

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PROTEÔMICA DO FLUIDO FOLICULAR OVARIANO DE
OVELHAS**

ALESSANDRA GOMES SOUZA

BOTUCATU – SP
19 de novembro de 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PROTEÔMICA DO FLUIDO FOLICULAR OVARIANO DE
OVELHAS**

ALESSANDRA GOMES SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biotecnologia
Animal, para obtenção do Título de
Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Oba

BOTUCATU – SP
Novembro/2020

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

Souza, Alessandra Gomes.

Proteômica do fluido folicular ovariano de ovelhas /
Alessandra Gomes Souza. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Biotecnologia animal. 2. Ovelha. 3. Proteômica.
4. Proteoma. 5. Proteínas. 6. Técnicas de maturação in vitro
de oócitos.

Palavras-chave: Foliculogênese; Ovelha; Proteoma;
Proteína.

Nome do autor (a): Alessandra Gomes Souza

Título: **PROTEÔMICA DO FLUIDO FOLICULAR OVARIANO DE OVELHAS**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eunice Oba

Presidente e Orientador

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

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

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

Prof. Dr. Leandro Maia

Autônomo

Pós doutorado pela Plataforma de Proteômica do Parc Cientific de Barcelona,
Universidade de Barcelona – Espanha e na FMVZ – UNESP, campus Botucatu.

Data da Defesa: 19 de novembro de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe e a minha tia Laura, por estarem sempre me apoiando, mesmo nos momentos mais conturbados, não deixaram de acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Se estou aqui escrevendo essa dissertação é porque várias pessoas se dedicaram e abdicaram seu tempo para poder me ajudar, fazendo com que tudo isso ocorresse da melhor forma possível. E estar aqui agradecendo, me deixa feliz e imensamente grata.

O agradecimento primordial devo à Deus e ao Nosso Senhor Jesus Cristo, por estarem presentes na minha Fé e me guiarem com sabedoria para o melhor caminho e me ajudando a tomar as decisões certas.

A minha mãe por nunca ter desacreditado no meu potencial, sendo meu porto seguro, mesmo que longe.

A minha tia Laura, por ser minha segunda mãe e minha mentora nos momentos mais difíceis.

A minha Vó por estar sempre em meus pensamentos, sei que sua presença se faz presente mesmo em outro plano.

Agradeço imensamente a minha orientadora, Profa. Dra. Eunice Oba, que desde o início abriu as portas e me recebeu como sua orientada. Sou grata aos puxões de orelhas e as broncas, pois fizeram de mim uma profissional melhor. Agradeço a disponibilidade por ceder todos os equipamentos utilizados neste projeto. Todo o meu respeito e admiração pelo trabalho e ensinamento que a senhora exerceu em minha vida durante esses anos percorridos no mestrado.

Agradecimento especial a minha banca examinadora, Professora Fabiana Souza e Ariane Dandas, pela disponibilidade do tempo precioso de todas. Uma honra poder contar com mulheres fortes e empoderadas.

A minha gratidão à Professora Fabiana Souza por dispor seu laboratório de proteômica e eletroforese para a realização desse projeto e pela paciência

que teve comigo.

Ao Doutor Leandro Maia, pela sua imensa colaboração para comigo e com o Departamento de Biotecnologia Animal, a disponibilidade de abdicar de seu tempo para me ajudar nessa etapa tão decisiva de minha vida acadêmica.

Aos meus amigos, Stella Tironi, Lucas Monteiro e Suzane Brochine, que foram amigos fiéis de todos os momentos, dos perrengues, das alegrias e dos sofrimentos, principalmente daqueles momentos em que eu pensei em desistir de tudo, vocês estavam ali, me motivando e me colocado para cima. Vocês foram minha família aqui nessa cidade maravilhosa de Botucatu, me acolheram e acabaram tornando meus irmãos de coração.

Mas o meu agradecimento especial para a Stellita, que soube ser parceira em todos os momentos do meu experimento, salvando minha vida nesses caminhos entre uma colheita e outra desses ovários, sempre me dando conselhos, sendo paciente, ouvindo minhas reclamações e meus choros, não me deixou desistir em nenhum momento se quer e, olha que houveram momentos difíceis, não foram poucos. Sem dúvidas com aquela frase clichê, “te levarei do mestrado para a vida”. Gratidão!

Ao meu melhor amigo e mais parceiro também, Lucas Monteiro, amigo esse que não mede as palavras para os concelhos da vida e profissionais

Meu agradecimento a todos do laboratório, Viviane Codgnoto, Letícia Salgado, Nayara Marques, Andressa Filaz e Edjalma Jr, que estiveram presentes e também ajudaram direta ou indiretamente nesse projeto.

Agradeço a minha eterna amiga Ariane Moreira que mesmo longe lá no outro hemisfério, sempre esteve presente nessa minha jornada profissional e pessoal. Minha eterna gratidão a você Pretinha.

Agradeço aos animais, sem eles não poderia ser possível a realização desse experimento, além dos frigoríficos de São Manuel e Boituva pela

disponibilidade em ceder as peças desses animais.

O meu muito obrigada ao CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais) de Campinas, pelo apoio e realização das análises proteômicas.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro, para que esse projeto se tornasse realidade - Código de Financiamento 001”.

A minha eterna Gratidão!

Até a teoria perfeita é inútil sem a prática bem feita.

Thiago Nigro

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CL	Corpo lúteo
FF	Fluido folicular
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG	gonadotrofina coriônica humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGFBPs	Proteína ligadora de insulina
IGF	Insulina
LH	Hormônio luteinizante

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Aparelho genital de ovelhas.....	4
2.2 Puberdade.....	6
2.3 Ciclo estral.....	8
2.4 Foliculogênese.....	11
2.5 Reserva folicular.....	16
2.6 Composição do líquido folicular.....	17
2.7 Proteômica do líquido folicular.....	19
2.8 Considerações finais.....	20
3 HIPÓTESE E OBJETIVO.....	20
3.1 Hipótese.....	20
3.2 Objetivo Geral.....	20
3.3 Obejtivo Específico.....	21
4. REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO 2.....	16
RESUMO.....	32
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODO.....	34
2.1. <i>Reagentes</i>	34
2.2. <i>Aspectos éticos</i>	34
2.3. <i>Desenho experimental</i>	34
2.4. <i>Colheita das amostras</i>	34
2.6. <i>Preparação das amostras para proteômica</i>	35
2.7. <i>Análise dos dados</i>	36
3. RESULTADOS.....	37
4. DISCUSSÃO.....	43
AGRADECIMENTOS.....	48
CONFLITO DE INTERESSES.....	48
REFERÊNCIAS.....	50

RESUMO

SOUZA, A.G. (2020) **PROTEÔMICA DO FLUÍDO FOLICULAR OVARIANO DE OVELHAS**. Botucatu – SP. 2020, 85p. Defesa (Mestrado) Departamento Biotecnologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

A interação que existe do líquido folicular com oócito serve para manter o mesmo e contribuir com o desenvolvimento oocitário. O objetivo deste estudo foi descrever o perfil de proteínas do líquido folicular ovariano de ovelhas em duas categorias de desenvolvimento dos folículos. Os ovários foram colhidos de um abatedouro e transportados até o laboratório. No laboratório, os ovários foram lavados com solução 0,9% NaCl, os folículos foram mensurados e classificados em duas categorias, folículos pequenos com diâmetro de < 4 mm e médios de ≥ 4 a 6 mm. O líquido folicular foi colhido por aspiração centrifugados a 800g por 10 minutos para retirada dos *debris* celulares e recentrifugados a 10.000g, durante 30 minutos a 4° C. A depleção de albumina foi conduzida e a concentração de proteínas totais foi mensurada pelo método de Bradford. Uma alíquota contendo 50 μ g de proteína foi preparada para eletroforese unidimensional SDS-PAGE. A corrida foi interrompida quando as amostras atingiram o gel de separação e a digestão trípica *in gel* foi realizada. Então, as amostras foram submetidas a espectrometria de massa com abordagem *shotgun* ESI-Q-TOF MS/MS. Os resultados foram submetidos à análise multivariada, por análise de componente principal (PCA), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) indicada pela pontuação VIP (projeção de importância variável – *VIP score*), dendrograma e ontologia gênica (função molecular, processo biológico e componente celular). Foi encontrado um total de 55 proteínas nos dois grupos, sendo 02 apenas no grupo < 4 mm e 13 no grupo 4 a 6 mm. A PCA identificou 2 grupos distintos, sendo a somatória de PC1 e PC2 $> 50\%$. No *VIP score* foram encontradas 12 proteínas com $\alpha \geq 1,5$, sendo 2 mais abundantes no folículos com diâmetro < 4 mm e 10 nos folículos entre 4 a 6 mm. Concluindo-se que as proteínas descritas estão ligadas diretamente com o funcionamento do metabolismo folicular e desenvolvimento dos oócitos, participando do processo de ovulação e qualidade dos oócitos.

Palavras-chaves: Foliculogênese; Proteína; Proteoma, Ovelha

ABSTRACT

SOUZA, A.G. **PROTEOMIC OF THE OVARIAN FOLLICULAR FLUID FROM THE SHEEP**. Botucatu, 2020, 68p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP.

The interaction that exists between the follicular fluid and the oocyte serves to maintain it and contribute to oocyte development. The objective of this study was to describe the protein profile of the ovarian follicular fluid of sheep in two categories of follicle development. The ovaries were harvested from a slaughterhouse and transported to the laboratory. In the laboratory, the ovaries were washed with 0.9% NaCl solution, the follicles were measured and classified into two categories, small follicles with a diameter of < 4 mm and medium from ≥ 4 to < 6 mm. The follicular fluid was collected by centrifuged aspiration at 800g for 10 minutes to remove the cellular debris and refocused at 10,000g for 30 minutes at 4°C. Albumin depletion was conducted and the total protein concentration was measured by the Bradford method. An aliquot containing 50 μ g of protein was prepared for SDS-PAGE unidimensional electrophoresis. The run was stopped when the samples reached the separation gel and tryptic digestion in gel was performed. Then, the samples were submitted to mass spectrometry with shotgun approach ESI-Q-TOF MS/MS. The results were submitted to multivariate analysis, by principal component analysis (PCA), discriminant analysis by partial least squares (PLS-DA) indicated by VIP score (projection of variable importance - VIP score), dendrogram and gene ontology (molecular function, biological process and cellular component). A total of 55 proteins were found in both groups, 02 only in the group < 4 mm and 13 in the group 4 to 6 mm. The PCA identified 2 distinct groups, being the sum of PC1 and PC2 $> 50\%$. In the VIP score were found 12 proteins with $\alpha \geq 1.5$, being 2 more abundant in follicles with diameter < 4 mm and 10 in follicles between 4 and 6 mm. It was concluded that the proteins are directly linked to the functioning of the follicular metabolism and development of the oocytes, participating in the ovulation process and oocyte quality.

Keywords: Folliculogenesis; Protein; Proteome; Ovine

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os ovinos domésticos (*Ovis aires*) estão dentro da família Bovidae. No Brasil nos últimos anos o rebanho ovino vem ganhando destaque e importância comercial no cenário do agronegócio. O rebanho brasileiro conta com um efetivo de aproximadamente 19 milhões de animais, em índice crescente divulgado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018). De acordo com o Censo Agropecuário entre os anos de 2006 e 2017, em termos de comercialização houve um aumento significativo, superior ao crescimento do rebanho, chegando a atingir nesse período 47,5% em sua produção (EMBRAPA, 2018).

O sistema de criação de ovinos tanto no Brasil como em outras partes do mundo, possui três tipos de criação, o sistema intensivo (com o confinamento total dos animais, ideal para a produção de cordeiros), extensivo (voltado para a criação de carne ou para a subsistência) e semi-extensivo (onde os animais ficam à pasto durante o dia e no período da noite, são recolhidos para as instalações). Bem como a utilização principal da carne, leite, lã, mais direcionada para a região Sul, onde a mesma está um passo à frente do ponto de vista organizacional sob o próprio mercado (OTTO DE SÁ, SÁ, 2006, EMBRAPA, 2018).

Na reprodução de ovinos tem se utilizado várias biotécnicas para acelerar a seleção e crescimento de produção e criação. Para isso é necessário conhecer a morfologia do aparelho genital bem como o envolvimento de fatores externos e internos que envolvem os ovários e oócitos dessa espécie. Segundo (HOMA et al., 1992) comparando com oócitos de bovinos, o que se conhece a respeito do líquido folicular é que há uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados encontrado notadamente em folículos de tamanhos menores, esse ácido tem como característica estabelecer o processo de meiose dos mesmos.

O que se sabe é que esses oócitos sofrem a ação do processo de maturação e desenvolvimento, e que basicamente sua composição química influencia diretamente na qualidade dos oócitos, na competência oocitária, na capacidade de desenvolvimento e na qualidade embrionária (ALI et al., 2004, IWATA et al., 2005; KIM et al., 2006; BIANCHI et al., 2013 e LOURENÇO, 2016).

Já ANDERSEN et al., (1976) e FERNANDES et al, (2002) afirmam que o líquido folicular é classificado como um transudado do plasma sanguíneo, onde relataram que os elementos que constituem o fluido folicular, venha propriamente de origem sanguínea, assim como alguns lipídeos, algumas proteínas e eletrólitos, tendo integração intra-folicular associada à plasmática. Contudo, o mesmo contém diversificadas moléculas ativas, incluindo proteínas, fatores de crescimento, açúcares, peptídeos, aminoácidos, hormônios, fatores anti-coagulantes, eletrólitos, espécies reativas de oxigênio e dentre outras composições, que estão relacionadas diretamente com o desenvolvimento folicular, fertilização dos oócitos e desenvolvimento embrionário. Garantindo um ambiente folicular adequado para produzir oócitos de alta qualidade (FORTUNE, 1994; MOTTA, 2008; REVELLI et al., 2009).

A descrição do líquido folicular através da proteômica pode apontar diversos tipos de biomarcadores, dos quais ajudariam a facilitar a identificação, bem como a competência e a qualidade dos oócitos (WALLACE et al., 2012; BIANCHI et al., 2013 e LOURENÇO, 2016).

Dentro do proteoma há a presença de um grande número de variáveis em relação a genômica e o transcriptoma, devido à grande variabilidade química das proteínas e interconectividade das mesmas (ALTELAAR; MUNOZ; HECK; 2013; EMIDIO et al., 2015). O seu estudo requer algumas ferramentas específicas, dentre elas de forma analíticas com alta seletividade, resolução e sensibilidade (POMASTOWSKI; BUSZEWSKI, 2014; EMIDIO et al., 2015).

Os relatos em literatura sobre as análises de proteínas do fluido folicular (FF), foram descritos em humanos (HANDRIEDER et al., 2008), bovinos (ZACHUT et al., 2016), búfalos (FU et al., 2016), suínos (SUN et al., 2011), caninos (FAHIMINIYA et al., 2010), equinos (FAHIMINIYA et al., 2011), ovinos (WU et al. 2018) e caprinos (PAULA JUNIOR et al., 2018).

Apesar de todas as biotecnologias empregadas na espécie ovina, pouco se sabe sobre a composição química do líquido folicular, especialmente quando no que diz respeito à composição proteica. Até mesmo em humanos a técnica da proteômica vem sendo amplamente difundida com a intenção de identificar e obter uma resposta para aqueles pacientes submetidos aos protocolos de fertilização *in vitro* (SALERMO et al., 2011). No âmbito veterinário pouco se sabe quais são os genes e proteínas presentes no FF que sensibilizam o

desenvolvimento e a maturação dos oócitos. Desta forma faz-se importante rastrear o proteoma do FF ovariano de ovelhas, para então identificar quais as proteínas de maior expressão no mesmo e suas respectivas funções biológicas no desenvolvimento e maturação oocitária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aparelho genital de ovelhas

O aparelho reprodutor feminino é de extrema importância para um melhor entendimento da fisiologia reprodutiva (Figura 1). O sistema reprodutor das ovelhas anatomicamente está localizado intra-abdominal e sublombar, composto pelos ovários, o qual tem forma arredondada e são de tamanho semelhante a uma avelã, apresentam estruturas em sua superfície intitulados de folículos, que ao amadurecerem liberam o óvulo. Os ovários também produzem os hormônios encarregados pelo estro, manutenção da gestação e do parto (GRANADOS; DIAS; SALES, 2006).

As tubas uterinas são tubos sinuosos que conectam o ovário ao útero. Visto que ocorre a liberação do óvulo pelos ovários, ele desce pela tuba uterina e na presença do espermatozoide, vai ocorrer a fecundação, fixando-se no útero e dando sequência à gestação (Figura 2). O útero é onde vai ocorrer o desenvolvimento da gestação. Forma-se um corpo verdadeiro e dois cornos, onde se conectam as tubas. Separa-se da vagina pela cérvix ou também conhecida como colo uterino, que tem função de proteger a gestação da vagina e do meio exterior. A cérvix (Figura 3) é um canal quase sempre fechado, com a presença de dobras, denominadas de anéis, em ovelhas o número de anéis é em torno de 4 a 6 (GRANADOS; DIAS; SALES, 2006).

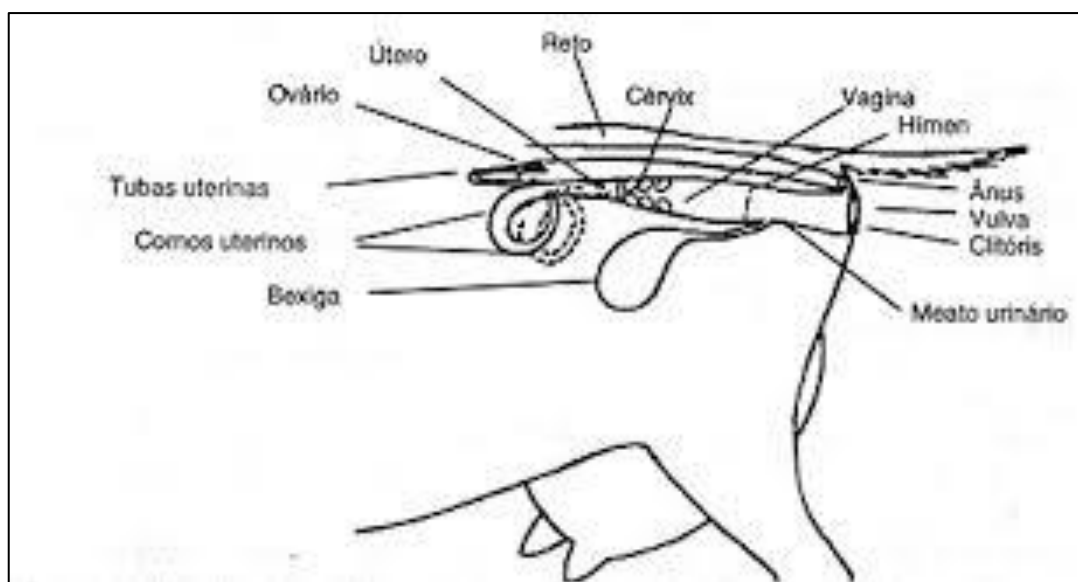


Figura 1. Localização anatômica do aparelho reprodutor feminino. Adaptado de (GRANADOS; DIAS; SALES, 2006).

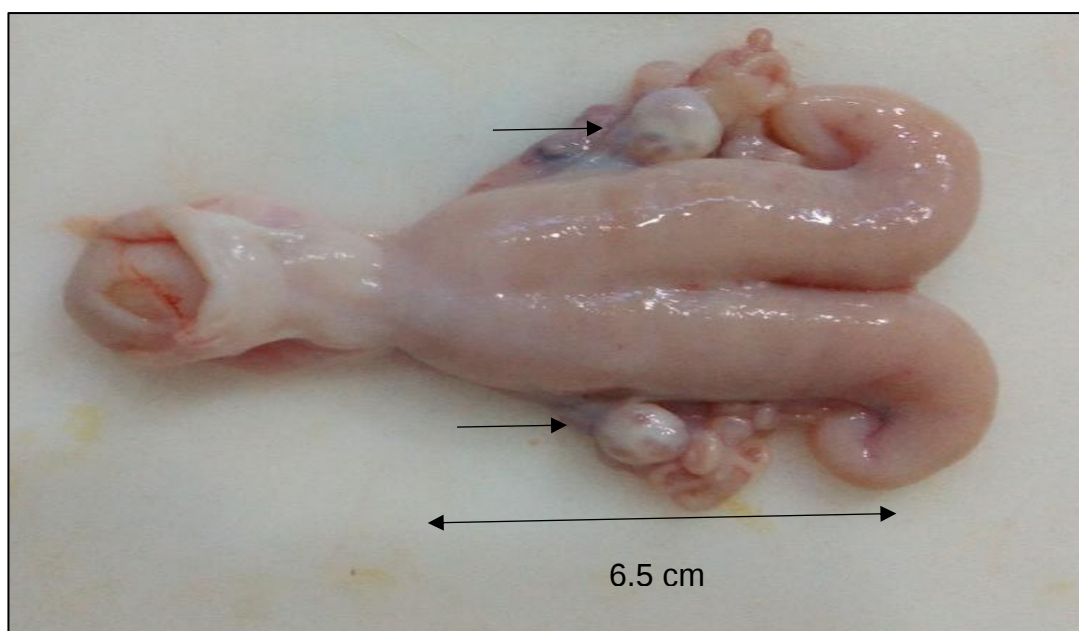


Figura 2. Sistema reprodutor da fêmea ovina. Setas indicam os ovários. (Arquivo pessoal).



Figura 3. Cérvix uterina ovina, mostrando os anéis fibro-musculares. Adaptado de (GRANADOS; DIAS; SALES, 2006).

2.2 Puberdade

Com o surgimento da puberdade determina-se então o início da atividade sexual para ambos os sexos. As fêmeas entram na puberdade quando apresentam o primeiro estro (período de receptividade sexual), porém na maioria das vezes observa-se uma baixa fertilidade, pois já foi constatado que a taxa de hormônios gonadotróficos ainda é escassa para estimular a ovulação (SASA et al, 2002).

A base endócrina da puberdade nas fêmeas conta com o desenvolvimento dos mecanismos hipotalâmicos que são responsáveis pela liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). A presença da adeno-hipófise libera hormônio folículo-estimulante (FSH), que tem como função promover uma maior proliferação das células dos grânulos, o desenvolvimento de enzimas celulares que serão capazes de fazer a conversão de andrógenos em estrógenos (estradiol) e secretando vários agentes parácrinos necessários para o desenvolvimento folicular (FAILS, MAGEE, 2019).

O hormônio luteinizante (LH) influencia diretamente nas células da granulosa, onde as mesmas proliferam-se e sintetizam andrógenos (androstenediona e testosterona), difundindo-se para a camada da granulosa (FAILS, MAGEE, 2019). A liberação de GnRH pode ser modulado por hormônios esteroides sendo eles: estradiol (responsável pela indução dos sinais de estro e desenvolvimento da glândula mamária) e progesterona e peptídicos (inibina), no

ovário, entretanto é concebida através de aportes neurais ao hipotálamo (FAILS, MAGEE, 2019).

O início da puberdade antecedido por um pico de LH, subsequente a uma pequena elevação da progesterona circulante. O pico seguinte de LH indica o início da primeira ovulação. No terceiro pico de LH que caracterizará a puberdade por completo (GONZÁLEZ, 2002), e durante puberdade que ocorre então a diminuição e inibição dos hormônios esteroides em relação às gonadotrofinas, fazendo o feedback negativo entre o estradiol e LH (GONZÁLEZ, 2002; FAILS, MAGEE, 2019).

As ovelhas em sua grande maioria chegam à puberdade aos 6 meses de idade, porém a primeira gestação geralmente não ocorre antes dos 8 a 10 meses de idade (GONZÁLEZ, 2002). Já os machos, a puberdade é marcada por instintos reprodutivos e produção espermática, mesmo antes de atingirem a puberdade por completa, que somente será alcançada quando os espermatozoides estão capacitados para a fertilização (GRANADOS et al., 2006; LOBATO et. al., 2013).

Segundo os autores JÚNIOR; GIRÃO (2003) a idade média em que os machos entram na puberdade é em torno de quatro a seis meses de idade, com a estimativa de peso vivo entre 22 a 28 kg. Já as fêmeas chegam a puberdade com sete a 10 meses de idade e, de acordo com (BORGES; GONÇALVES, 2002) que as fêmeas chegam nessa idade com o peso em torno de 40 a 45 kg do peso adulto.

Alguns fatores interferem o desencadeamento da puberdade nos ovinos, como a nutrição, peso corporal, genética, estação de nascimento, idade, tipo de parto, manejo sanitário e interações sociais, que por fim acabam interferindo também no estro e na ovulação (Figura 4) (MONTEIRO et al., 2010; SASA et al. 2002). De acordo GRANADOS et al., (2006), há também outros fatores que interferem no desencadeamento da puberdade, fatores como hormônios atuantes, raças e desenvolvimento ponderal.

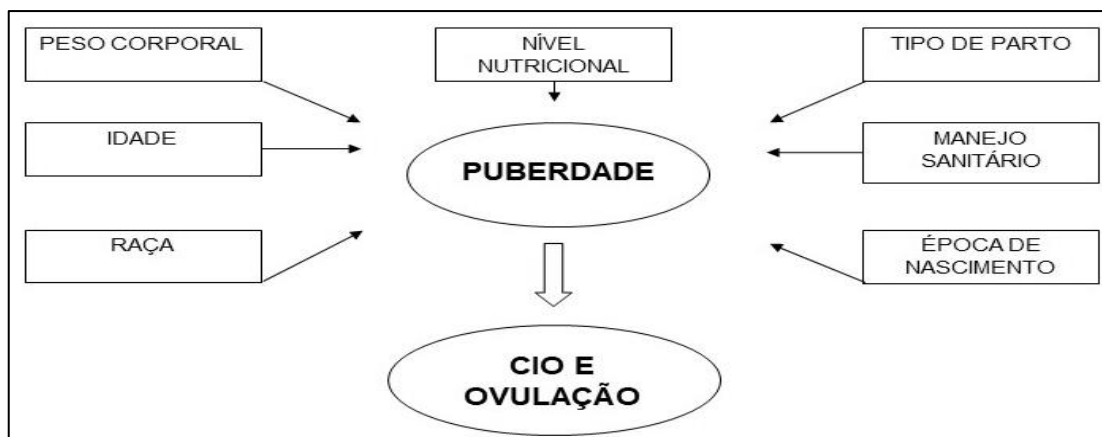


Figura 4. Fatores que interferem na puberdade da fêmea. Adaptado de (MONTEIRO et al., 2010; SASA et al. 2002).

A atividade reprodutiva é coordenada por diversos processos fisiológicos que agem em conjunto com fatores externos e internos ajudando na regulação do ciclo ovariano (GRANADOS et al., 2006).

2.3 Ciclo estral

O ciclo estral é o intervalo desde o início de um estro até o início do estro seguinte. Acredita-se que a ovelha é a melhor exemplo de animal poliéstrico sazonal (animais de dia curto), com longo período de anestro, subsequente há uma estação de monta que pode variar de 1 a 20 ciclos estrais consecutivos (FAILS; MAGEE, 2019). Em comparação com outras espécies, em novilhas a 1ª ovulação vem logo após um ciclo curto de 7 a 8 dias e a 2ª ovulação com 21 dias (GONZÁLEZ, 2002).

Os estros serão concentrados em um tempo definido durante o ano, tendo o fotoperíodo (número de horas de luz por dia) (FAILS; MAGEE, 2019). A melatonina tem grande importância sobre a sincronização da resposta reprodutiva, sabe-se que na presença da luz, a secreção da mesma é inibida, onde a duração da secreção de melatonina é diretamente proporcional ao comprimento da noite, período esse que ocorre sua produção (GONZÁLEZ, 2002).

Essa variação notória é devida alguns fatores como raça, ambiente no qual o animal se encontra e da sua alimentação (CUNHA et al., 200; SASA et al.,

2002). Assim, o ciclo reprodutivo das ovelhas é constituído por período de anestro, transição e acasalamento (FONSECA et. al., 2007). No Brasil, o outono é considerado a melhor época para a reprodução dos ovinos, período esse que compreende aos meses de março e maio (BICUDO, 2005).

O ciclo estral em ovelhas tem a duração média de 17 a 21 dias (figura 5), conta com a presença de uma fase luteínica de aproximadamente 13 a 17 dias e uma fase folicular de 4 dias. No decorrer dessa fase os hormônios FSH e LH são secretados pelas glândulas pituitária ou hipófise, glândulas essas que controlam o desenvolvimento folicular e esteirodogênese, resultando na secreção de estrógenos que conduz a observação do comportamento de estro e receptividade sexual (FONSECA, 2005; SANTOS; BARCELOS, 2012).

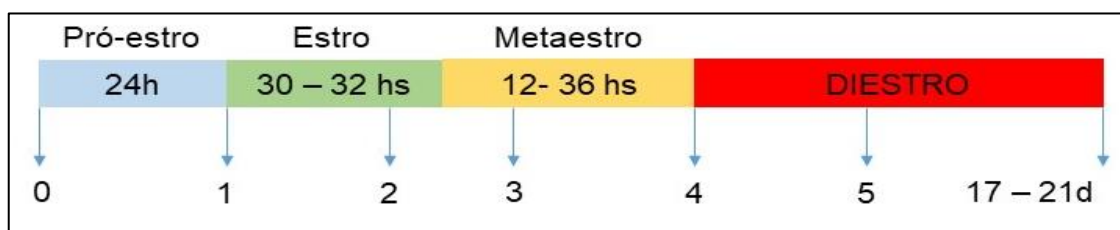


Figura 5. Duração do ciclo estral de ovelhas.

Particularmente ciclos longos ou curtos tendem a ocorrer no começo ou no fim da estação de monta (HAFEZ, 1995; FAILS; MAGEE, 2019). As etapas importantes durante o ciclo estral das ovelhas são compreendidas em fases: proestro, estro, metaestro, diestro e anestro, onde são regulados sobretudo pela interação dos hormônios GnRH é produzido no hipotálamo e atua na hipófise estimulando a liberação de FSH e LH. O FSH estimula o crescimento dos folículos ovarianos, maturação dos oócitos, secreção de estrógeno pela camada da granulosa do folículo ovariano, em ação conjunta com o LH, agem com o estrógeno na formação de receptores para LH nas células da granulosa.

O LH atua juntamente com o FSH, tem ação luteotrófica estimula as células do corpo lúteo (CL) a produzirem progesterona. A níveis basais ajuda a induzir a secreção de estrógeno dos folículos ovarianos, com o surgimento de uma onda pré-ovulatória de LH acarreta diversas alterações estruturais do folículo, o que acaba por fim rompendo-o e expulsando o óvulo de seu interior. O estradiol é produzido pelos folículos, onde estimulam a manifestação do estro e a liberação

do LH. A progesterona produzida através do CL e tem como função de manutenção da gestação (Quadro 1) (VALLE, 1991; GRANADOS et al., 2006; OLIVEIRA, 2006; LOBATO et. al., 2013).

Quadro 1. Principais hormônios, locais de atuação e funções, responsáveis pela reprodução em fêmeas (HAFEZ, 1982; GRANADOS et al., 2006; LOBATO et. al., 2013).

HORMÔNIO	FONTE	FUNÇÃO
GnRH	Hipotálamo	Promove a liberação do FSH e LH
FSH	Hipófise anterior	Estimula o desenvolvimento folicular e a secreção de estrógenos
LH	Hipófise anterior	Estimula a ovulação, formação e manutenção do corpo lúteo
Estradiol	Folículo (ovário)	Estimula a manifestação do cio e a liberação de LH
Progesterona	Ovário/Placenta	Manutenção da gestação

O proestro é a primeira fase do ciclo estral, compreende como sendo a fase de desenvolvimento e caracterização do início da produção de muco pela vulva e vagina, mas ainda não aceita a monta (GRANADOS et al., 2006; LOBATO et. al., 2013). Durante essa fase o folículo ovariano que está sobre a influência dos hormônios FSH e LH, aumentam de tamanho e começam a secretar estrógenos. Como as ovelhas são animais caracterizadas como poliéstricas, o proestro começa após a regressão do CL 1 ou 2 dias depois do ciclo estral anterior. Os estrógenos que foram absorvidos pelos folículos encontram-se extremamente vascularizado, preparando assim para as seguintes etapas de estro até a prenhez (FAILS; MAGEE, 2019).

O estro é caracterizado pela observação dos sinais externos, apresentando micção constante, cauda erguida e a baixa ingestão de alimentos, essa fase é o período em que a fêmea fica receptiva à monta do macho (GRANADOS et al., 2006; LOBATO et. al., 2013). É nessa fase que ocorre a elevação dos estrógenos daqueles folículos que se apresentam maduros, período determinado de 1 ou 2 dias após o início do estro (FAILS; MAGEE,

2019).

O metaestro é categorizado pelo fim da receptividade sexual da fêmea, fase essa que decorre o período de pós-ovulação dominada pelo CL. No decurso desse período, os níveis séricos de estrógeno diminuem e o da progesterona aumentam, até atingirem a produção máxima (GRANADOS et al., 2006; OLINDA, 2010; LOBATO et. al., 2013; FAILS; MAGEE, 2019).

Na fase de diestro, é observado a rejeição da fêmea a receptividade do macho à monta. Afrima FAILS e MAGEE, (2019) que as ovelhas por serem animais que apresentam diestro curto durante a estação de reprodução, porém entram em anestro caso não ocorra uma prenhez durante a estação que se encontra. Devido à importância dos esteroides, como o estradiol (ou estrógeno), é observado o espessamento do endométrio e aumento da atividade glandular, bem como a caracterização do fechamento de cérvix, com relaxamento da musculatura genital e queda na vascularização (LAGO; LAFAYETTE, 2000; OLINDA, 2010; LOBATO et. al., 2013)

2.4 Foliculogênese

A foliculogênese é estabelecida por um processo complexo de formação, crescimento e maturação folicular, partindo pela formação do folículo primordial até o estágio do folículo de Graaf ou pré-ovulatório (SILVA, 2002; VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). É um processo que se inicia durante a vida fetal na maioria das espécies, exemplo dos ruminantes e primatas (KNIGHT; GLISTER, 2006; ROSSETTO et al., 2011). Um exemplo muito usado é o da espécie bovina, onde a vida embrionária dura em média 120 a 140 dias, com uma camada de células somáticas, originárias do epitélio celômico, garantindo a formação dos folículos primordiais (RÜSSE, 1983; SILVA, 2002). Uma vez iniciada a foliculogênese, ela tem como destino assegurar a liberação do oócito maduro, que já se encontra apto para a fertilização e subsequentemente desenvolvimento embrionário (ROSSETTO et al., 2011).

Estudos realizados por GINTHER, (1992), acreditava que os folículos ovarianos não atrésicos que resultavam do estágio fetal, iniciavam seu desenvolvimento ininterruptamente de forma independente e totalmente aleatória das fases de ciclo estral ou gestação. Atualmente este conceito

modificou, segundo os autores (AUSTIN; SHORT, 1982; GINTHER, 1992; CARMO, 2007), relataram que os grupos de folículos iniciam seu desenvolvimento de forma sincronizada em determinados períodos do ciclo estral, das mais variadas espécies.

Na maioria das espécies, o ovário é dividido em duas regiões importantes, região medular (medula) e a região cortical (córtex). A porção medular está localizada na região interna do ovário, constituída por tecido conjuntivo, com vasos linfáticos e nervos sanguíneos. A região cortical está localizada na parte externa do órgão, pouco vascularizado, caracterizado pela presença de estroma, folículos ovarianos e corpos lúteos em diferentes fases e estágios de desenvolvimento (Figura 6) (FIGUEIREDO, 2008; PAZ, 2016).

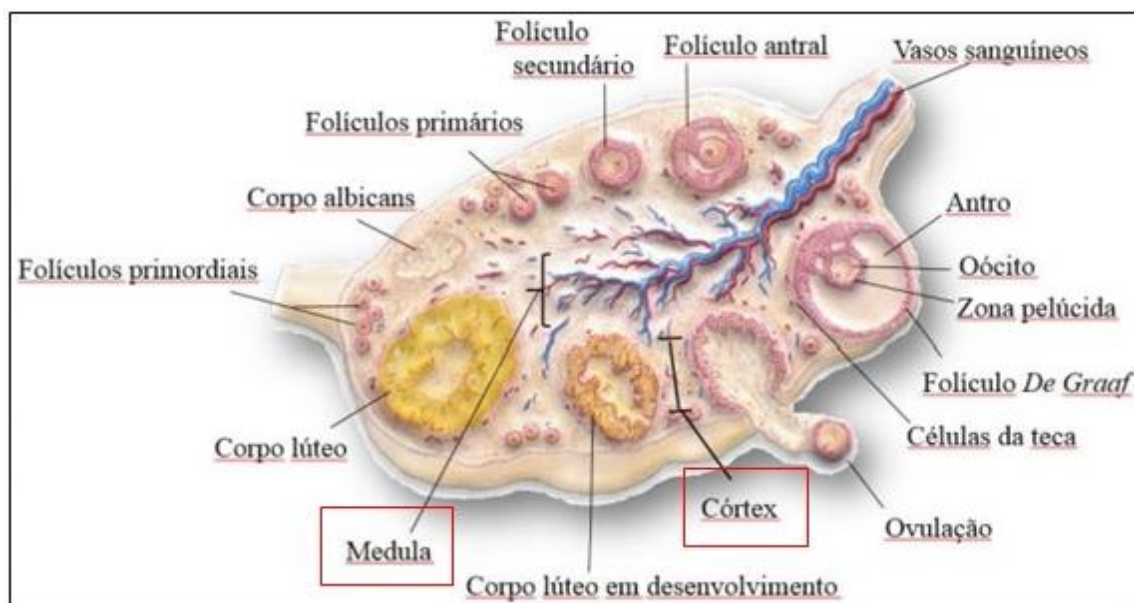


Figura 6. Morfologia ovariana. Adaptado de FIGUEIREDO, 2008.

O folículo ovariano é composto por um oócito rodeado por células somáticas (granulosa e teca). No decorrer do processo de foliculogênese, a morfologia dos oócitos é alterada, onde o mesmo muda de tamanho e as células da granulosa circundantes se modificam e se multiplicam e adquirem capacidade esteroidogênica (HICKEY et al., 2005; BRISTOL – GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. 2006; ROSSETTO, 2011)

Dentro da foliculogênese, há alguns hormônios gonadotróficos e esteroidogênicos que controlam todo esse processo. O hipotálamo produz o

GnRH no sistema porta hipotalâmico-hipofisário, com a função de estimular a síntese de liberação de gonadotripinas: FSH e LH, encarregadas da maturação folicular, produção de estrógeno, ovulação e luteinização do CL (GOMES et al. 2012).

O FSH e LH chegam até os ovários por meio da corrente sanguínea e consequentemente estimulam o crescimento folicular até a chegada do estágio de folículos pré-ovulatórios. A elevação dos níveis de estrógenos é baseada no crescimento folicular, estimulando a liberação do pico pré-ovulatório de LH, responsável pela maturação folicular e ovulação em ruminantes domésticos (HAFEZ, 1993; SILVA, 2002). Tanto o FSH como o estradiol, são importantes para que os folículos escapem da atresia e cheguem ao estágio pré-ovulatório (CHENG et al., 2002; LIMA-VERDE et al., 2011).

O crescimento folicular na grande maioria é representado pelos folículos primordiais, é representado por (95%) da população folicular existente no ovário, constituído por um *pool* de reserva ou de folículos quiescentes (HICKEY et al.; 2005). Segundo RÜSSE (1983) o *pool* de folículos em crescimento consiste em folículos primário, secundário, terciário, pré-ovulatório.

Segundo FINDLAY et. al., (2000), os folículos são determinados como independentes ou dependentes de gonadotrofinas, dos quais ajudam no crescimento folicular. Durante a fase denominada de pré-antral os folículos se desenvolvem independente da ação das gonadotrofinas, logo após a formação do antro folicular o crescimento dos folículos advém mediante estimulação dos hormônios gonadotróficos.

O desenvolvimento folicular relatado em espécies monovulatórias caracterizou por três fases distintas: primeira fase relacionada com a ativação do folículo primordial, a segundo ocorrendo o recrutamento e crescimento folicular e na terceira fase ocorrendo a seleção de um ou mais folículos dominantes e a atresia dos folículos subordinados (GINTHER; BERGFELT 1993; CARMO, 2007).

A folliculogênese ocorre conjuntamente à oogênese, inicia-se após e termina antes da oogênese, pode ser dividida em duas fases: 1) fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento os folículos primários e secundários; 2) fase antral, subdivididos em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários ou de Graaf (figura 7) (HULSHOF et al.,

1994; FIGUEIREDO et al., 2008; GOMES et al., 2012; SANTOS, 2014).

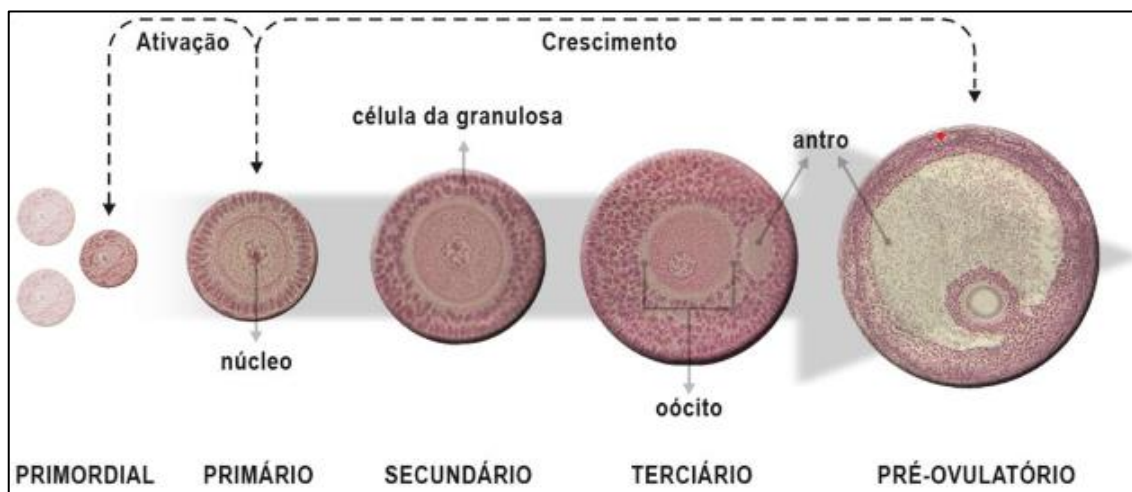


Figura 7. Etapas da ativação e desenvolvimento folicular. Adaptado de (ROSSETTO, 2011).

De acordo com os autores (PICTON, 2001; ROSSETTO, 2011), os folículos primordiais são constituídos por um oócito esférico, circundado por células da granulosa, com células epiteliais achatadas em torno do oócito, conta com um núcleo evidente em posição central, podendo até mesmo notar a presença do nucléolo. A zona pelúcida nesse estágio não é possível ser observada totalmente (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; ROSSETTO, 2011). Em comparação em outras espécies, o tamanho do diâmetro dos folículos primordiais em bovinos pode chegar em média de 35,23 mm (BRAWTAL; YOSSEFI, 1997; ROSSETTO, 2011), em ovinos 18,00 mm (AMORIM et al., 2000; ROSSETTO, 2011) e a 21,50 mm em caprinos (LUCCI et al., 1999).

Os folículos primários em crescimento, representa uma variedade de transformações moleculares e subcelulares, dentre as transformações ocorre o aumento do volume nuclear dos oócitos, o aumento das mitocôndrias, crescimento do retículo endoplasmático e complexo de Golgi (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2011). São caracterizados pela presença de uma única camada de células da granulosa com morfologia cúbica em torno do oócito, com diâmetro médio de 55,06 μm , e 34,70 μm em bovinos (BRAW-TAL; YOSSEET, 1997), 35,01 μm ovinos (AMORIM et al., 1999) e 34,70 μm em caprinos (LUCCI et al., 1999), respectivamente. Não produz hormônios esteroides, passa a responder

às gonadotrofinas, na presença do FSH o folículo primário se desenvolve e passa então para o folículo secundário.

Os folículos secundários em sua apresentação aparecem como um oócito circundado por duas ou mais células da granulosa (células pequenas e de aparência cubica). As células da teca (células grandes e alongadas) estão presentes em torno da membrana basal (SCARAMUZZI et al., 1993) podendo identificar a membrana hialinizada conhecida como zona pelúcida ao redor do oócito (GONÇALVES et al.; 2001). Nesse processo há a associação dos estrógenos juntamente com as gonadotrofinas, formando duas ou mais camadas constituindo a células da granulosa (DRUMMOND, 2006; MOTTA, 2016). Essa fase as células foliculares aumentam a expressão do receptor para o FSH, essencial para dar continuidade ao desenvolvimento do folículo, estimulando a atividade mitótica e a formação do fluido folicular. O FSH é responsável nessa fase por promover o aumento de receptores para o LH, exemplo representado em porca, onde os novos receptores aumentam de 300 em folículos pré-antrais para 10.000 folículos pré-ovulatório (HAFEZ; HAFEZ, 2004; MOTTA, 2016).

O diâmetro dos folículos secundários pode variar de 81 a 250 μm em bovinos (BRAW-TAL, YOSSEET, 1997) 66,03 μm ovinos e 58,94 μm em ovinos (AMORIM et al., 1999) e caprinos (LUCCI et al., 1999), respectivamente. Em bovinos e ovinos os folículos terciários são poucos dependentes de gonadotrofinas, isso até que o processo de crescimento inicial atinja o diâmetro de 3 μm . O próximo processo é a fase de recrutamento seleção e dominância que ocorre em intervalos regulares (FORTUNE, 1994; SILVA, 2002).

Durante o desenvolvimento folicular, ocorre então o aumento da vascularização e atividade mitótica das células da granulosa, a presença de cavidades contendo o fluido folicular, já denominadas anteriormente como antro folicular, passam então a serem identificadas (VAN DER HURK, ZAO, 2005, MOTTA, 2016).

A partir da fase de folículo terciário, o processo seguinte é denominado de folículo antral, que é a junção do folículo terciário com o folículo pré-ovulatório ou conhecido também como folículo de *Graaf*, sua característica é observada pela presença da cavidade antral, que encontra-se expandida devido o aumento do fluido folicular (FIGUEIREDO et al, 2008; PAZ, 2016).

Nos folículos antrais a característica observada é a presença de uma

cavidade em seu interior, repleta de líquido folicular, denominada de antro (SILVA, 2002). O folículo pré-ovulatório presente no último estágio de desenvolvimento folicular, é caracterizado por ser um oócito rodeado de células da granulosa, que nessa fase agora passam a ser chamadas de células do cúmulus (SANTOS, 2014).

2.5 Reserva folicular

Partindo do princípio que ocorre a intensa proliferação das células da granulosa, formando uma cavidade repleta por FF, conhecida como antro (LEITÃO et al., 2009). Os oócitos estão contidos no líquido folicular, no qual sofre o processo de maturação e desenvolvimento. A composição bioquímica do líquido folicular influencia a qualidade dos oócitos, competência oocitária, capacidade de desenvolvimento e qualidade embrionária (ALI et al., 2004, IWATA et al., 2005; KIM et al., 2006; BIANCHI et al., 2013). Também está relacionada à condição fisiológica da fêmea, estágio de desenvolvimento e status funcional do folículo (IWATA et al., 2006; KIM et al., 2006; BIANCHI et al., 2013).

O FF contém moléculas ativas de proteínas que estão relacionadas ao crescimento folicular, fertilização dos oócitos e ao desenvolvimento embrionário. A caracterização proteômica do FF pode determinar biomarcadores para identificar a competência/qualidade dos oócitos e aumentar a taxa de eficiência na fertilização *in vitro* (BIANCHI et al., 2002).

O estágio ovulatório em que os folículos ovarianos chegam é muito baixo. Considera-se que aproximadamente, 99,9% sofrem com o processo degenerativo ou de apoptose mais conhecido como atresia folicular, perpetuando assim um ovário de baixa produtividade (JOHNSON, 2003). Assim, a maioria dos folículos pré-antrais encontram-se em atresia antes ou logo após o nascimento, tendo somente alguns folículos capazes de atingir o estágio ovulatório (ZHOU et al., 2005).

Como a criação de ovinos vem crescendo cada vez mais, é importante haver um aproveitamento do potencial reprodutivo dessa espécie, o qual requer um estudo mais amplo e profundo dos mecanismos que controlam o crescimento e o desenvolvimento folicular da fêmea ovina.

2.6 Composição do líquido folicular

O líquido folicular também denominado de FF, está presente no antro folicular, sendo o maior elemento constituinte do folículo pré-ovulatório (RODGERS et al., 2001), composto por moléculas com baixa massa molecular advindas do soro sanguíneo (SHALGI, 1973). Segundo (Y WU et. al., 2018) o líquido folicular se concentra no antro do folículo ovariano, fornecendo o microambiente necessário para o desenvolvimento dos oócitos, maturação e competência do mesmo, que são obtidos no decorrer do desenvolvimento folicular. O que faz com que os folículos alcancem sua viabilidade e capacitação, está ligada diretamente pela composição bioquímica do fluido folicular presente em sua cavidade antral (CARMO, 2007). Os níveis hormonais presentes no fluido folicular são de grande importância na maturação folicular e consequentemente na maturação oocitária (ASSEY et al., 2005, CARMO, 2007).

Segundo HESS et al., (1998), o FF é composto a partir de produtos de secreção das células da granulosa e da teca e difusão dos capilares que irrigam o tecido ovariano, sendo poroso às proteínas com massa molecular < 500 kDa. De acordo com (IWATA et al., 2006; KIM et al., 2006; BIANCHI et al., 2013) os oócitos estão integrados ao líquido folicular e, sua constituição bioquímica influencia diretamente as características dos oócitos, diretamente relacionado com a condição fisiologia da fêmea, estágio de desenvolvimento e *status* funcional do folículo.

Baseado nos estudos de HENNET; COMBELLES, (2012) e ANDRADE, (2013) foi observado que a composição do FF influencia na capacidade de desenvolvimento do oócito, ou seja, essa afirmativa baseia-se em alguns componentes do fluido folicular a sua importância na diferenciação dos oócitos como: espécies reativas de oxigênio e antioxidantes, hormônios e metabólicos.

As concentrações hormonais presentes no FF influenciam a diferenciação do oócito de duas formas, direta (via ação genômica e não genômica) e indiretamente (através de células somáticas dentro dos folículos). Estudos realizados em humanos (HENNET; COMBELLES, 2012; ANDRADE, 2013), constataram que os principais hormônios que observados no líquido folicular são o FSH, LH, hormônio de crescimento (GH), a gonadotrofina coriônica humana

(hCG), progesterona e estradiol e, em condições elevadas de hCG, FSH e LH beneficiam a maturação do oócito, correlacionado com a alta taxa de fertilização. Relata-se ainda nos estudos de (REVELLI et al., 2009) que em altos níveis de estradiol relacionados aos níveis de andrógenos estão associados com a alta qualidade de oócitos e folículos saudáveis

Os metabólitos presentes no FF encontram-se armazenados dentro dos oócitos, apresentando capacidade de fornecer elementos intracelulares necessários para a diferenciação oocitária, dentre eles os aminoácidos, lipídios, nucleotídeos e demais moléculas advindas do soro, bem como da atividade metabólica das células somáticas foliculares (HENNET; COMBELLES, 2012; ANDRADE, 2013). Com a presença das células da granulosa, teca e células do cumulus influenciam diretamente nas concentrações do FF através deles há uma variabilidade de secreções de moléculas, incluindo proteínas e fatores de crescimento, com efeitos sob os oócitos, na regulação e na retomada da meiose (HENNET; COMBELLES, 2012; ANDRADE, 2013).

A composição do FF é um importante indicativo de qualidade oocitária e embrionária, subentende-se que todo o metabolismo folicular contendo células reguladoras, são cruciais para a efetividade da maturação dos oócitos (WALLACE et al., 2012; ANDRADE, 2013). A identificação de biomarcadores associados a explicações plausíveis para as alterações na composição de metabólitos irão possibilitar então a identificação e padronização de um método mais eficaz e não invasivo de qualidade oocitária (WALLACE et al., 2012; ANDRADE, 2013).

Há relatos segundo OROPEZA et al., (2004) e LOURENÇO (2016), que em fêmeas pré-púberes tem o desenvolvimento dos oócitos de forma reduzida, o que pode ser atribuir a deficiência na tradução de certas proteínas.

Portanto, a composição proteica do FF serve com indicador de atividades secretoras das células foliculares, que conseqüentemente regulam a qualidade folicular (Kim et al., 2013). Portanto há a necessidade de análises mais aprofundadas sobre a composição do FF, onde seguramente fornecerá uma melhor compreensão da foliculogênese no contexto do microambiente em desenvolvimento.

2.7 Proteômica do líquido folicular

O folículo ovariano que se encontra em crescimento necessita de um ambiente adequado para que ocorra a maturação oocitária, com a ajuda de esteroides e peptídeos produzidos localmente ou em lugares diferentes, onde esses são responsáveis por fornecer um meio nutritivo ideal (XIA, YOUNGLAI, 2000; MOURA, 2015).

O ambiente folicular é motivado pelo tipo de gonadotrofina onde ele é exposto durante a fase folicular (AL-INANY et al., 2005). As gonadotrofinas por fim refletem na produção hormonal e consequentemente sobre a produção de bioelementos do fluido folicular. O caso como exemplo, é a associação de genes ligados a apoptose, quando há menor concentração de estrógeno intra-folicular (EVANS et al., 2004). Resultando assim uma maior qualidade oocitária associada a quantidade de estradiol no líquido folicular (SMITZ et al., 2007).

Diferentes estudos já estudaram sobre a concentração de proteínas no líquido folicular (SCHWEIGERT et al., 2006), estudos estes realizados em humanos (HANDRIEDER et al., 2008), bovinos (ZACHUT et al., 2016), búfalos (FU et al., 2016), suínos (SUN et al., 2011), caninos (FAHIMINIYA et al., 2010), equinos (FAHIMINIYA et al., 2011), ovinos (WU et al. 2018) e caprinos (PAULA JUNIOR et al., 2018), com escassos estudos em ovinos.

Há relatos de trabalho em humanos, onde houve a comparação dos diferentes padrões proteicos presentes no fluido folicular de dois grupos de folículos, um imaturo e outro maduro, dentro da metodologia utilizaram análises do tipo Top Down e Bottom-up, que por meio da cromatografia líquida e pré fracionamento dos peptídeos e da cromatografia de massa em linha, identificaram 32 tipos de proteínas. Porém um total de 246 proteínas específicas foram identificadas e correlacionadas e associadas com as respostas imunes e as vias de coagulação (FU et al., 2016).

A correlação funcional entre o oócito e as células que o envolve, particularmente as células do *cumulus*, desenvolve papel importante na maturação (GILCHRIST et al., 2004; LI et al., 2006). Relatos de que a ausência das células do *cumulus*, promove um déficit na síntese de proteínas, refletindo na normalização do ciclo celular (COMBELLES et al., 2005).

Há relatos em cordeiros, onde foram encontrados e identificados alguns

padrões transcriptômicos em células da granulosa em torno de 300 genes expressos de maneira diferente (WU et al., 2017). Porém, ainda não se sabe quais são genes ou proteínas do fluido folicular que chegam a afetar o desenvolvimento e a maturação do oócito. Dessa maneira, seria produtivo se pudesse rastrear o proteoma do fluido folicular, para identificar, portanto, quais são as proteínas de maior relevância. Para isso pode contar com o auxílio das tecnologias de alto rendimento ao exemplo da genômica, metabolômica e proteômica para uma investigação mais detalhada das amostras do fluido folicular (DUTRA et al., 2019).

As proteínas são caracterizadas como macromoléculas mais abundante nas células. Organizadas em várias estruturas sendo elas, primária, secundária, terciária e quaternária e outros tipos de ligações que preveem suas funções, conhecimento esse que favorece os processos laboratoriais e biotecnologias ligadas com a reprodução (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).

2.8 Considerações finais

Apesar de muitas proteínas serem já identificadas, muitas questões ainda precisam ser explanadas como as suas funções fisiológicas, momento de atuação e a sua finalidade no líquido folicular de ovelhas.

Visto que, vários estudos de expressões de transcritos relacionados com diferentes processos celulares já foram determinados, porém a expressão de proteínas ainda necessita ser elucidada por ainda ser muito complexa.

3 HIPÓTESE E OBJETIVO

3.1 Hipótese

O desenvolvimento folicular de ovelhas influencia o perfil de proteínas do líquido folicular?

3.2 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil proteico do líquido folicular de ovelhas em dois

diferentes *status* de desenvolvimento dos folículos (pequenos: ≤ 4 mm e médios folículos: 4 - 6 mm), utilizando estratégia Shotgun ESI-Q-TOF MS/MS.

3.3 Obejtivo Específico

Identificar as proteínas do fluido folicular ovariano de ovelhas por espectrometria de massas.

4. REFERÊNCIAS

ADASHI, E.Y; RESNICK, C.E.; BRODIE, A.M.H.; SVOBODA, M.E.; VAN WYK, J.J. Somatomedin-C-Mediated Potentiation Of Follicle-Stimulateng Hormoneinduced Aromatase Activity Of Cultured Rat Granulosa Cells. **Endocrinology**. 117, 2313-2320, 1985.

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.

ANDERSEN, M.M.; KROLL, J.; BYSKOV, A.G., FABER, M. Protein Composition In The Fluid Of Individual Bovine Follicles. **Journal Reproduction. Fertility**. v.48, p.109-118, 1976.

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.

ASSEY, R.J.; HYTTEL, P.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M. Oocyte structure and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. **Molecular Reproduction and Desenvopment**, v 39 (1), p. 8-16 , 2005.

ALTELAAR, A. F.; MUNOZ, J.; HECK, A. J. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. **Nature Reviews Genetics**. v. 14, no. 1, p. 35-48, Jan 2013.

AUSTIN, C.R; SHORT, R.V. Germ cells and fertilization. In: **Reproduction in mamals**. Book 1, Germ cells and fertilization, 2 ed., editora Cambridge University Press, 1982, p.101.

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 in route for oocyte quality evaluation. **Journal of Proteomics**, v.90, p.61-76, 2013.

BRISTOL – GOULD, S. & WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**. 66:5 – 13. 2006.

CARMO, M. T. Estudo do Fluido Folicular, Transporte, Recuperação e Maturação de Oócitos em Éguas Superovuladas Com o Extrato de Pituitária Equina. **Tese (Doutorado)**. 203. Repositório Institucional **UNESP**. 2007. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105971/carmo_mt_dr_botfmvz.pdf;jsessionid=83BF863C843995B0433BDDD82F1B630E?sequence=1 Acesso em: 10 agosto 2020

CHENG, G.; WEIHUA, Z.; MAKINEN, S.; MAKELA, S.; SAJI, S.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A.; HOVATTA, O. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. **Biology Reproduction**, v.66, p.77- 84, 2002

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

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. 1349–1358, 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.

DUTRA, G. A.; ISHAK, G. M.; PECHANOVA, O.; PECHAN, T.; JACOB, J. C. F.; WILLARD, S.T.; RYAN, L. P.; GASTAL. E.L.; FEUGANG, J. M. Seasonal variation in equine follicular fluid proteome. **Reprod Biol Endocrinol**;17 (1):29. Published 2019 Mar 6. DOI:10.1186/s12958-019-0473-z Disponível em: [http:// https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-019-0473-z](http://https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-019-0473-z). Acesso em: 08 agostos de 2020.

DRUMMOND, A.E. The role of steroids in follicular growth. **Reproductive Biology Endocrinology**, v. 4, p. 1-11, 2006.

EMIDIO, N. B; CARPENEZ, A. G.; QUELLIS, L. S.; FARANI, P. S.; VASCONCELOS, E. G.; PINTO, P. F. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, n. 3 e 4, p. 101-111, jul. /dez. 2015. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/hurevista/article/view/2482/831>. Acesso em: 13 agosto 2020.

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. DOI: 10.1095/biolreprod.103.025114 Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/70/5/1475/2712795> Acesso em: 08 julho 2020.

FAILS, A.D; MAGEE, C. Fradson – **Anatomia e Fisiologia dos Animais de Produção**. Guanabara Koogan. 8.ed. p. 354, 2019.

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. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v.8, p.132, 2010. DOI: 10.1186/1477-7827-8-132 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2990747/> Acesso em: 05 agosto de 2020.

FAHIMINIYA, S.; GÉRARD, N. Le liquide folliculaire chez les mammifèresFollicular fluid in mammals. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**. v. 38, n.6, p. 402-404, 2010. DOI: 10.1016/j.gyobfe.2010.04.010 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1297958910001487#:~:text=Le%20liquide%20folliculaire%20est%20un,de%20la%20granulosa%20se%20diff%C3%A9rencient>. Acesso em: 05 agosto 2020.

FAHIMINIYA, S.; REYNAUD, K.; LABAS, V.; BATARD, S.; CHASTANT-MAILLARD, S.; GÉRARD, N. Steroid hormones content and proteomic analysis of canine follicular fluid during the preovulatory period. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, p. 132- 146, 2010. DOI: 10.1186/1477-7827-8-132. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2990747/> Acesso em: 05 agosto 2020.

FERNANDES, C. A. C; OBA, E, FERREIRA, A. M; URIBE-VELAQUEZ, L. F.; VIANA, J. H. M. Taxa de ovulação e concentração plasmática de progesterona em fêmeas bovinas imunizadas com líquido folicular suíno. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. vol.54 nº.6 Belo Horizonte, Dezembro 2002. DOI: 10.1590/S0102-09352002000600007. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352002000600007&script=sci_abstract&lng=pt . Acesso em: 09 julho 2020.

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. DOI: 10.1186/1471-2105-8-252 Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2105-8-252#citeas>. Acesso em: 03 agosto 2020.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C.1087 A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: Gonçalves, P. B.D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Roca, 2ª edição, p. 303–327, 2008

FONSECA, J. F., Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 16, 2005. Anais: Palestras

FONSECA, J. F.; SOUZA, J. M. G.; BRUSCH, J. H. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e Caprinos. **II Simpósio de Caprinos e Ovinos da EV-UFG**, 2007.

FORTUNE, J. E. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p. 225-232, 1994.

FU, Q.; HUANG, Y.; WANG, Z.; CHEN, F.; HUANG, D.; LU, Y.; LIANG, X.; ZHANG, M. Proteome profile and quantitative proteomic analysis of buffalo (*Bubalus bubalis*) follicular fluid during follicle development. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 17, n.5, p. 618-638, 2016. DOI: 10.3390/ijms17050618 Disponível em: [http:// https://www.mdpi.com/1422-0067/17/5/618](http://https://www.mdpi.com/1422-0067/17/5/618). Acesso em: 05 agosto 2020.

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.

GOMES, M. G. T.; SOUZA, F. A.; FERREIRA, D. A.; HENRY, M. R. J. M.; BORGES, I.; COLEHO, L. C. T.; MACIEL, K. A. Foliculogênese Em Ovelhas: Fatores De Estímulo E Inibição Do Crescimento Folicular. **Ciência Veterinária dos Trópicos**. v. 15, no 1/2/3, p. 1-10. 2012.

GINTHER, O.J. Reproductive Biology of the Mare - Basic and Applied Aspects. In. **Reproductive Biology of the Mare - Basic and Applied Aspects**, 20 ed. Cross Plains: Equiservices, 1992, 640p.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine estrous cycles. **Journal Reproduction. Fertility**. v. 99, p. 105-111, 1993.

GONZÁLEZ, F. H. D. Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

GRANADOS, L. B. C.; DIAS, A. J. B.; SALES, M. P. Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. **PROEX/UENF**, Campos dos Goytacazes, RJ. p. 54, 2006.

GRANADOS, L. B. C.; DIAS, A. J. B.; SALES, M. P. Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. In: **Capacitação dos técnicos e produtores do Norte e Noroeste Fluminense em Reprodução de Caprinos e Ovinos**. 1. ed. Campos dos Goytacazes: 2006. 54p.

PAZ, M. P. Transfecção De Folículos Secundários Ovinos Para Atenuação Da Aquaporina 3 Por Rnai E Seu Efeito Sobre O Desenvolvimento Folicular In Vitro. **VETTESSES | ID: vtt-203233** Dissertação (**Mestrado**). Univerdidade Estadual do Ceará. 2016.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Foliculogênese, maturação oocitária e ovulação. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. Manole, v. 7, p. 69-82, 2004.

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. DOI: 10.1021/pr070277z Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr070277z?casa_token=IMcwGJAegVEAAAAA%3AHPVNycM4sjuEdYI9B4qFsr7diGkKWg0jc7P-

Zo_yUo43NGnJekjgManxKRjOyanv1x5O9PNe4CmxVkg&. Acesso em: 03 agosto 2020.

HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. H. The Antral Follicle: A Microenvironment for Oocyte Differentiation. **The International Journal of Developmental Biology**. v.56, n. 10-12, p. 819-31, 2012.

HICKEY, T. E., MARROCCO, D. L. & AMATO, F. et al. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte - secreted factors and growth differentiation factor - 9 on porcine granulosa cells. **Biology. Reproduction**. 73: 825 - 832. 2005.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BEKERS, J.F. et al. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Questions and Answers Archive**, v. 2, n. 16, p. 78-80, 1994.

HOMA, S.T.; BROWN, C.A. Changes in Linoleic Acid During Follicular Development and Inhibition of Spontaneous Breakdown of Germinal Vesicles in Cumulus-Free Bovine Oocytes. **Journal Reproduction Fertility**, v. 94, p. 153 – 60, 1992. DOI: 10.1530/jrf.0.0940153. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1552477/>. Acesso em: 03 agosto 2020.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Guanabara Koogan, v. 11, p. 431- 451, 2011.

SOUZA-JÚNIOR, A.; GIRÃO, R. N. Manejo das crias de caprinos e ovinos. ed. **Sebrae**. Plug Propaganda. 2003. 36 p. Aprisco, 1.

KLEIN, P.; DELISI, C. Prediction of protein structural class from the amino-acid sequence. **Biopolymers**, v.25, p.1659–1672, 1986.

KNIGHT P.G. & GLISTER C. Potential regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. **Reproduction**, 121: 503 - 512. 2001.

KURGAN, L.A.; ZHANG, T.; ZHANG, H.; SHEN, S. RUAN, J. Secondary structurebased assignment of the protein structural classes. **Amino Acids**, v.35 p.551–564, 2008.

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.

KIM, Y. S.; GU, B. H.; CHOI, B. C.; KIM, M. S.; SONG, S.; YUN, J. H.; BAEK, K. H. Apolipoprotein A-IV as a novel gene associated with polycystic ovary syndrome. **International Journal of Molecular Medicine**, 31, 707–716, 2013.

LAGO, G.; LAFAYETTE, J. W. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos. 2000. **Online**. Disponível em: <http://www.serratalhada.net>. Acesso em: 25 de julho de 2020.

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.

LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.35, n.4, p.472-482, out./dez. 2011. Disponível em www.cbpa.org.br

LOBATO, E.; FERRO, R. A. C.; SANTOS, K. J. G.; COSTA, M. A.; FERRO, D. A. SANTOS, A. P. P. Fisiologia reprodutiva de ovinos. **PUBVET**, V. 7, N. 15, Ed. 238, Art. 1573, agosto, 2013.

LOURENÇO, T. T. Estudo proteômico do desenvolvimento folicular de vacas zebuínas não gestantes. Repositório Institucional **UNESP**. 2016. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/146671>>.

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.

MOTA, L. C. B. Avaliação Histológica Da Viabilidade De Folículos Ovarianos Suínos Submetidos A Diferentes Condições De Transporte. 2016. 41. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal do Ceará.

MOURA, D. S., LOURENÇO, T. T., MOSCARDINI, M. M., SCOTT, C., FONSECA, P. O., SOUZA, F. F. Aspectos morfológicos da cervice de ovelhas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 31 (Supl.1):33-38, dezembro 2011.

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.

OLINDA, R. G. Manejo reprodutivo de ruminantes. 2010. **Online**. Disponível em: <http://www.periodicos.ufersa.edu.br>. Acesso em: 24 de julho de 2020.

OLIVEIRA, G. D. M. Fisiologia da Reprodução Bovina e Métodos de Controle do Ciclo Estral. Rio de Janeiro – RJ. 2006, 28. **Dissertação (Lato sensu)** – Universidade Castelo Branco.

OROPEZA, A.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; HADELER, K.G.; NEMANNI, H. Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian insulin-like growth factor-I application. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1634–43, 2004.

PAULA JUNIOR, A.R.; VAN TILBURG, M.F.; LOBO, M.D.P.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; MOREIRA R.A.; MELO, C.H.; SOUZA-FABJAN, J.M.; ARAUJO, A.A.; MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.A.; MOURA, A.A.; FREITAS V.J.F. Proteomic analysis of follicular fluid from tropically-adapted goats. **Animal Reproduction Science**, v. 1, p.1-11, 2018.

PAZ, M. P. Transfecção De Folículos Secundários Ovinos Para Atenuação Da Aquaporina 3 Por Rnai E Seu Efeito Sobre O Desenvolvimento Folicular In Vitro. **Biblioteca Virtual em Saúde**, 2016 **Dissertação (Mestrado)** – UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ.

POMASTOWSKI, P.; BUSZEWSKI, B. Two-dimensional gel electrophoresis in the light of new developments. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 53, p. 167-177, Jan 2014

REVELLI, A.; PIANE, L. D.; CASANO, S.; MOLINARI, E.; MASSOBRIO, M.; RINAUDO, P. Follicular Fluid Content and Oocyte Quality: From Single Biochemical Markers to Metabolomics. **Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E**, v.7, n. 40, p. 4330-7, 2009.

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.

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.

SANTOS, F. C. C; BARCELOS, R. A. D.; Eficiência de protocolos de sincronização de estro em ovelhas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.3, p.202-205, jul./set.2012

SALERMO, A.; DI IORIO, L.; NAZARRO, A. A proteomic analysis of human follicular fluid in women undergoing ivf cycles. *Fertility and Sterility*, v 96, p. 193, 2011).

SANTOS, L. P. Imunolocalização Do Fator De Crescimento Epidermal (Egf) Em Ovários Ovinos E Seu Efeito Sobre A Morfologia E O Crescimento In Vitro De Folículos Pré-Antrais Isolados Ou Incluídos Em Tecido Ovariano. Petrolina – PE. 2014. 87 **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal do Vale do São Francisco.

SASA, A. et al. Concentrações plasmáticas de progesterona em borregas lanadas e deslanadas no período de abril a novembro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1150–1156, 2002.

SILVA, J. R. V.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F. & FIGUEIREDO, J. R. Características Morfológicas E Controle Do Crescimento Folicular Durante A Foliculogênese Em Ruminantes Domésticos **Ciência Animal**, 12(2):105-117, 2002.

SUN, Y.L.; PING, Z.G.; LI, C.J.; SUN, Y.F.; YI, K.L.; CHEN, L., LI, X.Y.; WANG, X.L.; ZHOU, X. Comparative proteomic analysis of follicular fluids from normal and cystic follicles in sows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n.5, p. 889-895, 2011. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01760.x Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0531.2011.01760.x?casa_token=uuhF__egZoAAAAAA%3AvctDIpn0F9IFHk1QVQ2R-IDh7kV8poakvTH96teJCoB6i8rtqgldOQa4dlXSqGR2YQI-ht4OW9b-3LA. Acesso em: 05 agosto 2020.

VALLE, E. R. O Ciclo Estral de Bovinos e Métodos de Controle. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-**EMBRAPA**, 1991.

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**. 2000; 118 (2):229-233. DOI:10.1530/reprod/118.2.229 Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/118/2/229.xml> Acesso em: 27 janeiro 2020.

WALLACE, M.; COTTELL, E.; GIBNEY, M.J.; MCAULIFFE, F.M.; WINGFIELD, M.; BRENNAN, L. An Investigation Into the Relationship Between The Metabolic Profile of Follicular Fluid, Oocyte Developmental Potential, and Implantation Outcome. **Fertility and Sterility**, v.97, p.1078–1084, 2012.

WU, Y.; LIN, J.; HAN, B.; WANG, L.; LIU, M.; HUANG, J. Proteomic profiling of follicle fluids after superstimulation in one-month-old lambs. **Reproduction Domestic Animal**.;53(1):186-194. 2018. DOI:10.1111/rda.13091 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29080277/> Acesso em: 03 agosto de 2020.

WU, Y.; LIN, J.; LI, X.; HAN, B.; WANG, L.; LIU, M., & HUANG, J. Transcriptome profile of one-month-old lambs' granulosa cells after superstimulation. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 30, 20–33. 2017.

ZACHUT, M.; SOOD, P.; LEVIN, Y.; MOALLEM, U. Proteomic analysis of preovulatory follicular fluid reveals differentially abundant proteins in less fertile dairy cows. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 139, p. 122-129, 2016. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.03.027

CAPÍTULO 2

PROTEÔMICA DO LÍQUIDO FOLICULAR OVARIANO DE OVELHAS¹

PROTEOMIC OF OVARIAN FOLLICULAR LIQUID FROM THE SHEEP

Alessandra Gomes Souza¹, Viviane Maria Codognoto¹, Caroline Scott¹, Stella Maris
Teobaldo Tironi¹, Ludimila Cardoso Zoccal Janini¹, Fabiana Ferreira de Souza¹,
Marcus Vinicius Niz Alvarez², Eunice Oba¹

¹Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary
Medicine and Animal Science, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, São
Paulo, Brazil

²Biotechnology Institute, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, São
Paulo, Brazil

*Corresponding author: Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction,
School of Veterinary Medicine and Animal Science. Address: Rua Prof. Dr. Walter
Maurício Correa, s/n, Bairro Unesp Campus de Botucatu, CEP 18.618-681, Botucatu,
São Paulo, Brazil. Email: eunice.oba@unesp.br

¹ Artigo redigido segundo as normas da *Animal Reproduction Science*, Ranqueada como A2 pelo QUALIS. Normas disponíveis no link: <https://www.elsevier.com/journals/animal-reproduction-science/0378-4320/guide-for-authors>, exceto para as citações nos textos e a localização das figuras e tabelas.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo quantificar e descrever as proteínas de maior expressão no líquido folicular ovariano de ovelhas. Foram utilizados aproximadamente 294 ovários advindos de abatedouros. A técnica adotada foi a aspiração manual utilizando seringas e agulhas para extração do FF, separando em dois grupos (FOL < 4 mm) e (FOL ≥ 4 – 6 mm). A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método Bradford, onde uma alíquota de 50 µg foi aplicada em gel de poliacrilamida 12% e digeridas nos reagentes específicos para a digestão em gel, adequada a espectrometria de massas Nano-LC-ESI-Q-TOF mass spectrometry. Os dados foram analisados pelo programa MetaboAnalyst 4.0 que de acordo com os dados obtidos, observou no dendrograma componente principal (PCA) e Vip Scores e no Heat Map. Foram identificadas 55 proteínas relevantes, dentre os dois grupos, as proteínas relevantes no grupo (FOL < 4 mm) foram *serum amyloid A-4 protein isoform X1*, *trinucleotide repeat-containing gene 6C protein isoform X2*, *transthyretin* e a *Immunoglobulin v lambda chain, partial*. No grupo (FOL ≥ 4-6 mm) as mais significativas foram *complement component C6*; *serotransferrin isoform X2*; *fibrinopeptide A*; *tetranectin*; *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X1*; *serpin B9 isoform X2*; *alpha-enolase isoform X6*; *serum paraoxonase/arylesterase 1*; *complement factor B*; *complement C3 isoform X2, partial*; *glutathione S-transferase A1*. Concluiu-se entre as proteínas existentes nos dois grupos estudados, onde estão relacionadas com o metabolismo folicular e desenvolvimento do oócito, participando ativamente do processo de ovulação, função folicular e qualidade do oócito.

Palavras-chave: Fêmea; Espectrometria-massas; Proteoma

1. INTRODUÇÃO

Os ovinos (*ovis aires*) foram uma das primeiras espécies a serem domesticadas pelo homem. Com a possibilidade de sua criação, o homem favoreceu-se com o consumo do leite, carne e lã. Desde então, a ovinocultura vem crescendo significativamente no cenário da agricultura moderna brasileira, bem como em ampla expansão mundial, devido a sua alta adaptabilidade a diferentes climas relevos e vegetações (Gadelha et al., 2020).

A principal origem do fluido folicular (FF) é sanguínea, partindo do princípio onde ocorre intensa proliferação das células da granulosa e teca, formando uma cavidade repleta de líquido, conhecida como antro (Kim et al., 2006; Bianchi et al., 2013; Ferraza et al., 2017). Os oócitos estão contidos dentro do (FF), produzido durante o crescimento folicular com finalidade de desenvolvimento e maturação dos oócitos (Ali et al., 2004; Iwata et al.; 2005).

A composição do FF é bem complexa, com variadas moléculas biologicamente ativas, contendo proteínas reguladoras capazes de afetar o crescimento folicular, maturação, a capacidade de permeabilidade da parede folicular e até mesmo a ovulação (Ferraza et al., 2017). A importância da descrição da proteômica do FF é poder identificar e determinar marcadores de acordo com a competência e qualidade dos oócitos, com o objetivo de aumentar a taxa de eficácia na fertilização *in vitro* (Bianchi et al., 2002).

Os primeiros estudos foram realizados em líquido folicular de humanos, com o intuito de comparar os padrões complexos de proteínas existentes nos folículos imaturos e maduros (Handrieder, 2008). Já em animais, as pesquisas realizadas foram em bovinos (Zachut, et al., 2016). búfalos (Fu et al., 2016); suínos (Sun et al.; 2011), caninos (Fahiminiya et al., 2010), equinos (FAHIMINIYA et al., 2011), ovinos (Wu et al., 2018) e caprinos (Paula Junior et al., 2005)

Em vista disto, foi então elaborada a hipótese se o perfil de proteínas do FF ovariano interfere ou influencia no desenvolvimento folicular de ovelhas. Com o objetivo de caracterizar o perfil proteico do FF em dois diferentes *status* de desenvolvimento, onde 294 ovários foram aspirados e os folículos classificados entre pequenos ≤ 4 mm e médios folículos ≥ 4 a 6 mm.

Em vista da ausência de estudos sobre o perfil proteômico do fluido folicular de ovelhas é de grande interesse continuar as pesquisas para investigar a composição do perfil proteico do fluido folicular ovariano na finalidade de ajudar a otimizar

futuramente a eficácia na produção *in vitro* de embriões.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Reagentes

Os reagentes usados foram caracterizados com alto grau de pureza e adquiridos das empresas GE Healthcare (Uppsala, Suécia), Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) e BD Pharmingen (São Paulo, Brasil), quando não, foram citados.

2.2. Aspectos éticos

Os aspectos éticos estão de acordo com os recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Institucional, sob o protocolo nº 0112/2019.

2.3. Desenho experimental

O estudo seguiu o desenho experimental representado na Figura 1.

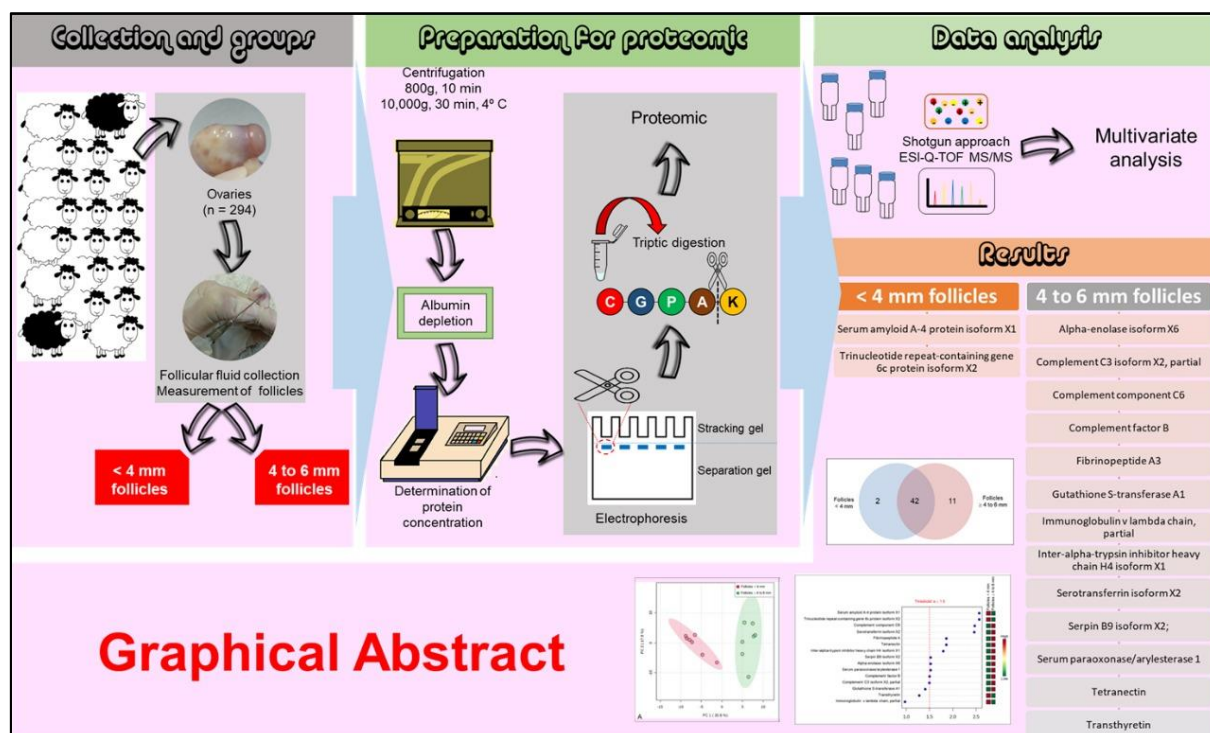


Figura 1. Desenho experimental.

2.4. Colheita das amostras

Foram colhidos 294 ovários de ovelhas nulíparas de um abatedouro comercial. Imediatamente após o abate os ovários foram removidos do útero (Figura 2) utilizando um bisturi e mantidos em garrafas térmicas contendo solução salina de 0,9% NaCl para o transporte até o laboratório (máximo de 3,5 horas) em caixas térmicas.

No laboratório, os ovários foram retirados das garrafas térmicas e os folículos foram mensurados com paquímetro digital. O líquido folicular foi colhido com seringa 30 x 0,70 acoplada a uma agulha 22G e divididos em dois grupos de acordo com o diâmetro folicular (pequenos: < 4 e médios: ≥ 4 a 6 mm). As amostras foram centrifugadas a 800g por 10 minutos para retirada dos *debris* celulares e o sobrenadante foi recentrifugado a 10.000g, durante 30 minutos, a 4° C para eliminar qualquer resto celular. O sobrenadante foi colhido e armazenado a -80° C.

2.6. Preparação das amostras para proteômica

As amostras foram descongeladas e submetidas a depleção de albumina de acordo com Colantonio et al. (2005). A seguir, a concentração de proteína total foi mensurada pelo método de Bradford (Bradford Reagent, B6916, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Então, uma alíquota de 50 µg foi submetida a eletroforese unidimensional sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), em gel de separação contendo 12% de poliacrilamida. A corrida foi conduzida a 12 mA por gel e 300V de voltagem máxima e interrompida quando as amostras atingiram o gel de separação, formando uma banda única. A banda foi recortada e as proteínas digeridas de acordo com Shevchenko et al. (1996), com modificações. As bandas foram descoradas em metanol 50% associado com ácido acético 2,5%, por 4 vezes. A amostra foi desidratada com acetonitrila 100% e a redução de pontes dissulfeto foi realizada com DTT. A alquilação foi feita com iodoacetamida e a digestão com tripsina (20 ng/µL, 1: 50 tripsina/substrato) *overnight*. A extração foi conduzida com ácido fórmico 5%, as amostras concentradas (Integrated Systems SPD1010 SpeedVac™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e estocadas -80° C.

Para a espectrometria de massas *shotgun* as amostras foram diluídas a 0.7 µg proteína/µL em ácido fórmico 0,1%, homogeneizadas e centrifugadas a 1.100 g por 5 minutos. Uma alíquota contendo ~ 3.2 µg de proteína foi usada para separação em uma coluna C18 (100 µm x 100 mm) RP nano UPLC (NanoAcquity, Waters Corporation, Milford, MA, USA) acoplada a um espectrômetro Q ToF Premier (Waters Corporation, Milford, MA, USA) e nanoelectrospray em um fluxo de 0,600 µL/min. Um

gradiente 2 a 90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico foi mantido durante 45 minutos. A voltagem no nanoelectrospray foi de 3.5 kV e um cone de voltagem de 0 V a 100 μ C, no modo *top three*, no qual um espectro de MS foi adquirido, seguido pelo MS/MS dos 3 mais intensos picos detectados. Após a fragmentação MS/MS, os íons foram colocados numa lista de exclusão durante 60 segundos. Para a análise de clivagem endógena dos peptídeos foi usado tempo-real de deleção. Os espectros foram adquiridos usando o programa MassLynx v.4.1 e os dados brutos foram convertidos para *peak list format* (mgf), sem adição de *scans*, e analisados no programa Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltda, Boston, MA, USA) usando a taxonomia *Ovis aries* no UniProtKB (www.uniprot.org, Boutet et al., 2016). Os parâmetros de procura incluíram a tripsina como protease, com no máximo uma 1 clivagem permitida; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável; e uma tolerância de 0,1 Da para ambos os íons precursores (MS) e fragmentos (MS/MS), e massa molecular monoisotópica.

2.7. Análise dos dados

A quantificação relativa de cada proteína foi determinada pelo *exponentially modified protein abundance index* (emPAI) (Ishihama et al., 2005), do programa Mascot Distiller (Matrix Science Inc., Boston, MA, USA).

Os dados foram normalizados para excluir os *outliers* por *winsorization*. Proteínas que estavam presentes no mínimo na metade das amostras em cada grupo foram mantidas, caso contrário foram excluídas. Ainda, os *outliers* foram corrigidos por dividir o emPAI de cada proteína pela somatória dos emPAIs da proteína nas amostras do grupo. Então, os dados foram submetidos a análise multivariada de agrupamento não-hierárquico. A análise de componente principal (PCA) descreveu a variação das amostras nos agrupamentos numa *scoring matrix* e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi usada para indicar a projeção de importância variável (*VIP score*). As proteínas mais abundantes em cada grupo foram consideradas com *VIP scores* $\alpha \geq 1.5$ (CHECA et al., 2015). Os resultados da análise de *fold change* (*threshold* 2) e do teste t foram também consideradas e comparadas aos resultados do *VIP score*. A análise multivariada foi executada no programa MetaboAnalyst 3 (Xia; Wishart, 2016).

As proteínas identificadas foram buscadas no banco de dados UniprotKB (www.uniprot.org,br), para obter a anotação da ontologia gênica nas categorias função

molecular, processos biológicos e componente celular. As imagens referentes a ontologia foram obtidas no Panther *version* 10 (<http://www.pantherdb.org>, Thomas et al., 2003).

3. RESULTADOS

A espectrometria de massas identificou um total de 55 proteínas no líquido folicular nos grupos estudados (Figura 3), sendo 2 encontradas apenas nos folículos < 4 mm e 11 nos folículos ≥ 4 a 6 mm.

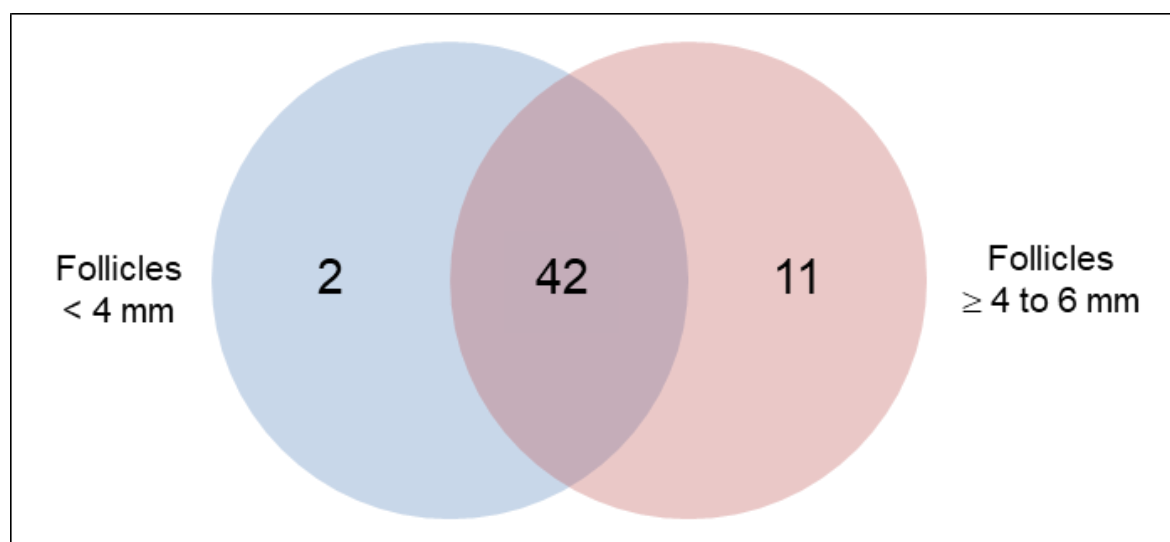


Figura 3. Diagrama de Venn demonstrando as proteínas encontradas no líquido folicular de ovelhas (< 4 mm e ≥ 4 a 6 mm).

A PCA confirmou a separação dos dois grupamentos (folículo < 4 mm e ≥ 4 a 6 mm), na qual a somatória do PC1 e PC2 foi > 50% (53,5%) (Figura 4).

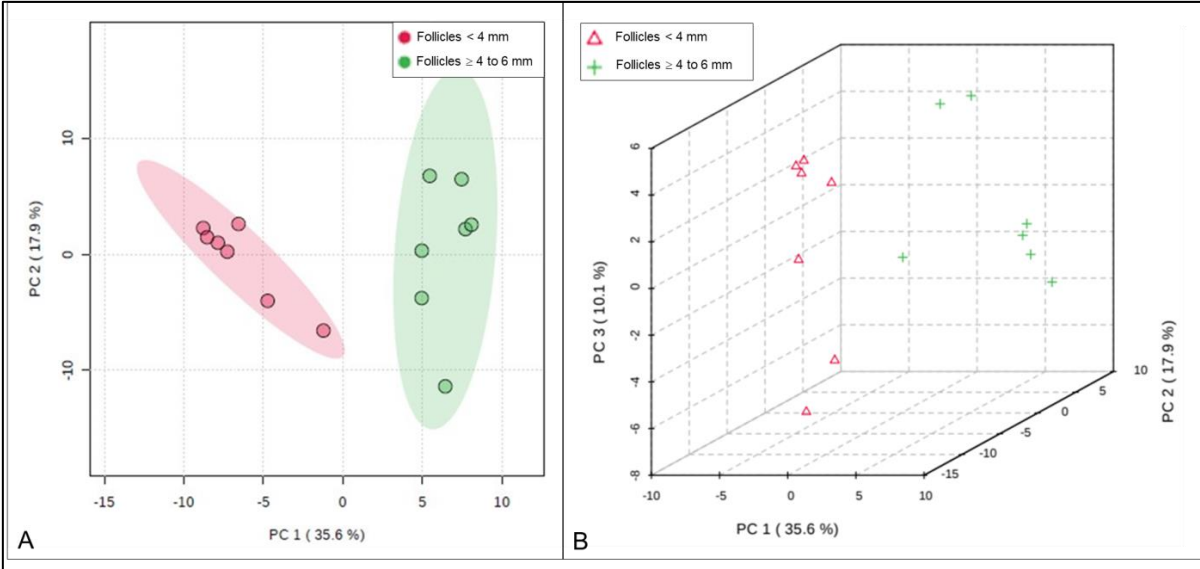


Figura 4. Resultados da análise de componente principal (PCA) 1D (A) e 3D (B). A somatória de PC1 e PC2 foi de 53.5%.

Na análise de PLS-DA foram identificadas 15 proteínas em maior abundância (Figura 5), das quais 12 apresentaram $\alpha \geq 1,5$. No *VIP score*, destas, 2 estavam em maior abundância nos folículos < 4 mm e 10 no grupo de folículos ≥ 4 a 6 mm.

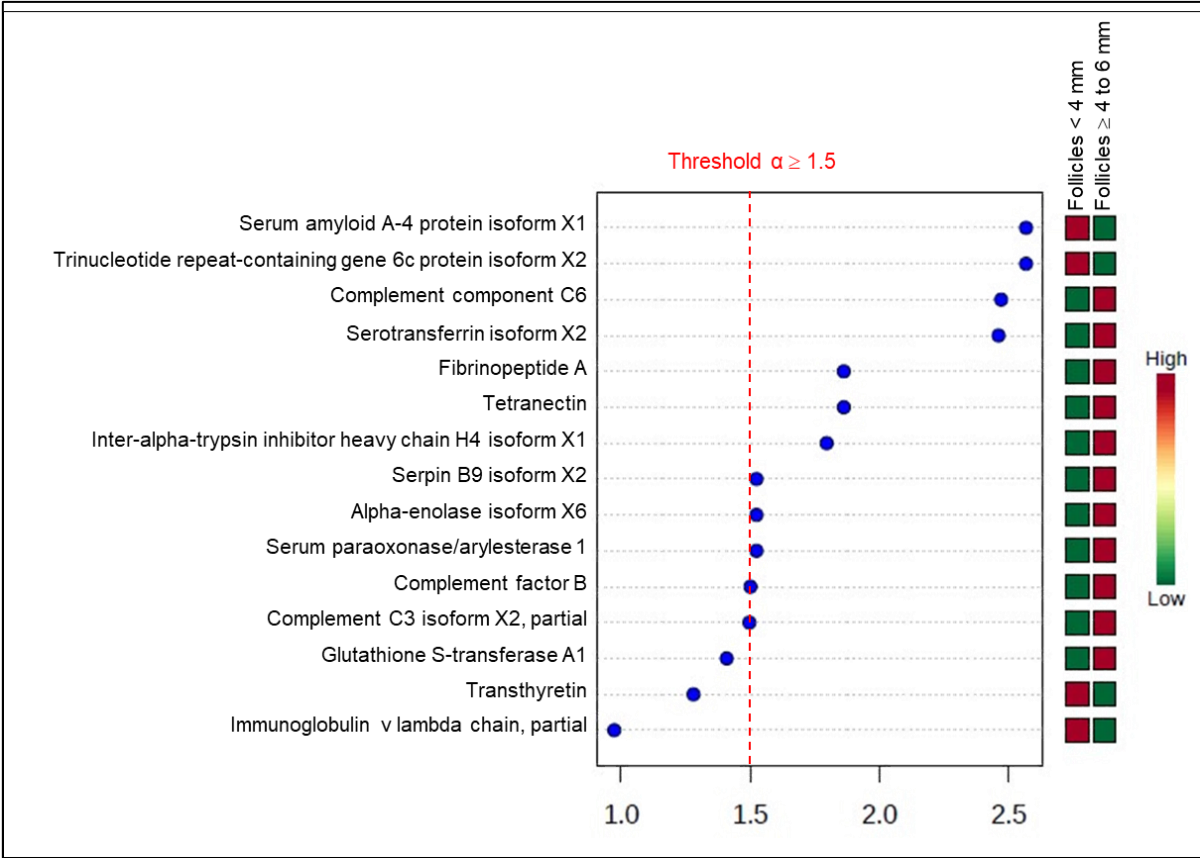


Figura 5. VIP score (projeção de importância variável) classificado pelo PLS-DA. Os boxes coloridos representam as proteínas em cada grupo. *Threshold* considerado significativo foi $\alpha \geq 1,5$. A maior *performance* da análise foi obtida no componente 5, na qual Q2 foi 0,93.

Os resultados da PLS-DA foram comparados aos do *fold change analysis* e teste t (Tabela 1). O *fold change analysis* identificou 16 proteínas em maior abundância e no teste t foram 7.

Tabela 1. Resultados do *fold change analysis* (*threshold* 2) e do teste t e a condição cada proteína nos grupos.

Protein	Fold change ¹	log2(FC) ¹	FDR ²	Group	
				< 4 mm	≥ 4 a 6 mm
Alpha-enolase isoform X6	0.053	-4.249	--	↓	↑
Complement C3 isoform X2, partial	0.048	-4.369	--	↓	↑
Complement component C6	0.051	-4.292	< 0.001	↓	↑
Complement factor B	0.049	-4.337	--	↓	↑
Fibrinopeptide A3	0.053	-4.244	< 0.05	↓	↑
Glutathione S-transferase A1	0.053	-4.244	--	↓	↑
Immunoglobulin v lambda chain, partial	3.158	1.659	--	↓	↑
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X1	0.047	-4.404	--	↓	↑
Serotransferrin isoform X2	0.051	-4.293	< 0.001	↓	↑
Serpin B9 isoform X2	0.050	-4.317	--	↓	↑
Serum amyloid A-4 protein isoform X1	44.693	5.482	< 0.01	↑	↓
Serum paraoxonase/arylesterase 1	0.054	-4.223	--	↓	↑
Tetranectin	0.053	-4.243	< 0.05	↓	↑
Transthyretin	4.485	2.165	--	↓	↑
Trinucleotide repeat-containing gene 6c protein isoform X2	41.740	5.383	< 0.01	↑	↓

¹Resultados do *fold change analysis*. ²Resultados do teste t. (↑) Proteína em maior abundância; (↓) proteína em menor abundância.

A ontologia gênica analisada pelo Panther nos grupos identificou como principal

função molecular atividade catalítica (32% e 30,4%) e de ligação (27% e 30,2%), processo biológico o processo celular (30,5% e 31,4%) e metabólico (28% e 26%) e componente celular a parte da célula (21, 2% e 21%) (Figura 6).

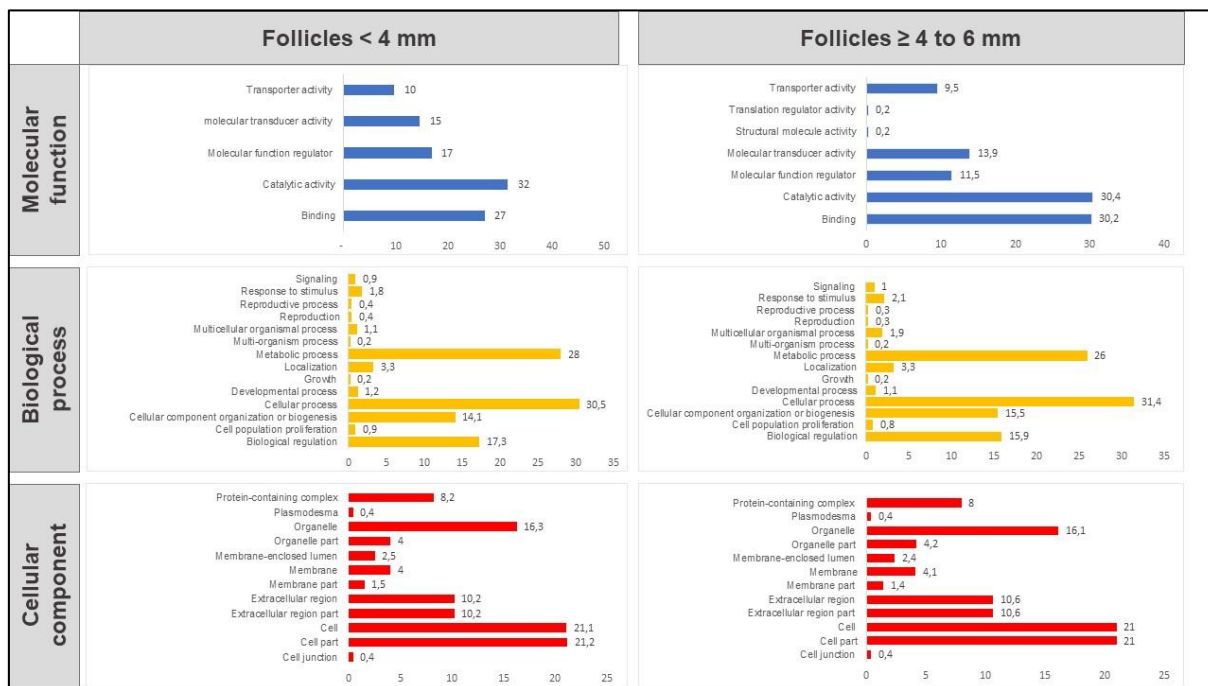


Figura 6. Ontologia gênica de todas as proteínas, nas categorias função molecular, processos biológicos e componente celular, obtida no Panther (<http://www.pantherdb.org>).

A Tabela 2 representa a ontologia gênica, das principais proteínas encontradas nos grupos estudados, nas categorias função molecular, processos biológicos e componente celular.

Tabela 2. Ontologia gênica das principais proteínas encontradas nos grupos estudados.

Protein	Gene ontology ¹		
	Função molecular	Processo biológico	Componente celular
Alpha-enolase isoform X6	DNA-binding transcription repressor activity, RNA polymerase II-specific; enzyme binding; GTPase binding; heat shock protein binding; identical protein binding; magnesium ion binding; phosphopyruvate hydratase activity; protein-containing complex binding; protein homodimerization activity; RNA binding; RNA polymerase II regulatory region sequence-specific	Canonical glycolysis; cellular response to interleukin-7; glycolytic process; in utero embryonic development; positive regulation of binding	Cytosol: Cytosol; phosphopyruvate; hydratase complex. Plasma Membrane: extrinsic component of plasma membrane; plasma membrane; synaptic membrane. Other locations: cell cortex region; cell surface; cytoplasm; growth cone; membrane; membrane raft; myelin sheath; neuron projection

	DNA binding; Biomineral tissue development; cellular response to organic cyclic compound; developmental process involved in reproduction; endochondral ossification; osteoblast differentiation; response to antibiotic; response to vitamin		
Complement C3 isoform X2, partial	C5L2 anaphylatoxin chemotactic receptor binding; endopeptidase inhibitor activit	Amyloid-beta clearance; cell surface receptor signaling pathway involved in cell-cell signaling; complement activation; complement activation, alternative pathway; complement activation, classical pathway; complement-dependent cytotoxicity; complement-mediated synapse pruning; fatty acid metabolic process; inflammatory response; neuron remodeling; positive regulation of activation of membrane attack complex; positive regulation of angiogenesis; positive regulation of apoptotic cell clearance; positive regulation of glucose transmembrane transport; positive regulation of G protein-coupled receptor signaling pathway; positive regulation of lipid storage; positive regulation of phagocytosis, engulfment; positive regulation of protein phosphorylation; positive regulation of receptor-mediated endocytosis; positive regulation of type IIa hypersensitivity; positive regulation of vascular endothelial growth factor production; regulation of triglyceride biosynthetic process; response to bacterium; vertebrate eye-specific patterning	Extracellular space
Complement component C6	Complement activation, classical pathway; cytolysis; innate immune response	-	-
Complement factor B	Serine-type endopeptidase activity	Complement activation	Extracellular region
Fibrinopeptide A3	Cell adhesion molecule binding; metal ion binding; signaling receptor binding; structural molecule activity	Adaptive immune response; blood coagulation; blood coagulation, common pathway; blood coagulation, fibrin clot formation; cell-matrix adhesion; cellular protein-containing complex assembly; fibrinolysis; induction of bacterial agglutination; innate immune response; negative regulation of endothelial cell apoptotic process; negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors;	Endoplasmic reticulum: rough endoplasmic reticulum. Extracellular region or secreted: blood microparticle; collagen-containing extracellular matrix; extracellular space; fibrinogen complex. Plasma Membrane: external side of plasma membrane. Other locations: cell cortex; cell surface; cytoplasm; platelet alpha granule; synapse

		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 smooth muscle cell migration; positive regulation of vasoconstriction; protein-containing complex assembly; protein polymerization; response to calcium ion	
Glutathione S-transferase A1	Glutathione transferase activity	-	-
Ig lambda chain C region (fragment)	-	Complement activation; complement activation, classical pathway	Extracellular region
Immunoglobulin v lambda chain, partial	-	Adaptive immune response; immune response; immunoglobulin production	Extracellular region or secreted: extracellular space. Plasma Membrane: plasma membrane; Other locations: immunoglobulin complex
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X1	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Acute-phase response; hyaluronan metabolic process	Extracellular space
Serotransferrin isoform X2	Ferric iron binding; ferrous iron binding; iron chaperone activity; transferrin receptor binding	Actin filament organization; activation of JUN kinase activity; cellular iron ion homeostasis; cellular response to iron ion; ERK1 and ERK2 cascade; iron ion transport; osteoclast differentiation; positive regulation of bone resorption; positive regulation of cell motility; positive regulation of receptor-mediated endocytosis; positive regulation of transcription, DNA-templated; regulation of iron ion transport; response to bacterium; SMAD protein signal transduction	Endosome: early endosome; late endosome; recycling endosome
Serpin B9 isoform X2	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity involved in apoptotic process; protease binding; serine-type endopeptidase inhibitor activity	Cellular response to estrogen stimulus; immune response; mast cell mediated immunity; negative regulation by symbiont of host apoptotic process; positive regulation of gene expression; protection from natural killer cell mediated cytotoxicity; response to bacterium	Cytosol: cytosol; Extracellular region or secreted: extracellular space; Golgi apparatus: Golgi apparatus; Nucleus: nucleoplasm
Serum amyloid A-4 protein isoform X1	Chemoattractant activity	Acute-phase response; cell chemotaxis	Extracellular region or secreted: extracellular space; high-density lipoprotein particle
Serum	Acyl-L-homoserine-lactone lactonohydrolase activity;	Extracellular region or secreted: extracellular space;	-

paraoxonase/arylesterase 1	aryldialkylphosphatase activity; arylesterase activity; calcium ion binding; high-density lipoprotein particle binding; phospholipid binding; protein homodimerization activity	high-density lipoprotein particle; spherical high-density lipoprotein particle. Other locations: intracellular membrane-bounded organelle	
Tetranectin	Calcium ion binding; carbohydrate binding; heparin binding	Bone mineralization; ossification; positive regulation of plasminogen activation	Extracellular region or secreted: extracellular space; Nucleus: granular componente; Other locations: cytoplasm
Transthyretin	Hormone activity; identical protein binding; thyroid hormone binding	Retinol metabolic process; thyroid hormone transport	Extracellular region
Trinucleotide repeat-containing gene 6c protein isoform X2	RNA binding	Embryonic hemopoiesis; embryonic organ development; endoderm development; endoderm formation; gene silencing by miRNA; miRNA mediated inhibition of translation; positive regulation of nuclear-transcribed mRNA catabolic process, deadenylation-dependent decay; positive regulation of nuclear-transcribed mRNA poly(A) tail shortening; regulation of gene silencing by miRNA	Nucleus: nucleoplasm. Other locations: P-body

¹UniprotKB (www.uniprot.org,br).

A Tabela Suplementar 1 representa a ontologia gênica de todas as proteínas identificadas neste estudo.

4. DISCUSSÃO

Em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que descreve as proteínas do fluído folicular de ovelhas e as correlaciona ao desenvolvimento folicular. Este estudo descreveu 55 proteínas que foram separadas e 2 grupos distintos, folículos < 4 mm e ≥ 4 a 6 mm.

Segundo a ontologia gênica, as funções moleculares das proteínas do FF de ovelhas são as atividades catalítica e de ligação, sendo os principais processos o processo biológico e metabólico, encontrando-se na parte celular. Esses resultados corroboram com resultados encontrados no fluído folicular em búfalas (Kumar et al., 2019) e em cabras (Paula Junior et al., 2017).

Proteínas em maior abundância foram aqueles consideradas em duas análises (*fold change analysis* e *VIP score*). No grupo de folículos < 4 mm foram encontradas 2 proteínas em maior abundância, a *serum amyloid A-4 protein isoform X1* e a

trinucleotide repeat-containing gene 6c protein isoform X2. Já no grupo de folículos $\geq$ 4 a 6 mm, as proteínas *complement component C6*; *serotransferrin isoform X2*; *fibrinopeptide A*; *tetranectin*; *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X1*; *serpin B9 isoform X2*; *alpha-enolase isoform X6*; *serum paraoxonase/arylesterase 1*; *complement factor B* e *complement C3 isoform X2*, *partial* as quais serão discutidas.

A *serum amyloid A-4 protein (SAA) isoform X1* é uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado sendo sua produção induzida por estímulos pró-inflamatórios em diferentes espécies de vertebrados (Uhlir and Whitehead, 1999; Zakerkish et al., 2020). É um mediador pró-inflamatório que desempenha como função a síntese de citocinas e outros mediadores inflamatórios, atuando na defesa imunológica do indivíduo (Eklund et al., 2012). Os RNAs de SAA já foram encontrados em diversos tecidos em hamsters como estômago, musculatura, rim, cérebro, coração, pulmão, intestino, ovário, testículo e útero (Webb et al., 1989; Hardardottir et al., 1997). A isoforma *serum amyloid A-4* foi relatada em alta quantidade no fluido folicular de mulheres com sobrepeso (Liu et al., 2020), além de ser também regulada positivamente durante a ovulação em mulheres (Zakerkish et al., 2020) demonstrando seu envolvimento nesse período e estando fortemente associada à ovulação (Rosewell et al., 2015; Zakerkish et al., 2020). Em búfalas foi também relatada no fluido folicular, desempenhando um papel importante na fisiologia e endocrinologia ovariana, estando envolvida no processo de ovulação (Kumar et al., 2019).

Já a *trinucleotide repeat-containing gene 6c protein isoform X2 (TNRC6c)* é uma proteína da família GW182 (TNRC6A, TNRC6B e TNRC6C) encontrada em vertebrados. A TNRC6A está envolvida na supressão gênica mediada por microRNAs, sendo que sua expressão durante a maturação sexual e crescimento folicular, se mostrou importante em ovários de galinhas (Kang et al., 2017).

O sistema complemento é composto por proteínas da membrana plasmática, sendo responsável pela resposta imune inata no fluido folicular, atuando na angiogênese e desenvolvimento folicular (Jarkovska et al., 2010), além de estar envolvido na defesa inespecífica contra patógenos (Fu et al., 2016). Associado a cascata de coagulação, o sistema complemento desempenha funções de manutenção do ambiente folicular e proteção ao oócito, de modo que mudanças nos níveis de complemento podem dar início ao processo inflamatório que ocorre durante a ovulação o que leva a sua participação direta na lise da parede folicular (Fu et al., 2016). Os *complement component C6*, *complement factor B* e *complement C3*

presentes em nosso estudo, já foram relatados no fluido folicular em humanos (Twigt et al., 2012), sendo o *complement factor B* e *complement C3* também relatado em alta abundância no fluido folicular de ovelhas, cabras e búfalas (Wu et al., 2016; Fu et al., 2016, Junior et al., 2018). Maiores quantidades de proteínas do sistema complemento foram observadas no fluido folicular em vacas no estro, confirmando a hipótese de que a ovulação ocasiona um processo inflamatório local, de modo que o sistema complemento pode auxiliar na ruptura da parede do folículo (Fahmi and Hunter, 1985), além de estar envolvido na capacitação espermática e reação acrossomal (Fahmi and Hunter, 1985; Junior et al., 2018), o que demonstra que as proteínas do complemento desempenham funções importantes durante a fertilização (Junior et al., 2018). Em nosso estudo, proteínas do sistema complemento estiveram em maior abundância proteica no grupo de folículos entre 4 e 6 mm, sendo o mesmo observado em búfalos onde o *complement factor B* e *complement C3* estiveram em maiores quantidades em folículos grandes (>8 mm) (Fu et al., 2016) e em cabras nos folículos médios e grandes (Junior et al., 2018), o que pode ser justificado pela presença de folículos pré-ovulatórios o que desencadeia um processo inflamatório para posterior ovulação.

As transferrinas séricas, conhecidas também como serotransferrinas, são glicoproteínas de ligação ao ferro encontradas em diferentes fluidos do organismo. São sintetizadas pelo fígado (Schaeffer et al., 1987; Hallquist and Klasing, 1994) e participam do transporte de ferro necessário para a síntese de hemoglobina, além de atuar na inibição do crescimento bacteriano, visto que a remoção de ferro ocasionado pelas transferrinas diminui o crescimento e replicação de bactérias (Hallquist and Klasing, 1994). Podem também ser secretadas pelas células da granulosa do folículo ovariano estando intimamente em contato com o oócito (Briggs et al., 1999), onde estimula o desenvolvimento folicular e reduz a produção de espécies reativas de oxigênio causadoras de atresia folicular (de Jong et al., 1990; Tilly, 1998). Em nosso estudo, a serotransferrina esteve em maior abundância proteica no grupo de folículos maiores, sendo o mesmo observado no fluido folicular em cabras o que pode ser ocasionado pelo aumento da proliferação das células da granulosa em folículos maiores durante o crescimento folicular (Junior et al., 2018).

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática formado por cadeias polipeptídicas, fibrinopeptídeo A (FpA) e B (FpB) (Weisel, 2005). É produzido no fígado, sendo distribuído para a maioria dos tecidos e fluidos corpóreos por meio da circulação sanguínea (Weisel, 2005). Em equinos é amplamente utilizado como um

marcador no diagnóstico de inflamação (Borges et al., 2007; Copas et al., 2013). Em nosso estudo, esteve presente em maior abundância no fluido folicular de folículos maiores, podendo estar envolvida com o processo inflamatório ocasionado pela ovulação.

A *tetranectin* é uma proteína de ligação ao plasminogênio (Las Holtet et al., 1997). Já foi relatada na linfa e no colostro em ovinos (Goldfinch et al., 2008; Hernández-Castellano et al., 2013) e no fluido folicular em mulheres (Twigt et al., 2012). Esta atua ativação da plasmina e migração de neutrófilos para locais de infecção (Renckens et al., 2006).

A *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 (ITIH4) isoform X1* é uma proteína da família de inibidores de serina, que tem atividade antiproteolítica e auxilia na manutenção da estabilidade da matriz extracelular funcionando assim como um agente modulador (Ferrazza et al., 2017; Venna et al., 2018). É ainda conhecida como uma proteína de fase aguda encontrada no soro (Pineiro et al., 2004) e fluido folicular em bovinos (Zachut et al., 2016; Ferrazza et al., 2017). Sua baixa concentração no soro em humanos foi correlacionada com câncer de ovário maligno, visto que a ITIH4 liga-se ao ácido hialurônico para manter a estabilidade da matriz extracelular, inibindo o crescimento metastático das células tumorais (Huang et al., 2019). Maior abundância de ITIH foi observada no fluido folicular de vacas com fertilidade reduzida, estando envolvida com a desregulação da matriz de proteínas do complexo cumulus-oócito, o que leva a alteração na sua formação e expansão e consequentemente afeta a qualidade do oócito e fertilidade (Zachut et al., 2016).

Serpins são proteínas inibidoras de endopeptidase do tipo serina, que tem como função manter a homeostase na atividade de proteases, além de participar da diferenciação celular e remodelação da matriz extracelular, e estar intimamente envolvida com a coagulação, fibrinólise e produção de plasmina, sendo deste modo uma proteína importante para o processo de maturação folicular e ovulação. Já foi detectada no fluido folicular em veados, vacas, ovelhas e em humanos (Hayashi et al., 2011; Ambekar et al., 2013; Junior et al., 2018; Souza et al., 2019), de modo que diferentes serpinas podem estar envolvidas no desenvolvimento folicular em diferentes espécies (Ambekar et al., 2013). Em nosso estudo encontramos a *serpin B9 isoform X2* aumentada em folículos maiores (≥ 4 -6 mm), sendo um aumento de serpina (Serpine2) também observado em células da granulosa de folículos dominantes e corpo lúteo em bovinos quando comparados a folículos menores que 4

mm e em búfalos, sendo sua expressão (SerpinD1) maior em folículos grandes quando comparada a folículos pequenos (Fu et al., 2016), sugerindo que serpinas atuam como importantes inibidores de proteases em folículos em crescimento, mantendo um equilíbrio entre proteases e seus inibidores, sendo isso fundamental para o desenvolvimento folicular, ovulação e desenvolvimento do corpo lúteo (Bédard et al., 2003).

A *alpha-enolase isoform X6* (ENO1) é uma enzima glicolítica encontrada na maioria dos tecidos, sendo expressa no ovário em ratas principalmente nas células da granulosa (Yoshioka et al., 2011). É conhecida como uma proteína multifuncional (Pancholi, 2001) que atua no crescimento e maturação folicular, além de sua capacidade de ligação ao plasminogênio (Yoshioka et al., 2011). Foi também relatada em vertebrados sendo necessária para o desenvolvimento embrionário (Finckbeiner et al., 2011). Foi observado um aumento na concentração de ENO1 no fluido folicular de folículos em desenvolvimento, fato este que demonstra que esta glicoproteína pode desempenhar um papel regulador e até ser considerado um biomarcador para o desenvolvimento de folículos em iaques (Guo et al., 2016).

A *serum paraoxonase/arylesterase 1* faz parte da família das lipoproteínas paraoxonase (PON) e possui três genes: o PON1, PON 2 PON 3. São produzidas e armazenadas no fígado, sendo encontradas no sangue ligada as lipoproteínas de alta densidade (HDLs), desempenhando ação antioxidante frente a lipídeos oxidativos tóxicos no organismo, diminuindo o acúmulo de produtos da peroxidação lipídica (Thomás-Moya et al., 2006; Marsillach et al., 2008). A paraoxonase/arylesterase 1 foi identificada no fluido folicular canino e humano (Angelucci et al., 2006; Fahiminiya et al., 2010) estando envolvida com o desenvolvimento folicular e embrionário (Meijide et al., 2017), além de atuar na proteção do folículo contra o estresse oxidativo ocasionado pela ovulação (Angelucci et al., 2006). Sua concentração foi maior em folículos grandes quando comparada aos folículos pequenos em mulheres (Angelucci et al., 2006). O mesmo pôde ser visto em nosso estudo onde observou-se uma maior abundância proteica de paraoxonase/arylesterase 1 em folículos maiores que 4 mm, sendo esta diferença justificada pela diferença bioquímica entre folículos grandes e pequenos o que reflete a diferença no estágio de maturação folicular o que leva a um aumento nas PONs (Thomas et al., 2000; Meijide et al., 2017).

CONCLUSÃO

De acordo com a nossa hipótese inicial o perfil proteico do fluido folicular de folículos em crescimento em ovelhas, levando em consideração o processo biológico e função molecular das proteínas, as proteínas descritas em nosso estudo estão intimamente relacionadas ao metabolismo folicular e desenvolvimento do oócito, participando ativamente do processo de ovulação, exercendo efeitos na função folicular e qualidade do oócito. Deste modo, a técnica de proteômica é uma ferramenta que nos permite definir as funções biológicas de proteínas podendo identificar possíveis proteínas que funcionem como biomarcadores de competência oocitária, auxiliando na seleção de oócitos de qualidade e assim levando a otimização da eficiência na produção de embriões in vitro em cordeiros.

Hipótese

O desenvolvimento folicular de ovelhas influencia o perfil de proteínas do líquido folicular?

3.2 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil proteico do líquido folicular de ovelhas em dois diferentes *status* de desenvolvimento dos folículos (pequenos: ≤ 4 mm e médios folículos: 4 - 6 mm), utilizando estratégia Shotgun ESI-Q-TOF MS/MS.

3.3 Obejtivo Específico

Identificar as proteínas do fluido folicular ovariano de ovelhas por espectrometria de massas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de mestrado.

Ao CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais) de Campinas, pelo apoio e realização da proteômica.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

414

415

416

417

418

419

420

421

REFERÊNCIAS

- 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, 596–1606, 2004. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.03.011.
- ALMEIDA, A.; ECKRESALL, D.; BENCUROVA, E.; DOLINSKA, S.; MLYNARCIK, P.; VINCOVA, M.; BHIDE, M. Proceedings of the 4th Management committee meeting and 3rd meeting of working groups 1, 2 & 3 of COST action FA1002. **Farm Animal Proteomics** 2013. DOI: 10.3920/978-90-8686-776-9.
- AMBEKAR, A. S.; NIRUJOGI, R. S.; SRIKANTH, S. M.; CHAVAN, S.; KELKAR, D. S.; HINDUJA, I.; ZAVERI, K.; PRASAD, T. S.; HARSHA, H. C.; PANDEY, A.; MUKHERJEE, S. Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis. **Journal of Proteomics**. 2013 11;87:68-77. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.05.017.
- ANDERSEN, M.M.; KROLL, J.; BYSKOV, A.G. et al. Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. **Society for Reproduction and Fertility**. 1976. V. 48. Issue. 1. p. 109-118. DOI: 10.1530./jrf.0.0480109.
- ANGELUCCI, S.; CIAVARDELLI, D.; DI GIUSEPPE, F.; ELEUTERIO, E.; SULPIZIO, M.; TIBONI, G. M.; GIAMPIETRO, F.; PALUMBO, P.; DI ILIO, C. Proteome analysis of human follicular fluid. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics**. 2006 V. 1764. Issue 11. p. 775-85. DOI: 10.1016/j.bbapap.2006.09.001.
- AYDILEK, N.; VARIŞL, Ö.; SELEK, Ş.; KORKMAZ, Ö.; ATLI, M. O.; TAŞKIN, A. The Effect of Estrous Cycle on Oxidant and Antioxidant Parameters in Dairy Cows. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**. 2014. V. 20. Issue. 5. 703-709. DOI: 10.9775/kvfd.2014.10947.
- BARBOSA, E. B., VIDOTTO, A., POLACHINI, G. M., HENRIQUE, T., MARQUI, A. B., T., TAJARA, E. H., Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista Associação Medicina Brasileira**. v. 58. n.3. 2012. DOI: 10.1590/S0104-42302012000300019
- BARROS, T.B., D.B. GUIMARÃES¹, L.R.S. ARAÚJO¹, L.F. CANTANHÊDE¹, A.V. DIAS¹, I.B. QUEVEDO FILHO¹, A.A.A. MOURA², R. TONIOLLI. O estudo proteômico e o seu potencial de avaliação da fertilidade em machos de diferentes espécies domésticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 37, 3, 266-271, jul./set. 2013. Disponível em www.cbpa.org.br

BÉDARD, J.; BRÛLÉ, S.; PRICE, C. A.; SILVERSIDES, D. W.; LUSSIER, J. G. Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. **Molecular Reproduction Development**. 2003 V. 64. Issue. 2 p. 152-65. DOI: 10.1002/mrd.10239.

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 in route for oocyte quality evaluation. **Journal of Proteomics**, 90, 61-76, 2013. DOI: 10.1016/J.JPROT.2013.02.025.

BICUDO S. D.; AZEVEDO H. C.; SILVA MAIA M. S.; SOUSA D. B. RODELLO, L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. 33, 127-130. 2005. Disponível em: <<http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/EMPARN/DOC/DOC0000000000001367.PDF>>. Acesso em: 22/09/2019

BOLLAG D. M.; ROZYCKI, M. D.; EDELSTEIN, S. J. Preparation for protein isolation. **Protein Methods**. 2th. Ed. p. 432 Wiley-Liss; 1996.

BORGES, A. S.; DIVERS, T. J.; STOKOL, T.; MOHAMMED, O. H. Serum Iron and Plasma Fibrinogen Concentrations as Indicators of Systemic Inflammatory Diseases in Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 2007. V. 21. Issue 3. p. 489-494. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2007.tb02995.x.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding.

BRIGGS, D.A.; SHARP, D.J.; MILLER, D.; GOSDEN, R. G. Transferrin in the developing ovarian follicle: evidence for de-novo expression by granulosa cells. **Molecular Human Reproduction**. 1999. V. 5 Issue. 12. p. 1107-14. DOI: 10.1093/molehr/5.12.1107.

CAHILL, L. P.; MARIANA, J.C; MAULEON, P. Total folucular populations in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction & Fertility**. 55, 27-36,1979. DOI: 10.1530/JRF.0.550027.

CAHILL, L.P. MAULÉON, P. Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. **Journal of Reproduction & Fertility**. 1980. p. 321-328, DOI: 10.1530/JTF.0.580321.

CARBONARO M. Proteomics: present and future in food quality evaluation. **Trends Food Science Technol**, 15, 209- 216, 2004. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.09.020

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Usin MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis **Current Protocols in Bioinformatics**. p. 128. 68, e86 DOI: 10.1002/cpbi.86.

COLANTONIO, D. A.; DUNKINSON, C.; BOVENKAMP, D. E.; VAN-EYK, J. E. Effective removal of albumin from serum. **Proteomics**. 2005. V. 5. p. 3831-3835. 411 DOI: 10.1002/pmic.200401235.

COPAS, V. E.; DURHAM, A. E.; STRATFORD, C. H.; MCGORUM, B. C.; WAGGETT, B.; PIRIE, R. S. In equine grass sickness, serum amyloid A and fibrinogen are elevated, and can aid differential diagnosis from non-inflammatory causes of colic. **Veterinary Record**. 2013 V. 172. Issue. 15. DOI: 10.1136/vr.101224.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal Animal Science**. 25, 800-805, 1966b. DOI: 10.2527/jas1966.253800x
Estes, S. J., Ye, B., Qiu, W., Cramer, D., Hornstein, M. D., Missmer, S. A. A proteomic analysis of IVF follicular fluid in women ≤ 32 years old. **Fertil Steril**. 2009. p. 1569–1578. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.08.120.

FAHIMINIYA, S.; REYNAUD, K.; LABAS ,V.; BATARD, S.; CHASTANT-MAILLARD, S.; GÉRARD, N. Steroid hormones content and proteomic analysis of canine follicular fluid during the preovulatory period. **Reproductive Biology Endocrinology**. 2010 V. 1. Issue. 8. DOI: 10.1186/1477-7827-8-132.

FAHMI, H. A.; HUNTER, A. G. Effect of estrual stage on complement activity in bovine follicular fluid. **J Dairy Sci**. 1985 V. 68 Issue. 12. p. 3318-22. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(85)81241-8.

FERRAZZA, R.A.; GARCIA, H. D. M.; SCHMIDT, E. M. D. S.; MIHM CARMICHAEL, M.; SOUZA, F. F.; BURCHMORE, R.; SARTORI, R.; ECKERSALL, P.D.; FERREIRA, J. C. P. Quantitative proteomic profiling of bovine follicular fluid during follicle development. **Biology Reproduction**. 2017 V. 97. Issue. 6. p.835-849. DOI: 10.1093/biolre/iox148. PMID: 29149247.

- FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V.
FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R.; ECTORS, F.J; FONTES, R.S.; NUSGENS, B.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**. 40, 789-799, 1993. DOI: 10.1016/0093-691X(93)90214-P
- FINCKBEINER, S.; KO, P. J.; CARRINGTON, B.; SOOD, R.; GROSS, K.; DOLNICK, B.; SUFRIN, J.; LIU, P. Transient knockdown and overexpression reveal a developmental role for the zebrafish *enosf1b* gene. **Cell & Bioscience**. 2011 V.1 26;1:32. DOI: 10.1186/2045-3701-1-32.
- FINDLAY, J. K.; DRUMMOND, A. E.; BRITT, K. L.; DYSON, M.; WREFORD, N. G.; ROBERTSON, D. M.; GROOME, N. P.; JONES, M. E. E.; SIMPSON, E. R. The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 163, 81-87, 2000. DOI: 10.1016/S0303-7207(99)00243-9
- FONSECA, J. F.; SOUZA, J. M. G.; BRUSCHI, J. H. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. In: Simpósio de Caprinos e Ovinos, 2, 2007, **Anais eletrônicos** [online] Belo Horizonte: Escola de Veterinária/UFMG, 2007.
- FU, Q.; HUANG, Y.; WANG, Z.; CHEN, F.; HUANG, D.; LU, Y.; LIANG, X.; ZHANG, M. Proteome Profile and Quantitative Proteomic Analysis of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Follicular Fluid during Follicle Development. **International Journal of Molecular Sciences** 2016. V. 17, 618. DOI: 10.3390/ijms17050618.
- FU, QIANG.; HUANG, YULIN.; WANG, ZHIQIANG.; CHEN, FUMEI.; HUANG, DELUN.; LU, YANGQING.; LIANG, XIANWEI.; ZHANG, MING. Proteome profile and quantitative proteomic analysis of buffalo (*Bubalus bubalis*) follicular fluid during follicle development. **International Journal of Molecular Sciences**. 2016, 17, 618. DOI:10.3390/ijms17050618.
- GOLDFINCH, G. M.; SMITH, W. D.; IMRIE, L.; MCLEAN, K.; INGLIS, N. F.; PEMBERTON, A. D. The proteome of gastric lymph in normal and nematode infected sheep. **Proteomics and Systems Biology**. 2008. V. 8. Issue 9. p. 1909-18. DOI: 10.1002/pmic.200700531.
- GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. **EMBRAPA**. Editora Varela, p.340, 2001.

GUO, X.; PEI, J.; DING, X.; CHU, M.; BAO, P.; WU, X.; LIANG, C.; YAN, P.
Comparative proteomic analysis of yak follicular fluid during estrus. **Asian-Australas
Journal Animal Sciences**. 2016. V. 29. p. 1239-46. DOI: 10.5713/ajas.15.0724.

HARDARDOTTIR, I., SIPE, J., MOSER, A.H., FIELDING, C.J., FEINGOLD, K.R. &
GRUNFELD, C. LPS and cytokines regulate extra hepatic mRNA levels of
apolipoproteins during the acute phase response in Syrian hamsters. **Acta Biochim.
Biophys**. 1997. p.210–220.

HAYASHI, K. G.; USHIZAWA, K.; HOSOE, M.; TAKAHASHI, T. Differential gene
expression of serine protease inhibitors in bovine ovarian follicle: possible involvement
in follicular growth and atresia. **Reproduction Biology and Endocrinology**. 2011. V.
27. Issue. 9. p. 72. DOI: 10.1186/1477-7827-9-72.

HEIN, M. Y. et al. Chapter 1 - Proteomic Analysis of Cellular Systems. In: WALHOUT,
A. J. M., VIDAL, M., et al. **Handbook of Systems Biology**. Academic Press, 2013,
p.3-25.

HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L. E.; ARGÜELLO, A.; DYRLUND, T. F.; ALMEIDA, A.
M.; CASTRO, N.; BENDIXEN, E. The absorption of colostral proteins in newborn
lambs: an iTRAQ proteomics study. **Farm Animal Proteomics** 2013. p.179-183.

HICKEY, T. E., MARROCO, D. L.; AMATO, F.; RITTER, L. J.; NORMAN, R. B.;
GILCHRIST, R. B.; ARMSTRONG, D. T. Androgens augment the motogenic effects of
oocyte-secreted factors and growth differentiation factor-9 on porcine granulosa cells.
Biology of Reproduction. 2005. 73: 4. p. 825-832. DOI:
10.1095/biolreprod.104.039362.

HOLTET, T. L., GRAVERSEN, J. H.; THOGERSEN, H. C.; ETZERODOT, M.;
CLEMMENSEN, I. Tetranectin, a trimeric plasminogen-binding C-type lectin. **Protein
Science**. 2008. V. 6. Issue 7. p. 1511-1515. DOI: 10.1002/pro.5560060715.

HUANG, M.; ZHANG, W.; ZHAO, B.; LI, L. Relationship between inter- α -trypsin
inhibitor heavy chain 4 and ovarian cancer. **Chinese Journal of Cancer Research**.
2019. V. 31. Issue. 6. p. 955-964. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2019.06.11.

HULSHOF, S.C.J.; FIQUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. B.; BEVERS, M. M.; VAN DEN
HURK., R. ZHAO. Isolation and characterization of preantral of preantral follicles from
foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**. 16, 78-80, 1994. DOI:
10.1080/01652176.1994.9694423

Importância da biotécnica de MIOFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 31, 143-152, 2007.

ISHIHAMA, Y., ODA, Y., TABATA, T., SATO, T., NAGASU, T., RAPPSILBER, J., MANN, M. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**. 2005. 4, p. 1265-1272. DOI: 10.1074/mcp.M500061-MCP200.

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**. 2006. V. 91. p. 215–223. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2005.04.006.

JARKOVSKA, K.; MARTINKOVA, J.; LISKOVA, L.; HALADA, P.; MOOS, J.; REZABEK, K.; GADHER, S. J.; KOVAROVA, H. Proteome mining of human follicular fluid reveals a crucial role of complement cascade and key biological pathways in women undergoing in vitro fertilization. **Journal Proteome** 2010. V. 5. Issue 3. p.1289-301. DOI: 10.1021/pr900802u.

JIMENEZ, C. R., ARAÚJO, V. R., C. A. A. (2016) The base médium affectes ultrastructure and survival of bovine preantral follicles cultured in vitro. **Theriogenology**,85,1019-1029.DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.11.007.

JOHNSON A. L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**. 78, 185-201, 2003. DOI: 10.1016/S0378-4320(03)00090-3.

JONG, G.; VAN DIJK J. P.; VAN EIJK, H. G. The biology of transferrin. **Clinica Chimica Acta**. 1990 DOI: 10.1016/0009-8981(90)90278-z.

KANG, L.; YANG, C.; WU, H.; CHEN, Q.; HUANG, L.; LI, X.; TANG, H.; JIANG, Y.; miR-26a-5p Regulates *TNRC6A* Expression and Facilitates Theca Cell Proliferation in Chicken Ovarian Follicles. **DNA and Cell Biology**. 2017. V. 36. Issue 11. DOI: 10.1089/dna.2017.3863.

KIM, Y.S.; KIM, M.S.; LEE, S.H.; CHOI, B.C.; LIM, J.M.; CHA, K.Y.; BAEK, K.H. Proteomic analysis of recurrent spontaneous abortion: identification of an inadequately expressed set of proteins in human follicular fluid. **Proteomics**, 6, 3445–3454, 2006. DOI: 10.1002/pmic.200500775.

LEITÃO, C.C.F.; BRITO, I.R., FROTA, I.M.A.; SILVA, J.R.V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinarie** v.37, n.2, p.93-104, 2016. DOI: 10.22456/1679-9216.16332.

LIU, X., WANG, Y., ZHU, P., WANG, J., LIU, J., LI, N., WANG, W., ZHANG, W., ZHANG, C., WANG, Y., SHEN, X., LIU, F. Human follicular fluid proteome reveals association between overweight status and oocyte maturation abnormality. **Clinical Proteomics**. 2020. DOI:10.1186/s12014-020-09286-7.

LUCENA, C. C.; GUIMARÃES, V. P. Análise de conjuntura do mercado de caprinos e ovinos: sinais, tendências e desafios. **Embrapa Caprinos e Ovinos**. Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos 2018. IV. n. 6.

LUO, S.; WEHR, N. B.; LEVINE, R. L. Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie blue and Fast Green. **Analytical Biochemistry**. 350. 2006. 233–238. DOI: 10.1016/j.ab.2005.10.048.

MARSILLACH, J.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.; RIU, F.; BELTRÁN, R.; JOVEN, J.; CAMPS, J. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. **Free Radical Biology and Medicine**. 2008 V. 15. p. 146-57. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.023.

MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, 32, 1, 36-49, 2008. Disponível em: www.cbpa.org.br

MEIJIDE, S.; PÉREZ-RUIZ, I.; HERNÁNDEZ, M. L.; NAVARRO, R.; FERRANDO, M.; LARREATEGUI, Z.; RUIZ-SANZ, J. I.; RUIZ-LARREA, M. B. Paraoxonase activities in human follicular fluid: role in follicular maturation. **Reproductive Biomedicine Online**. 2017 V. 35 Issue. 4. p. 351-362. DOI: 10.1016/j.rbmo.2017.06.008.

MOYA, E. T.; GIANOTTI, M.; LLADÓ, I.; PROENZA, A. M. Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase 1 activity. **The Journal of Nutritional Biochemistry** V. 17. Issue 3 p. 197–203. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2005.07.004.

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, 255–262. DOI: 10.1002/elps.1150090603.

PANCHOLI, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2001 V. 58. Issue. 7 p. 902-20. DOI: 10.1007/pl00000910.

PAULA JUNIOR, A. R.; VAN TILBURG, M. F.; LOBO, M. D. P.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA R. A.; MELO, C. H.; SOUZA-FABJAN, J. M.; ARAUJO, A. A.; MELO, L. M.; TEIXEIRA, D. I. A.; MOURA, A. A.; FREITAS V. J. F. Proteomic analysis of follicular fluid from tropically-adapted goats. **Animal Reproduction Science**, V. 1, p.1-11, 2018. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.11.005.

PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Annls Biol. anim. Biochim. Biophys.** 1976. p. 271-278, 1976.

PICTON, H.M. Activation of follicle development: The primordial follicle. **Theriogenology**. 55, 1193-1210, 2001. DOI: 10.1016/S0093-691X(01)00478-2.

PIÑEIRO, M.; ANDRÉS, M.; ITURRALDE, M.; CARMONA, S.; HIRVONEN, J.; PYÖRÄLÄ, S.; HEEGAARD, P. M. H.; TJORNEHOJ, K.; LAMPREAVE, F.; PIÑEIRO, A.; ALAVA, M. A. ITIH4 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4) is a new acute-phase protein isolated from cattle during experimental infection. **American Society for Microbiology – Infection and Immunity**. 2004. V. 72. Issue 7. p. 3777-3782. DOI: 10.1128/IAI.72.7.3777–3782.2004.

RENCKENS, R.; ROELOFS, J. J. T. H.; FLORQUIN, S.; VAN DER POLL, T. Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Plays a Role in Neutrophil Migration during Lipopolysaccharide-Induced Peritoneal Inflammation but Not during *Escherichia coli*—Induced Peritonitis. **The Journal of Infection Disiases**. 2006 V. 193. Issue 4. p. 522-530. DOI: 10.1086/499601.

RIVEROS, A. C. G. Análise proteômica do saco vitelino de bovinos. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2009. DOI: 10.11606/D.10.2009.tde-02032010-105017.

RODRIGUES, A. P. R., AMORIM, C. A., LUCCI, C. M. Desenvolvimento de um método mecânico para o isolamento de folículos pré-antrais a partir de ovários oriundos de cabras nativas da região Nordeste do Brasil. In: V ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1996. **Anais**. Universidade Estadual do Ceará, 480, 1996.

ROSEWELL, K.; AL-ALEM, L.; ZAKERKISH, F.; MCCORD, L.; AKIN, W. J.; CHAFFIN, L. C.; BRÄNNSTRÖM, M.; THOMAS E CURRY JR Induction of proteinases in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle by human chorionic gonadotropin. **Fertil Steril**. 2015. V. 103 Issue. 3. P. 826-33. DOI:10.1016/j.fertnstert.2014.11.017.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Biblioteca Anatômica**, 24, 77-92, 1983.

SCHAEFFER, E.; LUCERO, M. A.; JELTSCH, J. M.; PY MC, LEVIN, M. J.; CHAMBON, P.; COHEN, G. N.; ZAKIN, M. M. Complete structure of the human transferrin gene. Comparison with analogous chicken gene and human pseudogene. **Gene**. 1987. V. 56 Issue 1. p. 109-16. DOI: 10.1016/0378-1119(87)90163-6.

SHEVCHENKO A., WILM M., VORM O., MANN M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**. 1996 , 68(5):850-858. DOI: 10.1021/ac950914h.

Situação do mercado da carne ovina no Brasil. Anais da Semana do Curso de Zootecnia. SEZUS. **Anais**. 11, 1, 2017 Disponível em <http://www.anais.ueg.br/index.php/sezus/article/view/9345> Acesso em: 25/01/2019.

SOUZA, T. T. S.; BEZERRA, M. J. B.; VAN TILBURG, M. F.; NAGANO, C. S.; ROLA, L. D.; DUARTE, J. M. B.; MELO, L. M.; MOURA, A. A.; FREITAS, V. J. F. Protein profile of the ovarian follicular fluid of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*; Fisher, 1814). **Zygote**. 2020 V. 28. Issue 2. p. 170-173. DOI: 10.1017/S0967199419000741.

STRZEZEK, J., WYSOCKI, P., KORDAN, W., KUKLINSKA, M., MOGIELNICKA, M., SOLIWODA., D., FRASER., L., Proteomics of boar seminal plasma – current studies possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. **Reproductive Biology**. 5, .p. 279-290, 2005. PMID: 16372045.

THEODORESCU, D.; WITTKE, S.; ROSS, M. M.; WALDEN, M.; CONAWAY, M.; JUST, I.; MISCHAK, H.; FRIERSON, H. F. Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. **Lancet Oncology**. 2006 V. 7. Issue 3. p. 230-40. DOI: 10.1016/S1470-2045(06)70584-8.

THOMAS PD, CAMPBELL MJ, KEJARIWAL A., MI H., KARLAK B., DAVERMAN R., DIEMER K., MURUGANUJAN A., NARECHANIA A. 2003. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. **Genome Research**., 13: 2129-2141. DOI: 10.1101/gr.772403

THOMAS, N.; GOODACRE, R.; TIMMINS, E. M.; GAUDOIN M, FLEMING, R. Fourier transform infrared spectroscopy of follicular fluids from large and small antral follicles. **Human Reproduction**. 2000 V. 15 Issue 8. p. 1667-71. DOI: 10.1093/humrep/15.8.1667.

TILLY J.L. Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. **Toxicology Letters**. 1998 V. 28 Issue. 102-103. p. 497-501. DOI: 10.1016/s0378-4274(98)00240-9.

TWIGT, J.; STEEGERS-THEUNISSEN, P. R.; BEZSTAROSTI, K.; DEMMERS, A. A. J. Proteomic analysis of the microenvironment of developing oocytes. **Proteomics and Systems Biology**. 2012. V.12. Issue. 9 p. 1463-1471. DOI: 10.1002/pmic.201100240.

VAN DEN HURK., R. ZHAO, J. Fomation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**. 63, 1717-1751, 2005. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.005.

VENNA, V. R.; ROY-O'REILLY, M.A.; HOWE, M.D.; LEE, JUNEYOUNG.; ZHU, LIANG.; STONESTREET, B.; LIM, Y. P.; MCCULLOUGH. Circulating Inter-alpha inhibitor protein levels decline after stroke in humans: exogenous supplementation is protective in multiple animal models of ischemic stroke. **Stroke** 2018. V. 49.. DOI: 10.1161/str.49.suppl_1.71.

WALLACE, M.; COTTELL, E.; GIBNEY, M.J.; MCAULIFFE, F.M.; WINGFIELD, M.; BRENNAN, L. An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. **Fertility and Sterility**, 97, 1078–1084, 2012. DOI: 10.1016/J.FERTNSTERT.2012.01.122.

WEBB, C.F., TUCKER, P.W. & DOWTON, S. B. Expression and sequence analyses of serum amyloid A in the Syrian Hamster. **Biochemistry** 1989. V. 28. Issue. 11. p. 4785–4790.

WEISEL, J. W. Fibrinogen and fibrin. **Advances in Protein Chemistry**. 2005. V. 70. p. 247-99. DOI: 10.1016/S0065-3233(05)70008-5.

WU, Y.; LIN, J.; HAN, B.; WANG, L.; CHEN, Y.; LIU, M.; HUANG, J. Proteomic profiling of follicle fluids after superstimulation in one-month-old lambs. **Reproduction in Domestic Animals**. 2017. V. 53. Issue 1. 186-194. DOI: 10.1111/rda.13091.

XIA, J., WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Current. Protocols. Bioinformatics**. 2016. 55, 1-91. DOI: 10.1002/cpbi.11.

YOSHIOKA, N.; TAKAHASHI, N.; TARUMI, W.; ITOH, M. T.; ISHIZUKA, B.
Gonadotropins up-regulate the expression of enolase 2, but not enolase 1, in the rat
ovary. **Endocrine Journal**. 2011. V. 58. Issue 11 941-8. DOI: 10.1507/endocrj.ej11-
0098.

ZACHUT, M.; SOOD, P.; LEVIN, Y.; MOALLEM, U. Proteomic analysis of preovulatory
follicular fluid reveals differentially abundant proteins in less fertile dairy cows. **Journal
of Proteomics**. 2016 V. 139. 122-129. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.03.027.

ZAKERKISH, F.; BRÄNNSTRÖM, M.; CARLSOHN, E.; SIHLBOM, C.; VAN DER
POST, S.; THORODDSEN A. Proteomic analysis of follicular fluid during human
ovulation. **Acta Obstetricia Gynecologica Scandinavica**. 2020 V. 99. Issue. 7. p.
917-924. DOI: 10.1111/aogs.13805.

Tabela Suplementar 1. Descrição da ontologia gênica das proteínas encontradas no fluido folicular de ovelhas.

Protein	ID ¹	Organism**	Gene**	Gene ontology**		
				Molecular function	Biological process	Cellular component
Alpha-1 antitrypsin "Alpha-1-antiproteinase"	gil1370	<i>Ovis aries</i> (Sheep)	N/A	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	-	Extracellular space
Alpha-1B-glycoprotein isoform X2	gil803292449	<i>Ictalurus punctatus</i> (Channel catfish) (<i>Silurus punctatus</i>)	LOC108272539	-	-	Integral component of membrane
Alpha-enolase isoform X6	gil803258810	<i>Mus musculus</i> (Mouse)	Eno1	DNA-binding transcription repressor activity, RNA polymerase II-specific; enzyme binding; GTPase binding; heat shock protein binding; identical protein binding; magnesium ion binding; phosphopyruvate hydratase activity; protein-containing complex binding; protein homodimerization activity; RNA binding; RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	Canonical glycolysis; cellular response to interleukin-7; glycolytic process; in utero embryonic development; positive regulation of binding	Cytosol: phosphopyruvate; hydratase complex Plasma Membrane: extrinsic component of plasma membrane; plasma membrane synaptic membrane Other locations: cell cortex region; cell surface; cytoplasm; growth cone; membrane; membrane raft; myelin sheath; neuron projection
Angiotensinogen	gil1091878	<i>Ovis aries</i> (Sheep)	AGT	Essential component of the renin-angiotensin system (RAS), a potent regulator of blood pressure, body fluid and electrolyte homeostasis.	Regulation of systemic arterial blood pressure by renin-angiotensin; vasoconstriction	Extracellular space
Antithrombin III	gil1195	<i>Ovis aries</i> (Sheep)	SERPINC1	Heparin binding; serine-type endopeptidase inhibitor activity	Blood coagulation; regulation of blood coagulation, intrinsic pathway	Extracellular space
Apolipoprotein A-I	gil803225470	<i>Ovis aries</i> (Sheep)	APOA1	Amyloid-beta binding; apolipoprotein A-I receptor binding; chemorepellent activity; cholesterol binding; cholesterol transfer activity; enzyme binding; heat shock protein binding; high-density lipoprotein particle binding; high-density lipoprotein particle receptor binding; identical protein 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; high-density lipoprotein particle remodeling; integrin-mediated signaling pathway; lipid storage;	Spherical high-density lipoprotein particle; very-low-density lipoprotein particle. Other locations: endocytic vesicle

Apolipoprotein A-IV	gij426244573	<i>BOS TAURUS</i> (BOVINE)	APOA4	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 efflux; positive regulation of cholesterol esterification; positive regulation of hydrolase activity; positive regulation of phagocytosis; positive regulation of phospholipid efflux; 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	
			Cholesterol binding; phosphatidylcholine binding; phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity; phospholipid binding	Cholesterol biosynthetic process; cholesterol efflux; cholesterol homeostasis; high-density lipoprotein particle assembly; lipoprotein metabolic process; phosphatidylcholine metabolic process; phospholipid efflux; positive regulation of cholesterol esterification; positive regulation of fatty acid biosynthetic process; positive regulation of lipid biosynthetic process; positive regulation of lipoprotein lipase activity; positive regulation of triglyceride catabolic process; regulation of intestinal cholesterol absorption; reverse cholesterol transport; triglyceride homeostasis; very-low-density lipoprotein particle remodeling	Chylomicron; high-density lipoprotein particle

Beta-2-glycoprotein 1	gij803282088	BOS TAURUS (BOVINE)	APOH	Heparin binding	-	Extracellular region
Clusterin	gij426220555	BOS TAURUS (BOVINE)	CLU	Unfolded protein binding	Immune complex clearance; negative regulation of amyloid fibril formation; positive regulation of apoptotic process; positive regulation of receptor-mediated endocytosis; regulation of cell population proliferation; protein stabilization	Cytosol; Endoplasmic reticulum: perinuclear endoplasmic reticulum lumen; Extracellular region or secreted: extracellular region; Mitochondrion: mitochondrial inner membrane; Nucleus; Other locations: chromaffin granule; cytoplasm; intracellular membrane-bounded organel
Complement C3	gij1567557964	Bos taurus (Bovine)	C3	C5L2 anaphylatoxin chemotactic receptor binding; endopeptidase inhibitor activity	Amyloid-beta clearance; cell surface receptor signaling pathway involved in cell-cell signaling; complement activation; complement activation, alternative pathway; complement activation, classical pathway; complement-dependent cytotoxicity; complement-mediated synapse pruning; fatty acid metabolic process; inflammatory response; neuron remodeling; positive regulation of activation of membrane attack complex; positive regulation of angiogenesis; positive regulation of apoptotic cell clearance; positive regulation of glucose transmembrane transport; positive regulation of G protein-coupled receptor signaling pathway; positive regulation of lipid storage; positive regulation of phagocytosis, engulfment; positive regulation of protein phosphorylation; positive regulation of receptor-mediated endocytosis; positive regulation of type IIa hypersensitivity; positive regulation of vascular endothelial growth factor production; regulation of triglyceride biosynthetic process; response to bacterium; vertebrate eye-specific patterning	Extracellular space
Complement C3 isoform X2, partial	gij803341483	Vulpes vulpes (Red fox)	C3	Endopeptidase inhibitor activit	Complement activation	Extracellular space
Complement C4-like isoform X1	gij1567534517	Delphinapterus leucas (Beluga whale)	LOC111170700	Endopeptidase inhibitor activity	Complement activation; inflammatory response	Extracellular space
Complement component C3, partial	gij12649541	Ovis aires (Sheep)	C3	-	Complement activation	Extracellular space
Complement component C6	gij803307439	Bos Taurus (Bovine)	C6	-	Complement activation, classical pathway; cytolysis; innate immune response	Extracellular region

Complement factor B	gij148645283	Ovis aires (Sheep)	CFB	Serine-type endopeptidase activity	Complement activation	Extracellular region
Complement factor I	gij426231287	Mus musculus (Mouse)	Cfi	Metal ion binding; scavenger receptor activity; serine-type endopeptidase activity	Complement activation, classical pathway; innate immune response	Extracellular space
Creatine kinase M-type	gij803147519	Ovis aires (Sheep)	CKM	ATP binding; creatine kinase activity	Phosphocreatine biosynthetic process; response to heat	Extracellular space
Fetuin	gij1380	Homo sapiens (Human)	FETUB	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity; endopeptidase inhibitor activity; metalloendopeptidase inhibitor activity	Binding of sperm to zona pelúcida; negative regulation of endopeptidase activity; single fertilization	Extracellular exosome; extracellular region
Fibrinogen alpha chain isoform X2	gij965876574	Mus musculus (Mouse)	Fga	Cell adhesion molecule binding; metal ion binding; signaling receptor binding; structural molecule activity	Adaptive immune response; blood coagulation; blood coagulation, common pathway; blood coagulation, fibrin clot formation; cell-matrix adhesion; cellular protein-containing complex assembly; fibrinolysis; induction of bacterial agglutination; innate immune response; 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 smooth muscle cell migration; positive regulation of vasoconstriction; protein-containing complex assembly; protein polymerization; response to calcium ion	Endoplasmic reticulum: rough endoplasmic reticulum. Extracellular region or secreted: blood microparticle; collagen-containing extracellular matrix; extracellular space; fibrinogen complex. Plasma Membrane: external side of plasma membrane. Other locations: cell córtex; cell surface; cytoplasm; platelet alpha granule; synapse
Fibrinogen beta chain	gij803293298	Ovis aires (Sheep)	FGB	-	Adaptive immune response; blood coagulation; innate immune response	Extracellular region
Fibrinogen gamma chain isoform X2	gij426246913	Rattus norvegicus (Rat)	Fgg	Cell adhesion molecule binding; identical protein binding; metal ion binding; signaling receptor binding; structural molecule activity	Blood coagulation, fibrin clot formation; cell-matrix adhesion; cellular protein-containing complex assembly; cellular response to interleukin-1; cellular response to interleukin-6; fibrinolysis; negative regulation of endothelial cell apoptotic process; negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors; negative regulation of platelet aggregation; plasminogen activation; platelet aggregation; platelet maturation; positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade; positive regulation of exocytosis; positive	Blood microparticle; extracellular space; fibrinogen complex. Plasma Membrane: external side of plasma membrane. Other locations: cell cortex; cell surface; cytoplasm; platelet alpha granule; synapse

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

Adaptive immune response; blood coagulation; blood coagulation, common pathway; blood coagulation, fibrin clot formation; cell-matrix adhesion; cellular protein-containing complex assembly; fibrinolysis; induction of bacterial agglutination; innate immune response; 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 smooth muscle cell migration; positive regulation of vasoconstriction; protein-containing complex assembly; protein polymerization; response to calcium ion

Endoplasmic reticulum: rough endoplasmic reticulum. Extracellular region or secreted: blood microparticle; collagen-containing extracellular matrix; extracellular space; fibrinogen complex. Plasma Membrane: external side of plasma membrane. Other locations: cell cortex; cell surface; cytoplasm; platelet alpha granule; synapse

Fibrinopeptide A

gij229213

Mus musculus (Mouse)

Fga

Cell adhesion molecule binding; metal ion binding; signaling receptor binding; structural molecule activity

Gelsolin isoform B

gij327346104

Ovis aires (Sheep)

GSN

Actin filament binding; calcium ion binding

Actin filament severing; actin nucleation; barbed-end actin filament capping

-

Glia-derived nexin

gij426221643

Mus musculus (Mouse)

Serpine2

Glycosaminoglycan binding; heparin binding; serine-type endopeptidase inhibitor activity; signaling receptor binding

Blood coagulation; cerebellar granular layer morphogenesis; dense core granule biogenesis; detection of mechanical stimulus involved in sensory perception; innervation; long-term synaptic potentiation; mating plug formation; negative regulation of blood coagulation; negative regulation of cell growth; negative regulation of cell population proliferation; negative regulation of endopeptidase activity; negative regulation of peptidase activity; negative regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling; negative regulation of plasminogen activation; negative regulation of platelet activation; negative regulation of platelet aggregation;

Cytosol: cytosol. Extracellular region or secreted: collagen-containing extracellular matrix; extracellular region; extracellular space. Plasma Membrane: extrinsic component of external side of plasma membrane. Other locations: membrane; neuromuscular junction; neuronal cell body; platelet alpha granule

negative regulation of protein catabolic process; negative regulation of protein processing; negative regulation of proteolysis; negative regulation of smoothened signaling pathway; negative regulation of sodium ion transport; positive regulation of astrocyte differentiation; positive regulation of neuron projection development; regulation of synaptic transmission, glutamatergic; regulation of timing of cell differentiation; response to wounding; secretion by cell; secretory granule organization; seminal vesicle epithelium development.

Glutathione S-transferase A1	gij166714258	Ovisaires (Sheep)	GSTA1	Glutathione transferase activity	-	-
Hemopexin	gij426244910	Ovis aires (sheep)	HPX	Metal ion binding	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 STAT protein	Extracellular space
Ig heavy chain c region - sheep (fragment) – “MHC class I antigen”	gij109029	Ovis aires (Sheep)	Ovar	-	Antigen processing and presentation; immune response	Other locations: Integral component of membrane
Ig kappa chain – sheep “Immunoglobulin kappa variable 3-20”	gij423311	Homo sapiens (Human)	IGKV3-20	Antigen binding	Antibacterial humoral response; complement activation; complement activation, classical pathway; Fc-epsilon receptor signaling pathway; Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis; glomerular filtration; immune response; immunoglobulin production; leukocyte migration; receptor-mediated endocytosis; regulation of complement activation; regulation of immune response	Extracellular region or secreted : Blood microparticle; extracellular exosome; extracellular region; extracellular space; monomeric IgA immunoglobulin complex; pentameric IgM immunoglobulin complex; secretory IgA immunoglobulin complex. Plasma Membrane: Plasma membrane
Ig lambda chain c region - sheep (fragment)	gij109030	Gallus gallus (Chicken)	N/A	-	Complement activation; complement activation, classical pathway	Extracellular region

Immunoglobulin lambda light chain constant region segment 1, partial	gi 52366986	<i>Homo sapiens (Human)</i>	N/A	-	Adaptive immune response	Extracellular region or secreted: extracellular region; Plasma Membrane: plasma membrane; Other locations: immunoglobulin complex
Immunoglobulin v lambda chain, partial	gi 2766639	<i>Homo sapiens (Human)</i>	IGLV5-52	-	Adaptive immune response; immune response; immunoglobulin production	Extracellular region or secreted: extracellular space. Plasma Membrane: plasma membrane; Other locations: immunoglobulin complex
Inhibitor of carbonic anhydrase-like I isoform X3"	gi 803335968	<i>Lipotes vexillifer (Yangtze river dolphin)</i>	LOC103090671	Enzyme inhibitor activity	-	Extracellular space
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X1	gi 803234236	<i>Bos taurus (Bovine)</i>	ITIH4	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Acute-phase response; hyaluronan metabolic process	Extracellular space
Map7 domain-containing protein 1 isoform X2	gi 803223295	<i>Mus musculus (Mouse)</i>	Map7d1	-	Microtubule cytoskeleton organization	Cytoskeleton: microtubule cytoskeleton; Cytosol: cytosol
Map7 domain-containing protein 3 isoform X2	gi 803275781	<i>Mus musculus (Mouse)</i>	Map7d3	Microtubule binding; tubulin binding	Microtubule cytoskeleton organization; microtubule polymerization	Cytoskeleton: microtubule cytoskeleton; spindle Other locations: cytoplasm
Plasma protease X1 inhibitor isoform X2	gi 803299018	<i>Enhydra lutris kenyoni</i>	LOC111148596	-	-	Extracellular space
Pre-pro serum albumin	gi 1387	<i>Ovis aires (Sheep)</i>	ALB	Chaperone binding; DNA binding; enterobactin binding; exogenous protein binding; fatty acid binding; identical protein binding; metal ion binding; oxygen binding; pyridoxal phosphate binding; toxic substance binding	Cellular response to starvation; maintenance of mitochondrion location; negative regulation of apoptotic process	Endoplasmic reticulum: endoplasmic reticulum; Extracellular region or secreted: extracellular exosome; Golgi apparatus: Golgi apparatus; Other locations: protein-containing complex
Serotransferrin	gi 1567498089	<i>Bos taurus (Bovine)</i>	TF	Ferric iron binding; ferrous iron binding; iron chaperone activity; transferrin receptor binding	Actin filament organization; activation of JUN kinase activity; cellular iron ion homeostasis; cellular response to iron ion; ERK1 and ERK2 cascade; iron ion transport; osteoclast differentiation; positive regulation of bone resorption; positive regulation of cell motility; positive regulation of receptor-mediated endocytosis; positive regulation of transcription, DNA-templated; regulation of iron ion transport; response to bacterium; SMAD protein signal transduction;	Endosome: early endosome; late endosome; recycling endosome
Serotransferrin isoform X2	gi 803335974	<i>Vulpes vulpes (Red fox)</i>	TF	Enzyme inhibitor activity	-	Extracellular space

Serpin A3-1	gij1567522710	<i>Bos taurus (Bovine)</i>	SERPINA3-1	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity; serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular region or secreted: extracellular space; Other locations: chromaffin granule; cytoplasm; cytoplasmic vesicle
Serpin A3-5	gij1567522716	<i>Bos taurus (Bovine)</i>	SERPINA3-5	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular region or secreted: extracellular space; Other locations: chromaffin granule; cytoplasmic vesicle
Serpin A3-5-like isoform X3	gij965908783	<i>Austrofundulus limnaeus</i>	LOC106530971	-	-	Extracellular space
Serpin A3-5-like isoform X4	gij803331885	<i>Austrofundulus limnaeus</i>	LOC106530971	-	-	
Serpin A3-6-like	gij1567522712	<i>Bos taurus (Bovine)</i>	SERPINA3-6	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular region or secreted: extracellular space; Other locations: chromaffin granule; cytoplasmic vesicle
Serpin A3-7-like isoform X1	gij803339859	<i>Bos taurus (Bovine)</i>	SERPINA3-7	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular region or secreted: extracellular space; Other locations: chromaffin granule; cytoplasmic vesicle
Serpin A3-8 isoform X2	gij965912333	<i>Bos taurus (Bovine)</i>	SERPINA3-8	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular region or secreted: extracellular space. Other locations: chromaffin granule; cytoplasmic vesicle
Serpin B9 isoform X2	gij803341307	<i>Ovis aires (Sheep)</i>	SERPINB9	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity involved in apoptotic process; protease binding; serine-type endopeptidase inhibitor activity	Cellular response to estrogen stimulus; immune response; mast cell mediated immunity; negative regulation by symbiont of host apoptotic process; positive regulation of gene expression; protection from natural killer cell mediated cytotoxicity; response to bacterium	Cytosol: cytosol; Extracellular region or secreted: extracellular space; Golgi apparatus: Golgi apparatus; Nucleus: nucleoplasm
Serpin F1	gij209571747	<i>Bos taurus (Bovine)</i>	SERPINF1	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 region or secreted: extracellular region; extracellular space. Other locations: melanosome
Serum amyloid A-4 protein isoform X1	gij803338738	<i>Bos taurus (Bovine)</i>	SAA4	: Chemoattractant activity	Acute-phase response; cell chemotaxis	Extracellular region or secreted: extracellular space; high-density lipoprotein particle
Serum paraoxonase/arylesterase 1	gij803284534	<i>Mus musculus (Mouse)</i>	Pon1	Function: acyl-L-homoserine-lactone lactonohydrolase activity; aryldialkylphosphatase activity; arylesterase activity; calcium ion binding; high-density lipoprotein particle binding; phospholipid binding; protein homodimerization activity	Aromatic compound catabolic process; blood circulation; carboxylic acid catabolic process: cholesterol metabolic process; organophosphate catabolic process; phosphatidylcholine metabolic process; positive regulation of binding; positive regulation of cholesterol efflux;	-

Short palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 2A-like	gi 1567509340	<i>Bos taurus (Bovine)</i>	SPLUNC2A	Lipid binding	positive regulation of transporter activity; response to fatty acid; response to fluoride; response to nutrient levels; response to toxic substance	-	Extracellular region
Tetranectin	gi 803218864	<i>Bos taurus (Bovine)</i>	CLEC3B	Calcium ion binding; carbohydrate binding; heparin binding	Bone mineralization; ossification; positive regulation of plasminogen activation		Extracellular region or secreted: extracellular space; Nucleus: granular componente; Other locations: cytoplasm
Transthyretin	gi 1420	<i>Ovis aires (Sheep)</i>	TTR	Hormone activity; identical protein binding; thyroid hormone binding	Retinol metabolic process; thyroid hormone transport		Extracellular region
Trinucleotide repeat-containing gene 6C protein isoform X2	gi 803208992	<i>Mus musculus (Mouse)</i>	Tnrc6c	RNA binding	Embryonic hemopoiesis; embryonic organ development; endoderm development; endoderm formation; gene silencing by miRNA; miRNA mediated inhibition of translation; positive regulation of nuclear-transcribed mRNA catabolic process, deadenylation-dependent decay; positive regulation of nuclear-transcribed mRNA poly(A) tail shortening; regulation of gene silencing by miRNA		Nucleus: nucleoplasm. Other locations: P body
Vitamin D-binding protein	gi 803262346	<i>Ovis aires (Sheep)</i>	GC	Vitamin D binding; vitamin transmembrane transporter activity	-		Extracellular space

¹Obtida no <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> **Informações obtidas no UniProtKB <https://www.uniprot.org/>