Positive regulation of peptide hormone secretion; Positive regulation of protein secretion; Positive regulation of vasoconstriction; Protein polymerization; Response to calcium ion; Signal transduction	Blood microparticle; Cell cortex; External side of plasma membrane; Extracellular exosome; Fibrinogen complex; Platelet alpha granule
Fibrinogen beta chain OS=Bos taurus GN=FGB PE=1 SV=2	FIBB_BOVIN	41	40	65,38	Glycoprotein binding		Adaptive immune response; Innate immune response; Platelet activation; Protein polymerization; Signal transduction	Fibrinogen complex
Fibrinogen gamma-B chain OS=Bos taurus GN=FGG PE=1 SV=1	F1MGU7_BOVIN	16	36	45,60	Structural molecule activity		Blood coagulation, fibrin clot formation Cell-matrix adhesion; Fibrinolysis; Negative regulation of endothelial cell apoptotic process; Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors; Plasminogen activation; Platelet aggregation; Positive regulation of erk1 and erk2 cascade; Positive regulation of exocytosis; Positive regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Positive regulation of peptide hormone secretion; Positive regulation of protein secretion; Positive regulation of vasoconstriction; Protein polymerization; Protein secretion; Response to calcium ion; Signal transduction	Blood microparticle; Cell cortex; External side of plasma membrane; Extracellular exosome; Fibrinogen complex; Platelet alpha granule
Fibrinogen gamma-B chain OS=Bos taurus GN=FGG PE=1 SV=1	FIBG_BOVIN	16	36	47,30	--		Platelet activation; Protein polymerization; Signal transduction	Fibrinogen complex
Glutathione S-transferase A1 OS=Bos taurus GN=GSTA1 PE=2 SV=3	GSTA1_BOVIN	9	20	46,40	--		Glutathione metabolic process	Cytoplasm
Glutathione S-transferase P OS=Bos taurus GN=GSTP1 PE=1 SV=2	GSTP1_BOVIN	11	16	71,43	Dinitrosyl-iron complex binding; Glutathione transferase activity; S-nitrosoglutathione binding		Glutathione metabolic process; Negative regulation of ERK1 and ERK2 cascade; Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway; Negative regulation of interleukin-1 beta production; Negative regulation of JUN kinase activity; Negative regulation of monocyte chemotactic protein-1 production; Negative regulation of nitric-oxide synthase biosynthetic process; Negative regulation of tumor necrosis factor production	Extracellular exosome; Extracellular space; Mitochondrion; Nucleus; Plasma membrane; TRAF2-GSTP1 complex
Heat shock 27kDa protein 1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=2 SV=1	E9RHW1_BOVIN	12	16	72,14	--		--	--
Heat shock 70kDa protein 1A (Fragment) OS=Bos indicus x Bos taurus GN=HSPA1A PE=3 SV=1	K9ZRQ6_BOVIN	2	8	35,71	ATP binding		--	--

Continua Tabela 4

Heat shock 70kDa protein 1A (Fragment) OS=Bos indicus x Bos taurus GN=HSPA1A PE=3 SV=1	K9ZU00_BOBOX	2	8	35,71	ATP binding	--	--
Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Bos taurus GN=HSPA8 PE=1 SV=2	HSP7C_BOVIN	26	50	52,92	Atpase activity, coupled; ATP binding Source: uniprotkb-KW; Poly(A) RNA binding	ATP metabolic process; Chaperone mediated protein folding requiring cofactor; Clathrin coat disassembly; Mrna processing; Negative regulation of fibril organization; Negative regulation of transcription, DNA-templated; Positive regulation of mrna splicing, via spliceosome; Protein refolding; Regulation of cell cycle; RNA splicing transcription, DNA-templated	Blood microparticle; Extracellular exosome; Focal adhesion; Intracellular ribonucleoprotein complex; Melanosome; Myelin sheath; Nucleolus; Nucleus; Plasma membrane prp19 complex; Spliceosomal complex; Ubiquitin ligase complex
Heat shock protein beta-1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=1 SV=2	E1BEL7_BOVIN	12	17	71,43	Poly(A) RNA binding; Protein kinase C inhibitor activity	Intracellular signal transduction; Negative regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway; Platelet aggregation; Positive regulation of angiogenesis; Positive regulation of blood vessel endothelial cell migration; Positive regulation of endothelial cell chemotaxis by vegf-activated vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway; Positive regulation of interleukin-1 beta production; Positive regulation of tumor necrosis factor biosynthetic process; Regulation of i-kappab kinase/nf-kappab signaling; Response to virus; Retina homeostasis	Extracellular exosome; Extracellular space; Focal adhesion; Nucleus; Plasma membrane; Z disc
Heat shock protein beta-1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=2 SV=1	HSPB1_BOVIN	12	16	72,14	--	--	Cytoplasm; Nucleus; Spindle
Hemopexin OS=Bos taurus GN=HPX PE=2 SV=1	HEMO_BOVIN	24	35	61,44	Heme transporter activity; Metal ion binding	Cellular iron ion homeostasis; Heme metabolic process; Hemoglobin metabolic process; Positive regulation of humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin; Positive regulation of immunoglobulin production; Positive regulation of interferon-gamma-mediated signaling pathway; Positive regulation of tyrosine phosphorylation of STAT1 protein	Blood microparticle; Cell; Extracellular exosome
Histidine-rich GLYCOPROTEIN=FACTOR XIIIa substrate (Fragments) OS=Bos taurus PE=1 SV=1	Q9TS85_BOVIN	5	18	37,38	--	--	--
HSPA8 protein (Fragment) OS=Bos taurus GN=HSPA8 PE=2 SV=1	A8KC76_BOVIN	11	28	39,11	ATP binding	--	--
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Fragment) OS=Bos taurus GN=HPRT PE=2 SV=1	Q9GJT9_BOVIN	6	17	35,48	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity	Purine ribonucleoside salvage	Cytoplasm
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 OS=Bos taurus GN=HPRT1 PE=2 SV=1	Q1JP91_BOVIN	7	19	42,66	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity	Purine ribonucleoside salvage	Cytoplasm

Continua Tabela 4

Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase OS=Bos taurus GN=HPRT1 PE=2 SV=3	HPRT_BOVIN	8	19	42,66	Guanine phosphoribosyltransferase activity; Hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity; Magnesium ion binding; Nucleotide binding; Protein homodimerization activity	Adenine salvage; Gmp catabolic process; Gmp salvage; Guanine salvage; Hypoxanthine metabolic process; Hypoxanthine salvage; Imp metabolic process; Imp salvage; Positive regulation of dopamine metabolic process; Protein homotetramerization; Purine nucleotide biosynthetic process; Purine ribonucleoside salvage	Cytoplasm; Cytosol
IGK protein OS=Bos taurus GN=IGK PE=2 SV=1	Q05B55_BOVIN	11	13	47,50	--	--	--
IGK protein OS=Bos taurus GN=IGK PE=2 SV=1	B0JYP6_BOVIN	10	12	43,75	--	--	--
IGL@ protein OS=Bos taurus GN=IGL@ PE=1 SV=1	Q3T101_BOVIN	11	12	55,32	--	--	--
IGL@ protein OS=Bos taurus GN=IGL@ PE=2 SV=1	A5PK49_BOVIN	8	10	36,32	--	--	--
IGLL1 protein OS=Bos taurus GN=IGLL1 PE=2 SV=1	A4IFI0_BOVIN	8	12	36,17	--	--	--
Immunoglobulin light chain_lambda gene cluster OS=Bos taurus GN=IGL@ PE=2 SV=1	Q1RMN8_BOVIN	10	13	48,72	--	--	--
Nexin (Fragment) OS=Bos taurus PE=2 SV=1	Q9N1C4_BOVIN	5	12	38,15	--	--	Extracellular space
Peroxiredoxin-2 OS=Bos taurus GN=PRDX2 PE=2 SV=1	PRDX2_BOVIN	5	16	37,19	Peroxidase activity; Peroxiredoxin activit	Regulation of apoptotic process; Removal of superoxide radicals	Cytoplasm; Extracellular exosome
Peroxiredoxin-6 OS=Bos taurus GN=PRDX6 PE=1 SV=3	PRDX6_BOVIN	16	27	72,32	Glutathione peroxidase activity; Peroxidase activity; Peroxiredoxin activity; Phospholipase a2 activity	Cellular oxidant detoxification; Phospholipid catabolic process; Response to reactive oxygen species	Cytoplasm; Cytoplasmic membrane-bounded vesicle; Cytosol; Extracellular exosome; Extracellular space; Lysosome; Membrane

Continua Tabela 4

Plasma serine protease inhibitor OS=Bos taurus GN=SERPINA5 PE=1 SV=1	IPSP_BOVIN	9	29	36,63	Heparin binding; Phosphatidylcholine binding; Retinoic acid binding; Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Lipid transport; Negative regulation of endopeptidase activity; Single fertilization; Spermatogenesis	Acrosomal membrane external side of plasma membrane; Extracellular; Extracellular space; Platelet alpha granule; Platelet dense tubular network; Protein C inhibitor-coagulation factor V complex; Protein c inhibitor-coagulation factor XA complex; Protein c inhibitor-coagulation factor XI complex; Protein C inhibitor-KLK3 complex; Protein c inhibitor-plasma kallikrein complex; Protein C inhibitor-plat complex; Protein C inhibitor-PLAU complex; Protein C inhibitor-thrombin complex; Protein c inhibitor-TMPRSS11E complex; Protein C inhibitor-TMPRSS7 complex
Proteasome subunit alpha type (Fragment) OS=Bos taurus GN=PSMA7 PE=2 SV=1	A7E3D5_BOVIN	6	21	35,86	Threonine-type endopeptidase activity	Ubiquitin-dependent protein catabolic process	Cytoplasm; Nucleus; Proteasome core complex, alpha-subunit complex
Protein HP-25 homolog 2 OS=Bos taurus PE=2 SV=1	HP252_BOVIN	5	10	55,35	--	--	Collagen trimer; extracellular region
Putative uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=2 SV=1 (*)	A6QM09_BOVIN	10	16	50,43	--	--	--
Putative uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=2 SV=1 (*)	A5PK72_BOVIN	9	12	42,80	--	--	--
Putative uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=2 SV=1 (*)	A6H7J7_BOVIN	10	14	45,96	--	--	--

Continua Tabela 4

Serotransferrin OS=Bos taurus GN=TF PE=1 SV=	IG3X6N3_BOVIN	22	75	38,07	Ferric iron binding; Ferric iron transmembrane transporter activity; Ferrous iron binding	Cellular iron ion homeostasis; Cellular response to iron ion; Ferrous iron import into cell; Positive regulation of receptor-mediated endocytosis; Retina homeostasis	Apical plasma membrane; Basal plasma membrane; Blood microparticle; Coated pit Early endosome; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Extrinsic component of external side of plasma membrane; Hfe-transferrin receptor complex; Late endosome; Perinuclear region of cytoplasm; Recycling endosome
Serotransferrin OS=Bos taurus GN=TF PE=1 SV=1	G3X6N3_BOVIN	22	75	38,07	Ferric iron binding; Ferric iron transmembrane transporter activity; Ferrous iron binding	Cellular iron ion homeostasis; Cellular response to iron ion; Ferrous iron import into cell; Positive regulation of receptor-mediated endocytosis; Retina homeostasis	Apical plasma membrane; Basal plasma membrane; Blood microparticle; Coated pit; Early endosome; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Extrinsic component of external side of plasma membrane; Hfe-transferrin receptor complex; Late endosome; Perinuclear region of cytoplasm; Recycling endosome
Serotransferrin OS=Bos taurus GN=TF PE=2 SV=1	TRFE_BOVIN	23	76	39,20	Ferric iron binding; Ferric iron transmembrane transporter activity	Cellular iron ion homeostasis	Cell; Extracellular space
Serotransferrin OS=Bos taurus GN=TF PE=2 SV=1	TRFE_BOVIN	172	23	76	Ferric iron binding; Ferric iron transmembrane transporter activity	Cellular iron ion homeostasis; Extracellular space	Cell; Extracellular space
Serpin A3-1 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-1 PE=1 SV=3	SPA31_BOVIN	19	28	37,47	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity; Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasm; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-2 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-2 PE=3 SV=1	SPA32_BOVIN	20	28	40,39	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-3 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-3 PE=1 SV=2	SPA33_BOVIN	24	28	57,18	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space

Continua Tabela 4

Serpin A3-4 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-4 PE=3 SV=1	SPA34_BOVIN	24	29	57,18	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-5 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-5 PE=3 SV=1	SPA35_BOVIN	22	28	54,50	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-6 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-6 PE=3 SV=1	SPA36_BOVIN	21	26	49,28	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-6 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-6 PE=3 SV=1	G3N1U4_BOVIN	21	27	52,55	--	--	Extracellular space
Serpin A3-7 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-7 PE=1 SV=1	A0A0A0MP92_B OVIN	18	29	42,69	--	--	Extracellular space
Serpin A3-8 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-8 PE=2 SV=1	SPA38_BOVIN	17	34	43,78	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-8 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-8 PE=3 SV=1	A0A0A0MP89_B OVIN	17	34	43,78	--	--	Extracellular space
SERPINA10 protein OS=Bos taurus GN=SERPINA10 PE=2 SV=1	A5PJ69_BOVIN	11	35	41,15	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular exosome; Extracellular space
SERPIND1 protein OS=Bos taurus GN=SERPIND1 PE=2 SV=1	A6QPP2_BOVIN	21	35	60,89	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular exosome; Extracellular space
Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4	ALBU_BOVIN	26	59	47,28	DNA binding; Drug binding; Fatty acid binding; Metal ion binding; Pyridoxal phosphate binding ; Toxic substance binding	Cellular response to starvation; Hemolysis by symbiont of host erythrocytes; Maintenance of mitochondrion location; Negative regulation of apoptotic process; Transport	Extracellular region; Extracellular space; Protein complex
Similar to 70 kDa heat shock cognate protein (Fragment) OS=Bos taurus PE=2 SV=1	Q861V2_BOVIN	3	6	41,79	ATP binding	Gtpase activity; GTP binding	--
Similar to alpha-tubulin isoform 1 (Fragment) OS=Bos taurus PE=2 SV=1	Q862L2_BOVIN	2	6	35,35	--	Microtubule-based process	Microtubule

Continua Tabela 4

Similar to peroxiredoxin 1 (Fragment) OS=Bos taurus PE=2 SV=1	Q862E5_BOVIN	4	9	35,24	Antioxidant activity Oxidoreductase activity		
Tetranectin OS=Bos taurus GN=CLEC3B PE=2 SV=1	TETN_BOVIN	7	13	49,01	Calcium ion binding; Carbohydrate binding; Heparin binding	Bone mineralization; Cellular response to transforming growth factor beta stimulus; Positive regulation of plasminogen activation; Skeletal system development	Cytoplasm; Extracellular exosome; Extracellular space; Granular component
Toll-like receptor 2 (Fragment) OS=Bos indicus x Bos taurus GN=TLR2 PE=4 SV=1	W6A4U5_BOBO X	3	7	42,31	--	Inflammatory response; Innate immune response; MYD88-dependent toll-like receptor signaling pathway; Positive regulation of inflammatory response; Regulation of cytokine secretion; Response to molecule of bacterial origin; Toll-like receptor 2 signaling pathway	Integral component of membrane
Transthyretin OS=Bos taurus GN=TTR PE=1 SV=1	TTHY_BOVIN	4	7	55,10	Thyroid hormone binding	Retinol metabolic process; thyroid hormone transport	Extracellular exosome; extracellular space
Triosephosphate isomerase OS=Bos taurus GN=TPI1 PE=2 SV=3	TPIS_BOVIN	9	21	44,98	Triose-phosphate isomerase activity	Gluconeogenesis glycerol catabolic process glycolytic process glycerol biosynthetic process glycerol catabolic process glycolytic process; Multicellular organismal development; Pentose-phosphate shunt	Cytosol; Extracellular exosome; Extracellular space; Nucleus
Tubulin alpha-1B chain OS=Bos taurus PE=1 SV=2	TBA1D_BOVIN	15	34	48,56	Double-stranded RNA binding; Gtpase activity; GTP binding ; structural constituent of cytoskeleton	Cellular response to interleukin-4 microtubule cytoskeleton organization	Cytoplasmic microtubule; Extracellular exosome; Myelin sheath
Tubulin alpha-1D chain OS=Bos taurus GN=TUBA1D PE=1 SV=1	TBA1D_BOVIN	12	34	40,49	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoplasm; Microtubule
Tubulin alpha-4A chain OS=Bos taurus GN=TUBA4A PE=1 SV=2	TBA4A_BOVIN	11	34	36,83	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoplasm; Extracellular exosome; Microtubule
Tubulin beta-2B chain OS=Bos taurus GN=TUBB2B PE=1 SV=2	TBB2B_BOVIN	13	30	37,08	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process; Neuron migration	Cytoplasm; Microtubule; Nucleus
Tubulin beta-3 chain OS=Bos taurus GN=TUBB3 PE=2 SV=1	TBB3_BOVIN	13	30	40,00	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Axon guidance; Microtubule-based proces	Cell periphery; Cytoplasm; Dendrite; Extracellular exosome; Microtubule; Neuronal cell body; Nucleus

Continua Tabela 4

Tubulin beta-4A chain OS=Bos taurus GN=TUBB4A PE=2 SV=1	TBB4A_BOVIN	11	30	36,49	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cilium;Cytoplasm; Extracellular exosome; Internode region of axon; Microtubule; Myelin sheath; Neuronal cell body; Nucleus
Tubulin beta-4B chain OS=Bos taurus GN=TUBB4B PE=2 SV=1	TBB4B_BOVIN	15	30	46,74	Double-stranded RNA binding; GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based proces	Cytoplasm; Extracellular exosome; Microtubule; Myelin sheath
Tubulin beta-5 chain OS=Bos taurus GN=TUBB5 PE=2 SV=1	TBB5_BOVIN	16	30	44,59	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cell body; Cytoplasmic ribonucleoprotein granule; Extracellular exosome; Microtubule; Nuclear envelope lumen
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Bos taurus PE=1 SV=1 (**)	G3N0V0_BOVIN	19	25	75,15	Antigen binding; Immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway; Complement activation, classical pathway; Defense response to bacterium; Innate immune response; Phagocytosis, engulfment; Phagocytosis, recognition; Positive regulation of B cell activation	Blood microparticle; External side of plasma membrane; Immunoglobulin complex, circulating
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Bos taurus PE=1 SV=1 (**)	G04_B5E6OVIN	5	6	58,88	Antigen binding; Immunoglobulin receptor binding	Immune response; Immunoglobulin production; B cell receptor signaling pathway; Complement activation, classical pathway; Defense response to bacterium; Innate immune response; Phagocytosis, engulfment; Phagocytosis, recognition; Positive regulation of B cell activation	Extracellular space; Blood microparticle; External side of plasma membrane; Immunoglobulin complex, circulating
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Bos taurus PE=4 SV=2 (**)	E1BDS9_BOVIN	5	13	39,02	--	Protein targeting; Regulation of cell death	Mitochondrion
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=CMBL PE=4 SV=1 (**)	F1N2I5_BOVIN	8	20	40,82	Hydrolase activity	--	Extracellular exosome
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=IGLL1 PE=1 SV=2 (**)	F1MLW7_BOVIN	5	11	37,61	--	--	--
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=IGLL1 PE=1 SV=2 (**)	F1MCF8_BOVIN	8	10	36,32	--	Immune response; Immunoglobulin production	Extracellular space
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=IGLL1 PE=4 SV=1 (**)	G3N2D7_BOVIN	2	5	37,93	--	--	--

Continua Tabela 4

Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=LOC100295712 PE=3 SV=1 (**)	F2Z4K0_BOVIN	11	34	37,33	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process; Microtubule	Cytoplasm
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=LOC100295712 PE=3 SV=1 (**)	F6RP72_BOVIN	11	34	37,42	Gtpase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Microtubule
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=SERPINA3 PE=3 SV=1 (**)	G8JKW7_BOVIN	22	29	52,43	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular space
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=TUBA1A PE=3 SV=1 (**)	F2Z4C1_BOVIN	13	34	42,57	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoplasmic microtubule; Myelin sheath; Nucleus; Recycling endosome
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=TUBB2A PE=1 SV=1 (**)	E1BJB1_BOVIN	13	30	37,08	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Cytoplasmic ribonucleoprotein granule; Extracellular exosome	Cytoplasm; Nucleus
Uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=1 SV=2 (**)	F1MZ96_BOVIN	10	13	43,75	--	B cell differentiation	--
Uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=1 SV=2 (**)	F1MH40_BOVIN	10	13	43,75	--	Immune; Immunoglobulin production	Extracellular space
Uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=4 SV=2 (**)	F1MLW8_BOVIN	11	10	42,92	--	Immune response; Immunoglobulin production	Extracellular space

(*) Putative uncharacterized protein: means that this protein may be identified by computer, and the function is still unknown. This protein is not homologous to any well characterised proteins and thus its function cannot be predicted. Putative means that it was only predicted based on ORF (open reading frame) and promoter sequence.

(**) Uncharacterized protein: Proteins which are NOT conserved or with no known or predicted function or characteristics (<http://www.uniprot.org/docs/nameprot>)

Tabela 5. Proteínas indentificadas na espectrometria de massas e suas respectivas ontologias gênicas (função molecular, processo biológico e componente celular) das amostras do grupo de folículos transicionais, de ovários sem corpo lúteo de vacas gestantes

Descrição proteína	ID Acesso	Match	Nº Peptídeos	% Cobertura sequência	Ontologia gênica		
					Função molecular	Processo biológico	Componente celular
14-3-3 protein epsilon OS=Bos taurus GN=YWHAE PE=2 SV=1	1433E_BOVIN	10	29	38,43	Poly(A) RNA binding; Potassium channel regulator activity	Cerebral cortex development; Hippocampus development; Negative regulation of peptidyl-serine dephosphorylation; Neuron migration; Protein targeting; Regulation of membrane repolarization; Regulation of potassium ion transmembrane transporter activity; Substantia nigra development	Extracellular exosome; Focal adhesion; Melanosome membrane; Mitochondrion
ALB protein OS=Bos taurus GN=ALB PE=2 SV=1	B0JYQ0_BOVIN	21	59	38,06	Chloride channel activity; Voltage-gated ion channel activity	Regulation of cell cycle	Chloride channel complex; Cytoplasm
Chloride intracellular channel protein (Fragment) OS=Bos taurus PE=2 SV=1	Q4QRP1_BOVIN	3	10	37,86	--	Immune response; Immunoglobulin production	Extracellular space
Chloride intracellular channel protein 1 OS=Bos taurus GN=CLIC1 PE=2 SV=3	CLIC1_BOVIN	8	19	51,45	Chloride channel activity; Voltage-gated ion channel activity	Chloride transmembrane transport; Platelet aggregation; Positive regulation of osteoblast differentiation; Regulation of cell cycle; Regulation of mitochondrial membrane potential	Blood microparticle; Chloride channel complex; Cytoplasm; Extracellular exosome; Mitochondrion; Nuclear membrane; Nucleus; Perinuclear region of cytoplasm; Plasma membrane
IGK protein OS=Bos taurus GN=IGK PE=2 SV=1	B0JYP6_BOVIN	7	12	36,25	--	--	--
IGK protein OS=Bos taurus GN=IGK PE=2 SV=1	Q05B55_BOVIN	7	13	36,25	--	--	--
IGK protein OS=Bos taurus GN=IGK PE=2 SV=1	B0JYP6_BOVIN	6	12	35,83	--	--	--
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Bos taurus GN=PEBP1 PE=1 SV=2	PEBP1_BOVIN	5	14	43,32	ATP binding; Lipid binding; Poly(A) RNA binding; Serine-type endopeptidase inhibitor activity	--	Cytoplasm; Extracellular exosome; Nucleus
Protein HP-25 homolog 2 OS=Bos taurus PE=2 SV=1	HP252_BOVIN	10	10	42,79	--	--	--
Putative uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=2 SV=1 (*)	A5PK72_BOVIN	7	12	39,41	--	--	--
Serotransferrin OS=Bos taurus GN=TF PE=2 SV=1	TRFE_BOVIN	22	76	36,79	Ferric iron binding; Ferric iron transmembrane transporter activity	Cellular iron ion homeostasis	Cell; Extracellular space

Continua Tabela 5

Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4	ALBU_BOVIN	22	59	40,20	DNA binding ; Drug binding; Fatty acid binding; Metal ion binding; Pyridoxal phosphate binding; Toxic substance binding	Cellular response to starvation; Hemolysis by symbiont of host erythrocytes; Maintenance of mitochondrion location; Negative regulation of apoptotic process	Extracellular region; Extracellular space; Protein complex
Tetranectin OS=Bos taurus GN=CLEC3B PE=2 SV=1	TETN_BOVIN	6	13	40,10	Calcium ion binding; Carbohydrate binding; Heparin binding	Bone mineralization; Cellular response to transforming growth factor beta stimulus; Positive regulation of plasminogen activation; Skeletal system development	Cytoplasm; Extracellular exosome; Extracellular space; Granular component
Transthyretin OS=Bos taurus GN=TTR PE=1 SV=1	TTHY_BOVIN	6	7	55,78	Thyroid hormone binding	Retinol metabolic process; Thyroid hormone transport	Extracellular exosome; Extracellular space
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Bos taurus PE=1 SV=1 (**)	G5E604_BOVIN	3	6	43,93	--	--	--
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=IGLL1 PE=1 SV=2 (**)	F1MLW7_BOVIN	7	11	45,30	Immune response; Immunoglobulin production	--	Extracellular space
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=IGLL1 PE=4 SV=1 (**)	G3N2D7_BOVIN	3	5	51,72	--	--	--
Uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=1 SV=2 (**)	F1MH40_BOVIN	6	13	35,83	--	--	--
Uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=1 SV=2 (**)	F1MZ96_BOVIN	7	13	36,25	--	B cell differentiation	--
Uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=1 SV=2 (**)	F1MH40_BOVIN	7	13	36,25	--	Immune response; Immunoglobulin production	Extracellular space
Uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=1 SV=2 (**)	F1MZ96_BOVIN	6	13	35,83	--	--	--

(*) Putative uncharacterized protein: means that this protein may be identified by computer, and the function is still unknown. This protein is not homologous to any well characterised proteins and thus its function cannot be predicted. Putative means that it was only predicted based on ORF (open reading frame) and promoter sequence.

(**) Uncharacterized protein: Proteins which are NOT conserved or with no known or predicted function or characteristics (<http://www.uniprot.org/docs/nameprot>)

Tabela 6. Proteínas indentificadas na espectrometria de massas e suas respectivas ontologias gênicas (função molecular, processo biológico e componente celular) das amostras do grupo de folículos atresicos, de ovários sem corpo lúteo de vacas gestantes

Descrição proteína	ID Acesso	Match	Nº Peptídeos	% Cobertura sequência	Ontologia gênica		
					Função molecular	Processo biológico	Componente celular
ALB protein OS=Bos taurus GN=ALB PE=2 SV=1	B0JYQ0_BOVIN	36	59	59,14	--	Transport	Extracellular space
Alpha-1-antitripsina OS=Bos taurus GN=SERPINA1 PE=1 SV=1	A1AT_BOVIN	13	28	35,10	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Endoplasmic reticulum; Extracellular exosome; Extracellular space; Golgi apparatus
Alpha-1B-glycoprotein OS=Bos taurus GN=A1BG PE=1 SV=1	A1BG_BOVIN	17	24	47,32	--	--	Blood microparticle; Extracellular exosome
Antithrombin-III OS=Bos taurus GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	F1MSZ6_BOVIN	24	38	51,83	Heparin binding; Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Regulation of blood coagulation, intrinsic pathway	Blood microparticle; Extracellular exosome
Antithrombin-III OS=Bos taurus GN=SERPINC1 PE=1 SV=2	ANT3_BOVIN	24	38	51,83	Heparin binding; Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Blood coagulation; Negative regulation of endopeptidase activity; Regulation of blood coagulation, intrinsic pathway	Extracellular space
Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=1	V6F9A2_BOVIN	21	32	59,25	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; Phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity; Phospholipid binding	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of hydrolase activity; Positive regulation of Rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of Cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride homeostasis; Vitamin transport	Blood microparticle; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle

Continua Tabela 6

Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=3	APOA1_BOVIN	20	32	59,25	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; High-density lipoprotein particle receptor binding; Phosphatidylcholine binding; Phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Lipoprotein metabolic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Neuron projection regeneration; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phosphatidylcholine metabolic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of lipoprotein lipase activity; Positive regulation of Rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Positive regulation of triglyceride catabolic process; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of Cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride catabolic process; Triglyceride homeostasis; Very-low-density lipoprotein particle remodeling; Vitamin transport	Blood microparticle; Chylomicron; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; High-density lipoprotein particle; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle
Apolipoprotein A-I-like OS=Bos taurus GN=LOC100297695 PE=4 SV=1	V6F869_BOVIN	9	23	37,02	Lipid binding	Lipid transport Source: uniprotkb-KW; Lipoprotein metabolic process	Extracellular region
Complement C3 OS=Bos taurus GN=C3 PE=1 SV=1	G3X7A5_BOVIN	59	154	44,49	Endopeptidase inhibitor activity	Complement activation; Inflammatory response; Positive regulation of activation of membrane attack complex; Positive regulation of angiogenesis; Positive regulation of apoptotic cell clearance; Positive regulation of glucose transport; Positive regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway; Positive regulation of lipid storage; Positive regulation of protein phosphorylation; Positive regulation of type IIA hypersensitivity; Positive regulation of vascular endothelial growth factor production; Regulation of triglyceride biosynthetic process	Blood microparticle; Extracellular exosome
Complement C3 OS=Bos taurus GN=C3 PE=1 SV=2	CO3_BOVIN	61	154	47,56	C5L2 anaphylatoxin chemotactic receptor binding; Endopeptidase inhibitor activity	Complement activation, alternative pathway; Complement activation, classical pathway; Fatty acid metabolic process; Inflammatory response; Positive regulation of glucose transport; Positive regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway; Positive regulation of lipid storage; Positive regulation of protein phosphorylation; Regulation of triglyceride biosynthetic process	Extracellular space
Complement component 3 OS=Bos taurus GN=C3 PE=2 SV=1	A0A0F6QNP7_BOVIN	58	156	44,01	Endopeptidase inhibitor activity	Complement activation; Inflammatory response	Extracellular space
Complement component 3d (Fragment) OS=Bos taurus PE=2 SV=1	Q693V9_BOVIN	10	35	43,23	--	--	Extracellular space
Endopin 2 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-7 PE=2 SV=1	Q3SZQ8_BOVIN	15	29	37,89	--	--	Extracellular space
FGB protein (Fragment) OS=Bos taurus GN=FGB PE=2 SV=1	A6QPX7_BOVIN	33	28	72,73	--	Platelet activation; Protein polymerization; Signal transduction	Fibrinogen complex

Continua Tabela 6

FGG protein OS=Bos taurus GN=FGG PE=1 SV=1	Q3SZZ9_BOVIN	13	35	43,68	--	Platelet activation; Protein polymerization; Signal transduction	Fibrinogen complex
Fibrinogen beta chain OS=Bos taurus GN=FGB PE=1 SV=2	F1MAV0_BOVIN	39	43	60,40	Structural molecule activity	Blood coagulation, fibrin clot formation; Cell-matrix adhesion; Fibrinolysis; Induction of bacterial agglutination; Negative regulation of endothelial cell apoptotic process; Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors; Plasminogen activation; Platelet aggregation; Positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade; Positive regulation of exocytosis; Positive regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Positive regulation of peptide hormone secretion; Positive regulation of protein secretion; Positive regulation of vasoconstriction; Protein polymerization; Response to calcium ion; Signal transduction	Blood microparticle; Cell cortex; External side of plasma membrane; Extracellular exosome; Fibrinogen complex; Platelet alpha granule
Fibrinogen beta chain OS=Bos taurus GN=FGB PE=1 SV=2	FIBB_BOVIN	36	40	56,62	Glycoprotein binding	Adaptive immune response; Innate immune response; Platelet activation; Protein polymerization; Signal transduction	Fibrinogen complex
Fibrinogen gamma-B chain OS=Bos taurus GN=FGG PE=1 SV=1	F1MGU7_BOVIN	13	36	42,89	Structural molecule activity	Blood coagulation, fibrin clot formation; Cell-matrix adhesion; Fibrinolysis; Negative regulation of endothelial cell apoptotic process; Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors; Plasminogen activation; Platelet aggregation; Positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade; Positive regulation of exocytosis; Positive regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Positive regulation of peptide hormone secretion; Positive regulation of protein secretion; Positive regulation of vasoconstriction; Protein polymerization; Protein secretion; Response to calcium ion; Signal transduction	Blood microparticle; Cell cortex; External side of plasma membrane; Extracellular exosome; Fibrinogen complex; Platelet alpha granule
Gelsolin OS=Bos taurus GN=GSN PE=1 SV=1	F1MJH1_BOVIN	17	49	36,11	Calcium ion binding	Actin filament severing; Actin nucleation; Barbed-end actin filament capping	--
Gelsolin OS=Bos taurus GN=GSN PE=2 SV=1	GELS_BOVIN	17	49	36,11	Calcium ion binding	Actin filament severing; Actin nucleation; Barbed-end actin filament capping; Cilium morphogenesis	Cytoplasm; Cytoskeleton
Hemopexin OS=Bos taurus GN=HPX PE=2 SV=1	HEMO_BOVIN	18	35	41,18	Heme transporter activity; Metal ion binding	Cellular iron ion homeostasis; Heme metabolic process; Hemoglobin metabolic process; Positive regulation of humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin; Positive regulation of immunoglobulin production; Positive regulation of interferon-gamma-mediated signaling pathway; Positive regulation of tyrosine phosphorylation of Stat1 protein	Blood microparticle; Cell; Extracellular exosome
Histidine-rich GLYCOPROTEIN=FACTOR XIIIa substrate (Fragments) OS=Bos taurus PE=1 SV=1	Q9TS85_BOVIN	5	18	37,38	--	--	--
Inter-alpha (Globulin) inhibitor H4 (Plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein) OS=Bos taurus GN=ITIH4 PE=2 SV=1	Q5EA67_BOVIN	24	62	43,34	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Hyaluronan metabolic process	--
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Bos taurus GN=ITIH4 PE=1 SV=1	ITIH4_BOVIN	26	62	45,09	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Acute-phase response; Hyaluronan metabolic process	Extracellular region

Continua Tabela 6

Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Bos taurus GN=ITIH4 PE=1 SV=2	F1MMD7_BOVIN	24	62	43,34	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Acute-phase response; Hyaluronan metabolic process; Response to cytokine	Blood microparticle; Cytoplasm; Extracellular exosome; Plasma membrane
MHC class II antigen (Fragment) OS=Bos taurus GN=BoLA-DRB3,2 PE=4 SV=1	Q3LUK2_BOVIN	3	9	37,21	--	Antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II; Immune response	Integral component of membrane; MHC class II protein complex
Pigment epithelium-derived factor OS=Bos taurus GN=SERPINF1 PE=1 SV=1	PEDF_BOVIN	11	30	38,22	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of angiogenesis; Negative regulation of endopeptidase activity; Negative regulation of epithelial cell proliferation involved in prostate gland development; Positive regulation of neurogenesis	Extracellular exosome; Extracellular matrix; Extracellular region; Extracellular space; Melanosome
Serotransferrin OS=Bos taurus GN=TF PE=1 SV=1	G3X6N3_BOVIN	52	75	69,03	Ferric iron binding; Ferric iron transmembrane transporter activity; Ferrous iron binding	Cellular iron ion homeostasis; Cellular response to iron ion; Ferrous iron import into cell; Positive regulation of receptor-mediated endocytosis; Retina homeostasis	Apical plasma membrane; Basal plasma membrane; Blood microparticle; Coated pit; Early endosome; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Extrinsic component of external side of plasma membrane; HFE-transferrin receptor complex; Late endosome; Perinuclear region of cytoplasm; Recycling endosome
Serotransferrin OS=Bos taurus GN=TF PE=2 SV=1	TRFE_BOVIN	50	76	67,76	Ferric iron binding; Ferric iron transmembrane transporter activity	Cellular iron ion homeostasis	Cell; Extracellular space
Serpin A3-1 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-1 PE=1 SV=3	SPA31_BOVIN	18	28	36,01	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity; Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasm; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-2 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-2 PE=3 SV=1	SPA32_BOVIN	19	28	38,93	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-3 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-3 PE=1 SV=2	SPA33_BOVIN	21	28	45,26	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-4 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-4 PE=3 SV=1	SPA34_BOVIN	21	29	45,26	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-5 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-5 PE=3 SV=1	SPA35_BOVIN	20	28	43,07	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space

Continua Tabela 6

Serpin A3-6 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-6 PE=3 SV=1	SPA36_BOVIN	18	26	37,44	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-6 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-6 PE=3 SV=1	G3N1U4_BOVIN	18	27	40,15	--	--	Extracellular space
Serpin A3-8 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-8 PE=2 SV=1	SPA38_BOVIN	16	34	41,87	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-8 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-8 PE=3 SV=1	A0A0A0MP89_BOVIN	16	34	41,87	--	--	Extracellular space
SERPIND1 protein OS=Bos taurus GN=SERPIND1 PE=2 SV=1	A6QPP2_BOVIN	15	35	43,15	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular exosome; Extracellular space
Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4	ALBU_BOVIN	36	59	58,48	DNA binding; Drug binding; Fatty acid binding; Metal ion binding; Pyridoxal phosphate binding; Toxic substance binding	Cellular response to starvation; Hemolysis by symbiont of host erythrocytes; Maintenance of mitochondrion location; Negative regulation of apoptotic process; Transport	Extracellular region; Extracellular space; Protein complex
Similar to 70 kDa heat shock cognate protein (Fragment) OS=Bos taurus PE=2 SV=1	Q861V2_BOVIN	3	6	52,24	ATP binding	--	--
Transthyretin OS=Bos taurus GN=TTR PE=1 SV=1	TTHY_BOVIN	5	7	39,46	Thyroid hormone binding	Retinol metabolic process; Thyroid hormone transport	Extracellular exosome; Extracellular space
Tubulin alpha-1B chain OS=Bos taurus PE=1 SV=2	TBA1B_BOVIN	11	34	42,57	Double-stranded RNA binding; Gtpase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Cellular response to interleukin-4; Microtubule cytoskeleton organization	Cytoplasmic microtubule; Extracellular exosome; Myelin sheath
Tubulin beta-4A chain OS=Bos taurus GN=TUBB4A PE=2 SV=1	TBB4A_BOVIN	9	30	36,94	GTPase activity ; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cilium; Cytoplasm; Extracellular exosome; Internode region of axon; Microtubule; Myelin sheath; Neuronal cell body; Nucleus
Tubulin beta-5 chain OS=Bos taurus GN=TUBB5 PE=2 SV=1	TBB5_BOVIN	13	30	44,82	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cell body; Cytoplasmic ribonucleoprotein granule; Extracellular exosome; Microtubule; Nuclear envelope lumen

Continua Tabela 6

Uncharacterized protein (Fragment) OS=Bos taurus PE=1 SV=1 (**)	G3N0V0_BOVIN	13	25	51,84	Antigen binding; Immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway; Complement activation, classical pathway; Defense response to bacterium; Innate immune response; Phagocytosis, engulfment; Phagocytosis, recognition; Positive regulation of B cell activation	Blood microparticle ; External side of plasma membrane; Immunoglobulin complex, circulating
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=LOC784932 PE=3 SV=1 (**)	A0A0A0MPA0_BOVIN	13	31	35,01	--	Extracellular space	--
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=SERPINA3 PE=3 SV=1 (**)	G8JKW7_BOVIN	18	29	49,27	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular space
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=SERPING1 PE=3 SV=2 (**)	E1BMJ0_BOVIN	15	26	38,89	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of complement activation, lectin pathway; Negative regulation of endopeptidase activity	Blood; Extracellular exosome; Extracellular space

(**) Uncharacterized protein: Proteins which are NOT conserved or with no known or predicted function or characteristics (<http://www.uniprot.org/docs/nameprot>)

Tabela 7. Proteínas indentificadas na espectrometria de massas e suas respectivas ontologias gênicas (função molecular, processo biológico e componente celular) das amostras do grupo de folículos saudáveis, de ovários com corpo lúteo de vacas gestantes

Descrição proteína	ID Acesso	Match	Nº Peptídeos	% Cobertura sequência	Ontologia gênica		
					Função molecular	Processo biológico	Componente celular
ALB protein OS=Bos taurus GN=ALB PE=2 SV=1	B0JYQ0_BOVIN	33	59	55,19	--	Transport	Extracellular space
ALB protein OS=Bos taurus GN=ALB PE=2 SV=1	B0JYQ0_BOVIN	25	59	43,49	--	Transport	Extracellular space
Alpha 1-antichymotrypsin (Fragment) OS=Bos taurus GN=alpha 1-antichymotrypsin/ ACT PE=2 SV=1	Q28921_BOVIN	10	18	39,29	--	--	Extracellular space
Alpha 1-antichymotrypsin (Fragment) OS=Bos taurus GN=alpha 1-antichymotrypsin/ ACT PE=2 SV=1	Q28922_BOVIN	3	7	73,12	--	--	Extracellular space
Alpha1-antichymotrypsin isoform pHHK11 (Fragment) OS=Bos taurus PE=2 SV=1	Q27983_BOVIN	8	16	38,92	--	--	Extracellular space
Alpha-1B-glycoprotein OS=Bos taurus GN=A1BG PE=1 SV=1	A1BG_BOVIN	9	24	35,19	--	--	Blood microparticles; Extracellular exosome
Alpha-2-macroglobulin OS=Bos taurus GN=A2M PE=1 SV=2	A2MG_BOVIN	41	108	38,94	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of complement activation, lectin pathway; Stem cell differentiation	Blood microparticle; Extracellular exosome
Alpha-2-macroglobulin variant 2 OS=Bos taurus GN=A2M PE=2 SV=1	K4JR71_BOVIN	7	20	37,36	Endopeptidase inhibitor activity	--	--
Alpha-2-macroglobulin variant 21 OS=Bos taurus GN=A2M PE=2 SV=1	K4JBT0_BOVIN	6	16	41,34	Endopeptidase inhibitor activity	--	--
Alpha-2-macroglobulin variant 22 OS=Bos taurus GN=A2M PE=2 SV=1	K4JR88_BOVIN	16	46	39,51	Endopeptidase inhibitor activity	--	--

Continua Tabela 7

Apolipoprotein A-I	V6F9A2_BOVIN	14	32	49,06	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity; Phospholipid binding	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of hydrolase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride homeostasis; Vitamin transport	Blood microparticle; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle
Apolipoprotein A-I	P15497	16	14	32	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis	Blood microparticle; Chylomicron; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; High-density lipoprotein particle
Apolipoprotein A-1 OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=1	V6F9A2_BOVIN	12	32	44,91	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity; Phospholipid binding	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of hydrolase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride homeostasis; Vitamin transport	Blood microparticle; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle

Continua Tabela 7

Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=1	V6F9A2_BOVIN	12	32	44,91	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity; Phospholipid binding	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of hydrolase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride homeostasis; Vitamin transport	Blood microparticle; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle
Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=3	APOA1_BOVIN	14	32	49,06	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; High-density lipoprotein particle receptor binding; Phosphatidylcholine binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle ; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Lipoprotein metabolic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Neuron projection regeneration; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phosphatidylcholine metabolic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of lipoprotein lipase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Positive regulation of triglyceride catabolic process; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride catabolic process; Triglyceride homeostasis; Very-low-density lipoprotein particle remodeling; Vitamin transport	Blood microparticle; Chylomicron; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; High-density lipoprotein particle; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle

Continua Tabela 7

Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=3	APOA1_BOVIN	16	35	52,15	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; High-density lipoprotein particle receptor binding; Phosphatidylcholine binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Lipoprotein metabolic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Neuron projection regeneration; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phosphatidylcholine metabolic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of lipoprotein lipase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Positive regulation of triglyceride catabolic process; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride catabolic process; Triglyceride homeostasis; Very-low-density lipoprotein particle remodeling; Vitamin transport	Blood microparticle; Chylomicron; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; High-density lipoprotein particle; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle
Apolipoprotein E (Fragment) OS=Bos taurus PE=4 SV=1	Q0ZCB4_BOVIN	6	22	36,71	High-density lipoprotein particle receptor binding; Phosphatidylcholine binding; Phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity	Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Lipoprotein metabolic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Neuron projection regeneration; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phosphatidylcholine metabolic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of lipoprotein lipase activity; Positive regulation of Rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Positive regulation of triglyceride catabolic process; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of Cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride catabolic process; Triglyceride homeostasis; Very-low-density lipoprotein particle; Vitamin transport	Spherical high-density lipoprotein particle Very-low-density lipoprotein particle
Apolipoprotein E (Fragment) OS=Bos taurus PE=4 SV=1	Q0ZCB4_BOVIN	6	22	36,71	Lipid binding	Lipid transport; Lipoprotein metabolic process	Extracellular region

Continua Tabela 7

Complement C3 OS=Bos taurus GN=C3 PE=1 SV=1	G3X7A5_BOVIN	62	154	42,44	Endopeptidase inhibitor activity	Complement activation Inflammatory response Positive regulation of activation of membrane attack complex; Positive regulation of angiogenesis; Positive regulation of apoptotic cell clearance; Positive regulation of glucose transport; Positive regulation of g-protein coupled receptor protein signaling pathway; Positive regulation of lipid storage; Positive regulation of protein phosphorylation; Positive regulation of type iia hypersensitivity; Positive regulation of vascular endothelial growth factor production; Regulation of triglyceride biosynthetic process	Blood microparticle; Extracellular exosome
Complement C3 OS=Bos taurus GN=C3 PE=1 SV=2	CO3_BOVIN	64	154	44,85	C5L2 anaphylatoxin chemotactic receptor binding; Endopeptidase inhibitor activity	Complement activation, alternative pathway; Complement activation, classical pathway; Fatty acid metabolic process; Inflammatory response; Positive regulation of glucose transport; Positive regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway; Positive regulation of lipid storage; Positive regulation of protein phosphorylation; Regulation of triglyceride biosynthetic process	Extracellular space
Complement component 3 OS=Bos taurus GN=C3 PE=2 SV=1	A0A0F6QNP7_BOVIN	63	156	43,41	Endopeptidase inhibitor activity	Complement activation; Inflammatory response	Extracellular space
Complement component 3d (Fragment) OS=Bos taurus PE=2 SV=1	Q693V9_BOVIN	16	35	52,15	--	--	Extracellular space
Endopin 2 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-7 PE=2 SV=1	Q3SZQ8_BOVIN	12	29	35,73	--	--	Extracellular space
Endopin 2B OS=Bos taurus PE=2 SV=1	Q5J801_BOVIN	12	29	35,73	--	--	Extracellular space
Hemopexin OS=Bos taurus GN=HPX PE=2 SV=1	HEMO_BOVIN	11	35	37,91	Heme transporter activity; Metal ion binding	Cellular iron ion homeostasis; Heme metabolic process; Hemoglobin metabolic process; Positive regulation of humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin; Positive regulation of immunoglobulin production; Positive regulation of interferon-gamma-mediated signaling pathway; Positive regulation of tyrosine phosphorylation of STAT1 protein	Blood microparticle; Cell; Extracellular exosome
IGK protein OS=Bos taurus GN=IGK PE=2 SV=1	B0JYP6_BOVIN	6	12	35,83	--	--	--
IGK protein OS=Bos taurus GN=IGK PE=2 SV=1	Q05B55_BOVIN	6	13	35,83	--	--	--

Continua Tabela 7

Serotransferrin OS=Bos taurus GN=TF PE=1 SV=1	G3X6N3_BOVIN	30	75	51,99	Ferric iron binding; Ferric iron transmembrane transporter activity; Ferrous iron binding	Cellular iron ion homeostasis; Cellular response to iron ion; Ferrous iron import into cell; Positive regulation of receptor-mediated endocytosis; Retina homeostasis	Apical plasma membrane; Basal plasma membrane; Blood microparticle; Coated pit; Early endosome; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Extrinsic component of external side of plasma membrane; Hfe-transferrin receptor complex; Late endosome; Perinuclear region of cytoplasm; Recycling endosome
Serotransferrin OS=Bos taurus GN=TF PE=2 SV=1	TRFE_BOVIN	31	76	54,97	Ferric iron binding; Ferric iron transmembrane transporter activity	Cellular iron ion homeostasis	Cell; Extracellular space
Serpin A3-1 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-1 PE=1 SV=3	SPA31_BOVIN	16	28	38,93	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity; serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; 1 Cytoplasm ; cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-2 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-2 PE=3 SV=1	SPA32_BOVIN	17	28	41,85	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-3 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-3 PE=1 SV=2	SPA33_BOVIN	16	28	41,61	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-4 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-4 PE=3 SV=1	SPA34_BOVIN	16	29	41,61	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-5 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-5 PE=3 SV=1	SPA35_BOVIN	14	28	46,23	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-6 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-6 PE=3 SV=1	SPA36_BOVIN	15	26	41,79	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-6 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-6 PE=3 SV=1	G3N1U4_BOVIN	14	27	44,77	--	--	Extracellular space
Serpin A3-7 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-7 PE=1 SV=1	A0A0A0MP92_BOVIN	12	29	35,73	--	--	Extracellular space

Continua Tabela 7

Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4	ALBU_BOVIN	27	59	45,63	DNA binding; Drug binding; Fatty acid binding; Metal ion binding; Pyridoxal phosphate binding; Toxic substance binding	Cellular response to starvation; Hemolysis by symbiont of host erythrocytes; Maintenance of mitochondrion location; Negative regulation of apoptotic process; Transport	Extracellular region; Extracellular space; Protein complex
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Bos taurus PE=1 SV=1 (**)	G3N0V0_BOVIN	10	25	45,09	Antigen binding; Immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway; Complement activation, classical pathway; Defense response to bacterium; Innate immune response; Phagocytosis, engulfment; Phagocytosis, recognition; Positive regulation of B cell activation	Blood microparticle; External side of plasma membrane; Immunoglobulin complex, circulating
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=SERPINA3 PE=3 SV=1 (**)	G8JKW7_BOVIN	13	29	42,96	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular space
Uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=1 SV=2 (**)	F1MZ96_BOVIN	6	13	35,83	--	B cell differentiation	--
Uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=1 SV=2 (**)	F1MH40_BOVIN	6	13	35,83	--	Immune response; Immunoglobulin production	Extracellular space

(**) Uncharacterized protein: Proteins which are NOT conserved or with no known or predicted function or characteristics (<http://www.uniprot.org/docs/nameprot>)

Tabela 8. Proteínas indentificadas na espectrometria de massas e suas respectivas ontologias gênicas (função molecular, processo biológico e componente celular) das amostras do grupo de folículos transicionais, de ovários com corpo lúteo de vacas gestantes

Descrição proteína	ID Acesso	Match	Nº Peptídeos	% Cobertura sequência	Ontologia gênica		
					Função molecular	Processo biológico	Componente celular
14-3-3 protein theta OS=Bos taurus GN=YWHAQ PE=2 SV=1	1433T_BOVIN	9	24	37,14	--	Negative regulation of transcription, DNA-templated; Substantia nigra development	Cytoplasm; Extracellular exosome; Focal adhesion; Membrane; Protein complex
14-3-3 protein zeta/delta OS=Bos taurus GN=YWHAZ PE=1 SV=1	1433Z_BOVIN	8	25	37,96	--	--	Melanosome
Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=1	V6F9A2_BOVIN	27	32	68,68		Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity; Phospholipid binding Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of hydrolase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride homeostasis; Vitamin transport	Blood microparticle; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle
Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=3	APOA1_BOVIN	27	32	68,68		Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; High-density lipoprotein particle receptor binding; Phosphatidylcholine binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Lipoprotein metabolic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Neuron projection regeneration; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phosphatidylcholine metabolic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of lipoprotein lipase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Positive regulation of triglyceride catabolic process; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of CDC42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride catabolic process; Triglyceride homeostasis; Very-low-density lipoprotein particle remodeling; Vitamin transport;	Blood microparticle; Chylomicron; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; High-density lipoprotein particle; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle

Continua Tabela 8

Apolipoprotein A-I-like OS=Bos taurus GN=LOC100297695 PE=4 SV=1	V6F869_BOVIN	13	23	51,44	Lipid binding	Lipid transport; Lipoprotein metabolic proces	Extracellular region
Glutathione S-transferase A1 OS=Bos taurus GN=GSTA1 PE=2 SV=3	GSTA1_BOVIN	8	20	45,95	Glutathione transferase activity	Glutathione metabolic process	Cytoplasm
Heat shock 27kDa protein 1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=2 SV=1	E9RHW1_BOVIN	10	16	69,65	--	--	--
Heat shock 27kDa protein 1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=2 SV=1	Q58DP7_BOVIN	8	13	59,35	--	--	--
Heat shock protein beta-1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=1 SV=1	G3X7S2_BOVIN	8	13	59,74	--	--	--
Heat shock protein beta-1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=1 SV=2	E1BEL7_BOVIN	10	17	68,97	Poly(A) RNA binding; Protein kinase C inhibitor activity	Intracellular signal transduction; Negative regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway; Platelet aggregation; Positive regulation of angiogenesis; Positive regulation of blood vessel endothelial cell migration; Positive regulation of endothelial cell chemotaxis by VEGF-activated vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway; Positive regulation of interleukin-1 beta production; Positive regulation of tumor necrosis factor biosynthetic process; Regulation of I-kappab kinase/NF-kappab signaling; Response to virus; Retina homeostasis	Extracellular exosome; Extracellular space; Focal adhesion; Nucleus; Plasma membrane; Z disc
Heat shock protein beta-1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=2 SV=1	HSPB1_BOVIN	10	16	69,65	--	--	--
IGL@ protein OS=Bos taurus GN=IGL@ PE=1 SV=1	Q3T101_BOVIN	8	12	48,94	--	--	--
Immunoglobulin light chain_ lambda gene cluster OS=Bos taurus GN=IGL@ PE=2 SV=1	Q1RMN8_BOVIN	9	13	52,14	--	--	--
Peroxiredoxin-6 OS=Bos taurus GN=PRDX6 PE=1 SV=3	PRDX6_BOVIN	10	27	54,91	Glutathione peroxidase activity; Peroxidase activity; Peroxiredoxin activity; Phospholipase a2 activity	Cellular oxidant detoxification; Phospholipid catabolic process; Response to reactive oxygen species	Cytoplasm ; ytoplasmic membrane-bounded vesicle; Cytosol; Extracellular exosome; Extracellular space; Lysosome; Membrane
Putative uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=2 SV=1 (*)	A6QM09_BOVIN	9	16	51,29	--	--	--
Putative uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=2 SV=1 (*)	A5PK72_BOVIN	7	12	39,41	--	--	--

Continua Tabela 8

Rho protein GDP-dissociation inhibitor (Fragments) OS=Bos taurus PE=1 SV=1	Q7M2Q9_BOVIN	2	5	37,50	Rho GDP-dissociation inhibitor activity	--	Cytoplasm
Triosephosphate isomerase OS=Bos taurus GN=TPI1 PE=2 SV=3	TPIS_BOVIN	6	21	42,17	Triose-phosphate isomerase activity	Gluconeogenesis; Glyceraldehyde-3-phosphate biosynthetic process; Glycerol catabolic process; Glycolytic process; Multicellular organismal development; Pentose-phosphate shunt	Cytosol; Extracellular exosome; Extracellular space; Nucleus
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Bos taurus PE=4 SV=2 (**)	E1BDS9_BOVIN	4	13	38,21		Protein targeting; Regulation of cell death	Mitochondrion
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=IGLL1 PE=1 SV=2 (**)	F1MLW7_BOVIN	8	11	52,14	--	--	--
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=IGLL1 PE=4 SV=1 (**)	G3N2D7_BOVIN	3	5	51,72	--	--	--
Uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=1 SV=2 (**)	F1MZ96_BOVIN	8	13	36,25	--	B cell differentiation	--
Vimentin OS=Bos taurus GN=VIM PE=1 SV=3	VIME_BOVIN	15	47	45,49	Double-stranded RNA binding; Structural constituent of cytoskeleton; Structural constituent of eye lens	Astrocyte development; Bergmann glial cell differentiation; Intermediate filament organization; In utero embryonic development; Lens fiber cell development; Negative regulation of neuron projection development; Positive regulation of gene expression; SMAD protein signal transduction	Cell leading edge; Cytoplasm; Extracellular exosome; Focal adhesion; Intermediate filament; Neuron projection; Peroxisome; Plasma membrane

(*) Putative uncharacterized protein: means that this protein may be identified by computer, and the function is still unknown. This protein is not homologous to any well characterised proteins and thus its function cannot be predicted. Putative means that it was only predicted based on ORF (open reading frame) and promoter sequence.

(**) Uncharacterized protein: Proteins which are NOT conserved or with no known or predicted function or characteristics (<http://www.uniprot.org/docs/nameprot>)

Tabela 9. Proteínas indentificadas na espectrometria de massas e suas respectivas ontologias gênicas (função molecular, processo biológico e componente celular) das amostras do grupo de folículos atresicos, de ovários com corpo lúteo de vacas gestantes

Descrição proteína	ID Acesso	Match	Nº Peptídeos	% Cobertura sequência	Ontologia gênica		
					Função molecular	Processo biológico	Componente celular
ALB protein OS=Bos taurus GN=ALB PE=2 SV=1	B0JYQ0_BOVIN	40	59	63,26	Transport	--	Extracellular space
ALB protein OS=Bos taurus GN=ALB PE=2 SV=1	B0JYQ0_BOVIN	22	59	35,75	Transport	--	Extracellular space
Alpha 1-antichymotrypsin (Fragment) OS=Bos taurus GN=alpha 1-antichymotrypsin/ ACT PE=2 SV=1	Q28921_BOVIN	13	18	49,60	--	--	Extracellular space
Alpha 1-antichymotrypsin (Fragment) OS=Bos taurus GN=alpha 1-antichymotrypsin/ ACT PE=2 SV=1	Q28922_BOVIN	2	7	60,22	--	--	Extracellular space
Alpha-1B-glycoprotein OS=Bos taurus GN=A1BG PE=1 SV=1	A1BG_BOVIN	14	24	44,93			Blood microparticle
Alpha-2-antiplasmin OS=Bos taurus GN=SERPINF2 PE=1 SV=2	A2AP_BOVIN	8	32	35,57			Extracellular exosome
Alpha-2-antiplasmin OS=Bos taurus GN=SERPINF2 PE=1 SV=2	A2AP_BOVIN	8	32	35,57	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Acute-phase response; Blood vessel morphogenesis; Collagen fibril organization; Negative regulation of endopeptidase activity; Negative regulation of fibrinolysis; Negative regulation of plasminogen activation; Positive regulation of cell differentiation; Positive regulation of collagen biosynthetic process; Positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade; Positive regulation of jnk cascade; Positive regulation of smooth muscle cell proliferation; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of transcription from rna polymerase ii promoter; Positive regulation of transforming growth factor beta production; Regulation of blood vessel size by renin-angiotensin	Blood microparticle; Cell surface; Extracellular exosome; Extracellular space; Fibrinogen complex
Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Bos taurus GN=AHSG PE=1 SV=1	B0JYN6_BOVIN	9	19	42,62	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity	Acute-phase response; Negative regulation of bone mineralization; Ossification; Positive regulation of phagocytosis; Regulation of inflammatory response	Blood microparticle; Extracellular exosome; Extracellular membrane- bounded organelle; Plasma membrane; Vesicle
Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Bos taurus GN=AHSG PE=1 SV=2	FETUA_BOVIN	9	19	42,62	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity; Endopeptidase inhibitor activity	Acute-phase response; Negative regulation of biomineral tissue development; Negative regulation of bone mineralization; Negative regulation of endopeptidase activity; Ossification; Positive regulation of phagocytosis; Regulation of inflammatory response	Blood microparticle; Extracellular exosome; Extracellular matrix; Extracellular membrane- bounded organelle; Plasma membrane

Continua Tabela 9

Angiotensinogen OS=Bos taurus GN=AGT PE=2 SV=1	Q3SZH5_BOVIN	12	23	39,39	Sodium channel regulator activity	Activation of nf-kappab-inducing kinase activity; Angiotensin mediated vasoconstriction involved in regulation of systemic arterial blood pressure; Astrocyte activation; Blood vessel development; Brain renin-angiotensin system; Branching involved in ureteric bud morphogenesis; Cell-matrix adhesion; Drinking behavior; Establishment of blood-nerve barrier; Excretion; Extracellular matrix organization; G-protein coupled receptor signaling pathway; Hormone metabolic process; Negative regulation of cell proliferation; Negative regulation of neuron apoptotic process; Negative regulation of neurotrophin trk receptor signaling pathway; Ovarian follicle rupture; Peristalsis; Positive regulation of activation of jak2 kinase activity; Positive regulation of branching involved in ureteric bud morphogenesis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of endothelial cell migration; Positive regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway; Positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of gap junction assembly; Positive regulation of mapk cascade; Positive regulation of membrane hyperpolarization; Positive regulation of multicellular organism growth; Positive regulation of organ growth; Positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation; Positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling; Positive regulation of protein kinase c activity; Positive regulation of protein tyrosine kinase activity; Positive regulation of transcription, DNA-templated; Regulation of cardiac conduction; Regulation of extracellular matrix assembly; Regulation of inflammatory response; Regulation of renal output by angiotensin; Renal response to blood flow involved in circulatory renin-angiotensin regulation of systemic arterial blood pressure; Renin-angiotensin regulation of aldosterone production; Response to cold; Response to salt stress; Smooth muscle cell differentiation; Smooth muscle cell proliferation	Blood microparticle; Extracellular exosome; Intracellular
Antithrombin-III OS=Bos taurus GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	F1MSZ6_BOVIN	24	38	55,91	Heparin binding; Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Regulation of blood coagulation, intrinsic pathway	Blood microparticle; Extracellular exosome
Antithrombin-III OS=Bos taurus GN=SERPINC1 PE=1 SV=2	ANT3_BOVIN	25	38	58,71	Heparin binding; Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Blood coagulation; Negative regulation of endopeptidase activity; Regulation of blood coagulation, intrinsic pathway	Extracellular space
Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=1	V6F9A2_BOVIN	14	32	44,15	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity; Phospholipid binding	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory respons; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway ; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of hydrolase activity ; Positive regulation of Rho protein signal transduction ; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading ; Protein oxidation; Protein stabilization ; Regulation of Cdc42 protein signal transduction ; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation ; Reverse cholesterol transport; Triglyceride homeostasis; Vitamin transport	Blood microparticle ; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle

Continua Tabela 9

Apolipoprotein A-1 OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=1	V6F9A2_BOVIN	30	32	73,21	<p>Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; Phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity; Phospholipid binding</p>	<p>Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of hydrolase activity; Positive regulation of Rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of Cdc42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride homeostasis; Vitamin transport</p>	<p>Blood microparticle; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle</p>
Apolipoprotein A-1 OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=3	APOA1_BOVIN	14	32	44,15	<p>Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; High-density lipoprotein particle receptor binding; Phosphatidylcholine binding; Phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity</p>	<p>Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Lipoprotein metabolic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Neuron projection regeneration; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phosphatidylcholine metabolic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of lipoprotein lipase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Positive regulation of triglyceride catabolic process; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of CDC42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation; Reverse cholesterol transport; Triglyceride catabolic process; Triglyceride homeostasis; Very-low-density lipoprotein particle remodeling; Vitamin transport</p>	<p>Blood microparticle; Chylomicron; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; High-density lipoprotein particle; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle</p>

Continua Tabela 9

Apolipoprotein A-I OS=Bos taurus GN=APOA1 PE=1 SV=3	APOA1_BOVIN	30	32	73,21	Beta-amyloid binding; Chemorepellent activity; Cholesterol binding; Cholesterol transporter activity; High-density lipoprotein particle binding; High-density lipoprotein particle receptor binding; Phosphatidylcholine binding phosphatidylcholine-sterol o-acyltransferase activator activity	Adrenal gland development; Blood vessel endothelial cell migration; Cholesterol biosynthetic process; Cholesterol efflux; Cholesterol homeostasis; Cholesterol import; Endothelial cell proliferation; Glucocorticoid metabolic process; G-protein coupled receptor signaling pathway; High-density lipoprotein particle assembly; Integrin-mediated signaling pathway; Lipid storage; Lipoprotein biosynthetic process; Lipoprotein metabolic process; Negative regulation of cell adhesion molecule production; Negative regulation of cytokine secretion involved in immune response; Negative regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Negative regulation of hydrolase activity; Negative regulation of inflammatory response; Negative regulation of interleukin-1 beta secretion; Negative regulation of tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; Negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling; Neuron projection regeneration; Peptidyl-methionine modification; Phosphatidylcholine biosynthetic process; Phosphatidylcholine metabolic process; Phospholipid efflux; Phospholipid homeostasis; Positive regulation of cholesterol esterification; Positive regulation of fatty acid biosynthetic process; Positive regulation of lipoprotein lipase activity; Positive regulation of rho protein signal transduction; Positive regulation of stress fiber assembly; Positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading; Positive regulation of triglyceride catabolic process; Protein oxidation; Protein stabilization; Regulation of CDC42 protein signal transduction; Regulation of intestinal cholesterol absorption; Regulation of protein phosphorylation ; Reverse cholesterol transport; Triglyceride catabolic process; Triglyceride homeostasis; Very-low-density lipoprotein particle remodeling; Vitamin transport	Blood microparticle; Chylomicron; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; High-density lipoprotein particle; Spherical high-density lipoprotein particle; Very-low-density lipoprotein particle
Apolipoprotein A-I-like OS=Bos taurus GN=LOC100297695 PE=4 SV=1	V6F869_BOVIN	14	23	52,40	Lipid binding	Lipid transport; Lipoprotein metabolic process	Extracellular region
Complement C3 OS=Bos taurus GN=C3 PE=1 SV=2	CO3_BOVIN	41	154	35,46	C5L2 anaphylatoxin chemotactic receptor binding; Endopeptidase inhibitor activity	Complement activation, alternative pathway; Complement activation, classical pathway; Fatty acid metabolic process; Inflammatory response; Positive regulation of glucose transport; Positive regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway; Positive regulation of lipid storage; Positive regulation of protein phosphorylation; Regulation of triglyceride biosynthetic process	Extracellular space
Complement component C9 OS=Bos taurus GN=C9 PE=2 SV=1	CO9_BOVIN	18	42	43,43	--	Complement activation, alternative pathway; Complement activation, classical pathway; Cytolysis	--
Corticosteroid-binding globulin OS=Bos taurus GN=SERPINA6 PE=3 SV=1	CBG_BOVIN	10	28	39,85	Serine-type endopeptidase inhibitor activity; Steroid binding	Glucocorticoid metabolic process; Negative regulation of endopeptidase activity; Transport	Extracellular exosome; Extracellular space
Endopin 2 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-7 PE=2 SV=1	Q3SZQ8_BOVIN	17	29	47,24	--	--	Extracellular space
Endopin 2B OS=Bos taurus PE=2 SV=1	Q5J801_BOVIN	16	29	40,53	--	--	Extracellular space
FGB protein (Fragment) OS=Bos taurus GN=FGB PE=2 SV=1	A6QPX7_BOVIN	29	28	68,79	--	Platelet activation; Protein polymerization; Signal transduction	Fibrinogen complex

Continua Tabela 9

FGG protein OS=Bos taurus GN=FGG PE=1 SV=1	Q3SZZ9_BOVIN	20	35	62,99	--		Platelet activation; Protein polymerization; Signal transduction	Fibrinogen complex
Fibrinogen beta chain OS=Bos taurus GN=FGB PE=1 SV=2	F1MAV0_BOVIN	34	43	56,97		Structural molecule activity	Blood coagulation, fibrin clot formation; Cell-matrix adhesion; Fibrinolysis; Induction of bacterial agglutination; Negative regulation of endothelial cell apoptotic process; Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors; Plasminogen activation; Platelet aggregation; Positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade; Positive regulation of exocytosis; Positive regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Positive regulation of peptide hormone secretion; Positive regulation of protein secretion; Positive regulation of vasoconstriction; Protein polymerization; Response to calcium ion; Signal transduction	Blood microparticle; Cell cortex; External side of plasma membrane; Extracellular exosome; Fibrinogen complex; Platelet alpha granule
Fibrinogen beta chain OS=Bos taurus GN=FGB PE=1 SV=2	FIBB_BOVIN	31	40	54,27		Glycoprotein binding	Adaptive immune response; Innate immune response; Platelet activation; Protein polymerization; Signal transduction	Fibrinogen complex
Fibrinogen gamma-B chain OS=Bos taurus GN=FGG PE=1 SV=1	F1MGU7_BOVIN	20	36	58,24		Structural molecule activity	Blood coagulation, fibrin clot formation; Cell-matrix adhesion; Fibrinolysis; Negative regulation of endothelial cell apoptotic process; Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors; Plasminogen activation; Platelet aggregation; Positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade; Positive regulation of exocytosis; Positive regulation of heterotypic cell-cell adhesion; Positive regulation of peptide hormone secretion; Positive regulation of protein secretion; Positive regulation of vasoconstriction; Protein polymerization; Protein secretion; Response to calcium ion; Signal transduction	Blood microparticle; Cell cortex; External side of plasma membrane; Extracellular exosome; Fibrinogen complex; Platelet alpha granule
Fibrinogen gamma-B chain OS=Bos taurus GN=FGG PE=1 SV=1	FIBG_BOVIN	19	36	56,53	--		Platelet activation; Protein polymerization; Signal transduction	Fibrinogen complex
Heat shock 27kDa protein 1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=2 SV=1	E9RHW1_BOVIN	8	16	59,70	--		--	--
Heat shock 27kDa protein 1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=2 SV=1	Q58DP7_BOVIN	4	13	35,48	--		--	--
Heat shock protein beta-1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=1 SV=1	G3X7S2_BOVIN	4	13	35,71	--		--	--
Heat shock protein beta-1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=1 SV=2	E1BEL7_BOVIN	7	17	55,67		Poly(A) RNA binding; Protein kinase C inhibitor activity	Intracellular signal transduction; Negative regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway; Platelet aggregation; Positive regulation of angiogenesis; Positive regulation of blood vessel endothelial cell migration; Positive regulation of endothelial cell chemotaxis by VEGF-activated vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway; Positive regulation of interleukin-1 beta production; Positive regulation of tumor necrosis factor biosynthetic process; Regulation of I-kappab kinase/NF-kappab signaling; Response to virus; Retina homeostasis	Extracellular exosome; Extracellular space; Focal adhesion; Nucleus; Plasma membrane

Continua Tabela 9

Heat shock protein beta-1 OS=Bos taurus GN=HSPB1 PE=2 SV=1	HSPB1_BOVIN	8	16	59,70	--	--		Cytoplasm; Nucleus; Spindle
Hemopexin OS=Bos taurus GN=HPX PE=2 SV=1	HEMO_BOVIN	18	35	49,89	Heme transporter activity; Metal ion binding		Cellular iron ion homeostasis; Heme metabolic process; Hemoglobin metabolic process; Positive regulation of humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin; Positive regulation of immunoglobulin production; Positive regulation of interferon-gamma-mediated signaling pathway; Positive regulation of tyrosine phosphorylation of stat1 protein	Blood microparticlesource; Extracellular exosome
Histidine-rich GLYCOPROTEIN=FACTOR XIIIa substrate (Fragments) OS=Bos taurus PE=1 SV=1	Q9TS85_BOVIN	5	18	37,38	--	--		--
IGK protein OS=Bos taurus GN=IGK PE=2 SV=1	B0JYP6_BOVIN	7	12	36,67	--	--		--
IGK protein OS=Bos taurus GN=IGK PE=2 SV=1	Q05B55_BOVIN	7	13	36,67	--	--		--
IGL@ protein OS=Bos taurus GN=IGL@ PE=1 SV=1	Q3T101_BOVIN	10	12	51,91	--	--		--
Immunoglobulin light chain_ lambda gene cluster OS=Bos taurus GN=IGL@ PE=2 SV=1	Q1RMN8_BOVIN	9	13	45,30	--	--		--
Kininogen-1 OS=Bos taurus GN=KNG1 PE=1 SV=2	F1MNV5_BOVIN	14	35	37,61	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity	--		--
Pigment epithelium-derived factor OS=Bos taurus GN=SERPINF1 PE=1 SV=1	PEDF_BOVIN	11	30	39,90	Serine-type endopeptidase inhibitor activity		Negative regulation of angiogenesis; Negative regulation of endopeptidase activity; Negative regulation of epithelial cell proliferation involved in prostate gland development; Positive regulation of neurogenesis	Extracellular exosome; Extracellular matrix; Extracellular region; Extracellular space; Melanosome
Putative uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=2 SV=1 (*)	A5PK72_BOVIN	8	12	39,41	--	--		--
Serotransferrin OS=Bos taurus GN=TF PE=1 SV=1	G3X6N3_BOVIN	53	75	68,04	Ferric iron binding; Ferric iron transmembrane transporter activity; Ferrous iron binding		Cellular iron ion homeostasis; Cellular response to iron ion; Ferrous iron import into cell; Positive regulation of receptor-mediated endocytosis; Retina homeostasis	Apical plasma membrane; Basal plasma membrane; Blood microparticle; Coated pit; Early endosome; Endocytic vesicle; Extracellular exosome; Extrinsic component of external side of plasma membrane; Hfe-transferrin receptor complex; Late endosome; Perinuclear region of cytoplasm; Recycling endosome

Continua Tabela 9

Serotransferrin OS=Bos taurus GN=TF PE=2 SV=1	TRFE_BOVIN	51	76	66,90	Ferric iron binding; Ferric iron transmembrane transporter activity	Cellular iron ion homeostasis	Cellsource; Extracellular space
Serpin A3-1 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-1 PE=1 SV=3	SPA31_BOVIN	21	28	55,96	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity; Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasm; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-2 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-2 PE=3 SV=1	SPA32_BOVIN	19	28	44,77	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-3 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-3 PE=1 SV=2	SPA33_BOVIN	22	28	53,04	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-4 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-4 PE=3 SV=1	SPA34_BOVIN	22	29	53,04	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-5 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-5 PE=3 SV=1	SPA35_BOVIN	24	28	66,67	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-6 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-6 PE=3 SV=1	SPA36_BOVIN	18	26	45,17	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-6 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-6 PE=3 SV=1	G3N1U4_BOVIN	20	27	56,20	Immunoglobulin receptor binding		Extracellular space
Serpin A3-7 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-7 PE=1 SV=1	A0A0A0MP92_B OVIN	16	29	40,53	--	--	Extracellular space
Serpin A3-8 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-8 PE=2 SV=1	SPA38_BOVIN	16	34	42,11	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Chromaffin granule; Subcell; Cytoplasmic vesicle; Extracellular space
Serpin A3-8 OS=Bos taurus GN=SERPINA3-8 PE=3 SV=1	A0A0A0MP89_B OVIN	16	34	42,11	--	--	Extracellular space
SERPIND1 protein OS=Bos taurus GN=SERPIND1 PE=2 SV=1	A6QPP2_BOVIN	16	35	47,58	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular exosome; Extracellular space

Continua Tabela 9

Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4	ALBU_BOVIN	40	59	65,40	DNA binding; Drug binding; Fatty acid binding; Metal ion binding; Pyridoxal phosphate binding; Toxic substance binding	Cellular response to starvation; Hemolysis by symbiont of host erythrocytes; Maintenance of mitochondrion location; Negative regulation of apoptotic process	Extracellular region; Extracellular space; Protein complex
Tubulin alpha-1B chain OS=Bos taurus PE=1 SV=2	TBA1B_BOVIN	13	34	50,78	Double-stranded RNA binding; Gtpase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Cellular response to interleukin-4; Microtubule cytoskeleton organization	Cytoplasmic microtubule; Extracellular exosome; Myelin sheath
Tubulin alpha-1C chain OS=Bos taurus GN=TUBA1C PE=1 SV=1	TBA1C_BOVIN	12	34	48,11	Gtpase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoplasm; Microtubule
Tubulin alpha-1D chain OS=Bos taurus GN=TUBA1D PE=1 SV=1	TBA1D_BOVIN	11	34	45,80	Gtpase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoplasm; Microtubule
Tubulin alpha-4A chain OS=Bos taurus GN=TUBA4A PE=1 SV=2	TBA4A_BOVIN	9	34	38,84	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoplasm; Extracellular exosome; Microtubule
Tubulin beta-4B chain OS=Bos taurus GN=TUBB4B PE=2 SV=1	TBB4B_BOVIN	10	30	37,30	Double-stranded RNA binding; Gtpase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoplasm; Extracellular exosome; Microtubule; Myelin sheath; Nucleus
Tubulin beta-6 chain (Fragment) OS=Bos taurus GN=TUBB6 PE=3 SV=1		7	25	41,81	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Extracellular exosome; Microtubule; Nucleus
Tubulin beta-6 chain OS=Bos taurus GN=TUBB6 PE=2 SV=1	TBB6_BOVIN	9	30	41,70	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoplasm; Microtubule
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Bos taurus PE=1 SV=1 (**)	G3N0V0_BOVIN	18	25	67,18	Antigen binding; Immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway; Complement activation, classical pathway; Defense response to bacterium ; Innate immune response; Phagocytosis, engulfment; Phagocytosis, recognition; Positive regulation of B cell activation	Blood microparticle; External side of plasma membrane; Immunoglobulin complex, circulating
Uncharacterized protein (Fragment) OS=Bos taurus PE=1 SV=1 (**)	G3N0V0_BOVIN	8	25	56,44	Antigen binding	B cell receptor signaling pathway; Complement activation, classical pathway; Defense response to bacterium; Innate immune response; Phagocytosis, engulfment; Phagocytosis, recognition; Positive regulation of b cell activation	Blood microparticle; External side of plasma membrane; Immunoglobulin complex, circulating

Continua Tabela 9

Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=IGLL1 PE=1 SV=2 (**)	F1MLW7_BOVIN N	8	11	39,74	--	--	--
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=IGLL1 PE=1 SV=2 (**)	F1MCF8_BOVIN	9	10	39,74	--	Immune response; Immunoglobulin production Source	Extracellular space
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=LOC100141266 PE=3 SV=1 (**)	F1MNF8_BOVIN	10	34	44,77	GTPase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoplasm; Microtubule
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=SERPINA3 PE=3 SV=1 (**)	G8JKW7_BOVIN	27	29	67,72	--	Platelet activation; Protein polymerization; Signal transduction	Fibrinogen complex
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=SERPINA3 PE=3 SV=1 (**)	G8JKW7_BOVIN	6	29	40,78	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular space
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=TUBA1A PE=3 SV=1 (**)	F2Z4C1_BOVIN	12	34	47,89	Gtpase activity; GTP binding; Structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process	Cytoplasmic microtubule; Cytoplasmic ribonucleoprotein granule; Extracellular exosome; Myelin sheath; Nucleus; Recycling endosome
Uncharacterized protein OS=Bos taurus GN=VTN PE=2 SV=1 (**)	Q3ZBS7_BOVIN	11	27	45,80	Extracellular matrix binding; Polysaccharide binding; Scavenger receptor activity	Cell adhesion mediated by integrin; Endodermal cell differentiation; Extracellular matrix organization; Immune response; Negative regulation of endopeptidase activity; Oligodendrocyte differentiation; Positive regulation of cell-substrate adhesion; Positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation; Positive regulation of protein binding; Positive regulation of receptor-mediated endocytosis; Positive regulation of smooth muscle cell migration; Smooth muscle cell-matrix adhesion	Blood microparticle; Extracellular exosome; Proteinaceous extracellular matrix
Uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=1 SV=2 (**)	F1MZ96_BOVIN	7	13	36,67	--	--	B cell differentiation
Uncharacterized protein OS=Bos taurus PE=1 SV=2 (**)	F1MH40_BOVIN	7	13	36,67	--	Immune response; Immunoglobulin production	Extracellular space

(*) Putative uncharacterized protein: means that this protein may be identified by computer, and the function is still unknown. This protein is not homologous to any well characterised proteins and thus its function cannot be predicted. Putative means that it was only predicted based on ORF (open reading frame) and promoter sequence.

(**) Uncharacterized protein: Proteins which are NOT conserved or with no known or predicted function or characteristics (<http://www.uniprot.org/docs/nameprot>)

4. Referências

- Aleporou-Marinou V, Pappa H, Yalouris P, Patargias T. Purification of apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I)-like protein from human follicular fluid. *Comp Biochem Phys B* 2001;128:537-42
- Anahory T, Dechaud H, Bennes R, Marin P, Lamb N J, Laoudj D. Identification of new proteins in follicular fluid of mature human follicles. *Electrophoresis* 2002;23(7-8):1197-202.
- Angelucci S, Ciavardelli D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, Giampietro F, Palumbo P, Di Ilio C. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim Biophys Acta* 2006;1764:1775-85.
- Bandyopadhyay D, Prakash S, Gupta K, Balaram P. Mass spectrometric analysis of dimer-disrupting mutations in Plasmodium triosephosphate isomerase. *Anal Biochem* 2016;500:45-50.
- Benifla JL, Sifer C, Bringuier AF, Blanc-Layrac G, Camus E, Madelenat P, & Feldmann G. Induced apoptosis and expression of related proteins in granulosa cells from women undergoing IVF: a preliminary study. *Hum Reprod* 2002;17(4):916-20.
- Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. Preparation for protein isolation. *Protein Methods* 2th ed New York: Wiley-Liss 1996.
- Cao M, Buratini J, Lussier JG, Carrière P, & Price CA. Expression of protease nexin-1 and plasminogen activators during follicular growth and the periovulatory period in cattle. *Reproduction* 2006;131(1):125-137.
- Chan Ying Kai. Interplay of Dengue Virus and the Human Immune Response. Diss. 2015.
- Chao HT, Ng HT, Kao SH, Wei YH, & Hong CY. Human follicular fluid stimulates the motility of washed human sperm. *Arch Androl* 1991;26(2):61-65.
- Choi YS, Cho S, Seo SK, Park JH, Kim SH, & Lee BS. Alteration in the intrafollicular thiol-redox system in infertile women with endometriosis. *Reproduction* 2015;26(2):61-65.
- Darwin C. A origem das espécies, 6th ed. Editora Escala 2009;1:28-36.
- Downs SM, Coleman DL, Ward-Bailey P F, & Eppig J J. Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(2):454-58.
- Driancourt MA, Tatcher WW, Terqui M, Andrieu D. Dynamics of ovarian follicular

- development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Domest Anim Endocrinol* 199(8):209–21.
- Ducolomb Y, González-Márquez H, Fierro R, Jiménez I, Casas E, Flores D, Bonilla E, Salazar Z, Betancourt M. Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on in vitro fertilization. *Theriogenology* 2013;79:836-904.
- Eikermann E, Frank KU, Schindler L, Niemann H. Repeated ultrasound-guided follicular aspiration in pregnant heifers and cows. *Theriogenology* 2000;53:351.
- Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994;50:225-32.
- Gasperin BG, Ferreira R, Rovani MT, Santos JT, Buratini J, Price CA, Gonçalves PBD. FGF10 inhibits dominant follicle growth and estradiol secretion in vivo in cattle. *Reproduction*. 2012;143:815-23.
- Ginther OF, Santos VG, Mira RA, Beg MA. Progesterone concentration when the future ovulatory follicle and corpus luteum are located in ipsilateral or contralateral ovaries in heifers. *Theriogenology* 2013;79(3):534-40.
- Ginther OJ, Siddiquia MAR, Baaldrighia JM, Wolf CA. Systemic effect of follicle-stimulating hormone and intraovarian effect of the corpus luteum on complete regression VS recovery of regressing wave-2 follicles in heifers. *Domest Anim Endocrin* 2016;55:51-9.
- Ginther OJ, Hoffman MM. Interactions of side (left and right ovary) with the number of follicles per ovary and with the intraovarian relationships between dominant follicle and corpus luteum in heifers. *Theriogenology* In Press, 2016.
- Gobbetti M, Stepaniak L, De Angelis M, Corsetti A, Di cagno R. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *CRC Cr Rev Food Sci* 2002;42:223-39.
- Grimes RW, Ireland JJ. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles concentration of steroid in follicular fluid, and maturation of oocytes in vitro. *Biol. Reprod* 1986;35:725-32.
- Hashimoto S, Minami N, Yamada M, & Imai H. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev* 2000;56(4):520-26.

- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey S, Stoles E, Trimmer SA. Production, freezing and transfer of bovine EVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 1995;43:141-52.
- Ippolito C, Colucci R, Segnani C, Errede M, Girolamo F, Virgintino D, & Campani D. Fibrotic and Vascular Remodelling of Colonic Wall in Patients with Active Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis* 2016; 19 mar. p. jjw076.
- Ireland JJ, Mihm M, Austin E, Dikin MG, Roche JF. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle, key concepts, studies, advancements, and terms. *J Sci* 2000;83:1964-1658.
- Ireland JJ, Roche JE. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology* 1983;112:150-6.
- Iwase A, Kobayashi H, Goto M, Nakahara T, Nakamura T, Kondo M. A proteomic analysis of human follicular fluid: comparison between younger and older women with normal FSH levels. *Int J Mol Sci* 2014;15(10):17518-40.
- Iwata H, Inoue J, Kimura K, Kuge T, Kuwayama T, Monji Y. Comparison between the characteristics of follicular fluid and the developmental competence of bovine oocytes. *Anim Reprod Sci* 2006;91:215-23.
- Jolly, Caroline, and Richard I. Morimoto. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 2000;92. (19):1564-72.
- Khan GH, Galazis N, Docheva N, Layfield R, & Atiomo W. Overlap of proteomics biomarkers between women with pre-eclampsia and PCOS: a systematic review and biomarker database integration. *Hum Reprod* 2014;30(1):133-48.
- Kim YS, Kim MS, Lee SH, Choi BC, Lim JM, Cha KY. Proteomic analysis of recurrent spontaneous abortion: identification of an inadequately expressed set of proteins in human follicular fluid. *Proteomics* 2006;6:3445-54.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970;227:680-5.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 1994;41:67-72.
- Luo S, Wehr NB, Levine RL. Quantitation of protein on gels and blots by infrared

- fluorescence of Coomassie blue and Fast Green. *Anal Biochem* 2006;350:233–238.
- Maniwa J, Izumi S, Isobe N, & Terada T. Studies on substantially increased proteins in follicular fluid of bovine ovarian follicular cysts using 2-D PAGE and MALDI-TOF MS. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3(1):1.
- McDonald LE, McNutt SH, Nichols RE. The essentiality of the bovine corpus luteum of pregnancy. *Am J Vet Res* 1953;14:539-41.
- Minin AA, and Ozerova SG. Fish ovarian fluid contains protease inhibitors. *Russian J Dev Biol* 2015;46(1):33-7.
- Minnich M, Tagoh H, Bönelt P, Axelsson, Fischer M, Cebolla, & Busslinger M. Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat Immunol* 2016.
- Moens PB, Kolas NK, Tarsounas M, Marcon E, Cohen PE, & Spyropoulos B. The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci* 2002;115(8):1611-22.
- Montrezor LH, Piccinato CA, Collares CVA, Vireque AA, & e Silva AR. Effects of angiotensin II, atrial natriuretic peptide and endothelin-1 on proliferation and steroidogenic output of bovine granulosa cells cultured in a chemically defined system. *Anim Reprod Sci* 2015;152:8-16.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, & Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988;9(6):255-62.
- Luo S, Wehr NB, Levine RL. Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie blue and Fast Green. *Anal Biochem* 2006;350(2):233-8.
- O'Bryan MK, Foulds LM, Cannon JF, Winnall WR, Muir JA. Identification of a novel apolipoprotein, ApoN, in ovarian follicular fluid. *Endocrinology* 2004;145(11):5231-42.
- Pan Y, Cui Y, Baloch AR, Fan J, He J, Zhang Y. Association of heat shock protein 90 with the developmental competence of immature oocytes following Cryotop and solid surface vitrification in yaks (*Bos grunniens*). *Cryobiology* 2015;71(1):33-9.
- Portela VM, Castilho AC, Bertolin K, Buratini J, & Price CA. Localization of angiotensin receptor type 2 in fetal bovine ovaries. *Anim Reprod Sci* 2016;168:34-9.

- Regenass-Lechner F, Staack RF, Mary J L, Richter W F, Winter M, Jordan G. Immunogenicity, inflammation and lipid accumulation in cynomolgus monkeys infused with a lipidated Tetranectin-ApoA-I fusion protein. *Toxicol Sci* 2016; kfw004.
- Rexroad CE, Casida LE. Ovarian follicular development in cows, sows and ewes in different stages of pregnancy as affected by number of corpora lutea in the same ovary. *J Scie* 1975;41:1090–97.
- Weller Ribeiro R, Santos G, Aneliza F, Castilho C, Giometti J, Machado Guaberto L & Cristina Giometti I. Perfil Proteico do líquido folicular coletado de ovários em diferentes fases do ciclo estral de bovinos. *Colloquium Agrariae* 2012;8(2).
- Saito A. Heparin cofactor II is degraded by heparan sulfate and dextran sulfate. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;457(4):585-8.
- Serrano H, Canchola E, García-Suárez MD. Sperm-attracting activity in follicular fluid associated to an 8.6-kDa protein. *Biochem Biophys. Res Commun* 2001; 283(4):782-4.
- Siqueira LC, dos Santos JT, Ferreira R, dos Santos RS, dos Reis AM, Oliveira JF & Gonçalves PB. Preovulatory changes in the angiotensin II system in bovine follicles. *Reprod Fertil Dev* 2013;25(3):539-46.
- Tirloni L, Kim TK, Coutinho ML, Ali A, Seixas A, Termignoni C, & da Silva Vaz I. The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. *Insect Biochem Molec Biol* 2016;71:12-28.
- Twigt JM, Bezstarosti K, Demmers J, Lindemans J, Laven J S, & Steegers-Theunissen RP. Preconception folic acid use influences the follicle fluid proteome. *Eur J Clin Invest* 2015;45(8):833-41.
- Wu YT, Wu Y, Zhang JY, Hou NN, Liu AX, Pan JX, & Huang HF. Preliminary proteomic analysis on the alterations in follicular fluid proteins from women undergoing natural cycles or controlled ovarian hyperstimulation. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(3):417-27.
- Yoon Se-Jin, Kyung-Hee Choi, and Kyung-Ah Lee. Nitric oxide-mediated inhibition of follicular apoptosis is associated with HSP70 Induction and Bax suppression. *Mol Reprod Dev* 2002;61(4):504-10.
- Zulu VC, Sawamukai Y, Nakada K, Kida K, & Moriyoshi M. (2002). Relationship among insulin-like growth factor-I, blood metabolites and postpartum ovarian

function in dairy cows. *J Vet Med Sci* 2002;64(10):879-85.

Zylicz Maciej, Frank W King, and Alicja Wawrzynow. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *Embo J* 2001;20(17):4634-38.