ALVARO CARLOS GALDOS RIVEROS

ANÁLISE PROTEÔMICA DO SACO VITELINO DE BOVINOS

São Paulo
2009

ALVARO CARLOS GALDOS RIVEROS

Análise proteômica do saco vitelino de bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo
2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2159
FMVZ

Galdos, Alvaro Carlos Riveros
Análise proteômica do saco vitelino de bovinos / Alvaro Carlos Galdos Riveros. – São Paulo : A. C. R. Galdos, 2009.
110 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Eletroforese bidimensional. 2. Saco vitelino. 3. Análise proteômica. 4. Bovinos. 5. Embrião. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise proteomica do saco vitelino de bovinos", protocolado sob o nº1324/2008, utilizando 30 (trinta) vacas, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 23 de abril de 2008.

We certify that the Research "Proteomics analysis of bovine yolk sac", utilizing 30 (thirty) cows, protocol number 1324/2008, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/23/08.

São Paulo, 23 de abril de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Univrsitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone/Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
+ 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GALDOS, Alvaro Carlos Riveros

Título: Análise proteômica do saco vitelino de bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

A Deus,

O senhor é o meu pastor, nada me faltará (Salmo 23, 1)
Porque me demonstrou o qual grande é a sua misericórdia e *NUNCA ME ABANDONOU* quando mais precisei
OBRIGADO SANTO PAI!!!!

Aos meus Pais Leônidas e Hilda,

Filho meu, ouve a instrução do teu pai, e não deixes o ensino da tua mãe. Porque eles serão uma grinalda de graça para a tua cabeça, e colares para o teu pescoço (Provérbios 1: 8-9).

Ensinaram-me que a luta pelos nossos ideais se baseia na FÉ e PERSEVERANÇA, nem em toda minha vida conseguiria agradecer a vocês pelos ensinamentos...
LOS QUIERO MUCHO!!!!!!!!

A minha Avó "Mamá Chepita",

Sem seu exemplo de luta e esforço nunca teríamos conseguido nada nesta vida. Você que cuidou de mim sempre e me protege, só tenho a dizer uma coisa.....
TE QUIERO MUCHO MAMÁ CHEPITA!!!!!!

A minha querida Irma Silvana e Martin,

Silvana, pelo exemplo de superação que vi em você e aprendi desde que era criança...e ao meu cunhado Martin, pelos conselhos e por *sempre* estar disposto a ajudar
LOS QUIERO MUCHO!!!!

Aos meus Tios: Ysabel e Freddy,

Por me ensinar que a honestidade é o mais importante na família, na escola, na faculdade e no trabalho e que podemos ser os melhores quando nos decidimos
LOS QUIERO MUCHO!!!!!

A minha querida Juliana,

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, ***e não tivesse amor, nada seria***
(I Coríntios 13,2).

Com você passei, passo e passarei os melhores momentos da minha vida...disso eu tenho certeza
TE QUIERO MUCHOO!!!!

A minha querida família
dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A **Deus**, pela vida que eu tenho e por estar comigo sempre em todo momento;

Ao **Brasil**, por abrir suas portas para poder realizar meus sonhos;

A **Profa. Dra. Maria Angélica Miglino** pela oportunidade a mim concedida, por seus ensinamentos e pela paciência inabalável, por confiar sempre em mim na realização deste trabalho, sempre disposta a esclarecer minhas duvidas;

Ao Prof**. Dr. Durvanei Augusto Maria** pela amizade e por me aceitar no seu laboratório, além da ajuda durante a realização deste trabalho, pelos ensinamentos, pelos grandes momentos vividos durante estes anos;

A **Profa Dra. Ana Patricia Yatsuda** da FCF-USP (Ribeirão Preto) pelo estagio e pelos valiosos ensinamentos na área da Proteômica;

Ao **Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli** pelo uso do seu laboratório para a realização deste trabalho;

Aos Professores da Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo: Pedro Primo Bombonato, Paula Papa de Carvalho, Jose Roberto Kfoury Jr, Francisco Hernandez Blazquez e Augusto Coppi Maciel Ribeiro;

A minha “Hermanita” **Miryan** que desde que a conheci me demonstrou que alem de ser uma grande amiga é uma ótima professional, sempre disposta a me ajudar durante a tese e pelos grandes momentos que passamos, pelas conversas, risadas, enfim por tudo!!!;

Aos meus grandes amigos Hugo (Tibur), Artur (Flanders) e Bruno (Bundoli), pelos momentos de amizade e pelas conversas que tivemos, embora algum dia estejamos longe um do outro...lembrarei de vocês Amigos, e desses momentos na morada dos estudantes!!!.....OBRIGADOO

Aos meus amigos colombianos Alex Genoy, Lenin Villamizar, Magda, Miguelito e Andrea pela amizade, pelos grandes momentos;

Aos meus amigos chilenos Christian, Alvaro, Pedro e Mario pela amizade, pelos grandes momentos;

As minhas amigas: Patrícia, Claudia Kanashiro, Alicia e Lorena pela amizade, atenção e disposição.

Aos amigos e colegas da FMVZ-USP:, Rose, Marcelo, Mateus, Marcão, Carlo, Carla, Drika, João, André, Ricardo, Rodrigo, Ana Luisa, Marina, Cris, Renata, Juliana Passos....enfim a todos vocês OBRIGADO.

A Elza e o pessoal da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia da Universida de São Paulo pela ajuda em todo este tempo da faculdade.

Aos amigos do Laboratorio de Bioquimica e Biofisica do Instituto Butantan: Norma, Rogerio, Kleber, Ricardo, Mirian, Fernanda e Dona Vilma.

Aos tecnicos Reginaldo (Indio), Ronaldo, Sandra e Diogo pelo amizade e sempre estar dispostos a ajudar.

Aos funcionarios Jaqueline, Maicon, Fatima, Natalia, Tati e Cauê por estar sempre dispostos a ajudar.

Aos meus amigos da pensão, foram muitas pensões hehehe.....Ao Sr Ailton e Dona Yvani, grandes pessoas que me compreenderam e me ajudaram sempre...OBRIGADO!!!. Dona Bernardete pela companhia e ajuda a Dona Lucy e Don Anastácio pela hospitalidade nesses anos.....OBRIGADO A VOCÊS.

Aos Frigorifico Poços de Caldas – Frigonossa, que contribuiu em grande parte deste trabalho, estando sempre de portas abertas para nos receber.

RESUMO

RESUMO

GALDOS, A. C. R. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos.** [Proteomic analisys of bovine yolk sac]. 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O saco vitelino desempenha um importante papel no desenvolvimento embrionário de todos os mamíferos. Sua função está sendo estudada, demonstrando ser um dos lugares iniciais da hematopoiese. No período em que a placenta verdadeira ainda não esta formada, durante o desenvolvimento embrionário, o saco vitelino é a principal fonte de nutrição do embrião, constituindo um sitio de transferência e síntese de proteínas. As proteínas são moléculas que governam praticamente todas as funções celulares e são do ponto de vista químico as moléculas biológicas estruturalmente mais complexas. A proteômica é o estudo em grande escala de proteínas de uma amostra biológica complexa. O objetivo deste trabalho foi realizar a analise estrutural e bioquímica inicial das proteínas presentes no saco vitelino de embriões bovinos por eletroforese bidimensional 2D-PAGE. A partir dos géis obtidos em 2D-PAGE as amostras de proteínas contidas no saco vitelino de 37 dias de gestação apresentaram cerca de 1230 proteínas, e os géis das amostras de 23 dias de gestação apresentaram cerca de 970 proteínas. O saco vitelino de 23 dias apresentou proteínas essenciais diferencialmente expressas nos estágios de desenvolvimento, como Hemogen, proteína expressa neste estagio, responsável pelo controle da proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas; a proteína Glicoproteína-N-acetilgalactosamina 3-beta-galactosiltransferase-1, envolvida nos processos de angiogênese, trombopoiese e no desenvolvimento da homeostase nos rins; a proteína fator de transcrição Corion-especifico (GCMa) fator de transcrição necessário para o desenvolvimento da placenta. Enqueanto que o saco vitelino de 37 dias apresentou proteinas essenciais deste estágio como a apolipoproteína E (APOE) que medeia à ligação, inter-sinalização e catabolismo das partículas de lipoproteína, podendo servir como uma ligação para o receptor de LDL (apo B/E) e para receptores específicos de apo-E dos tecidos hepáticos durante a embriogênese. Estas proteinas serão de vital importância para o desenvolvimento do embrião até a formação da placenta.

Palavras-chave: Eletroforese bidimensional. Saco vitelino. Análise proteômica. Bovinos, Embrião.

ABSTRACT

ABSTRACT

GALDOS, A. C. R. **Proteomic analisys of bovine yolk sac**. [Análise proteômica do saco vitelino de bovinos]. 2009. 110 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The yolk sac plays an important role in embryonic development of all mammals. Its function is being studied, proving to be one of the initials of haematopoiesis. In the period when the placenta is not real yet formed during embryonic development, the yolk sac is the main source of nutrition of the embryo, providing a place for the transfer and synthesis of proteins. Proteins are molecules that govern all cellular functions and are from a chemical structurally the most complex biological molecules. The proteomics is the large-scale study of proteins in a complex biological sample. The aim of this work was make the analisys of present proteins in the yolk sac of bovine embryos by 2D-PAGE two-dimensional electrophoresis. The gels obtained from 2D-PAGE of protein samples contained in the yolk sac of 37 days of pregnancy had about 1230 proteins, and gels of samples from 23 days of pregnancy had about 970 proteins. The yolk sac of 23 days showed essential proteins differentially expressed in stages of development, as Hemogen, protein expressed in stage, responsible for controlling the proliferation and differentiation of hematopoietic cells, the protein acetylgalactosamine glycoprotein-N-3-beta-galactosyltransferase-1, involved in the process of angiogenesis, trombopoiese homeostasis and development of the kidney, the protein factor chorion-specific transcription (GCMa) transcription factor necessary for the development of the placenta. The yolk sac of 37 days showed essential proteins differentially expressed in stages of development , as apolipoprotein E (APOE), which mediates the binding, intersignaling and catabolism of lipoprotein particles, and can serve as a link to the receptor to LDL (apo B/E) and specific receptors for apo E in the liver tissue embryogenesisThese proteins are of vital importance to the development of the embryo until the formation of the placenta.

Keywords: Two-dimensional electrophoresis. Yolk sac. Proteomic analisys. Bovine, Embryo.

RESUMEN

RESUMEN

GALDOS, A. C. R. **Analisis proteómico del saco vitelino de bovinos.** [Proteomic analisys of bovine yolk sac]. 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

El saco vitelino es un anexo embrionario que desempeña un papel importante en el desenvolvimiento embrionario de todos los mamiferos. Su función esta siendo estudiada, demostrando ser uno de los lugares de inicio de la hematopoyesis. Durante el periodo en el que la placenta verdadera todavia no esta formada, durante el desenvolvimiento do embrión, el saco vitelino es la principal fuente de nutrición del embrión, constituyendo un lugar de transferencia y sintesis de proteinas. Las proteinas son moleculas que lideran practicamente todas las funciones celulares y son desde un punto de vista quimico las moleculas biologicas estructuralmente mas complejas. El objetivo de este estudio fue realizar un analisis estructural y bioquimico inicial de las proteinas presentes en el saco vitelino de embriones bovinos por electroforesis bidimensional 2D-PAGE. A partir de los geles obtenidos em 2D-PAGE las muestras de proteinas contenidas en el saco vitelino de 37 dias de gestación presentarón cerca de 1230 proteinas y los geles de las muestras de 23 dias de gestación presentarón cerca de 970 proteinas. El saco vitelino de 23 dias presento proteinas diferencialmente expresas en los periodos de desenvolvimiento, como Hemogen, proteina expressada solamente neste periodo, responsable por el control de la proliferación y diferenciación de celulas hematopoyeticas, la proteina Glicoproteina-N-acetilgalctosamina 3-betagalactosiltransferasa-1, envuelta en processos como angiogenesis, trombopoyesis y en el desenvolvimiento de la homeostasis en los riñones, la proteina Corion-especifico (GCMa) que es un factor de transcripción necesario para el desenvolvimiento de la placenta. En cuanto que el saco vitelino de 37 dias presento proteinas esenciales de este periodo como la apolipoproteina E (APOE) que media la ligación, interseñalización y catabolismo de las particulas de liproteina, pudiendo servir como una ligación para el receptor de LDL (apo B/E) y para los receptores especificos de apo E de los tejidos hepaticos durante la embriogenesis. Estas proteinas seran de vital importancia para el desenvolvimiento del embrión hasta la formación de la placenta.

Palabras-llave: Electroforesis bidimensional, Saco vitelino, Analisis proteómico, Bovinos, Embrión.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletroforese Bidimensional 2D-PAGE utilizado na analise de proteomas. 46

Figura 2 - Metodologia utilizada na Eletroforese Bidimensional 2D-PAGE. 53

Figura 3 - Desenvolvimento embrionario e formação do saco vitelino de embriões bovinos provenientes de monta natural, com idade gestacional estimada de A – 24 dias, B – 29 dias, C e D – 37 dias 67

Figura 4 - Desenvolvimento embrionario e formação do saco vitelino de embriões bovinos provenientes de monta natural, com idade gestacional estimada de A – 42 dias, B – 42 dias, C – 48 dias 69

Figura 5 - Protocolo de Eletroforese bidimensional para amostras de saco vitelino de embriões bovinos 71

Figura 6 - Separação das proteinas do saco vitelino de embrioes bovinos com idade estimada de 37 dias de gestação por Eletroforese bidimensional. Focalização isoeletrica realizada em gradiente de pH NL de 3 – 10, coloração com Azul de Coomassie G-250 73

Figura 7 - Gel proteomico do saco vitelino de embrião bovino com idade estimada de 37 dias de gestação, separação pelo intervalo de pH (3, 5, 7, 10) 75

Figura 8 - Separação das proteinas do saco vitelino de embrioes bovinos com idade estimada de 23 dias de gestação por Eletroforese bidimensional. Focalização isoeletrica realizada em gradiente de pH NL de 3 – 10, coloração com Azul de Coomassie G-250 78

Figura 9 - Gel proteomico do saco vitelino de embrião bovino com idade estimada de 23 dias de gestação, separação pelo intervalo de pH (3, 5, 7, 10) 81

Figura 10 - Perfil proteomico do saco vitelino. A direita estão representados em 3D, regiões que contem os spots que apresentaram expressão diferencial de proteinas 86

Figura 11 Perfil proteomico do saco vitelino. A direita estão representados em 3D, regiões que contem os spots que apresentaram expressão diferencial de proteinas 87

Figura 12 Perfil proteomico do saco vitelino. A direita estão representados em 3D, regiões que contem os spots que apresentaram expressão diferencial de proteinas 88

Figura 13 Gel proteomico do saco vitelino de embrião bovino com idade estimada de 23 dias, que apresentou alta quantidade de proteinas expressas nesta idade (região F) 89

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Solução de reidratação para as tiras IPG: Estocar a -20ºC em aliquotas de 1mL 56

Tabela 2 - Programa para o IPGphor III (tira de 13cm, pH 3-10). A corrida sera realizada com a fonte de eletroforese EPS 3501 XL 56

Tabela 3 - Composição do gel 12,5% (SDS-PAGE). 58

Tabela 4 - Composição da Solução de equilibrio para SDS-PAGE. 59

Tabela 5 - Programa para o sistema Eletroforetico Ruby SE600: parametros de separação. 60

Tabela 6 - Composição da Solução de Fixação utilizada para coloração Azul Brilhante de Coomassie G-250. 61

Tabela 7 - Composição da Solução colorante de Azul Brilhante de Coomassie G-250. 61

Tabela 8 - Composição da solução de armazenagem dos géis 12,5% SDS-PAGE.. 62

Tabela 9 - Valores de Intensidade, area e volume dos spots dos géis proteomicos do saco vitelino de embrião bovino. Representação de acordo com o programa Image Master 2D v.6.0 (GE-Amersham Biosciences). 74

Tabela 10- Provaveis proteinas representadas pelos spots dos geis proteômicos do saco vitelino de embrião bovino com idade estimada de 23 e 37 dias de gestação, nas respectivas faixas de peso molecular (PM) e ponto isoeletrico (pI). 76

Tabela 11- Valores de Intensidade, area e volume dos spots dos géis proteomicos do saco vitelino de embrião bovino. Representação de acordo com o programa Image Master 2D v.6.0 (GE-Amersham Biosciences). 79

Tabela 12- Provaveis proteínas representadas pelos spots dos géis proteômicos do saco vitelino de embrião bovino com idade estimada de 23 e 37 dias de gestação, nas respectivas faixas de peso molecular (PM) e ponto isoeletrico (pI) 82

ABREVIATURAS

INDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE	Eletroforese Bidimensional em gel de poliacrilamida
CHAPS	[(3-Cholamidopropyl) dimethylammido]-1-propanesulfonate
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CR	Crown Rump
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	(*2S,3S*)-1,4-Bis-sulfanilbutano-2,3-diol
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
HCG	Gonadotrofina coriônica humana
IEF	Focalização Isoelétrica(isoelectric focusing)
IPG strip	Fita de focalização elétrica
IPG	gradiente imobilizado de pH (Immoblized pH gradient)
kDa	Kilo Daltons
mL	mililitro
mRNA	RNA mensageiro
MW	Peso molecular
pI	Ponto Isoelétrico
PM	Peso molecular
PT	Proteína total
rpm	roteções por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenodiamina
Tris	Tris-hidroximetilaminoetano
USP	Universidade de São Paulo
V	voltagem
Vh	volts-hora
µL	microlitros
µM	micromol
αFP	α Fetoproteina

SUMARIO

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 28

2 **OBJETIVOS** 31

3 **REVISÃO DE LITERATURA** 33

3.1 SACO VITELINO 33

3.2 PLACENTA 36

3.3 PROTEINAS 38

3.4 PROTEÔMICA 40

3.5 ELETROFORESE 44

3.5.1 **Eletroforese Bidimensional** 45

3.5.1.1 Primeira dimensão: Focalização Isoeletrica 47

3.5.1.2 Segunda dimensão: Eletroforese em de poliacrilamida (PAGE) 47

3.6 TRATAMENTO DA AMOSTRA 49

4 **MATERIAL E MÉTODO** 52

4.1 ESTUDO MACROSCOPICO: PARÂMETROS ANALIZADOS 52

4.2 PREPARO DE MATERIAL 52

4.2.1 **Preparação das amostras** 54

4.2.2 **Dosagem de Proteínas Totais** 54

4.2.3 **Primeira dimensão: Focalização isoelétrica** 55

4.2.3.1 Reidratação das tiras de gel (*strips*) 55

4.2.3.2 Focalização Isoeletrica (IEF) 56

4.2.3.3 Armazenagem dos geis de Focalização 57

4.2.4 **Segunda dimensão: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida** 57

4.2.4.1 Preparação do gel 12,5% (SDS-PAGE) 58

4.2.4.2 Armazenagem dos geis SDS-PAGE de segunda dimensão 58

4.2.4.3 Equilibrio da tira (*strip*)..... 59

4.2.4.4 Corrida SDS-PAGE 59

4.2.5 **Detecção de proteinas** 60

4.2.5.1.Coloração por Coomassie Brilliant Blue G-250 60

4.2.6 **Digitalização captura e análise de imagem**..... 62

4.2.7 **Calculo do PM e determinação do pI de spots** 63

4.2.8 **Identificação *in silico* dos spots do gel 2D** 63

4.2.9 **Análise computacional gráfica e quantitativa**..... 64

5 **RESULTADOS**..... 66

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA: EMBRIÃO E SACO VITELINO..... 66

5.2 OBTENÇÃO DE UM PROTOCOLO DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL 2D-PAGE PARA AMOSTRAS DE SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS..... 70

5.3 ANÁLISE DOS GÉIS 2D-PAGE DE SACO VITELINO DE 37 DIAS DE GESTAÇÃO 72

5.4 ANÁLISE DOS GÉIS 2D-PAGE DE SACO VITELINO DE 23 DIAS DE GESTAÇÃO 77

5.5 ANÁLISE 3D DOS SPOTS DE PROTEINA DO SACO VITELINO DE EMBRIÃO DE 23 E 37 DIAS DE GESTAÇÃO 85

6 DISCUSSÃO 91

7 CONCLUSÕES 100

REFERÊNCIAS..... 103

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas na área pecuária têm resultado em grande sucesso no desenvolvimento tecnológico e metodológico que aprimora significativamente a eficiência da produção animal (GREEN et al*.,* 2007). Os avanços na produção de bovinos de ótima qualidade elevam o Brasil a ser uma das primeiras potências em produção de bovinos de corte, agregando à carne alto valor nutricional.

Diskin, Sreenan (1980) e Dunne et al*.* (2000) afirmam que a eficiência reprodutiva é o fator que mais influencia na produtividade e lucratividade de um rebanho. A mortalidade pré-natal é a responsável por aproximadamente um terço de todas as falhas gestacionais (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004), sendo que a maioria destas ocorre no início da gestação (KUNZ et al., 2002), durante o período embrionário, o qual se estende da fecundação ao completo estágio de organogênese, em torno do 42º dia da gestação (DUNNE et al*.,* 2000).

Björkman et al. (1989) descreveram que neste estagio o embrião é envolvido por quatro membranas: cório, âmnio, saco vitelino, e alantóide. Primeiramente o cório se desenvolve em uma simples camada de epitélio (trofoblasto) avascular. O âmnio consiste em um revestimento interno de ectoderma e uma vascular membrana conectada ao tecido, formando um saco ao redor do feto repleto de líquido.

O saco vitelino é uma das membranas que desempenham um papel importante para a sobrevivência inicial do embrião em muitas espécies de mamíferos, além de produzir proteínas necessárias para o seu desenvolvimento (WOLF *et al*., 2003). Sua função nos mamíferos é complexa, participando da hematopoiese e transferência de material materno, tais como aminoácidos, vitaminas e proteínas (DEREN et al., 1966; LLOYD et al., 1976).

As proteínas controlam a maioria dos processos celulares, os quais ocorrem em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (AEBERSOLD; MANN, 2003; SOUZA *et al.,* 2003).

Nas passadas duas décadas, a biologia molecular tem mudado o perfil das pesquisas na pecuária, começando no campo da genômica e as relativamente

novas áreas da genômica funcional, proteômica, transcriptômica, metabolômica e metagenômica (GREEN et al., 2007). O estudo de proteínas em larga escala é conhecido como proteômica, associada tradicionalmente com a exposição de um grande número de proteínas de uma linha celular ou organismo em géis de poliacrilamida bidimensional (WILKINS et al., 1996; ANDERSON; ANDERSON, 1996; WILKINS et al., 1997).

A separação de proteínas por técnicas bidimensionais como ponto isoelétrico seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida (mapeamento protéico) é um método que tem apresentado características destacáveis, tais como o alto poder de resolução e boa reprodutibilidade quando são usados para separar soluções complexas de proteína, assim como extratos de plantas ou soro humano (KLOSE, 1975).

Acredita-se que as altas taxas de mortalidade embrionária provenientes da fecundação *in vitro* podem ser provocadas devido a dificuldades na transição de nutrientes do saco vitelino para o alantóide (DE SOUSA et al., 2001). Assim, acreditamos que a análise destas proteínas será de fundamental importância para sua compreensão funcional, durante o estágio de maior susceptibilidade à perdas embrionárias. Isto pode ocorrer devido à alta atividade celular relacionada à indução e formações de tecidos, responsáveis por um desenvolvimento normal sem altos índices abortivos.

O estudo dos perfis protéicos do saco vitelino de embriões bovinos por análise proteômica será de grande importância para avaliar a expressão diferencial dos spots de proteína, a sua caracterização, identificação e supostamente ser um biomarcador molecular ou bioquímico nos diferentes estágios de gestação bovina normal e manipulada, e assim compreender como estas proteínas atuam durante os estágios mais críticos da diferenciação celular no desenvolvimento do embrião bovino.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Determinar o perfil protéico diferencial das proteínas do saco vitelino em bovinos por eletroforese bidimensional (2D-PAGE).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo de separação de amostras de saco vitelino bovino não manipulados para eletroforese bidimensional 2D-PAGE.
- Analisar diferencialmente (quantitativamente e qualitativamente) as proteínas contidas no saco vitelino de embriões bovinos não manipulados;
- Determinar os pontos isoelétricos das proteínas diferencialmente expressas no saco vitelino;
- Obter valores preditivos dos spots de proteínas diferenciais existentes no saco vitelino através de softwares e banco de dados.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

Para uma melhor sistematização dos assuntos pesquisados, se levantaram tópicos: Saco vitelino, placenta, proteínas, proteômica, eletroforese, eletroforese bidimensional e tratamento da amostra.

3.1 SACO VITELINO

De acordo com Mossman (1937) a formação do saco vitelino inicia-se quando o hipoblasto (endoderma prospectivo) sofre deslocamento e delamina-se dando origem à cavidade de blástula. O mesoderma formado no botão embrionário primitivo migra entre o epiblasto e o hipoblasto. Este transforma a blástula em uma estrutura de três camadas. O epiblasto é então transformado no trofoblasto do córion. A cavidade forrada pelo endoderma é o saco vitelino. Este completa seu desenvolvimento, no momento em que a porção extra-embrionária de celoma se alarga. Assim, o saco vitelino é uma esplancnopleura, a qual inicialmente tem uma extensa conexão com a somatopleura coriônica. Constituído por células originadas a partir do disco embrionário, ele forma inicialmente uma camada fina de ectoderma (saco vitelino uni laminar ou onfalopleura). Subseqüentemente, a migração de células das camadas internas do endoderma para o ectoderma forma o saco vitelino bilaminar e, finalmente, o crescimento do mesoderma entre os dois primeiros dão origem ao saco vitelino trilaminar.

O saco vitelino, assim como cório, é derivado do ectoderma embrionário através de uma divisão/ruptura (roedores e primatas) ou uma dobra (demais mamíferos).

De acordo com Wrobel e Suess (1968) o saco vitelino se desenvolve de um disco trilaminar para um corpo cilíndrico. Russe et al. (1992) observaram que durante a fase inicial de alongação para o saco vitelino, a endoderme diferencia-se, na região da membrana citoplasmática, em células prismáticas e células achatadas, as quais acompanham o trofoblasto.

O saco vitelino é o primeiro anexo a ser formado, sendo uma camada do epitélio endodérmico acompanhado pelo mesênquima fetal vascularizado (vasos vitelínicos). As aves têm a função de conter o vitelo, desintegrá-lo, absorver substâncias nutridoras e levá-los para o embrião mediante vasos vitelínicos. Nos mamíferos domésticos ele persiste como uma estrutura rudimentar, a qual geralmente não participa das trocas materno-fetais, sendo considerado precocemente órgão vasculogênico e hematocitopoético.

Em humanos, duas a três semanas após a fertilização e a implantação do ovo no endométrio, surge no mesênquima lateral a notocorda agrupamentos de células, denominadas “ilhotas sanguíneas”, que representam os progenitores dos sistemas vasculares e hematopoiético. As células mais externas das ilhotas formam o endotélio e as mais centrais (hemocitoblasto) se tornam livres de lúmen (ZAGO; COVAS, 2006)

Nos ruminantes o saco vitelino é grande e vascular. Portanto, é completamente cercada pela cavidade extraembriônica soltando-se do córion pelo 20° dia de gestação na vaca. Como resultado, ao redor dos 25º dias de gestação o saco vitelino foi reduzido a uma estrutura sólida como um cordão (LATSSHAW, 1987).

Na ratazana o saco vitelino é o principal órgão nutritivo do embrião antes da formação da placenta alantóica funcionante. No camundongo o saco vitelino é desenvolvido e similar ao da ratazana, envolvendo completamente o âmnio através da maior parte da gestação (RENFREE et al., 1975).

Já no macaco rhesus o saco vitelino degenera rapidamente e possivelmente não chega a ser funcional (NODEN; LAHUNTA, 1990).

Segundo Sadler (2005) no 9º dia da gestação, o pólo embrionário desprende-se, da fase interna do trofoblasto, uma camada de células achatadas (membrana de Hauser). Esta membrana junto com a margem do disco embrionário forram a cavidade exocelômica ou saco vitelino primitivo. O endoderma (que no 12° dia começou a forrar a membrana de Hauser com uma camada de células epiteliais baixas) continua a proliferar e forma uma nova cavidade, denominado saco vitelino secundário ou definitivo que é mais importante que a cavidade exocelômica (ou saco primitivo), por isto acredita-se que grande parte da exocelômica é excluída dele. Supõe-se que esta porção forma os chamados cistos exocelômicos, freqüentemente encontrados no celoma extra-embrionário ou cavidade coriônica.

Conforme afirma Hafez e Hafez (2004) em animais domésticos a lâmina mesodérmica se divide e combina com o trofoectoderma para formar o saco vitelino.

O saco vitelino inicia sua regressão por volta da segunda ou terceira semana gestacional à medida que o alantóide se expande para se fusionar com o córion. Entretanto, a função do saco vitelino é estendida na placenta esférica da égua, enquanto o alantóide se expande gradualmente para substituí-lo no 30° dia de gestação (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Barone (1976) afirmou que o saco vitelino involue e se degenera muito cedo nos ruminantes e, a partir da segunda semana seus vestígios não são encontrados até o final da prenhez.

O saco vitelino em humano é um órgão flutuante na cavidade exocêlomica entre a placenta e a cavidade amniótica que participa no desenvolvimento do embrião. Esta aparece durante a 6ª semana de gestação, como uma estrutura esférica e cística, coberta por numerosos vasos superficiais pequenos, os quais se fundem na base do duto vitelino que liga o saco vitelino, a parte ventral do embrião, diretamente ao intestino e à principal circulação sanguínea (GONZALES-CRUSSI; ROTH, 1976; JONES; JAUNIAUX, 1995).

Durante seu estágio transitório, tem-se demonstrado seu papel na hematopoiese (MIGLIACCIO et al., 1986) e biosíntese de proteínas (GITLIN; PERRICELI, 1970; SHI et al., 1985), até o fígado embrionário ter amadurecido suficientemente para exercer com estas funções.

Apesar do saco vitelino não ser funcional no que diz respeito ao armazenamento de vitelo, sua presença é essencial por varias razões: ele desempenha papel na transferência de nutrientes para o embrião, durante a segunda e na terceira semana, quando a circulação uteroplacentária esta sendo estabelecida; a formação de sangue ocorre primeiro no mesoderma extra-embrionário, bem vascularizado, que cobre a parede do saco vitelino. No inicio da terceira semana, continua-se formando até que a atividade hematopoiética se inicia no fígado, durante a 6ª semana; durante a 4ª semana, o endoderma do saco vitelino é incorporado pelo embrião, formando o intestino primitivo. Seu endoderma, derivado do epiblasto dá origem ao epitélio da traquéia, brônquios, pulmões e trato digestivo; e aparecimento das células germinativas primordiais no revestimento endodérmico da parede do saco vitelino na terceira semana e, subseqüentemente, migram para as glândulas sexuais em desenvolvimento. Elas se diferenciam nas

células germinativas (espermatogônias nos homens e ovogônias nas mulheres) (MOORE; PERSAUD, 2004).

O desenvolvimento inicial começa quando a membrana e a cavidade exocelômica modifica-se rapidamente, formando o saco vitelino primitivo. O saco vitelino e as cavidades amnióticas tornam possíveis os movimentos morfogenéticos das células do disco embrionário; com a formação do saco do celoma extra-embrionário, o saco vitelino primitivo diminui em tamanho e forma-se o segundo saco secundário (definitivo). Este saco vitelino menor é formado por células endodérmicas extra-embrionárias que migram para o lado interno do saco vitelino primitivo, vindas do hipoblasto do disco embrionário. Durante a formação do saco vitelino secundário uma grande parte do saco vitelino primitivo destaca-se. Ele pode desempenhar um papel no transporte seletivo de materiais nutritivos para o disco embrionário (MOORE; PERSAUD, 2004).

O saco vitelino tem sido reconhecido, por muito tempo, por ter a função hepática fetal como a hematopoiese e proteínas de “soro”, durante o início do desenvolvimento embrionário (LIU et al., 1991).

Tiedemann (1979) afirmou em seus estudos que os vasos sanguíneos do endotélio do saco vitelino de gatos são fenestrados e apresentam membrana basal completa. Estas condições são favoráveis para a passagem de proteínas e de células sanguíneas.

Gulbis et al. (1998) sugeriram que o saco vitelino é uma importante zona de transferência entre as cavidades extra-embrionária e embrionária e pode ajudar a desenvolver protocolos de terapia gênica de injeção de células a cavidade exocelomica.

3.2 PLACENTA

Antes da formação da placenta, ocorre o processo de implantação, um estágio transitório no processo de prenhez, durante o qual o blastócito assume uma posição fixa e inicia uma complexa interação fisiológica com o útero, para estimular o desenvolvimento placentário. Nos animais ungulados, o processo inicia-se pela fase de aposição ou manutenção passiva de contato entre o trofoblasto e o epitélio

uterino, seguindo para a fase de adesão ou união coesiva entre superfícies interativas. A seguir, evolui para uma fixação definitiva, por volta do 19° dia da gestação nos bovinos, através da interdigitação dos microvilos, culminando na formação de um órgão complexo, a placenta, com funções múltiplas de proteção, nutrição, respiração, controle endócrino e imunossupressão (KING et al., 1982).

Desde o momento da implantação aparece a placenta para facilitar a mudança interna fisiológica de substâncias para que o feto se mantenha. No suíno esta mudança fisiológica interna acontece ao conectar-se a superfície maternal (endometrial) e fetal (coriônica) incluindo as microvilosidades de tais estruturas que se projetam umas dentro das outras aumentando de forma considerável a superfície de contato, facilitando assim a transferência de substâncias (HUGHES; VARLEY, 1984).

Björkman et al. (1989) revisando comparativamente a placentação em animais de laboratório, roedores, logomorfos, carnívoros (gato e cão) e ungulados (pequenos ruminantes e mini porcos), definiram a placenta como a justaposição ou fusão de membranas fetais: cório, âmnio, saco vitelino e alantóide. O cório se desenvolve primeiro como uma camada simples de epitélio (trofoblasto) que é avascular. O âmnio consiste em revestimento ectodérmico na membrana avascular de tecido conectivo; forma uma bolsa cheia de fluído em torno do feto. O saco vitelino e alantóide são divertículos endodermais do intestino e são vascularizados por vasos umbilicais e vitelínicos, respectivamente. As duas membranas tardias formam fundamentalmente dois tipos placentários diferentes. O saco vitelino podendo ou não combinar com o cório, fornece vascularização fetal da placenta corioalantóide.

Leiser e Kaufmann (1994) estudando comparativamente os aspectos estruturais da placenta de alguns mamíferos tais como cavalo, porco, ruminantes domésticos, gato, cobaia e o homem, propõem termos para sua classificação de acordo com os tipos de membranas placentárias, o formato da placenta, a interdigitação materno fetal, as camadas de barreira placentária, a invasão trofoblástica, a reação das células teciduais, a formação do sinciciotrofoblasto, as inter-relações de fluxo sanguíneo materno-fetal e a separação da placenta no nascimento. Estes termos originam-se parcialmente da classificação básica das placentas, e são obtidas dos resultados de pesquisas recentes. Assim eles auxiliam

para um melhor entendimento da estrutura e da função dos diferentes tipos de placenta.

A placenta dos mamíferos eutérios (todos os mamíferos exceto os marsupiais e os monotremas) é uma estrutura que se forma pela aposição de membranas fetais e tecidos maternos (NODEN; LAHUNTA, 1990).

King (1982) relatou que as placentas da maioria dos mamíferos tinham modificações que ampliavam a quantidade de superfícies da área disponível para absorção de nutrientes. Essa ampliação poderia estar na espessura histológica ou num nível ultra-estrutural de organização, já que a área de superfície disponível para transporte era um importante parâmetro para determinação da taxa absorção nas quais muitos nutrientes poderiam ser transferidos para o feto.

3.3 PROTEINAS

O termo proteína foi introduzido na linguagem no ano de 1938 pelo Químico sueco Jöns Jacob Berzelius para descrever um tipo particular de macromoléculas compostos por uma cadeia linear de aminoácidos, e que eram abundantes em organismos vivos (TWYMAN, 2004). Proteínas são polímeros de aminoácidos resultantes da tradução das informações genéticas contida no DNA das células. O termo proteína vem do grego proteios e significa “a mais importante”. De fato as proteínas compõem um conjunto de moléculas indispensáveis para todos os seres vivos do planeta. Devido a essa diversidade de funções, as proteínas exercem um papel fundamental em quase todos os fenômenos biológicos, como produção de energia, defesa imunológica, contração muscular, atividade neuroquímica e reprodução. Do ponto de vista comercial, bilhões de dólares são gerados anualmente por indústrias que trabalham com proteínas (DE SOUSA et al., 2003).

As moléculas de proteínas são copolímeros de condensação de até 20 aminoácidos de ocorrência natural distinguidos apenas pelas suas cadeias laterais. Existem literalmente bilhões de combinações possíveis e milhares de diferentes espécies de proteínas, cada tipo com uma função especifica a desempenhar no organismo (ATKINS; JONES, 2001).

Segundo De Sousa et al. (2003) as proteínas são as biomoléculas mais abundantes e ocorrem em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares.

Eles catalisam uma extraordinária quantidade de reações químicas, fornecem rigidez estrutural à célula, controlam o fluxo do material através da membrana, regulam as concentrações dos metabolitos, atuam como sensores e chaves, produzem movimentos e controlam a função genética (NELSON; COX, 2002). As proteínas são essenciais para todos os seres vivos, possuindo imensa gama de variações de atividades que determinam o padrão de transformação química na célula. Dentre suas funções principais estão: a catálise enzimática, o transporte, o armazenamento de moléculas e íons, sustentação mecânica, proteção imunitária, geração e transmissão dos impulsos nervosos e no controle do crescimento da célula (BERG et al., 1995).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o saco vitelino é a principal fonte de produção de muitas proteínas tais como pré-albumina, albumina, α-fetoproteina (αFP), α1-antitripsina e transferrina (GITLIN; PERRICELI, 1970; SHI et al., 1985).

Baumgartner et al. (1994) estudaram a síntese protéica de embriões de camundongos no 11º dia de gestação onde encontraram que no saco vitelino contem grupos característicos de proteínas em adição a várias outras proteínas especificas. Durante esse período da embriogênese nos roedores o saco vitelino desempenha um papel funcional importante relacionado aos aspectos nutricionais e hematopoiéticos.

Segundo Gulbis et al. (1998) foi demonstrado por eletroforese que nos fluidos do saco vitelino contém proteínas comparáveis com a albumina, interalbumina-α1-globulina e por imunobloting.revelaram a presença de albumina, αFP, α1-antitripsina, α2-macroglobulina, transferrina, Fatores de complemento 3 – 4 e imunoglobulina G.

A presença de HCG no saco vitelino embrião humano fornece a primeira evidencia biológica da sua função de absorção e como importante via de acesso de proteínas de alto peso molecular para a circulação embrionária, HCG é uma glicoproteína produzida exclusivamente durante a gestação humana pelo trofoblasto placentário (GULBIS et al., 1998). Ela é composta por duas subunidades, α e β, que são sintetizadas separadamente e subseqüentemente ligadas no - covalentemente (LAPTHORN et al., 1994).

A α-fetoproteína é uma glicoproteína embrionária especifica produzida a partir do segundo mês de gestação pelo saco vitelino, o fígado fetal e o trato gastrointestinal (GITLIN; PERRICELI, 1970).

Minuth e Tiedeman (1980) apresentaram que no suíno a maioria das proteínas sintetizadas foram localizadas nas regiões de alto e médio peso molécula do gel. A relativa ausência de proteínas na região de baixo peso molecular poderia sugerir ausência de histonas, que cumprem um papel importante na regulação dos genes, de maneira epigenética.

3.4 PROTEÔMICA

A proteômica surgiu no final de 1970 quando pesquisadores começaram a criar as bases de dados de proteínas usando naquela época a moderna técnica de eletroforese bidimensional (O`FARREL, 1975).

O termo proteoma foi proposto por Wilkins e Willians em 1994, como sendo todo o conteúdo de proteínas expressas por um genoma ou, no caso de organismos multicelulares, ao complemento protéico expresso por um tecido ou células diferenciadas (WILKINS et al., 1996). Após a euforia provocada pelo seqüenciamento dos genomas de vários organismos, a comunidade cientifica percebeu que, para se compreender a função gênica em toda sua plenitude, era necessário o estudo em larga escala das proteínas expressas. Constatou-se que, embora importante, a análise das seqüências de nucleotídeos nem sempre reflete uma relação direta com os níveis de proteínas expressas e, conseqüentemente, de atividade biológica (GYGI et al., 1999).

Enquanto o genoma de um organismo permanece relativamente estável ao longo da vida, o proteoma é extremamente dinâmico e variável. A análise proteômica permite saber se um gene esta sendo expresso, a concentração relativa desse produto e, por fim, as modificações que podem ocorrer nessas proteínas após a sua tradução.

A análise proteômica pode mostrar também como esses processos metabólicos, regulatórios e de sinalização se tornam disfuncionais nos estados

patológicos e como podem ser manipulados, mediante, por exemplo, a administração de medicamentos ou a terapia gênica.

O objetivo inicial dos estudos proteômicos foi a identificação em larga escala de todas as proteínas presentes em uma célula ou tecido. Atualmente, consistem na análise simultânea de misturas complexas de proteínas como as provenientes de lisados celulares e extratos de tecidos com o intuito de detectar diferenças quantitativas e qualitativas na expressão protéica (WESTERMEIER; NAVEN, 2002).

Seus objetivos se diversificaram para a análise de vários aspectos funcionais das proteínas, como modificações pós-traducionais, interações proteína-proteina, existência de isoformas, atividades e estruturas. O campo de atuação desta ciência estende-se à descoberta de novas drogas, terapias, diagnósticos, microbiologia, bioquímica. A pesquisa proteômica torna possível a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas especificas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificar essas moléculas é extremamente útil no diagnostico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento (CASH, 2002).

A expressão dos padrões de proteína em células e tecidos é característica do seu desenvolvimento, fisiologia ou estado patológico. Assim, é muito importante determinar os perfis de expressão destas proteínas e as alterações de um estágio não patológico para um estágio especifico da doença.

As razões que justificam tal magnitude do proteôma são as variações na clivagem do RNA e/ou modificações pós-traducionais, que o torna várias vezes maior e complexo que o genoma correspondente. Modificações na abundância (quantidade) das proteínas com o tempo, com o desenvolvimento do organismo e as alterações do meio ambiente, tornam este desenvolvimento dinâmico (WILKINS et al., 1996).

Tais fatos impulsionaram o desenvolvimento de novas tecnologias para o estudo deste conjunto de proteínas expressas. Estas ferramentas passaram então, a ser denominadas instrumentos da “Proteômica”. Isto revolucionou a Biologia e inaugurando uma nova forma de fazer ciência, a “Ciência dirigida para a descoberta” (Discovery-driven Science). Assim, isto podera trazer grande quantidade de dados, como também para encontrar padrões a partir dos quais as informações podem ser inferidas. Isto nao serviria apenas para provar ou refutar uma única hipótese estritamente definida, em contraposição a “Ciência dirigida por hipótese”

(Hypothesis-driven Science), forma clássica de fazer ciência (AEBERSOLD et al., 2000).

No contexto da proteômica comparativa, onde o objetivo é identificar diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas, a técnica de 2-DE é geralmente o método de escolha, gerando dados em formato que possibilita uma boa avaliação visual e fornece comparações quantitativas (RABILLOUD, 2000).

A análise de proteomas começa geralmente com a eletroforese em géis de poliacrilamida, principalmente os géis bidimensionais (2-DE), este resultado é uma exposição de spots dos géis bidimensionais para criar as bases de dados de todas as proteínas expressas. Determinar a identidade das proteínas foi difícil por um atraso da sensibilidade e rapidez dos métodos analíticos para caracterização de proteínas (tais como reação da cadeia polimerase e analise automatizada da seqüência do DNA). Em 1990 a espectrometria de massa emergiu como um poderoso método analítico que removeu a maioria das limitações da análise de proteínas. Este desenvolvimento, associado com a disponibilidade com o completo seqüenciamento do código genético humano em bases de dados públicas, marcou o começo de uma nova era. Hoje, o termo proteômica cobre mais do que uma análise funcional dos produtos dos genes ou “genômica funcional”, incluindo estudos em larga escala da identificação ou localização de proteínas. O estudo mais enfocado de estrutura de proteínas, contudo, é usualmente não incluído e em vez disso designado “genômica estrutural” (BURLEY, 1999).

A razão disso é que o controle da expressão gênica ocorre desde a transcrição do mRNA até as modificações pós-traducionais como glicosilação, fosforilação, acilação, hidroxilação, carboxilação, ubiquitinação, entre outras, as quais alteram a atividade protéica. Pelos motivos expostos, a análise proteômica é hoje um dos meios mais eficientes para o estudo funcional dos genes e genomas de organismos complexos (ROCHA et al., 2005).

Proteoma indica as proteínas expressas em um genoma ou tecido, enquanto o genoma representa a soma de todos os genes de um individuo, o proteoma não é uma característica fixa de um organismo. O proteoma altera com o estado de desenvolvimento, do tecido ou mesmo sob as condições nas quais o individuo se encontra. Portanto, há muito mais proteínas no proteoma do que genes no genoma, especialmente para eucaritos. Isto porque há várias maneiras do gene expresso, o RNA total, sofrer redução (*splicing*) para construir o RNA “maduro”. Este

então irá servir de molde para a tradução de uma proteína a qual sofre modificação pós-tradução (DI CIERO; BELLATO, 2003).

Proteômica é a análise de proteínas em larga escala, que contribui grandemente para o entendimento da função genética na era pós-genômica. A proteômica pode ser dividida em três áreas principais: (1) Micro-caraterização protéica para a identificação em larga escala de proteínas e suas modificações pós-traducionais; (2); a proteômica manifesta diferença para a comparação dos níveis de proteína com aplicação potencial em uma ampla faixa de doenças; e (3) estudos das interações proteína-proteína usando técnicas tais como a Espectrometria de Massa (PANDEY; MANN, 2000).

Recentemente, um progresso importante pode ser visto no campo da Proteômica, com o desenvolvimento de métodos alternativos para separação e identificação de proteínas. Exemplos destes avanços são: tecnologias baseadas em chips, nos chamadas *arrays* de proteínas (RAMACHANDRAN et al., 2004), a análise direta de complexos protéicos por espectrometria de massas (LINK et al., 1999; WASHBURN et al.,2003), o uso de *tags* de afinidade (GYGI et al.,1999), sistemas como duplo híbrido em levedura (UETZ et al.,2000), entre outros.

Entre todas as técnicas de Proteôma de uso atual, a mais utilizada é Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE), acoplada a espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. O principal requisito para todas estas técnicas é que seja possível separar, visualizar e analisar de forma reprodutível, misturas complexas de proteínas, obtidas a partir de células, tecidos ou organismos.

No contexto da proteômica comparativa, onde o objetivo é identificar diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas, a técnica de 2D PAGE é método de escolha, e gera dados em um formato que possibilita uma boa avaliação visual (para amostras pouco complexas) e fornece comparações quantitativas (RABILLOUD, 2002).

3.5 ELETROFORESE

O termo eletroforese foi criado por Michaelis em 1909, para descrever a migração e colóides sob a influência de um campo elétrico (ALFENAS, 1998).

Em 1937 Tiselius mostrou a separação de proteínas, albumina e α, β e γ - globulinas do soro que foram estudados de um ponto de vista de homogeneidade química e também separados dentro de seus principais constituintes, por eletroforese (TISELIUS, 1937).

Alfenas (1998) descreve que a eletroforese visa à separação de moléculas em função de suas cargas elétricas, de seus pesos moleculares e de suas conformações, em suportes porosos e tampões apropriados sob a influência de um campo elétrico contínuo. Moléculas com preponderância de cargas negativas migram, no campo elétrico, para o pólo positivo (anodo), e moléculas com excesso de cargas positivas migram para o pólo negativo (catodo). A carga preponderante de uma molécula protéica é função dos seus aminoácidos.

Segundo Shaw (1969) a eletroforese implica a moção de dissolver ou suspender material baixo à influência de um campo elétrico aplicado. É um de quatro de todos os fenômenos eletro-cinéticos relatados da qual implica movimento entre as partes rígidas e móveis de uma dupla camada elétrica.

A escolha de meio de suporte depende de preferências individuais e dos objetivos, mas de modo geral, para proteínas, os géis de poliacrilamida têm sido preferidos por seu maior poder de resolução graças a ampla variação controlável no diâmetro de seus poros. Além disso, géis de poliacrilamida são muitos translúcidos, o que possibilita quantificar a atividade enzimática por densitometria (ALFENAS, 1998).

Os métodos eletroforéticos baseiam-se no principio de que uma molécula com carga elétrica movimenta-se em um campo elétrico. A velocidade de migração de uma proteína depende da intensidade de campo, da carga liquida da proteína e do coeficiente de atrito. As separações eletroforéticas são quase sempre feitas em gel, onde os de poliacrilamida são os escolhidos por ser quimicamente inertes e porque o tamanho dos seus poros pode ser controlado (STRYER, 2004).

3.5.1 **Eletroforese Bidimensional**

A eletroforese em gel de poliacrilamida tem sido extremamente proveitosa como uma ferramenta analítica para a separação e quantificação de espécies de proteínas de complexas misturas.

Os fundamentos desta abordagem foram apresentados pela primeira vez em 1975 (KLOSE, 1975; O'FARRELL, 1975). Em géis bidimensionais, os polipeptídios aparecem formando manchas (*spots*) após serem corados. Diferentes manchas podem conter isoformas da mesma proteína com coordenadas específicas de ponto isoelétrico (pI*)* e Massa molecular (MM). Em 1988, Angelika Görg introduziu o uso de gradientes imobilizados de pH (IPG) (BJELLQVIST et al., 1982; GÖRG et al*.,* 1988), nos quais tampões são co-polimerizados com acrilamida e bisacrilamida, acarretando uma melhor reprodutibilidade dos perfis bidimensionais. 2D-PAGE é uma técnica que pode ser usada para a obtenção de perfis bidimensionais completos de uma amostra como também para estudos comparativos entre amostras. O aparecimento ou desaparecimento de manchas ou *spots* podem fornecer informações acerca de proteínas estagio-especificas, enquanto a intensidade das manchas fornece informações quantitativas a respeito da expressão diferencial dos polipeptídios (GRAVES et al*.*, 2000).

Em comparação com a eletroforese unidimensional em géis desnaturantes de poliacrilamida, conhecida como SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio), a eletroforese 2D apresenta uma maior capacidade para separar misturas complexas. Como as bandas protéicas tendem a se sobrepor, os métodos unidimensionais de separação, como a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), podem separar um número relativamente pequeno de proteínas (geralmente menos de 50). A eletroforese bidimensional, ao combinar dois processos distintos de separação, pode ser usada para separar mais de 1000 proteínas num único gel (ANDERSON; ANDERSON, 1996).

Em eletroforese 2D, as proteínas são separadas com base em duas das suas propriedades: numa primeira dimensão, de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) e numa segunda dimensão, em gel de SDS – PAGE de acordo com o seu peso molecular (MW) (Figura 1). Ou seja, a eletroforese 2D resulta da combinação de duas técnicas: a focagem isoelétrica (IEF), seguida por uma separação de SDS -

PAGE. Quando bem sucedida obtém-se um gel de poliacrilamida contendo numerosos *spots*, bem separados, cada um correspondendo a uma proteína (ou a uma forma protéica) (SANTOS et al., 2004).

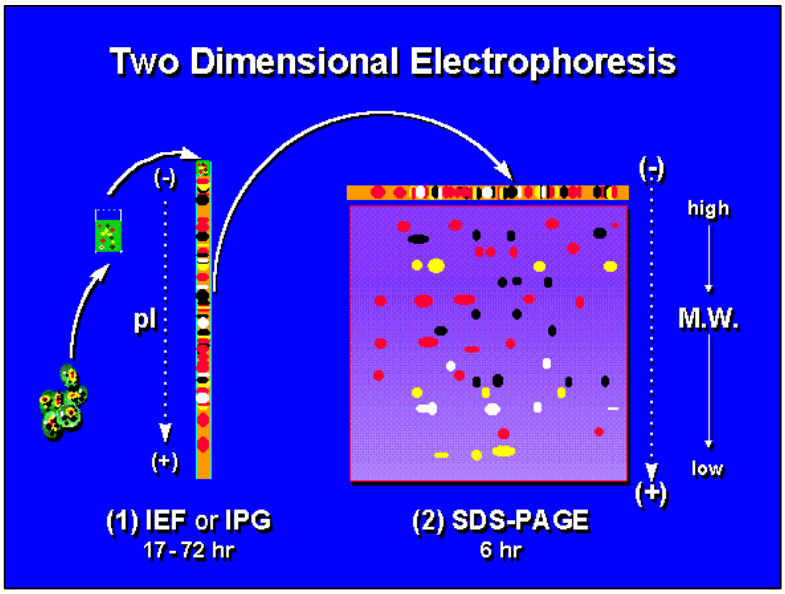


Figura 1 – Eletroforese Bidimensional 2D-PAGE utilizado na analise de proteomas

De acordo com Chromy et al. (2004) e Qualtieri et al. (2007) o gel bidimensional que é produzido por eletroforese, baseado em uma combinação de duas propriedades intrínsecas e independentes de cada proteína, tais como estado de carga e massa molecular. Em uma primeira dimensão, as proteínas são separadas pela sua capacidade de protonação, através de seu ponto isoelétrico (pI), e , em uma segunda dimensão pelo seu tamanho, através de sua massa molecular relativa (Mr). Na primeira dimensão, utiliza-se a técnica de focalização isoelétrica (IEF) de uma solução da mistura protéica com agentes desnaturantes não carregados em uma tira de gel de poliacrilamida. Na segunda dimensão a separação por peso molecular é realizada por eletroforese em um gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

A eletroforese bidimensional (2D) é hoje a principal técnica de separação de proteínas utilizada antes da aplicação da amostra no espectrômetro de massa. Sua vantagem em relação a outras tecnologias é a capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa e a

possibilidade de se fazer análise de expressão gênica por meio de comparação dos padrões protéicos (QUALTIERI et al., 2007; SIZOVA et al., 2007).

3.5.1.1 Primeira dimensão: Focalização Isoelétrica

A Focalização Isoelétrica envolve a separação de solutos anfotericos em um gradiente de pH. Sob a influência do campo elétrico um soluto experimenta regiões de pH progressivamente menor. Assim, uma fração cada vez maior torna-se protonado, e desta forma, a carga efetiva é alterada durante a migração. Eventualmente, a carga total do soluto torna-se zero, e sua migração é interrompida, cada componente da amostra migra para uma região de pH ao seu ponto isoelétrico, e permanecerá nesta posição enquanto o campo elétrico for operante (TAVARES, 1996).

3.5.1.2 Segunda dimensão: Eletroforese em gel de Poliacrilamida (PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) é um método muito utilizado para a análise de massas moleculares de proteínas oligoméricas. O gel é uma matriz constituída de um polímero de acrilamida com ligações cruzadas de N,N – metil-bis-acrilamida, cuja porosidade da malha pode ser escolhida. Quanto maior a concentração de acrilamida menores serão os poros da malha formada. A solução de acrilamida é estável por até um mês. Quando estocada por períodos prolongados, transforma-se em ácido acrílico, que pode causar distorções no gel. É importante frisar que a acrilamida é fotossensível e neurotóxica, devendo, portanto, ser estocada em frasco escuro e manuseada com o maior cuidado possível.

Antes de iniciar a eletroforese, as variáveis forma e carga nativa das proteínas devem ser eliminadas para que a separação dependa apenas de sua massa molecular. Para isso, as proteínas são misturadas com SDS, um detergente anfipático cuja função é desnaturá-las, ou seja, convertê-las numa estrutura linear –

a forma nativa é geralmente globular – e conferir-lhes densidade de carga uniforme. O SDS tem alta carga negativa e uma carga hidrofóbica que interage com as cadeias polipeptídicas numa proporção aproximada de 1,4g de SDS para cada grama de proteína, tornado-as negativamente carregadas. Na ausência do SDS, as proteínas com massas iguais podem migrar diferentemente na malha do gel devido ao diferencial de cargas de suas estruturas tridimensionais. Além da adição do SDS, as proteínas podem ser opcionalmente fervidas na presença de um agente redutor, como ditiotreitol (DTT) ou 2-mercaptoetanol, que desfazem as pontes de dissulfetos, ajudando a eliminar a estrutura tridimensional dos polipeptídeos (ROCHA et al., 2005).

Após esse tratamento as proteínas são aplicadas no topo de um gel de poliacrilamida e submetidas a uma corrente elétrica, fazendo com que elas migrem através da malha de acrilamida em direção ao pólo positivo. Dependendo do seu tamanho, cada proteína se moverá diferentemente: as proteínas menores migrarão mais rapidamente, enquanto que as maiores terão mais dificuldade em atravessar a malha do gel e, assim, se moverão mais lentamente. Quando se representa a mobilidade eletroforética frente ao logarítmo dos pesos moleculares conhecidos de diversas cadeias polipeptídicas (proteínas marcadoras), obtém-se uma reta que pode ser utilizada como padrão para o cálculo do peso molecular das subunidades da proteína de interesse (ROCHA et al., 2005).

3.6 TRATAMENTO DA AMOSTRA

A preparação da amostra é a parte mais critica de qualquer experimento, este passo pode envolver homogeneização e lise celular. Condições que mantém a solubilidade dos componentes da amostra ainda são compatíveis com os métodos com maior dificuldade de realizar.

Quando os tecidos ou celulas são lisadas, proteases são liberadas ou ativadas. Degradação de proteinas através da ação da proteases prejudica os resultados dos analises dos geis bidimensionais, então medidas tem que ser tomadas para evitar este problema (GORG et al., 2007).

A preparação da amostra foi e continua sendo o passo mais importante nos experimentos em proteômica, e o desafio estão na capacidade de separação, recuperação do material e rendimento específico. Muitos dos passos da preparação da amostra mencionados aqui são familiares para os cientistas que estudam proteínas, contudo, muitos desses métodos não foram desenvolvidos para fornecer o grau de pureza ou a recuperação eficiente do material que são necessários para estudos proteomicos. Desta forma, melhoramentos ou alternativas são necessárias.

Muitas das verdadeiras informações em proteômica vem diretamente dos organismos, seja humano ou outro modelo. Em outros casos, tecidos é outro lugar para começar a obter populações homogêneas de célula. Tecido congelado, embora seja mais fácil de obter, elimina a possibilidade de cultura celular ou técnicas que dependam de células vivas. Tecido fixado em formalina e embebido em parafina não são de uso em experimentos proteomicos. Protocolos de dissociação de tecidos foram bem estabelecidos, embora alguns estudos tais como o análise de proteínas da célula precisa de uma dissociação sem proteases (STULTS; ARNOTT, 2005).

Para separação de proteínas ainda pode ser necessário fornecer uma adequada resolução e escala dinâmica (CORTHALS et al., 2000).

A preparação apropriada das amostras é essencial para obter bons resultados na eletroforese bidimensional. O melhor método de extração, precipitação e solubilização das proteínas variam de uma amostra para outra e deverá ser estabelecido para cada caso em particular, para o saco vitelino.

O tratamento prévio das amostras para 2D-PAGE envolve a solubilização, desnaturação e a redução para quebrar completamente às interações entre as proteínas (RABILLOUD, 1996).

O processo de solubilização tem como objetivo quebrar as interações macromoleculares (incluindo todas as interações não covalentes e as pontes de dissulfeto), para o rompimento de interações não covalentes será utilizados agentes caotrópicos, como a uréia, que é reagente desnaturante que altera solvente e exerce profundos efeitos sobre todos os tipos de interações não covalentes porque rompe os elementos de estruturas secundarias de modo que os grupos ionizáveis fiquem completamente expostos a solução. Por esse motivo quando usado em altas concentrações (comumente 8 mol l^{-1}) esse reagente facilita a solubilização das proteínas (RABILLOUD et al., 1997; RABILLOUD, 1998). Função semelhante à uréia é também exercida pela tiouréia que é um agente caotrópico mais eficiente do que a uréia, mas pouco solúvel em água. A mistura de uréia-tiouréia tem sido muito utilizada, pois é mais eficiente do que a uréia sozinha (RABILLOUD et al., 1997).

Foi utilizado o DTT, que também é um agente desnaturante, tem como função principal clivar as pontes de dissulfeto formadas entre resíduos de cisteínas. Por ser mais eficiente e apresentar melhores resultados – embora haja proteínas com muita cisteína que não são totalmente reduzidas com DTT e para romper as interações hidrofóbicas, serão usados detergentes não-iônicos ou zwitteriônicos (com carga liquida neutra), como Triton X-100 e, mais recentemente, CHAPS são comumente empregados, pois alem de auxiliar a solubilização das proteínas previnem a agregação através de interações hidrofóbicas (DAMERVAL et al., 1986; ROCHA et al., 2005).

MATERIAL E MÉTODO

4.MATERIAL E MÉTODO

O material refere-se à coleta de embriões provenientes monta natural e metodologia aplicada aos estudos macroscópicos e bioquímicos.

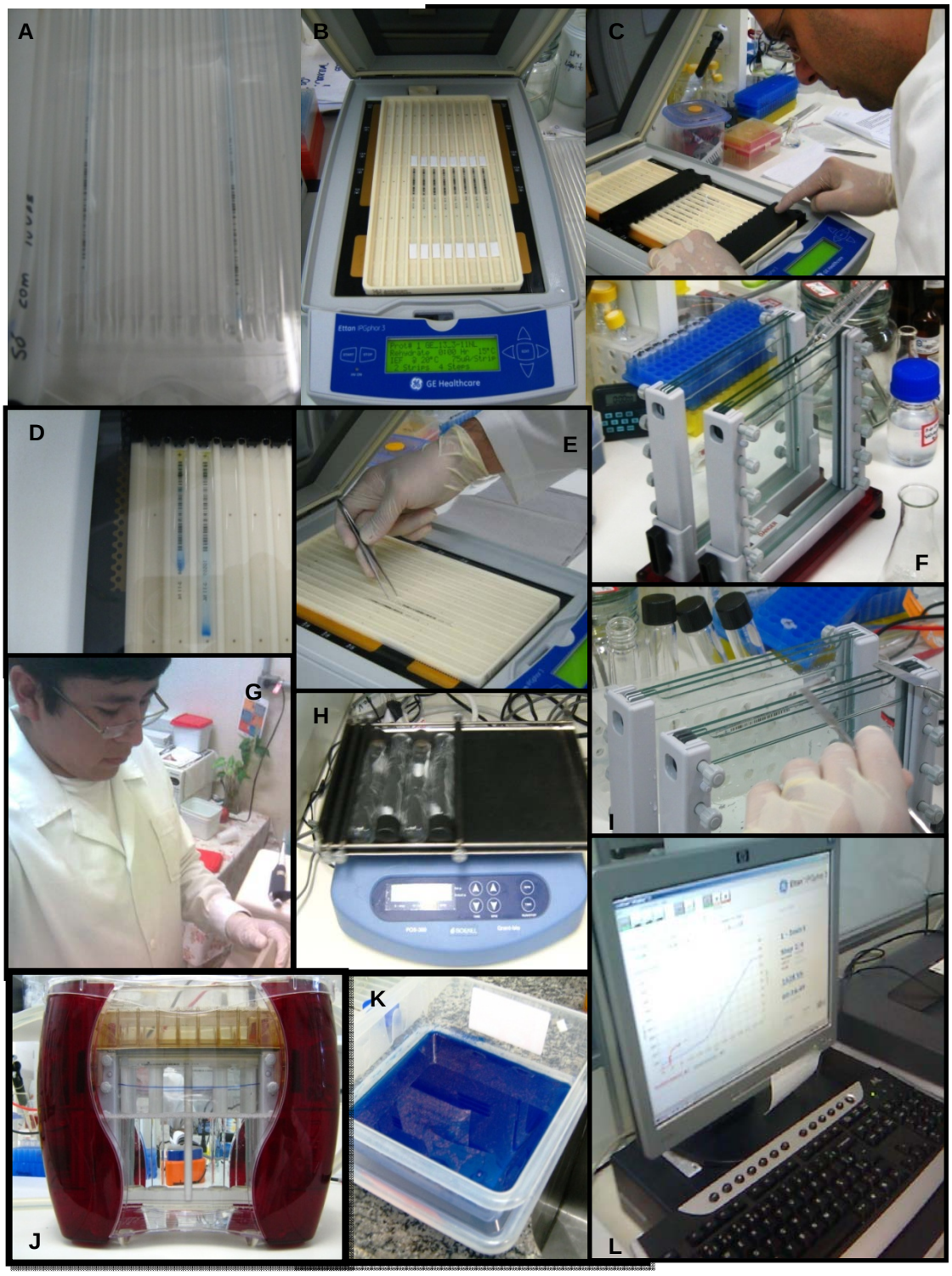
4.1 ESTUDO MACROSCÓPICO: PARÂMETROS ANALISADOS

Foram avaliados os parâmetros relativos ao desenvolvimento externo e proporções de tamanho dos embriões. Com auxílio de um paquímetro inoxidável com divisões em milímetros (150 mm x 0.02 mm) realizamos as medidas de comprimento (crânio-caudal) e assim estimamos a idade gestacional do embrião.

Os embriões foram fotografados com câmera digital SONY - Cyber-Shot DSC H9 para posterior documentação e descrição.

4.2 PREPARDO DE MATERIAL

A eletroforese bidimensional consiste em cinco etapas principais (Figura 2). A primeira é a preparação da amostra. O melhor método de extração, precipitação e solubilização das proteínas varia de uma amostra para outra e deve ser estabelecido para cada caso em particular (HERBERT, 1999). Apesar disso alguns passos essenciais devem ser seguidos: as proteínas devem ser parcialmente purificadas, completamente solubilizadas, desagregadas, desnaturadas e reduzidas. A segunda é a focalização isoelétrica (primeira dimensão) onde o ponto isoelétrico de uma proteína é determinado. Uma vez submetidas a um campo elétrico, as proteínas migrarão até encontrar uma faixa de pH referente ao seu pI e neste ponto ficarão com carga total neutra (BERKELMAN; STENSTED, 1998). A terceira etapa é a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (segunda dimensão) que separa as proteínas por seu peso molecular na presença de SDS. A quarta etapa é a



Legenda – Seqüência de eventos usados na analise proteômica da membrana vitelina: (A) Reidratação das strips com as amostras; (B) Transferindo as strips para o sistema eletroforetico; (C) colocando as strips com seguradores do sistema IPGhor III; (D) As amostras estão focalizando; (E) Retirando as strips para começar a 2da Dimensão; (F) Preparação do gel 2D-PAGE; (G) Iniciando a 2ª Dimensão com a preparação do tampão de equilíbrio; (H) Se procede a equilibrar as strip, um em tampão com DTT e outra em tampão com Iodoacetamida (I) Se coloca as strips no topo do gel; (J) Se começa a correr a 2ª dimensão; (K) Depois de terminado a corrida, se aplica a coloração Azul Brilhante de Coomassie G-250; (L) No final os géis são escaneiados e se detecta os spots de proteina nos bancos de dados na internet.

Figura 2 Metodologia utilizada na Eletroforese bidimensional 2D-PAGE

detecção de proteínas por técnicas analíticas avançadas de detecção e identificação. Após essa detecção as proteínas foram analisadas por digitalização e analise de imagem. Atualmente estão disponíveis no mercado diverso *softwares* que podem oferecer aos pesquisadores um método automático, pratico e estatisticamente seguro para analise comparativa dos géis 2D.

A Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE) consistiu de cinco etapas principais:

4.2.1 **Preparação das amostras**

O protocolo estabelecido para a preparação das amostras consta das seguintes etapas: (a) Trituração em Nitrogênio Liquido (N_2); (b) Extração com tampão Tris-CL 40mM, pH 8,8.; (c) Re-solubilização em solução de uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, IPG Buffer 0,5% e DTT 0,3%; (d) Adição de Inibidor de protease 1%.

Os sacos vitelinos foram triturados separadamente em tubos Eppendorf de 2mL com uma pinça na presença de nitrogênio liquido (N_2), após colocados num tubo Eppendorf de 1.5mL para serem lavados e centrifugados 4 vezes com Tampão Tris-Cl pH 8.8, 1.5M por 2 minutos, e colocados em papel de alumínio para ser colocados individualmente em tubos Eppendorf 1.5mL e armazenados imediatamente em nitrogênio líquido a -196°C.

4.2.2 **Dosagem de Proteínas Totais**

Foram realizadas dosagens de proteínas totais das amostras de saco vitelino nos diferentes estágios encontrados, a fim de padronizar a quantidade de proteínas totais para aplicar na Eletroforese Bidimensional. Para tanto, utilizou-se a técnica de Bradford (BRADFORD, 1976). Para quantificar proteínas, foram feitas três alíquotas de 50µL de extrato adicionados de 2,5mL do reagente de Bradford e após 5 min, foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm. As concentrações de

proteínas foram determinadas utilizando-se curva padrão da albumina de soro bovino.

4.2.3 **Primeira dimensão: Focalização isoelétrica**

Esta técnica consistiu em uma separação eletroforética, na qual as proteínas serão separadas de acordo com as diferenças de seus pontos isoelétricos. Uma vez submetidas a um campo elétrico, as proteínas migrarão até encontrar uma faixa de pH referente ao seu ponto isoelétrico (*pI*) e neste ponto ficarão com carga total neutra, interrompendo a migração no gel (BERKELMAN; STENSTED, 1998).

4.2.3.1 Rehidratação das tiras de gel (*strips*)

As tiras de IPG (*immobilized pH gel*) foram obtidas comercialmente na forma desidratada com diversas faixas de pH e tamanhos e devem ser rehidratadas antes da focalização isoelétrica. As amostras foram misturadas à solução de rehidratação ou aplicadas sobre a tira usando o acessório chamado (sample cups), depois se adicionou-se o 1µL de Solução Cocktail de Inibidor de Protease. O primeiro procedimento permite a aplicação uma maior quantidade de proteínas (≈1mg), minimiza a precipitação durante a entrada no gel e evita a manipulação exigida durante a aplicação usando o segundo procedimento.

Nessa etapa, as amostras foram aplicadas em solução de rehidratação diretamente nas fendas da bandeja, e então se colocou as tiras com a superfície do gel virada para baixo. Em seguida se aplicou-se 2mL de óleo mineral (DryStrip Cover Fluid) em cada fenda, para evitar a cristalização da uréia. Usando-se o IPGphor III, foi possível fazer a rehidratação e, imediatamente, a focalização isoelétrica, evitando perda de tempo e manipulações desnecessárias das tiras. O período necessário para a rehidratação das tiras é de, no mínimo, 10 horas e deve

ser realizada a temperatura ambiente. Para nosso experimento foi aplicado 12 horas.

Tabela 1 - Solução de reidratação para as tiras IPG. Estocar a -20°C em alíquotas de 1ml.

Reagentes	Concentração final
Uréia	7M
Tioureia	2M
CHAPS	4%
IPG Buffer 3-10	2%
Azul de bromofenol	0,002%
Dissolver em H_2O milli-Q	

4.2.3.2 Focalização isoelétrica (IEF)

Nesta etapa se utilizou o aparelho de Focalização Isoelétrica IPGphor III, para a primeira dimensão, com as seguintes fases (Tabela 2) O processo durou 6 horas.

Tabela 2 - Programa para o IPGphor III (tira de 13cm; pH 3-10 linear). A corrida será realizada com a fonte de eletroforese EPS 3501 XL

Fase	Voltagem	Volt\horas	Tempo
Reidratação	-	-	12h
1	500V	500V	1:00h
2	1000V	1000V	1:00h
3	8000V	16000V	4:00h

4.2.3.3 Armazenagem dos géis de focalização

Uma vez terminadas as focalizações isoelétricas e enquanto não foram analisadas de imediato na segunda dimensão SDS-PAGE, as tiras ficaram estocadas entre filmes plásticos e armazenados a -80ºC.

4.2.4 **Segunda dimensão: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida**

A eletroforese bidimensional, ao combinar dois processos distintos de separação, pode ser usada para separar mais de 1000 proteínas em um único gel.

Na primeira dimensão (IEF), as proteínas foram separadas em função de suas cargas nativas (pI). Posteriormente, a tira de gel foi mergulhada em uma solução de equilíbrio contendo SDS e depois colocada no topo de um gel de poliacrilamida – cuja espessura é geralmente de 1mm – para a realização da eletroforese de segunda dimensão, através da qual cada cadeia polipeptídica migra em função de sua massa molecular. O resultado final consiste em um gel com diversos discos (spots) dispersos, cada um correspondendo a uma proteína particular. O poder de separação é tão grande que duas proteínas que diferem em apenas um aminoácido carregado podem ser prontamente distinguidas.

4.2.4.1 Preparação do gel 12,5% (SDS-PAGE)

Para a preparação do gel 12,5% se utilizou o protocolo descrito abaixo (Tabela 3)

Tabela – 3 Composição do gel 12,5% (SDS-PAGE)

Reagentes	Volume pipetado
Acrilamida- 40%	27,45mL
Bis 2%	14,6 mL
Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8	22,5mL
H_2O Milli-Q	24mL
SDS 10%	0,9 mL
APS 10% (Persulfato de Amônia)	0,45mL
TEMED 10%	40µL

4.2.4.2 Armazenagem dos géis SDS-PAGE de segunda dimensão

O topo dos géis polimerizados com 1mL de solução de armazenagem de géis que consiste de Tris-Cl 1.5M; SDS 10% foi coberto com filme de PVC, para evitar a desidratação. O material foi armazenado a 4ºC.

4.2.4.3 Equilíbrio da tira (*strip*)

Após a primeira dimensão (IEF) a *strip* deverá ser equilibrada por duas vezes de 15 minutos antes de correr a segunda dimensão (SDS-PAGE). O primeiro equilíbrio será realizado com DTT a 1% por 15 minutos a agitação constante, depois se lavou a *strip* com tampão de corrida, o segundo com iodoacetamida a 2,5% por 15 minutos com agitação constante (Tabela 4).

Tabela 4 – Composição da Solução de equilíbrio para SDS-PAGE

Reagentes	Concentração final
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	50mM
Uréia	6M
Glicerol (99%)	30%
SDS	2%
Azul de bromofenol	0,002%
Dissolver em H_2O milli-Q	

4.2.4.4 Corrida SDS-PAGE

A *strip* do gel foi colocada no topo do gel e selada com agarose a 0,5%. A corrida da segunda dimensão foi desenvolvida no sistema eletroforético Ruby SE600 (Amersham Biosciences\GE Healthcare) com amperagem ou potencia constante em baixa temperatura (10%) para evitar o aquecimento (Tabela 5). A corrida deverá ser interrompida quando o azul de bromofenol atingir o final do gel. Esta etapa durou 5 horas.

Tabela 5 – Programa para o sistema eletroforetico Ruby SE600: parâmetros de separação

Fase	Voltagem máxima	Amperagem máxima	Potencia\gel*	Duração
1	500V	400mA	15W	1:00h
2	1000V	400mA	30W	1:00h
3	8000V	400mA	30W	3:00h

Depois de desmontar o aparelho foram retirados com cuidado os géis para evitar rasgamentos, e preparados para a detecção de proteínas.

4.2.5 **Detecção de proteínas**

As proteínas separadas eletroforética foram visualizadas por métodos gerais de coloração, tais como azul brilhante de coomassie, nitrato de prata, fluorescência ou autoradiografia, ou por métodos específicos como a coloração de glicoproteínas ou detecção com imunoquímicos. Utilizamos o método de coloração Azul Brilhante de Coomassie G-250.

4.2.5.1 Coloração por Coomassie Brilliant Blue G-250

Os géis foram submergidos na solução de fixação: Acido fosfórico 3% (p/v), etanol 50% (v/v) por 24horas. Foram retirados os excessos de solução de fixação com três lavagens com água Milli-Q for 5 min (Tabela 6).

Tabela 6 – Composição da Solução de Fixação utilizada para coloração Azul Brilhante de Coomassie G-250

Reagente	Quantidade
Acido Fosforico 3%	35,3mL
Etanol 50%	500mL
Agua Milli-Q para 1L	

Os géis foram incubados na solução colorante de Coomassie Brilliant Blue G-250 1% (p/v), sulfato de amônio 17% (p/p), metanol 34% (v/v), acido fosfórico 3% (p/v) por 4 dias (Tabela 7). Lavar com acido acético 1% (v/v) antes da digitalização e captura da imagem do gel.

Tabela 7 – Composição da Solução colorante de Azul Brilhante de Coomassie G-250

Reagente	Quantidade
Azul de Coomassie G-250 (1%)	1g
Sulfato de amônia 17%	170g
Acido Fosfórico 3%	35,3mL(85%)
Metanol 34%	340mL
Água Milli-Q para 1L	

Os géis foram armazenados em solução de armazenamento (Tabela 8) e embalados em sacolas de plástico e estocados a 4ºC.

Tabela 8 – Composição da solução de Armazenagem de géis 2D-PAGE

Reagente	Quantidade
Acido Acético	25mL
Água Milli-Q para 500mL	

4.2.6 **Digitalização captura e análise de imagem**

As capturas das imagens foram feitas no sistema Image Scanner™ II da Amersham Biosciences\ Ge Healthcare em modo de transferência com resolução de 300 dpi (*dotch per inch*) captura em modo de transmissão e alta nitidez. Foram armazenadas para cada gel sua imagem colorida em formato *bmp* de baixa compressão e imagens em 256 tons de cinza geradas em formato *mel*, foram analisadas com o software Image Máster™ 2D platinum v6.0 (Amersham Bioscence\Ge Healthcare), calibrado previamente segundo as instruções do fabricante. A detecção de cada spot de proteína foi validada por inspeção manual e editada quando necessário. O programa forneceu o numero de spots e a estimativa dos seus pI e massa molecular.

No Image Máster 2D Platinum v. 6.0 cuja versão tem parâmetros com melhor resolução automática para: *smooth* que possibilita discriminar ruído do *spot* e definir *spots* em sobreposição; *saliency* que define a curvatura do *spot*, também ajudando a retirar ruídos e *min área* que elimina artefatos próximos aos *spots* que não conseguimos eliminar com a *saliency* e nem o *smooth*. Foram feitas as detecções automáticas, isto é, delimitações dos *spots*, segundo parâmetros descritos acima com valores preestabelecidos por nós para cada gel. Esses parâmetros tiveram

como critérios: cobertura na delimitação de um maior numero de *spots,* exclusão de background e melhor separação de *spots* próximos. Porém, os géis passaram por revisões de detecção feitas manualmente com ajuda dos recursos de visualização de *spots* em 3D, mudanças de contrastes e/ou de cores e gráficos marcando a intensidade tanto na lateral quanto na parte superior, indicando onde um spot começa e termina. As revisões foram feitas para adicionar *spots* não detectados, separar e juntar *spots* e excluir *background* e artefatos da coloração detectados erroneamente (GE / Amersham Biosciences).

4.2.7 **Calculo do PM e determinação do pI de spots**

Os cálculos de massa aparente foram efetuados através da plotagem de dados de cada banda ou spot, ligados a corrida eletroforética (parâmetros de migração da banda ou spot em mm x curva padrão dos marcadores moleculares utilizados) em planilha e posteriormente em gráfico que possibilitou obter o peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI) dos peptídeos e proteínas contidos nas bandas e spots

4.2.8 **Identificação *in silico* dos spots do gel 2D**

O algoritmo utilizado para a identificação dos spots dos géis 2D foi o Tagident (WILKINS et al., 1996, 1998), uma ferramenta *on line* disponível no portal ExPaSy (GASTEIDER et al., 2005). Esta ferramenta gera uma lista de peptídeos e proteínas a partir dos valores informados nos campos de massa molecular aparente e pI fazendo uma seleção dentro de uma busca específica.

4.3.8 **Analise computacional gráfica e quantitativa**

Para a análise computacional foram utilizados ferramentas do Excel, software que possibilitou a construção de tabelas e de gráficos para uma melhor analise do perfil protéico.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

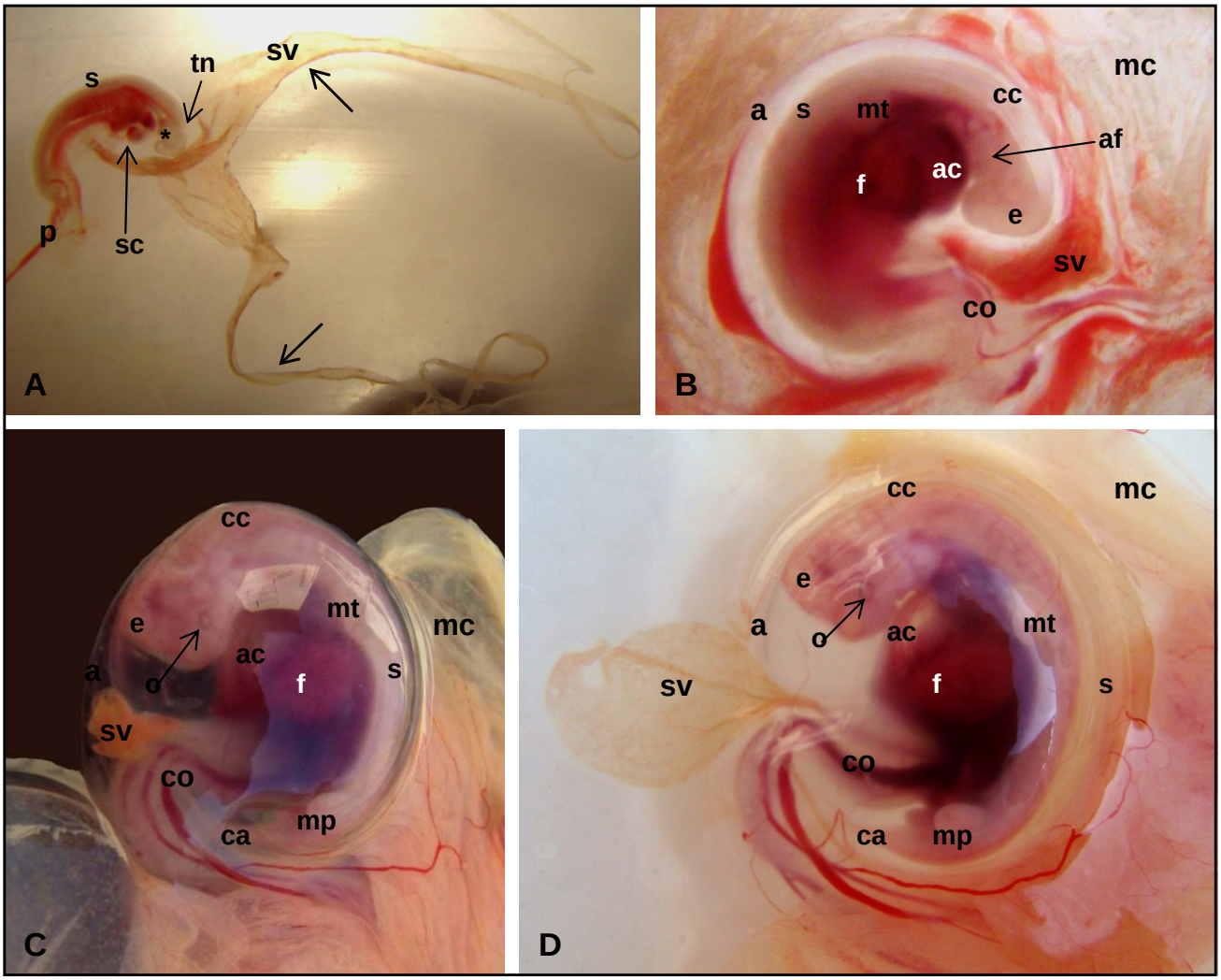
A seguir serão apresentados: um protocolo de eletroforese bidimensional para saco vitelino de embriões bovinos e os analises dos géis 2D-PAGE do saco vitelino de embriões bovinos em diferentes períodos gestacionais, com faixa de pI no intervalo 3-10 representando os diferentes spots protéicos obtidos a partir de 60µL da amostra e os padrões diferenciais entre cada gel obtido; a identificação de proteínas diferencialmente expressas nas amostras.

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA: EMBRIÃO E SACO VITELINO

Ao analisar a seqüência e eventos que fazem parte do desenvolvimento do saco vitelino, observamos ao 24 dias de gestação o embrião em forma de C, constituído por pedículo embrionário, tubo neural, somitos, saliência cardíaca, arco mandibular, somitos, neuróporo cranial, neuróporo caudal e estomodeu. O saco vitelino parte da porção ventral do embrião, em forma de T, contendo duas longas pontas (Figura 3).

Com 29 dias de gestação o embrião passa a ter início na formação dos membros torácicos, do cordão umbilical e os arcos faríngeos estão presentes. Distingue-se região encefálica, área cardíaca e somitos. O saco vitelino está presente, próximo a membrana amniótica que envolve o embrião (Figura 4).

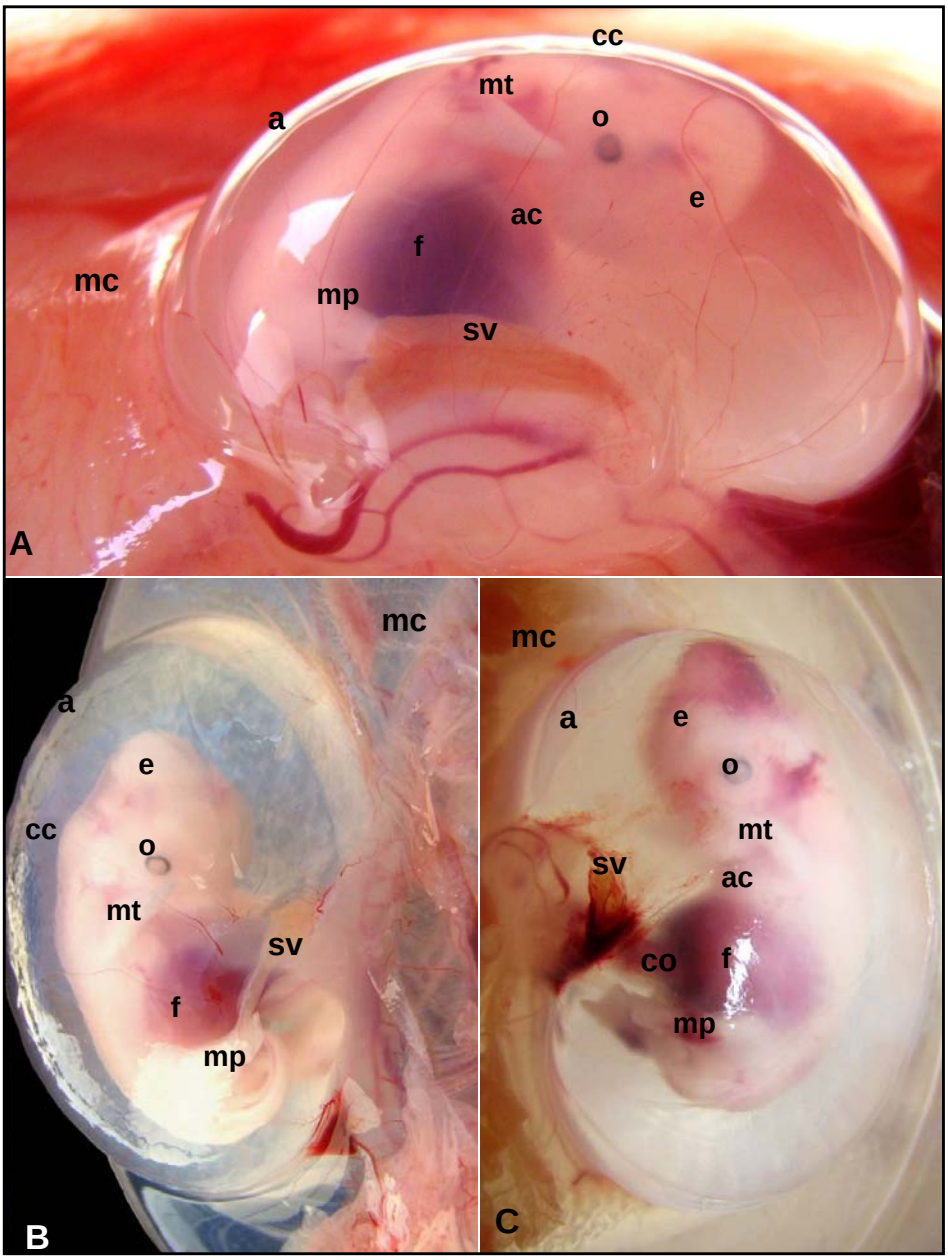
Aos 37 dias de gestação, o embrião apresenta formação dos membros torácicos e membros pélvicos, pigmentação da retina, região de encéfalo anterior, curvatura cervical, medula espinal, cordão umbilical e cavidade oral. O saco vitelino encontra-se justaposto ao âmnio, semelhante a uma “folha seca” quando esticado (Figura 3).



Legenda: A, Saco vitelino (sv) parte da porção ventral do embrião dividindo-se, formando um T (setas) e extensão de ambas as pontas. O embrião apresentou pedículo embrionário (p) partindo da porção caudal, presença de tubo neural (tn), estomodeu (e), somitos e saliência cardíaca (sc). B, Embrião envolto por membrana amniótica (a) e membrana corioalantóide (mc). Da porção ventral parte o saco vitelino (sv) e inicia-se a formação do cordão umbilical (co). Presença dos arcos faríngeos (af), curvatura cervical (cc), encéfalo (e), área cardíaca (ac), fígado (f) e somitos. C e D, Embrião (e) envolto por membrana amniótica (a) e membrana corioalantóide (mc). Saco vitelino (sv) parte da porção ventral do embrião e encontra-se justaposto ao âmnio (a), mantendo uma forma enovelada. Cordão umbilical (co) parte da porção ventral. Em D, o saco vitelino (sv) foi separado das membranas, e observamos um formato de "folha seca". Notar presença de encéfalo (e) curvatura cervical (cc), somitos (s), membro torácico (mt), membro pélvico (mp), cauda (ca), pigmentação da retina (o), área cardíaca (ac) e fígado (f).

Figura 3 - Desenvolvimento embrionário e formação do saco vitelino de embriões bovinos provenientes de monta natural, com idade gestacional estimada de: A – 24 dias, B – 29 dias, C e D – 37 dias

Aos 42 dias de gestação, a membrana amniótica torna-se vascularizada, com aumento do liquido amniótico. O saco vitelino apresenta-se em processo de regressão, justaposto ao âmnio. Notamos ainda presença dos membros pélvicos e torácicos com extremidades em forma de “pá”, olho pigmentado, região de encéfalo, cauda, focinho e curvatura cervical. Aos 48 dias de gestação seguem-se as mesmas características, estando o saco vitelino ainda menor e extremidade dos membros bipartidos (Figura 4).



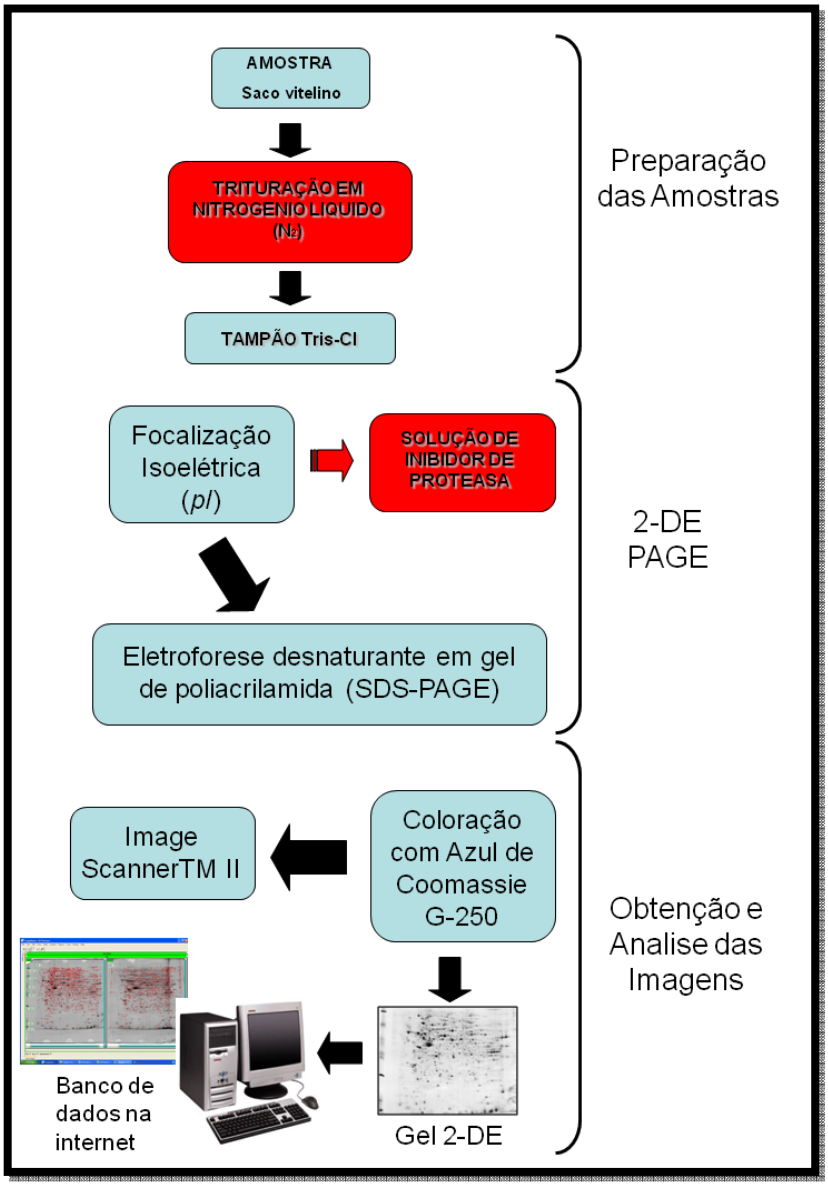
Legenda: A, Embrião envolto por membrana corioalantóide (mc) e membrana amniótica (a) vascularizada. O saco vitelino (sv) encontra-se justaposto ao âmnio (a). Observar: região de encéfalo (e), olho pigmentado (o), membro torácico (mt), membro pélvico (mp), área do coração (ac) e fígado (f).
B e C: Observe embrião com membrana corioalantóide (mc) e membrana amniótica (a). O saco vitelino (sv) apresenta-se em processo de regressão. Em C, note ainda a presença do cordão umbiilical (co). Inicia-se a bipartição das extremidades dos membros torácicos (mt) e membros pélvicos (mp), presença do fígado (f), área do coração (ac), olhos pigmentados (o) e região de encéfalo (e).

Figura 4 - Desenvolvimento embrionário e formação do saco vitelino de embriões bovinos provenientes de monta natural, com idade gestacional estimada de: A – 42 dias, B – 42 dias, C – 48 dias

5.2 OBTENÇÃO DE UM PROTOCOLO DE ELETROFORESE BIDIMENSIONAL 2D-PAGE PARA AMOSTRAS DE SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS.

O protocolo para eletroforese bidimensional (2D PAGE) das amostras de saco vitelino de embriões bovinos que foi inicialmente testado não apresentava Tioureia. Os géis obtidos não apresentaram spots de proteínas (dados não amostrados).

O estabelecimento de um protocolo de eletroforese bidimensional 2D-PAGE para amostras biológicas é essencial para obter bons resultados em proteômica. Nosso método apresentou boa resolução nos géis preparados pelo tratamento da amostra em especial na etapa de lise que foi adicionado ao trituramento da amostra na presença de nitrogênio liquido (N_2), e a utilização de Inibidores de protease 1% (Figura 5).



Legenda: Seqüenciamento de eventos utilizados em Proteômica, passos essenciais em vermelho: Trituração em Nitrogênio Liquido (N_2) e adição de Inibidores de protease

Figura 5 - Protocolo de eletroforese bidimensional para amostras de saco vitelino de embriões bovinos

5.3 ANALISE DOS GÉIS 2D-PAGE DE SACO VITELINO DE 37 DIAS DE GESTAÇÃO

Os géis bidimensionais em triplicata do saco vitelino de aproximadamente 37 dias detectaram cerca de 1230 spots de proteína (Figura 6).

De acordo com o ponto isoelétrico no intervalo de pH de 3 a 5 apresentou 424 spots de proteína, o intervalo de 5 a 7 apresentou 568 spots de proteína e no intervalo de 7 a 10 apresentou 265 spots de proteína (Figura 7).

Na tabela 9 amostram-se os *spots* com seus valores de intensidade, área e volume das amostras do saco vitelino de embriões bovinos.

A identificação destes spots nos bancos de dados na internet onde se obteve as prováveis proteínas e suas funções biológicas (Tabela 10).

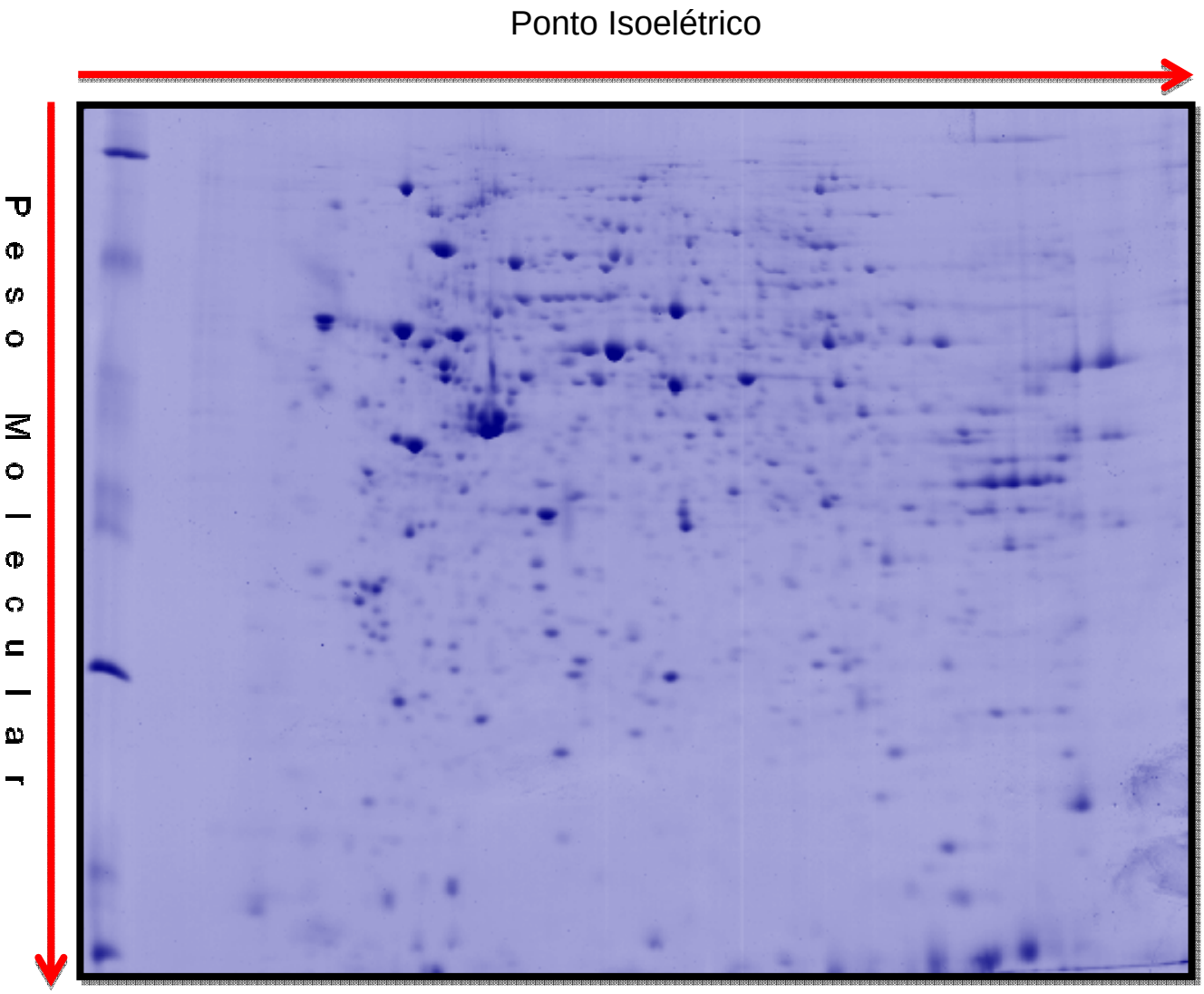


Figura 6 – Separação das proteínas do saco vitelino de embriões bovinos de gestação por eletroforese bidimensional. Focalização Isoelétrica realizada em gradiente de pH NL de 3-10. Coloração com azul de coomassie G-250. Embrião com idade estimada de 37 dias de gestação.

Tabela 9 – Valores de intensidade, área e volume dos spots dos géis 2D, de saco vitelino de embrião bovino. Representação de acordo com o programa Image Master 2D v.6.0 (GE – Amersham Biosciences)

Spots	***pI***	***PM***	***Intensidade***		***Área***		***Volume***	
			37d	**23d**	**37d**	**23d**	**37d**	**23d**
1	5.52	22.000	98	80	4.42	6.68	174	194
*2	6.09	22.000	-	48	-	11.8	-	213
3	3.82	53.000	129	114	7.28	3.08	502	203
*4	3.82	51.000	122	-	3.08	-	202	-
*5	4.24	52.000	-	87	-	3.51	-	126
6	5.90	48.000	153	121	11.3	8.24	1146	616
7	5.72	48.000	128	83	6.73	3.84	488	146
*8	5.79	44.000	115	-	4.52	-	260	-
9	5.64	44.000	128	72.0	2.70	5.68	105	152
*10	6.06	46.000	-	72.0	-	3.26	-	78.6
*11	6.29	49.000	-	64.0	-	2.80	-	67.9
*12	5.56	47.000	79.0	-	5.20	-	161	-

*Diferença qualitativa entre amostras.

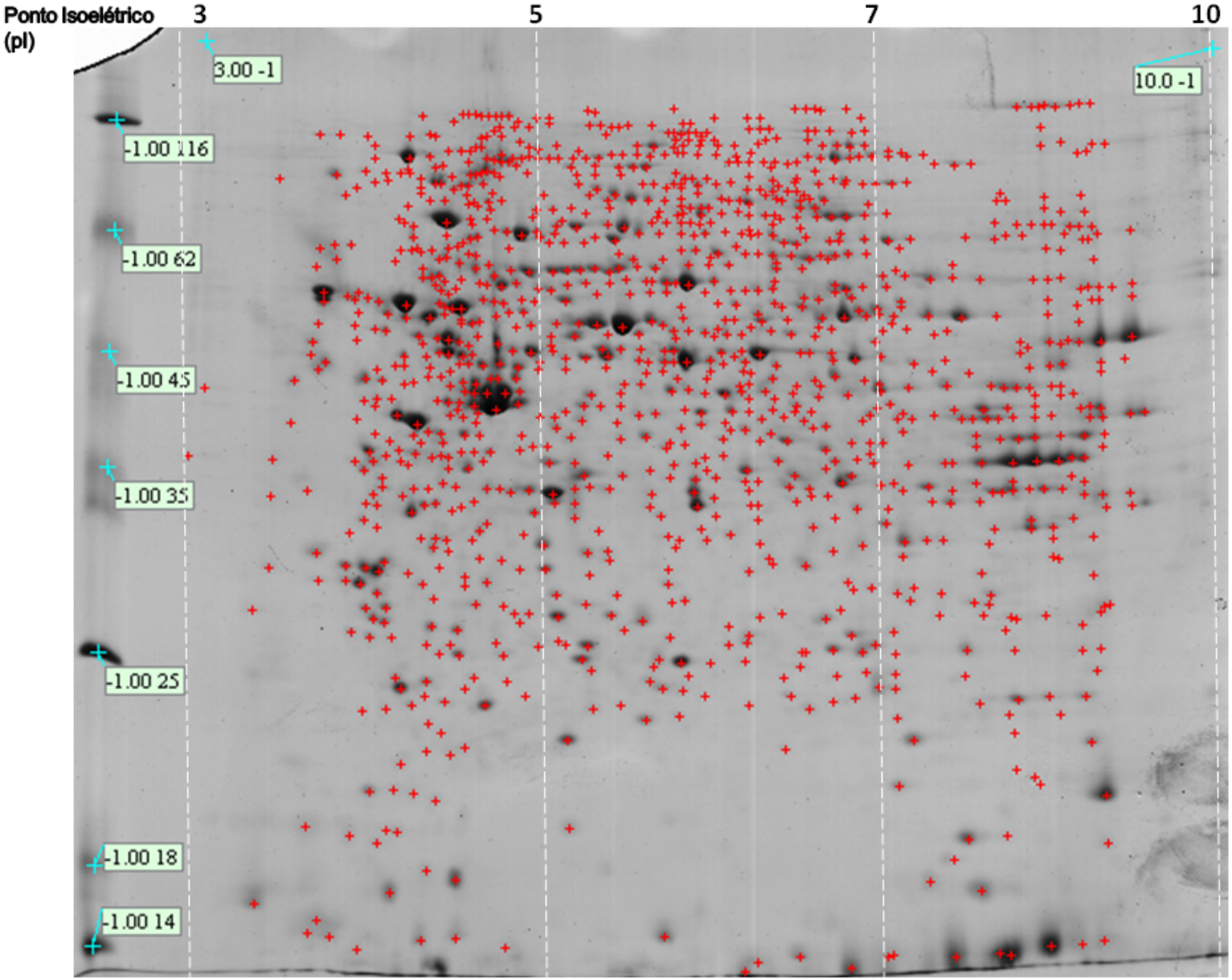


Figura 7 – Gel Proteômico do saco vitelino de embrião bovino com idade estimada de 37 dias de gestação, separação pelo intervalo de pH (3, 5, 7, 10)

Tabela 10 – Prováveis proteínas representadas pelos *spots* dos géis proteômicos das amostras de saco vitelino de embrião bovino não manipulado de 23 dias e 37 dias de gestação, nas respectivas faixas de peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI)

(Continua)

PROTEINA*	NºSWISS PROT	FUNÇÃO	PM(Da)	pI
DHH1 Desert hedgehog protein 1 [Precursor]	**Q91610**	Sinal envolvida no início da indução e modelagem do ectoderma anterodorsal, sistema nervoso e somitos. Induz a formação de glândulas no embrião.	22008	5.69
AMOS Basic helix-loop-helix transcription factor amos	**Q9Y0A7**	Fator de Transcrição envolvido no início da neurogênese; Promove a formação de neurônio dendríticos múltiplos (MD).	22569	5.59
CK073 Uncharacterized protein C11orf73 homolog	**Q56JY0**	Necessario para a organização e/ou função das celulas de clara no pulmão.	21653	5.26
CPG1 Chondroitin proteoglycan 1 [Precursor]	**Q17802**	Necessário para a extrusão de corpos polares durante a citocinese no desenvolvimento embrionário. Afeta o tamanho dos grânulos corticais. Tem papéis na segregação cromossômica meióticas, função barreira osmótica e polarização em conjugação com CPG-2. Liga quitina.	52368	3.82
CPG2 Chondroitin proteoglycan-2 [Precursor]	**P41996**	Necessário para a extrusão de corpos polares durante a citocinese no desenvolvimento embrionário. Afeta o tamanho dos grânulos corticais. Tem papéis na segregação cromossômica meióticas, função barreira osmótica e polarização em conjugação com CPG-2. Liga quitina.	51906	3.81
HEMGN Hemogen Hemopoietic gene protein	**Q32L62**	Regula a proliferação e diferenciação das células hematopoéticas.. Também pode evitar a apoptose celular por meio da ativação do fator nuclear-kappa B (NF-kB)	51137	4.75
ARP3 Actin-related protein 3	**Q6K908**	Funciona como um componente ligante do ATP do complexo Arp2 / 3 que está envolvida na regulação da polimerização da actina e em conjunto com a ativação do fator de promoção de nucleação (NPF) medeia a formação de redes ramificadas de actina. Regulamenta a direção da expansão celular através da regulação da organização da actina e, desta maneira, a distribuição dos micro túbulos e fusão de pequenos vacúolos.	48061	5.87
UBA3 Ubiquitin-activating enzyme 3 homolog	**Q19360**	Necessario para a citocinese e a orientação mitotica.	48025	.5.74
ELF3 ETS-related transcription factor Elf-3	**Q3UPW2**	Envolvidos na mediação da inflamação vascular. Podem desempenhar um papel importante na diferenciação de células epiteliais e tumorigênese. Pode estar muito relacionado com a chave sinalizadora ERBB2. Pode estar associado com o desenvolvimento e a involução da glândula mamária. Desempenha um papel importante na regulação da transcrição com promotores TATA-less da Pré-implantação de embriões, o que é essencial no desenvolvimento da Pré-implantação.	44274	5.75

* Banco de dados Swiss-Prot (www.expasy.ch)

(Conclusão)

PROTEINA*	NºSWISS PROT	FUNÇÃO	PM(Da)	pI
EIF3M COP9/Signalosome and eIF3 complex-shared subunit 1	**A8WQY8**	Componente do eIF-3, que está envolvida na síntese protéica e, juntamente com outros fatores de início, estimula a ligação do mRNA e methionyl-tRNAi ao ribosoma 40S. Componente do complexo COP9/ signalosomo (CSN), um complexo envolvido em vários processos celulares e de desenvolvimento. A CSN é um complexo regulador essencial da ubiquitina. O complexo CSN desempenha um papel essencial na embriogênese e oogenese e é necessária para regular a estabilidade do microtubulo no início do embrião.	44102	5.63
C1GLT Glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1	**Q0VC84**	Desempenha um papel central em muitos processos, tais como a angiogênese, trombopoiese e desenvolvimento de homeostase no rim	45910	6.01
GCM1 Chorion-specific transcription factor GCMa	**Q9NP62**	Fator de transcrição necessario para o desenvolvimento da placenta.	49268	6.57
DCLK1 Serine/threonine-protein kinase DCLK1	**O08875**	Provavel quinase que pode estar envolvida numa chave sinalizadora de calcio controlando a migração neuronal durante o desenvolvimento do cerebro. Pode participar também nas funções de amadurecimento do sistema nervoso.	47681	5.51

* Banco de dados Swiss-Prot (www.expasy.ch)

5.4 ANALISE DOS GÉIS 2D-PAGE DO SACO VITELINO DE 23 DIAS DE GESTAÇÃO

Os géis bidimensionais em triplicata do saco vitelino de aproximadamente 23 dias detectaram cerca de 970 spots de proteína (Figura 8)

De acordo com o ponto isoelétrico no intervalo de pH de 3 a 5 apresentou 262 spots de proteína, o intervalo de 5 a 7 apresentou 379 spots de proteína e no intervalo de 7 a 10 apresentou 326 spots de proteína (Figura 9).

Na tabela 11 e12 amostram-se os *spots* com seus valores de intensidade, área e volume das amostras do saco vitelino de embriões bovinos.

A identificação destes spots nos bancos de dados na internet onde se obteve as prováveis proteínas (Tabela 10).

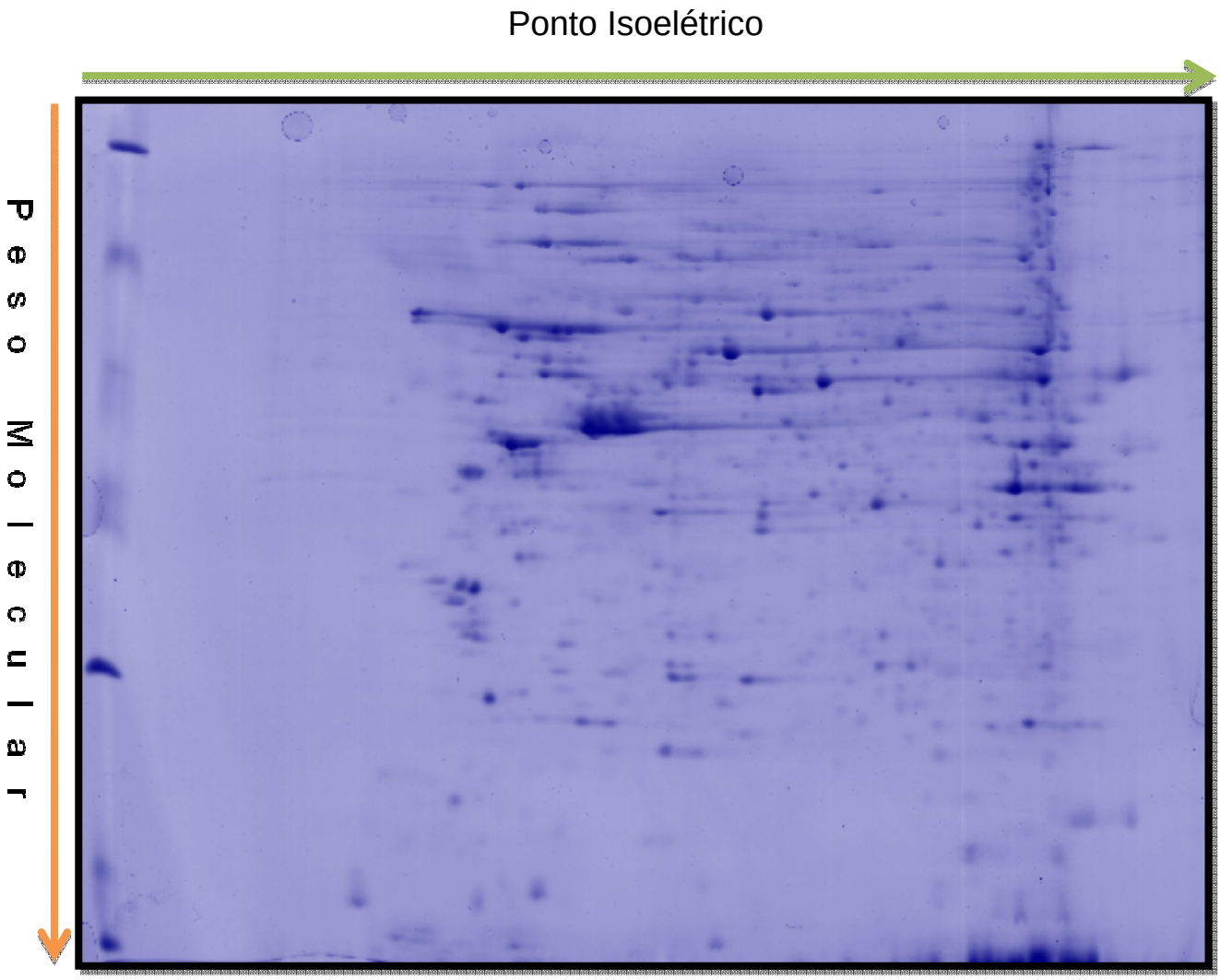


Figura 8 – Separação das proteínas do saco vitelino de embriões bovinos de gestação por eletroforese bidimensional. Focalização Isoelétrica realizada em gradiente de pH NL de 3-10. Coloração com azul de coomassie G-250. Embrião com idade estimada de 23 dias de gestação.

Tabela 11 - Valores de intensidade, área e volume dos spots dos géis 2D, de saco vitelino de embrião bovino. Representação de acordo com o programa ImageMaster 6.0

(Continua)

Spots	*pI*	PM	Intensidade		Área		Volume	
			37d	23d	37d	23d	37d	23d
13	5.42	33.000	124	101	6.11	4.81	457	163
14	5.42	33.000	75.0	21.0	2.80	3.52	82.7	32.9
15	5.45	27.000	107	52.0	3.51	4.01	157	67.7
*16	5.25	34.000	77.0	-	5.01	-	127	-
17	5.43	28.000	41.0	20.0	3.03	4.57	47.9	30.7
18	8.87	44.000	40.0	97.0	5.05	7.86	89.7	417
19	8.56	42.000	58.0	27.0	3.76	2.42	106	27.0
20	8.64	42.000	58.0	70.0	3.79	5.94	97.5	144
*21	8.36	48.000	-	108.0	-	10.9	-	542
22	8.66	62.000	13.0	92.0	1.33	5.72	9.51	184
*23	9.01	64.000	40.0	-	3.44	-	41.0	-
*24	8.42	90.000	-	105	-	2.69	-	143
*25	8.34	86.000	-	63.0	-	2.82	-	66.1
*26	8.35	94.000	-	65.0	-	3.05	-	89.2
*27	8.31	91.000	-	48.0	-	1.53	-	36.1
*28	8.36	116.00	-	107	-	4.22	-	166
*29	8.44	117.00	-	97.0	-	3.67	-	96.0

*Diferença qualitativa entre amostras

(Conclusão)

Spots	*pI*	PM	Intensidade		Área		Volume	
			37d	23d	37d	23d	37d	23d
30	8.64	125.00	53.0	-	3.69	-	71.1	-
*31	8.74	125.00	35.0	-	1.10	-	23.3	-
*32	8.80	125.00	45.0	-	1.58	-	32.9	-
*33	8.83	125.00	44.0	-	1.18	-	25.2	-
*34	8.90	125.00	50.0	-	3.02	-	68.3	-
35	7.44	49.000	126	83.0	6.27	7.19	404	191
36	7.46	53.000	97.0	53.0	2.78	4.25	107	74.6
37	7.49	52.000	60.0	27.0	1.71	2.34	41.6	24.4
38	7.38	53.000	52.0	29.0	2.70	4.19	62.5	65.1
*39	7.38	54.000	61.0	-	1.99	-	52.8	-
*40	7.67	50.000	66.0	-	3.37	-	96.0	-
*41	7.69	50.000	69.0	-	1.51	-	44.2	-

*Diferença qualitativa entre amostras

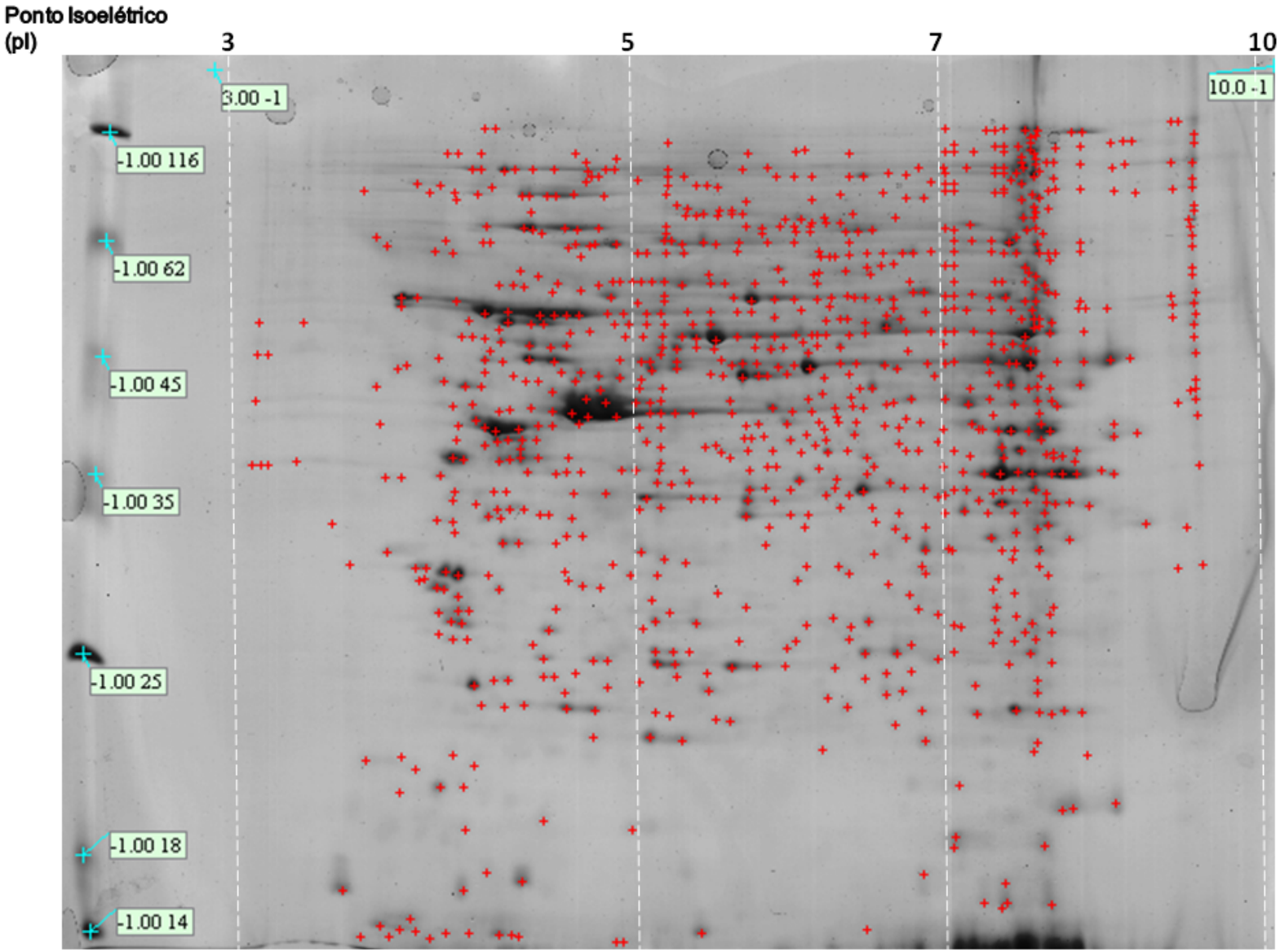


Figura 9 – Gel Proteômico do saco vitelino de embrião bovino de idade estimada de 23 dias de gestação, separação pelo intervalo de pH (3, 5, 7, 10)

Tabela 12 - Prováveis proteínas representadas pelos *spots* dos géis proteômicos das amostras de saco vitelino de embrião bovino de 23 dias e 37 dias de gestação, nas respectivas faixas de peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI)

(Continua)

PROTEINA	NºSWISS PROT	FUNÇÃO	PM(Da)	pI
CFDP1 Craniofacial development protein 1	**Q75QI0**	Pode jogar um papel durante a embriogenese	32780	5.36
MYOD1 Myoblast determination protein 1	**Q7YS82**	Envolvido na diferenciação muscular (factor miogênico). Induz fibroblastos a se diferenciarem em mioblastos. Activa promotores específicos do músculo. Interage e é inibida pela torção protéica. Esta interação provavelmente envolve a base de ambos os domínios proteínas	34207	5.66
MYF6 Myogenic factor 6	**Q7YS80**	Envolvido na diferenciação muscular (factor miogênico). Induz fibroblastos a se diferenciarem em mioblastos. Probable sequence specific DNA-binding protein	26977	5.53
APOE Apolipoprotein E [Precursor]	**Q03247**	Medeia a ligação, intersinalização e catabolismo de particulas de lipoproteina. Esto pode servir como uma ligação para o receptor de LDL (apo B/E) e para receptores especificos de apo-E (Quilimicrones remanecentes) dos tecidos hepaticos.	34127	5.45
MYF5 Myogenic factor 5	**P17667**	Envolvido na diferenciação muscular (factor miogênico). Induz fibroblastos a se diferenciarem em mioblastos.	28242	5.71
JMJD6 Histone arginine demethylase JMJD6	**Q58DS6**	Necessaria para a diferenciação de multiples órgãos durante a embriogeneses. Provavelmente funciona como um regulador chave da diferenciação hematopoietica. Seems to be necessary for the regulation of macrophage cytokine responses	45527	8.83
ALX4 Homeobox protein aristaless-like 4	**Q4LAL6**	Fator de transcrição envolvido no desenvolvimento do cranio e membros.	42485	8.36
MB211 Protein mab-21-like 1	**A4FV14**	Necessario para muitos aspectos do desenvolvimento embrionario incluindo o desenvolvimento normal dos olhos.	40957	8.93
PDLI7 PDZ and LIM domain protein 7	**Q3SX40**	Envolvido em dois dos mecanismos fundamentais da formação óssea, por exemplo, a formação óssea direta (embrionias plana ossos da mandíbula e da crânio) e, por exemplo, a formação óssea endocondral (ossos longos desenvolvimento embrionário). Desempenha um papel importante durante a reparação de fraturas. Envolvido na chave sinalizadora BMP6	47433	8.69

(Continuação)

PROTEINA*	NºSWISS PROT	FUNÇÃO	PM(Da)	pI
CALI Calicin	**Q28068**	Possivel elemento morfogenetico do citoesqueleto na diferenciação espermiogenica.	66890	8.49
COE2 Transcription factor COE2	**Q08DL5**	Fator de transcrição que, em osteoblastos, ativa o receptor para a RANKL engodos, TNFRSF11B, que, por sua vez, regula a diferenciação dos osteoclastos.	62620	9.22
PHC2 Polyhomeotic-like protein 2	**Q8IXK0**	Componente do grupo complexo Polycomb (PcG) multiprotein PRC1, é necessario para a a manutensão no estado repressivo transcricional de muitos genes, incluindo genes Hox, durante todo o desenvolvimento. Os complexos PCG PRC1 atuam através da remodelação da cromatina e modificação de histonas, que medeia monoubiquitinação de histonas H2A 'Lys-119', tornando cromatina hereditavel que mudou na sua expressão.	90350	8.73
FA48A Protein FAM48A	**Q8NEM7**	Necessário para MAP quinase p38 (MAPK11, MAPK12, MAPK13 e / ou MAPK14) ativação durante a gastrulação.	85818	8.75
HIC1 Hypermethylated in cancer 1 protein	**Q9R1Y5**	Fator de transcrição muito importante. Pode atuar como um supressor tumoral. Podem estar envolvidos no desenvolvimento da cabeça, face, pernas e ventral organismo parede	94321	8.74
WRM1 Armadillo repeat-containing protein wrm-1	**A8X811**	Tem um papel antagonista na sinalização de Wnt, que opera na embriogenese. Tem um papel na sinalização durante blastomere endoderme especificação	91588	8.33
TSH2 Teashirt homolog 2	**Q9NRE2**	Regulador transcricional envolvido nos processos de desenvolvimento	8.00	115006
SEM6D Semaphorin-6D [Precursor]	**Q76KF0**	Também podem estar envolvidos na manutenção e remodelação das conexões neuronais	8.71	117435
RADIL Ras-associating and dilute domain-containing protein	**A7UA95**	Efetor Downstream do Rap, exigido para adesão celular e migração dos precursores da crista neural durante o desenvolvimento.	124935	8.67
UNC84 Nuclear migration and anchoring protein unc-84	**Q20745**	Provavelmente envolvida na migração nuclear. Essencial para o recrutamento de anc-1 and unc-83 para o envelope nuclear.	125862	8.75

(Conclução)

PROTEINA*	NºSWISS PROT	FUNÇÃO	PM(Da)	pI
CTSRB Cation channel sperm-associated protein subunit beta	**A2RTF1**	Provavelmente envolvida na hiperativação da células spermaticasa através da sua associação com CATSPER1. Hiperativação da célula espermática é necessária para a motilidade espermática que é essencial mais tarde, durante a preparação do esperma para fertilização	126108	8.38
PRTGA Protogenin A [Precursor]	**Q2EY14**	Pode desempenhar um papel na elongação do eixo anteroposterior.	123663	8.05
AZI1 5-azacytidine-induced protein 1	**Q9UPN4**	Pode desempenhar uma função na espermatogeneses	122061	8.83
TBX20 T-box transcription factor TBX20	**Q9I9K7**	Pode desempenhar desde cedo uma função na diferenciação dos precursores cardiacos. Durante o desenvolvimento, esta expresso nas estruturas embrionárias de ambas origens ectodérmica e mesodérmica, incluindo o coração, neurônios motores craniais e da aorta dorsal. Proeminente associado com a formação do coração e continuamente expressa na linhagem do miocárdio desde o início da diferenciação do miocárdio através de formação do diferenciadas, dois camaras do coração.	49303	7.36
CED6 Cell death protein 6	**O76337**	Pode funcionar como um adaptador proteína em um percurso que medeia reconhecimento ea fagocitose de células apoptóticas durante o desenvolvimento normal. Promove a destruição de células em ambas fases precoce e tardia da apoptose. Necessário para a reorganização da actina em torno de células apoptóticas.	52808	7.59
EDIL3 EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3 [Precursor]	**O35474**	Promove adesão das celulas endoteliais atraves da interação com receptores da alpha-v/beta-3 integrin. Inibe a formação de estruturas vasculares. Pode estar envolvida na regulação da morfogenese vascular do remodelamento no desenvolvimento embrionario.	52050	7.75
RORB Nuclear receptor ROR-beta	**P454446**	O receptor Orphan nuclear é necessária para o normal desenvolvimento pós-natal da haste e o cone fotorreceptor das células. Regula a transcrição de OPN1SW no cone fotorreceptor das células por ligação a seqüência 5'-AGGTCA-3 'no promotor OPN1SW	53201	7.79
CHK1 Serine/threonine-protein kinase Chk1	**Q6DE87**	Ativação do WEE1 e inibição do CDC25 resultam num aumento da inibição de tirosina of complexos CDK-cyclin e consequentemente a inibição da prograssão do ciclo celulargression. Participa no ciclo celular	53975	7.90
IFRD1 Interferon-related developmental regulator 1	**Q5S1U6**	Poderia desempenhar uma função na regulaçaõ da atividade do genetanto na proliferação como na diferenciação induzida por precursores NFG.	50124	7.50
GOLI Protein goliath [Precursor]	**Q06003**	Regulação da expressão do gene durante a formação do mesoderma embrionario. Importante função como fator de transcrição.	49851	7.94

* Banco de dados Swiss-Prot (www.expasy.ch)

5.5 ANÁLISES 3D DOS SPOTS DE PROTEÍNA DO SACO VITELINO DE EMBRIÃO BOVINO DE 23 E 37 DIAS DE GESTAÇÃO

Os spots diferencialmente expressos em diferentes regiões dos géis proteômicos (Figuras 10, 11 e 12) foram analisados em 3ª Dimensão pelo programa Image Master 2D v. 6.0, onde se encontrou uma maior expressão de proteínas no saco vitelino de embrião bovino com 37 dias.

No saco vitelino de embrião bovino com 23 dias apresentaram proteínas especificas deste estagio na região D (Figura 13).

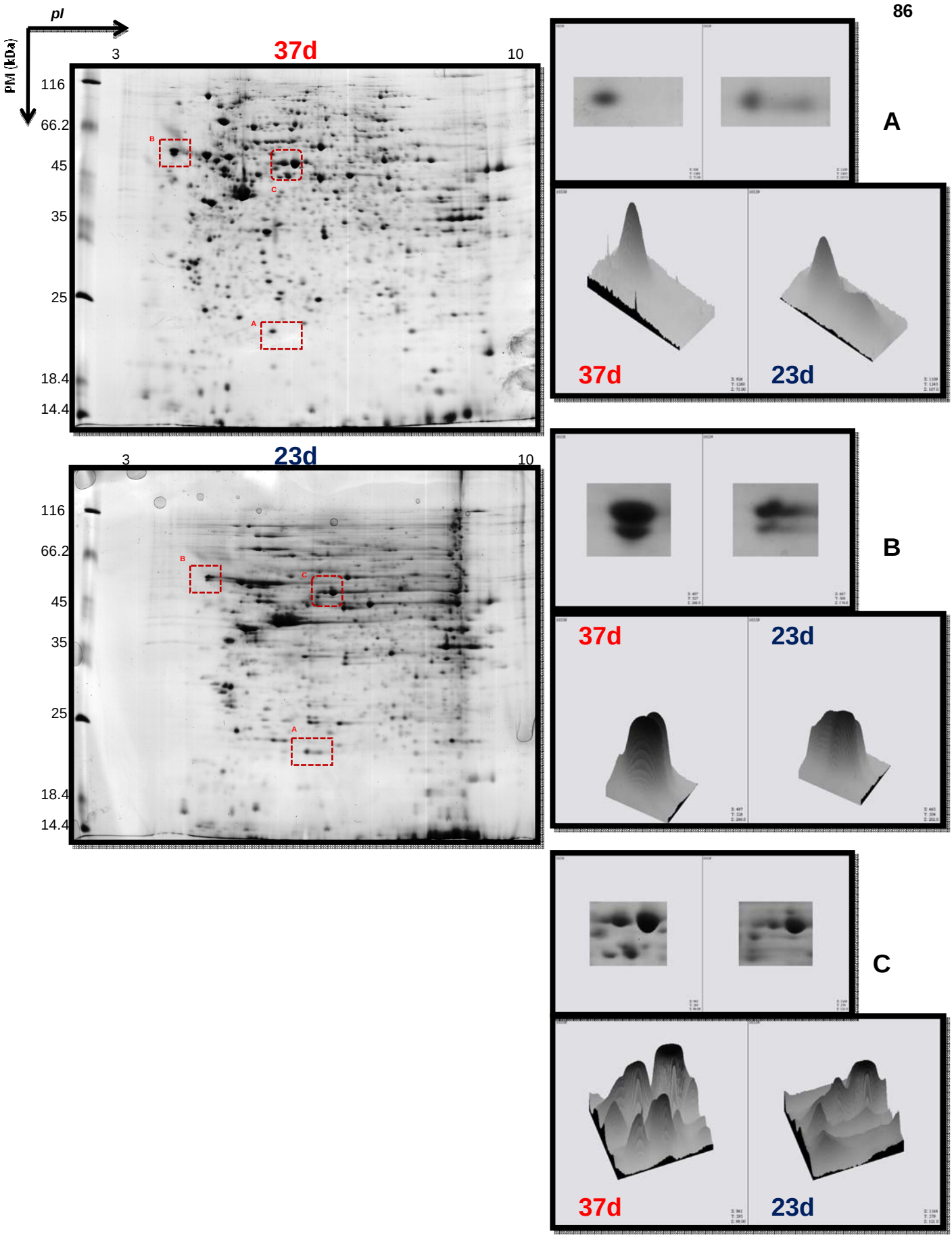


Figura 10 – Perfil proteômico do saco vitelino de embriões bovinos não manipulados de aproximadamente 37d e 23d de gestação. A direita estão representados, em 3D, regiões A, B e C que contem os spots os quais apresentaram expressão diferencial de proteínas na regiões selecionadas

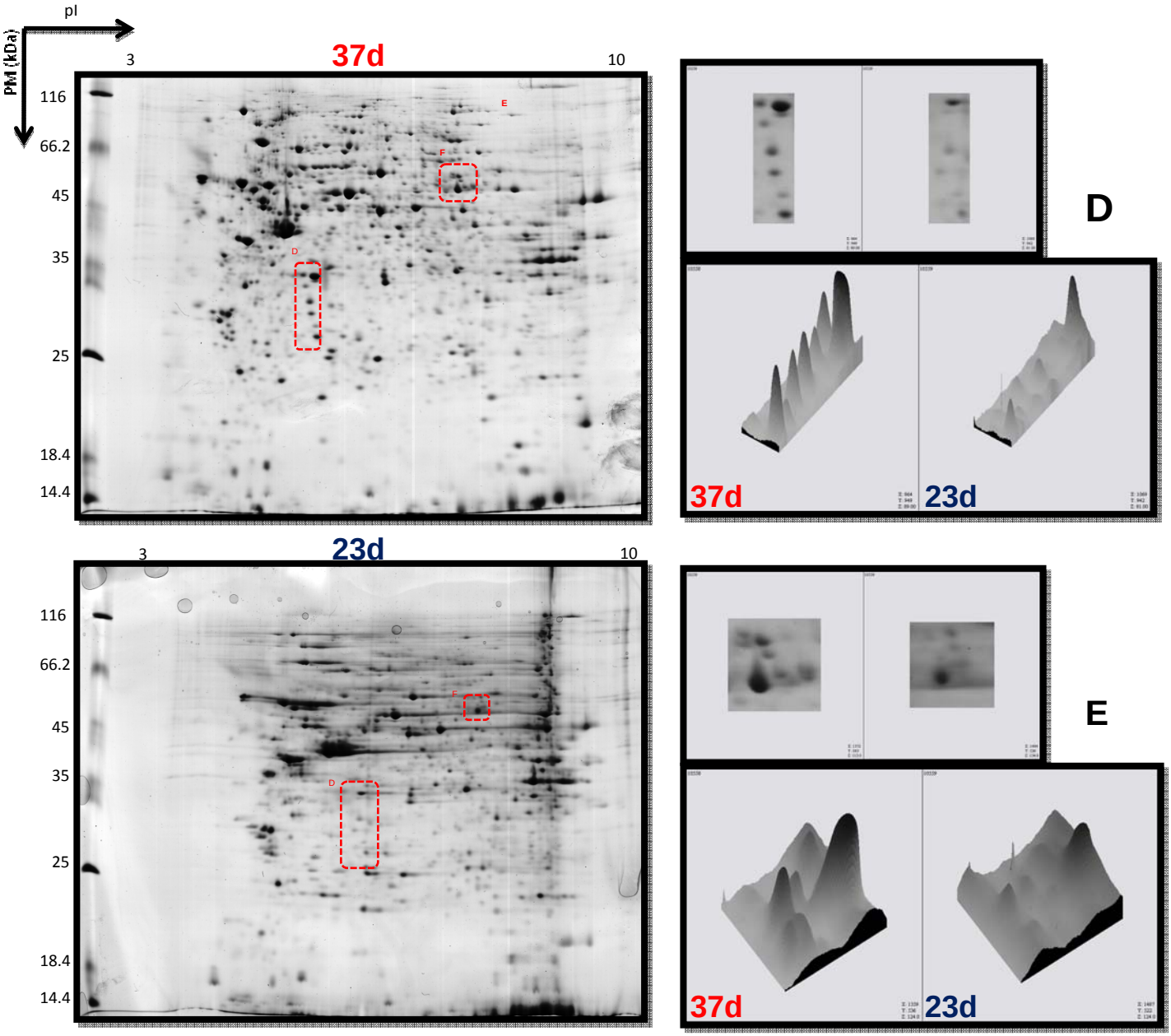


Figura 11 – Perfil proteômico do saco vitelino de embriões bovinos não manipulados de aproximadamente 37d e 23d de gestação. A direita estão representados, em 3D, regiões D e E que contem os spots os quais apresentaram expressão diferencial de proteínas na regiões selecionadas.

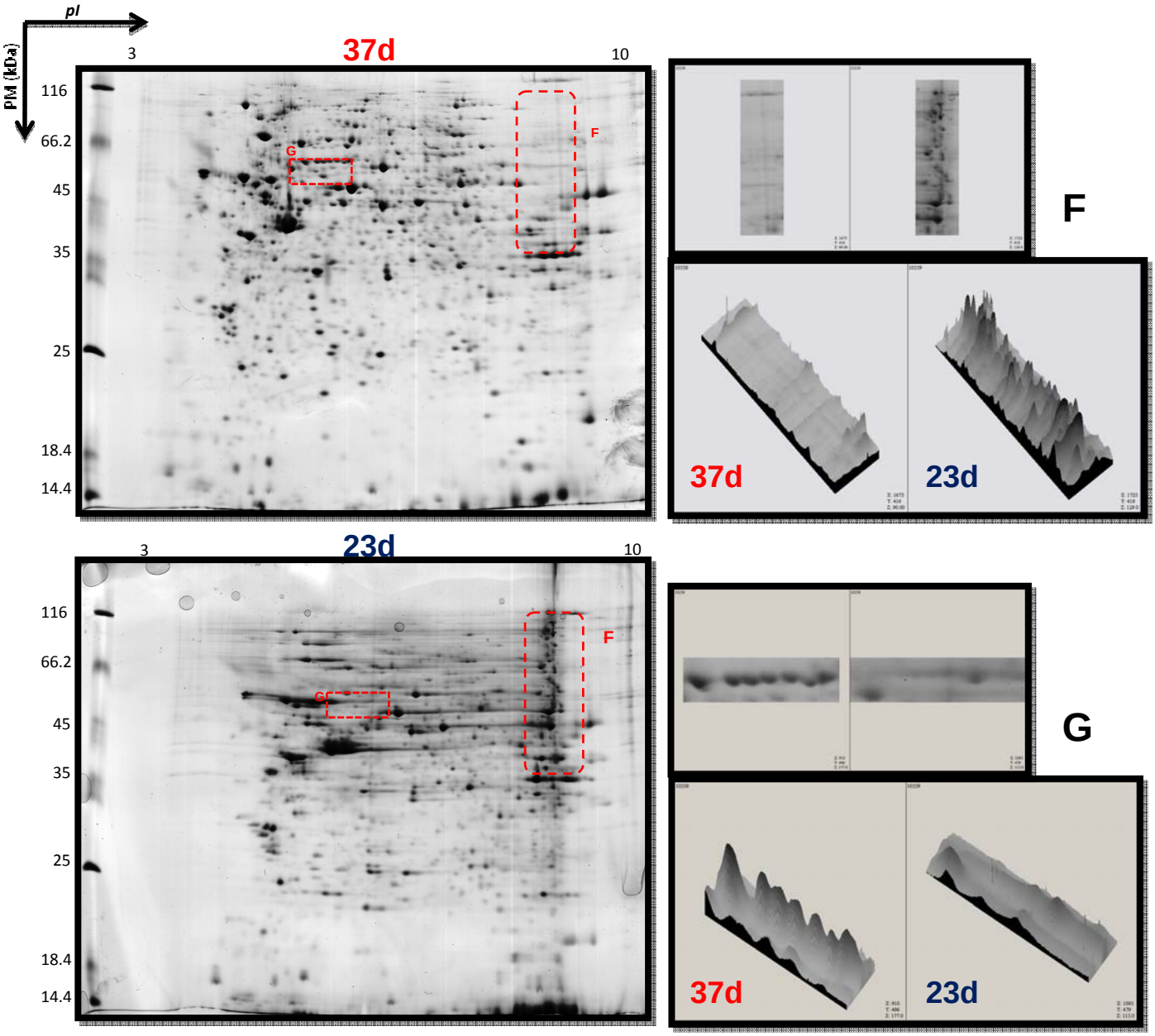


Figura 12 – Géis proteômicos do saco vitelino de embrião bovino não manipulado. A direita estão representados, em 3D, regiões F e G que contem os *spots* os quais apresentaram expressão diferencial de proteínas .

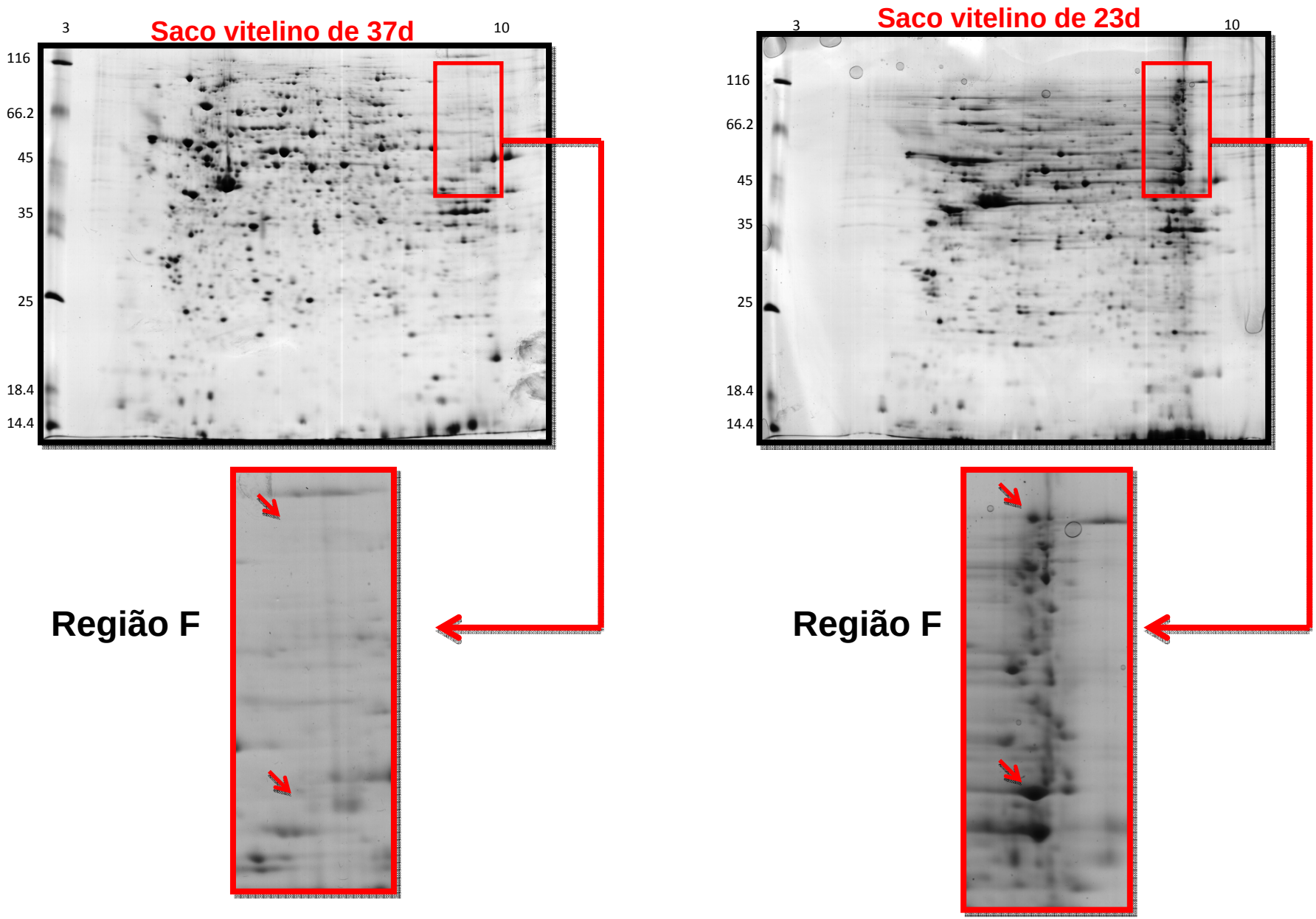


Figura 13 – Gel proteomico do saco vitelino de embrião bovino com idade estimada de 23 dias, que apresentou alta quantidade de proteinas expressas nesta idade (região F)

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Com o seqüenciamento dos genomas de diversos organismos vegetais e animais, tornou-se praticável a análise da expressão gênica. A análise da expressão global através do proteoma permite revelar proteínas envolvidas em processos dinâmicos que ocorrem após os estímulos de diferenciação e maturação celular. A monitorização do nível das proteínas, através de proteômica quantitativa, permite apreciar o efeito da regulação da expressão genética que ocorre nos processos pós-transcrição e pós-tradução e fornece numerosas informações, quanto à sua função biológica e envolvimento em vias de sinalização celular.

Os resultados apresentados neste trabalho documentam pela primeira vez as proteínas existentes no saco vitelino da espécie bovina, obtida pela análise proteômica, os quais foram responsáveis pela geração de um grande número de informações. Estas poderão ser consultadas para estudos atuais ou futuros, como também para encontrar padrões comparativos entre diferentes espécies. Este tipo de estudo é caracterizado como um novo tipo de fazer ciência, a “Ciência dirigida para a descoberta” (Discovery-driven Science) (AEBERSOLD et al., 2000).

As fontes naturais de proteínas para estudos proteômicos podem ser divididas em três categorias principais: (1) órgãos e tecidos intatos, (2) células de cultura e isoladas e (3) fluidos corporais (THONGBOONKERD, KLEIN, KLEIN; 2004). O protocolo para extração de proteínas do saco vitelino de embriões bovinos, que corresponde à categoria de órgãos e tecidos intatos, é diferente do protocolo para fluidos corporais, uma vez que estes já estão solubilizados, e particularmente foi estabelecido neste projeto.

O melhor método de extração, precipitação e solubilização das proteínas varia de uma amostra para outra, e deve ser estabelecido para cada caso em particular (HERBERT, 1999). Um protocolo específico para saco vitelino de embriões bovinos foi estabelecido para desenvolver estudos a nível molecular e bioquímico desta membrana, e para um melhor entendimento deste propósito.

O primeiro protocolo que foi utilizado, neste projeto apresentou detecção muito baixa dos spots de proteínas, devido a pouca solubilidade e alto grau de

proteólise da amostra. Foram estabelecidas outras etapas, como os métodos mecânicos de trituração da amostra na presença de nitrogênio líquido (N_2), o qual é aplicado em amostras vegetais. Este então se tornou eficiente na detecção dos spots de proteína das amostras apresentados neste trabalho.

Quando o tecido ou célula é lisado, proteases são liberadas ou ativadas. As degradações de proteínas através da ação das proteases interferem nos resultados dos géis proteômicos (GORG et al., 2007), desta forma foi adicionado inibidores de protease no tampão de reidratação/lise o que melhorou a viabilidade dos resultados.

O uso de inibidores de protease não teve efeitos nos nossos experimentos (USAMI et al., 2006). Durante a coleta das amostras, as altas temperaturas poderiam favorecer a liberação/ativação de proteases produzindo uma rápida degradação protéica, assim, além dos inibidores de protease foi necessária a manutenção das amostras a baixas temperaturas durante todo o procedimento experimental, como também durante o processo de reidratação das amostras na primeira etapa de eletroforese dimensão.

Um complemento para melhorar a solubilização das amostras foi à adição de um potente caotrópico, a tiouréia a qual tem demonstrado ser um desnaturante eficiente (RABILLOUD et al., 1997; RABILLOUD, 1998). O uso de tiouréia melhorou a solubilização da amostra no tampão de reidratação.

Na literatura não foram encontrados trabalhos de análise proteômica na raça bovina, apenas um trabalho que utilizou saco vitelino de ratas realizado por Usami et al. (2006), apresentando cerca de 800 proteínas no saco vitelino de embrião de ratas de 10,5 dias de gestação.

Em nossos achados, a proteína *Desert hedgehog 1* (DHH1), localizada no *spot*-1 encontrou-se presente nos estágios iniciais da gestação e suas variações são pequenas durante todas as fases. A proteína *Desert hedgehog 1* é uma proteína envolvida no desenvolvimento e formação de glândulas no embrião, além de se tratar de uma proteína sinalizadora derivada das células de Schwann (PARMANTIER et al., 1999). Tabin e Mcmahon (1997); Ingham (1998) complementam este estudo afirmando que esta proteína tem importante função de sinalização, durante o início do desenvolvimento.

A proteína Golias GOLI (Protein goliath [Precursor]), localizada no spot-41 atua na regulação da expressão dos genes, durante a formação do mesoderma embrionário, além disso, é um importante fator de transcrição, expresso somente no período de 23 dias de gestação. Provavelmente, decorrente da finalização do processo de formação dos folhetos embrionários, desta maneira, idades gestacionais mais avançadas, já não apresentaram esta proteína, como descrito por Moore e Persaud (2004), que afirmam que antes dos 23 dias de gestação, as células se despreendem do hipoblasto e passam a se posicionar entre o hipoblasto e o citotrofoblasto, de maneira a formar o mesoderma extra-embrionário. Do epiblasto surge o ectoderma que forma o âmnio, o embrião e a células da linha primitiva, que futuramente formará parte do mesoderma extra-embrionário e mesoderma do embrião.

A proteína Hemogen ou *Hemopoietic Gene Protein*, localizada no *spot*-5 foi expressa somente no estágio de 23 dias, com provável função de regulação da proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas. Também pode evitar a apoptose celular por meio da ativação do fator nuclear-kappa B (NF-kB). Desta forma, confirmamos os achados de Migliaccio et al. (1986); Liu et al. (1991), ao relatarem que o saco vitelino tem função hepática fetal, tal como a hematopoiese, durante o início do desenvolvimento embrionário.

Por outro lado, o spot-8 conhecido como fator de transcrição ELF-3 derivado de uma família de proteínas reguladoras da transcrição conhecida como ETS, desempenham função importante na proliferação celular, diferenciação de células epiteliais e tumorigênese (MAVROTHALASSITIS, GHYSDAEL; 2000). A mesma foi expressa no saco vitelino de embrião bovino de aproximadamente 37 dias de gestação, estando ausente no estágio de 23º dia gestacional.

A glicoproteina conhecida como Glicoproteina-N-acetilgalactosamina 3-beta-galactosiltransferase 1, localizada no *spot*-10, apresentou-se expressa somente nos estágios de 23 dias de gestação, desempenhando funções em muitos processos, tais como a angiogenese, trombopoiese e no desenvolvimento da hemostases nos rins.

Em seqüência, o *spot* 11 encontra-se o fator de transcrição Corion-específico (GCMa), proteína necessária para o desenvolvimento da placenta. Nas amostras de saco vitelino de embrião bovino com idade gestacional de aproximadamente 37 dias,

não houve expressão desta proteína, enquanto que nas amostras do saco vitelino de embrião com idade gestacional de 23 dias a proteína GCMa foi significativamente expressa. Acreditamos, que este fator é necessário durante o período inicial de prenhez, com finalidade de gerar informação as células, de maneira que os tecidos envolvidos no processo de placentação iniciem seu processo de formação e desenvolvimento. Ao final do período embrionário essas informações talvez não sejam necessárias, pois ao iniciar o período fetal a placenta deverá estar pronta para manutenção da gestação, e as proteínas necessárias para esse processo provavelmente, sejam expressas pelo embrião com idade gestacional de 37 dias.

A proteína quinase serina/treonina DCLK1 que pode estar envolvida como uma chave sinalizadora de cálcio controlando a migração neuronal durante o desenvolvimento do cérebro pode participar também nas funções de amadurecimento do sistema nervoso (MATSUMOTO et al., 1999), justificando a sua presença no *spot* 12, expresso diferencialmente no saco vitelino de aproximadamente 37 dias de gestação e não expresso no saco vitelino de 23 dias de gestação, uma vez que sua função está no amadurecimento celular e não na formação tecidual.

A apolipoproteína E (APOE), localizado no *spot* 16 apresentou-se expressa somente nas amostras de saco vitelino com aproximadamente de 37 dias de gestação. A apolipoproteina E medeia à ligação, inter-sinalização e catabolismo das partículas de lipoproteína, podendo servir como uma ligação para o receptor de LDL (apo B/E) e para receptores específicos de apo-E dos tecidos hepáticos durante a embriogênese. A apolipoproteina E é a maior apolipoproteína do sistema nervoso central, tendo uma importante função neural e reparo, após injúria. A APOE é regulada em resposta ao stress oxidativo e dotada com propriedades antioxidantes (MIYATA, SMITH; 1996).

As proteínas MYOD1, MYF6 e MYF5 estão envolvidas na diferenciação muscular e induz fibroblastos a se diferenciarem em mioblastos, e foram expressas nos dois períodos de gestação. Por outro lado, a proteína PDLI7 (*PDZ and LIM domain protein 7*) esta envolvida em dois dos mecanismos fundamentais da formação óssea: a formação óssea direta (ossos planos da mandíbula e do crânio no embrião) e a formação óssea endocondral (ossos longos no embrião), sendo encontrada expressa somente no período de 23 dias de gestação.

No *spot* 21 localiza-se uma proteína domínio da família de proteínas PDZ, envolvida no desenvolvimento embrionário. A proteína LIM 7, um dos membros da família PDZ está ligada a actina do citoesqueleto, envolvida nos mecanismos fundamentais da formação óssea (OTT et al., 2008) desempenha um papel importante na reparação de fraturas. Esta proteina apresentou expressão diferencial unicamente no saco vitelino de embrião bovino de aproximadamente 23 dias de gestação, sugerindo que sua ação ocorre nas células afim de se diferenciarem para formar os moldes cartilaginosos, seguido dos processos de calcificação, nas idades gestacionais mais avançadas.

A proteína COE2, localizada no spot-23 é um fator de transcrição que atua na diferenciação celular como na regulação de osteoclastos. Em nematódeos e vertebrados desempenha função nos estágios iniciais da diferenciação neuronal (DUBOIS, VINCENT; 2001). Nossos resultados demonstram que esta proteína encontra-se expressa somente nas amostras do saco vitelino de embrião bovino de aproximadamente 37 dias de gestação, explicando os achados de Larsen (1997), ao afirmar que as primeiras condensações de células mesenquimais surgem quando o mesênquima somático induz a proliferação da placa mesodérmica lateral. A cartilagem se desenvolve a partir do mesênquima e aparece pela primeira vez nos embriões, durante a quinta semana gestacional (FLETCHER; WEBER, 2004; MOORE; PERSAUD, 2004). Tais características nos levam a crer que estas células mesenquimais acabaram de sofrer diferenciação à partir do mesoderma, estando em intensa atividade para constituir as futuras células cartilaginosas.

O *spot*-24 corresponde a proteína *Polyhomeotic-like protein2* (PHC2) componente do grupo complexo *Polycom (PcG) multiprotein PRC1*, necessária para a manutenção no estado supressivo transcricional de muitos genes durante o desenvolvimento. Está implicada em múltiplos níveis do controle celular (MARTINEZ et al., 2006), sendo expressa unicamente no saco vitelino de aproximadamente 37 dias de gestação.

O *spot*-25 corresponde à proteína *FAM48A* que atua na ativação da quinase MAP p38 (MAPK11, MAPK12, MAPK13 e/ou MAPK14) durante a gastrulação em vertebrados (ZOHN et al., 2006). A gastrulação em bovinos acontece entre os 13 - 21 dias da gestação (HAFEZ; HAFEZ, 2004) . Enquanto que nos camundongos começa no dia 6,25 de gestação e resulta da formação dos três folhetos germinativos e estabelecimento do corpo embrionário (TAM, BEHRINGER; 1997).

Nossos resultados mostraram a expressão desta proteina exclusivamente no saco vitelino de embrião bovino de aproximadamente 23 dias de gestação, a qual foi expressa provavelmente em períodos anteriores, como a gastrulação citada pelo autor acima, e talvez faça parte também da formação dos tecidos relacionados a este evento durante a terceira e quarta semana estudada neste projeto.

Por se tratar de um fator de transcrição muito importante, o *spot* 26 corresponde a proteina Hipermetilada Câncer 1 (HIC1) pode atuar como um supressor antitumoral (DELTOUR et al., 2002; FLEURIEL et al., 2008), podendo ainda estar envolvido no desenvolvimento da cabeça, face, pernas e parede ventral do organismo, explicando sua expressão durante o período de 23 dias de gestação nos sacos vitelinos dos embriões bovinos estudados, momento em que se iniciará a diferenciação em porção cranial, porção caudal, porção ventral e porção dorsal dos embriões.

Observamos ainda que neste estudo comparativo do saco vitelino de embriões bovinos, as amostras de 37 dias de gestação foram as que apresentaram maior expressão de proteínas, cerca de 1230 *spots* de proteína em comparação as amostras de 23 dias de gestação que apresentaram cerca de 970 *spots* de proteínas, mas neste estágio de 23 dias apresentou uma região F onde se expressaram diferencialmente spots de proteínas característico deste estágio (Figura 12).

Ao comparamos os dois períodos de gestação, encontramos que: a proteína *Desert Hedgehog 1 (DHH1), localizada no spot-1* é uma proteína sinalizadora envolvida no inicio da indução e modelagem do ectoderma anterodorsal, sistema nervoso e somitos. Além disso, induz a formação de glândulas no embrião foi expressa igualmente nos dois períodos. Por outro lado a proteína Hemogen (HEMGN) que é responsável pela regulação da proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas e pode inibir a apoptose celular pela ativação do fator nuclear-kappa B (*NF-kB*) expressa somente no período de 23 dias.

O fator de transcrição Elf-3 (*ELF3*), localizada no *spot*-8 é uma proteína que desempenha um papel fundamental na diferenciação de células epiteliais e tumorigênese, foi expressa no período de 37 dias. Talvez a função relacionada à diferenciação de células epiteliais explique sua presença, pois nesta fase o tecido

mesenquimal se diferencia formando tecidos conjuntivos e tecidos epiteliais característico de cada órgão. Por outro lado, a glicoproteína conhecida como Glicoproteina-N-acetilgalactosamina 3-beta-galactosiltransferase 1, localizada no *spot*-10 desempenha funções em múltiplos processos, como a angiogênese, trombopoiese e desenvolvimento da homeostases nos rins, somente foi expressa no período de 23 dias de gestação, justificando os achados Noden, de Lahunta (1990) ao descreverem que o sistema cardiovascular inicia seu desenvolvimento no final da terceira semana gestacional, poucos dias antes do início do surgimento do primórdio do respiratório. As células mesenquimais derivadas do mesoderma esplâncnico proliferam-se formando aglomerados celulares isolados, que logo darão origem a tubos endoteliais, que se unem formando o sistema cardiovascular primitivo.

Nos humanos, Moore, Persaud (2004); Moore, Persaud, Shiota (2002) afirmam que o primórdio do coração torna-se evidente aos 18 dias e começa a pulsar aos 22 ou 23 dias. Na área cardiogênica, células mesenquimais esplâncnicas se agregam e se dispõe de ambos os lados formando os cordões angioblásticos, os quais se canalizam formando os tubos cardíacos endocárdicos de paredes delgadas, tais sinalizações e informações provavelvente estão sendo realizadas pela glicoproteína Glicoproteina-N-acetilgalactosamina 3-beta-galactosiltransferase 1, mencionada acima, encontrada por nós neste trabalho.

A proteína Corion-especifico (GCM1), localizada no *spot*-11 é um fator de transcrição necessário para o desenvolvimento da placenta e somente foi expresso no período de 23 dias. Por outro lado, a proteína quinase serina/treonina *DCLK1,* localizada no spot-12 é responsável pela sinalização de cálcio, controlando a migração neuronal durante o desenvolvimento do cérebro, expressa aos 37 dias de gestação.

A proteina 1 Desenvolvimente Cranio-Facial (CFDP1), localizada no *spot*-13 é uma proteína que pode desempenhar funções durante a embriogênese foi expressa nos dois períodos gestacionais, esta proteína poderia estar expressa até o final do desenvolvimento do saco vitelino. Por outro lado, a proteína ApoE (*Apolipoproteina E*), localizada no *spot*-16 é a maior apolipoproteína encontrada no sistema nervoso central, tem uma importante função neural e de reparo após uma injúria, poderia ser uma importante proteína para a sobrevivência do embrião durante uma agressão externa, só foi expressa no período de 37 dias.

A proteína JMJD6 (*Histone arginine demethylase*), localizado no *spot*-18 é necessária para a diferenciação de múltiplos órgãos durante a embriogênese. Provavelmente funciona como uma via reguladora da diferenciação hematopoiética foi expressa nos dois períodos com maior intensidade de expressão no período de 23º dia de gestação. Por outro lado, a proteína HIC1 (*Hypermethylated in Cancer 1 protein*), localizada no spot-25 é um fator de transcrição importante durante o desenvolvimento embrionário, podendo atuar como um supressor tumoral que reduziria a probabilidade de uma célula se tornar um tumor, só foi expressa no período de 23 dias.

A proteína TSH2 (*Teashirt homolog 2*), localizada no spot-27 é um regulador transcricional envolvido nos processos de desenvolvimento de outras proteínas, ainda não conhecidos, só foi expresso no período de 23 dias.

A proteína CED6 (*Cell death protein 6*), localizada no spot-35 pode atuar como um adaptador de proteína para o reconhecimento e a fagocitose de células apoptóticas durante o desenvolvimento normal, promove a destruição de células nas fases precoce e tardia da apoptose, expressa nos dois períodos gestacionais. Barreto Filho e Marques Junior (1993) explicam a existência de um processo de eliminação de células desnecessárias, mantendo a homeostase dos tecidos, com papel funcional de maturação e não descolamento de placenta durante o periodo fetal. O aumento no número de células em apoptose contribui para a desconexão materno-fetal da placenta. Talvez esta proteína seja expressa durante todo o período gestacional, e uma falha em sua produção levaria ao aborto do embrião ou feto.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Em face dos resultados obtidos nas condições experimentais apresentadas podemos concluir que:

1. O presente protocolo foi estabelecido para a separação de proteínas do saco vitelino de embriões bovinos, e possivelmente para outras amostras de tecidos de mamíferos.

2. O pré-tratamento das amostras é de grande relevância para melhorar a separação e o poder de resolução das proteínas nos géis proteômicos.

3. A separação das proteínas do saco vitelino de embriões bovinos utilizando-se fitas IPG com gradiente 3-10 e coloração com Coomassie Blue G-250 permitiu detectar grande quantidade de spots.

4. Os padrões protéicos dos géis 2D-PAGE apresentaram diferenciação significativa entre as amostras de 23 e 37 dias de gestação, como também foi capaz de expressar padrões distintos de proteínas.

5. Os mapas primários 2D-PAGE desenvolvidos no presente estudo são úteis para a geração de um banco de dados eletrônico de géis 2D-PAGE, e a sua comparação inter-laboratorial com o intuito de identificar novos padrões de expressão protéica ou mudanças pós-transducionais nos diferentes estágios de desenvolvimento.

6. O saco vitelino de embrião bovino possui funções importantes para o desenvolvimento do embrião. Dentre destas funções a diferenciação celular, o desenvolvimento do sistema nervoso, funções neurais, diferenciação muscular, diferenciação de múltiplos órgãos na embriogêneses, atividade anti-apoptótica, durante o período

gestacional de 37 dias, como observado neste estudo. Enquanto, que as proteínas do saco vitelino no período de 23 dias apresentam funções diferenciadas, quando comparadas ao período gestacional de 37 dias, como as funções no desenvolvimento da angiogênese, trombopoiese e homeostasia nos rins, desenvolvimento da placenta, formação dos ossos no embrião, supressão tumoral e regulação da expressão gênica durante a formação do mesoderma embrionário.

O conhecimento das funções das proteínas vitelinas, durante o primeiro trimestre de gestação, auxiliarão na compreensão das várias inter-relações entre a mãe e o feto, fase na qual muitos eventos podem levar a alterações no desenvolvimento desta membrana e, por conseguinte a fenômenos que prejudicam a placentação e desenvolvimento normal dos embriões. O estudo destas proteínas e a sua identificação poderão servir para o desenvolvimento de biomarcadores úteis no diagnóstico pré-implantacional embrionário, com o intuito de prevenir a transmissão de enfermidades genéticas no embrião produzido por manipulação em laboratório.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 402, p. 198-207, 2003.

AEBERSOLD, R.; HOOD, L. E.; WATTS, J. D. Equipping scientists for the new biology. Nature Biotechnology, v. 18, p. 359, 2000.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins.** Viçosa: UFV, 1998, p 574.

ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L. Twenty years of Two-dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**, v. 17, p. 443-453, 1996.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química:** questionando a vida moderna e o médio ambiente. Porto Alegre: Bookman, 914 p, 2001.

BARONE, R. **Anatomie comparèe dês mammifères domestiques**. Splanchnologie. Paris: Vigot Frères, 1976, t. 2, p. 579-605.

BARRETO FILHO, J.B.; MARQUES JUNIOR, A.P. Aspectos histológicos da placenta de vacas zebu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.45, p.385-393, 1993.

BAUMGARTNER, B. G.; MURACH, K. F.; SCHLEGEL, E.; PRAXMAYER, C.; ILLMENSEE, K. Comparison of protein between embryonic and extraembryonic tissues during 11th day of gestation of the mouse. **Electrophoresis**, v. 15, p. 992-1000, 1994.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5 ed: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2004. p.1059.

BERKELMAN, T.; STENSTED, T. **2-D electrophoresis using immobilized pH gradients:** principles and methods. Uppsala, Sweden: Amersham Biosciences Inc., 1998. Manual do fabricante. 100p.

BJELLQVIST, B., EK, K.; RIGHETTI, P. G.; GIANAZZA, E.; GÖRG, A.; WESTERMEIER, R.; POSTEL, W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. **J Biochemycal Biophysical Methods.** v. *6*, p. 317-339, 1982.

BJÖRKMAN, N.; DANTER, V.; LEISER, R. Comparative placentatión in laboratory animals. A Review**. Scandinavia. Journal. laboratory. Animal. Science,** v. 16, n. 4, p. 129-158, 1989.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitycal Biochemistry,** v. 72, p. 248-254, 1976.

BURLEY, S. K.; ALMO, S. C.; BONANNO, J. B.; CAPEL, M.; CHANCE, M. R.; GAASTERLAND, T.; LIN, D.; SALI, A.; STUDIER, F. W.; SWAMINATHAN, S. Structural genomics: beyond the human genome project. **Nature Genetics,** v. 23, p. 151-157, 1999.

CHROMY, B. A.; PERKINS, J.; HEIKBRINK, J. L.; GONZALES, A. D.; MURPHY, G. A.; FITCH, J. P.; MCCUTCHEM-MALONEY, S. L. Proteomic characterization of host response to Yersinia pestis and near neighbours. **Biochemical and Biophysical Research Comunications,** v. 320, p. 474-479, 2004

CORTHALS, G. L.; WASINGER, V. C.; HOCHSTRASSE, D. F.; SANCHEZ, J. C. The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research. **Electrophoresis,** v. 21, p. 1104-1115, 2000.

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis,** v. 7, p. 52-54, 1986.

DE SOUSA, M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. A Análise de proteômas: o despertar da era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência ε Desenvolvimento**. v.2, n.7, p. 12-14. 2003.

DE SOUSA, P.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L. E.; WALKER, S. K.; WILMUT, I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biology of Reproduction**, v.65, p. 23-30, 2001.

DELTOUR, S.; PINTE, S.; GUERARDEL, C.; LEPRINCE, D. Chracterization of HRG22, a Human Homologue of the putative tumor suppressor gene HIC1. **Biochemical an Biophysical Research Communications**, v. 287, p. 427-434, 2002.

DEREN, J. J.; PADYKULA, H. A.; WILSON, T. H. Development of structure and function in the mammalian yolk sac. II. Vitamin B_{12} uptake by rabbit yolk sacs. **Development Biology**, v.13, p. 349-369, 1966a.

DEREN, J. J.; PADYKULA, H. A.; WILSON, T. H. Development of structure and function in the mammalian yolk sac. III. The development of amino acid transport by yolk sac. **Development Biology**, v.13, p. 370-384, 1966b.

DI CIERO, L.; BELLATO, C. M. PROTEOMA: Avanços Recentes em Técnicas de Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massa. **Biotecnologia Ciência ε Desenvolvimento**. n. 29, p. 158-164. 2003.

DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 463-468, 1980.

DUBOIS, L.; VINCENT, L. The COE-Collier/Olf1/EBF-Transcription factors: structural conservation and diversity of developmental functions. Mechanisms of Development, v. 108, p. 3-12, 2001.

DUNNE, L. D.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Embryo and fetal loss in beef heifers between day 14 gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n.1, p. 39-44, 2000.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomy and Histology and Embryology**, v.2, p.11-45, 1973.

FLETCHER, T. F.; WEBER, A. F. **Veterinary developmental anatomy**. 2004, CVM 6100, 76 p.

FLEURIEL, C.; TOUKA, M.; BOULAY, G.; GUERARDEL, C.; ROOD, B. R.; LEPRINCE, D. HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 26-33, 2009.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. The Proteomics Protocols Handbook. Human Press, 2005. p. 571-607.

GITLIN, D.; PERRICELI, A. Synthesis of serum albumin, prealbumin, alphafetoprotein, alpha 1-antitrypsin and transferring by the human yolk sac. **Nature,** v. 228, p. 995-997, 1970.

GONZALES-CRUSSI, F.; ROTH, L. M. The human yolk sac and yolk sac carcinoma: an ultralstructural study. **Human Pathology**, v. 7, p. 675-691, 1976.

GÖRG, A.; KLAUS, A.; LÜCK, C.; WEILAND, F. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis: A laboratory manual. Disponivel em: <http://www.wzw.tum.de/blm/deg/>. Acesso em: 3 março 2007.

GÖRG, A.; POSTEL, W.; GÜNTHER, S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**. v. 9, p. 531-546, 1988.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.: Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology Molecular Biology Reviews,** v. 66, p. 39-63, 2002.

GREEN, R. D.; QURESHI, M. A.; LONG, J. A.; BURFENING, P. J.; HAMERNIK, D. L. Identifying the Future Needs for Long-Term USDA Efforts in Agricultural Animal Genomics. **International Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 185-191, 2007.

GULBIS, B.; JAUNIAUX, E.; COTTON, F.; STORDEUR, P. Protein and enzyme patterns in the fluid cavities of the first trimester gestational sac: relevance to the absortive role of secondary yolk sac. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 857-862, 1998.

GYGI, S. P.; RIST, B.; GERBER, S. A.; TURECEK, F.; GELB, M. H.; AEBERSOLD, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 994-999, 1999.

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

HERBERT, B. R. Advances in protein solubilization for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 20, p. 660-663, 1999.

HUGHES, P. E.; VARLEY, M. A. **Reproducción del cerdo**, Zaragoza: Acribia, 1984. 253 p.

INGHAM, P. W. Transducing hedgehog: the story so far. **Journal EMBO,** v. 17, p. 3505-3511, 1998.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. E. S. Gestação, fisiologia pré-natal e parto. In: HAFEZ, E. S. E. Ed. **Reprodução animal.** 7. ed. Barueri, SP: Manole, 2004. p. 141-155.

JAMES, P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. **Quarterly Review of Biophysics**, v. 30, n. 4, p. 279-331, 1997.

JONES, C. P. J.; JAUNIAUX, E. Ultrastructure of the materno-embryonic interface in the first trimester of pregnancy. **Micron**, v. 2, 145-173, 1995.

KING, B. F. Comparative anatomy of the placenta barrier. **Bibliotheca anatomical,** n. 22, p.13-28, 1982.

KING, G. J.; ATKINSON, B. A.; ROBERTSON, H. A. Implantation and early placentation in domestic ungulates. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 31, p. 17-30, 1982.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A Novel Approach to Testing for Induced Point Mutations in Mammals. **Humangenetik**, v. 26, p. 231-243, 1975.

KUNZ, T. L.; GAMBARINI, M. L.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; GALINDO, A. D. S. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião-patógenos. **Revista CFMV**, v. 8, n. 26, p. 27-36, 2002.

LAPTHORN, A. J.; HARRIS, D. C.; LITTLEJOHN, A.; LITTLEJOHN, A.; LUSTBADER, J. W.; CANFIELD, R. E.; MACHIN, K. J.; MORGAN, F.J.; ISAACS, N. W. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. **Nature**, v. 369, p. 455-461, 1994.

LARSEN, W. J. **Human Embryology**. 2. ed. [s. n.] Churchill Lurngstone, 1997, 512 p.

LATSHAW, W. K. **Veterinary development anatomy**. A clinical oriented approach. Toronto: Decker, 1987. p 49 - 74.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placenta structure: in a comparative aspect experimental and clinical. **Endocrinology**, v.102, n.3, p. 122-134, 1994.

LINK, A. J.; ENG, J.; SCHIELTZ, D. M.; CARMACK, E.; MIZE, G. J.; MORRIS, D. R.; GARVIK, B. M.; YATES, J. R., 3rd. Direct analyses of protein complexes using mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 676-682, 1999.

LIU, K. H.; BREWTON, R. G.; BAUMBACH, G. A.; GODKIN, J. D. Characterization of protein production by ovine placental membranes: Identification of a placental retinal-bilding protein**. Endocrinology**, v.129, p.126-132, 1991.

MARTINEZ, A.; COLOMB, S.; DEJARDIN, J,; BANTIGNIES, F.; CAVALLI, G. Polycomb group-dependent Cyclin A repression in Drosophila. **Genes & Development**, v. 20, p. 501-513, 2006.

MINUTH, W.W.; TIEDEMANN, K. The pig yolk sac II: Analysis of synthesized proteins. **Histochemistry**, v. 68, p. 147-158, 1980.

MIYATA, M.; SMITH, J. D. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. **Nature Genetics,** v. 14, p. 55-61, 1996.

NODEN, D. M.; LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domésticos mecanismos de desarrollo y malformaciones.** Zaragoza: Acribia, 1990. 399 p.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**, 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 609 p.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V.; SHIOTA, K. **Atlas Colorido de Embriologia Clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 284 p.

MOSSMAN, H. W. **Contributions to embryology**. Washington: Carnegie Institution, 1937, p. 247.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 3 ed. New York: WH Freeman and Company, , 2002. 117 p.

O'FARRELL, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Protein. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OTT, E. B.; VANDEN AKKER, N. M. S.; SAKALIS, P. A.; GITTENBERGER-DE GROOT, A. C.; TE VELTHUIS, A. J. W.; BAGOWSKY, C. P. The lim domain only protein 7 is important in zebrafish heart development. **Developmental Dynamics**, v. 237, p. 3940-3952, 2008.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, Massachusetts, v. 405, n. 6788, p.837-846, 2000.

PARMANTIER, E.; LYNN, B.; LAWSON, D.; TURMAINE, M.; SHARGHI-NAMINI, S.; CHAKRABARTI, L.; MCMAHON, A. P.; JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. Schwann Cell-Derived desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. **Neuron**, v. 23, p. 713-724, 1999

QUALTIERI, A.; PERA, M. L.; URSO, E.; BONO, F.; VALENTINO, P.; SCORNAIENCHI, M. C.; QUATTRONE, A. Two-dimensional electrophoresis of peripheral nerve proteins: optimized sample preparation. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 159, p. 125-133.

RABILLOUD, T. Solubilization of proteins for electrophoresis analysis. **Electrophoresis,** v. 17, p. 813-829, 1996.

RABILLOUD, T.; ADESSI, C.; GIRAUDEL, A.; LUNARDI, J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis,** v. 18, p. 307-316, 1997.

RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility the membrane proteins in Two-Dimensional electrophoresis. **Electrophoresis,** v. 19, p. 758-760, 1998.

RABILLOUD, T. **Proteome research: two-dimensional gel electrophoresis and identifications methods**. Berlin: Springer Verlag, 2000.

RABILLOUD, T. Two dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still climbs up the mountains. **Proteomics,** v. 2, p. 3-10, 2002.

RACHAMANDRAN, C.; GORIS, J.; WAELKENS, E.; MERLEDEVE, W.; WALSH, D. The interrelationship between cAMP-dependent alpha and beta subunit phosphorylation in the regulation of phosphorylase kinase activity. Studies using subunit specific phosphatases. **Journal Biology Chemycal,** v. 262, p. 3210-3218, 1987.

RENFREE, M. B.; HENSLEIGH, H. C.; MC LAREN A. Development changes in the composition and amount of mouse fetal fluids. **Journal Embryology Experimental Morphology**, v. 33, n. 2, p.435-446, 1975.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.;VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Eletroforese bidimensional e analise de proteomas. **Comunicado Técnico**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 136, p. 1-12, 2005.

RÜSSE, I.; SINOWATZ, F.; RICHTER, L.; LEHMANN, M.; SCHALLENBERGER, E. The development of the yolk sac in ruminants (sheep and cattle) **Anatomy and Histology and Embryology,** v. 21, p. 324-347, 1992.

SADLER, T. W. **Embriologia medica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 347.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; CORREIA, I. S. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microorganismos. **Boletim de Biotecnologia**, n. 77, p. 7-17, 2004.

SHAW, D. J. **Electrophoresis**. London: Academic Press. 1969, p.144.

SHI, W. K.; HOPKINS, B.; THOMPSON, S.; HEATH, J. K.; LUKE, B. M.; GRAHAM, C. F. Synthesis of apolipoproteins, alphafoetoprotein, albumin, and transferrin by the human foetal yolk sack and other foetal organs. **Journal Embryology & Experimental Morphology**, v. 85, p. 191-206, 1985.

SIZOVA, D.; CHARBAUT, E.; DELALANDE, F.; POIRIER, F.; HIGH, A. A.; PARKER, F.; DORSSELAER, A. V.; DUCHESNE, M.; DIU-HERCEND, A. Proteomics analysis of brain tissue from an Alzheimer´s disease mouse model by two-dimensional difference gel electrophoresis. **Neurobiology of Aging**, v. 28, p. 357-370, 2007.

STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L.; BERG, J. M. **Bioquimica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997. p. 513.

STULTS, J. T.; ARNOTT, D. Proteomics. **Methods Enzymology,** v. 402, p. 245–289, 2005.

TAM, P. P. L.; BEHRINGER, R. R. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. **Mechanism of Development**, v. 68, p. 3-25, 1997.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: conceitos básicos. **Química Nova**. v.19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TIEDEMANN, K. The amniotic, allantoic and yolk sac epithelia of the cat: SEM and TEM studies. **Anatomy Embryology,** v. 158, p. 75-94, 1979.

TISELIUS, A. A new apparatus for Electrophoretic analysis of colloidal mixtures**.** **Transactions of the Faraday Society,** v. 33, p. 524-531, 1937.

TWYMAN, R. M. **Principles of Proteomics,** New York: BIOS Scientific, 2004. 400 p.

UETZ, P.; GIOT, L.; CAGNEY, G.; MANSFIELD, T. A.; JUDSON, R. S.; KNIGHT, J. R.; LOCKSHON, D.; NARAYAN, V.; SRINIVASAN, M.; POCHART, P.; QURESHI-EMILI, A.; LI, Y.; GODWIN, W.; CONOVER, D.; KALBFLEISCH, T.; VIJAYADAMODAR, G.; YANG, M.; JOHNSTON, M.; FIELDS, S.; ROTHBERG, J. M. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Sccharomyses cerevisiae. **Nature**, v. 403, n. 6770, p. 623-627.

WASHBURN, M. P.; ULASZEK, R. R.; YATES, J. R.; 3rd. Reproducibility of quantitative proteomics analyses of complex biological mixtures by multidimensional protein identification technology. **Anal Chem**, v. 75, n. 19, p. 5054-5061, 2003.

WESTERMEIER, R; NAVEN, T. **Proteomics in Practice**: A laboratory Manual of proteome analysis, Germany, Weinheim: Wiley-VCH Verlag-GmbH., 2002, p. 329.

WILKINS, M. R.; GASTEIGER, E.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. Protein Identification with N and C-terminal Sequence Tags in Proteome Projects. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, p. 599-608, 1998.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, E.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIANS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 61-65, 1996.

WILKINS, M. R.; WILLIANS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. **Proteome research**: new frontiers in functional genomics. Germany: Springer-Verlag, 1997. p 243.

WOLF, E. Embryo-maternal communication in bovine- strategies for deciphering a complex cross-talk. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 38, p. 276-289, 2003.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco**: A nova fronteira da medicina. Células-Tronco hematopoéticas. São Paulo: Atheneu, p. 49-65. 2006.

ZOHN, I. E.; LI, Y.; SKOLNIK, E. Y.; ANDERSON, K. V.; HAN, J.; NISWANDER, L. p38 and a p38-Interacting Protein are Critical for downregulation of E-Cadherin during Mouse gastrulation. **CELL**, v. 105, p. 957-969, 2006.