

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

## **PROTEÔMICA DO FLUÍDO FOLICULAR DE BÚFALAS**

NAYARA FERNANDA SILVA MARQUES

BOTUCATU – SP  
Julho/2020

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

## **PROTEÔMICA DO FLUÍDO FOLICULAR DE BÚFALAS**

NAYARA FERNANDA SILVA MARQUES

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

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Oba

BOTUCATU – SP  
Julho/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

Marques, Nayara Fernanda Silva.

Proteômica do fluido folicular de búfalas / Nayara  
Fernanda Silva Marques. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Búfalos. 2. Proteômica. 3. Líquido folicular.  
4. Folículo ovariano.

Palavras-chave: Búfalo; Fluido folicular; Folículos;  
Ovário; Proteômica.

Nome do autor (a): Nayara Fernanda Silva Marques

Título: **PROTEÔMICA DO FLUÍDO FOLICULAR DE BÚFALAS**

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Eunice Oba

Presidente e Orientador

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

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

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

Dra. Janaina Torres Carreira

Membro

Reneco International Wildlife Consultants – Abu Dhabi /UAE

Data da Defesa 5 de julho de 2020

*E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi  
trunfar...*

*Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las.*

*Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.*

*Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de encontrar um oásis.*

*Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.*

*Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.*

*Naquele dia descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias  
limitações e que enfrentá-las era a única e melhor forma de as superar.*

*Naquele dia, descobri que eu não era o melhor e que talvez eu nunca tivesse  
sido.*

*Deixei de me importar com quem ganha ou perde.*

*Agora me importa simplesmente saber melhor o que fazer.*

*Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir.*

*Aprendi que o melhor triunfo é poder chamar alguém de "amigo".*

*Descobri que o amor é mais que um simples estado de enamoramento, "o  
amor é uma filosofia de vida".*

*Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados e  
passei a ser uma tênue luz no presente.*

*Aprendi que de nada serve ser luz se não iluminar o caminho dos demais.*

*Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...*

*Naquele dia, aprendi que os sonhos existem para tornarem-se realidade.*

*E desde aquele dia já não durmo para descansar... simplesmente durmo para  
sonhar.*

Walt Disney

## DEDICATÓRIA

*Dedico à minha família, meus pais e minha irmã, também ao meu noivo Paulo e minhas amigas Viviane, Letícia, Andressa, Laiza, Caroline e Fabiana. Sem o apoio de vocês os meus sonhos e as minhas conquistas até aqui nunca teriam sido realizados.*

*Dedico em especial aos meus avós paternos e maternos, Elisabete Marques, Antônio Marques e Creusa Galo que ainda estão presentes em minha vida e também ao meu avô materno Antenor Aparecido da Silva “in memoriam”, que já partiu para assistir minha vitória ao lado do senhor.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, meu guia, socorro presente nas horas de angústia.

A meus pais Adriano e Cleonice, a minha irmã Maria Eduarda, que com muito amor, carinho e apoio, não mediram esforços para que eu concluísse esta etapa de minha vida.

Ao meu noivo Paulo e aos seus familiares, principalmente seus pais Sr. Vitor e Sra. Silvia que me acolheram com todo amor e carinho e me ajudaram a seguir em frente sempre.

A minha orientadora Profa. Dra. Eunice Oba, que com muito carinho sempre me incentivou a seguir em frente e buscar novos horizontes, teve muita paciência me orientando não somente neste trabalho mas também na vida com seus conselhos, sempre me mostrou que nem sempre o caminho mais fácil é o melhor e que todo esforço tem sua recompensa e reconhecimento!.

A minha professora, amiga e confidente, Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza que me ajudou com todo carinho e atenção também me orientando durante todas as etapas deste trabalho para que ele fosse concluído com a máxima perfeição possível, me orientando não somente em relação a este trabalho, mas também em relação a vida, sempre me incentivando e me mostrando que existe saídas mesmo quando achamos impossível e que nossos sonhos dependem apenas de nós mesmo para serem realizados! Fa, toda minha gratidão a você!!!

A professora Janaina Torres Carreira que foi uma das minhas inspirações durante a graduação e se dispôs prontamente a participar da minha banca de defesa mesmo estando no Marrocos a milhares de quilômetros de distancia, minha eterna gratidão.

As minhas companheiras do grupo (Neivas), Viviane, Leticia e Andressa e também as não Neivas kkkkkk Carol e Laíza, Flaviane e Hanna, que sempre estiveram juntas a mim mesmo que não de maneira física mas sempre presentes, para que o trabalho fosse concluído e apresentado com sucesso.

Aos meus primos Thaisa e João que sempre fizeram questão de me lembrar que eu sou a prima estudiosa mas também a mais doida da família, e frequentemente compartilhavam memes para me fazer rir e conseguiam kkkk

A todos os funcionários do setor de Reprodução Animal da FMVZ por sempre estarem dispostos a ajudar no que fosse preciso, Edilson, Cabeça, Felipe, Dona Raquel, a todos vocês meus sinceros agradecimentos.

Aos funcionários da farmácia que sempre supriam minha necessidade de caixas de papelão para minhas organizações.

Aos funcionários da sessão de Pós Graduação, que sempre estiveram disponíveis e me ajudavam até nas dúvidas mais tolas.

A todos os professores do departamento e às pessoas com quem convivi ao longo desses quase 3 anos anos.

A minhas eternas Whitney e Cindy (In Memoriam) minhas pequenas que sempre estarão presente em meus pensamentos e em meu coração.

As minhas terroristinhas Gin, Tônica, Kiara, e Esmeralda, e aos meus terroistas Ozzy, Ricardo Guilherme e Antony Gabriel por sempre me alegrarem mesmo com toda bagunça e chinelos comidos.

À vida de todos os animais que foram abatidos, sem os quais seria impossível realizar este trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa sem a qual a permanência e realização deste projeto em Botucatu seria inviável.

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

## Sumário

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| CAPÍTULO 1.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | ii        |
| <b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>1</b>  |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>2</b>  |
| 2.1. Anatomia do trato reprodutivo .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 2         |
| 2.2. Características reprodutivas .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 4         |
| 2.2.1 Foliculogênese.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 5         |
| 2.3. Fisiologia do ciclo estral.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 7         |
| 2.4. Reserva folicular .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 8         |
| 2.5. Proteômica do fluido folicular.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 12        |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 14        |
| CAPÍTULO 2.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1         |
| <b>3. RESULTS.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <b>10</b> |
| Considering all groups, a total of 1,395 proteins were found, however the number of proteins varied according to the groups (Table 2), but 146 proteins were common to all groups. ....                                                                                                                                                                  | 10        |
| <b>Table 2.</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>11</b> |
| Number of protein found in each group. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 11        |
| According to the multivariate analysis, there was no clear separation between the groups (Figure 2), observed in the PCA. The sum of main components 1 and 2 was less than 50%, confirming this result, even in the 3D image.....                                                                                                                        | 11        |
| <b>5. REFERENCES.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>21</b> |
| Carson , JK Findlay , HG Burger , AO Trounson Gonadotropin Receptors of the Ovine Ovarian Follicle during Follicular Growth and Atresia Notas do autor <b>Biology of Reproduction</b> , Volume 21, Edição 1, 1 de agosto de 1979, páginas 75–87, <a href="https://doi.org/10.1095/biolreprod21.1.75">https://doi.org/10.1095/biolreprod21.1.75</a> ..... | 21        |
| Duclos, L.T. Zlock, L. Marnell, Definition of a C-reactive protein-binding.....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 22        |
| determinant on histones, <b>J. Biol. Chem.</b> 266 (1991) 2167–2171. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 22        |
| Witkin, I.M. Linhares, A.M. Bongiovanni, C. Herway, D. Skupski, Unique .....                                                                                                                                                                                                                                                                             | 25        |
| alterations in infection-induced immune activation during pregnancy, <b>BJOG</b> 118 (2011) 145–153.....                                                                                                                                                                                                                                                 | 25        |

## RESUMO

MARQUES, N.F.M. **PROTEÔMICA DO FLUÍDO FOLICULAR DE BÚFALAS** Botucatu, 2020. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo, Brasil.

O objetivo do presente estudo foi identificar, quantificar e descrever o perfil proteico do líquido folicular e morfometria dos folículos, de ovários de búfalas mestiças das raças Mediterrânea e Murrah. O fluido folicular (FF) é um meio essencial para o crescimento e a maturação das células ovarianas. A análise dos seus componentes é fundamental para o entendimento da dinâmica folicular da espécie bubalina. O objetivo deste estudo foi traçar o perfil proteico do FF. Foram utilizados 112 ovários provenientes de um abatedouro, a extração do FF foi realizada manualmente com o uso de seringas e agulhas por meio de punção aspirativa nos folículos visíveis macroscopicamente, os folículos aspirados foram separados em seis grupos, < 5 mm com corpo lúteo (CL); < 5 sem CL; 5 – 8 com CL; 5 – 8 sem CL; > 8 com CL; > 8 sem CL. A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford. Baseado na concentração de proteína total uma alíquota contendo 50 µg foi aplicada em gel de poliacrilamida 12%, a corrida foi interrompida quando as amostras atingiram o gel de separação, a seguir foi realizada a digestão em gel para a análise da espectrometria de massa em Nano-LC-ESI-Q-TOF mass spectrometry. A análise estatística foi realizada utilizando o programa MetaboAnalyst 4.0 e de acordo com os dados obtidos podemos observar no dendrograma e na análise de componente principal (PCA), no Vip Scores e no Heat Map que a concentração de proteínas foi constante em todos os grupos independente do tamanho dos folículos. As proteínas mais relevantes foram, Mucin-19, Haptoglobin, Histone H2A type 1, Histone H2B, Lysosomal alpha-glucosidase, Glutathione S-transferase A1, e a Serine protease inhibitor clade E member 2. Podemos relacionar estas proteínas que estão em abundância no líquido folicular como sendo promotoras do desenvolvimento folicular, e do processo de maturação oocitária.

**Palavras-chaves:** líquido folicular, ovário, folículo, proteômica

## ABSTRACT

MARQUES, N.F.M. **PROTEOMIC OF FOLLICULAR FLUID OF THE BUFFALOES**. Botucatu, 2020 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo, Brasil.

The objective of the present study was to identify, quantify and describe the protein profile of the follicular fluid and morphometry of the follicles, of mixed-race buffalo ovaries of the Mediterranean and Murrah breeds. The follicular fluid (FF) is an essential medium for the growth and maturation of the ovarian cells. The analysis of its components is fundamental for understanding the follicular dynamics of the buffalo species. The aim of this study was to trace the protein profile of FF. 112 ovaries from a slaughterhouse were used, FF extraction was performed manually using syringes and needles through aspiration puncture in the macroscopically visible follicles, the aspirated follicles were separated into six groups, <5 mm with corpus luteum (CL ); <5 without CL; 5 - 8 with CL; 5 - 8 without CL; > 8 with CL; > 8 without CL. The total protein concentration was determined by the Bradford method. Based on the total protein concentration, an aliquot containing 50 µg was applied on 12% polyacrylamide gel, the run was interrupted when the samples reached the separation gel, then the gel was analyzed for analysis of the Nano mass spectrometry. -LC-ESI-Q-TOF mass spectrometry. The statistical analysis was performed using the MetaboAnalyst 4.0 program and according to the data obtained, we can see in the dendrogram and in the main component analysis (PCA), in the Vip Scores and in the Heat Map that the concentration of proteins was constant in all groups regardless the size of the follicles. The most relevant proteins were, Mucin-19, Haptoglobin, Histone H2A type 1, Histone H2B, Lysosomal alpha-glucosidase, Glutathione S-transferase A1, e a Serine protease inhibitor clade E member 2. We can relate these proteins that are in abundance in the follicular fluid as being promoters of follicular development, and the oocyte maturation process.

**Keywords:** follicular fluid, ovary, follicle, proteomics

# **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, o agronegócio foi um dos maiores responsáveis por manter positiva a balança comercial brasileira, respondendo por 90% das reservas cambiais do país (Ohashi, 2003). O rebanho bubalino brasileiro é estimado em aproximadamente 1,3 milhões de cabeças e vem apresentando um crescimento anual de 7,8%, crescimento este superior ao dos bovinos (MAPA, 2019). Deste modo, para que a criação de bubalinos se expanda cada vez mais e continue como um empreendimento pecuário atraente sob o ponto de vista econômico, torna-se necessário estudos mais aprofundados em relação aos aspectos reprodutivos da espécie (Oba, 2003).

A aplicação de biotecnologias da reprodução é interessante em fêmeas bubalinas uma vez que esta apresenta características reprodutivas particulares e distintas das fêmeas bovinas, tais como: discreta expressão do comportamento de estro, longos períodos de anestro pós-parto e intervalo entre partos, características estas que podem ser observadas principalmente quando submetidos a uma dieta inadequada (Mishra et al., 2008). O fato desses animais apresentarem índices reprodutivos inferiores aos da espécie bovina quando relacionados a aplicação de biotecnologias está diretamente ligado com manejo deficiente e/ou seleção inadequada, além do errôneo conhecimento acerca da sua fisiologia que por inúmeras vezes é comparada com a de bovinos (Vale & Ribeiro, 2005).

As características morfológicas e anatômicas dos ovários podem ser utilizadas para verificar a presença de alterações, bem como determinar a existência de atividade ovariana luteal cíclica, além de sugerir qual a provável fase do ciclo estral, possibilitando inferir sobre a fertilidade futura do animal (Nascimento et al., 2003). Assim o estado anatomofisiológico reprodutivo das fêmeas está diretamente relacionado à fertilidade, eficiência reprodutiva, seleção e melhoramento genético dos rebanhos.

O líquido folicular é constituído por moléculas ativas e proteínas que estão diretamente ligadas ao crescimento folicular, fertilização dos oócitos e ao desenvolvimento embrionário. A determinação das proteínas presentes no líquido folicular pode estabelecer biomarcadores para reconhecer a aptidão/qualidade do oócitos e assim aumentar as taxas de eficácia quando

usadas biotecnologias da reprodução como por exemplo fertilização in vitro (Wallace et al., 2012; Bianchi et al., 2013). Desde modo, também em humanos a análise proteômica do líquido folicular vem sendo utilizada pra identificar a resposta da paciente em protocolos de fertilização in vitro (Salerno et al., 2011).

O estudo dos ovários pode ser conduzido mediante o uso de técnicas invasivas e não invasivas. Desde o advento da nova era da abordagem proteômica, a identificação de assinaturas moleculares individuais em vários sistemas biológicos pela pesquisa básica tem impulsionado a descoberta de alguns biomarcadores. A abordagem proteômica é o estudo em larga escala de peptídeos/proteínas, usualmente aferidos por métodos bioquímicos (Vale et. al., 1994). A proteômica está relacionada com o conjunto de tecnologias analíticas que têm por objetivo separar e identificar proteínas em amostras biológicas complexas (Neglia et. al., 2003). Essas moléculas controlam a maioria dos processos celulares, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (Gasparrini et. al., 2008).

O objetivo do presente estudo foi identificar e caracterizar a composição proteica do fluído folicular de diferentes classes de folículos de búfalas mestiças da raça Murrah e Mediterrâneo provenientes de abatedouro.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Anatomia do trato reprodutivo**

As fêmeas bovinas e bubalinas possuem características morfológicas semelhantes, porém em âmbito das particularidades reprodutivas ocorre distinção (Vale et al., 1982). O sistema reprodutivo das búfalas é composto por ovários, ovidutos, útero, cérvix, vagina, vestíbulo, vulva e os ovários responsáveis pela liberação de oócitos, atuando também na produção de hormônios esteróides, estradiol e progesterona (Pansani, 2009).

Um estudo realizado por Vale e Ribeiro et al. (2005), demonstraram que as fêmeas bubalinas apresentam estruturas do trato reprodutivo menores do que as fêmeas bovinas. Os ovários de búfalas possuem formato ovóide e são consideravelmente menores que das fêmeas bovinas (Dyce et al., 1996)

medindo cerca de 2,5 a 3,0 cm de comprimento; 1,4 cm de largura e peso de 4,6g.

Histologicamente, o ovário apresenta uma região cortical e uma medular, nos quais são envolvidos por um epitélio superficial conhecido como germinativo que localiza-se sobre uma membrana basal, logo abaixo. Observa-se a túnica albugínea com uma camada espessa de tecido conjuntivo, e o estroma ovariano, formado por tecido conjuntivo frouxo. Na região cortical ou também chamado córtex ovariano pode ser encontrado folículos ovarianos não atresícos e atresícos, corpos lúteos, corpos albicans e corpos hemorrágicos, além de colágeno dos tipos I e III, fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas (Ali et. al., 2004).

Os cornos uterinos dos bubalinos são mais rígidos e tortuosos que nos bovinos, apresentando maior tônus na fase estrogênica, e o colo apresenta 5,3 a 8,0 cm de comprimento. Em relação ao corpo do útero, este mede 5,3 a 8,0 cm de comprimento, sendo constituído de três partes: o corpo, os cornos e uma estrutura chamada septo interconual que separa os cornos (Pansani, 2009). A parede do útero é dividida em três camadas: a mucosa ou endométrio, a muscular ou miométrio e a serosa ou perimétrio (Ali et. al., 2005).

A tuba uterina apresenta em média 19 a 24 cm de comprimento, no qual se localiza no fundo da bursa ovárica (Vale, 2005). As secreções do epitélio da tuba uterina formam um fluido que promove o meio necessário para a maturação dos gametas femininos e masculinos (capacitação espermática), a fertilização e, pela sua composição química, o desenvolvimento inicial do embrião (Abe et. al., 1996).

Já a cérvix, localiza-se caudalmente a vagina e sua principal função é proteção do corpo do útero, seleção e reservatório de espermatozoides. Esta possui menor tamanho do que das fêmeas bovinas, porém com maior número de anéis cervicais, entre 3 a 5, com difícil dilatação, mesmo no estro, quando somente 2 a 4 se dilatam. O corpo lúteo possui coloração marrom/avermelhado, embebido no interior do ovário inserido no estroma ovariano, sendo considerado menor que o da vaca apresentando peso e diâmetro máximo de 23 g e 15 mm, respectivamente, (Roy; Mullick, 1964) o que dificulta a formação de proeminência.

A vagina é o órgão copulatório, no qual o sêmen é depositado (Pansani,

2009). A genitália externa é denominada vulva, responsável pelo fechamento interno do trato genital feminino. Além disso, há descrição que a vulva das fêmeas bubalinas apresenta hiperpigmentação, sendo característico desta espécie (Avali-Shoushtari et. al., 2006).

## **2.2. Características reprodutivas**

Há dois tipos de búfalos, o Murrah, (que apresenta maior aptidão para produção leiteira) e o Jafarabadi com  $2n=50$  cromossomos. Já o búfalo do Pântano também conhecido como Carabao, com  $2n=48$ , que ao se cruzarem, produzem animais com  $2n=49$  cromossomos. Tais subespécies de búfalos apresentam variações quanto aos aspectos reprodutivos, tais como: idade a puberdade, maturidade sexual, duração e características do ciclo estral, além da duração da gestação (Vale et al., 1990).

Autores como (Mcgregor, 1941; Bhattacharya, 1958; Shalash, 1958; Rao, 1968) defendem que a espécie bubalina apresenta baixa performance reprodutiva quando comparada a espécie bovina, tais opiniões são contestadas por outros autores, defensores da tese de que o fenômeno pelo qual essa espécie apresenta, pode estar relacionado com manejo deficiente e/ou de seleção inadequada (Kaleff, 1942; Hafez, 1952; 1954; 1955; Ivanov, 1960; De Franciscis, 1978; Vale, 1988; Vale et al., 1990; Baruselli, 1993; Vale e Ribeiro, 2005).

Estudos sobre a espécie bubalina instintivamente já a comparam com a espécie bovina, sendo que tais comparações não oferecem respostas fidedignas, já que há distinções referentes a anatomia e demais características. Os estudos realizados por Vale et al. (1990) mostraram que estas espécies apresentam mais diferenças do que semelhanças entre si.

Em relação a idade de puberdade, Vale et al. (1990) descreveram grande variação no momento em que a fêmea bubalina atinge essa fase, porém deve-se levar em consideração os aspectos ligados ao manejo e alimentação, as características distintas entre búfalos do tipo Indiano e do Carabao, sendo este último mais tardio, quando comparado ao tipo leiteiro. Variações entre 10 a 36 meses são citadas na literatura.

Baruselli et al. (1999) estudara o início da puberdade de 12 novilhas da raça Murrah criadas no Vale do Ribeira-SP, para observar o desenvolvimento

ponderal, comportamento durante o ciclo estral, as alterações fisiológicas e morfológicas sofridas no trato genital no período de estro, através de avaliações por ultrassonografia via transretal. Além disso, obtiveram a dosagem de progesterona no plasma sanguíneo, nos quais os valores médios obtidos para idade ao primeiro estro, foi de  $659 \pm 21,49$  dias (~ 22 meses) e animais com peso corporal de  $372,58 \pm 24,37$  Kg. Já a maturidade sexual foi alcançada aos  $783,33 \pm 24,64$  dias de idade, (média 26 meses) e com um peso corporal de  $394,50 \pm 22,37$  Kg.

Vale (2000) avaliou a puberdade em novilhas da raça Murrah, e esta foi atingida com idade média de 17,6 (14,5 - 20) meses e com peso corporal médio de  $391 \pm 33$  (365 - 444) Kg, provando assim que a puberdade pode variar de acordo com o manejo adotado desde o primeiro dia de vida para criação desses animais bem como a seleção genética realizada para obtenção de melhores resultados.

De acordo com o estudo de Zicarelli et al. (2002) quanto as características reprodutivas estacionais da espécie, os búfalos, quando criados em localidades distantes da região equatorial, têm um comportamento reprodutivo influenciado positivamente pela diminuição de horas de luz do dia, podendo-se dizer que os búfalos são poliétricos estacionais de dias curtos, semelhantemente aos ovinos e caprinos. Constatou-se através de estudo realizado na Estação Experimental de Zootecnia em Registro-SP localizada na região centro-sul do país que, nesta localidade as búfalas apresentam maior índice de cio durante o outono, estes dados indicam que, para se obter sucesso no emprego de biotecnologias da reprodução em bubalinos, as atividades devem ser concentradas nos meses de março a agosto (Baruselli , 2000)

### **2.2.1 Foliculogênese**

Junqueira e Carneiro (1995) demonstraram que os folículos são divididos em folículos pré-antrais ou não cavitários sendo estes caracterizados por não possuírem antro: primordiais, primários e secundários. Os folículos antrais ou cavitários, já apresentam cavidade antral, sendo que no seu interior há presença de líquido folicular: terciários e ovulatórios.

Bertaudiere e. al., (1972), constataram que folículos primários representam o estágio inicial do crescimento folicular, e tem como principal característica a presença de um oócito localizado ao centro, sendo este envolto por uma única camada de células da granulosa. Nas búfalas o diâmetro dos folículos varia entre 25 a 80  $\mu\text{m}$ , e o oócito também é envolto por células da granulosa (Bhattacharya et al., 1974).

Os folículos secundários também possuem oócito centralizado, porém este é envolto por duas ou mais camadas de células da granulosa (Camaioni et. al., 1996).

Folículos terciários têm como característica a presença de várias camadas de células da granulosa e formação do antro nota-se também aumento do diâmetro folicular, e multiplicação das células das camadas da teca e da granulosa (Gasparrini et. al., 2006).

Junqueira et. al., (2000) atestam que os folículos ovulatórios surgem no final do desenvolvimento folicular, e apresenta as mesmas características presentes nos folículos terciários além da presença de um oócito secundário.

Neglia (2001), mostrou que a foliculogênese nos ruminantes tem início ainda durante a vida fetal e é o processo de formação, crescimento e maturação folicular, que tem início com a formação de um folículo primordial e final com a formação de um folículo ovulatório (Neglia et. al., 2001).

Segundo Taneja et al. (1996) as búfalas geralmente apresentam duas ondas de crescimento folicular em cada ciclo estral sendo o início da primeira nos dias  $1,8 \pm 0,6$ , e da segunda nos dias  $7,8 \pm 2,0$  do ciclo.

Já Baruselli et al. (1997) registra que a primeira onda de crescimento folicular ocorreu nos dias  $1,16 \pm 0,5$  e a segunda onda nos dias  $10,83 \pm 1,09$ , e em casos de fêmeas que apresentam três ondas foliculares esta ocorre nos dias  $1,10 \pm 0,32$ ,  $9,30 \pm 1,25$  e  $16,80 \pm 1,22$ , em relação a primeira e segunda onda, notaram também que as búfalas com ciclos de duas ondas apresentaram taxas mais elevadas de crescimento folicular (63%).

Segundo Hafez et. al., (2000), descreveram o diâmetro máximo do folículo ovulatório com a medida de  $13,8 \pm 0,37$  mm, com taxa de crescimento de  $0,94 \pm 0,12$  mm/dia durante  $11,8 \pm 1,39$  dias, assim Taneja et al. (1996), atestam o diâmetro máximo de folículo ovulatório de  $15,5 \pm 0,9$  mm e  $1,0 \pm 0,1$  mm/dia para taxa média de crescimento.

### **2.3. Fisiologia do ciclo estral**

A espécie bubalina possui características peculiares na fisiologia reprodutiva. Foi descrito por Borghese (2005) e Perera (2011) que, em condições favoráveis os búfalos apresentam o primeiro estro aos 15-18 meses para as espécies de rio e de 21-24 meses para as espécies de pântano. O peso corporal ao qual a puberdade é alcançada é influenciado pelo genótipo e é aproximadamente de 200 a 300 kg para o tipo de pântano e 250-400 kg para o tipo de rio. Embora o búfalo atinja puberdade mais tardia em relação ao gado bovino, esses animais possuem uma vida reprodução mais longa (Vale 2002).

O ciclo estral apresenta características distintas da espécie bovina, como a duração e a demonstração de sinais do estro e aceitação da monta pelo macho no proestro. Além disso, a ovulação ocorre após os sinais de cio cessem, cios silenciosos podem ser comuns, cios anovulatórios no meio do ciclo também podem ocorrer em algumas fêmeas (Oba, 2003). O tônus uterino é superior ao da fêmea bovina, a secreção de muco é pouco produzida e as búfalas ao contrário das vacas mostram baixa atividade homossexual (Vale, 1988).

Em média o ciclo estral da búfala dura 21 dias podendo variar de 18 a 33 dias, no qual é dividido em proestro, estro, metaestro e diestro. Esta amplitude é devido a vários fatores, como o manejo, clima e alimentação. Os animais submetidos a manejo inadequado e com alimentação deficiente em energia, proteína e minerais, apresentam cios curtos ou longos, da mesma maneira quando submetidos a estresse térmico (Beg; Totey et al., 1999).

A ovulação ocorre após o término dos sinais de estro entre 15 e 18 horas (Vale, 2002) ou em alguns casos 35 a 45 horas após o início do estro (Jainudeen; Hafez, 1995). A melhor forma de detecção do cio na búfala é a utilização de rufiões com buçal marcador, além da observação visual (Vale, 1982).

Os búfalos são classificados como animais sazonais, ou seja, tem sua ciclicidade reprodutiva diretamente influenciada pela sua exposição diária à luz. Assim, as búfalas apresentam fotoperíodo negativo, demonstram características de cio no outono, concentrando os partos de julho a dezembro,

no hemisfério norte. Já no hemisfério sul, se enquadram nos meses de janeiro a março (Siqueira; Leal; Oba, 2009).

Os mecanismos endócrinos e neuroendócrinos regulam o ciclo estral, bem como os hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas e os secretados pelos ovários (Hafez, 2004). Singal et al. (1984) atestam em seu estudo que o estresse térmico aumenta os níveis de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) que levam a alterações endócrinas, induzindo distúrbios no ciclo estral e ao anestro.

Nas fêmeas bubalinas, a dinâmica folicular ovariana durante o ciclo estral é semelhante à do gado. Estudos da Índia (Taneja et al., 1996), do Brasil (Baruselli et al., 1997) e do Paquistão, mostraram claramente que a maioria dos búfalos apresentam duas ondas de atividade folicular durante o ciclo estral.

Em cada onda de crescimento folicular, desenvolve-se um folículo dominante que suprime o crescimento dos outros folículos menores. Os folículos dominantes que crescem e atingem seu diâmetro máximo no meio do ciclo estral, sob altos níveis de progesterona, não ovulam e iniciam processo de regressão, permitindo o crescimento de uma nova onda de crescimento folicular. O folículo dominante que se desenvolvem durante a última onda de crescimento folicular de cada ciclo estral é o folículo ovulatório (Lucy et al., 1992).

## **2.4. Reserva folicular**

O fluido folicular (FF) é formado a partir de produtos de secreção das células da granulosa e da teca e difusão dos capilares que irrigam o tecido ovariano (Hess et al., 1998). O mesmo contém moléculas ativas e proteínas que estão relacionadas ao crescimento folicular, fertilização dos oócitos e ao desenvolvimento embrionário. A caracterização proteômica do líquido folicular pode determinar biomarcadores para identificar a competência/qualidade dos oócitos e aumentar a taxa de sucesso na fertilização in vitro (Wallace et al., 2012; Bianchi et al., 2013). Em humanos, a análise proteômica do fluido folicular é indicada para identificar a resposta do paciente, frente à fertilização in vitro (Salerno et al., 2011). Após a transcrição e tradução, as proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais (Gobbetti et al., 2002). Dessa forma, resultados da expressão gênica podem ser complementados com a

caracterização das proteínas e dos peptídeos do líquido folicular, a fim de permitir a identificação do seu papel na fisiologia folicular e maturação oocitária (Ducolomb et al., 2013).

O maior elemento constituinte do folículo pré-ovulatório é o líquido folicular (Rodgers et al., 2001), que é composto por moléculas com baixa massa molecular advindas do soro sanguíneo (Shalgi, 1973). O líquido folicular é formado a partir de produtos de secreção das células da granulosa e da teca e difusão dos capilares que irrigam o tecido ovariano, sendo permeável às proteínas com massa molecular <500 kDA (Hess et al., 1998). Os oócitos estão embutidos no líquido folicular, onde sofrerão seu desenvolvimento e maturação. A composição bioquímica desse fluído influencia a qualidade dos oócitos e está relacionada ao status fisiológico da fêmea e estágio de desenvolvimento funcional do folículo (Iwata et al., 2006; Kim et al., 2006; Bianchi et al., 2013). Ainda na literatura observamos que existem poucos estudos sobre expressão de genes relacionados a diferentes processos celulares, mostrando que a expressão de proteínas ainda necessita ser elucidado, bem como a fisiologia do desenvolvimento folicular poderá contribuir para melhorar as biotecnologias aplicadas a reprodução animal (Baruselli, 2000).

A fêmea bovina apresenta, ao nascer, em torno de 100.000 folículos primordiais nos ovários. Os folículos que constituem este pool de reserva podem permanecer no estado quiescente, ou iniciar um processo irreversível de desenvolvimento no qual resulta na ovulação, porém a maioria desses sofrem o processo de atresia (Findlay et al., 1994; Erickson; Shimasaki et al., 2001).

Um estudo provou que a concentração de estradiol foi menor em búfalas que se apresentavam acíclicas do que nas cíclicas. Observou-se também que independentemente do status cíclico, houve aumento na concentração de estradiol de acordo com o aumento do tamanho do folicular, também notou-se esta mesma diferença quando relacionamos a progesterona em ambos os grupos. Búfalos acíclicos apresentaram menor concentração de insulina no líquido folicular quando comparados com os cíclicos, sendo assim conclui-se que búfalos acíclicos têm baixas concentrações de estradiol e insulina

concomitantes a maiores concentrações de progesterona no fluido folicular (Alvarez et al., 2006).

Um outro estudo teve como objetivo avaliar as alterações hormonais e bioquímicas do fluido folicular correlacionados aos cistos foliculares ovarianos presentes em búfalas. Os cistos expressaram maiores níveis de concentração de nitróxido, progesterona e cortisol e menores de ácido ascórbico, glicose e insulina quando comparados aos folículos pré-ovulatórios, o que indica que os cistos têm uma composição bioquímica e hormonal alteradas, dentre estas alterações observou-se: aumentos no óxido nítrico, progesterona, cortisol e T 3 e uma redução nas concentrações de ácido ascórbico, insulina e glicose. Os pesquisadores sugerem então que maiores concentrações de progesterona possivelmente inibem aumento do LH (Ball et al., 1982).

Em 1999 na Itália foi analisada a defesa antioxidante do fluido folicular e do plasma de búfalas, e os resultados mostraram os diferentes níveis de capacidade antioxidante total, retinol, tocoferol, UMA-tocoferol, ácido ascórbico e ácido úrico. Os resultados mostraram que os níveis de tocoferol foram relativamente menores quando comparados com o de retinol no fluido folicular e também no plasma, o mesmo resultado mostrou-se quando foram mensurados os níveis dos ácidos ascórbico e úrico respectivamente, entretanto na camada de cúmulus oócito observou-se um aumento significativo nos níveis dos ácidos bem como do retinol e do tocoferol quando comparados as quantidades presentes no fluido e no plasma folicular (Baruselli et al., 1997).

Sabe-se que as búfalas apresentam menor número de folículos primordiais e maior taxa de atresia folicular do que as vacas (Danell, 1987; Le Van Ty et al., 1989). Foram encontrados 12.636 e 10.132 folículos primordiais em novilhas bubalinas cíclicas e não cíclicas 150.000 (Erickson et al., 1966).

O número de folículos presente em cada ovário varia entre espécies e indivíduos, de aproximadamente 1.500 no camundongo-fêmea (Shaw et al., 2000) e 2.000.000 na mulher (Baker et al., 1963).

Stainfield et al. (2011), analisaram a concentração de folículos pré-antrais em 12 fêmeas da espécie *Loxodonta africana* – elefantas africanas com idade entre 2 meses e 4,5 anos. Constataram a existência de aproximadamente 240.000 folículos pré-antrais presentes na porção externa do ovário. Não mostraram diferença significativa na concentração de folículos

entre o ovário direito e esquerdo, bem como a diferença na quantidade desses em animais mais jovens em relação aos mais velhos.

González et al. (2015) avaliaram a morfologia ovariana das fêmeas muaras, bem como sua ciclicidade reprodutiva. As fêmeas apresentaram corpos lúteos 45,83% (33/72) e folículos 15,27% (11/72) nos ovários, além da recuperação de 11 oócitos de mulas. Os folículos pré-antrais permaneceram dispostos em pequenas aglomerações, nos quais visualizaram 21 folículos primários e 1 antral no ovário de uma das mulas e 3 folículos primários em outro ovário.

Já Carrijo et al. (2010) apresentaram as características dos ovários de gatas quanto a morfometria, ultraestrutura e população folicular. Nos ovários de cinco gatas com idade entre 2 a 4 anos, constataram 190 folículos pré-antrais, destes 100 eram primordiais, 60 primários e 30 secundários. Estes possuíam uma média de 37.853 folículos, no qual, destes 87% primordiais, 10,4% primários e 2,3% secundários. Os folículos de gatas possuem características únicas, como a formação inicial da zona pelúcida em folículos primários e a organização das mitocôndrias. Além disso, outras organelas em aglomerações e grânulos corticais alinhados na região periférica foram descritas em folículos secundários (Carrijo et al., 2010).

Carrijo et al., (2009) examinou a composição bioquímica do fluido folicular de folículos de três classes (4 - 5, 6 - 9 e 10 – 20 mm de diâmetro). e sua relação com a do plasma sanguíneo nas búfalas. As amostras foram analisadas quanto a metabólitos: glicose, proteína total, albumina, globulina, colesterol, triglicerídeos, uréia e creatinina, íons: cálcio e fósforo e enzimas: fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase (ASAT), alanina aminotransferase (ALAT), e lactato desidrogenase. As concentrações de cálcio, uréia, creatinina, albumina e ASAT e ALAT no fluido folicular não foram afetadas pelo tamanho dos folículos, já as concentrações de fósforo, colesterol, triglicerídeo, ALK e LDH no fluido folicular diminuíram de folículos pequenos para grandes, e as concentrações de, albumina, fósforo e LDH no plasma foram menores do que os níveis em todas as classes de folículos. Em contrapartida (Ducolomb et al., 2013), atestou em um estudo que fazia a mesma comparação porem em búfalas acíclicas que os resultados indicam uma alteração na composição bioquímica do líquido folicular durante a

aciclicidade reprodutiva e ainda que os dados obtidos fornecem suporte adicional à noção de que a má nutrição é um fator importante que desencadeia a aciclicidade reprodutiva no búfalo.

## **2.5. Proteômica do fluido folicular**

Vários estudos mostram que as proteínas são essenciais para o desenvolvimento de vários tipos de padrões celulares, sendo que nas células oocitárias e da granulosa determinadas proteínas serve como mediadoras da comunicação entre oócitos e células da granulosa. Notou que a qualidade embrionária está relacionada a presença e concentração de biomarcadores presentes no FF, deste modo, compreender a composição deste fluido em especial as proteínas pode abrir caminhos para novas descobertas sobre a foliculogênese desta espécie e ainda auxiliar na qualidade oocitária (Fu et al., 2016).

Estratégias de análise proteômica vem sendo utilizadas no perfil protéico e também na análise comparativa da abundancia protéica em variados tipos de tecidos.e fluidos celulares Estudos realizados em humanos compara os padrões proteicos existentes no fluido folicular de folículos maduros e imaturos, posteriormente também foram realizadas para tal investigação análises dos tipos Top Down e Bottom-up, 32 proteínas puderam ser identificadas por meio de cromatografia líquida através do pré fracionamento dos peptídeos e da cromatografia de massa em linha. Um total de 246 proteínas específicas foram identificadas e em grande maioria estavam associadas a vias de coagulação e resposta imune (Fu et al., 2016).

As fêmeas bubalinas apresentam alta adaptabilidade em condições de clima tropical úmido, entretanto apresentam baixa eficiência reprodutiva com baixa qualidade oocitária que pode ser atribuída a um microambiente folicular ruim. Atualmente apenas um trabalho relata a análise proteômica do FF dessas fêmeas, e levando em consideração o aumento significativo na produção desta espécie, mais estudos são necessário para entender um pouco mais das proteínas envolvidas em processos como a foliculogênese por exemplo (Vale, 2005).

O efeito das proteínas do fluido folicular e das gonadotrofinas na secreção de progesterona pelas células da granulosa do ovário de búfalas

durante a cultura foi alvo de um trabalho que concluiu que o fluido folicular contém proteínas e peptídeos que desencadeiam um importante papel no desenvolvimento, crescimento e maturação de oócitos, já as gonadotrofinas funcionam sinergicamente e regula as funções ovarianas. As proteínas do fluido folicular de folículos pequenos não mostrou nenhum efeito estimulador, entretanto, notou-se um aumento significativo na secreção de progesterona pelas células da granulosa, conjunto com a presença de proteínas e LH no fluido folicular, já o FSH quando associado com as proteínas mostrou um efeito inibitório. Tais resultados indicam que as proteínas presentes no fluido folicular tem seu próprio efeito estimulador e age em conjunto com as gonadotrofinas. A resposta diferente observada pelas células da granulosa mostra que, a secreção de hormônios, a caracterização e purificação de tais proteínas esteroidogênicas podem ser baseadas em seu estágio de crescimento e diferenciação celular (Kim et. al., 2006).

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- ABE, H., OIKAWA, T. Observations by scanning electron microscopy of oviductal epithelial cells from cows at follicular and luteal phases. **The Anatomical Record**, v.235, p.399-410, 1993.
- 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.
- ALI, A., PARADIS, F., VIGNEAULT, C., SIRARD, M.A. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 71, p. 358-367, 2005.
- ALAVI-SHOUSHTARI SM, ASRI-REZAI S, ABSHENAS DJ. A study of the uterine protein variations during the estrus cycle in the cow: a comparison with the serum proteins. **Animal Reproduction Scienc.**, v.96, p.10-20, 2006.
- ALVAREZ, H.R., OBA, E. Biometria ovariana de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) superovuladas com FSH-p e PMSG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, 1995, Belo Horizonte. **Anais...**, 1995. p. 351.
- BAKER, T. G. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. Proceedings of the **Royal Society of London**. Series B, v.158, p.417-433, 1963.
- BALL, G.D.; BELLIN, M.E.; AX, R.L.; FIRST, N.L.; Glycossaminoglycans in bovine cumulos-oocyte complexes: morphology and chemistry. **Mol. Cell Endocrinol.**, v.28, n.1, p. 113-122, 1982.
- BARUSELLI, B. P. Manejo reprodutivo em bubalinos. Nova Odessa, SP: Instituto de Zootecnia, 1993. 46p. **Monografia**.
- BARUSELLI, P.S.; MUCCIOLO, R.G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; OLIVEIRA, C. A.; MOLERO-FILHO, J. R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.47, p.1531-1547, 1997.
- BARUSELLI, P.S., MADUREIRA, E.H., VISINTIN, J.A., PORTO FILHO, R.M., CARVALHO, N.A.T., CAMPANILE, G., ZICARELLI, L. Failure oocyte entry into oviduct in superovulated buffalo. **Theriogenology**, v. 53, p. 491, 2000.

---

<sup>1</sup> Referências organizadas de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 6023, 2018)

BARUSELLI, P.S.; MUCCIOLO, R.G.; ARRUDA, R., MADUREIRA, E.H., AMARAL, R.; ASSUMPTÃO, M.E.O.A. Embryo recovery rate in superovulated buffalo. **Theriogenology**, v.51, n. 1, p.401, 1999.

BEG, M. A.; TOTEY, S. M. The oestrus cycle, behaviour and endocrinology of the estrous cycle in the buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Breeding Abstracts Journal**, v.67, p.239-337, 1999.

BERTAUDIÈRE, P. L. Etude de la physiologie et de la pathologie de la reproduction chez de buffle. 107f. Thèse (Doctorat) - **Escole National de Veterinaire d'Alfort, Paris**, 1972.

BIANCHI L, GAGLIARDI A, CAMPANELLA G, LANDI C, CAPALDO A, CARLEO A, et al. A methodological and functional proteomic approach of human follicular fluid in route for oocyte quality evaluation. **J. Proteomics** 2013;90:61-76.

BHATTACHARYA P. Reproduction. In: Cockril WR (Ed.). **The husbandry and health of the water buffalo**. Rome: FAO, 1974. 993p.

BHATTACHARYA P. Some aspects of reproduction in Indian farm animals. In: Indian Sci. Congress, 45th, 1958, **Madras, India. Proceedings** ... Madras: [s.n.], pt.2, 22 p.

BORGHESE, A. (Ed.), 2005. In: Technical Series 67. **Food and Agriculture Organization**, Rome, Italy.

CAMAIONI, A.; SALUSTRI, A.; YANAGISHITA, M.; HASCALL, V.C. Proteoglycans and proteins in the extracellular matrix of mouse cumulus cell-oocyte complexes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 325, n.2, p. 190-198, 1996.

CARRIJO JR, O. A.; MARINHO, A. P. S.; CAMPOS, A. A. AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M. Morphometry, Estimation and Ultrastructure of Ovarian Preantral Follicle Population in Queens. Cto - cells tissues organs. **Brasilia - BR**, n. 191, p. 152-160, jun. 2009.

DANELL, B. Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. 1987. 124f. **Thesis (Doctorat)** -Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

DE FRANCISCIS G. Buffalo improvement programme in Italy. In: **Seminar sponsored by FAO/SIDA/Govt** of India, 1978, Karnal, India. Proceedings: Buffalo reproduction and AI. Rome: FAO, 1979. p.163-172.

DYCE, K.M., SACK, W.O., WEINSING, C.J.G. **Textbook of Veterinary Anatomy**. Philadelphia: WB Saunders, 1996. 856p.

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

ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertility and Sterility**, v.76, n.5, p.943-949, 2001.

FINDLAY, J. K. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. **Reproduction Fertility Development**, v.6, p.127-139, 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**. **Int. J. Mol. Sci.** 2016, 17, 618.

GASPARRINI, B., BOCCIA, L., MARCHANDISE, J., DI PALO, R., GEORGE, F., DONNAY, I., ZICARELLI, L. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, v. 65, p. 275-287, 2006.

GASPARRINI, B., DE ROSA, A., ATTANASIO, B., BOCCIA, L., DI PALO, R., CAMPANILLE, G., ZICARELLI, L. Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency of in vitro development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). **Anim. Reprod. Sci.**, v. 105, p. 354-364, 2008.

GOBBETTI, M.; STEPANIAK, L.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; DI CAGNO, R. Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, p.223-239, 2002.

GONZÁLEZ, S. M.; GOMES, R.G.; SOUZA, A. K.; SILVA C.B.; SILVA-SANTOS, K. C.; SENEDA, M. M. Evidences of Regular Estrous Cycles in Mules and Successful Use of These Animals as Recipients for Donkey Embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.5, p.869-872, 2015.

HAFEZ, E. S. E. The buffaloes a review. **Indian Journal of Veterinary Science**, v.22, p.257-263, 1952.

HAFEZ, E. S. E. Oestrus and some related phenomena in the buffalo. **Journal Agricultural Science**, v.44, p.165-172, 1954.

HAFEZ, E. S. E. Puberty in buffalo-cow. **J Agric Sci**, v.46, p.137-42, 1955.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. 513p

HESS KA, CHEN L, LARSEN WJ. The ovarian blood follicle barrier is both charge and size-selective in mice. **Biol Reprod**, 1998; 58:705-11.

IVANOV, P.; ZACHARIEV, S. J. Biologische Eigenschaften und Wirtschaftlichkeit der Büffel in Bulgarien. Z. **Tierz. Züchtungsbiol.** v.74, p.340-360, 1960.

IWATA, H., INOUE, J., KIMURA, K., KUGE, T., KUWAYAMA, T., MONJI, Y. Comparison between the characteristics of follicular fluid and the developmental competence of bovine oocytes. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 91, p. 215-233, 2006.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Ciclos reprodutivos: bovinos e bubalinos. In: HAFEZ, E. S. E. (Ed). **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 1995. p.319-34.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J.C. **Histologia clássica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, 433p.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Introdução: uma vista panorâmica sobre a estrutura, funções e evolução das células. In: JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 1-17.

KALEFF, B. Der Hausbuffel und seine Zuechtunsbiologie in Vergleich zum Rind. Z **Tierz Zuechtungsbiol**, v.51, p.131-178, 1942. 31

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**, v.6, p.3445–3454, 2006.

LE VAN TY, D. C.; CHUPIN, D.; DRIANCOURT, M. A. Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. **Animal Reproduction Science**, v.19, p.171-178, 1989

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, R. L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal Animal Science**, v.70, p.3615-26, 1992.

MCGREGOR, R. The domestic buffalo. **Veterinary Record**, v.5, p.443-450, 1941.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 15/03/2019.

MISHRA, V., MISRA, A.K., SHARMA, R. A comparative study of parthenogenic activation and in vitro fertilization of bubaline oocytes. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 103, p. 249-259, 2008.

NASCIMENTO, A.A., PINHEIRO, N.L., SALES, A., VIANA, J.H.M. Correlação morfométrica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.40, p. 126-132, 2003.

NEGLIA, G., MARINO, M., DI PALO, R., WILDING, M., CARACCIOLO DI BRENZA, V., DALE, B., GASPARRINI, B., ZICARELLI, L. A comparison of in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine oocytes using confocal microscopy. **Theriogenology**, v. 55, p. 488, 2001.

NEGLIA, G., GASPARRINI, B., DI BRENZA, V.C., DI PALO, R., CAMPANILE, G., PRESICCE, G.A., ZICARELLI, L. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v. 59, p. 1123-1130, 2003.

OBA E. Tópicos atualizados ligados à reprodução na espécie bubalina. In: **Contribuição ao estudo dos bubalinos: período de 1972-2001: palestras**. Botucatu, SP: FMVZ/UNESP, 2003. p. 179-198.

OHASHI, O. M., MIRANDA, M. S., SOUSA, J. S., SOUSA, A. J. O., CORDEIRO, M. S., BIONDI, F. C. Produção in vitro de embrião bubalino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, n. 2, p. 103-109, 2003.

PANSANI, M. A. Anatomia e Fisiologia do Aparelho Reprodutor de Fêmeas Bovinas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 12, p. 2-3, 2009.

PERERA, B. M. A. O. Reproductive cycles of buffalo. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.194-199, 2011.

RAO, A. R.; RAO, S. V. A Study on oestrus and conception rate in buffaloes in Andhra Pradesh. **Indian Veterinary Journal**, v.45, p.846-852, 1968.

RODGERS, R.J.; IRVING-RODGERS, H.F.; VAN WEZEL, I.L.; KRUPA, M.; LAVRANOS, T.C. Dynamics of the membrana granulosa during expansion of the ovarian follicular antrum. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.171, p.41-48, 2001.

ROY, D. J.; MULLICK, D. N. Endocrine functions of corpus luteum of buffaloes during estrus cycle. **Endocrinology**, v.75, p.284-7, 1964.

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

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.59-72, 2000.

SIQUEIRA, J. B.; LEAL, L. S.; OBA, E. Dinâmica folicular ovariana na espécie bubalina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.3, p.139-148, 2009.

SINGAL, S. P.; DHANDA, O. P.; RAZDAN, M. N. Some managemental and therapeutic approaches in the treatment of physiological infertility of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). In: **International Congress on Animal Reproduction and AI**, 10th, 1984. Proceedings .... Urbana, IL: ICAR, v.2, p.470.

SHALGI, R.; KRAICER, P.; RIMON, A.; PINTO, M.; SOFERMAN, N. Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier. **Fertility and Sterility**, v.24, p.429-434, 1973.

STAINFIELD, A.; FIONA, J.; NÖTHLINGA, J. O.; ANSARIC, T. The distribution of small preantral follicles within the ovaries of prepubertal African elephants (*Loxodonta africana*). **Animal Reproduction Science**, v.129, p.96-103, out. 2011.

SHALASH, M. R. Physiology of reproduction in the buffalo cow. **International Journal Fertility**, v.3, p.425-432, 1958.

TANEJA, M.; ALI, A.; SINGH, G. Ovarian follicular dynamics in water buffalo. **Theriogenology**. 1996.

VALE, W.G., OHASHI, O.M., SOUSA, J.S., RIBEIRO, H.F.L. Biometria do sistema genital de búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 34, p. 193-202, 1982.

VALE, W. G. Bubalinos: fisiologia e patologia da reprodução. Campinas: **Fundação Cargill**. 86p, 1988.

VALE, W. G.; OHASHI, O. M.; SOUSA, J. S.; RIBEIRO, H. F. L. Studies on the reproduction of water buffalo in the Amazon basin. In: **Livestock in Latin America**. Vienna: **International Atomic Energy Agency**, 1990. p.201-210.

VALE, W.G. Reproductive management of buffalo under Amazon conditions. **Buffalo J.** v. 10, p. 85-90, 1994

VALE, W. G. Enhancing the puberty in buffalo heifers. In: **International Congress on Animal Reproduction**, 14th, 2000, Stockholm. Stockholm: ICAR, 2000. v.1, p.271.

VALE, W.G. Reproductive management of buffalo male aiming semen production for artificial insemination. In: **Buffalo Symposium of Americas**, 1, 2002, Belém, PA, 2002. Proceedings ... Belém: BSA, 2002.

VALE, W.G., RIBEIRO, H.F.L. Características reprodutivas das bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 29, n. 2, p. 63-73, 2005.

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.

ZICARELLI, L.; VALE, W. G. Patrones reproductivos estacionales y no estacionales en el bufalo domestico. In: BERDUGO, J. A., VALE, W. G. (Ed.) **Memorias del Curso Internacional de Reproducción Bufalina**. 2002, Medellín, Colombia. Medellín: CATI, 2002, p. 33-58.

# CAPÍTULO 2

## ARTIGO

### **Proteomic of follicular fluid from buffaloes (*Bubalus bubalis*)**

Nayara Fernanda Silva Marques<sup>1</sup>, Viviane Maria Codognoto<sup>1</sup>, Caroline Scott<sup>1</sup>,  
Andressa Fillaz Vieira<sup>1</sup>, Leticia Cristina Salgado<sup>1</sup>, Stella Maris Teobaldo Tironi<sup>1</sup>,  
Laiza Sartori de Camargo<sup>1</sup>, Marcus Vinicius Niz Alvarez<sup>2</sup>, Fabiana Ferreira de  
Souza<sup>1</sup>, Eunice Oba<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup>Biotechnology 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

## ABSTRACT

The objective of the present study was to identify, quantify and describe the protein profile of the follicular fluid and morphometry of the follicles, of mixed-race buffalo ovaries of the Mediterranean and Murrah breeds. The follicular fluid (FF) is an essential medium for the growth and maturation of the ovarian cells. The analysis of its components is fundamental for understanding the follicular dynamics of the buffalo species. The aim of this study was to trace the protein profile of FF. 112 ovaries from a slaughterhouse were used, FF extraction was performed manually using syringes and needles through aspiration puncture in the macroscopically visible follicles, the aspirated follicles were separated into six groups, <5 mm with corpus luteum (CL); <5 without CL; 5 - 8 with CL; 5 - 8 without CL; > 8 with CL; > 8 without CL. The total protein concentration was determined by the Bradford method. Based on the total protein concentration, an aliquot containing 50 µg was applied on 12% polyacrylamide gel, the run was interrupted when the samples reached the separation gel, then the gel was analyzed for analysis of the Nano mass spectrometry. -LC-ESI-Q-TOF mass spectrometry. The statistical analysis was performed using the MetaboAnalyst 4.0 program and according to the data obtained, we can see in the dendrogram and in the main component analysis (PCA), in the Vip Scores and in the Heat Map that the concentration of proteins was constant in all groups regardless the size of the follicles. The most relevant proteins were, Mucin-19, Haptoglobin, Histone H2A type 1, Histone H2B, Lysosomal alpha-glucosidase, Glutathione S-transferase A1, e a Serine protease inhibitor clade E member 2. We can relate these proteins that are in abundance in the follicular fluid as being promoters of follicular development, and the oocyte maturation process.

**Keywords:** protein, corpus luteum, bovine

## **1. Introduction**

The global herd of buffaloes has grown annually, in view of the scarcity of food, which became necessary to search for new sources of protein. Moreover, the buffaloes produce meat and milk of the high quality that can be destined for direct consumption and for the by-products with high marked value. In the world, the herd has a total 174 million heads, with India and Pakistan with high number of animals (Zicarelli et al., 2002).

Buffaloes have a reduced fertility rate when some biotechnologies are applied, a fact that is result of a lower number of primordial follicles in the ovary, little response to hormonal stimulation protocols, decreased embryo output and, consequently, lower pregnancy rate when compared to cattle (Neglia et al., 2003). Success of this biotechnique also depends of the oocyte viability, which is connected to composition of follicular integrity and in the knowledge of follicle physiology. The oocyte is involved by follicular fluid that consists of active molecules and proteins that are directly linked to follicular growth, oocyte fertilization and embryo development (Ginther et al., 1996). Proteins were the main components of this fluid and to study theirs characteristics can contribute to establish biomarkers able to recognize the oocyte quality (Wallace et al., 2012; Bianchi et al., 2013). Therefore, in humans, the proteomic analysis of follicular fluid has also been used to identify the response in in vitro fertilization protocols (Salerno et al., 2011).

In view of this, 2 hypotheses were elaborated, 1) The size of the follicle (< 5.0 mm; 5.0 to 8.0 mm and > 8.0 mm) influences the expression of follicular fluid proteins; and 2) Progesterone produced by the corpus luteum influences locally the expression of the follicular fluid proteins. Thus, the aim of this study was to

describe the proteins of the follicular fluid from buffaloes, and correlate with the follicle size and presence/absence of the corpus luteum.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### *2.1. Ethical aspects*

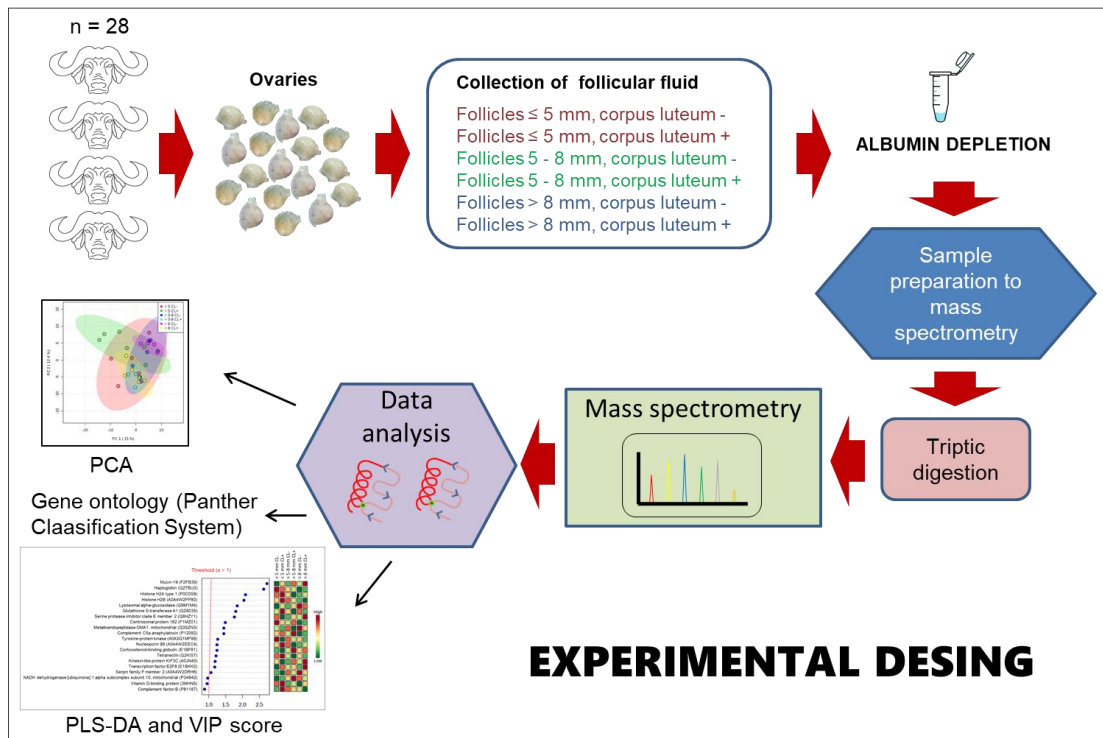
The study was conducted in accordance with the ethical precepts recommended by the National Council for Animal Control and Experimentation (CONCEA), and was approved by the Institutional Animal Use Ethics Committee (nº 0219/2018).

### *2.2. Reagents*

All reagents used were of high purity grade and purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil), otherwise were mentioned.

### *2.3. Experimental design*

For study, ovaries from female buffaloes obtained of a slaughterhouse were used. The follicles were measured and follicular fluid collected in according to follicular size and presence/absence of the corpus luteum. The samples were prepared to proteomic including albumin depletion, electrophoresis 1D-SDS-PAGE, tryptic in gel digestion, and mass spectrometry was performed. The data were analyzed by principal component analysis (PCA), partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) represented by variable in the projection score (VIP score) using the exponentially modified protein abundance index (emPAI). The gene ontology was described including biological process. The experimental design was represented in Figure 1.



**Figure 1.** Experimental design.

#### 2.4. Sample collection and preparation

Ovaries of 28 crossbred adult buffaloes from commercial slaughterhouses were used. After collection, the ovaries were kept in 0.9% NaCl solution and stored at 37° C in thermal boxes, to transport for the laboratory. In the laboratory, the ovarian follicles were measured with a caliper and classified according to the diameter (Table 1).

**Table 1.**

Experimental groups and sample number per group.

| Group | Follicle size | Corpus luteum | n     |
|-------|---------------|---------------|-------|
| 1     | ≤ 5 mm        | Absent        | 192   |
| 2     | ≤ 5 mm        | Present       | 528   |
| 3     | 5 to 8 mm     | Absent        | 440   |
| 4     | 5 to 8 mm     | Present       | 172   |
| 5     | > 8 mm        | Absent        | 24    |
| 6     | > 8 mm        | Present       | 92    |
| Total | --            | --            | 1,450 |

After the measurement, the follicular fluid was individually collected using 5 mL syringes and 30 x 7 needles. Then, the follicular fluid was centrifuged at 800g for 10 min to remove cellular content. The supernatant was recentrifuged at 10,000g, for 30 min at 4° C and the stored at -80° C for proteomics.

### *2.5. Samples preparation for proteomics*

The samples were subjected to albumin depletion in according (Colantonio et al. 2005). Briefly, an aliquot of follicular fluid was diluted with 0.1 mol NaCl in the final solution. The mixture was homogenized, incubated for 60 min at room temperature, and was added ethyl alcohol at 42% final concentration. The samples were homogenized and incubated for 60 min at room temperature. Then, the mixture was centrifuged at 16,000g for 45 min and the pellet (pellet 1) stored. The pH of the supernatant was adjustable to 5.7 using sodium acetate solution (pH 4.0), the sample was incubated for 60 min at room temperature and centrifuged the at 16,000g for 45 min, 4° C. The resulting supernatant,

containing albumin, was discarded and pellet 1 and 2 were eluted with PBS pH 7.0.

The total protein concentration from the follicular fluid was determined by the Bradford method in according to manufacturer instructions. The reading was performed in a nanospectrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo 169 Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) and the values were expressed in  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , based on a standard curve made from known concentrations of bovine serum albumin.

## *2.6. Tryptic in gel digestion*

The samples were submitted to electrophoresis 1D-SDS-PAGE, under denaturing conditions using 12% polyacrylamide in the separation gel. The samples were prepared according to Bollag et al. (1994) at a final concentration of 50  $\mu\text{g}$  of total protein. The electrophoresis run was conducted at 12 mA/gel and maximum voltage at 300 V. When the samples reached the separation gel, the run was stopped. Then, the gels were stained with colloidal coomassie (Luo et al., 2006; Neuhoﬀ et al., 1988) and each band was cut for tryptic in gel digestion.

The digestion was performed according to Shevchenko et al. (1996), with modifications. The bands were destained with 50% methanol, 2.5% acetic acid in purified water, for 4 times. The protein fragments were dehydrated with 100% acetonitrile, and the reduction of disulfide bridges was conducted with DTT (Bio-Rad<sup>®</sup>, Lagoa Santa, São Paulo, Brazil). The alkylation was done with iodoacetamide (Bio-Rad<sup>®</sup>, Santo Amaro, Minas Gerais, Brazil). Then, the samples were digested with trypsin (20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , 1: 50 trypsin/substrate) overnight.

The extraction was carried out with 5% formic acid, the samples were concentrated (Integrated Systems SPD1010 SpeedVac™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) and stored at -80° C until the mass spectrometry.

### *2.7. Mass spectrometry*

For mass spectrometry, samples were diluted in 0.1% formic acid (0.7 µg protein/µL), homogenized and centrifuged at 1,100 g for 5 min. A 4.5 µL aliquot (~ 3.2 µg protein) was separated by a C18 column (100 µ m x 100 mm) RP nano UPLC (NanoAcquity , Waters Corporation, Milford, MA, USA) coupled to a mass spectrometer Q ToFPremier (Waters Corporation, Milford , MA, USA) and nanoelectrospray at a flow rate of 0.600 µL/min. Acetonitrile gradient (2-90%) in 0.1% formic acid was maintained for 45 min. The nanoelectrospray voltage was maintained at 3.5 kV and third cone voltage 0 V up to 100 µC. The equipment was operated in top three modes, in which an MS spectrum was acquired, followed by MS/MS of the 3 most intense peaks detected. After MS/MS fragmentation, the ions were placed on an exclusion list for 60 s. For analysis of the endogenous cleavages of the peptides, a real-time deletion was used. The spectra were acquired using MassLynx v.4.1 software and the raw data were converted to the peak list format (.mgf) without adding the scans, and analyzed in Mascot Distiller software v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltda, Boston, MA, USA). Search parameters included trypsin as a protease, with a maximum of 1 missed cleavage allowed; carbamidomethylation of cysteine as fixed modification and methionine oxidation as variable modification; and a tolerance of 0.1 Da for both ion precursors (MS) and fragment (MS/MS), and

monoisotopic molecular mass.

The relative quantification of each protein in the mixture was determined by emPAI (Ishihama et al., 2005), obtained from the Mascot Distiller software (Matrix Science Inc., Boston, MA, USA).

### *2.8. Gene ontology*

Gene ontology was based on biological process using Panther version 10, available online at <http://www.pantherdb.org> (Thomas et al., 2003).

### *2.9. Data analysis*

The data were normalized to exclude proteins that did not represent the population and the outliers were adjusted by winsorization. In this way, proteins that were not present in at least half of the samples in each group, were considered absent in the group. Then, the outliers were corrected for dividing the emPAI of each protein in each sample by the sum of emPAIs of the same protein in all samples. Non-hierarchical clustering of multivariate analysis was used to evaluate the clustering random samples in software MetaboAnalyst 3 (Xia; Wishart, 2016). PCA was obtained to describe the variation of the sample in the scoring matrix and PLS-DA, to indicate the relevance of proteins in the characterization of each group. As a result of PSL-DA was calculated from the value of the VIP score. The most abundant proteins in each group were considered when VIP score was  $\alpha \geq 1.5$  (Checa et al., 2015).

## **3. RESULTS**

Considering all groups, a total of 1,395 proteins were found, however the

number of proteins varied according to the groups (Table 2), but 146 proteins were common to all groups.

**Table 2.**

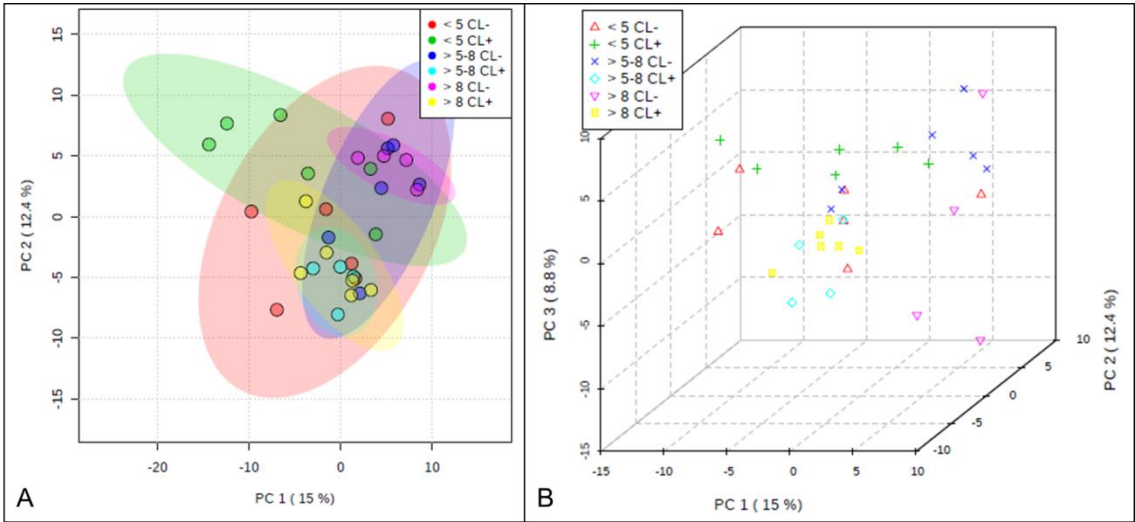
Number of protein found in each group.

| <b>Follicle size</b> | <b>Corpus luteum</b> | <b>Total proteins<br/>(number)</b> | <b>Proteins in this group<br/>(number)</b> |
|----------------------|----------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|
| ≤ 5 mm               | Absent               | 65                                 | 15                                         |
| ≤ 5 mm               | Present              | 66                                 | 16                                         |
| 5 to 8 mm            | Absent               | 58                                 | 5                                          |
| 5 to 8 mm            | Present              | 67                                 | 17                                         |
| > 8 mm               | Absent               | 66                                 | 17                                         |
| > 8 mm               | Present              | 63                                 | 12                                         |

According to the multivariate analysis, there was no clear separation between the groups (Figure 2), observed in the PCA. The sum of main components 1 and 2 was less than 50%, confirming this result, even in the 3D image.

The results of PLS-DA, represented by the VIP score determined 7 proteins with  $\alpha > 1.5$ . There was a variation between the increased or decreased abundance in accordance with follicular size and presence/absence of corpus luteum. The mucin 19 was more abundant in samples with the corpus luteum. The haptoglobin and two classes of histones were increased in smaller follicles and gradually reduced in larger follicles. The glutathione S- transferase A1 was more abundant in small follicles (< 5 mm) with corpus luteum an larger follicles without corpus luteum. Lysosomal alpha-glucosidase was increased in larger follicles, independently of corpus luteum. The serine protease inhibitor clade E

member 2 was more abundant in small follicles (< 5 mm) with corpus luteum and larger follicles without corpus luteum (Figure 3).



**Figure 2.** Results of the multivariate analysis. Principal component analysis (PCA) in a 1D (A) and 3D (B) projection. The sum of the main components (PC1 + PC2) was 27.4.

Table 3 represents the gene ontology of 7 main proteins found in the PLS-DA represented on VIP score.

In all groups, the gene ontology found as main biological processes, the two most relevant being the cellular process and metabolic process (Figure 4).

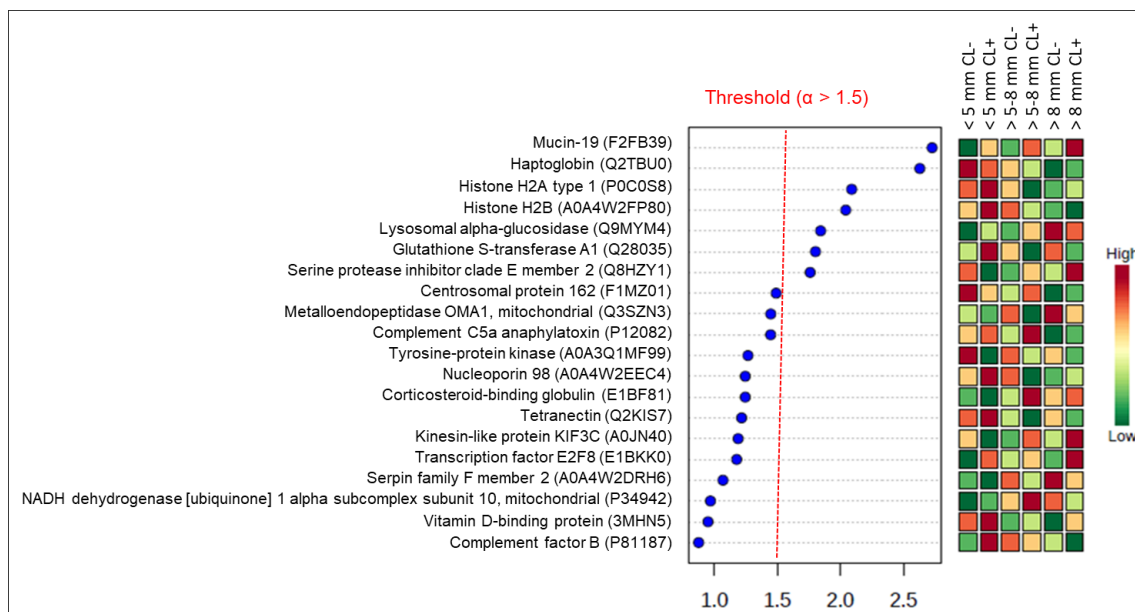
**Table 3.** Gene ontology of main proteins found in the PLS-DA represented by VIP score.

| Protein name                 | ID*        | Gene      | Gene ontology*                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                            |
|------------------------------|------------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                              |            |           | Molecular function                                                                           | Biological process                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Cellular component                                                                                         |
| Lysosomal alpha-glucosidase  | Q9MYM4     | Gaa       | Activity of alpha-1,4-glucosidase; carbohydrate binding ;maltose alpha-glucosidase activity; | Contraction of the heart muscle ;contraction of the diaphragm; catabolic glycogen process; morphogenesis of the heart; locomotion behavior; lysosomal organization; cellular homeostasis of muscle cells; neuromuscular process that controls balance; neuromuscular process that controls posture; regulation of cardiac contraction force; tissue development; vacuolar sequestration | Lysosome; lysosomal membrane                                                                               |
| Glutathione S-transferase A1 | Q28035     | GSTA1     | Glutathione transferase activity; peroxidase activity; steroid delta-isomerase activity      | Biosynthetic process derived from glutathione; glutathione metabolic process; metabolic process of prostaglandin; xenobiotic metabolic process                                                                                                                                                                                                                                          | Cytoplasm                                                                                                  |
| Haptoglobin District         | Q2TBU0     | Hp        | Antioxidant activity; haemoglobin binding;serine endopeptidase activity                      | Acute inflammatory response; acute phase response; defense response to the bacterium immune system process; positive regulation of cell death response to organic substance                                                                                                                                                                                                             | Extracellular or segregated region; extracellular space                                                    |
| Histone H2A type 1           | P0C0S8     | H2AC11    | DNA binding ; enzymatic bonding; heterodimerization activity of proteins                     | Organization of chromatin; chromatin silencing                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Core; other locations                                                                                      |
| Histone H2B                  | A0A4W2FP80 | HIST1H2BK | DNA binding; heterodimerization activity of proteins                                         | --                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Core; other locations                                                                                      |
| Mucin-19                     | F2FB39     | MCU19     | May work on homeostasis of ocular mucus                                                      | O-glycan processing; stimulating signaling pathway of the lectin receptor type C                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Plasma membrane; apical cell membrane; single-pass type I membrane protein; core; cell membrane; Cytoplasm |

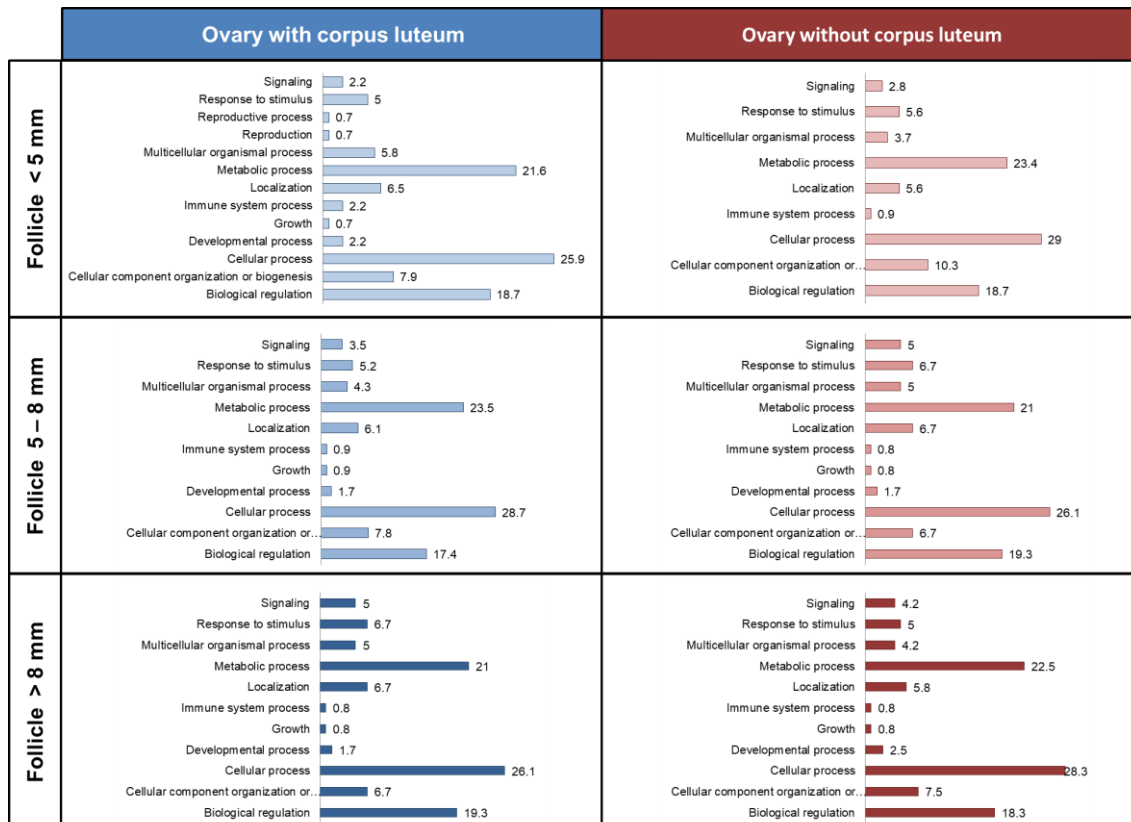
|                                               |        |          |                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                   |
|-----------------------------------------------|--------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Serine protease inhibitor<br>clade E member 2 | Q8HZY1 | SERPINE2 | Heparin binding; peptidase activity;<br>serine-type endopeptidase inhibitor<br>activity; signaling binding receiver | Blood coagulation; cerebellar granular layer<br>morphogenesis; detection of mechanical<br>stimulus involved in sensory perception;<br>innervation; long-term synaptic potentiation;<br>mating plug formation; negative regulation of<br>cell growth; negative regulation of cell<br>population proliferation; negative regulation of<br>phosphatidylinositol 3-kinase signaling;<br>negative regulation of plasminogen activation;<br>negative regulation of platelet aggregation;<br>negative regulation of protein catabolic<br>process; negative regulation of smoothened<br>signaling pathway; negative regulation of<br>sodium ion transport; positive regulation of<br>astrocyte differentiation; regulation of synaptic<br>transmission, glutamatergic; regulation of<br>timing of cell differentiation; secretion by cell;<br>secretory granule organization; seminal vesicle<br>epithelium development | Cytosol; extracellular region or<br>secreted; plasma membrane; other<br>locations |
|-----------------------------------------------|--------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|

---

\*ID obtained from UNIPROTKB <https://www.uniprot.org/>



**Figure 3.** Results of the discriminant analysis by partial least squares (PLS-DA) which resulted in a VIP score to select relevant proteins ( $\alpha > 1.5$ , dotted red line).



**Figure 4.** Biological process of proteins found in the studied groups.

#### 4. DISCUSSION

In this study, follicular fluid proteomic from buffalo was performed, characterizing the proteins that contribute for fertility, since are involved in the development and maturation of oocytes (Fu et al., 2016). Moreover, these proteins can be used as biomarkers to determine the oocyte quality (Mukesh et al., 2004).

A total of 109 proteins were identified in all groups, 66 proteins were common to groups. A PCA was not able to cluster the follicular categories according to the identified proteins. Despite this, 7 proteins will be discussed, since they have already been observed in other species and play an important role in the reproductive system. In our knowledge this is a first study which performed a cluster analysis in different categories of follicles from buffalo, based on follicular size and presence/absent of corpus luteum. Only one published study has described proteins of follicular fluid from this species (Fu et al., 2016).

The main protein from VIP score was mucin 19, which was in higher abundance in the follicles with corpus luteum. This protein, of high molecular weight, has at least 20 isoforms, is normally found in epithelial tissues, and its main characteristic is to form gels that has the function of lubrication and cell signaling (Von Wald et. al., 2010; Ishihama et. al., 2017). The viscosity of the follicular fluid can be justified due to a high concentration of this protein that has less than 20 isoforms (Von Wald et al., 2010). In humans, a mucin 19 has been mentioned as a biomarker of oocyte maturation, *in vitro* fertilization and also as a pathway of anti-inflammatory process during fertilization (Aboubakr et. al., 2004). This protein already was described in preovulatory follicles (Aboubakr et. al., 2004), and there is positive correlation between mucin and progesterone

concentrations (Spencer; Bazer, 2002). Therefore, mucin is in lower abundance in atretic follicles, which can indicate that these follicles are healthy and there is a paracrine control of the follicular fluid proteins by progesterone. Therefore, there was no relation of mucin with the follicular size, but higher progesterone concentrations are observed near to selection and deviation of the dominant follicle (Ginther et al., 1996). Since there is an association between mucin and progesterone concentration in the preovulatory follicles, the mucin can be to indicate proximity of follicular maturation. Contrary, exogenous administration of the estrogen decreases the mucin in uterine tube (Greenwald, 1969). Thus, we suggested that the increased follicular progesterone ready the preovulatory follicle with high mucin synthesis.

Haptoglobin was another protein found in higher abundance, but in small follicles. It is considered an acute phase protein that after hemolysis is irreversibly bound to hemoglobin and has the function the ovarian follicular protection (Estes et al., 2009). Organisms with high levels of haptoglobin cause tissue damage, including acute inflammation, infection or tissue necrosis (Bottini et al., 2009). The haptoglobin in the follicular fluid of women modulates lecithin-cholesterol acyltransferase, a type of activity stimulated by HDL (high density lipoprotein) and apolipoprotein A1 (APOA1) inhibiting reverse cholesterol transport (Bottini et al., 1999). Several isoforms of apolipoprotein were found in our samples, although we found no relationship between these proteins and follicular development or with the haptoglobin. Then, if the haptoglobin is involved in the steroid synthesis in smaller follicles, its function include modulating of the estrogen and progesterone synthesis, since these hormones are lower concentration in small than large follicles (Bottini et al., 1999).

A serine protease inhibitor clade E member 2 (*SERPINE2*) is orthologous to glia-derived nexin (GDN, human and rat) and protease nexin-1 (PN-1, mouse) (Bédard et al., 2003), and is considered a plasminogen activator inhibitor (Giau et al., 2005; Richard et al., 2004), which regulates the proteolytic enzyme cascades of tissue-type plasminogen activator (tPA) and urokinase plasminogen activator (uPA) (Gils; Declerck, 2004; Vaughan, 2005), modulating fibrinolysis, coagulation, inflammation, cell mobility, cellular differentiation and apoptosis (Hayashi et al., 2011). In the follicles, there is remodeling of basal lamina and alterations of extracellular matrix, which is mediated by cascade of tPA and uPA that culminates with thinning of the follicular wall and ovulation in bovines (Dow et al., 2002; Liu, 2004). Moreover, in cattle, the protein was labeling (immunostaining) in the granulosa cells and oocytes from the primordial, primary, and secondary pre-antral follicles. Similarly to our results, there was strong labeling in large antral follicles associated with granulosa cells and follicular fluid. *SERPINE2* mRNA levels was also sixfold higher in granulosa cells from large follicles than < 4 mm follicles. Therefore, *SERPINE2* labeling was identified in corpus luteum. The authors concluded that this protein is associated with growth and remodeling of the follicles (Bédard et al., 2003), and modulates the expansion of cumulus cells (Lu et al., 2013). In humans, *SERPINE2* is considered a gene marker of the oocyte maturation (Ambekar et al., 2013; Li et al., 2015) and its mRNA expression is greater in healthy than atretic follicles (Hayashi et al., 2011). Then, our results suggest that serine protease inhibitor clade E member 2 has similar functions in buffaloes, since was identified in greater abundance in follicles > 8 mm.

In our study, the glutathione S- transferase A1 was detected especially in small

follicles and lysosomal alpha-glucosidase in the large follicles. These proteins play an antioxidant action that prevents oxidative stress and cell damage (Choi et al., 2015). Similarly to haptoglobin play a role in signaling the ERK pathway in protein-dependent modifications histones, which was also found in higher abundance in small follicles. Both are present in the maturation and post-fertilization of bovine oocytes produced *in vitro* (Hashimoto et al., 2000). In oocyte maturation, an increase in *cumulus* cells is observed when glutathione S-transferase A1 is added to the maturation medium, increasing the blastocyst cleavage and output rates (Luciano et al., 2005; Eliasson et al., 1999). These suggest that glutathione S-transferase A1 is a protein involved with the oocyte maturation, and positively interfering in the cellular development of the species. Lysosomal alpha-glucosidase was observed in higher abundance in large follicles, without relation with the corpus luteum. This protein is described in studies on Glycogen Storage Disease Type II characterized by enzyme deficiency and lysosomal failure (Hagemans et al., 2006). In follicles, in our knowledge there is no description in follicular fluid, which can be a condition of buffaloes. A isoform of lysosomal alpha-glucosidase was identified in cumulus cells of woman, named neutral alfa-glucosidase AB that was correlated with oocyte maturation (Braga et al., 2016). Whether this protein is involved in follicular development and oocyte maturation in buffaloes remains to be investigated.

Two isoforms of the histone (histone H2A type 1, histone H2B) were identified in our study in small follicles, although other study did not able to identified significant difference between gene expression of the growing and persistent follicles to histone H2B (Lingenfelter et al., 2007). Histones are a protein

connected chromosome organization, biogenesis (Lingenfelter et al., 2007), interaction with DNA and regulation of gene expression (Dráb et al., 2014), phosphorylates for kinase protein (Lake; Salzman, 1972). Study demonstrated the histones as immunomodulatory proteins in the reproductive system (Dráb et al., 2014). Histones bind to macrophages (Friggeri et. al., 2012) and to molecules associated with immune system (Duclos et, al., 1991; Witkin et. al., 2011) and have antimicrobial activity, including in follicular fluid (Dráb et al., 2014). Histone H2A has antigonadotropic action, inhibiting the binding GnRH and exogenous hCG in ovarian of the rats (Margolin et al., 1992). Indeed, histones can modulate inflammatory response aiming to protect follicles and can also modulate the binding to follicular cells to gonadotrophins during follicular growth, since was found in higher abundance in small follicles, which need of the lower gonadotrophin concentration to its development (Carson et. al., 1979).

Based on our results, we conclude that the proteins found in greater abundance in all groups of follicles are mostly related to follicular growth, development and oocyte maturation. A protein identified in significant abundance in our study was Lysosomal alpha-glucosidase, to our knowledge there are no reports of it in the literature correlating it as an important component of ovarian follicular fluid. We believe that these results may assist in the development of means of maturation for PIV in the buffalo species since this process shows low rates of embryonic recovery, thus increasing the production rates of this species on the market.

## 5. REFERENCES

Aboubakr, M., Elnashar, M.D., Gamal, I., Aboul-Enein, M.D. **Endometrial receptivity. Middle East Fertil. Soc. J.**, 9 (2004), pp. 10-24.

Ambekar, A. S., Nirujogi, R. S., Srikanth, S. M., Chavan, S. et al., Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis. **J. Proteomics** 2013, 87, 68–77.

Bédard S., Brûlé C. A., Price D. W., Silversides J. G.; Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, Volume64, Issue2, February 2003, Pages 152-165

Bianchi L, Gagliardi A, Campanella G, Landi C, Capaldo A, Carleo A, et al. A methodological and functional proteomic approach of human follicular fluid in route for oocyte quality evaluation. **J. Proteomics** 2013;90:61-76.

Braga, D. P. A. F., Setti, A. S., Turco, E. G. L., Cordeiro, F. B., Cabral, E. C., Cortezzi, S. S. Ono, E., Figueira, R.C.S., Eberlin, M.N., Borges Jr., E. Protein expression in human cumulus cells as an indicator of blastocyst formation and pregnancy success. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 33, n. 12, p. 1571-1583, 2016.

BOLLAG, DM; ROZYCKI, MD e EDELSTEIN, SJ Protein methods . **Wiley-Liss, EUA**. 2<sup>nd</sup> ed. 1996. 432 p. ISBN: 0-471-11837-0.

Bottini, N., Gimelfarb, A., Gloria-Bottini, F., La Torre, M., Lucarelli, P., & Lucarini, N. Haptoglobin genotype and natural fertility in humans. **Fertility and sterility**, v. 72, n. 2, p. 293-296, 1999

Carson , JK Findlay , HG Burger , AO Trounson Gonadotropin Receptors of the Ovine Ovarian Follicle during Follicular Growth and Atresia Notas do autor **Biology of Reproduction** , Volume 21, Edição 1, 1 de agosto de 1979, páginas 75–87, <https://doi.org/10.1095/biolreprod21.1.75>

Colantonio; Christy Dunkinson, Diane E. Bovenkamp; Jennifer E. Van-Eyk. Effective removal of albumin from serum. **Proteomics** 2005, 5, 3831–3835.

Checa, A., Bedia, C., Jaumot, J. Lipidomic data analysis: Tutorial, practical guidelines and applications. **Analytica Chimica Acta**. Volume 885, Pages 1-16. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.068>  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267015002962>

Choi Seong Hee, et al. Noise-Induced Neural Degeneration and Therapeutic Effect of Antioxidant Drugs. **J Audiol Otol: The Korean Audiological Society** [Internet]. 2015 [cited 2020 Aug 20];19:111-119. DOI 10.7874 / jao.2015.19.3.111. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4704551/>.

Dow, M. P., L. J. Bakke, C. A. Cassar, M. W. Peters, J. R. Pursley, and G. W. Smith. 2002. Gonadotropin surge-induced up-regulation of the plasminogen activators (tissue plasminogen activator and urokinase plasminogen activator) and the urokinase plasminogen activator receptor within bovine periovulatory follicular and luteal tissue. *Biol. Reprod.* 66:1413–1421.

Duclos, L.T. Zlock, L. Marnell, Definition of a C-reactive protein-binding determinant on histones, **J. Biol. Chem.** 266 (1991) 2167–2171.

Dráb, T., Kračmerová, J., Hanzlíková, E., Černá, T., Litváková, R., Pohlová, A., Tichá, M., Přikryl, P., Liberda, J. The antimicrobial action of histones in the reproductive tract of cow. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 443, Issue 3, P. 987-990, 2014.

Eliasson, M., Stark, T., De-Pierre, J. W. (1999). Expression of glutathione transferase isoenzymes in the porcine ovary in relationship to follicular maturation and luteinization. **Chemico-Biol. Interactions** 117, 35–48.

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. **Fertility and sterility**, v. 92, n. 5, p. 1569-1578, 2009.

Friggeri, S. Banerjee, N. Xie, H.C. Cui, A. de Freitas, M. Zerfaoui, H. Dupont, E. Abraham, G. Liu, Extracellular histones inhibit efferocytosis, **Mol. Med.** 18 (2012) 825–833.

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. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 618.

Giau, R., Carrette, J., Bockaert, J., Homburger, V., 2005. Constitutive secretion of protease nexin-1 by glial cells and its regulation by G-protein-coupled receptors. **J. Neurosci.** 25, 8995–9004.

Gils, A., Declerck, P.J., 2004. Plasminogen activator inhibitor-1. **Curr. Med. Chem.** 11, 2323–2334.

Ginther, O.J.; Wiltbank, M.C.; Fricke, P.M. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, n.6, p.1187-1194, 1996.

Gloria-Bottini, F., Magrini, A., Amante, A., Nicotra, M., & Bottini, E. Haptoglobin phenotype and reproductive success in repeated spontaneous abortion. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 144, n. 2, p. 153-156, 2009

Greenwald, G. S., In Hafez E. S. E., and R. J. Blandau (eds.), *The Mammalian Oviduct*, U. of Chicago Press, Chicago-London, 1969, p. 183.

HASHIMOTO, S .; MINAMI, N .; YAMADA, M. et al. A concentração excessiva de glicose durante a maturação in vitro prejudica a competência de desenvolvimento de oócitos bovinos após a fertilização in vitro: relevância para as espécies reativas intracelulares de oxigênio e o conteúdo de glutathione. *Molecular Reproduction and Development* , v.56, p.520-526, 2000.

Hayashi, K., Ushizawa, K., Hosoe, M. et al. Differential gene expression of serine protease inhibitors in bovine ovarian follicle: possible involvement in follicular growth and atresia. **Reprod Biol Endocrinol** 9, 72 (2011).

Ishihama , Y. , Oda , Y., Tabata , T., Sato, T., Nagasu , T., Rappsilber , J., Mann, M., 2005. Exponentially modified protein abundance index ( emPAI ) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. **Mol. Cell Proteomics**. 4, 1265-1272. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500061-MCP200>

Lake, R.S. & Salzman, N.P. (1972) Occurrence and properties of a chromatin-associated F1-histone phosphokinase in mitotic Chinese hamster cells, **Biochemistry** 11,4817-4826.

Li, S. H., Lin, M. H., Hwu, Y. M., Lu, C. H., Yeh, L. Y., Chen, Y. J., & Lee, R. K. K. Correlation of cumulus gene expression of GJA1, PRSS35, PTX3, and SERPINE2 with oocyte maturation, fertilization, and embryo development. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2015.

Lingenfelter BM, Dailey RA, Inskeep EK, Vernon MW, Poole DH, Rhinehart JD, Yao J. 2007. Changes of maternal transcripts in oocytes from persistent follicles in cattle. **Mol Reprod Dev**, 74:265-272.HO

Liu Yi-Xun. Tissue-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Are Coordinately Expressed during Ovulation in the Rhesus Monkey. *Endocrinology* [Internet]. 2004 [cited 2020 Aug 20];145(4):1767-1775. DOI 10.1210/en.2003-1327. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article/145/4/1767/2878350>

Lu C-H, Lee RK-K, Hwu Y-M, Lin M-H, Yeh L-Y, Chen Y-J, et al. (2013) Involvement of the Serine Protease Inhibitor, SERPINE2, and the Urokinase Plasminogen Activator in Cumulus Expansion and Oocyte Maturation. **PLoS ONE** 8(8): e74602.

Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A, Modina S. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. **Mol Reprod Dev** 71, 389–397, 2005.

Luo , S., Wehr , NB, Levine, RL, 2006. Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie blue and Fast Green. **Anal. Biochem** . 350, 233–238.

Margolin, Y., Aten, R., Behrman, H. Mechanisms for the antigonadotropic action of the ovarian gonadotropin- releasing hormone-binding inhibitor protein/histone H2A on ovarian cells. **Biology of reproduction**, v. 46, 1992.

Mukesh, M., M. Sodhi, S. Bhatia and B. P. Mishra. 2004. Genetic diversity of Indian native cattle breeds as analyzed with 20 microsatellites. **J. Anim. Breed. Genet.** 121:416-424.

Neglia, G., Gasparrini, B., Di Brienza, V.C., Di Palo, R., Campanile, G., Presicce, G.A., Zicarelli, L. Bovine and buffalo in vitro embryo production usinh oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v. 59, p. 1123-1130, 2003.

Neuhoff , V., Arold , N., Taube, D., Ehrhardt , W., 1988. 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** 9, 255–262.

Nuñez-Calonge, R., Cortés, S., Gonzalez, L. M. G., Kireev, R., Vara, E., Ortega, L., Caballero, P., Rancan, L., Tresguerres, J. Oxidative stress in follicular fluid of young women with low response compared with fertile oocyte donors. *Reproductive BioMedicine Online*. Volume 32, Issue 4, April 2016, Pages 446-456

Renzetti, G., Silvestre, G., D'Amario, C., Bottini, E., Gloria-Bottini, F., Bottini, N., Auais, A., Perez, M. K., Piedimonte, G. Less air pollution leads to rapid reduction of airway inflammation and improved airway function in asthmatic children. **Pediatrics March** 2009, 123 (3) 1051-1058;

Richard, B., Arocas, V., Guillin, M.C., Michel, J.B., Jandrot-Perrus, M., Bouton, M.C., 2004. Protease nexin-1: a cellular serpin down-regulated by thrombin in rat aortic smooth muscle cells. **J. Cell. Physiol.** 201, 138–145.

Salerno, A.; Di Iorio, L.; Nazzaro, A. A proteomic analysis of human follicular fluid in women undergoing ivf cycles. **Fertility and Sterility**, v.96, p.193, 2011.

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels . **Anal. Chem.** 1996 , 68 ( 5 ): 850-8 . <https://doi.org/10.1021/ac950914h>

Spencer, FW Bazer Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. **Frontiers in Bioscience** 7, d1879-1898, September 1, 2002

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 Res.**, 13: 2129-2141.

Van der Beek, N. A., Hagemans, M. L., Van der Ploeg, A. T., Reuser, A. J., &

Van Doorn, P. A. Pompe disease (glycogen storage disease type II): clinical features and enzyme replacement therapy. **Acta Neurologica Belgica**, v. 106, n. 2, p. 82-86, 2006.

Vaughan, D.E., 2005. PAI-1 and atherothrombosis. **J. Thromb. Haemost.** 3,1879–1883.

T. Von Wald, Y. Monisova, M.R. Hacker, S.W. Yoo, A.S. Penzias, R.R. Reindollar, A. Usheva Age-related variations in follicular apolipoproteins may influence human oocyte maturation and fertility potential **Fertil. Steril.**, 93 (2010), pp. 2354-2361

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.

Witkin, I.M. Linhares, A.M. Bongiovanni, C. Herway, D. Skupski, Unique alterations in infection-induced immune activation during pregnancy, **BJOG** 118 (2011) 145–153.

Xia, J., Wishart , DS, 2016. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Curr . Protoc . Bioinformatics**. 55, 1-91.

Zicarelli, L.; Vale, W. G. Patrones reproductivos estacionales y no estacionales en el bufalo domestico. In: BERDUGO, J. A., VALE, W. G. (Ed.) **Memorias del Curso Internacional de Reproducción Bufalina**. 2002, Medellín, Colombia. Medellin: CATI, 2002, p. 33-58.