

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 06/10/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DE FATORES ENVOLVIDOS NA FOLICULOGÊNESE DE
BÚFALAS COM A UTILIZAÇÃO DE PRIMERS DELINEADOS PARA
BOVINOS**

EDJALMA RODRIGUES DA SILVA-JUNIOR

BOTUCATU-SP
Outubro/2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA VETERINÁRIA E REPRODUÇÃO ANIMAL

**AVALIAÇÃO DE FATORES ENVOLVIDOS NA
FOLICULOGÊNESE DE BÚFALAS COM A UTILIZAÇÃO
DE PRIMERS DELINEADOS PARA BOVINOS**

EDJALMA RODRIGUES DA SILVA-JUNIOR

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu-SP, para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dra. Eunice Oba

BOTUCATU-SP

Outubro/2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva-Junior, Edjalma Rodrigues da.

Avaliação de fatores envolvidos na foliculogênese de búfalas com a utilização de primers delineados para bovinos / Edjalma Rodrigues da Silva-Junior. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Substancias de crescimento. 2. Fator de crescimento epidérmico. 3. Fator 2 de crescimento de fibroblastos. 4. Ovário. 5. Bovino.

Palavras-chave: EGF; FGF2; FSHR; IGF; Ovário.

Nome do autor: Edjalma Rodrigues da Silva-Junior

Título: AVALIAÇÃO DE FATORES ENVOLVIDOS NA FOLICULOGÊNESE DE BÚFALAS COM A UTILIZAÇÃO DE PRIMER DELINEADOS PARA BOVINOS

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Eunice Oba

Presidente e orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal – FMVZ, UNESP
Botucatu-SP

Prof.^a. Dra. Maria Denise Lopes

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal – FMVZ, UNESP
Botucatu-SP

Prof.^a. Dra. Maria Inês Lenz Souza

Membro

Instituto de Biociências / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS,
Campo Grande-MS

Prof.^a. Dra. Paula Fernanda de Lima

Membro

Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva – FAIT, Itapeva-SP

Prof.^a. Dra. Priscilla do Nascimento Guasti

Membro

Sociedade Cultural e Educacional de Garça – Faculdade de Ensino Superior e
Formação Integral – FAEF, Garça-SP

Data da Defesa: 06 de Outubro de 2021.

Tutto è bene quel che finisce bene

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, que esteve presente em todos os momentos de nossas vidas, que proporcionou mais uma vitória e nos manteve seguros nessa grande aventura, chamada vida. Que nos apoia, suporta e fortalece nos momentos mais conturbados... Sem ELE, nada disso seria possível...

Inegavelmente, o trabalho do pós-graduando não é somente submeter-se a aventura da pesquisa, ensino e extensão universitária. Essa é a fração do trabalho mais fácil a ser executada dentro da nossa responsabilidade.

Desapegar-se do seu programa de pós-graduação, sem dúvida será a tarefa mais árdua que nos é determinada. Nos últimos anos, fomos pisoteados e aniquilados por todos os lados, tanto pelas instituições de fomento à pesquisa, quanto pelo próprios líderes do nosso país. Mesmo assim... O programa de pós-graduação permanece firme, porém... até quando?

Seria injusto de minha parte não agradecer a todos que fizeram e fazem o dia a dia mais feliz dentro da Universidade. Sim, “Universidade” no geral, pois são muitas em nosso país que ainda sucumbem ao amargor dos poucos recursos, falta de valorização e créditos aos docentes...

Logo, meu primeiro agradecimento será aos docentes que fizeram de mim o professor e futuro pesquisador que serei. Em especial, agradeço aos docentes de minha egressa escola, a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), a qual me abriu os horizontes na pesquisa científica, apadrinhado pelos professores:

Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari – minha eterna orientadora da iniciação científica, amiga e motivadora das principais aventuras científicas que vivi e viverei;

Maria Inês Lenz Souza – exemplo de professora e pessoa a qual proporcionou o primeiro contato com a Reprodução Animal no ano de 2009;

Juliana Arena Galhardo – com seu jeito peculiar de ensinar, proporcionou momentos inegáveis de aprendizado e empatia com os alunos e orientados;

Breno Fernandes Barreto Sampaio – companheiro de ensinamentos e amigo, o qual proporcionou o conhecimento além da Reprodução Animal e terapia complementar Chinesa.

Daniela Brandão Nunes – a quem me ensinou grande parte do conhecimento a campo, e que desafiou meus conhecimentos sobre a

reprodução animal, sendo enorme incentivadora e hoje amiga presente nas horas boas e ruins.

Aos demais professores da UFMS, que por motivo de esquecimento, não foram citados, mas que carrego um pedacinho dos senhores, do lado esquerdo do peito. Agradeço-lhes.

Não obstante e no patamar acima, os familiares que representaram toda a articulação da personalidade, modulação do caráter e me fizeram ser peculiar a minha maneira. Aos meus pais, Edjalma Silva e Shirley Ibrahim que, com pulso firme, disciplina e horas de estudos me incentivaram e desafiaram nessa empreitada do ensino. À minha irmã, Julie Gabrielle, que optou pela Medicina Veterinária antes de mim mostrando o quão bonita e rentável a carreira pode se tornar. Agradeço-lhes.

Em especial, a amiga, companheira inseparável Suzane Brochine, que nos momentos conturbados de pandemia, foi o meu porto seguro e motivadora para o delineamento experimental, execução e escrita... sendo a minha inspiração diária. Agradeço-lhe.

Aos animais, que são a razão do estudar do Médico Veterinário, com sua benevolência, paciência e pureza de viver. Em especial aos meus pets...

Profissionalmente, não posso negar que fui recebido de braços abertos, por uma das instituições que mais contribuíram para o meu crescimento. A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, minha segunda casa... Que me fez crescer, pesquisar, amadurecer no pensamento crítico, filosófico, matemático e experimental. Orgulho-me de poder ter feito parte de 1% da sua história... acredito que depois de quase oito anos... posso ter a ousadia de chamar de “casa”.

Com esse mesmo pensamento, agradeço aos meus orientadores na pós-graduação Prof. Frederico Ozanam Papa (residência e mestrado) e Profa. Eunice Oba (doutorado), que tiveram paciência durante meu ensino, mesmo com esse “jeito peculiar”. Agradeço-lhes.

Não poderia deixar de citar a “velha guarda” do Dpto. De Reprodução Animal e hoje professores do ensino superior: Gabriel Augusto Monteiro, Yamê Fabres Robaina Sancler Silva, Priscilla do Nascimento Guasti, Camila de Paula Freitas Dell’Aqua e José Antônio Dell’Aqua Jr, os quais foram minha referência

desde 2013, exemplos a serem seguidos e, que aos poucos foram tornando-se amigos na querida cidade botucatuense.

Aos amigos, também unespianos, que fizeram-se presentes durante a pós-graduação: Thaisy Dellaqua, Ludmilla Zoccal, Lucas Monteiro, Stella Tironi, Beatriz Lippe, Alessandra Gomes, Andreza e tantos outros que passaram e fizeram parte da história dessa nossa pequena vida acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Estudos. Ao programa de Pós-Graduação de Biotecnologia Animal e todos seus funcionários que sempre foram muito solícitos em todos os atendimentos. Agradeço-lhes.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

Se, por ventura, alguém for esquecido... peço-lhe desculpas e sinta-se agradecido.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Ovários	16
2.2. Foliculogênese durante a embriogênese	17
2.2.1. Folículos primordiais e primários	20
2.2.2. Folículos secundários	21
2.3. Foliculogênese durante a puberdade	22
2.4. Fatores de crescimento no parênquima ovariano	24
2.6. Foliculogênese e apoptose ovariana	29
2.7. Utilização de PCR na avaliação da foliculogênese	30
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
5. HIPÓTESES	41
6. OBJETIVOS	41
CAPÍTULO 2	42

RESUMO

SILVA-JUNIOR, E.R. **AVALIAÇÃO DE FATORES ENVOLVIDOS NA FOLICULOGÊNESE DE BÚFALAS COM A UTILIZAÇÃO DE PRIMERS DELINEADOS PARA BOVINOS.** Botucatu-SP. 2021, p.47-. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

O conhecimento da fisiologia ovariana é importante durante a aplicação de biotécnicas assistidas de reprodução, tanto animal quanto humana. Durante a foliculogênese, os folículos apresentam aumento em número e diferenciação morfológica das células que circundam o oócito e, com a progressão do desenvolvimento, se tornam unidades funcionais no parênquima ovariano. Esses folículos podem ser considerados como *pool* de reserva e, na dependência do estímulo, podem permanecer quiescentes, sofrerem atresia ou chegar até a ovulação. Durante esse desenvolvimento, podemos ter a presença de fatores de crescimento produzidos no parênquima ovariano, que são modulados pela presença dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Além disso, o FSH e o LH também apresentam ação direta durante todo o curso da foliculogênese. Dentre os fatores de crescimento mais comuns, podemos citar o fibroblástico (FGF), insulínico (IGF), epidermal (EGF) e seus respectivos receptores que atuam na diferenciação e progressão do desenvolvimento folicular, desde as fases iniciais até a ovulação. Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram revisar a regulação parácrina dos fatores de crescimento durante a foliculogênese, atresia folicular, descrever e quantificar a expressão gênica desses fatores (FGF2, IGF1 e EGF), seus receptores (FSHR, FGFR2C e FGFR3C) e agentes envolvidos na apoptose (CASP3) presentes no ovário de búfalas vazias e gestantes. Em abatedouros, coletaram-se ovários de búfalas vazias (n=12) e gestantes (n=12), que se encontravam no terço final da gestação. Para a padronização das amostras, todas as búfalas vazias se encontravam cíclicas, com a presença de folículos em desenvolvimento e corpo lúteo evidente no parênquima. As amostras foram encaminhadas ao laboratório em tempo máximo de uma hora após a coleta. Todos os ovários foram dissecados, os folículos antrais aspirados e as amostras de tecido ovariano coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) para posterior análise. No laboratório, foram utilizados *primers* delineados para bovinos na utilização do RT-qPCR na quantificação gênica das amostras. Após a padronização técnica, normalização das amostras e transformações dos valores em bases logarítmicas foi realizado a quantificação por RT-qPCR das amostras dos ovários de búfalas. Foram consideradas com diferença estatística, as amostras que apresentaram significância em 5% no pós-teste de Wilcoxon. Todos os *primers* foram expressos no RT-qPCR, entretanto, apenas o FSHR apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais. O FSH atua na estimulação e regulação dos fatores parácrinos na regulação da foliculogênese, uma vez que houve variação da expressão de seu receptor (FSHR) entre os grupos experimentais. No grupo experimental de búfalas vazias, houve oscilação na expressão do FSHR decorrente das diferentes fases do ciclo estral que as fêmeas se encontravam, pois a modulação da secreção de esteroides pode afetar o desenvolvimento e progressão do desenvolvimento folicular. A presença do receptor FSHR no parênquima ovariano é um dos pontos iniciais para o início da foliculogênese e progressão do seu desenvolvimento, através da modulação

de outros fatores de crescimento. Já nas búfalas gestantes, não houve essa variação, decorrente da atuação hormonal da progesterona. Sendo assim, conclui-se que houve expressão gênica dos fatores de crescimento testados estão presentes no tecido ovariano e são responsáveis pela modulação e progressão da foliculogênese em búfalas gestantes e vazias. Não foi possível visualizar a diferença na expressão do fator apoptótico pesquisado (CASP3) entre os grupos experimentais e, em adição, é viável a utilização de primers desenhados para bovinos na pesquisa de fatores de crescimento em ovário de búfalas.

Palavras-chave: EGF, FGF2, FSHR, IGF, ovário, PCR

ABSTRACT

SILVA-JUNIOR, E.R. EVALUATION OF FACTORS INVOLVED IN THE FOLLICULOGENESIS OF BUFFALOES USING PRIMERS DESIGNED FOR CATTLE. Botucatu-SP. 2021, p.47. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Knowledge of ovarian physiology is important when applying assisted reproductive biotechniques, both animal and human. During folliculogenesis, the follicles show an increase in number and morphological differentiation of the cells that surround the oocyte and, with the progression of development, they become functional units in the ovarian parenchyma. These follicles can be considered as a reserve pool and, depending on the stimulus, can remain quiescent, suffer atresia or reach ovulation. During this development, we may have the presence of growth factors produced in the ovarian parenchyma, which are modulated by the presence of follicle-stimulating (FSH) and luteinizing (LH) hormones. Furthermore, FSH and LH also have a direct action throughout the course of folliculogenesis. Among the most common growth factors, we can mention fibroblastic (FGF), insulin (IGF), epidermal (EGF) and their respective receptors that act in the differentiation and progression of follicular development, from the initial stages to ovulation. Therefore, the objectives of this study were to review the paracrine regulation of growth factors during folliculogenesis, follicular atresia, describe and quantify the gene expression of these factors (FGF2, IGF1 and EGF), their receptors (FSHR, FGFR2C and FGFR3C) and agents involved in apoptosis (CASP3) present in the ovary of empty and pregnant buffaloes. In abattoirs, ovaries from empty buffaloes (n=12) and pregnant women (n=12), which were in the final third of gestation, were collected. For sample standardization, all empty buffaloes were cyclic, with the presence of developing follicles and corpus luteum evident in the parenchyma. The samples were sent to the laboratory within a maximum of one hour after collection. All ovaries were dissected, antral follicles aspirated and ovarian tissue samples collected and stored in liquid nitrogen (-196°C) for further analysis. In the laboratory, primers designed for cattle were used in the use of RT-qPCR for gene quantification of the samples. After technical standardization, normalization of samples and transformation of values into logarithmic bases, quantification by RT-qPCR of samples from buffalo ovaries was performed. The samples that presented significance in 5% in the Wilcoxon post-test were considered with statistical difference. All primers were expressed in RT-qPCR, however, only FSHR showed a significant difference between experimental groups. FSH acts in the stimulation and regulation of paracrine factors in the regulation of folliculogenesis, since there was variation in its receptor (FSHR) expression between the experimental groups. In the experimental group of empty buffaloes, there was an oscillation in the expression of the FSHR due to the different phases of the estrous cycle that the females were in, as the modulation of steroid secretion can affect the development and progression of follicular development. The presence of the FSHR receptor in the ovarian parenchyma is one of the starting points for the beginning of folliculogenesis and progression of its development, through the modulation of other growth factors. In pregnant buffaloes, however, there was no such variation, due to the hormonal action of progesterone. Thus, it is concluded that there was gene expression of the growth factors tested are present in ovarian

tissue and are responsible for the modulation and progression of folliculogenesis in pregnant and empty buffaloes. It was not possible to visualize the difference in the expression of the investigated apoptotic factor (CASP3) between the experimental groups and, in addition, it is feasible to use primers designed for cattle in the research of growth factors in buffalo ovary.

Key-words: EGF, FGF2, FSHR, IGF, ovary, PCR

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A bubalinocultura vem apresentando destaque comercial no aumento da produção e número absoluto de animais, podendo ser explorada a produção de carne e leite. Entretanto, as biotecnologias reprodutivas aplicadas a essa espécie, ainda não estão bem fundamentadas e, muitas vezes, são aplicadas técnicas utilizadas em bovinos, sem conhecimento prévio das particularidades de sua fisiologia.

Dentre essas peculiaridades reprodutivas da búfala, podemos citar o menor tamanho dos ovários, baixa reserva gonadal, e variação entre os ciclos estrais em relações às fêmeas bovinas. Tais características fisiológicas podem ser responsáveis pelos baixos índices reprodutivos inerentes à espécie (1). Ainda como adição a essas peculiaridades, as búfalas apresentam a influência da estacionalidade reprodutiva, marcada pelos ciclos estrais regulares nos períodos de menor luminosidade ao longo do ano, mais evidentes em regiões que se afastam da linha do equador (2,3).

Já nas fêmeas bovinas submetidas a aspiração folicular, seguida pela maturação oocitária, fertilização *in vitro* e a transferência de embrião, são biotecnologias que estão consolidadas e possuem índices reprodutivos satisfatórios. Entretanto, para a espécie bubalina, há alterações anatômicas e fisiológicas que tornam a técnica mais laboriosa, diminuindo a obtenção de óocitos recuperados pela aspiração folicular, quando comparado aos bovinos (4).

Uma alternativa para a obtenção de um maior número de oócitos para a produção *in vitro* de embriões bubalinos é o isolamento e cultivo de folículos pré-antrais. Essa biotécnica permite que sejam obtidos oócitos proveniente de abatedouros e seu cultivo até a fertilização, aumentando o potencial comercial da técnica de transferência de embriões em búfalas.

Além disso, os folículos pré-antrais constituem o *pool* de reserva das fêmeas mamíferas, que podem se desenvolver até folículo ovulatório, ou sofrer atresia, na dependência do tipo de estímulo recebido. Ainda hoje, as pesquisas são realizadas com o objetivo de esclarecer o funcionamento e os mecanismos de controle da regulação da fisiologia ovariana. Dentre estes fatores que atuam no ovário, a expressão de receptores e fatores de crescimento, influenciam na

ativação, manutenção e seleção dos folículos pré-antrais durante as ondas de recrutamento e seleção.

Sendo assim, a compreensão dos fatores envolvidos na fisiologia ovariana podem esclarecer os eventos que ocorrem no início da foliculogênese nas fêmeas, auxiliando no momento da aplicação de biotécnicas de reprodução assistida, não só em animais domésticos de interesse reprodutivo, mas em animais ameaçados de extinção, na espécie humana buscando melhores meios de maturação, fertilização e cultivo de oócitos e embriões.

Entretanto, para melhorar a qualidade dos meios (5) utilizados em laboratórios de cultivo celular, a produção dos mesmos deve manter características semelhantes ao líquido folicular fisiológico. Com isso, os meios se tornariam mais próximos aos sintetizados pelos ovários e individualizados por espécie.

Dessa forma, a investigação de fatores de crescimento que atuam no parênquima ovariano através de metodologias de biologia molecular, metabolômica e proteômica, podem esclarecer as intimas relações moleculares no desenvolvimento folicular. Como ferramenta complementar, o desenvolvimento de sequências gênicas (também conhecido como *primer*) de fatores de crescimento que podem atuar no parênquima e folículo ovariano trazem informações sobre o funcionamento dessas relações. Assim, o delineamento e desenho de um *primer* pode influenciar na pesquisa de determinado fator de crescimento no tecido ou célula-alvo.

Dessa maneira, os objetivos dessa revisão são discorrer sobre os fatores de crescimento envolvidos no desenvolvimento de folículos pré-antrais e caracterizar a expressão gênica desses fatores envolvidos na dinâmica de crescimento folicular de ovários fetais, búfalas gestantes e não-gestantes.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atividade ovariana é multifatorial, sendo que os fatores de crescimento exercem uma importante atividade no parênquima ovariano, entretanto, são dependentes da estimulação do FSH e LH. Os protocolos para indução de maior quantidade de folículos (pré-antrais e antrais), ainda estão dependentes da quantidade das reservas gonadais adquiridas durante o desenvolvimento fetal. Sendo assim, a compreensão da fisiologia ovariana é um dos primeiros passos para o entendimento da foliculogênese, para a produção de meios de cultivo semelhantes ao líquido folicular e, conseqüentemente promover melhorias nos resultados das biotécnicas de reprodução assistida.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marin DFD, de Souza EB, de Brito VC, Nascimento CV, Ramos AS, Filho STR, et al. In vitro embryo production in buffaloes: From the laboratory to the farm. *Anim Reprod*. 2019;16(2):260–6.
2. Perera BMAO. Reproductive cycles of buffalo. *Anim Reprod Sci*. 2011 Apr 1;124(3–4):194–9.
3. D'Occhio MJ, Ghuman SS, Neglia G, della Valle G, Baruselli PS, Zicarelli L, et al. Exogenous and endogenous factors in seasonality of reproduction in buffalo: A review. *Theriogenology*. 2020 Jul 1;150:186–92.
4. Baruselli PS, Carvalho JGS de, Elliff FM, Silva JCB da, Chello D, Carvalho NAT de. Embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 2020 Jul 1;150:221–8.
5. Maksura H, Akon N, Islam MN, Akter I, Modak AK, Khatun A, et al. Effects of estradiol on in vitro maturation of buffalo and goat oocytes. *Reprod Med Biol*. 2021 Jan 1;20(1):62–70.
6. HAFEZ ESE, HAFEZ B. Reprodução Animal. In: 7th ed. Barueri: São Paulo; 2004. p. 13–29.
7. Silva-Santos KC, Santos GMG, Siloto LS, Hertel MF, Andrade ER, Rubin MIB, et al. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*. 2011;76(6):1051–7.
8. Lamothe S, Bernard V, Christin-Maitre S. Gonad differentiation toward ovary. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2020 Jun 1;81(2–3):83–8.
9. Senger PL. Senger, Pathways to Pregnancy and Parturition, 2nd Ed, 2003,

373p.pdf. 2005. p. 381.

10. Mondadori RG, Luque MCA, Santin TR, Báo SN. Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2007;97(3–4):323–33.
11. Kacinskis MÁ, Lucci CM, Luque MCA, Báo SN. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2005 Jun 1;87(1–2):45–57.
12. Basuino L, Silveira CF. Human follicular fluid and effects on reproduction. *J Bras Reprod Assist.* 2016;20(1):38–40.
13. Bersinger NA, Eisenhut M, Stute P, von Wolff M. Gonadotropin Stimulation Has Only a Limited Effect on the Concentration of Follicular Fluid Signalling Proteins: An Antibody Array Analysis. *Int J Reprod Med.* 2021;2021:1–7.
14. Mansour MM, Zeitoun MM, Hussein FM. Mastitis outcomes on pre-ovulatory follicle diameter, estradiol concentrations, subsequent luteal profiles and conception rate in Buffaloes. *Anim Reprod Sci.* 2017;181:159–66.
15. Ghuman SPS, Singh J, Honparkhe M, Dadarwal D, Dhaliwal GS, Jain AK. Induction of ovulation of ovulatory size non-ovulatory follicles and initiation of ovarian cyclicity in summer anoestrous buffalo heifers (*Bubalus bubalis*) Using melatonin implants. *Reprod Domest Anim.* 2010;45(4):600–7.
16. Neglia G, de Nicola D, Esposito L, Salzano A, D'Occhio MJ, Fatone G. Reproductive management in buffalo by artificial insemination. *Theriogenology.* 2020;150:166–72.
17. Rathore R, Sharma RK, Phulia SK, Mudgal V, Jerome A, Ghuman SPS, et al. Comparative efficacy of oestrus synchronization protocols in buffalo (*Bubalus bubalis*). Vol. 49, *Tropical Animal Health and Production.* 2017. p. 1377–82.
18. Karuppanasamy K, Sharma RK, Phulia SK, Jerome A, Kavya KM, Ghuman SPS, et al. Ovulatory and fertility response using modified Heatsynch and Ovsynch protocols in the anovular Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.* 2017;95:83–8.
19. Selokar naresh L, Sharma P, Saini M, Sheoran S, Rajendran R, Kumar D, et al. Successful cloning of a superior buffalo bull. *Sci Rep.* 2019;9(1).
20. Saini M, Selokar NL, Palta P, Chauhan MS, Manik RS, Singla SK. An update: Reproductive handmade cloning of water buffalo (*Bubalus bubalis*). Vol. 197, *Animal Reproduction Science.* Elsevier; 2018. p. 1–9.
21. Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: From the research laboratory to clinical practice. Vol. 81, *Theriogenology.* *Theriogenology*; 2014. p. 138–51.

22. Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev.* 2015;36(1):1–24.
23. Richani D, Gilchrist RB. The epidermal growth factor network: Role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Hum Reprod Update.* 2018;24(1):1–14.
24. Chen Y, Yang W, Shi X, Zhang C, Song G, Huang D. The Factors and Pathways Regulating the Activation of Mammalian Primordial Follicles in vivo. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(September):1–11.
25. Devillers MM, Petit F, Cluzet V, François CM, Giton F, Garrel G, et al. FSH inhibits AMH to support ovarian estradiol synthesis in infantile mice. *J Endocrinol.* 2019;240(2):215–28.
26. Li Q, He H, Zhang YL, Li XM, Guo X, Huo R, et al. Phosphoinositide 3-kinase p110 δ mediates estrogen and FSH-stimulated ovarian follicle growth. *Mol Endocrinol.* 2013;27(9):1468–82.
27. Chaves RN, Tavares De Matos MH, Buratini J, Ricardo De Figueiredo J. The fibroblast growth factor family: Involvement in the regulation of folliculogenesis. *Reprod Fertil Dev.* 2012;24(7):905–15.
28. Dubey PK, Nath A, Chandra V, Sarkar M, Saikumar G, Sharma GT. Expression of mRNA Encoding IGF-I, IGF-II, Type-I, and II IGF-Receptors and IGF-Binding Proteins-1-4 during Ovarian Follicular Development in Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Biotechnol.* 2015;26(2):81–91.
29. Castilho ACS, Bueno da Silva R, Price CA, Machado MF, Amorim RL, Buratini J. Expression of fibroblast growth factor 10 and cognate receptors in the developing bovine ovary. *Theriogenology.* 2014;81(9):1268–74.
30. Santos SSD, Biondi FC, Cordeiro MS, Miranda MS, Dantas JK, Figueiredo JR, et al. Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages. *Anim Reprod Sci.* 2006 Sep 1;95(1–2):1–15.
31. Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Hatzirodos N, Bonner W, Sabatier L, Reinhardt DP, et al. A New Model of Development of the Mammalian Ovary and Follicles. *PLoS One.* 2013;8(2).
32. Fortes MRS, Li Y, Collis E, Zhang Y, Hawken RJ. The IGF1 pathway genes and their association with age of puberty in cattle. *Anim Genet.* 2013;44(1):91–5.
33. Umer S, Zhao SJ, Sammad A, Sahlu BW, Yunwei P, Zhu H. AMH: Could it be used as a biomarker for fertility and superovulation in domestic animals? Vol. 10, *Genes.* Genes (Basel); 2019.
34. She ZY, Yang WX. Sry and SoxE genes: How they participate in mammalian sex determination and gonadal development? Vol. 63, *Seminars in Cell and Developmental Biology.* Academic Press; 2017. p.

13–22.

35. Puttabyatappa M, Matiller V, Stassi AF, Salvetti NR, Ortega HH, Padmanabhan V. Developmental Programming: Prenatal Testosterone Excess on Ovarian SF1/DAX1/FOXO3. *Reprod Sci*. 2020 Jan 1;27(1):342–54.
36. Nakamoto M, Wang DS, Suzuki A, Matsuda M, Nagahama Y, Shibata N. Dax1 suppresses P450arom expression in medaka ovarian follicles. *Mol Reprod Dev*. 2007 Oct;74(10):1239–46.
37. Paulini F, Silva RC, De Paula Rôlo JLJ, Lucci CM. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *J Ovarian Res*. 2014;7(1):1–12.
38. Hartanti MD, Hummitzsch K, Bonner WM, Bastian NA, Irving-Rodgers HF, Rodgers RJ. Formation of the Bovine Ovarian Surface Epithelium during Fetal Development. *J Histochem Cytochem*. 2020;68(2):113–26.
39. Hatzirodos N, Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Breen J, Perry VEA, Anderson RA, et al. Transcript abundance of stromal and thecal cell related genes during bovine ovarian development. *PLoS One*. 2019;14(3):1–16.
40. Chen H, Palmer JS, Thiagarajan RD, Dinger ME, Lesieur E, Chiu H, et al. Identification of novel markers of mouse fetal ovary development. *PLoS One*. 2012;7(7).
41. da Silva RB, Yang MY, Caixeta ES, Castilho AC, Amorim RL, Price CA, et al. Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis in fetal bovine ovarian tissue in vitro. *Mol Reprod Dev*. 2019 Feb 1;86(2):166–74.
42. da Silva RB, Yang MY, Caixeta ES, Castilho AC, Amorim RL, Price CA, et al. Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis in fetal bovine ovarian tissue in vitro. *Mol Reprod Dev*. 2019;86(2):166–74.
43. Lecluze E, Rolland AD, Filis P, Evrard B, Leverrier-Penna S, Maamar M Ben, et al. Dynamics of the transcriptional landscape during human fetal testis and ovary development. *Hum Reprod*. 2020;35(5):1099–119.
44. Hummitzsch K, Hatzirodos N, Irving-Rodgers HF, Hartanti MD, Perry VEA, Anderson RA, et al. Morphometric analyses and gene expression related to germ cells, gonadal ridge epithelial-like cells and granulosa cells during development of the bovine fetal ovary. *PLoS One*. 2019;14(3):1–20.
45. Hartanti MD, Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Bonner WM, Copping KJ, Anderson RA, et al. Morphometric and gene expression analyses of stromal expansion during development of the bovine fetal ovary. *Reprod Fertil Dev*. 2019;31(3):482–95.
46. Bayne RA, Donnachie DJ, Kinnell HL, Childs AJ, Anderson RA. BMP signalling in human fetal ovary somatic cells is modulated in a gene-specific fashion by GREM1 and GREM2. *Mol Hum Reprod*. 2016 Sep 1;22(9):622–

33.

47. Gunes SO, Mahmutoglu M., Agarwal A. Genetic and epigenetic effects in sex determination. Vol. 108, Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews. Birth Defects Res C Embryo Today; 2016. p. 321–36.
48. Sharma P, Yadav AS, Selokar NL, Kumar D, Dhaka SS, Yadav PS. Epigenetic status of buffalo fibroblasts treated with sodium butyrate a chromatin remodeling agent. Tissue Cell. 2018 Feb 1;50:51–8.
49. Roth Z. Stress-induced alterations in oocyte transcripts are further expressed in the developing blastocyst. Vol. 85, Molecular Reproduction and Development. Mol Reprod Dev; 2018. p. 821–35.
50. Tan Q. Deciphering the DNA Methylome of Polycystic Ovary Syndrome. Mol Diagnosis Ther. 2020 Apr 15;24(3):245–50.
51. Sirard MA. Distribution and dynamics of mitochondrial DNA methylation in oocytes, embryos and granulosa cells. Sci Rep. 2019 Dec 1;9(1).
52. Pohler KG, Geary TW, Atkins JA, Perry GA, Jinks EM, Smith MF. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. Vol. 349, Cell and Tissue Research. Cell Tissue Res; 2012. p. 649–64.
53. Thompson RP, Nilsson E, Skinner MK. Environmental epigenetics and epigenetic inheritance in domestic farm animals. Vol. 220, Animal Reproduction Science. Elsevier; 2020. p. 106316.
54. Saini M, Selokar NL. Approaches used to improve epigenetic reprogramming in buffalo cloned embryos. Vol. 148, Indian Journal of Medical Research. Indian J Med Res; 2018. p. 115–9.
55. Klinger FG, Rossi V, De Felici M. Multifaceted programmed cell death in the mammalian fetal ovary. Int J Dev Biol. 2015;59(1–3):51–4.
56. da Silva RB, Yang MY, Caixeta ES, Castilho AC, Amorim RL, Price CA, et al. Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis in fetal bovine ovarian tissue in vitro. Vol. 86, Molecular Reproduction and Development. 2019. p. 166–74.
57. De Moraes R, Nogueira Da Costa N, Ohashi OM, Do S, Santos SD, Monteiro BM, et al. Hormônio antimülleriano: pode uma realidade usada em seres humanos ser transferida a bovinos e búfalos Antimüllerian Hormone: can a reality in humans translate to bovine and buffalos. Rev Bras Reprod Anim. 2017;41(4):693–8.
58. Franchi FF, Hernandez MP, Coelho Ferreira AL, Vieira de Lima VA, de Oliveira Mendes L, Musa de Aquino A, et al. Fractal analysis and histomolecular phenotyping provides insights into extracellular matrix remodeling in the developing bovine fetal ovary. Biochem Biophys Res Commun. 2020;523(4):823–8.

59. Santos SSD, Ferreira MAP, Lima MYS, Sampaio R V., Cordeiro MS, Silva TVG, et al. Quantification, Morphology and Ultrastructure of Preantral Follicles of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Foetuses. *Reprod Domest Anim*. 2011 Feb;46(1).
60. Baillet A, Mandon-Pepin B. Mammalian ovary differentiation - A focus on female meiosis. Vol. 356, *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012. p. 13–23.
61. Mondal M, Prakash BS. Effects of long-term growth hormone-releasing factor treatment on growth, feed conversion efficiency and dry matter intake in growing female buffaloes (*Bubalus bubalis*). *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2005 Aug;89(7–8):260–7.
62. Perry GA. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. Vol. 86, *Theriogenology*. *Theriogenology*; 2016. p. 373–8.
63. Deb R, Chakraborty S, Mahima, Kumar Verma A, Tiwari R, Dhama K. Nutrigenomics and its role in male puberty of cattle: A mini review. *Pakistan J Biol Sci*. 2014;17(3):329–34.
64. Haldar A, Prakash BS. Effect of exogenous growth-hormone-releasing factor on blood metabolites and minerals in late maturing buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2007 Aug;91(7–8):326–32.
65. Haldar A, Prakash BS. Growth hormone-releasing factor (GRF) induced growth hormone advances puberty in female buffaloes. *Anim Reprod Sci*. 2006 May 1;92(3–4):254–67.
66. Esposito L, de Nicola D, Balestrieri A, Petrovas G, Licitra F, Salzano A, et al. Effect of live body weight and method of synchronization on ovulation, pregnancy rate and embryo and fetal loss in buffalo heifers. *Anim Reprod*. 2019;16(4):859–63.
67. Lirón JP, Prando AJ, Fernández ME, Ripoli M V., Rogberg-Muñoz A, Goszczynski DE, et al. Association between GNRHR, LHR and IGF1 polymorphisms and timing of puberty in male Angus cattle. *BMC Genet*. 2012 Apr 5;13.
68. D'Occhio MJ, Baruselli PS, Campanile G. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. Vol. 125, *Theriogenology*. Elsevier; 2019. p. 277–84.
69. Williams GL, Amstalden M, Garcia MR, Stanko RL, Nizielski SE, Morrison CD, et al. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. In: *Domestic Animal Endocrinology*. Elsevier; 2002. p. 339–49.
70. Tran L V., Malla BA, Sharma AN, Kumar S, Tyagi N, Tyagi AK. Effect of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid enriched diet on plasma IGF-1 and testosterone concentration, puberty and semen quality in male buffalo. *Anim Reprod Sci*. 2016 Oct 1;173:63–72.

71. Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 Apr 25;175(1–2):123–30.
72. Robker RL, Hennebold JD, Russell DL. Coordination of ovulation and oocyte maturation: A good egg at the right time. *Endocrinology.* 2018;159(9):3209–18.
73. Dewailly D, Robin G, Peigne M, Decanter C, Pigny P, Catteau-Jonard S. Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Hum Reprod Update.* 2016;22(6):709–24.
74. Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, et al. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: What is the link? Vol. 90, *Biology of Reproduction.* 2014. p. 1–11.
75. Figueiredo JR De, Jales J, Celestino DH, Paula A, Rodrigues R. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala 1. 2007;(Xvii):143–52.
76. Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;163(1–2):53–60.
77. Ipsa E, Cruzat VF, Kagize JN, Yovich JL, Keane KN. Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor Action in Reproductive Tissues. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10(November).
78. Fortune JE. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2003;78(3–4):135–63.
79. Vo KCT, Kawamura K. In vitro activation early follicles: From the basic science to the clinical perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7).
80. Andersen CY. Inhibin-B secretion and FSH isoform distribution may play an integral part of follicular selection in the natural menstrual cycle. *Mol Hum Reprod.* 2017;23(1):16–24.
81. Sakaguchi K, Yanagawa Y, Yoshioka K, Suda T, Katagiri S, Nagano M. Relationships between the antral follicle count, steroidogenesis, and secretion of follicle-stimulating hormone and anti-Müllerian hormone during follicular growth in cattle. *Reprod Biol Endocrinol.* 2019;17(1):1–13.
82. Baba T, Ting AY, Tkachenko O, Xu J, Stouffer RL. Direct actions of androgen, estrogen and anti-Müllerian hormone on primate secondary follicle development in the absence of FSH in vitro. *Hum Reprod.* 2017;32(12):2456–64.
83. Wang X, Wang L, Sun Y, Wu D, Li J, Zhu L, et al. The optimized research of the in vitro culture of preantral follicles in mice. *J Clin Lab Anal.*

2020;34(11):1–11.

84. Liu Q, Gao H, Yang F, Zhang H, Zeng S. FSH Promotes Progesterone Synthesis by Enhancing Autophagy to Accelerate Lipid Droplet Degradation in Porcine Granulosa Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9(February):1–14.
85. Silva JRV, van den Hurk R, Figueiredo JR. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: Advances and challenges for farm animals. *Domest Anim Endocrinol.* 2016;55:123–35.
86. Sharma GT, Dubey PK, Kumar GS. Effects of IGF-1, TGF- α plus TGF- β 1 and bFGF on in vitro survival, growth and apoptosis in FSH-stimulated buffalo (*Bubalis bubalis*) preantral follicles. *Growth Horm IGF Res.* 2010;20(4):319–25.
87. Sharma RK, Singh JK, Khanna S, Singh I. Ovarian response of prepubertal Murrah heifers to exogenous GnRH. *Anim Reprod Sci.* 2012;133(3–4):153–8.
88. Price CA. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. *J Endocrinol.* 2016;228(2):R31–43.
89. Taru Sharma G, Dubey PK, Sai Kumar G. Localization and Expression of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene in Buffalo (*Bubalus bubalis*) Pre-Antral Follicles. *Reprod Domest Anim.* 2011 Feb 1;46(1):114–20.
90. Sharma GT, Dubey PK, Nath A, Saikumar G. Co-culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles with antral follicles: A comparative study of developmental competence of oocytes derived from in vivo developed and in vitro cultured antral follicles. *Zygote.* 2013;21(3):286–94.
91. da Silva RB, Yang MY, Caixeta ES, Castilho AC, Amorim RL, Price CA, et al. Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis in fetal bovine ovarian tissue in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2019;86(2):166–74.
92. Santos J, Menezes V, Barberino R, Macedo T, Lins T, Gouveia B, et al. Immunohistochemical Localization of Fibroblast Growth Factor-2 in the Sheep Ovary and its Effects on Pre-antral Follicle Apoptosis and Development In Vitro. *Reprod Domest Anim.* 2014;49(3):522–8.
93. Campanile G, Baruselli PS, Neglia G, Vecchio D, Gasparrini B, Gimenes LU, et al. Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. *Anim Reprod Sci.* 2010;121(1–2):1–11.
94. Rafael Rossetto, Lima IMHT, Saraiva MVA, Lima-Verde IB, Sales ET, De Figueiredo JR. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. *Acta Vet Bras.* 2011;5(1):15–23.
95. Mondadori RG, Santin TR, Fidelis AAG, Porfírio EP, Bão SN. Buffalo (*Bubalus bubalis*) pre-antral follicle population and ultrastructural

- characterization of antral follicle oocyte. *Reprod Domest Anim.* 2010;45(1):33–7.
96. Ramesh HS, Gupta PSP, Nandi S, Manjunatha BM, Kumar VG, Ravindra JP. Co-culture of Buffalo preantral follicles with different somatic cells. *Reprod Domest Anim.* 2008;43(5):520–4.
 97. Sampaio P. Biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). *Rev Bras Reprod Anim.* 2005;29(1):4–17.
 98. Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2015;30(3):608–15.
 99. Baldrighi J, Sá Filho MF, Batista EOS, Lopes RNVR, Visintin JA, Baruselli PS, et al. Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reprod Domest Anim.* 2014;49(6):1015–20.
 100. Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, et al. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: What is the link? Vol. 90, *Biology of Reproduction*. Oxford Academic; 2014. p. 85–6.
 101. Gautam D, Vats A, Pal P, Haldar A, De S. Characterization of Anti-Müllerian Hormone (AMH) Gene in Buffaloes and Goats. *Front Vet Sci.* 2021;8(March).
 102. Gershon E, Dekel N. Newly identified regulators of ovarian folliculogenesis and ovulation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):1–18.
 103. Dubey PK, Tripathi V, Singh RP, Sharma GT. Influence of nitric oxide on in vitro growth, survival, steroidogenesis, and apoptosis of follicle stimulating hormone stimulated buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. *J Vet Sci.* 2011;12(3):257–65.
 104. Wardowska A. M6a rna methylation in systemic autoimmune diseases—a new target for epigenetic-based therapy? *Pharmaceuticals.* 2021;14(3).
 105. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(43):17474–9.
 106. Sun SY, Zhang W, Han X, Huang RH, Shi FX. Cell proliferation and apoptosis in the fetal and neonatal ovary of guinea pigs. *Genet Mol Res.* 2014;13(1):1570–8.
 107. Sharma GT, Dubey PK, Kumar GS. Effects of IGF-1, TGF- α plus TGF- β 1 and bFGF on in vitro survival, growth and apoptosis in FSH-stimulated buffalo (*Bubalis bubalus*) preantral follicles. *Growth Horm IGF Res.* 2010 Aug 1;20(4):319–25.

108. Jiang Y, Xin X, Pan X, Zhang A, Zhang Z, Li J, et al. STAT4 targets KISS1 to promote the apoptosis of ovarian granulosa cells. *J Ovarian Res.* 2020;13(1):1–12.
109. AL J, JT B. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction.* 2002;124(1):19–27.
110. F S, S F, A BB, H Z, M B-M, H D. Caspase-7 deficiency in Chinese hamster ovary cells reduces cell proliferation and viability. *Biol Res.* 2020;53(1).
111. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, et al. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2011;96(5):1246-1251.e1.
112. Devi HL, Kumar S, Konyak YY, Bharati J, Bhimte A, Pandey Y, et al. Expression and functional role of fibroblast growth factors (FGF) in placenta during different stages of pregnancy in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.* 2020 Feb 1;143:98–112.
113. Garafutdinov RR, Galimova AA, Sakhabutdinova AR. The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2020 Sep 1;39(9):1251–69.
114. Rodríguez A, Rodríguez M, Córdoba JJ, Andrade MJ. Chapter 3 Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. *Methods Mol Biol.* 1275.
115. LC L, R D. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002 Nov 1;18(11):1427–31.