ALVARO CARLOS GALDOS RIVEROS

Avaliação dos perfis metabolômicos, proteômicos, vias de proliferação e morte celular do saco vitelino de embriões bovinos

São Paulo

2012

ALVARO CARLOS GALDOS RIVEROS

Avaliação dos perfis metabolômicos, proteômicos, vias de proliferação e morte celular do saco vitelino de embriões bovinos

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

Co-orientador:
Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

SÃO PAULO

2012

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
13/11/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2683
FMVZ

Galdos-Riveros, Alvaro Carlos
Avaliação dos perfis metabolômicos, proteômicos, vias de proliferação e morte celular do saco vitelino de embriões bovinos / Alvaro Carlos Galdos Riveros. -- 2012.
165 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

Co-orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria.

1. Apoptose. 2. Rotas metabólicas. 3. Proteínas. 4. Metabólitos. I. Título.

ERRATA

GALDOS RIVEROS, A. C. **Avaliação dos perfis metabolômicos, proteômicos, vias de proliferação e morte celular do saco vitelino de embriões bovinos.** 2011. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	1º	165 f.	161 f.
Resumo	1º	165 f.	161 f.
Abstract	1º	metabôlomicos	metabolômicos
Abstract	1º	165 f.	161 f.
Resumen	1º	metabôlomicos	Metabolómicos
Resumen	1º	165 f.	161 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos perfis metabolômicos, proteômicos, vias de proliferação e morte celular do saco vitelino de embriões bovinos", protocolado sob o nº 2784/2012, utilizando 100 (cem) bovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/2012.

We certify that the Research "Evaluation of metabolomic and proteomic profiles, proliferation and cell death pathways of the yolk sac in bovine embryos", protocol number 2784/2012, utilizing 100 (one hundred) bovine, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/2012.

São Paulo, 18 de outubro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

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

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GALDOS-RIVEROS, Alvaro Carlos

Título: Avaliação dos perfis metabolômicos, proteômicos, vias de proliferação e vias de morte celular do saco vitelino de embriões bovinos

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ___/ ___/ ___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

"Posso ter mil problemas, e mil motivos para desistir.

Mas tenho uma única razão que me faz continuar: DEUS"

Abençoado sejas Pai Santo

AGRADECIMENTOS

Peço desculpas pela minha ausência em qualquer momento:

Aos meus queridos e amados pais, ***Leônidas e Hilda*** por te me mostrado que com fé e trabalho podemos superar qualquer adversidade. Amo vocês!!!

A minha avó ***Josefina "Mamá Chepita"*** *(in memorian)* pelo amor que deu a sua família, aos filhos e filhas, netos e netas, bisnetos e bisnetas...Deus te abençoe!!!

A minha irmã ***Silvana e Martin*** por me ajudar quando precisei, e meus sobrinhos ***Marquito e Fábia***, embora não compartilhe tempo com vocês, saibam que estão no meu coração.

A minha ***Tia Ysabel e Tio Fredy***, por terem me ajudado com o exemplo de vocês desde quando era pequeno.

A toda minha família que não mencionei, agradeço a vocês por existirem.

A minha querida e amada ***Lorennita***, agradeço ao nosso Deus por juntar nossos caminhos, pelas alegrias e sorrisos.

Ao ***Sr Helio e Sra Valdira***, profunda gratidão a vocês por me ajudar nos momentos que mais precisei, alem de conhecer duas pessoas agradáveis e bondosas que são o reflexo da *Lorenna*.

A ***Jordana*** *e ao* ***Bruno***, só posso falar que são como meus irmãos e os respeito bastante. Agradeço pela ajuda.

À ***profa Dra. Maria Angélica Miglino***, que me recebeu e me deu uma oportunidade para começar a formar meu pensamento científico-acadêmico. Cara profa Angélica saiba que aprendi o que me foi transmitido.

Ao ***prof. Dr.Durvanei Augusto Maria,*** por me receber no seu laboratório. Caro profe Durvanei agradeço de coração pela formação que me passou e saiba que saberei passar o que me foi passado.

Ao ***prof Dr Alvicler Magalhães*** por ter-me recebido no seu laboratório e me ajudado a desenvolver parte do doutorado. Ao ***prof. Dr Homero*** por me ajudar com as análises dos metabólitos.

Ao meus grandes amigos de sempre: ***Hugo, Artur*** e ***Bruno*** por estarem presentes nos verdadeiros momentos que precisei, pelos momentos de irmandade que passamos.

As minhas hermanitas ***Miryam*** e ***Alicia***, que mesmo longe um do outro mantemos uma forte amizade, que o tempo não apagará. Eu aprendi muito com vocês, obrigado por estar sempre perto para me aconselhar. Abraços para vocês.

Aos colegas do Instituto Butantan, Miryam, Camila, Amanda, Janaina, Manuela, Thais, Ana Rita, Kleber, Rose, Fernanda e Thiago.

Aos colegas da pós-graduação Juliana Santos, Greyson, Phelipe, Catarina, André, Marcio, Sonia, Dayane, Erica, Bruno e Horacio.

Aos funcionários Maicon, Jackie e Rose por me ajudarem sempre que precisei.

Ao Ronaldo, Rose e Maria Amélia pela ajuda sempre que precisei.

Ao ***Frigorifico Vale do Cedro*** – Goiás, em especial ao Sr ,Sr Divino, MV. Leandro e a todos os funcionários pela ajuda e companheirismo.

Ao **Frigorifico Frigonossa** pela ajuda durante meu doutorado.

Ao povo Brasileiro e Peruano, que lutam pelos seus sonhos com valor e coragem.

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**).

Los pueblos son grandes, no por el tamaño de su territorio, ni por el número de sus habitantes. Ellos son grandes, cuando sus hombres tienen conciencia cívica y fuerza moral suficiente, que los haga dignos de civilización y cultura

Victor Hugo

RESUMO

GALDOS-RIVEROS, A. C. **Avaliação dos perfis metabolômicos, proteômicos, vias de proliferação e morte celular do saco vitelino de embriões bovinos**. [Evaluation of metabolomic, proteomic profiles, proliferation and cell death pathways of the yolk sac in bovine embryos]. 2012. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O saco vitelino esta presente em todas as espécies de vertebrados e desempenha importantes funções no desenvolvimento do embrião até a fase de placentação. O objetivo deste estudo foi avaliar o funcionamento do saco vitelino de embriões bovinos atentando para os aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares e suas relações ultraestruturais, bioquímicas e moleculares. Foram avaliados 69 amostras de SVEB distribuídos da seguinte forma: Grupo I (23-27), Grupo II (28-32), Grupo III (33-37), Grupo IV (38-42), Grupo V (43-47) e Grupo VI (48-52) dais de gestação. Os resultados inferem que o saco vitelino de embriões bovinos apresenta atividade proliferativa durante os primeiros dois grupos analisados, a presença de apoptose e necrose foram encontrados nos grupos restantes. A presença de importantes metabolitos como a alanina, mio-inositol, taurina, colina, glicerofosfocolina, cadaverina, glutamato, glutamina, lactato, hidrouracila, creatina, creatinina, aspartato e lisina; e proteínas como filamentos de actina ou tubulina do citoesqueleto, histona, sub unidades da hemoglobina, HSP-β1, proteína ribossomal, marcadores da matrix extracelular vimentina, alfafetoproteina e transferrina. Estas proteínas estão relacionadas diretamente com a formação de metabólitos secundários e foram encontradas durante todos os períodos estudados, com exceção da alanina que foi identificada somente no grupo I, ativando diversas proteínas e metabolitos, que estão envolvidos em vias de sinalização que promovem a ativação dos mecanismos de morte celular programada e na diferenciação celular, as quais iniciam as etapas da involução do saco vitelino e de outras estruturas no embrião, e assim dar inicio à placentação.

Palavras-chave: Apoptose. Rotas metabólicas. Proteínas. Metabólitos

ABSTRACT

GALDOS-RIVEROS, A. C. **Evaluation of metabolomic, proteomic profiles, proliferation and cell death pathways of the yolk sac in bovine embryos**. [Avaliação dos perfis metabôlomicos, proteômicos, vias de proliferação e morte celular do saco vitelino de embriões bovinos]. 2012. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The yolk sac is present in all vertebrate species, and plays important roles in the developing embryo until the arrival of the placenta. The objective of this study was to evaluate the functioning of the yolk sac of bovine embryos and how the morphological, biochemical and molecular related, one ultrastructural analysis, biochemical and molecular analysis was performed. For these purpose we evaluated 69 samples of YSBE distributed as follows: Group I (23-27), Group II (28-32), Group III (33-37), Group IV (38-42), Group V (43-47) and Group VI (48-52) days of pregnancy. The results infer that the yolk sac of bovine embryos has proliferative activity during the first two groups analyzed, the presence of apoptosis and necrosis were found in the remaining groups. The presence of major metabolites such as alanine, myo-inositol, taurine, choline, glicerofosfocolina, cadaverine, glutamate, glutamine, lactate, hydrouracile, creatine, creatinine, aspartate and lysine, proteins such as tubulin and actin cytoskeleton, histone, subunits of hemoglobin, HSP-β1, ribosomal protein, vimentin, markers of extracellular matrix, alpha-1-fetoprotein and transferrin. These proteins are related to the metabolites and were found throughout the study period, with the exception of alanine which was found in Group I, activating many proteins and metabolites that are involved in signaling pathways that trigger cell death mechanisms that originated the involution of the yolk sac, and thus give way to the beginning of placentation.

Key words: Apoptosis. Metabolic routes. Proteins. Metabolites

RESUMEN

GALDOS-RIVEROS, A. C. **Evaluación de los perfiles metabólomicos, proteômicos, vías de proliferación y muerte celular del saco vitelino en embriones bovinos**. [Avaliação dos perfis metabôlomicos, proteômicos, vias de proliferação e morte celular do saco vitelino de embriões bovinos]. 2012. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

El saco vitelino es una membrana presente en todas las especies de vertebrados y cumple diversas funciones importantes para el desarrollo y sobrevivencia del embrión hasta la aparición de la placenta que tomara su lugar hasta el fin de la gestación. El propósito de este estudio fue evaluar el aspecto funcional del saco vitelino de embriones bovinos, además de cómo los aspectos morfológicos, bioquímicos y moleculares se relacionan. Un análisis ultraestructural, bioquímico y molecular fue aplicado para este trabajo. Para este trabajo se utilizaron 69 muestras de SVEB distribuidos en grupos organizados de esta manera: Grupo I (23-27), Grupo II (28-32), Grupo III (33-37), Grupo IV (38-42), Grupo V (43-47) e Grupo VI (48-52) dais de gestación. Los resultados infieren que el saco vitelino de embriones bovinos presenta alta actividad proliferativa en los primeros grupos estudiados con edad gestacional temprana, la apoptosis e muerte celular estuvo presente durante todas las edades estudiadas, presentando una relación creciente de acuerdo con la edad, esto quiere decir que a mas edad gestacional mayor es la necrose y por consiguiente menor o casi nula es la actividad de proliferación. La presencia de metabolitos como la alanina, mio-inositol, taurina, colina, glicerofosfocolina, cadaverina, glutamato, glutamina, lactato, hidrouracila, creatina, creatinina, aspartato y lisina, sugieren que el saco vitelino está envuelto en las principales vías metabolicas y que son controladas por proteínas como filamentos de actina o tubulina del citoesqueleto, histona, sub unidades de hemoglobina, HSP-β1, proteína ribossomal, marcadores de matrix extracelular vimentina, alfafetoproteina e transferrina. Tanto las proteínas como los metabolitos participan en conjunto para la sobreviviencia del embrión en una fase en la cual esta sujeta a perdidas embrionárias, además brinda soporte para el inicio de la placentación.

Palabras clave: Apoptosis. Vias metabólicas. Proteínas. Metabólitos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estatística descritiva da variável IDADE. São Paulo, 2012. 46
Tabela 2 - Estatística descritiva da variável IATF, São Paulo, 2012. 46
Tabela 3 - Regressão linear simples. São Paulo, 2012. 47
Tabela 4 - Amostras de SVEB com Crown-Rump, idades gestacionais obtidas pela formula IDADE = (CR+22.61283)/ 1.13786. São Paulo, 2012. 48
Tabela 5 - Parâmetros do espectrômetro Bruker Advance III® para a aquisição de uma sequência 1D ZGF2PR (dupla supressão de sinal) para obter espectros de ^{1}H das amostras do SVEB sem raça definida. São Paulo, 2012..... 59
Tabela 6 - Parâmetros do espectrômetro Bruker Advance III® para a aquisição de uma sequência 1D CPMG (t2*) para obter espectros de ^{1}H das amostras de SVEB sem raça definida. São Paulo, 2012 60
Tabela 7 - Divisão dos grupos experimentais e número de amostras do SVEB, de acordo com as idades gestacionais estimadas (IG) por Crown-Rump (CR). São Paulo, 2012..... 63
Tabela 8 - Atribuições dos deslocamentos químicos para os metabólitos identificados nos espectros de 1H RMN das amostras do saco vitelino de embriões bovinos. São Paulo, 2012. 79
Tabela 9 – Lista de proteínas expressas no saco vitelino de embriões bovinos. São Paulo, 2012. ..... (Continua) 83
Tabela 10 - Expressão do marcador PCNA (Antígeno nuclear de proliferação celular) nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012. 91
Tabela 11 - Expressão do marcador Caspase 3 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012 93
Tabela 12 - Expressão do marcador Bcl-2 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012. 94
Tabela 13 - Expressão do marcador BAX nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012. 95
Tabela 14 - Expressão do marcador Bad nos diferentes períodos de gestação em células do saco vitelino de embriões bovino representando a Média±DP de cada grupo analisado, São Paulo, 2012. 96
Tabela 15 - Expressão do marcador HSP47 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012. 99
Tabela 16 - Expressão do marcador VEGF-R1 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012. 100
Tabela 17 - Expressão do marcador Citocromo-c nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012. 101
Tabela 18 - Expressão do marcador r-TNF nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012. 102

Tabela 19 - Expressão do marcador Stro-1 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012. 104
Tabela 20 - Expressão do marcador CD90 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado, São Paulo 2012. 105
Tabela 21 - Expressão do marcador NANOG nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012. 106
Tabela 22 - Expressão do marcador Oct-3/4 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012. 107
Tabela 23 - Expressão do marcador CD133 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012. 108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Saco vitelino (SV) de embrião bovino com alças alongadas (⇨) 23

Figura 2 - Diagrama esquemático de um espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN)..... 30

Figura 3 - Diagrama esquemático das partes essenciais de um espectrômetro de massas 31

Figura 4 – Fundamento da citometria de fluxo..... 34

Figura 5 - Ciclo celular em mamíferos. Observamos o ciclo celular composta pela Interfase, na qual encontramos as fases G_0, G_1, S e G_2. A fase M é composta pela Prófase, Metáfase, Anáfase e a Telófase..... 36

Figura 6 - Diagrama para ilustrar as características morfológicas da apoptose 41

Figura 7 - Fotografias de embriões bovinos apresentando o saco vitelino e membranas extraembrionárias em diferentes idades gestacionais. São Paulo, 2012..... 65

Figura 8 - Ilustração do SVEB de 26 dias de gestação. Apresentamos as camadas: (End) Endodermal, (Mes) mesenquimal e (Mst) mesotelial. (A) âmnio, (C) corio67

Figura 9 - Fotomicrografia (A) e eletromicrografias de varredura (B e C) e transmissão (D) do SVEB do grupo I (23 a 27 dias de gestação). São Paulo, 2012 68

Figura 10 - Fotomicrografias (A e B) e eletromicrografias de varredura (C, D, E e F) e transmissão (G e H) do saco vitelino de embriões bovinos do grupo II (28 a 32 dias de gestação). São Paulo, 2012..... 69

Figura 11 - Fotomicrografias (A e C) e eletromicrografias de varredura (D) e transmissão (B e E) do saco vitelino de embriões bovinos do grupo IV (38 a 42 dias de gestação). São Paulo, 2012..... 70

Figura 12 - Fotomicrografia (A) e eletromicrografias de transmissão (B, C, D e E) do saco vitelino de embriões bovinos do grupo V (43 a 47 dias de gestação). São Paulo, 2012 71

Figura 13 - Eletromicrografias de varredura (A) e transmissão (B, C, D, E e F) do saco vitelino de embriões bovinos do grupo VI (48 a 52 dias de gestação). São Paulo, 2012 72

Figura 14 - Figura do metaboloma do saco vitelino: Em A, podemos observar Espectro 2D RMN identificando 2 metabólitos principais que foram encontrados no espectro 1D RMN em B. Estes são a glicerofosfocolina mais a colina(GFC+Col) nas amostras de SVEB de 25 dias de gestação..... 74

Figura 16 - Espectro de 1H RMN (Intensidade x deslocamento químico em ppm) para uma amostra de SVEB com 26° dia de gestação 75

Figura 17 - Espectro de 1H RMN (Intensidade x deslocamento químico em ppm) para uma amostra de SVEB com 35° dia de gestação 76

Figura 18- Espectro de 1H RMN (Intensidade x deslocamento químico em ppm) para uma amostra de SVEB com 38° dia de gestação 77

Figura 19 - Espectro de 1H RMN (Intensidade x deslocamento químico em ppm) para uma amostra de SVEB com 41° dia de gestação 78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico do tipo Box-plot de IATF (mm) e idade gestacional (dias) 46

Gráfico 2 - Gráfico de dispersão de IATF versus Idade gestacional (em dias)..... 47

Gráfico 3 – Gráfico das concentrações em ppm dos metabólitos encontrados no SVEB nas diferentes idades gestacionais 81

Gráfico 4 – Gráfico *dotplot* obtidos das amostras de SVEB por citometria de fluxo 89

Gráfico 5 - **Gráfico de barras das médias** ± DP da porcentagem de célula **do** SVEB **dos diferentes estágios gestacionais nas fases do ciclo celular obtidos por citometria de fluxo.**..... 90

Gráfico 6 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador PCNA nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB. 91

Gráfico 7 - (A) gráfico do tipo histograma adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software Wizard. (B) gráfico de barras representando a média ± DP do índice proliferativo nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB..... 92

Gráfico 8 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador caspase 3 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB..... 93

Gráfico 9 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador Bcl-2 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB. 94

Gráfico 10 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador Bax nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB..... 95

Gráfico 11 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador Bad nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB..... 96

Gráfico 12 – (A) gráfico do tipo histograma adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do potencial elétrico mitocondrial nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB. 97

Gráfico 13 - Regressão linear do potencial elétrico mitocondrial obtido por citometria de fluxo das células do saco vitelino de embriões bovinos nos diferentes grupos de gestação analisados. 98

Gráfico 14 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador HSP47 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB. 99

Gráfico 15 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do receptor de VEGF nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB. 100

Gráfico 16 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador citocromo-c nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB. 101

Gráfico 17 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do receptor de TNF nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB. 102

Gráfico 18 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador Stro-1 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB. 104

Gráfico 19 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador CD90 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB. 105

Gráfico 20 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador NANOG nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB. 106

Gráfico 21 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador Oct-3/4 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB. 107

Gráfico 22 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador CD133 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB. 108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TFA	ácido trifluoroacético do inglês: *trifluoroacetic acid*
mRNA	RNA mensageiro
MudPIT	Tecnologia de identificação de proteínas multidimensional
FIV	Fecundação *In Vitro*
NANOG	Determinante de células-tronco embrionárias e germinativas são fatores de transcrição envolvidos na regulação da supressão de genes que levam a diferenciação e manutenção da pluripotência
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
FACS	Fluorescence Activated Cells Sorter
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
ANOVA	Analise de variância
DMSO	Dimetilsulfoxido
DTT	1,4-Ditiotreitol
NCBI	do inglês *National Center for Biotechnology Information*
BLAST	do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*
KEGG	do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
HRMAS	do inglês High Resolution Magic Angle Spining
HSP 47	Do inglês Heat Shock Protein 47
PCNA	do inglês Proliferation Cell Nuclear Antigen
Stro-1	do inglês, *stroma cell surface antigen 1*
PI	Iodeto de propideo
Oct-3/4	fator de transcrição de células-tronco embrionárias e germinativas pluripotentes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

2 OBJETIVOS 20

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 20

3 REVISÃO DE LITERATURA 21

3.1 SACO VITELINO 21

3.1.1 Formação do saco vitelino 23

3.1.2 Aspectos macroscópicos do saco vitelino em diferentes espécies 24

3.1.3 Funções do saco vitelino 26

3.2 METABOLOMA 27

3.3 PROTEOMA 30

3.4 FASES DO CICLO CELULAR E MORTE CELULAR 32

3.5 CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS 42

4 MATERIAL E MÉTODO 44

4.1 AMOSTRA 44

4.2 DETERMINAÇÃO DO PERÍODO GESTACIONAL 44

4.3 TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE LUZ 50

4.4 TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA 50

4.5 TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO 51

4.6 CITOMETRIA DE FLUXO 52

4.6.1 Fases do ciclo celular 52

4.6.2 Expressão de marcadores de vias de morte celular 53

4.6.3 Análise do potencial elétrico de membrana mitocondrial 53

4.6.5 Expressão de marcadores de maturação, diferenciação de células-tronco 55

4.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS: NANOUPLC TANDEM NANOESI-MS^E 56

4.7.1 Preparo das amostras 56

4.7.2 NanoUPLC tandem nanoESI-MS^E 57

4.8 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{1}H RMN 58

4.8.1 Protocolo de aquisição dos espectros 59

4.9 QUIMIOLUMINESCENCIA 62

4.9.1 Detecção das concentrações da alfafetoproteina (AFP) e do antígeno carcino-embrionário (CEA) 62

5 RESULTADOS 63

5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SVEB 63

5.3 ANÁLISE DO PERFIL PROTEÔMICO DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS 82

5.4 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR E MORTE CELULAR DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS 89

5.5 DETERMINAÇAO BIOQUÍMICA DO SACO VITELINO 109

6 DISCUSSÃO 111

6.1 MORFOLOGIA DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS 112

6.2 PERFÍL METABOLÔMICO DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS 116

6.3 PERFÍL PROTÉICO DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS 126

6.4 CICLO CELULAR E MORTE CELULAR DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS 129

6.5 MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR 136

7 CONCLUSÕES 138

1 INTRODUÇÃO

A fase da vida mais importante da ontogenia animal é a fase gestacional. Os acontecimentos intra-uterinos que tem lugar durante as fases embrionária e fetal, tanto em animais quanto no homem, são de tal importância que podem determinar a vida dos mesmos. Em particular, nos primeiros dias logo após a fecundação e formação do embrião, a sobrevivência depende da orquestração do desenvolvimento da comunicação materno-fetal e em especial da atuação do saco vitelino no suporte nutricional, hematopoiético no desenvolvimento do embrião.

Durante a evolução dos vertebrados variados genes tem evoluído para desenvolver funções de carregadores de nutrientes sistêmicos O desenvolvimento embrionário é complexo e influenciado por diversos fatores, sendo na sua totalidade dependente de um balanço adequado entre a proliferação (ciclo celular), diferenciação e morte celular (NURSE, 2000).

A apoptose ou morte celular programada é um processo fisiológico caracterizado por mudanças morfológicas e bioquímicas (DÜNDAR et al., 2005). O saco vitelino (SV) é uma membrana única encarregada da nutrição e manutenção precoce do embrião e único anexo embrionário presente em todas as espécies, responsável pela produção, transporte e síntese de proteínas e metabolitos necessários para o desenvolvimento embrionário (MEDVINSKY et al., 1993; WOLF et al., 2003).

O SV é uma membrana que sintetiza proteínas (USAMI; MITSUNAGA; NAKAZAWA, 2007; GALDOS-RIVEROS et al., 2010b), que interagem diretamente com outras macromoléculas conhecidas como metabólitos (HALL, 2006). Elas atuam como substratos, inibidores ou ativadores alostéricos de enzimas. Participam como precursores de moléculas importantes nas inúmeras rotas metabólicas celulares (DEMAIN; VAISHNAV; ENGEL; JENSEN; FENICAL, 2002).

O metaboloma consiste na avaliação da resposta metabólica dinâmica em sistemas vivos a estímulos patofisiológicos, à toxicidade de drogas ou à

modificação genética. As plataformas analíticas utilizadas para determinar estas alterações nos níveis de metabólitos são baseadas em técnicas de espectrometria de massas ou de espectroscopia por ressonância magnética nuclear 1H RMN (DUNN; ELLIS, 2005; LENZ; WILSON, 2006; NICHOLSON; LINDON, 2008). O metaboloma é usado para se referir ao conjunto de todos os metabólitos que são produzidos e/ou modificados por um organismo (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).

Outras biomoléculas de igual importância são as proteínas, sendo o estudo delas conhecido como proteômica (GALDOS-RIVEROS et al., 2010c). Existem evidências consideráveis de que o papel funcional de uma determinada proteína pode ser fortemente dependente do tipo de célula que ela é expressa e o estado dessa célula (GODOVAC-ZIMMERMANN; BROWN, 2001). As proteínas controlam a maioria dos processos celulares, os quais ocorrem em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, fatores de crescimento, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (DE SOUSA; FONTES; RICART, 1999; AEBERSOLD; MANN, 2003).

O propósito deste estudo é o de estabelecer a compreensão funcional de como o saco vitelino de embrião bovino (SVEB) fornece importantes funções no desenvolvimento do embrião, avaliando os seus potenciais metabólico e proteico. Estes serão analisados valendo-se de técnicas morfológicas, quanto bioquímicas e moleculares durante a fase gestacional de maior susceptibilidade às perdas embrionárias.

2 OBJETIVOS

Avaliar o potencial morfofuncional, metabólico, proteômico, bioquímico e molecular do saco vitelino de embriões bovinos em diferentes idades gestacionais.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as relações morfofuncionais do saco vitelino de embriões bovinos nas diferentes idades gestacionais;
- Avaliar o perfil proteômico do saco vitelino de embriões bovinos;
- Avaliar o perfil metabolômico do saco vitelino de embriões bovinos;
- Avaliar as vias de proliferação e vias de morte celular do saco vitelino de embriões bovinos;

3 REVISÃO DE LITERATURA

Primeiramente abordaremos a formação do SV, descrevendo a morfologia macro e microscópica em diferentes espécies, além das funções do saco vitelino e estudo metabolômicos e proteômicos desta membrana. Também abordaremos as fases do ciclo celular e morte celular:

3.1 SACO VITELINO

Os questionamentos sobre a origem da vida intrigam o mundo científico e deixam muitas perguntas, cuja maioria das respostas encontra-se a nível intra-uterino, durante o período gestacional. No entanto, é necessário entender que, para que o desenvolvimento de um novo indivíduo surgisse, seria necessário uma flutuabilidade que permitisse maior liberdade de movimentos do concepto, além de condições térmicas, químicas e osmóticas relativamente constantes e adequadas de acordo com as interações materno-fetais de muitas espécies. Para que isso ocorresse, os vertebrados vivíparos desenvolveram membranas extra-embrionárias que pudessem propiciar tais condições ao longo da evolução (BJÖRKMAN, 1982).

O embrião vivíparo possui então quatro membranas constituintes da placenta: o córion, o âmnio, o alantóide e o saco vitelino. O córion desenvolve-se primeiro de uma simples camada de epitélio trofoblástico, que é avascular. O âmnio consiste de revestimento interno de ectoderma sobre uma membrana avascular de tecido conjuntivo, formando um saco repleto de líquido ao redor do concepto. Já o saco vitelino e o alantóide são endodérmicos e vascularizados (BJORKMAN; DANTER; LEISER, 1989).

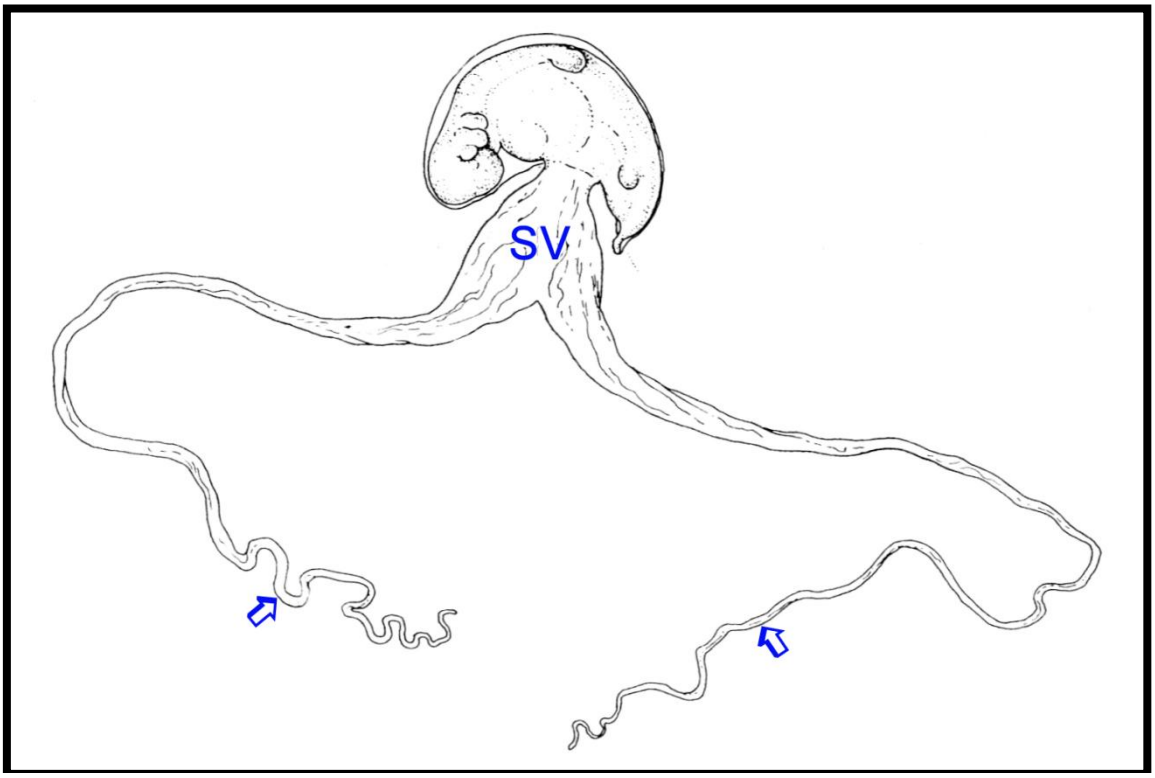
Em todos os eutérios, o período gestacional divide-se em duas fases: a embrionária e a fetal. O estágio mais crítico para a sobrevivência do concepto

ocorre na fase embrionária, que depende de uma forte e harmoniosa inter-relação entre o embrião e o SV.

O papel dominante do SV, tanto no desenvolvimento como na evolução das membranas fetais dos vertebrados é a razão principal do seu uso como o maior indicador das relações filogenéticas entre os eutérios (MOSSMAN, 1987). Atualmente, não se tem dúvida de que o SV desempenha um papel fundamental durante a fase inicial da gestação (NOGALES; BELTRAN; GONZALEZ, 1993), com função trófica para a sobrevivência do embrião (FUKUDA, 1973), sendo um grave erro propor que esta estrutura seja apenas um órgão vestigial e sem importância funcional. Além disso, alterações na morfogênese do SV repercutem diretamente no desenvolvimento normal das funções vitais do embrião.

Em muitas espécies de mamíferos, o SV produz e transporta proteínas necessárias para desenvolvimento do embrião (WOLF et al., 2003; USAMI; MITSUNAGA; NAKAZAWA, 2007; GALDOS-RIVEROS et al., 2010b) e participa no intercâmbio de metabólitos (DOCHERTY et al., 1996), podendo ser um excelente modelo para estudo de toxicidade (USAMI; MITSUNAGA; NAKAZAWA, 2007). Sua função nos mamíferos é complexa, participando da hematopoese (BLOOM; BARTELMEZ, 1940; HESSELDAHL; LARSEN, 1969; HOYES, 1969; FUKUDA, 1973; BJORKMAN; DANTER; LEISER, 1989; KATAYAMA; KAYANO, 1999) e transferência de material materno, tais como vitaminas (DEREN; PADYKULA; WILSON, 1966a; PADYKULA; DEREN; WILSON, 1966), aminoácidos (DEREN; PADYKULA; WILSON, 1966b; BUTT; WILSON, 1968; LLOYD. et al., 1976; LLOYD, JOHN B.; BECKMAN; BRENT, 1998) e imunoglobulinas (BRAMBELL; ROGERS, 1958), produzindo ainda as células germinativas, que constituirão as células precursoras dos gametas: espermatozóides e oócito (WITCHI, 1948; BJORKMAN; DANTER; LEISER, 1989; WROBEL; SÜB 1998; PEREDA; MONGE; NIIMI, 2010) (Figura 1).

Figura 1 - Saco vitelino (SV) de embrião bovino com alças alongadas (⇨)



Fonte: Rüsse et al. (1992).

3.1.1 **Formação do saco vitelino**

A maioria das espécies animais apresentam particularidades específicas durante o desenvolvimento embrionário. Porém, todas desenvolvem uma seqüência básica bastante semelhante: segmentação ou clivagem, gastrulação, neurulação e organogênese (NODEN; LAHUNTA, 1990). O SV e a cavidade amniótica tornam possíveis os movimentos morfogenéticos das células do disco embrionário (SADLER, 2005).

Em humanos, por volta do sétimo dia de desenvolvimento embrionário, a massa celular interna do blastocisto se organiza em duas camadas celulares. O embrião passa então a ser constituído de um disco bilaminar formado por epiblasto e hipoblasto. Paralelamente, o trofoblasto também se diferencia em duas camadas. A mais externa e que está em contato direto com a mucosa

uterina, chamada de sinciciotrofoblasto e uma camada interna denominada citotrofoblasto (JUNQUEIRA; ZAGO, 1982).

Entre o citotrofoblasto e o epiblasto aparecem pequenos espaços que confluem, formando uma cavidade única, a cavidade amniótica. No nono dia de gestação em humanos, a partir da face interna do citotrofoblasto, células achatadas oriundas do hipoblasto se dispõem de modo a constituir a membrana de Heuser, bastante delgada. A cavidade do blastocisto, que agora não mantém contato com o citotrofoblasto porque está forrada pela membrana de Heuser, é conhecida como saco vitelino primitivo ou cavidade exocelômica (JUNQUEIRA; ZAGO, 1982; SADLER, 2005).

Ao longo de toda a superfície interna do citotrofoblasto destacam-se células que constituirão o mesoderma extra-embrionário, revestindo inteiramente o âmnio e o saco vitelino primitivo (JUNQUEIRA; ZAGO, 1982).

Por volta do 12° dia de idade do blastocisto humano, as células endodérmicas começam a revestir internamente a membrana de Heuser, formando uma nova cavidade, denominado saco vitelino secundário ou definitivo (JUNQUEIRA; ZAGO, 1982; MOORE; PERSAUD, 2004; SADLER, 2005). Este novo saco é menor, localiza-se entre o âmnio e o córion na cavidade celômica extraembrionária, e permanece unido ao embrião pelo pedículo vitelino no nível da alça intestinal média (PEREDA; CORRER; MOTTA, 1994; PEREDA; MOTTA, 1999).

3.1.2 **Aspectos macroscópicos do saco vitelino em diferentes espécies**

Nos ruminantes o SV é grande, vascular e completamente cercado pela cavidade extraembriônica. Ele solta-se do córion pelo 20° dia de gestação e reduz-se a uma estrutura sólida como um cordão, ao redor dos 25º dia (LATSHAW, 1987).

Assis-Neto et al. (2010) descreveram que em embriões bovinos o SV se desenvolve até o dia 30º de gestação, e torna-se macroscopicamente visível até o dia 50º de gestação.

Em humanos, o SV surge na sexta semana gestacional como uma estrutura esférica e cística, sendo coberto por numerosos vasos superficiais pequenos, os quais se fundem na base do ducto vitelino ligando o saco vitelino à parte ventral do embrião, diretamente ao intestino médio e à principal circulação sanguínea (GONZALEZ-CRUSSI; ROTH, 1976; JONES; JAUNIAUX, 1995).

Em animais domésticos, o SV inicia sua regressão por volta da segunda ou terceira semana gestacional, à medida que o alantóide se expande para se fusionar com o córion (HAFEZ; HAFEZ, 2004; MIGLINO et al., 2006). Na maioria das espécies mamíferas, o saco vitelino é, portanto ativo apenas durante o período embrionário e involui no período fetal.

É descrito ainda, que a involução do SV nos ruminantes começa perifericamente nos extremos e avança centripetamente (RÜSSE et al., 1992), sendo que a partir da segunda semana gestacional, seus vestígios não são mais encontrados (BARONE, 1976). Entretanto, a função SV é estendida na placenta esférica da égua, enquanto o alantóide se expande gradualmente para substituí-lo no 30° dia de gestação (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Na maioria dos roedores o SV sofre um processo de inversão junto à placenta principal, formando a placenta vitelínica. O SV da paca (*Agouti paca*) e da cutia (*Dasyprocta aguti*) é invertido e vascularizado (CONCEIÇÃO et al., 2008). Nos primatas, especificamente na *Macaca mullata*, o SV degenera rapidamente e possivelmente não chega a ser funcional (NODEN; LAHUNTA, 1990).

Morfologicamente a parede do SV está constituída por três camadas sobrepostas: um epitélio de revestimento endodérmico interno, um epitélio de revestimento externo que corresponde ao mesotélio em contato direto com o exoceloma e um tecido mesenquimal entre ambas as superfícies, que contém vasos sanguíneos, tecido hematopoético e macrófagos (PEREDA; CERISOLA; POZO, 1987; PEREDA; MOTTA, 1999; PEREDA, 2001).

3.1.3 **Funções do saco vitelino**

O SV é essencial para o desenvolvimento embrionário, pois em fases iniciais ele é responsável pelo armazenamento e transferência do vitelo. O vitelo é um líquido armazenado pelo SV para suprir as necessidades nutricionais do embrião até que o cordão umbilical ou a placenta verdadeira estejam estabelecidos.

No entanto, as células endodérmicas do SV não são seletivas para absorver macromoléculas do lúmen uterino, mas são seletivas no transporte destas para o feto (KING, 1982), como por exemplo, pela transferência de imunoglobulinas (BRAMBELL; ROGERS, 1958). Além do transporte seletivo de proteínas tem uma importante função no SV, a degradação de proteína pelo SV também oferece um importante papel na nutrição fetal (KING, 1982).

Tiedemann (1976) afirmou que o SV de gatos possui vasos sanguíneos fenestrados e apresentam membrana basal completa. Estas condições são favoráveis para a passagem de proteínas e de células sanguíneas.

Em muitas espécies, parece provável que uma ampla variedade de nutrientes possa ser transferida da mãe para o feto pelo SV visceral (KING, 1982). Nos roedores o SV é o principal órgão nutritivo do embrião antes da formação da placenta alantóica funcionante. No camundongo, o SV é desenvolvido e similar ao da ratazana, envolvendo completamente o âmnio através da maior parte da gestação (RENFREE; HENSLEIGH; MCLAREN, 1975). Em muitos roedores e lagomorfos, o SV é ativo na nutrição do embrião e do feto (KING, 1982), ou seja, nestas espécies o SV persiste também durante o período fetal.

Além da função de nutrição do embrião, o SV desempenha também outras importantes funções, como a formação das primeiras células sanguíneas, e seus precursores da hematopoese (TIEDEMANN, 1979; MOORE; PERSAUD, 2004).

Bloom; Bartelmez (1940) e Rüsse et al.(1992) descreveram que o SV é o primeiro órgão hematopoético do embrião, além de demonstrar uma importante atividade de macrofagocitose, biosíntese de proteínas e transporte de nutrientes para o embrião, até o fígado embrionário ter amadurecido

suficientemente para exercer estas funções (MOORE; METCALF, 1970; CLINE; MOORE, 1972; GITLIN, DAVID; PERRICELLI; GITLIN, 1972; ENDERS, ALLEN; WIMSATT; KING, 1976; TIEDEMANN, 1979; MINUTH; TIEDEMANN, 1980; TIEDEMANN, K.; MINUTH, 1980; SHI et al., 1985; MIGLIACCIO et al., 1986; PALIS; MCGRATH; KINGSLEY, 1995; BIELINSKA et al., 1996; YAMASHITA, 1996; PALIS, JAMES; YODER, 2001; BARON, 2003; MIGLINO, M. A., 2009; PEREDA; MONGE; NIIMI, 2010). Além disso, muitas das proteínas secretadas pelo endoderma do SV também estão expressas no fígado (MEEHAN et al., 1984; SOPRANO; SOPRANO; GOODMAN, 1986; THOMAS et al., 1990; LIU, K. H. et al., 1991).

Recentemente foi descrito, que os eritrócitos do SV de humano além de transportar o oxigênio e o dióxido de carbono, cumprem a função de nutrir o embrião durante a quinta semana de gestação através do ducto vitelino (PEREDA; MONGE; NIIMI, 2010).

De acordo com Brambell; Rogers (1958) o SV é responsável também pela imunidade passiva pré-natal, a qual ocorre no momento inicial da implantação em coelhos e porquinhos da índia e nas fases finais da gestação em ratos e camundongos. Gulbis et al. (1998) sugeriram que o SV seja uma importante zona de transferência entre as cavidades embrionária e extra-embrionária e pode ajudar a desenvolver protocolos de terapia gênica por meio de injeção de células na cavidade exocelômica.

3.2 METABOLOMA

A metabolômica tem como objetivo isolar e caracterizar todos os metabólitos de uma amostra biológica em condições normais e sob algum estresse (ROCHFORT, 2005; WECKWERTH; MORGENTHAL, 2005). Acredita-se que os organismos complexos ou pluricelulares, tais como nos vegetais e animais, produzam muito mais metabólitos do que genes, pois múltiplos mRNA são formados a partir de um único gene, múltiplas proteínas a partir de um único mRNA, e múltiplos metabólitos a partir de uma única enzima, porque

muitas enzimas aceitam mais de um substrato, apesar de sua alta seletividade (SCHWAB, 2003).

O metaboloma refere-se ao conjunto de todos os metabólitos que são produzidos e/ou modificados por um organismo (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006). Não há duvidas de que conhecer as proteínas de um organismo é importante, mas existe um universo de pequenas moléculas orgânicas que interagem diretamente com as proteínas e outras macromoléculas (HALL, 2006). Essas moléculas atuam como substratos, inibidores ou ativadores alostéricos de uma enzima. Podem ser precursores de alguma molécula importante nas inúmeras rotas metabólicas celulares, ou até mesmo um resíduo metabólico de alguma via de síntese e degradação de macromoléculas que por algum motivo é estocado e utilizado como defesa química contra algum patógeno (DEMAIN; VAISHNAV; ENGEL; JENSEN; FENICAL, 2002). Essas pequenas moléculas são conhecidas como metabólitos (DIXON, 2001).

Esses metabólitos são divididos em dois grandes grupos: os metabólitos primários e secundários. Os primários são aqueles que estão diretamente envolvidos nas rotas de síntese e degradação das macromoléculas em qualquer ser vivo (DIXON, 2001). Já os secundários são mais comuns em plantas e fungos (CHALLIS; HOPWOOD, 2003; HALL, 2006).

Eles atuam como componentes estruturais, defesas contra patógenos, atrativos para polinizadores e agentes nas interações interespecíficas, como a alelopatia (ENGEL; JENSEN; FENICAL, 2002; CHALLIS; HOPWOOD, 2003).

Segundo Challis; Hopwood (2003), o estudo desses metabólitos visando à obtenção de produtos efetivos contra diversas doenças e passíveis de comercialização já vem sendo feito desde o início do século XX. Entretanto, a ideia de analisar todo o conjunto de metabólitos em qualquer nível de complexidade (organismo, órgão, tecido, célula ou mesmo compartimentos celulares) só começou a ganhar destaque nos últimos anos.

A metabolômica tem sido empregada em varias áreas da ciência e para diversos fins. Na farmacêutica, sobretudo na parte de toxicologia e desenvolvimento de fármacos, a metabolômica está sendo empregada para se identificar marcadores biológicos de toxicidade ou doenças, no entendimento do mecanismo de ação de várias toxinas e na seleção de fármacos efetivos e seguros (ROBERTSON, 2005; WECKWERTH; MORGENTHAL, 2005). Na área

nutricional, a metabolômica pode ser aplicada para se conhecer os efeitos que os compostos não nutrientes que estão presentes no alimento causam no individuo, assim como entender os efeitos causados pela falta ou excesso de um determinado nutriente na manutenção da saúde ou no desenvolvimento de doenças (WATKINS et al., 2001; GERMAN; WATKINS; FAY, 2005; GIBNEY et al., 2005).

Na área ecológica, a metabolômica tem sido aplicada, sobretudo na detecção de alterações imprevistas em organismos geneticamente modificados (OGM), demonstrando que a inserção de apenas um gene pode alterar a concentração de centenas de metabólitos, assim como levar à produção de dezenas de compostos de importância farmacêutica (MUNGUR et al., 2005).

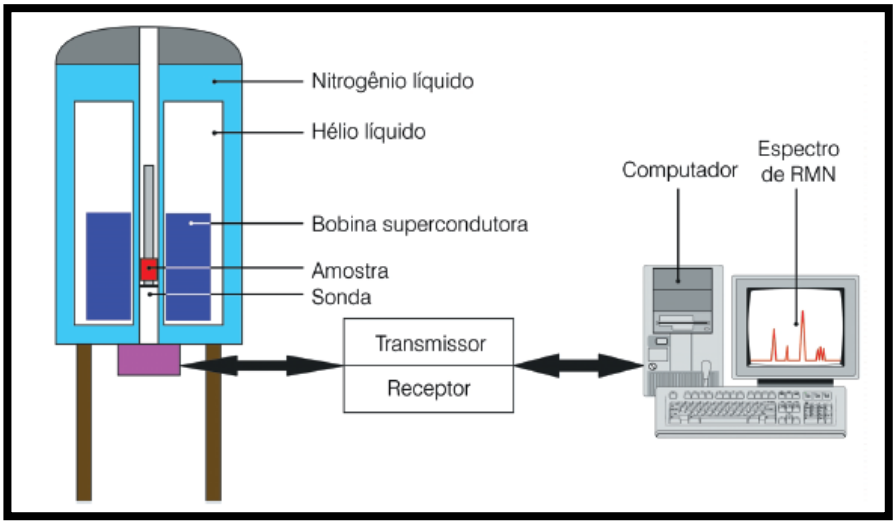
A metabolômica também pode ser aplicada nos estudos filogenéticos a partir do perfil metabólico das diferentes espécies dentro de um mesmo gênero (VIANT; ROSENBLUM; TJEERDEMA, 2003).

As informações obtidas pela metabolômica são de grande valia em qualquer das áreas já citadas. Entretanto, a integração dessas informações com as obtidas por outras plataformas tecnológicas (proteômica, transcriptômica e genômica) trará mais informações sobre a amostra analisada e um alto nível no avanço científico (BINNECK, 2004; ROCHFORT, 2005).

Contudo, é de senso comum que os resultados obtidos pela metabolômica facilitarão o entendimento de como o genótipo de um individuo está relacionado com o seu fenótipo (BINNECK, 2004; FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005).

O estudo de metabólitos é desenvolvido no espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN), a amostra é colocada dentro da sonda de RMN que fica no centro de uma bobina superconductora, resfriada por nitrogênio e hélio liquido. Um computador central comanda o equipamento, enviando, captando e processando os sinais de RMN (Figura 2).

Figura 2 - Diagrama esquemático de um espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN)



Fonte: Colnago; Almeida; Valente, (2002)

3.3 PROTEOMA

A proteômica surgiu no final de 1970 quando pesquisadores começaram a criar bases de dados de proteínas usando naquela época a moderna técnica de eletroforese bidimensional (O'FARRELL, P. H., 1975). A proteômica estuda o proteoma, este termo foi proposto por pelos pesquisadores Wilkins e Willians em 1994 (WILKINS et al., 1996). Após a euforia provocada pelo seqüenciamento do genoma de vários organismos, a comunidade científica percebeu que, para compreender a função gênica em toda sua plenitude, era necessário o estudo em larga escala das proteínas expressas. As razões que justificam tal magnitude são as variações na clivagem do RNA e as modificações pós-traducionais, que o torna muitas vezes maior que o genoma correspondente (WILKINS et al., 1996; GYGI et al., 1999).

A análise de proteomas era desenvolvida na união de duas técnicas biomoleculares: a eletroforese bidimensional (2DE) acoplada a espectrometria de massas (MS). A espectrometria de massa nos permite a análise de maior número de proteínas, facilitando a identificação das proteínas menos abundantes e que são frequentemente perdidas quando se utiliza os géis.

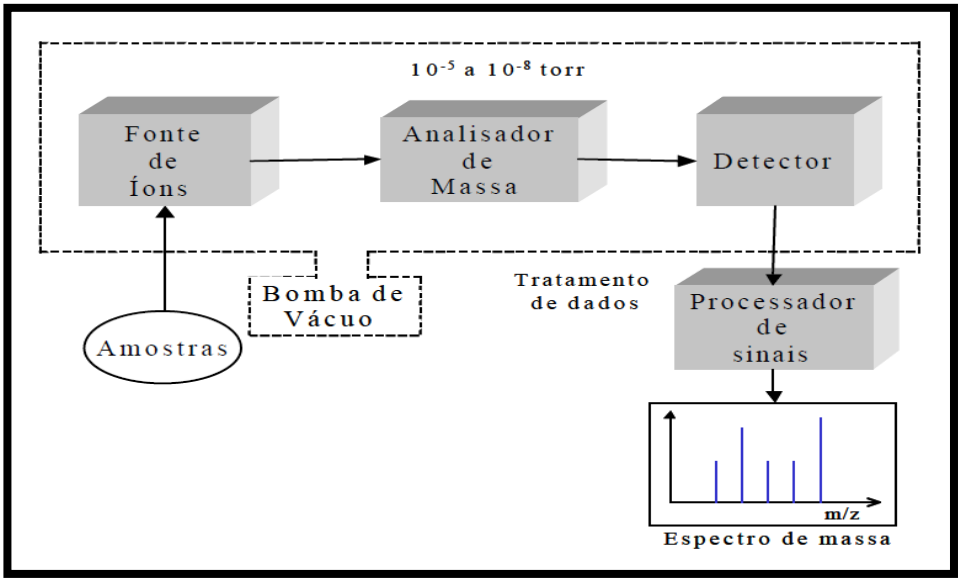
A espectrometria de massas estava destinada à identificação e análise de compostos orgânicos de baixa massa molecular, mas, com o

desenvolvimento de técnicas de ionização branda, sua aplicação à análise de moléculas grandes e polares, como peptídeos e proteínas, tornou-se possível e bem sucedida (LARSEN; ROEPSTORFF, 2000; HAGER, 2004).

A espectrometria de massas é uma ferramenta essencial para a análise de proteínas, devido não apenas a sua sensibilidade, mas, também, ao conjunto total de informações que pode ser obtido. Os espectrômetros de massas molar de um polipeptídeo quanto para a determinação da sequencia de aminoácidos, identificação de novos biomarcadores, interações proteína-proteína e caracterização de modificações pós-traducionais (AEBERSOLD; MANN, 2003; DOMON; AEBERSOLD, 2006).

A espectrometria de massas (MS) é uma tecnica que mede a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gaseosa (GROSS, 2004). De uma maneira geral, um espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de ionização, um analizador de massas, um detector e um sistema de adquisição de dados. Na fonte de ionização de moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gaseosa. No analizador de massas os íons formados são separados por de acordo com as relações m/z e posteriormente detectados (usualmente por elétron multiplicador) (FENN et al., 1989; GROSS, 2004) (Figura 3).

Figura 3 - Diagrama esquemático das partes essenciais de um espectrômetro de massas



Fonte: Galdos, 2012

A procura por um aumento na sensibilidade na detecção das proteínas, fez com que cada espectrômetro fosse melhorando sua eficácia. O surgimento de uma nova tecnologia multidimensional de identificação de proteínas (MudPIT). Resumidamente, o MudPIT utiliza uma coluna de troca iônica seguida de outra coluna de fase reversa diretamente acoplada ao espectrômetro de massas. A cromatografia bi-dimensional realiza-se aplicando na eluição a função degrau de aumento de concentração salina liberando pacotes de peptídeos de coluna de troca iônica para a coluna de fase reversa (RP). Cada eluato obtido da coluna de troca iônica é posteriormente submetido à gradiente hidrofóbico na coluna RP e os peptídeos identificados por MS/MS (COON et al., 2005).

A técnica MudPIT tem por objetivo identificar todos os constituintes de uma mistura complexa de peptídeos. O MudPIT utiliza cromatografia líquida de troca iônica (SCX) intercalada com cromatografia de fase reversa (RP) diretamente acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (LIU, H.; SADYGOV; YATES, 2004) (Figura 4).

3.4 FASES DO CICLO CELULAR E MORTE CELULAR

Para manter a homeostase celular em um organismo maduro, um número igual de células nasce e morre em uma dada unidade de tempo. Por tanto, a divisão celular deve ser equilibrada pela morte celular, e ambas as vias, divisão celular e morte celular, são igualmente ativas (KING, K. L.; CIDLOWSKI, 1998).

3.4.1 Citometria de Fluxo

Mensuração é o coração do mundo científico. Desde quando Galileu fez esta descoberta, o desenvolvimento de métodos, técnicas de mensuração e análise, influencia definitivamente o progresso científico (TÁRNOK, 2006).

Os estudos em algumas áreas como o conhecimento do ciclo celular sofreram um aumento na sensibilidade e rendimento com a utilização do

citômetro de fluxo comparado com a era da pré-citometria, na qual os experimentos eram submetidos por autoradiografia (ROGERS, 1973; DARZYNKIEWICZ; CRISSMAN; JACOBBERGER, 2004).

A citometria de fluxo é um método analítico pela qual se mede a emissão de múltiplas fluorescências e a dispersão da luz nas células ou partículas microscópicas, alinhadas sequencialmente mediante uma corrente líquida laminar, quando são apresentadas de uma em uma e a grande velocidade (até milhares de células por segundo) frente a um feixe de luz laser de comprimento de onda adequada (HEINLEIN; SPEIDEL, 2001; SHAPIRO, 2001; 2003). Ela permite a mensuração das características químicas ou físicas da célula que se encontram suspensas num fluxo contínuo. Parâmetros estruturais intrínsecos, como o metabolismo oxidativo, são algumas das mensurações obtidas por essa tecnologia, que tem sido usada amplamente nas áreas da saúde como, por exemplo, medicina veterinária (WILKERSON, 2011), biologia e imunologia desde 1930 (SHAPIRO, 2003).

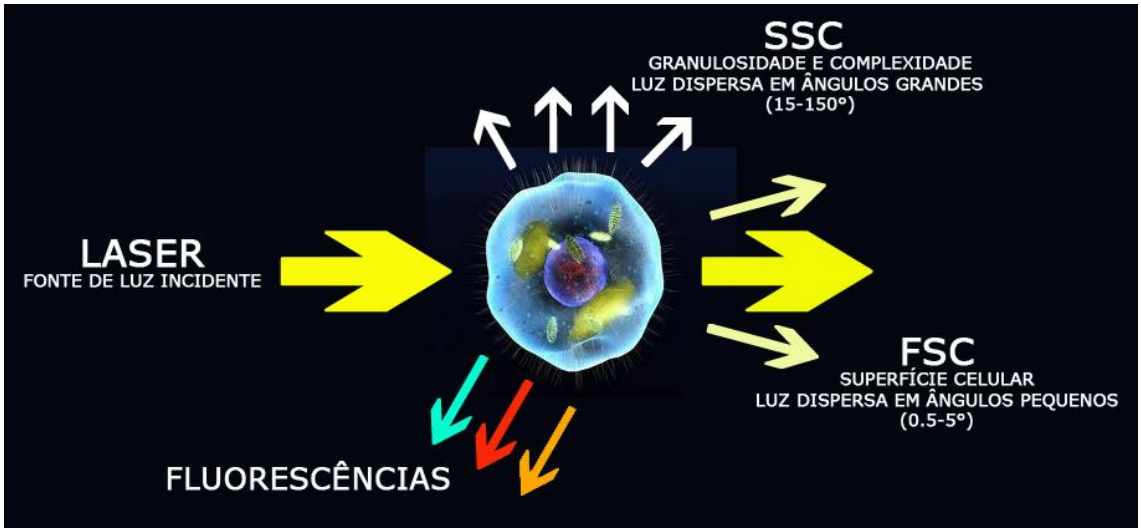
O citômetro de fluxo realiza uma análise multiparamétrica (SILVA et al., 2004), isto é, analisa múltiplas características e estruturas celulares de um número elevado de células em forma individual. A citometria de fluxo converte-se em uma poderosa ferramenta para caracterizar complexas populações celulares por ser precisa na descrição e contagem dos eventos (células) quando comparada com metodologias anteriores (TARRANT, 2005; TÁRNOK, 2006).

A citometria de fluxo foi desenvolvida para identificar e avaliar a emissão de fluorescência das células, FACS (NAKAGE ET AL 2005). O aparelho é formado por cinco componentes, uma fonte de radiação, uma câmera de fluxo, uma unidade de filtros ópticos, fotodiodos ou fotomultiplicadores e uma unidade de processadora dos dados obtidos (CÔRTE-REAL et al., 2002; SILVA, T. L. et al., 2004).

As células suspensas numa solução tampão são adequadas numa única coluna na câmara de fluxo, através de um fluxo laminar e um foco hidrodinâmico. A célula passa pelo feixe de radiação do laser de argônio que está perpendicular ao fluxo. Segundo Silva et al.(2004) o feixe intercepta a célula originando uma dispersão frontal FCS relacionado ao tamanha/volume da partícula e uma lateral SSC relacionado à granulosidade/complexidade da

partícula. A radiação assim dispersa é detectada diretamente por fotodiodos, dispersão frontal, ou desviada a 90° por lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos para ser focada nos multiplicadores, dispersão lateral (Figura 5).

Figura 4 – Fundamento da citometria de fluxo



Fonte: Galdos, 2012

3.4.2 Ciclo celular

Onde surge uma célula, existia uma célula anteriormente, assim como os animais só podem surgir de animais, e as plantas, de plantas. Essa doutrina celular, proposta pelo patologista alemão Rudolf Virchow, em 1858, carrega consigo uma mensagem para a continuidade da vida (ALBERTS et al., 2011).

Esse ciclo de duplicação e divisão, conhecido como ciclo celular, é o principal mecanismo pelo qual todos os seres vivos se reproduzem (NURSE, 2000). O estudo do ciclo celular começa com o início da divisão celular. o conceito de célula foi bem estabelecido por meados do século XIX, mas o entendimento de como as células se reproduziam era muito confuso, em grande parte porque Schleiden e Schawnn, os maiores expoentes desta teoria celular, pensavam que as células surgiram de dentro de outra célula pré-existente por um processo algo semelhante à precipitação ou cristalização (SCHWANN; SMITH; SCHLEIDEN, 1847).

Tempo depois Nageli e Remak esclareceram e descreveram corretamente a divisão celular de animais e plantas, para que finalmente Virchow promovesse a ideia de que todas as células foram produzidas pela fissão de células pré-existentes (HARRIS, 2000)

Wilson (1925) percebeu que a clivagem embrionária inicial representou uma serie de divisões celulares produtoras que eventualmente se diferenciam em tecidos e órgãos.

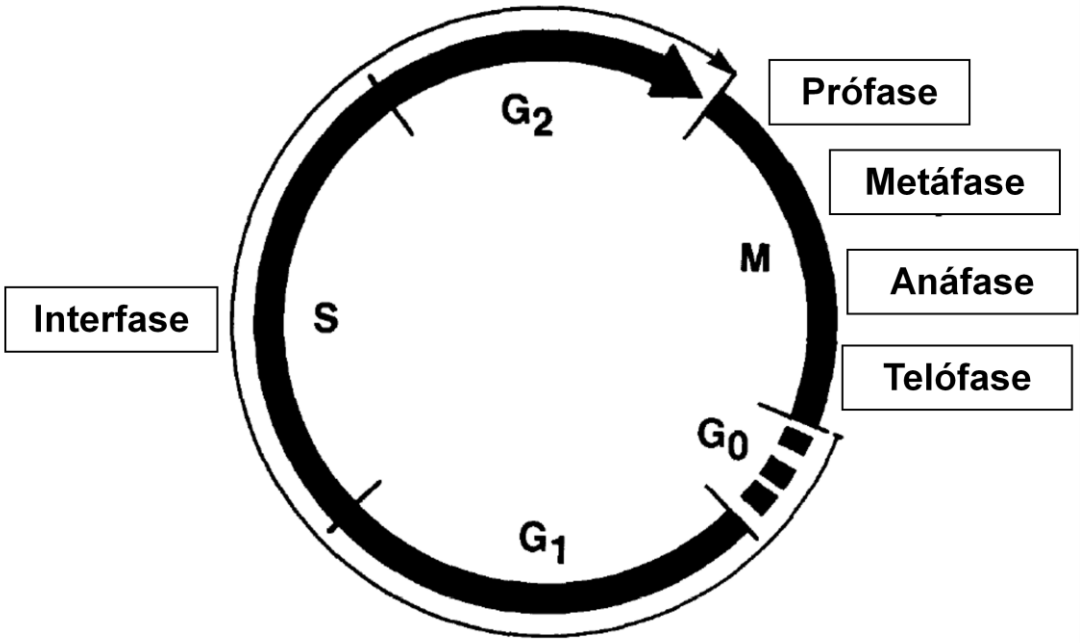
Essa nova ideia foi estendida durante os anos 1870 a 1880, que reconheceu que ovos e espermatozóides são células isoladas que se tornaram unidas na fecundação, por isso mesmo organismo multicelular mais complexo passou por uma fase unicelular. Assim, a divisão celular foi estabelecida como base de crescimento e desenvolvimento em animais e plantas (SHARP, 1921)

3.4.2.1 EVENTOS DO CICLO CELULAR

Os dois eventos mais dramáticos no ciclo são quando o núcleo se divide em um processo chamado de mitose, e quando a célula se divide em duas, um processo chamado de citocinese. Esse dois processos juntos constituem a fase M do ciclo celular. Em uma célula de mamífero típica, toda a fase M dura cerca de uma hora, que é apenas uma pequena fração do tempo total do ciclo celular (ALBERTS et al., 2011).

Um modelo de divisão divide as etapas da divisão celular em quatro fases (Figura 6). Na fase S, o DNA cromossômico é duplicado, e na fase M ocorre a mitose, levando a separação dos cromossomos, das organelas celulares, e do citoplasma da célula parental em duas células filhas (DEVLIN, 2011). As fases do intervalo ou gap, G_1 e G_2, separam a fase M da fase S e a fase S da fase M (MITCHISON, 1971; ALBERTS et al., 2011).

Figura 5 - Ciclo celular em mamíferos. Observamos o ciclo celular composta pela Interfase, na qual encontramos as fases G_0, G_1, S e G_2. A fase M é composta pela Prófase, Metáfase, Anáfase e a Telófase



Fonte: Betteridge; Fléchon (1988)

Durante toda a interfase, uma célula geralmente continua a transcrever genes, sintetizar proteínas e aumentar a massa. Juntas, as fases G_1 e G_2 proveem tempo adicional para a célula cresça e duplique as suas organelas citoplasmáticas: se a interfase durasse apenas o tempo suficiente para a replicação do DNA, a célula não teria tempo para duplicar a sua massa antes de se dividir e, consequentemente, diminuiria de tamanho a cada divisão. Em algumas circunstâncias especiais, é isso que ocorre. Em alguns embriões de animais, por exemplo, as primeiras divisões celulares após a fertilização (chamada de divisões de clivagem) servem para subdividir uma célula ovo-gigante em varias células menores, o mais rápido possível. Nestes ciclos celulares as fases G_1 e G_2 são encurtadas drasticamente, e as células não crescem antes de se dividir (KOSHLAND, 1989; NURSE, 2000).

Uma fase adicional, em equilíbrio com a fase G_1, é a fase G_0 na qual a célula encontra-se em um estado quiescente ou senescente. Uma célula quiescente, embora não esteja participando do ciclo celular, pode ser induzida a reentrar no ciclo celular por um estímulo mitótico, como um aumento na concentração de um fator de crescimento em seu ambiente externo. Em

contrapartida, uma célula senescente não pode reentrar no ciclo celular, mesmo na presença de fatores de crescimento mitóticos. Diferentes tipos de células variam em sua frequência de divisão celular e, portanto, na quantidade de tempo que permanecem quiescentes, em G_0 (PARDEE, 1989).

Embora fibroblastos e células epiteliais passem muito pouco ou nenhum tempo em G_0, células adultas de fígado se dividem cerca de uma vez por ano, células de cérebro adulto quase nunca se dividem. Assim, células adultas de fígado e de cérebro passam a maior parte do seu tempo em G_0. Em G_0, as proteínas críticas da via do ciclo celular, incluindo as quinases dependentes de ciclinas, estão ausentes (PARDEE, 1989; ALBERTS et al., 2011; DEVLIN, 2011).

Durante a fase S do ciclo celular todo o conteúdo do DNA do núcleo deve ser replicado completamente em um período de algumas horas. Isto é obtido pelo início da replicação bidirecional de múltiplos lugares ao longo de cada cromossomo, uma falha na conclusão de replicação da fase S levaria ao cromossomo a quebrar a seguinte fase que é a mitose. Da mesma forma, o local de reinício da replicação dentro da fase S poderia ter consequências adversas. Este fenômeno é observado em casos especiais, portanto, os padrões de iniciação em um único cromossomo devem ser regulados espacial e temporalmente para uma completa finalização da fase S (LASKEY; FAIRMAN; BLOW, 1989).

Os mecanismos que regulam a replicação dentro da fase S precisam ser versáteis. O comprimento da fase S pode variar, não somente entre espécies (EDENBERG; HUBERMAN, 1975; HAND, 1978), mas também nos diferentes estágios do desenvolvimento de uma mesma espécie (BLUMENTHAL; KRIEGSTEIN; HOGNESS, 1974). Células adultas do *Drosophila melanogaster* replicam seu DNA na fase S por cerca de 10 horas, enquanto que em embriões da fase inicial de desenvolvimento da mesma espécie, replicaram seu DNA na fase S em menos de 4 minutos (BLUMENTHAL; KRIEGSTEIN; HOGNESS, 1974).

Em camundongos o primeiro ciclo celular inicia-se quando o oócito é fecundado por um espermatozoide. Este evento desencadeia uma serie de alterações morfológicas e bioquímicas, incluindo a transformação da cromatina da fêmea e do macho em um núcleo funcional (SMITH; JOHNSON, 1986). O

oócito completa a segunda divisão mitótica, a descondensação cromossômica e o chamado pro-nucleo feminino são formados. Simultaneamente, a cromatina espermática altamente condensada sofre uma sequencia de mudanças estruturais e transforma-se em um pro-nucleo masculino haploide (DOBRUCKI; DARZYNKIEWICZ, 2001; CIEMERYCH; SICINSKI, 2005).

Já em coelhos o primeiro ciclo celular é bem curto, com uma duração de 8 a 10 horas, sendo que a sua fase S tem duração de 1 a 2 horas; durante o segundo ciclo celular a fase G_1 esta quase ausente (OPRESCU; THIBAULT; ZIMMERMANN, 1965). Segundo (ROSSANT; PETERSON, 1986)(37) em camundongos o ciclo celular é abreviado durante a clivagem inicial, particularmente as fases G_2 e M do primeiro ciclo celular.

Em bovinos a divisão celular de embriões por monta natural começa no dia 2 depois da fertilização, enquanto que em embriões produzidos por fecundação *in vitro* (FIV) inicia-se ao redor de 59 horas depois da fecundação (BETTERIDGE; FLÉCHON, 1988). A fase M (mitose mais citocinese) ocorre em um período relativamente curto de tempo – cerca de uma hora nas células de mamíferos que se dividem uma ao dia, ou mesmo uma vez ao ano, ela é de longe a fase mais importante do ciclo celular. Durante esse breve período, a célula reorganiza praticamente todos os seus componentes e os distribui de forma igual entre as duas células filhas. As fases anteriores do ciclo celular, de fato, servem para estabelecer o momento para o drama da fase M (DEVLIN, 2011).

3.4.3 Morte celular programada

A morte celular pode ser classificada de acordo a suas características morfológicas (apoptótica, necrótica, autofágica ou associada com mitose), critérios enzimológicos (com o sem envolvimento de nucleases ou de distintas fases de proteases, tais como caspases, calpaínas, catepsinas e transglutaminases), aspectos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) ou características imunológicas (imunogênica ou não imunogênica) (MELINO, 2001; KROEMER et al., 2009)

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares dependem de uma interação entre as células que o constituem. No desenvolvimento embrionário, muitas células produzidas em excesso são levadas à morte, contribuindo para a formação de órgão e tecidos (MEIER; FINCH; EVAN, 2000).

Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com as suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência (CASTEDO et al., 2004; OKADA; MAK, 2004; DIMRI, 2005). Embora recente classificação proposta pelo Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (CNMC)

A autofagia é um processo adaptativo e controlado geneticamente. Ela ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares (DANIAL; KORSMEYER, 2004; LUM; DEBERARDINIS; THOMPSON, 2005). Durante a autofagia, porções do citoplasma são encapsuladas por a membrana, originando estruturas denominadas autofagossomos. Estes irão se fusionar com os lisossomos. A seguir, o conteúdo dos autofagossomos será degradado pelas hidrolases lisossomais (RABINOWITZ; WHITE, 2010).

A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). É considerada uma resposta passiva a injuria celular, entretanto estudos recentes sugerem que a necrose também pode ser regulada geneticamente (ZONG; THOMPSON, 2006).

Assim como a necrose, a mitose catastrófica é um processo passivo; porem, alguns estudos sugerem que também pode apresentar regulação genética (CASTEDO et al., 2004). A mitose catastrófica envolve uma mitose aberrante, resultando em uma segregação cromossômica errônea. Geralmente não é considerada de morte, mas sim de uma sinalização irreversível para a morte (WEAVER; CLEVELAND, 2005).

A senescência é um processo metabólico ativo essencial para o envelhecimento. Ocorre por meio de uma programação genética que envolve

deterioração dos telômeros e ativação dos genes supressores tumorais. As células que entram em senescência perdem a capacidade proliferativa após um determinado número de divisões celulares (CHANDECK; MOOI, 2010).

Kerr; Wyllie; Currie (1972) descreveram a apoptose como um fenômeno de morte celular programada, reconhecida morfologicamente como um fenômeno distinto de morte. A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgão, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (RANGANATH; RAO-NAGASHREE, 2001). A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas (Figura 7).

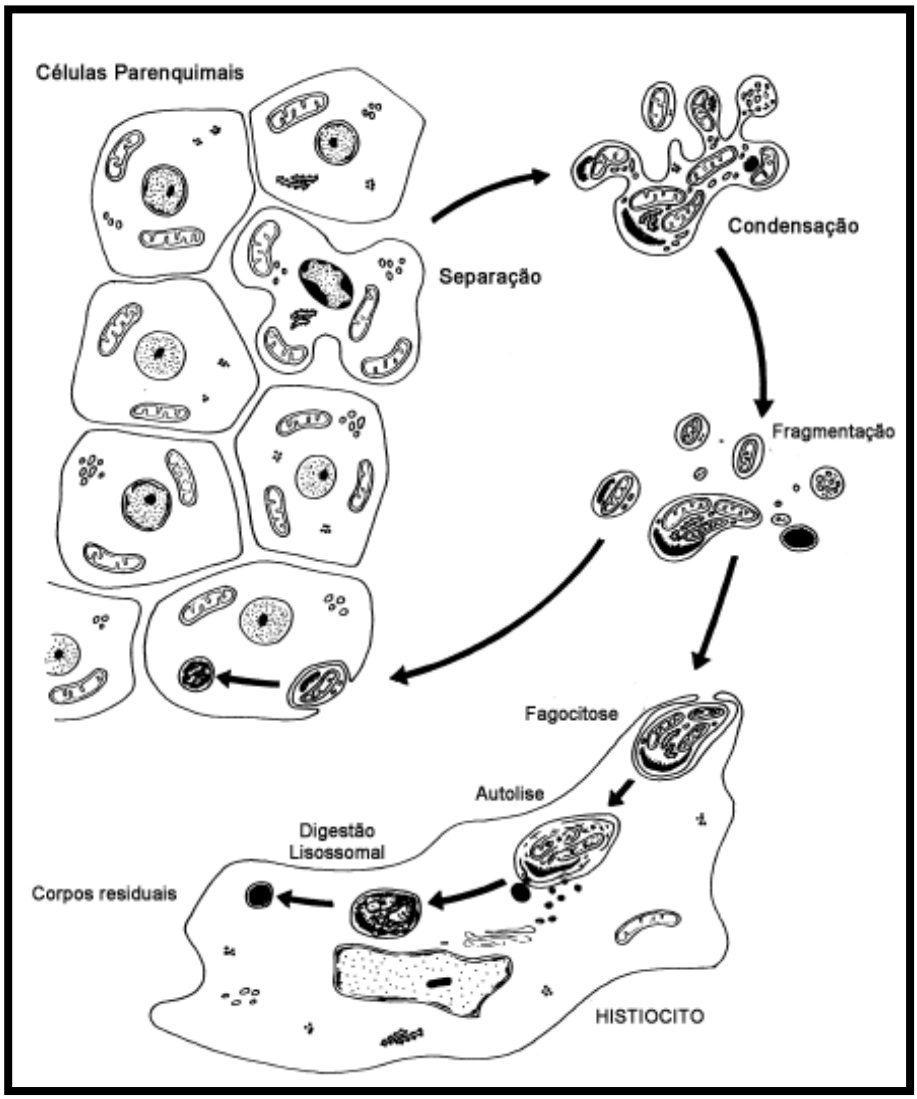
A apoptose aparece pela primeira vez no embrião de 32 para 64 células e pode ser demonstrado durante a embriogênese, que desempenha uma função importante em todos os estágios de desenvolvimento necessários para a produção normal do recém nascido (BRILL et al., 1999).

O maior evento bioquímico associado com a apoptose é o DNA fragmentado por diferentes nucleases(HENGARTNER, 2000). A apoptose é regulada em três níveis: ao nível de membrana, há receptores específicos de membrana mediando sinais de morte; ao nível nuclear, o genoma contem genes que são transcritos como resposta para a iniciação do processo de apoptose; e ao nível do citoplasma, há transdução de vias de sinalização. Há via de sinalização inicial que comanda a transdução de sinal são diferentes para cada receptor, contudo, o estagio final é similar na maioria dos casos e envolve as cisteíno proteases chamadas de Caspases (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997; THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998).

As caspases (cysteine-dependent aspartate-specific acid proteases) pertencem a uma família que utiliza os resíduos de cisteína como catalisador nucleofílico para clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, 1997). As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando a condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídeos de membrana que irão sinalizar para estas estas células serem fagocitadas por macrófagos (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997; THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; BOATRIGHT;

SALVESEN, 2003). São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que seis (caspases -3, -6, -7, -8, -9, -10) participam da apoptose (BOATRIGHT; SALVESEN, 2003). As caspases -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14 encontram-se envolvidas na maturação de citoquinas e sua contribuição na apoptose permanece desconhecida (DENAULT; SALVESEN, 2002).

Figura 6 - Diagrama para ilustrar as características morfológicas da apoptose



Fonte: Kerr; Wyllie; Currie (1972)

3.5 CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

As linhagens de células-tronco embrionárias são células não diferenciadas, derivadas do botão embrionário de blastocistos, que tem como característica principal pluripotência (EVANS, M. J.; KAUFMAN, 1981).

As células-tronco podem ser classificadas em três categorias de acordo com o período de isolamento durante a ontogênese: embrionária, fetal e adulta. O termo célula-tronco refere a células com habilidade em gerar células filhas com características similares da célula mãe, bem como diferenciar-se em células especializadas. Exemplos são: as células-tronco hematopoiéticas que originam todas as células hematopoiéticas, as células-tronco neurais que originam neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (GAGE, 2000; MERKLE; ALVAREZ-BUYLLA, 2006) e as células-tronco mesenquimais que se diferenciam em fibroblastos, osteoblastos e adipócitos (VAN DER KOOY; WEISS; SAMUEL, 2000; MERKLE; ALVAREZ-BUYLLA, 2006).

As células-tronco embrionárias foram descobertas na metade do século passado, através de estudos que avaliaram os tipos celulares presentes em teratomas de camundongos (MERKLE; ALVAREZ-BUYLLA, 2006; GADUE; WEISS, 2009). O saco vitelino, fígado e medula óssea são considerados como fontes promissoras de células-tronco, por possuírem nichos de células hematopoiéticas e estromais durante o desenvolvimento embrionário e fetal (WENCESLAU et al., 2011)

Existe um número grande de fatores de transcrição essenciais para a manutenção do estagio das células-tronco embrionárias, mas o Oct 3/4 é o melhor caracterizado. Ele é essencial para a manutenção de diferentes tipos celulares, está fortemente ligado na autorrenovação das células-tronco embrionárias indiferenciadas e deve ser expresso acima de um nível critico para preservar o estado da célula tronco (NIWA; MIYAZAKI; SMITH, 2000).

O fator de transcrição Oct-3/4 é expresso durante o desenvolvimento precoce das células que têm capacidade de diferenciação totipotentes ou pluripotentes (ROSNER et al., 1990). Oct-3 / 4 de proteína presente no núcleo das oito células e todas as células de embriões no estágio de mórula

subsequêntes. Quando os embriões se desenvolvem dentro do blastocisto, o trofoectoderma é formada na camada externa dos embriões como a primeira linhagem de células especificação. Oct-04/03 não é expresso pelas células do trofoectoderma, que é a continuação da massa celular interna, o qual mantém a pluripotência (OKAMOTO et al., 1990).

NANOG é um fator de transcrição envolvido na auto-renovação de células indiferenciadas das células-tronco embrionárias. Em humanos, esta proteína é codificada pelo gene NANOG, expresso em células-tronco embrionárias (ESC) sendo um fator chave na manutenção da pluripotência (CHAMBERS et al., 2003). NANOG atua em conjunto com outros fatores como POU5F1 e SOX2 envolvidos na auto-renovação de células indiferenciadas as células-tronco embrionárias e na formação de qualquer um dos três folhetos embrionários (endoderma, ectoderma, mesoderma) (PAN; THOMSON, 2007). É por esta razão que a compreensão dos mecanismos que mantêm a pluripotência de uma célula é fundamental para entender como as células-tronco, e pode levar a futuros avanços no tratamento de doenças degenerativas (MITSUI et al., 2003).

O marcador de superfície celular Stro-1 é considerado o melhor marcador para células-tronco mesenquimais, porém não é exclusivo para este tipo celular e ainda, sua expressão (KOLF; CHO; TUAN, 2007). O CD 90 é um marcador expresso em uma série de linhagens celulares fibroblásticas e estromais, endotélio, e algumas linhagens celulares tumorais. Está envolvido na adesão e migração celular (SICLARI; QIN, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa é descritiva e experimental. Foram analisados e interpretados os aspectos da macro e microestrutura morfológica do saco vitelino de embriões bovinos. Foi também analisada e interpretada a relação do potencial metabólico e protéico na relação apoptótica e da cinética do crescimento celular durante os períodos gestacionais do SVEB.

4.1 AMOSTRA

Sessenta e nove embriões bovinos sem raça definida em diferentes idades gestacionais foram coletados nos frigoríficos: Barra Mansa (Ribeirão Preto/SP), Frigonossa (Poços de Caldas/MG) e Vale do Cedro (Inhumas/GO). A incisão foi realizada no corno gravídico no sentido longitudinal expondo as membranas extra-embrionárias. Posteriormente, fez-se uma incisão na membrana corioalantóica para acessar ao saco vitelino, o qual foi retirado e armazenado em diferentes embalagens contendo fixadores específicos, dependendo da técnica a ser utilizada. Os procedimentos de coleta e processamento do saco vitelino seguiram as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) protocolados com nº 2784/2012.

4.2 DETERMINAÇÃO DO PERÍODO GESTACIONAL

Para determinar o período gestacional do SVEB foi mensurado o Crow-Rump (CR), consistiu na distância da crista nucal até a última vértebra sacral, o qual foi mensurado com paquímetro digital MITUTOYO® modelo 500-144B com divisões em milímetros (150 mm x 0.02 mm). Após tal procedimento, os

embriões foram dissecados e fotodocumentados com câmera digital Nikon® modelo D40.

A idade gestacional (IG) foi estimada por fórmula matemática baseada em dados experimentais de Oliveira (2011) e da literatura consultada (WINTERS; GREEN; CONSTOCK, 1942; EVANS, H. E.; SACK, 1973; NODEN; LAHUNTA, 1990).

$$\mathbf{IG = 20{,}23303 + (0{,}8560404 \times CR)}$$

Onde:

IG : Idade gestacional

CR: Crow Rump

4.2.1 Metodologia estatística

Com base nos dados de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e idade gestacional (em dias), se ajustou um modelo linear simples (Figura 1), isto é,

$$IATF = a + b*IDADE \qquad (1)$$

Da equação (1), podemos observar que

$$IDADE = (IATF - a)/b \qquad (2)$$

Conhecido na literatura como regressão inversa, foi realizada uma analise estatística descritiva, tendo observado que:

Tabela 1 - Estatística descritiva da variável IDADE. São Paulo, 2012

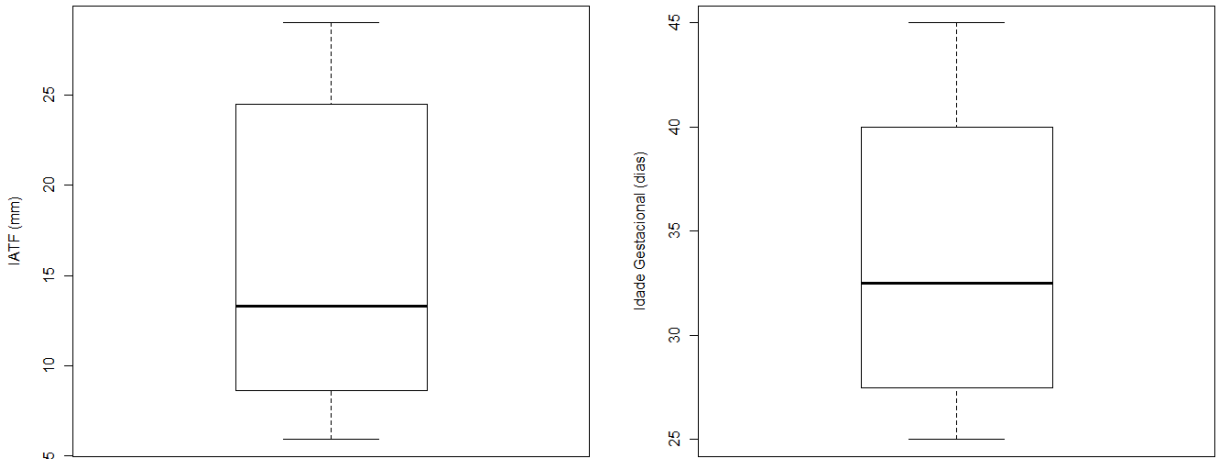
Mínimo	1st Quadrante	Mediana	Média	3rd Quadrante	Máximo
25.00	28.75	32.50	33.75	40.00	45.00

Tabela 2 - Estatística descritiva da variável IATF, São Paulo, 2012

Mínimo	1st Quadrante	Mediana	Média	3rd Quadrante	Máximo
5,90	9,30	13,30	15,79	24,25	29

Nas tabelas 1 e 2 observadas anteriormente, notamos que a idade gestacional mínima foi de 25 dias e a máxima de 45 dias, sendo que a idade mediana foi 32,5 dias. Na variável o valor de IATF mínimo foi de 5,90 mm e o Maximo 29 mm, sendo que o valor IATF mediano foi de 13,30.

Gráfico 1 – Gráfico do tipo Box-plot de IATF (mm) e idade gestacional (dias)



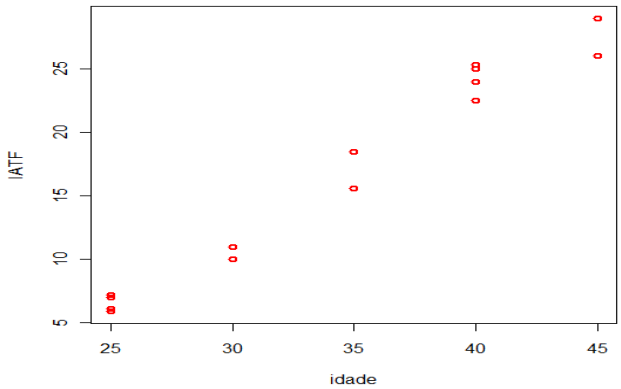
Fonte: Galdos, 2012

O ajuste do modelo (1) foi feito usando o software livre R versão 2.13 (R Development Core Team, 2011). Os resultados são apresentados a seguir (Tabela 3)

Tabela 3 - Regressão linear simples. São Paulo, 2012

Estimativa Idade	Desvio padrão	t	p-valor
-22.61283	1.50893	-14.99	$1.31e^{11}$
1.13786	0.04376	26.00	$9.97e^{16}$

Gráfico 2 - Gráfico de dispersão de IATF versus Idade gestacional (em dias)



Fonte: Galdos, 2012

Fizemos uma previsão da idade gestacional usando os resultados da Tabela 3 e da equação (2), isto é,

$$\textbf{IDADE} = (\textbf{CR}+22.61283)/\ 1.13786 \qquad (3)$$

Considera-se que a metodologia anterior é uma boa aproximação (predição) da IDADE gestacional (em dias) desde que o CR (mm) esteja no mesmo intervalo de valores que a variável IATF, ou seja, no intervalo [5,90;29]. Por médio da fórmula os dados apresentados na tabela 4 de idades gestacionais do saco vitelino de embriões bovinos.

Tabela 4 - Amostras de SVEB com Crown-Rump, idades gestacionais obtidas pela formula IDADE = (CR+22.61283)/ 1.13786. São Paulo, 2012

(continuação)

CR (mm)	IG Estimada (dias)
5,11	**24,61**
5,90	**25,28**
6,20	**25,54**
6,51	**25,81**
6,78	**26,04**
6,97	**26,20**
7,03	**26,25**
7,10	**26,31**
7,23	**26,42**
7,54	**26,69**
8,50	**27,51**
8,80	**27,77**
9,20	**28,11**
9,73	**28,56**
10,25	**29,01**
10,37	**29,11**
11,31	**29,91**
11,66	**30,21**
11,98	**30,49**
12,80	**31,19**
13,33	**31,64**
14,10	**32,30**
14,31	**32,48**
14,70	**32,82**
14,90	**32,99**
16,20	**34,10**
16,84	**34,65**
17,45	**35,17**
19,58	**36,99**

(conclusão)

20,00	**37,35**
20,94	**38,16**
21,17	**38,36**
22,10	**39,15**
22,73	**39,69**
23,25	**40,14**
23,55	**40,39**
23,96	**40,74**
24,13	**40,89**
24,15	**40,91**
24,80	**41,46**
28,15	**44,33**
28,18	**44,36**
28,30	**44,46**
28,34	**44,49**
29,77	**45,72**
30,17	**46,06**
31,30	**47,03**
36,39	**51,38**
36,40	**51,39**
37,10	**51,99**
38,00	**52,76**
41,10	**55,42**
43,12	**57,15**
45,00	**58,75**

4.3 TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE LUZ

As amostras de SV foram colocadas em solução de formaldeído 10% e transportadas para o Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Após 24hs de fixação em formaldeído 10%, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (70 a 100%) e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em Paraplast (TOLOSA et al., 2003). Os blocos foram cortados com espessura de 4 µm em micrótomo Polyartmicrótomo® (LEICA). As lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina, fotodocumentadas em microscópio de luz Olympus BX-50®, utilizando-se o programa específico para morfometria KS400 Zeiss®.

4.4 TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As amostras de SV foram fixadas em Karnowisky e transportadas para o Laboratório de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Após 48 horas de fixação, o material foi lavado três vezes em tampão fosfato 0,1 molar (pH 7,4) por 10 minutos, totalizando 30 minutos de imersão. Posteriormente o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio por 2 horas e novamente lavado três vezes em tampão fosfato a 0,1 molar (pH de 7,4) por 10 minutos. Na desidratação de 15 minutos em concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 80%, 90% e 95%) passando em seguida pelo álcool absoluto por quatro vezes de 15 minutos.

Todo o álcool foi evaporado do material em estufa a 50°C por 12 hs, deixando-o totalmente seco para a metalização com ouro. Como última etapa de processamento, as peças foram fixadas em *"stubs"* de alumínio com cola de carbono, deixadas em estufa por 12 horas para secagem e submetidas ao

banho de ouro no metalizador EMITECH/K550®. A análise e eletromicrografias foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura LEO/435VP®.

4.5 TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As amostras de SV foram fixadas em Karnowisky e transportadas para o Laboratório de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Após 48hs de fixação, as amostras foram lavadas em tampão fosfato e pós-fixadas em tetróxido de ósmio por 2 hs. Posteriormente, promoveu-se três banhos de 10 minutos em solução tampão. O próximo passo foram as desidratações com álcool etílico em concentrações crescentes: 70%, 80% e 90% (15 minutos de duração em cada solução) e três banhos com álcool etílico absoluto (10 minutos de duração em cada banho).

Após a passagem pela bateria de álcool etílico, os fragmentos foram lavados em óxido de propileno durante 30 minutos, garantindo assim uma total desidratação. Em intervalo de 4 horas, os fragmentos permaneceram sob agitação em mistura de 1:1 de óxido de propileno e resina (Spurr´s Kit). Na sequência, estas misturas foram substituídas por resina pura, permanecendo imergidos por 12 horas sob rotação. Após este tempo as amostras foram colocadas em moldes de silicone contendo resina pura. Uma vez incluídos, os cortes permaneceram em estufa 60ºC por 72 horas para consolidar a polimerização da resina.

Obtidos os blocos, foram realizados os cortes semi-finos com 0,4 µm de espessura em ultramicrótomo automático ULTRACUT-R (Leica Microsystens), corados a quente em solução de Azul de Toluidina a 1% e analisando-os em microscópio de luz para identificar as áreas de interesse. Localizadas as regiões desejadas, cortes ultrafinos com 0,07 µm de espessura foram colhidos sobre tela de cobre e contrastados com acetato de uranila saturado a 2%, durante 7 a 10 minutos, e pelo citrato de chumbo a 0,5%, durante 7 a 10

minutos. As observações e eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão Morgagni 268D Mega View III câmera® (Philips).

4.6 CITOMETRIA DE FLUXO

As amostras de SV foram mantidas em nitrogênio líquido e encaminhadas ao Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantã para a análise do ciclo celular e morte celular.

4.6.1 Fases do ciclo celular

A amostra do SV mantida em banho de gelo foi colocada em uma placa onde se adicionou 200 µl de tampão FACS Flow. Em seguida maceramos a amostra cuidadosamente até homogeneizá-la, depois foi filtrada em membrana de 0,22 µm de porosidade. Adicionou-se 800 µl de Álcool 70° RNAse, armazenado em freezer a -20°C por duas horas, posteriormente foi analisado as fases do ciclo celular (VINDELOV et al., 1982).

O conteúdo foi centrifugado e transferido vertido em tubo de citometria e adicionado 500 µl de tampão FACS Flow, depois centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, em seguida foi ressuspendido em 300 µl de paraformaldeido 2%. Após esta etapa foi incubado com 20 µl de iodeto de propideo por 15 minutos a de 4°C. As análises de expressão em 10.000 eventos foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur® e as fases do ciclo celular pré e pós-mitóticas (haplóides, G0-G1, fase S e G2-M) foram analisadas pelo software WinMdi 2.9. A análise estatística utilizou o teste não-paramétrico ANOVA One-way seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey-kramer. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão, considerando-se como valores significantes $p<0.05$.

O índice de proliferação celular do saco vitelino de embriões bovinos foi analisado no software ModFit LT versão 2.0.

4.6.2 Expressão de marcadores de vias de morte celular

Os marcadores utilizados foram: citocromo-c , caspase 3, Bax, Bad, Bcl2 e Anexina V/PI. A amostra do SV mantida em banho de gelo foi colocada em uma placa onde se adicionou 200 µl de tampão FACS Flow. Em seguida maceramos a amostra cuidadosamente até homogeneizá-la, depois foi filtrada em membrana de 0,22 µm de porosidade, posteriormente centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 800 µl de tampão FACS Flow®, a suspensão foi transferida para os tubos de citometria, adicionado 5 µl do anticorpo Anexina V / PI e incubado por 30 minutos a 37°C. Análises de expressão em 10.000 eventos foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur®, e as aquisições dos dados foram analisadas pelo programa WinMdi 2.9. A expressão de marcadores foi determinada pela comparação com um isótopo controle marcado com o fluorocromo FITC inespecífico. Para as outras marcações foram permeabilizadas previamente com 2 µl de Triton X-100 (0,1%) por 30 minutos e posteriormente adicionado o anticorpo primário específico e após 2 horas foi adicionado o anticorpo secundário (Alexa-Fluor® 488 – Invitrogen) marcado com FITC. A análise estatística utilizou o teste não-paramétrico ANOVA One-way seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey-kramer. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão, considerando-se como valores significantes $p<0.05$.

4.6.3 Análise do potencial elétrico de membrana mitocondrial

A amostra do SV foi colocada em uma placa onde se adicionou 200 µl de tampão FACS Flow. Em seguida maceramos a amostra cuidadosamente até homogeneizá-la, depois foi filtrada em membrana de 0,22 µm de porosidade, posteriormente centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 800 µl de tampão FACS Flow®, a suspensão foi

transferida para os tubos de citometria. Foi adicionado 5 µl de DMSO mais 5 µl do fluorocromo Rodamina 123 (5mg/mL). A seguir a amostra foi incubada em estufa de CO_2 (5%), a 37º por 30 minutos. Após este período, a amostra foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 300 µl de tampão FACS Flow.

Após a aquisição da intensidade de fluorescência arbitrária, emitida pela sonda rodamina 123, os resultados foram analisadas pelo software WinMDI 2.9 e representados nos histogramas das diferentes idades gestacionais do saco vitelino de embriões bovinos evidenciando as mitocôndrias inativas e ativas. A análise estatística utilizou o teste não-paramétrico ANOVA One-way seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey-kramer. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão, considerando-se como valores significantes $p<0.05$.

Este ensaio foi realizado em paralelo ao teste da verificação da proporção de células em apoptose/necrose e a expressão de proteínas de checagem de progressão do ciclo celular. A quantificação do potencial mitocondrial foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur®, com aquisição de 10.000 eventos.

4.6.4 Expressão de marcadores nucleares e citoplasmáticos envolvidos em vias de sinalização, síntese, proliferação e angiogênese

Os marcadores utilizados foram: r-TNF, HSP47, VEGF-R1 e CD105. A amostra do SV mantida em banho de gelo foi colocada em uma placa onde se adicionou 200 µl de tampão FACS Flow. Em seguida, macerado cuidadosamente até homogeneizá-la, depois filtrada em membrana de 0,22 µm de porosidade, posteriormente centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 800 µl de tampão FACS Flow®, Seguidamente, foi permeabilizada previamente com 2 µl de Triton X-100 (0,1%) por 30 minutos e posteriormente adicionado o anticorpo primário específico e após 2 horas foi adicionado o anticorpo secundário (Alexa-Fluor® 488 – Invitrogen), marcado com FITC. A suspensão foi transferida para os tubos de

citometria, para realizar a leitura. Análises de expressão em 10.000 eventos foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur®, e as aquisições dos dados foram analisadas pelo programa WinMDI 2.9. A expressão de marcadores foi determinada pela comparação com um isótopo controle marcado com fluorocromo FITC inespecífico. A análise estatística utilizou o teste não-paramétrico ANOVA One-way seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey-kramer. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão, considerando-se como valores significantes $p<0.05$.

4.6.5 Expressão de marcadores de maturação, diferenciação de células-tronco

Os marcadores utilizados foram: Stro-1, CD90, Nanog, Oct 3/4 e CD133. A amostra do SV mantida em banho de gelo foi colocada em uma placa onde se adicionou 200 µl de tampão FACS Flow. Em seguida maceramos a amostra cuidadosamente até homogeneizá-la, depois filtrada em membrana de 0,22 µm de porosidade, posteriormente centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 800 µl de tampão FACS Flow®, Seguidamente, foi permeabilizada previamente com 2 µl de Triton X-100 (0,1%) por 30 minutos e posteriormente adicionado o anticorpo primário específico e após 2 horas foi adicionado o anticorpo secundário (Alexa-Fluor® 488 – Invitrogen) marcado com FITC. A suspensão foi transferida para os tubos de citometria, para realizar a leitura. Análises de expressão em 10.000 eventos foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur®, e as aquisições dos dados foram analisadas pelo programa WinMDI 2.9. A expressão de marcadores foi determinada pela comparação com um isótopo controle marcado com fluorocromo FITC inespecífico. A análise estatística utilizou o teste não-paramétrico ANOVA One-way seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey-kramer. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão, considerando-se como valores significantes $p<0.05$.

4.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS: NANOUPLC TANDEM NANOESI-MS^E

Para a análise de maior número de proteínas foi utilizada a tecnologia de MudPit (Multidimensional Protein Identification Technology) tandem MS^E no Laboratório Thompson do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.7.1 Preparo das amostras

Ao "*pool*" de 15 amostras do SV foi adicionado 200 µL de solução contendo 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM KCl, 0.1 % (m/v) SDS e 10 mM DTT, o qual foi misturado com vortex por 3 min para extração das proteínas. Em seguida, 50 µL de proteínas da amostra foram precipitadas, usando 250 µL de solução contendo 10% (m/v) ácido tricloroacético preparado em acetona a -20°C. A solução foi armazenada por 2 horas e centrifugada a 4°C por 5 min a 13000 g em ultracentrífuga (Eppendorfl). O pellet formado foi dissolvido em 200 µL de tampão fosfato (pH 7.2). Um volume contendo 50 µg de proteína foi purificado e suas proteínas concentradas em filtros para centrifugação Microcon 0,5 mL (Amicon Bioseparation, Millipore) para obter uma concentração final de 50 µg de proteínas totais em 50 µL de volume final.

Uma vez concentradas as proteínas, o processo de digestão tríptica foi iniciada por desnaturação das proteínas com 0.2% (m/v) de surfactante RapiGest (Waters) durante 15 min a 80ºC. As proteínas foram reduzidas usando 10 mM DTT (preparado em 50 mM NH_4HCO_3) por 30 min a 60°C. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e adicionou 10 mM de Iodocetamida (IAA) para alquilação das proteínas, e incubados por 30 min na ausência de luz. Em seguida, para a digestão enzimática das proteínas, adicionou-se 10 µL de uma solução de tripsina, na proporção de 1:100 (tripsina: proteína). Esta solução foi incubada a 37ºC durante a noite. Após a digestão, foram adicionados 10 µL de TFA (ácido trifluoroacético) 5% a 37 ° C por 90 min

para hidrolisar o surfactante RapiGest.®. Finalmente, foi adicionado 5 µL de padrão interno (25 fmol/µL de álcool desidrogenase I) (SwissProt accession number P00330).

4.7.2 NanoUPLC tandem nanoESI-MS^E

O experimento de NANOUPLC TANDEM NANOESI-MS^E foi conduzido utilizando-se 250 ng de proteína total da amostra. O sistema nanoACQUITY UPLC utilizou um gradiente de fase reversa de 5% a 40% (v/v) de acetonitrila (0.1% v/v ácido fórmico) com fluxo de 600 nL/min durante 1,5 horas e dois tipos de colunas (coluna C18 BEH 1.7mm, 75 mm × 15 cm conjugada com uma coluna SCX 5 mm, 180 mm × 23 mm). Para todas as análises o espectrômetro de massas foi operado no modo “W”, com poder de resolução de pelo menos 20.000, e utilizada NanoLockSpray como fonte de ionização, operando no modo de íon positivo ESI (+). O canal lock mass foi carregado com amostra a cada 30 s. A calibração do espectrômetro de massas foi realizada com solução GFP *(*do inglês: *[Glu1]-Fibrinopeptide B human*) (100 fmol/ml) fornecida também pela fonte de *NanoLockSpray*. O íon duplamente carregado ([M +2H] 2+) foi utilizado para a calibração *single-point* (Lteff) inicial, e os fragmentos de MS/MS do GFP utilizados como instrumento final de calibração. A parte de MSE foi realizada em espectrômetro de massas, modelo Synapt HDMS G1® (Waters), o qual foi programado para automaticamente trocar entre MS de energia baixa (3eV) e de energia de colisão elevada MSE (12-40 eV) aplicada à célula trap ‘T-wave’ CID (collision-induced dissociation), em presença de gás argônio. A transferência a partir da célula de colisão foi ajustada para 1eV, com tempo de 1s, tanto em baixa quanto em alta energia. Após o analisador de tempo de vôo (*time of flight* - TOF) foram colhidos espectros de m/z 50 a 3000. Todavia, o offset RF do quadrupolo foi ajustado para que as informações de LC/MS fossem eficientemente adquiridas de m/z 300 a 3000, assegurando que qualquer massa menor que m/z 300 observada nas informações de LC/MSE fossem provindos apenas da célula de colisão. Desse modo, os valores de

baixa massa eram sabidamente produtos de fragmentação CID, e não de fragmentação na fonte.

A identificação proteica e os dados quantitativos foram gerados utilizando-se algoritmos (SILVA, J. C. et al., 2005) e busca em banco de dados específicos da espécie (KRAMER-ALBERS et al., 2007). O banco de dados utilizado foi randomizado “on- the fly” durante pesquisa para geração de falsas proteínas, a fim de identificar o nível de falso positivo, fixado em no máximo 1%. Para o processamento dos espectros e busca em banco de dados utilizou o servidor ProteinLynxGlobalServer v.2.4 (PLGS) com licença ExpressionE v.2.4. Os bancos de dados UniProtKB / Swiss-Prot 57.1 e UniProtKB / TrEMBL Release 40.1 foram utilizados e as condições de busca foram baseadas na taxonomia do *Bos taurus*. As proteínas identificadas foram organizadas por PLGs em uma lista que corresponde a uma proteína única, tanto pelo resultado do espectro como pelo banco de dados, e uma relação logarítmica entre os diferentes grupos. Apenas proteínas com escore maior que 50% e confiança maior que 99% foram consideradas, e quando a mesma proteína foi identificada por diferentes fragmentos de MS/MS, só foi considerada aquela que apresenta o escore mais alto (CHAMBERY et al., 2009; LI, G. Z. et al., 2009).

4.8 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{1}H RMN

As amostras do SV conservadas em nitrogênio líquido foram processadas para a análise do metaboloma no Laboratório de Química Analítica da Universidade Estadual de Campinas.

Experimentos de ^{1}H, uni e bi-dimensionais foram adquiridos em espectrômetro Bruker Advance III®, operando a 400.13 MHz para ^{1}H, equipado com sonda de alta resolução sob rotação no ângulo mágico (HRMAS) de 4 mm de tripla ressonância (HCP).

4.8.1 Protocolo de aquisição dos espectros

Foram utilizados experimentos de supressão de duplo-sinal de solvente e água via onda contínua e gradientes de campo pulsados, além de sequências 1D que utilizam metodologias adiabáticas em suas sequências de pulsos ZGF2PR (Tabela 5) e CPMG (Tabela 6).

Tabela 5 - Parâmetros do espectrômetro Bruker Advance III® para a aquisição de uma sequência 1D ZGF2PR (dupla supressão de sinal) para obter espectros de ^{1}H das amostras do SVEB sem raça definida. São Paulo, 2012

Parâmetros	**Ajustes**
Solvente	H_20 + D_20 + DMSO
Calibração com amostra padrão	H_20 + D_20 (δ = 4,7 ppm)
	DMSO (δ = 2,6 ppm)
Temperatura da amostra	300k
Sequência de Pulso	1D ZGF2PR
Supressão de água	Modelagem de excitação
Ângulo do pulso de excitação	90
Ângulo de re-orientação do pulso	180
Tempo de relaxamento	3s
Dimensão direta da largura de varredura	3200Hz
Dimensão indireta do número de pontos dos dados	16384
Dimensão indireta da largura de varredura	50Hz
Número de transientes	Tipicamente 8/incremento
N° de Scans	Ns = 256
Tempo de aquisição	Tipicamente ±16 min

Tabela 6 - Parâmetros do espectrômetro Bruker Advance III® para a aquisição de uma sequência 1D CPMG (t2*) para obter espectros de ^{1}H das amostras de SVEB sem raça definida. São Paulo, 2012

Parâmetros	**Ajustes**
Solvente	$H_20 + D_20$
Calibração com amostra padrão	$H_20 + D_20$ (δ = 4,7 ppm)
Temperatura da amostra	300k
Sequência de Pulso	1D CPMG (*spin-eco* t2)*
Supressão de água	Modelagem de excitação
Ângulo do pulso de excitação	90
Ângulo de re-orientação do pulso	180
Tempo de relaxamento	4s
Dimensão direta da largura de varredura	6010Hz
Dimensão indireta do número de pontos dos dados	16384
Dimensão indireta da largura de varredura	50Hz
Número de transientes	Tipicamente 8/incremento
N° de Scans	Ns = 256
Tempo de aquisição	Tipicamente ±20 min

Duas amostras da mesma idade gestacional do saco vitelino de embriões bovinos foram colocadas no rotor e avaliadas no espectrômetro Bruker Advance III® durante 30 minutos na unidimensional e 12 horas no bidimensional. A RMN-HRMAS permitiu uma análise direta de pequenas quantidades de tecido, ou seja, no máximo 20mg, mantendo este material intacto, sem a necessidade de tratar a amostra. Através de métodos de aquisição unidimensional 1D, foram realizados espectros de ^{1}H e iniciado a identificação das estruturas de metabólitos endógenos, presentes em concentrações sub-milimolares (ppm), envolvidos em diferentes vias bioquímicas. Para a discriminação entre os diferentes estágios do saco vitelino de embriões bovinos, foram investigadas as variações entre as amostras e a observação direta dos espectros. Foram utilizadas sequências 1D de saturação, filtro T2 e realizadas espectros de ^{1}H. Após a aquisição dos espectros os dados foram processados no programa TopSpin® e iniciado a identificação e caracterização dos sinais pelo busca nos bancos de dados e na literatura científica.

4.9 QUIMIOLUMINESCENCIA

4.9.1 Detecção das concentrações da alfafetoproteina (AFP) e do antígeno carcino-embrionário (CEA)

As amostras de SVEB frescos foram coletadas e armazenados no nitrogênio liquido. A metodologia utilizada esteve de acordo com Molina et al. (2000). A membrana vitelino foi macerada e submetida a lise celular mediante a adição de tampão de lise, de acordo com Galdos (2010b).

Foram determinadas as concentrações proteicas totais das amostras do SVEB pelo método de Bradford (1976).

O método para a determinação quantitativa de AFP é um imunoensaio de quimioluminescência em sanduiche. Um anticorpo monoclonal de camundongo é revestido por partículas magnéticas (fase sólida). Outro anticorpo monoclonal é ligado a um derivado de isoluminol (conjugado de anticorpos isoluminol). Durante a primeira incubação o AFP ou CEA presentes nos calibradores, nas amostras e nos controles liga-se ao anticorpo monnoclonal de fase sólida e, subsequentemente, após o passo da lavagem numa segunda incubação, o conjugado do anticorpo reage com o AFP ou CEA que já estão ligados na fase sólida. Apòs da incubação, o material não ligado é removido mediante um ciclo de lavagem. Em seguida, adicionam-se os reagentes iniciadores que induzem uma reação de quimioluminescência. O sinal luminoso e, por conseguinte, a quantidade de conjugado anticorpo-isoluminol, é medido por um fotomultiplicador em unidades relativas de luz (RLU, *relative light units*) e é indicativo da concentração do marcador presente nos calibradores, nas amostras ou nos controles.

5 RESULTADOS

Os resultados apresentados foram distribuídos da seguinte maneira: para microscopia de luz, eletrônica de varredura e transmissão foram utilizadas cinco amostras para cada técnica. Para análise de citometria de fluxo e metabolômica foram utilizadas 12 amostras de saco vitelino em diferentes IG, para cada técnica e 15 amostras foram utilizadas para a análise proteômica. Seis grupos experimentais foram estabelecidos de acordo com os intervalos da IG estimada, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Divisão dos grupos experimentais e número de amostras do SVEB, de acordo com as idades gestacionais estimadas (IG) por Crown-Rump (CR). São Paulo, 2012

GRUPO	N	IG (dias)	CR (mm)
I	12	23 – 27	5,11 – 8,80
II	13	28 – 32	9,20 – 14,90
III	5	33 – 37	16,20 – 20
IV	10	38 – 42	20,94 – 24,80
V	7	43 – 47	28,15 – 31,30
VI	7	48 - 52	36,39 - 45

5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SVEB

O SVEB localizado na porção ventral do embrião apresentou uma forma bifurcada bastante alongada nas fases iniciais do período embrionário (Figura 8). Nas fases mais avançadas do desenvolvimento embrionário ocorreu o enovelamento das extremidades do saco vitelino em direção ao cordão umbilical.

Ao analisar a sequencia e eventos que fazem parte do desenvolvimento do saco vitelino, observamos aos 25 dias de gestação o embrião em forma de C, constituído por pedículo embrionário, tubo neural, somitos, saliência

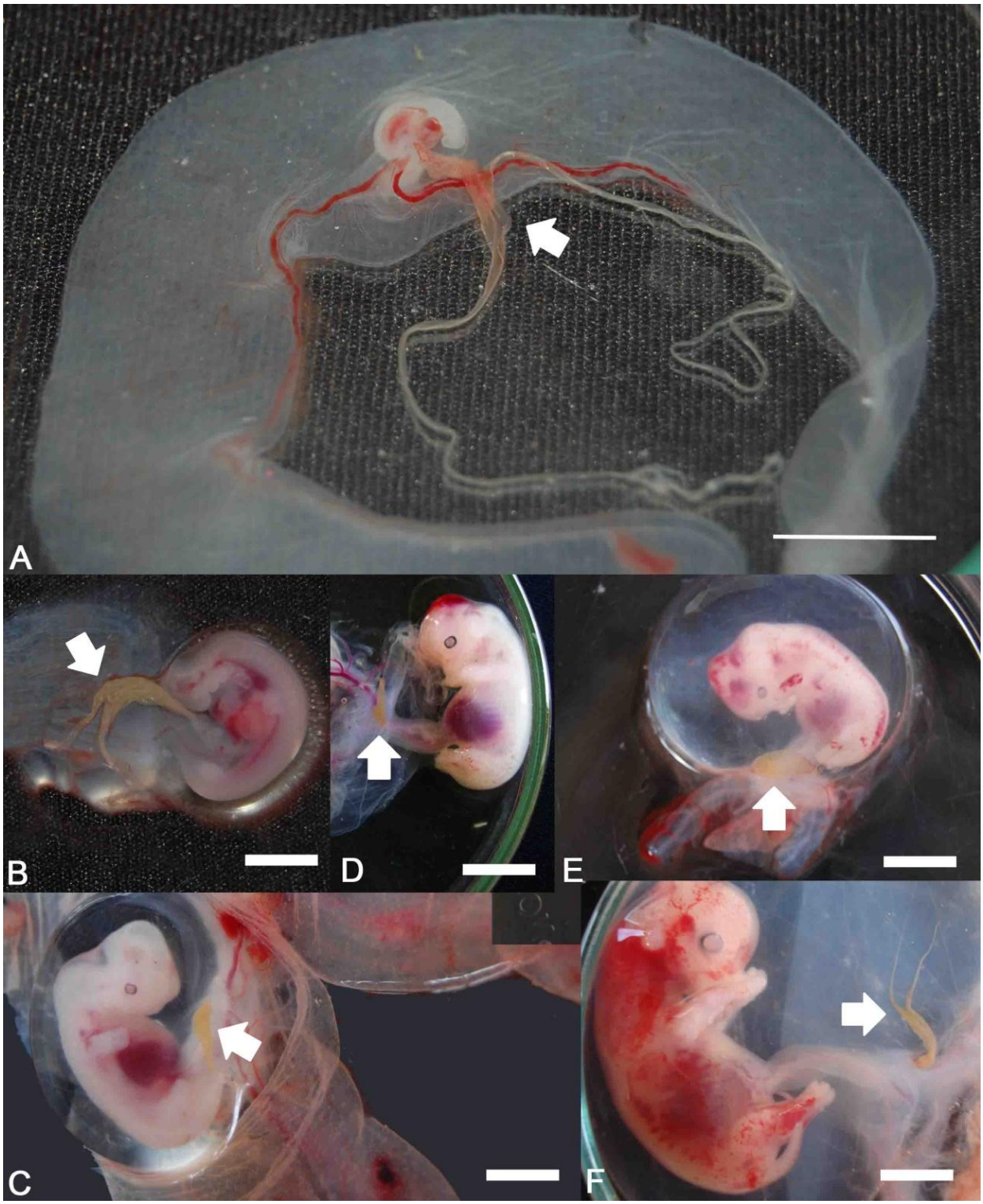
cardíaca, arco mandibular, somitos, neuróporo cranial, neuróporo caudal e estomodeu.

Com 29 dias de gestação, inicia a formação dos membros torácicos e os arcos faríngeos já estão presentes no embrião. Distingue-se a região encefálica, área cardíaca e somitos. O saco vitelino está próximo à membrana amniótica que envolve o embrião.

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.

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 as extremidades dos membros bipartidos.

Figura 7 - Fotografias de embriões bovinos apresentando o saco vitelino e membranas extraembrionárias em diferentes idades gestacionais. São Paulo, 2012



Fotografia de embriões bovino em vista lateral direita (A, C e F) e vista lateral esquerda (B, D e E) Pertencentes aos grupos I(23-27), II(), III(28-32), IV(38-42), V(43-47) e VI(48-52) dias de gestação. Nas flechas podemos observar a extensão do saco vitelino, bifurcado e sua relação topográfica com o saco corioalantóico e amniótico. Barra: 1cm

No saco vitelino de embriões bovinos, as células endodermais, cobrem a cavidade do saco vitelino e o mesotélio volta-se para a cavidade extra-celômica. Ambos apresentaram epitélio simples durante todo o período embrionário analisado e microvilosidades pequenas identificadas pela microscopia eletrônica de transmissão.

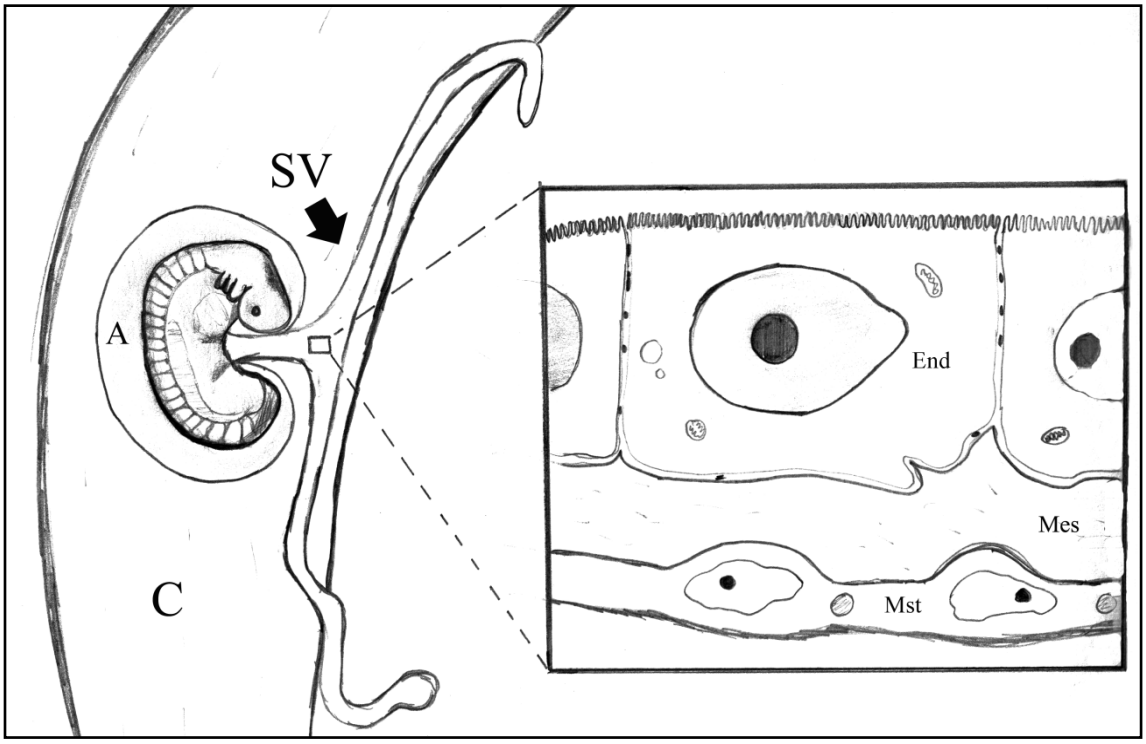
As células endodermais desenvolvem um extensivo sistema de retículo endoplasmático rugoso, numerosas vesículas e mitocôndrias com formas e tamanhos variados. Durante o desenvolvimento embrionário, o aparelho de golgi mudou de posição da região apical para a basal, ou seja mais próximo do núcleo, revertendo a polaridade das células. As células endodérmicas apresentaram características citológicas sugestivas de atividade secretória ou de síntese por causa do grande número de vesículas de secreção e vacúolos.

A superfície do epitélio endodermal apresentou projeções das vesículas endodérmicas dilatadas, às quais localizam-se sob a camada epitelial endodérmica (Figuras 10C, 10D e 10E). Os orifícios endodermais foram observados frequentemente na microscopia eletrônica de varredura (Figura 10D) na superfície do epitélio endodérmico, abrindo-se para a cavidade do saco vitelino. Estes orifícios são a continuidade do lúmen das vesículas endodérmicas e estão envolvidas pelas células endodérmicas (Figura 10B). Também observou-se invaginações basais das células endodérmicas no mesênquima (Figura 10H).

As células mesoteliais desenvolvem um extensivo sistema de absorção em seu ápice, enquanto grandes grânulos aumentam na região basal do citoplasma. As células mesoteliais apresentam extenso depósito de glicogênio, mas pouca mitocôndria e pouco retículo endoplasmático rugoso.

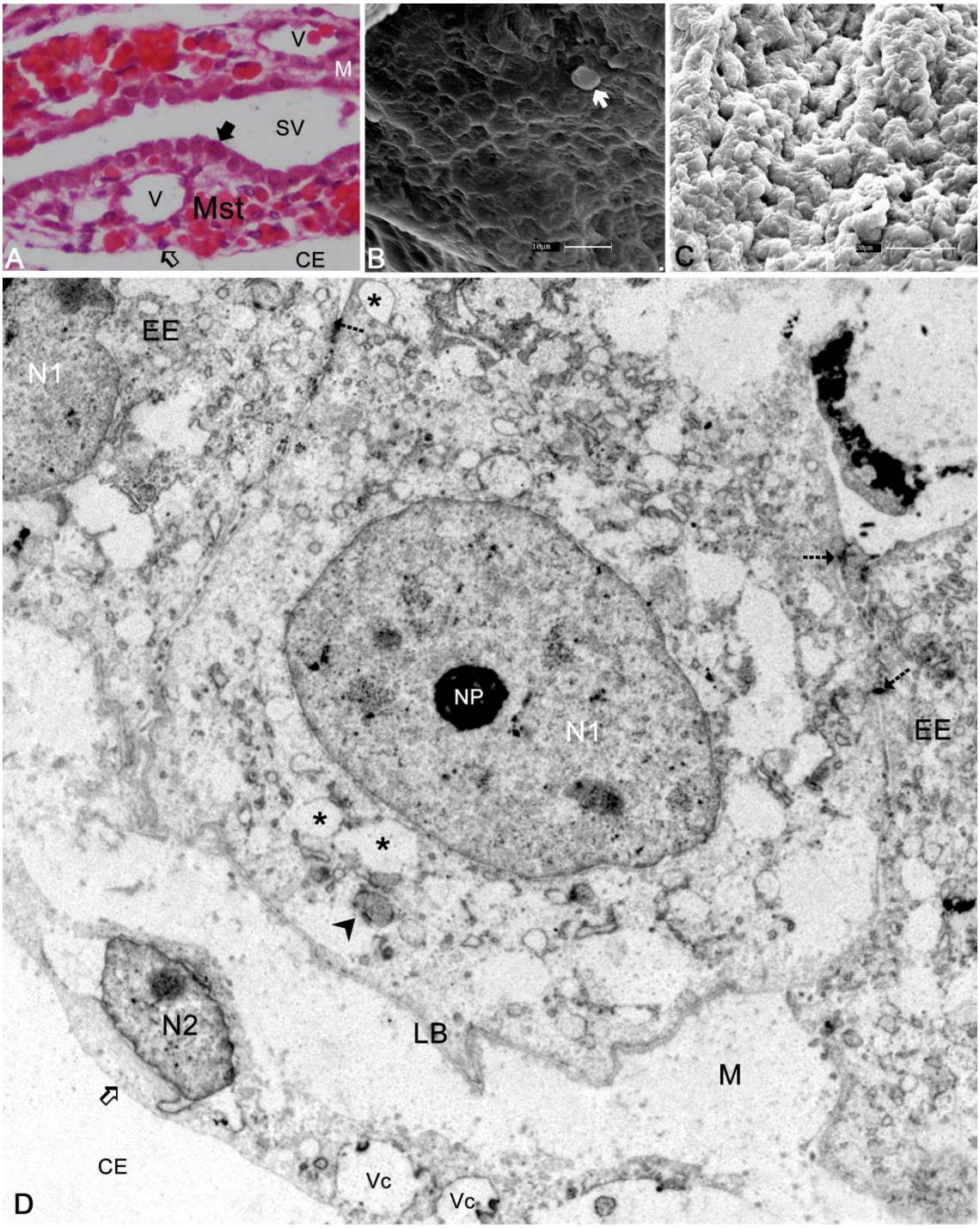
Na ML e MET foi encontrado uma divisão da parede do saco vitelino, uma camada endodermal interna que comunica com a cavidade do SVEB, uma camada mesotelial externa que comunica com a cavidade exocelômica e uma camada mesenquimal que esta situada no médio das outras camadas (Figura 9).

Figura 8 - Ilustração do SVEB de 26 dias de gestação. Apresentamos as camadas: (End) Endodermal, (Mes) mesenquimal e (Mst) mesotelial. (A) âmnio, (C) corio



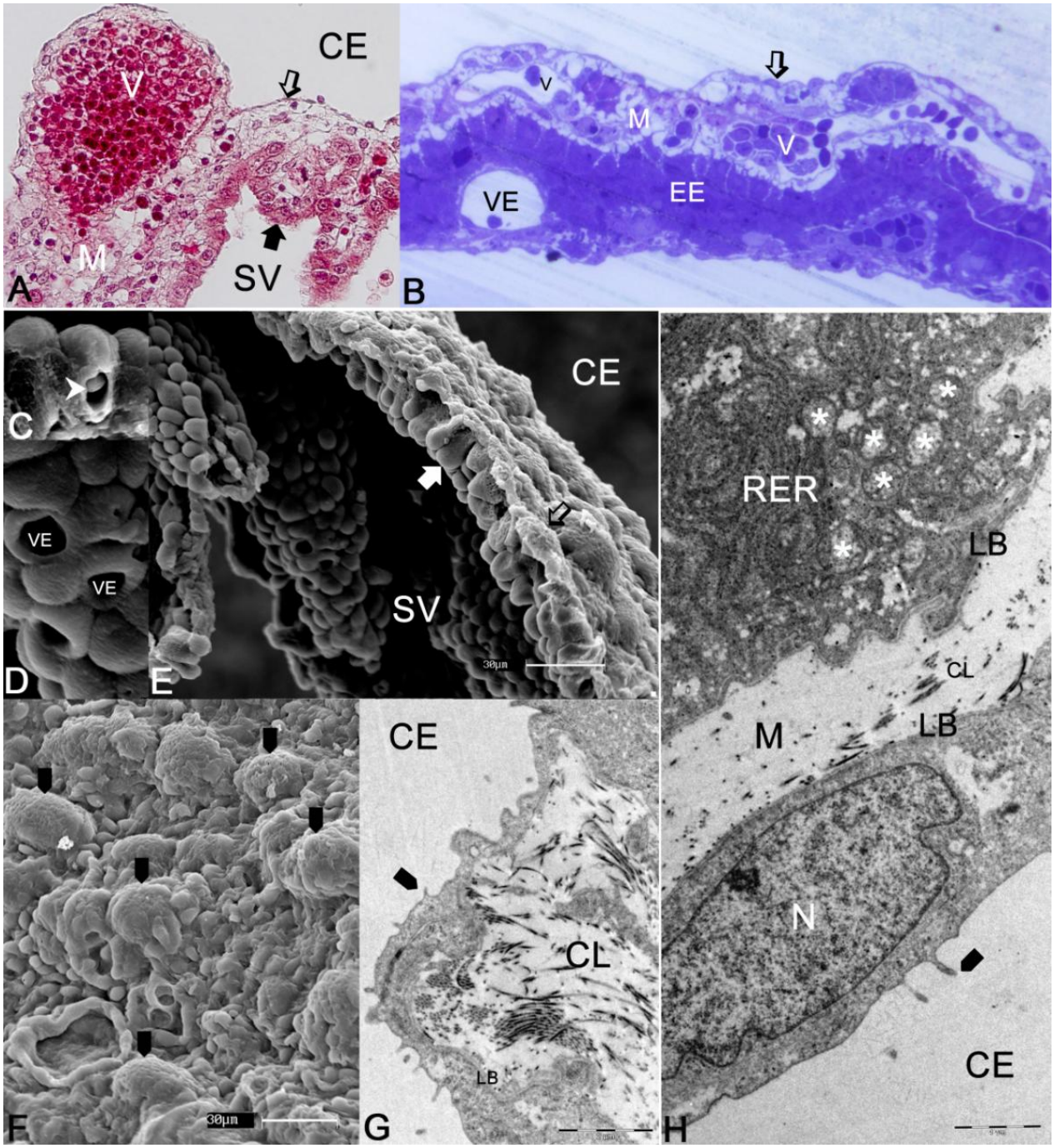
Fonte: Galdos-Riveros et al. (2012)

Figura 9 - Fotomicrografia (A) e eletromicrografias de varredura (B e C) e transmissão (D) do SVEB do grupo I (23 a 27 dias de gestação). São Paulo, 2012



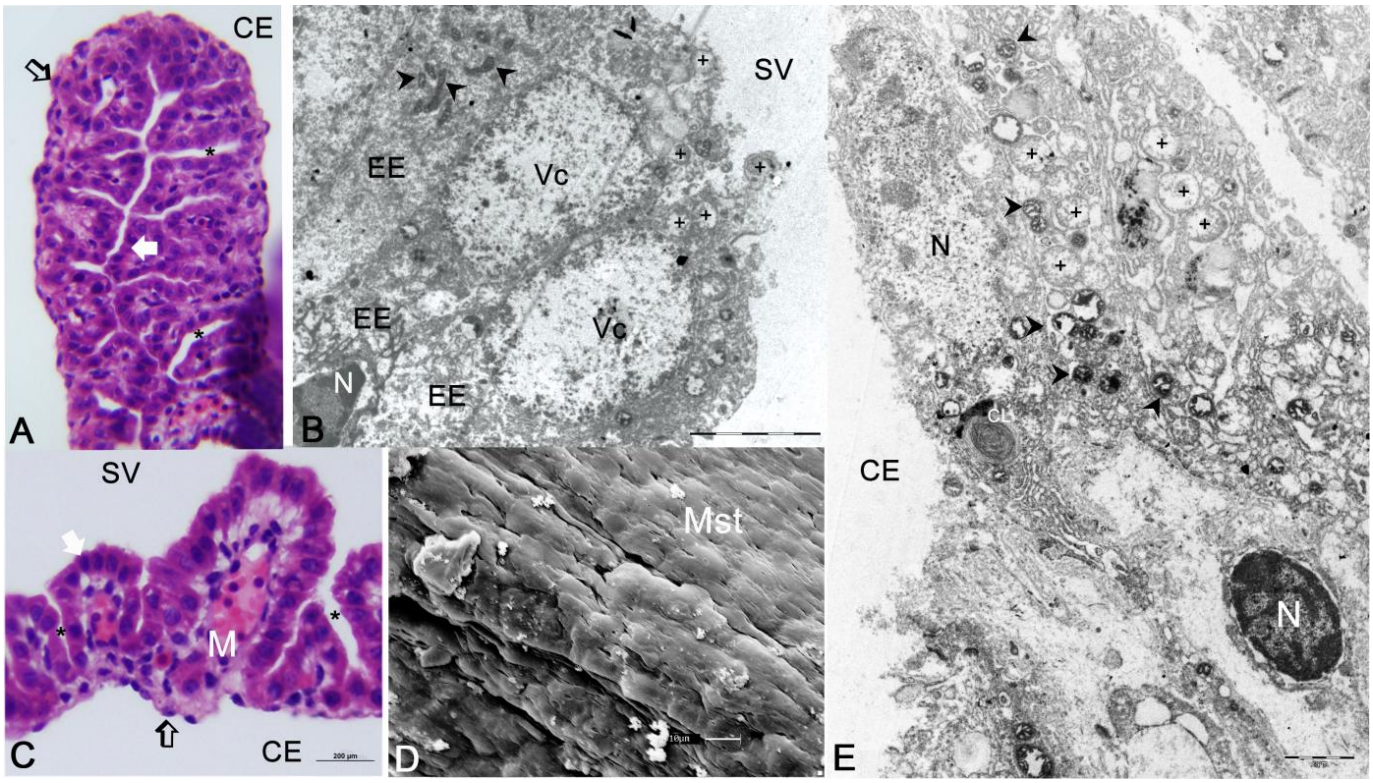
(A) Imagem histológica do saco vitelino colorado com HE (20x). B) superfície endodermal na qual observamos eritrócito (seta branca). C) superfície mesotelial (Mst) na qual observamos as projeções das microvilosidades. D) Corte transversal da parede do saco vitelino evidenciando a lâmina basal (LB), nucléolo proeminente (NP), o núcleo da célula endodermal (N1) e da célula mesotelial (N2), além de vacúolo do mesotélio, mitocôndria (➢), desmossomos (⇢) e vacúolo vazio provavelmente preenchido por lipídeos que foram dissolvidos (∗). Observar: cavidade do saco vitelino (SV), cavidade extra-celômica (CE), endoderme (➡), mesênquima (M), mesotélio (⇨),vaso sanguíneo (V), célula endodermal (EE)

Figura 10 - Fotomicrografias (A e B) e eletromicrografias de varredura (C, D, E e F) e transmissão (G e H) do saco vitelino de embriões bovinos do grupo II (28 a 32 dias de gestação). São Paulo, 2012



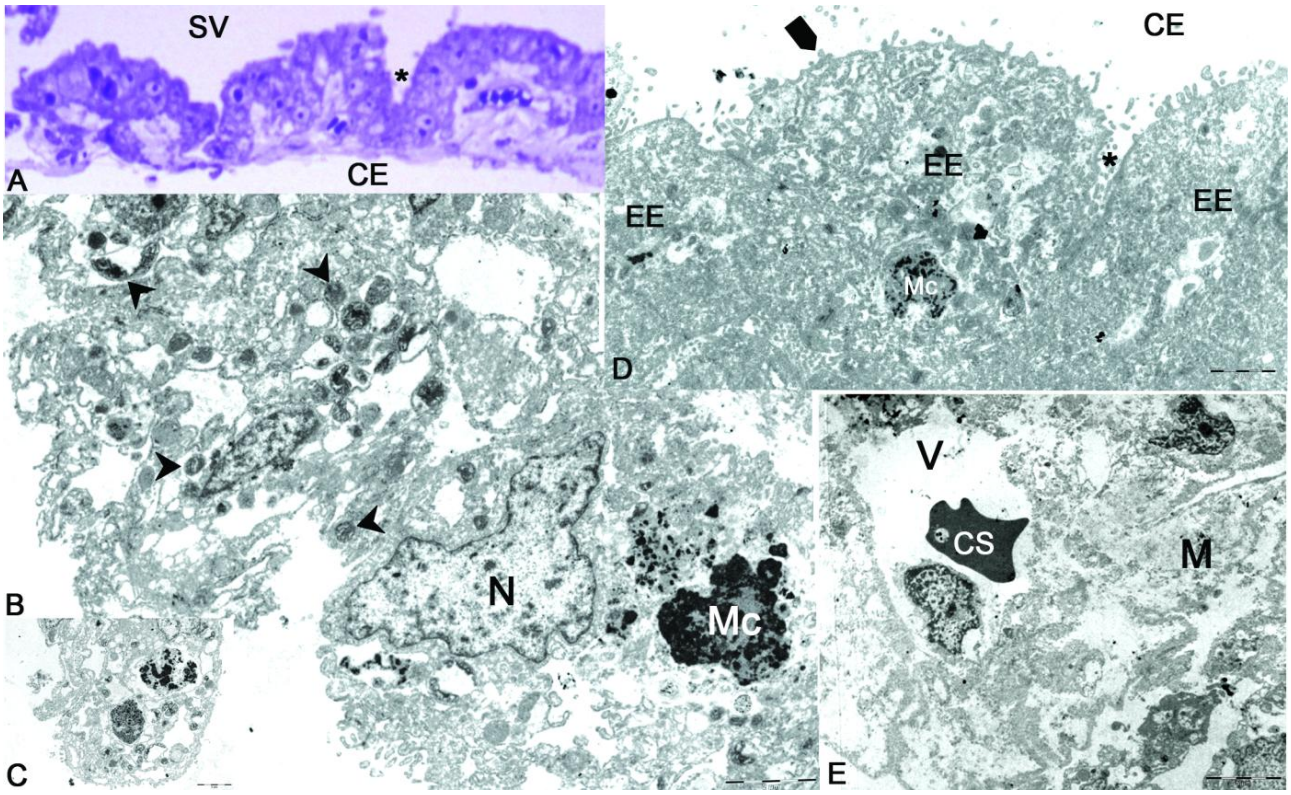
(A,B) Imagem histológica do saco vitelino colorado com HE (40x) e azul de toluidina (20x) no qual podemos observar a vesícula endodermal (VE). C,D) superfície endodermal na qual observamos secreção dentro da vesícula endodérmica (cabeça de seta branca) e vesículas endodérmicas abertas. E) Corte transversal da parede do saco vitelino no qual observamos o epitélio colunar simples da camada endodermal. F) superfície mesotelial (Mst) na qual observamos as projeções das microvilosidades (➨). G) Camada mesotelial e mesênquima com fibras colágenas (CL). H) Corte transversal da parede do saco vitelino evidenciando a lâmina basal (LB), núcleo da célula mesotelial (N), retículo endoplasmático rugoso (RER) e vesícula de secreção (∗). Observar: cavidade do saco vitelino (SV), cavidade extra-celômica (CE), endoderme (➡), mesênquima (M), mesotélio (⇨), vaso sanguíneo (V), célula endodermal (EE)

Figura 11 - Fotomicrografias (A e C) e eletromicrografias de varredura (D) e transmissão (B e E) do saco vitelino de embriões bovinos do grupo IV (38 a 42 dias de gestação). São Paulo, 2012



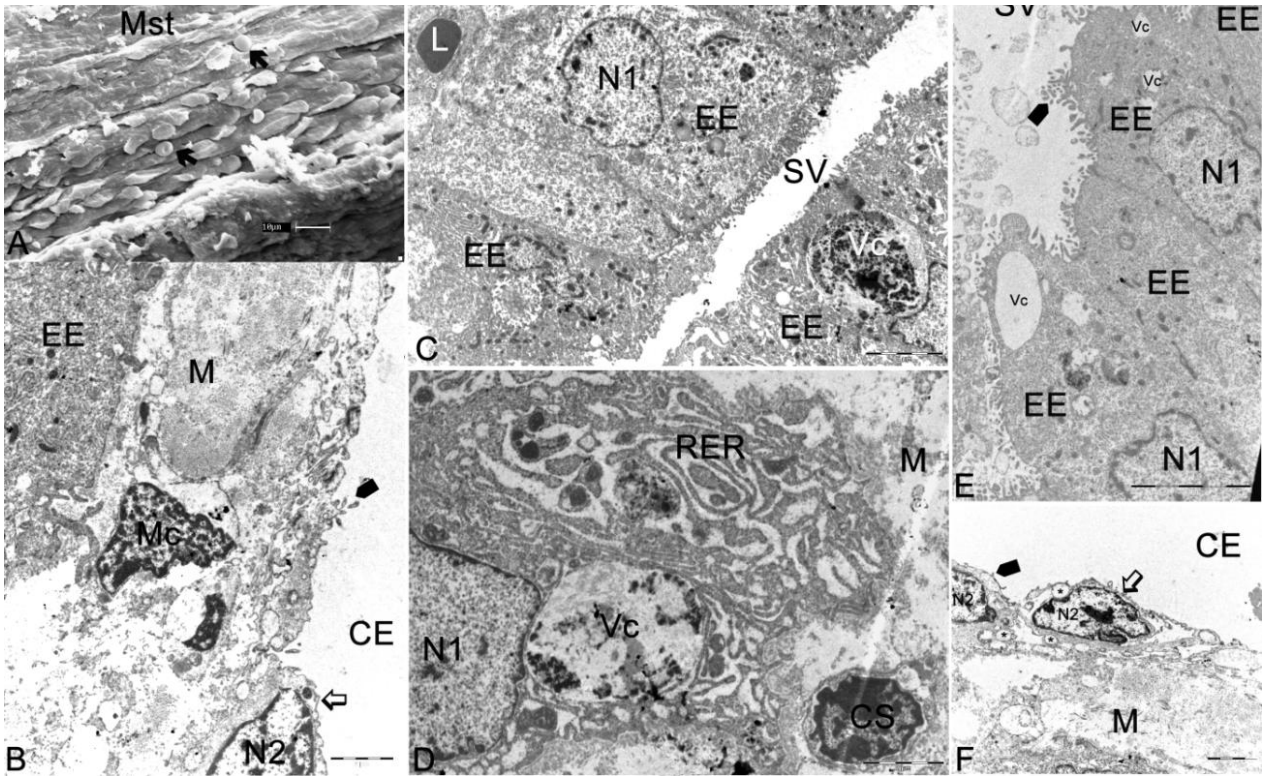
(A,C) Imagens histológica do saco vitelino colorado com HE (40x e 60x). B) Porção apical das células endodermais (EE) com vesículas de secreção (+) e mitocôndrias alongadas (➢). D) superfície mesotelial (Mst). E) Camada mesodermal e endodermal. Observar: cavidade do saco vitelino (SV), cavidade extra-celômica (CE), endoderme (➡), mesênquima (M), mesotélio (⇨), núcleo (N)

Figura 12 - Fotomicrografia (A) e eletromicrografias de transmissão (B, C, D e E) do saco vitelino de embriões bovinos do grupo V (43 a 47 dias de gestação). São Paulo, 2012



(A) Imagem histológica do saco vitelino colorado com azul de toluidina (20x) no qual podemos observar canalículos (∗) entre as dobras da parede do saco vitelino. B, C,D) superfície endodermal na qual observamos mitocôndrias (➢). E) Mesênquima com vaso sanguíneo. Observar: cavidade do saco vitelino (SV), cavidade extra-celômica (CE), endoderme (➡), mesênquima (M), mesotélio (⇨), célula endodermal (EE), microvilosidade (➨). núcleo (N), macrófago (Mc), eritrócito (CS), vaso sanguíneo (V)

Figura 13 - Eletromicrografias de varredura (A) e transmissão (B, C, D, E e F) do saco vitelino de embriões bovinos do grupo VI (48 a 52 dias de gestação). São Paulo, 2012



(A) Superfície mesodermal (Mst) na qual observamos eritrócitos (➔). B) Corte transversal da parede do saco vitelino no qual observamos o mesênquima com macrófago (Mc) e microvilosidades na superfície mesodermal. C) Conjunto de células endodermais apresentando grande vacúolo (Vc). D) Região basal da célula endodermal em contato com o mesênquima, notar a grande quantidade de cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER) e eritrócito (CS) no mesênquima. E) Região apical das células endodermais com microvilosidades e vacúolos. F) União das células mesodermais com o mesênquima. Observar: cavidade do saco vitelino (SV), cavidade extra-celômica (CE), mesênquima (M), mesotélio (⇨), núcleo célula endodérmica (N1), núcleo célula mesordérmica (N2), vaso sanguíneo (V), célula endodermal (EE), vacúolo (Vc), estrutura arredondada com conteúdo homogêneo, provavelmente gotas de lipídeos (L), microvilosidades (➨)

5.2 ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS

Com o intuito de determinar o perfil metabolômico do saco vitelino de embriões. Foi realizada a análise do saco vitelino de embriões bovinos divididos em quatro grupos diferentes encontrou-se 13 metabólitos (Tabela 8). Esses metabólitos são Aspartato (Asp), Taurina (Tau), Sn-glicero-3-fosfocolina (GFC), Creatinina (Cre), 5,6-Dihidrouracila (DHU), Glutamato (Glut), Glutamina (Gluta), Alanina (Ala), Lactato (Lact), Cadaverina (Cav), Lisina (Lis), Valina (Val), Mio-inositol (Mio), Colina (Co) (Figura14 – 17).

Figura 14 - Figura do metaboloma do saco vitelino: Em A, podemos observar Espectro 2D RMN identificando 2 metabólitos principais que foram encontrados no espectro 1D RMN em B. Estes são a glicerofosfocolina mais a colina(GFC+Col) nas amostras de SVEB de 25 dias de gestação

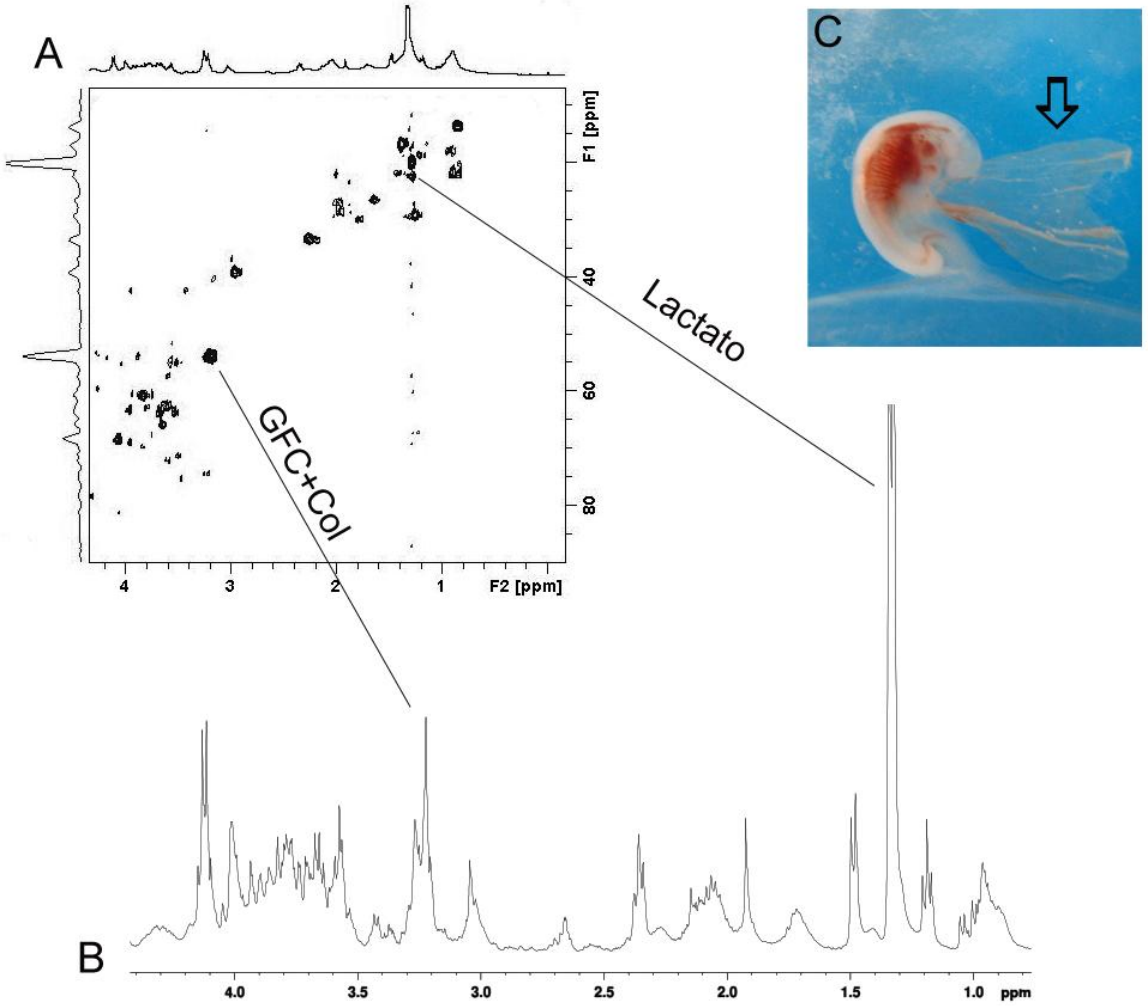


Figura 15 - Espectro de 1H RMN (Intensidade x deslocamento químico em ppm) para uma amostra de SVEB com 26° dia de gestação

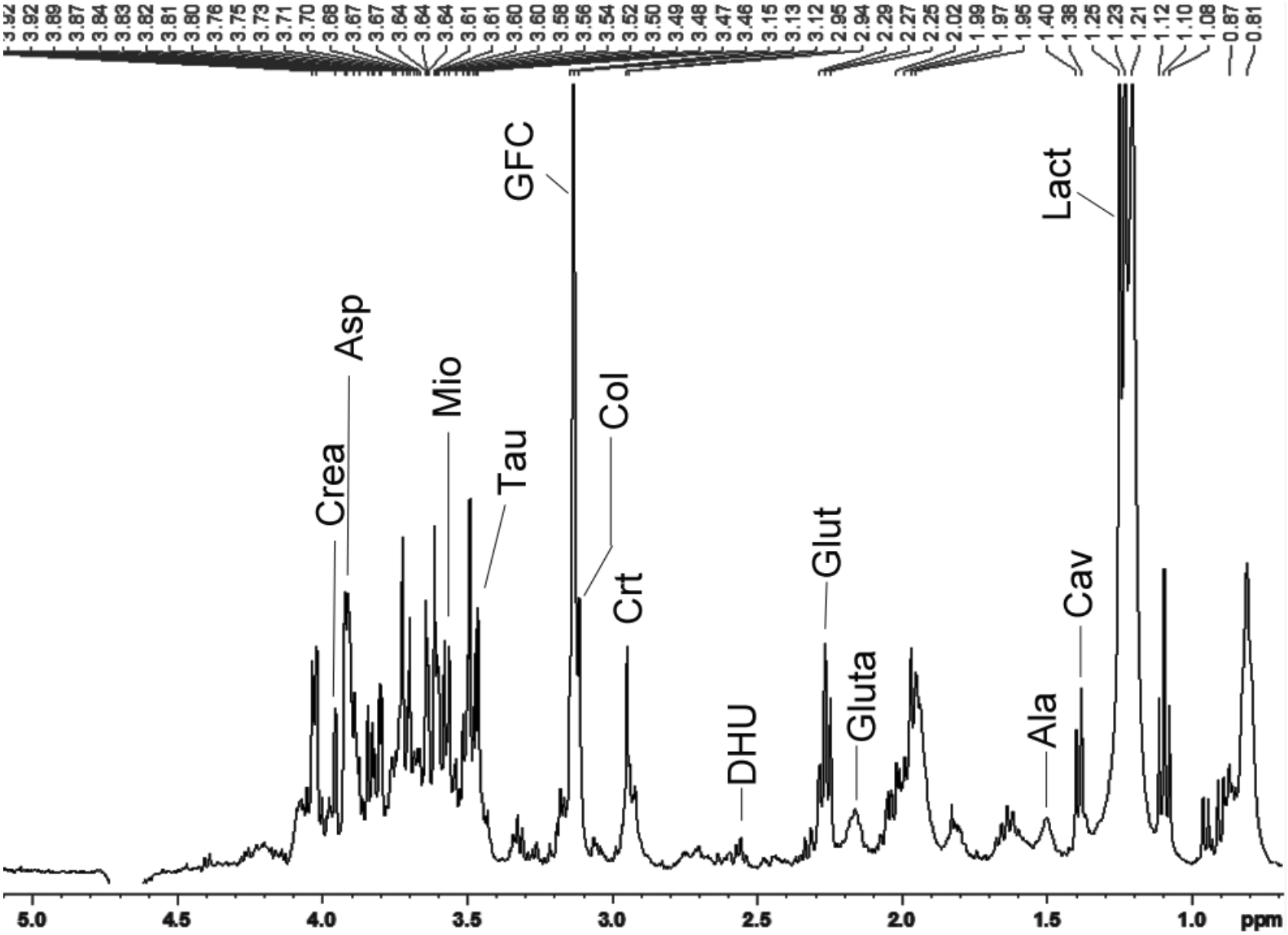


Figura 16 - Espectro de 1H RMN (Intensidade x deslocamento químico em ppm) para uma amostra de SVEB com 35° dia de gestação

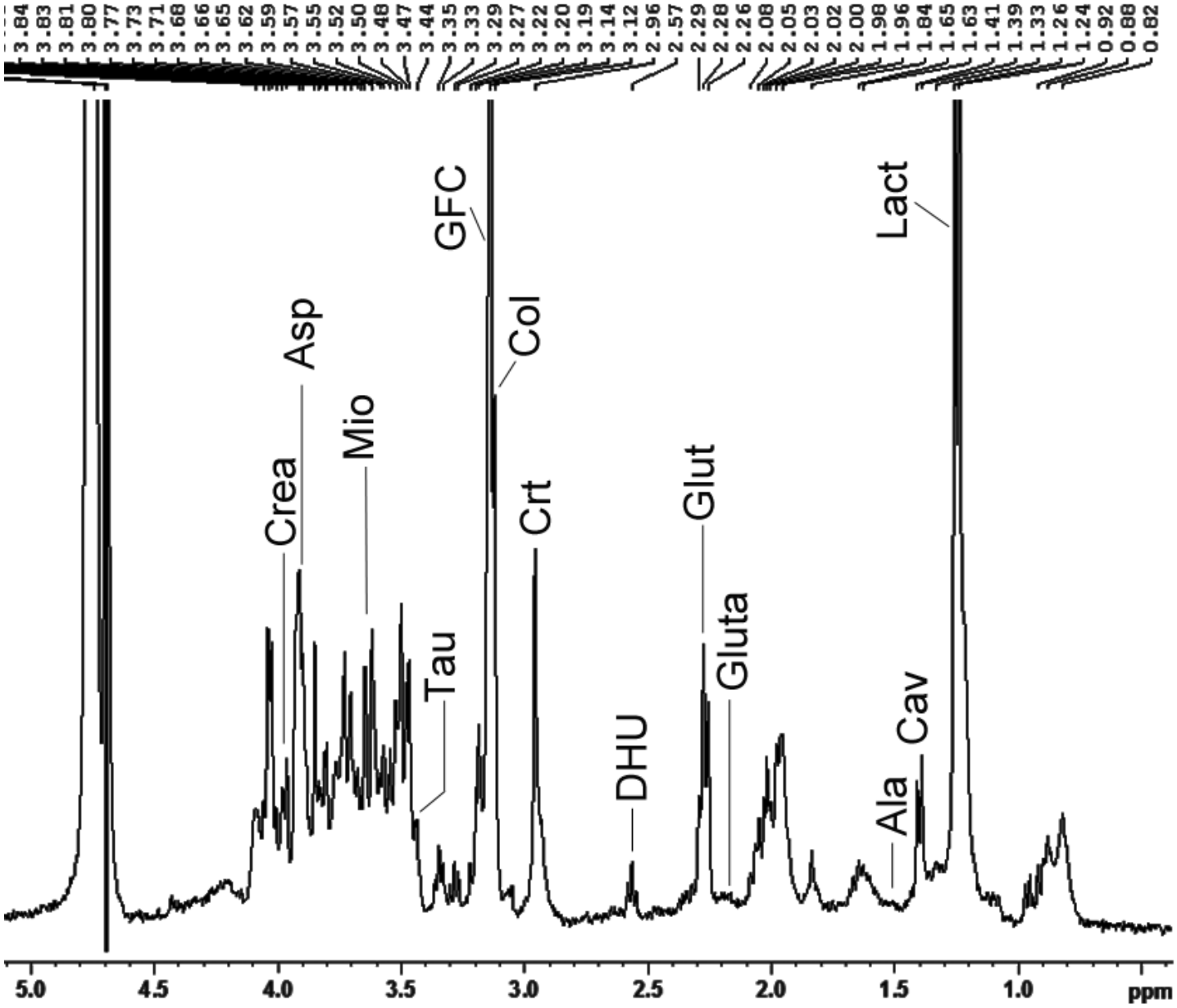


Figura 17- Espectro de 1H RMN (Intensidade x deslocamento químico em ppm) para uma amostra de SVEB com 38° dia de gestação

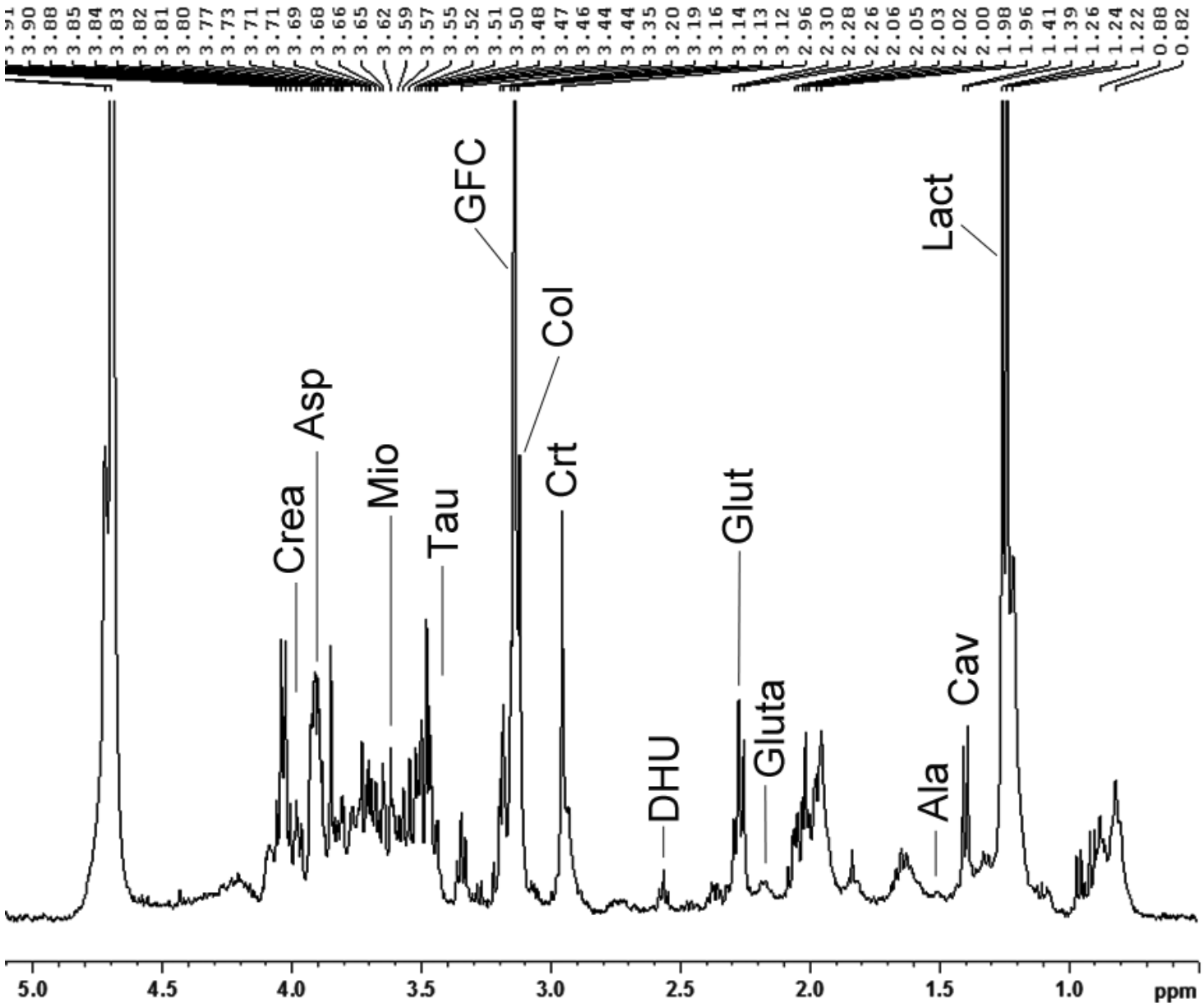


Figura 18 - Espectro de 1H RMN (Intensidade x deslocamento químico em ppm) para uma amostra de SVEB com 41° dia de gestação

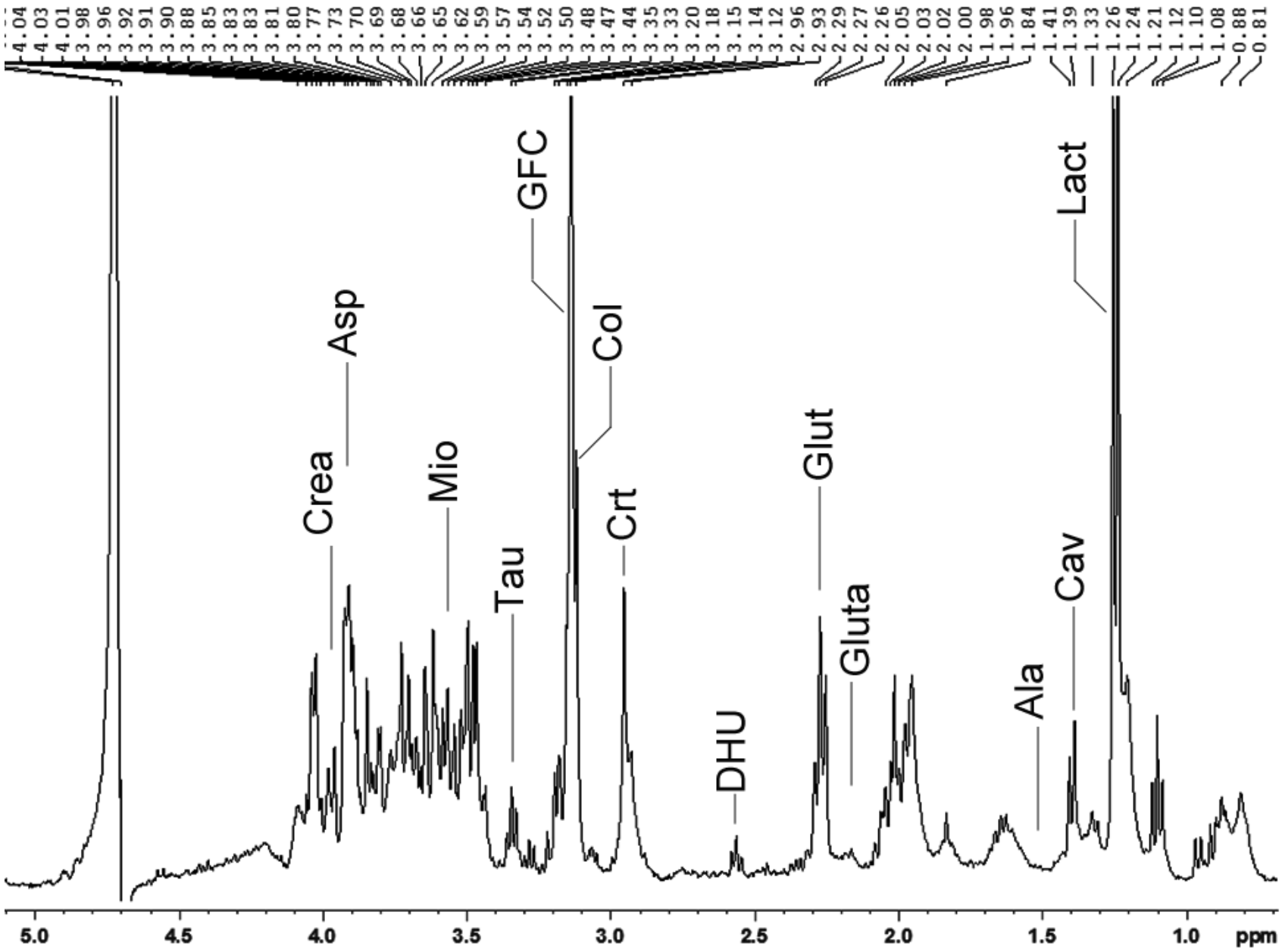


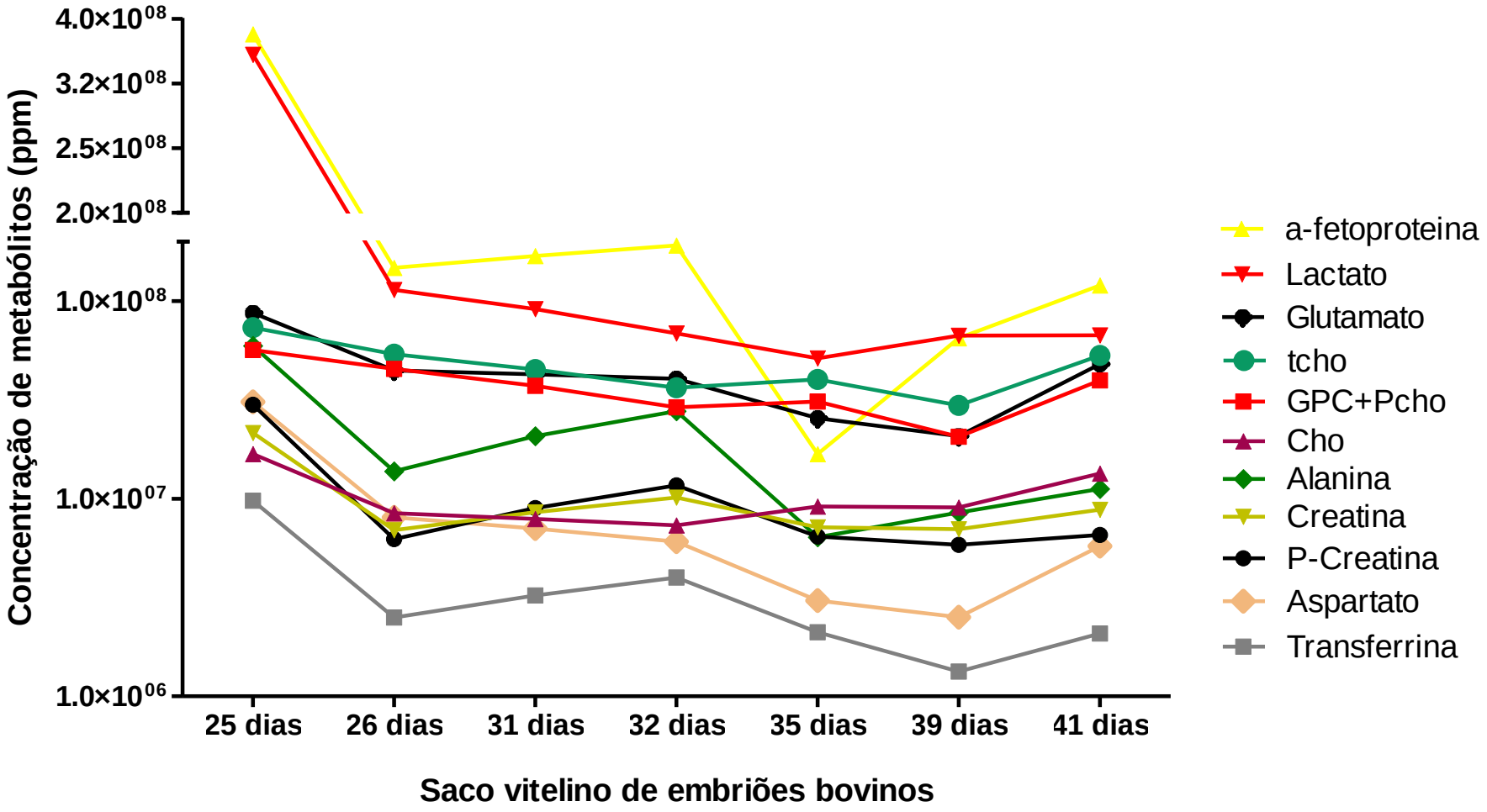
Tabela 8 - Atribuições dos deslocamentos químicos para os metabólitos identificados nos espectros de 1H RMN das amostras do saco vitelino de embriões bovinos. São Paulo, 2012

Deslocamento químico / ppm	**Molécula**	**Atribuições**	**Classificação**
3,96	Creatina	ε-CH2	Metabolismo de Aminoácidos
3,92	Aspartato	α-CH	Aminoácido
3,54	Mio-inositol	C1H, C3H	Vitamina
3,44	Taurina	S-CH_2	Metabolismo da Cisteina
3,15	Glicerofosfocolina	N-CH_2	Vitamina
3,12	Colina	N-CH_2	Vitamina
2,95	Creatinina		Metabolismo de Aminoácidos
2,59	5,6-hidrouracila		Metabolismo de Pirimidinas
2,25	Glutamato	γ-H	Aminoácido
1,7 3,17	Cadaverina		Metabolismo dos pigmentos biliares
1,25	Lactato	β-CH_2	Metabolismo dos carboidratos
1,5	Alanina	β-CH_3	Aminoácido
2,12	Glutamina	β-CH_2	Aminoácido

Os metabólitos identificados no saco vitelino de embriões bovinos estão envolvidos nas principais vias metabólicas, o lactato está envolvido no metabolismo da cisteina, do propanoato e do piruvato. A creatina é um componente no metabolismo da arginina e prolina, da glicina, serina e treonina. A valina é um aminoácido essencial, atua como componente na biosíntese do RNAt. O metabólito Aspartato atua no metabolismo de alanina, arginina, cisteina, glutamato, histidina, nitrogênio, fenilalanina, purinas e tirosina.

O metabólito 5,6-dihidrouracila atua como componente do metabolismo da β-alanina e no metabolismo da pirimidina. O mio-inositol atua no metabolismo de glicerofosfolipideos e do fosfato de inositol. O metabólito Sn-glicero-3-fosfocolina atua no metabolismo de lipídeos. A colina atua como componente no metabolismo de glicerofosfolipideos, glicina, serina e treonina e no metabolismo de glicoesfingolipídeos. A alanina foi encontrada somente no grupo I, de idade gestacional de 26 dias de gestação bovina.

Gráfico 3 – Gráfico das concentrações em ppm dos metabólitos encontrados no SVEB nas diferentes idades gestacionais



5.3 ANÁLISE DO PERFIL PROTEÔMICO DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS

Na análise das proteínas do saco vitelino de embriões bovinos foram encontradas 14 sequências randômicas no pool de amostras do saco vitelino de embriões bovinos. Destas 314 sequências, 139 correspondem a proteínas unicas (Tabela 9).

Tabela 9 – Lista de proteínas expressas no saco vitelino de embriões bovinos. São Paulo, 2012 (Continuação)

Nome da proteina	Refseq ID	Protein simbol	UniPROT ID	Massa média	Score	Contagem de peptídeo	Cobertura de sequência (%)
Actin alpha skeletal muscle	NP_776650.1	ACTA1	P68138; A4IFM8	42037,1796	4574,648	15	30,24
Alpha 2 actin	NP_001029674.1	ACTA2	Q58DT9; A58DT9; P62739; Q0PEU1; Q28539	31075,91718	4582,47	17	40,05
Actin cytoplasmic 1	**NP_776404.2**	**ACTB**	**P60712; D7RIF5; P60713; A0S012; Q9MZW1; Q4JHR5; Q9XSX8; Q9TTW4; Q865G0; Q0PGG4; A1XSX3; O46401; Q862P9; Q4U3D1; A3QP66**	**24738,37017**	**12394,41**	**23**	**61,33**
Actin alpha cardiac muscle 1	NP_001029757.1	ACTC1	Q3ZC07	42019,1203	4574,648	17	42,18
Actin cytoplasmic 2	**NP_001028790.1**	**ACTG1**	**P63258**	**41792,9956**	**12394,41**	**24**	**66,13**
Actin gamma enteric smooth muscle	NP_001013610.1	ACTG2	Q5E9B5	41877,0298	4574,648	17	42,29
Alpha actinin 1	NP_001030428.1	ACTN1	A4ZZF8; Q3B7N2	102851,0162	24,3365	12	3,92
Alpha actinin 3	NP_001069625.1	ACTN3	Q0III9	103151,2112	10,5472	9	3,22
Alpha actinin 4	NP_001091521.1	ACTN4	A5D7D1	104928,3155	21,1741	12	4,61
Alpha fetoprotein	NP_001029434.1	AFP	Q3SZ57	68587,9201	293,2043	25	28,85
Alpha 2 HS glycoprotein	NP_776409.1	AHSG	B0JYN6; P12763	38418,8793	148,4649	14	28,41
SERUM ALBUMIN	NP_851335.1	ALB	P02769; P02769; B0JYQ0; P14639; B3VHM9; Q3I349	66217,98057	290,495	21	21,42
Annexin A2	NP_777141.1	ANXA2	A2SW69; Q2Q1M6; P04272	38541,09253	80,4194	9	14,16
Annexin A5	NP_001035567.3	ANXA5	P81287	36088,9259	52,0994	5	11,21
ARHGAP18 protein	NP_001104242.1	ARHGAP18	A6QQF8	60166,751	32,4475	8	10,07
Rho GDP dissociation inhibitor 1	NP_788823.1	ARHGDIA	P19803; Q58DT6	21385,6757	137,7607	2	20,1
Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	NP_001068722.1	ATIC	Q0VCK0	64482,8509	33,0891	10	10,98
ATP synthase subunit beta mitochondrial	NP_786990.1	ATP5B	P00829	56283,6257	53,1378	7	8,52
ATRIP protein	NP_001096800.1	ATRIP	A5D7S1	85562,6715	19,001	7	3,55
BSD domain containing protein 1	NP_001030198.1	BSDC1	Q3SX22	50342,795	27,1908	6	10,63
Calreticulin	NP_776425.1	CALR	P52193; A5D7J6	48068,13475	28,8096	3	9,11
Cofilin 1 Non muscle	NP_001015655.1	CFL1	B0JYL8; Q6B7M7; Q5E9F7	18518,615	517,4674	4	35,54
Creatine kinase B type	NP_001015613.1	CKB	Q5EA61	42719,5111	71,1276	3	2,89

(Continuação)

Clathrin heavy chain 1	NP_776448.1	CLTC	P49951	191589,1052	27,5925	24	8,12
DDX17 protein	NP_001095463.1	DDX17	A7E307	72311,5878	21,7162	13	3,85
DEAD Asp Glu Ala As box polypeptide 19B	NP_001039695.1	DDX19B	Q2YDF3	54444,8618	22,1398	10	13,64
Desmin	NP_001075044.1	DES	O62654	53531,9318	9,9669	7	7,02
Dihydropyrimidinase related protein 2	NP_001069468.1	DPYSL2	O02675	62277,7058	189,9244	14	19,41
DPYSL3 protein	NP_001094538.1	DPYSL3	A7MBI5	73988,5125	130,1928	10	11,7
Elongation factor 1 alpha 1	NP_776960.1	EEF1A1	P68103; Q862L7; Q862R6; O18787; Q30B72	27596,0928	517,3575	6	17,53
Elongation factor 1 alpha 2	NP_001032541.1	EEF1A2	Q32PH8	50470,2832	69,9282	4	4,54
Elongation factor 1 delta	NP_001193549.1	EEF1D	A5D989; Q717R8	30981,1941	108,1164	8	25
Elongation factor 2	NP_001068589.1	EEF2	Q3SYU2	95368,479	39,0547	11	6,18
Eukaryotic initiation factor 4A I	NP_001029400.1	EIF4A1	Q3SZ54	46154,0758	1347,793	6	25,12
Eukaryotic initiation factor 4A II	NP_001029216.1	EIF4A2	Q3SZ65	46402,4014	1355,524	7	12,53
Eukaryotic translation initiation factor Eif4a2	NP_001029216.1	EIF4A2	Q9XT93	6993,6177	1336,292	1	25,4
Eukaryotic initiation factor 4A III	NP_001039653.1	EIF4A3	Q2NL22	46841,1513	1363,475	8	16,06
Alpha enolase	NP_776474.2	ENO1	Q9XSJ4	47326,241	109,9591	13	11,75
EPS15L1 protein	NP_001095341.1	EPS15L1	A7MB30	88004,5777	19,0669	15	8,91
FBLN1 protein	NP_001091498.1	FBLN1	A5D7S8	77530,7448	16,2068	7	5,95
Fermitin family homolog 3	NP_001032695.1	FERMT3	Q32LP0	75782,7451	16,2529	7	1,95
Fetuin B	NP_001029390.1	FETUB	Q58D62	42663,4269	73,5626	7	12,66
Filamin A Fragment	NP_001193443.1	FLNA	Q8WMQ6; Q95LH5	51236,0522	109,3548	12	15,53
Cumulus cell specific fibronectin 1 transcript variant	NP_001157250.1	FN1	B8Y9T0; P07589; B8Y9S9	261237,4136	19,7097	15	3,48
Fascin homolog 1 actin bundling protein Strongylocentrotus purpuratus	NP_001030217.1	FSCN1	Q3MHK9	54785,5176	54,7094	6	6,09
Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase Fragment	NP_001029206.1	GAPDH	Q28554; D7R7V6; P10096; Q8HY38; Q6DQI7; Q0QES8; Q712W6; A9YF36; Q95329; Q95KM2	25515,77703	638,106	9	15,22
Guanine nucleotide binding protein G I G S G O subunit gamma 12	NP_777210.1	GNG12	Q28024	8057,2977	61,9403	4	40,28
General transcription factor II I	NP_001095647.1	GTF2I	A7MB80	110125,2241	13,7279	7	8,38
Histone H2A J	NP_001071557.1.	H2AFJ	Q3ZBX9	14019,4234	587,0848	2	21,71

(Continuação)

Histone H2B type 1	NP_001032546.1	H2B	P62808	13906,1627	582,8015	7	41,27
Histone H4	**NP_776305.1**	**H4**	**P62803; Q6STH8**	**11534,55025**	**1864,986**	**7**	**63,11**
Hemoglobin subunit alpha	**NP_001070890.2**	**HBA**	**P01966; P01966; P01967; P01968; P09423; Q9TSN9; Q9TSN7; Q9XSK1; P01969; Q9TSN8; Q28743; Q28745; Q28744; C6ZP47; Q0ZA50; C6ZP44; Q4TU70; C6ZP52; C6ZP50; P68239; P04237; C6ZP43; P0CH26; C6ZP49; P21379; P68240; C6ZP48; P01971; C6ZP46; P0CH25**	**14669,33682**	**5048,144**	**17**	**57,04**
Hemoglobin subunit beta	NP_776342.1	HBB	P04245; P02073; D4QBE7; P02070; P04346; D4QBF3, P02070; D4QBD6; D4QBB8; D4QBD7; D4QBE2; D4QBD2, D4QBE6; D4QBD1; D4QBD0; D4QBD5; D4QBF1; D4QBB4; D4QBC5; D4QBD8; D4QBE8; D4QBB3; D4QBF7; P02072; P09422; D4QBF0; P67820; D4QBB5; P67819; A8E197; D4QBF4; A8E196; Q1KYZ5; P68057; P68058; P02078; P68056; P21380; P02077; Q1KYZ8; A8E199; P02074; A8E1A0; Q1KYZ9; Q1KYZ7; P02083; Q1A2D1; P02076; Q1KZF3; P02075; P02082; Q1KYZ6; P01972	15592,45732	368,0495	6	15,86
Hemoglobin subunit epsilon 1	NP_001103977.1	HBE1	P02102; Q28322	9622,0601	915,9321	5	27,21
Hemoglobin fetal subunit beta	NP_001014902.1	HBG	P02081	15859,2526	923,7631	7	40
Histone H2A type 1	NP_001092190.1	HIST1H2AG	P0C0S9	14091,4956	587,0848	2	21,54
Histone H2B	NP_001039711.1	HIST1H2BD	Q2KII5	13936,189	582,8015	7	41,27
Histone H2B type 1 N	NP_001075211.1	HIST1H2BM	Q32L48	13923,1065	582,8015	7	41,27
Histone H2B type 1 K	NP_001071531.1	HIST1H2BN	Q2M2T1	13875,1486	582,8015	7	41,27
Histone H2A type 2 C	NP_001075189.1	HIST2H2AC	A1A4R1	13988,3928	587,0848	2	21,71
Histone H2A	NP_001091566.1	HIST3H2A	A4IFU5	14121,4815	587,0848	2	21,54
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	NP_001039376.1	HNRNPA1	P09867	34196,2613	147,2033	4	10
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2 B1	NP_001039440.1	HNRNPA2B1	Q2HJ60	36006,0464	103,5322	12	23,46
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	NP_001029734.1	HNRNPK	Q3T0D0; D5K776	49900,5915	189,3822	7	17,67
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U Scaffold attachment factor A	NP_001070388.2	HNRNPU	A2VDN7	90452,546	97,7018	14	8,85

(Continuação)

Heat shock protein alpha	NP_001012688.1	HSP90AA1	A8DR93; Q76LV2; A9P323; Q8HZJ7;	69052,6173	172,1185	14	11,05
Heat shock protein HSP 90 beta	NP_001073105.1	HSP90AB1	Q76LV1	83253,3541	166,9842	13	9,67
Endoplasmin	NP_777125.1	HSP90B1	Q95M18	92426,8787	38,3699	14	9,2
Heat shock 70 kDa protein 1A	NP_776975.1	HSPA1A	Q27975; Q27965; C5IZH4; Q4U0F3; A7XV32	70265,2211	363,846	13	13,42
Heat shock 70 kDa protein 1 like	NP_001161367.1	HSPA1L	P0CB32	70389,2207	365,8197	11	10,45
Heat shock 70kDa protein 1A	NP_776769.1	HSPA2	A7E3Q2; Q9TUG3; P34933	69805,25233	435,8913	10	16,35
78 kDa glucose regulated protein	NP_001068616.1	HSPA5	Q0VCX2; C7EDP1; C7EDP2; Q4TVY4	64164,19693	183,9229	14	19,85
Heat shock cognate 71 kDa protein	NP_776770.2	HSPA8	P19120; Q861V2	39264,4055	446,2567	15	16,77
Heat shock protein beta 1	**NP_001020740.1**	**HSPB1**	**Q3T149; Q58DP7**	**19974,43845**	**1359,322**	**9**	**56,72**
Integrin alpha 4 subunit	NP_777173.1	ITGA4	Q9BGU3	115449,0579	15,5096	11	7,94
Inositol 1 4 5 trisphosphate receptor type 1	NP_777266.1	ITPR1	Q9TU34	308207,7396	19,834	36	4,1
L lactate dehydrogenase A chain	NP_776524.1	LDHA	A0A1F3; P19858; D1MGL8	36616,767	50,0784	5	18,67
L lactate dehydrogenase B chain	NP_776525.1	LDHB	Q5E9B1; A0FH35; B0JYN3; A0FH34	36736,99698	103,5301	4	14,97
Similar to galactose binding lectin Fragment	NP_786976.1	LGALS1	Q862G9; P11116; Q862W2	12803,16887	250,2883	2	43,27
LMNB1 protein	NP_001096765.1	LMNB1	A7YY47	66421,3465	48,4584	12	11,26
Minichromosome maintenance complex component 4	NP_001068626.1	MCM4	Q148N1	93661,9583	15,6055	9	5,26
Malate dehydrogenase cytoplasmic	NP_001029800.1	MDH1	Q3T145	36438,2893	124,8286	8	17,96
MS4A13 protein	NP_001070009.1	MS4A14	Q29RT3	97385,6397	14,3145	13	7,78
Myosin light chain kinase smooth muscle	NP_788809.1	MYLK	Q28824	128825,59	19,321	9	2,72
Myosin X	NP_776819.1	MYO10	P79114	235839,95	11,6916	21	3,22
Protein DJ 1	NP_001015572.1	PARK7	Q5E946	20035,3658	484,889	8	46,03
Poly rC binding protein 1	NP_001015565.1	PCBP1	Q5E9A3	37497,9524	56,3866	7	14,04
Proliferating cell nuclear antigen Fragment	NP_001029666.1	PCNA	Q95L57; Q3ZBW4	21009,99665	44,9862	5	14,75
Protein disulfide isomerase family A member 3	NP_776758.2	PDIA3	C6JUQ0; D3K382; A5D7E8; P38657	56972,7741	254,1696	21	30,3
PDIA6 protein Fragment	NP_001193274.1	PDIA6	A6QNL5	49624,242	122,304	11	12,8
Profilin 1	NP_001015592.1	PFN1	P02584	15057,4193	1372,361	5	45,71
Phosphoglycerate mutase 1	NP_001029226.1	PGAM1	Q3SZ62	28852,0587	300,0703	6	13,78

(Continuação)

6 phosphogluconate dehydrogenase decarboxylating	NP_001137210.1	PGD	Q3ZCI4	53077,1872	36,1122	5	7,87
Phosphoglycerate kinase 1	NP_001029471.1	PGK1	Q3T0P6; B7TJ13	44551,7682	47,9319	7	12,23
Phosphatidylinositol 4 kinase alpha	NP_777002.1	PI4KA	O02811	229393,202	9,3027	12	2,94
PIK3R6 protein	NP_001095498.1	PIK3R6	A7MBD5	82221,8248	12,3089	4	4,86
Peptidyl prolyl cis trans isomerase	NP_847890.1	PPIA	Q864S5	17674,7795	1234,296	5	35,85
Peroxiredoxin 2	NP_777188.1	PRDX2	Q9BGI3	21946,042	273,1748	7	48,74
Peroxiredoxin 4	NP_776858.1	PRDX4	Q9BGI2	30741,267	105,7711	6	16,06
cGMP dependant type II protein kinase	NP_001137571.1	PRKG2	D5HSX1	87089,8664	10,6904	8	3,15
Rab GTPase binding effector protein 2	NP_001076877.2	RABEP2	A4FUG8	65602,3803	26,157	10	4,79
mRNA cap guanine N7 methyltransferase	NP_001092412.1	RNMT	A6H761	55163,6263	6,3369	4	5,24
60S acidic ribosomal protein P1	**NP_001020511.1**	**RPLP1**	**Q56K14**	**11513,9643**	**318,4153**	**3**	**51,75**
40S ribosomal protein S7	NP_001092344.1	RPS7	A6H769	22126,8754	200,1752	3	19,59
Ribosomal protein AS	NP_776804.1	RPSA	D5HKJ4; A6YRY8; P26452; Q862H8	29315,76025	153,2564	4	15,25
Alpha 1 antiproteinase	NP_776307.1	SERPINA1	P12725; P34955	46044,43565	95,9763	11	14,66
Serpin H1	NP_001039528.1	SERPINH1	Q2KJH6	46506,7241	183,9073	5	8,85
SH2D3C protein	NP_001091508.1	SH2D3C	A5D7L2	94300,169	19,4464	11	7,91
Smoothelin	NP_001070347.1	SMTN	Q08DZ4	97776,4721	7,6847	5	2,77
Sorting nexin 17	NP_001015638.1	SNX17	Q5EA77	52825,3001	23,0201	9	9,57
Serrate RNA effector molecule homolog	NP_001077177.1	SRRT	A4IFB1	100566,6253	10,8529	5	3,54
Stress induced phosphoprotein 1	NP_001030569.1	STIP1	Q3ZBZ8	62482,1712	53,696	5	6,45
Stathmin	NP_001029962.1	STMN1	Q3T0C7	17302,5427	1288,301	6	31,54
SUB1 protein	NP_001098877.1	SUB1	A7YWC6	14369,3376	237,5148	1	18,9
Beta tubulin Fragment	NP_001040014.1	TBB2B	O46399	17365,9292	755,5238	1	9,27
Tubulin beta 3 Fragment	NP_001029835.1	TBB2C	Q19RN6	20050,4306	759,8384	2	8
Transketolase	NP_001003906.1	TKT	A7E3W4; A7Z014; A5PJ79; Q6B855	67087,51068	92,8159	13	19,46
Tripeptidyl peptidase 2	NP_001092504.1	TPP2	A5PK39	138361,283	33,4888	20	9,93
TRIM2 protein	NP_001077204.1	TRIM2	A4IF63	81476,2967	21,5848	8	10,35
TRIO protein	NP_001095682.1	TRIO	A6QQZ8	152215,1	33,7833	8	2,07

(Conclusão)

Tubulin alpha	**NP_001159977.1**	**TUBA1A**	**D0VWZ0**	**50135,7829**	**4853,406**	**18**	**51,44**
Tubulin alpha 1B chain	NP_001108328.1	TUBA1B	P81947; Q9MZB0	37969,20105	4872,69	18	51,44
Tubulin alpha 1C chain	NP_001029376.1	TUBA1C	Q3ZCJ7	49857,4117	4601,358	16	43,21
Tubulin alpha 1D chain	NP_001039875.1	TUBA1D	Q2HJ86	50282,9375	4848,699	17	42,48
Tubulin alpha 3 chain	NP_001033252.1	TUBA3E	Q32KN8	49925,68	1010,664	19	43,56
Tubulin alpha 4A chain	NP_001071626.1	TUBA4A	P81948; C5ISA2	49924,5663	997,3086	13	26,12
Tubulin alpha 8 chain	NP_001070563.1	TUBA8	Q2HJB8	50053,6829	503,1475	13	20,04
Tubulin beta chain	NP_001003900.1	**TUBB2A**	D0VWY9; Q148E2; Q6B856	45512,40593	7616,384	8	26,07
Tubulin beta 5 chain	NP_001040014.1	TUBB2B	Q2KJD0	49670,9835	8091,664	10	39,41
Tubulin beta 2C chain	NP_001029835.1	TUBB2C	Q3MHM5	49831,1803	7491,071	11	40,22
Tubulin beta 3 chain	NP_001070595.1	TUBB3	Q2T9S0	50432,8616	2509,956	7	23,33
Tubulin beta 4 chain	NP_001029869.1	TUBB4	Q3ZBU7	49585,9449	5920,728	8	36,26
Beta tubulin Fragment		**TUBB5**	**C7F7S5**	**18247,5144**	**6852,654**	**5**	**55,09**
Tubulin beta 6 chain	NP_001039838.1	TUBB6	Q2HJ81	49900,3073	2271,765	6	14,35
Ubiquitin like modifier activating enzyme 1	NP_001095947.1	UBA1	A3KMV5	117830,2142	51,9241	17	8,22
UBA6 protein	NP_001076907.1	UBA6	A4FV03	118733,1519	18,1028	13	6,62
Vimentin	**NP_776394.2**	**VIM**	**P48616; A4ZYA6; Q9MZA9; Q862F9**	**33526,40378**	**622,9016**	**21**	**51,07**
X ray radiation resistance associated protein 1 Fragment	NP_976069.1	XRRA1	Q7PCK7	62036,8779	24,2891	10	6,19
14 3 3 protein zeta delta	NP_777239.1	YWHAZ	P63103; P29361; Q7M332; Q29443	37934,66113	47,9353	8	13,47

5.4 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR E MORTE CELULAR DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS

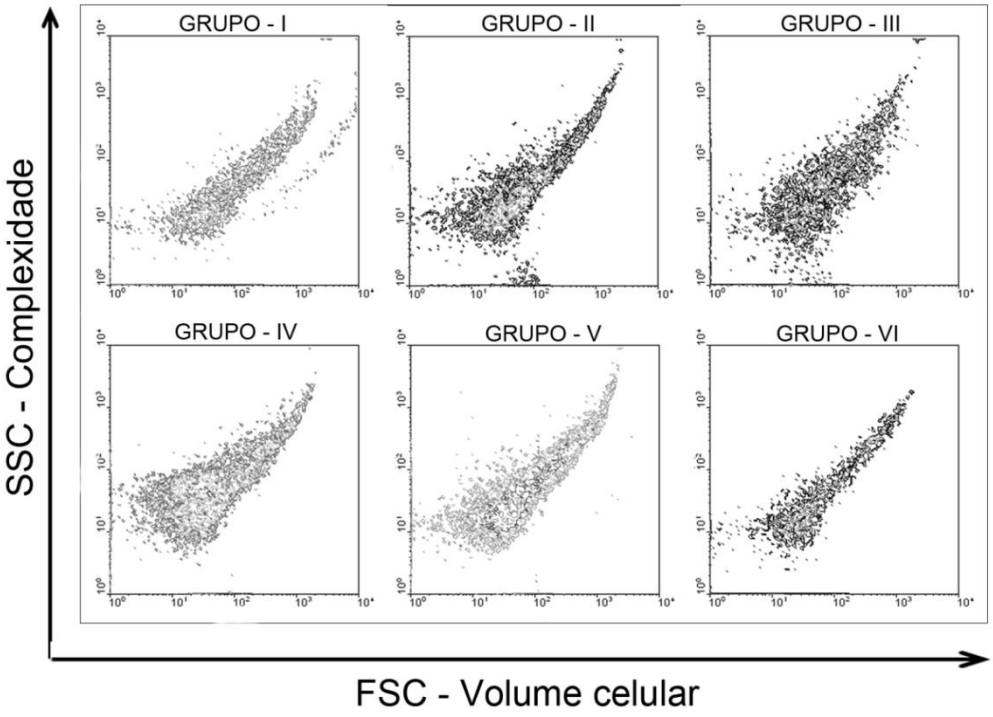
5.4.1 **Fases do ciclo celular**

Após a digestão das amostras do SVEB das diferentes idades gestacionais, mantidos em nitrogênio liquido (N_2), as células obtidas foram morfologicamente analisadas no citômetro de fluxo.

Os resultados obtidos e apresentados nos *dotplot* da figura 19 mostraram a definição de uma única população celular presente em todas as amostras dos grupos I – VI; sendo estas homogeneamente distribuídas.

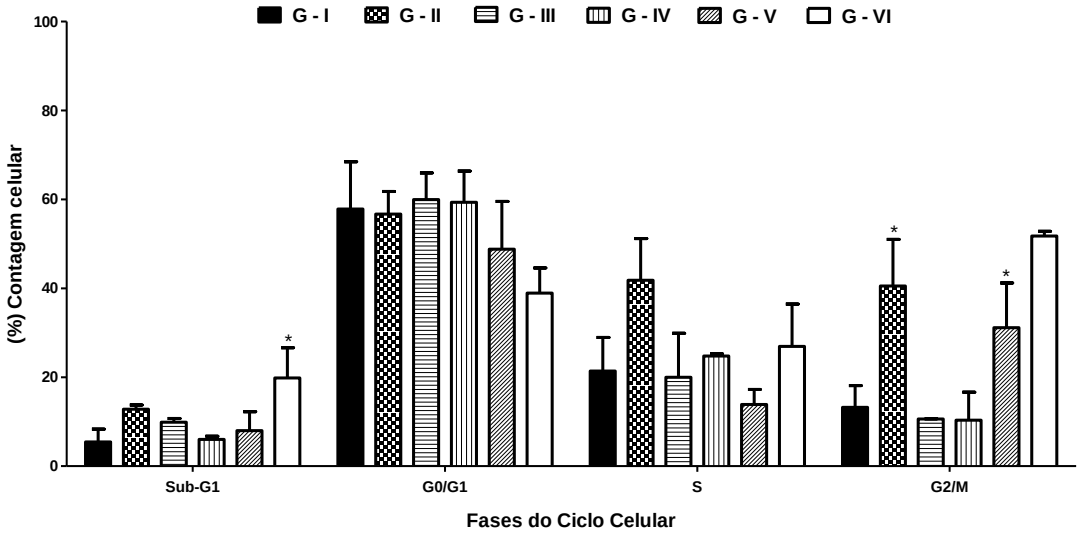
O gráfico 3 corresponde a analise das fases do ciclo celular nos 6 grupos conformados por amostras de SVEB: Grupo I (23 - 27 dias), Grupo II (28 - 32 dias), Grupo III (33 - 37 dias), Grupo IV (38 – 42 dias), Grupo V (43 – 47 dias) e Grupo VI (48 – 52 dias).

Gráfico 4 – Gráfico *dotplot* obtidos das amostras de SVEB por citometria de fluxo



Nossos resultados demonstraram que há um aumento das células haplóides com DNA fragmentado no grupo II e uma parada na capacidade de G2/M nos grupos III a V demonstraram que quanto maior a idade gestacional menor é a capacidade de proliferação celular (Gráfico 3).

Gráfico 5 - Gráfico de barras das médias ± DP da porcentagem de célula do SVEB dos diferentes estágios gestacionais nas fases do ciclo celular obtidos por citometria de fluxo



5.4.2 Expressão de marcadores de proliferação celular (PCNA)

Os gráficos correspondem a 6 grupos conformados por amostras de saco vitelino de embriões bovinos: Grupo I (23 - 27 dias), Grupo II (28 - 32 dias), Grupo III (33 - 37 dias), Grupo IV (38 – 42 dias), Grupo V (43 – 47 dias) e Grupo VI (48 – 52 dias).

Nossos resultados amostraram uma relação inversamente proporcional a idade, que quanto maior a idade gestacional menor é a proliferação celular (Gráfico 4, 5). Os grupos I e II demonstraram ser estatisticamente significantes em comparação com os outros (Tabela 10).

Tabela 10 - Expressão do marcador PCNA (Antígeno nuclear de proliferação celular) nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	GrupoII $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
PCNA	59.3±6.2	44.8±4.9	18.8±1.8	14.2±1.2	13.4±4.3	10.9±2.5

X = média DP = desvio padrão

Gráfico 6 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador PCNA nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB

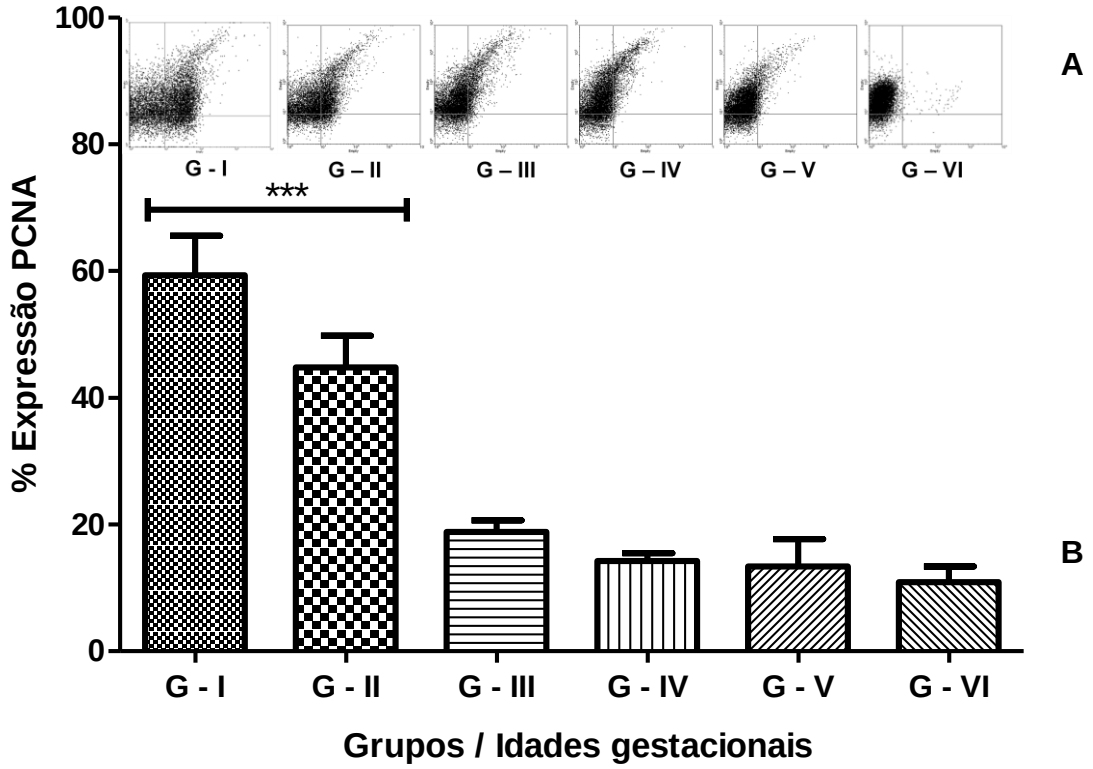
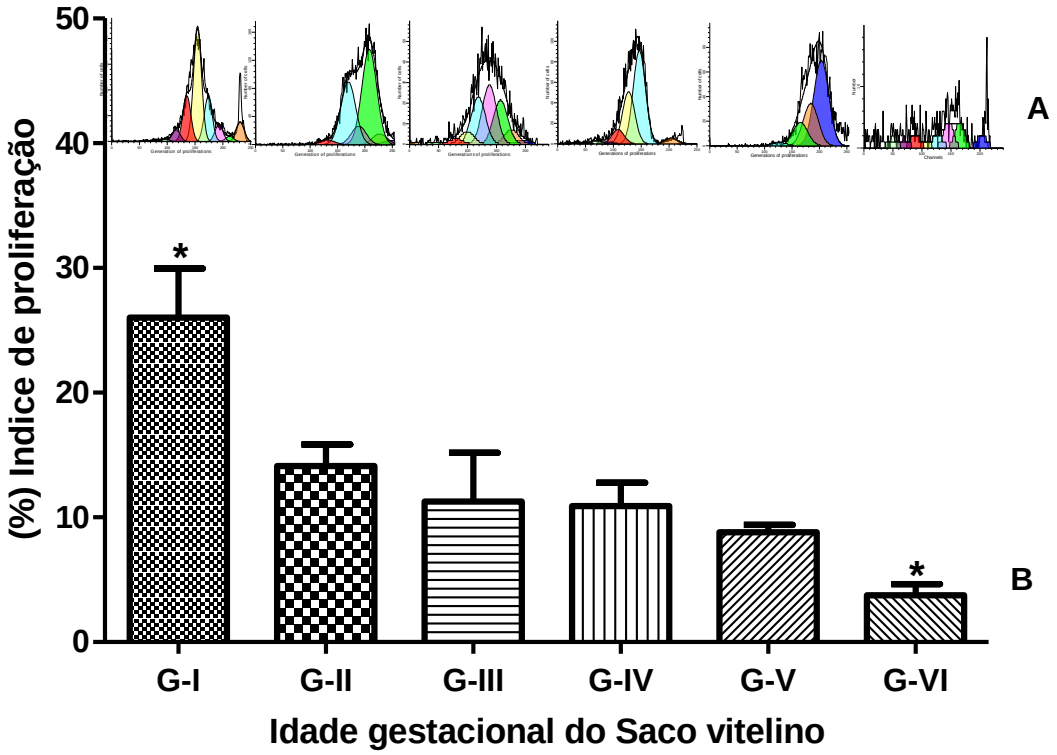


Gráfico 7 - (A) gráfico do tipo histograma adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software Wizard. (B) gráfico de barras representando a média ± DP do índice proliferativo nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB



5.4.3 **Expressão de marcadores de vias de morte celular**

Os gráficos correspondem a 6 grupos conformados por amostras do saco vitelino de embriões bovinos: Grupo I (23 - 27 dias), Grupo II (28 - 32 dias), Grupo III (33 - 37 dias), Grupo IV (38 – 42 dias), Grupo V (43 – 47 dias) e Grupo VI (48 – 52 dias).

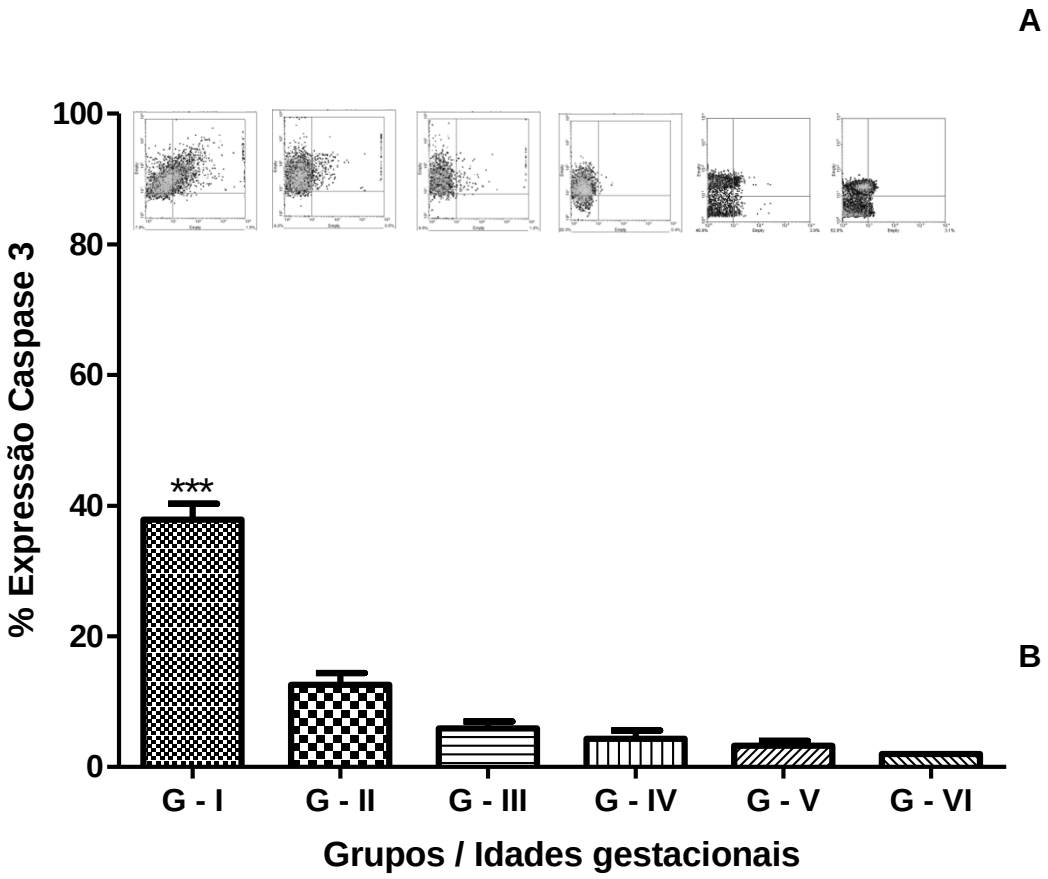
Nossos resultados amostram que o saco vitelino de embriões bovinos do Grupo I expressou de forma significativa Caspase-3 em comparação com os outros grupos (Tabela 11). Alem disso observamos uma relação inversamente proporcional, que a menor idade gestacional maior é apoptose, isto é porque as células entram em processo de necrose (Gráfico 6).

Tabela 11 - Expressão do marcador Caspase 3 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	GrupoII $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
Caspase-3	37.87±4.21	12.6±2.5	5.9±1.8	4.3±1.8	3.3±1.0	2.0±0.01

X = média DP = desvio padrão

Gráfico 8 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador caspase 3 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB



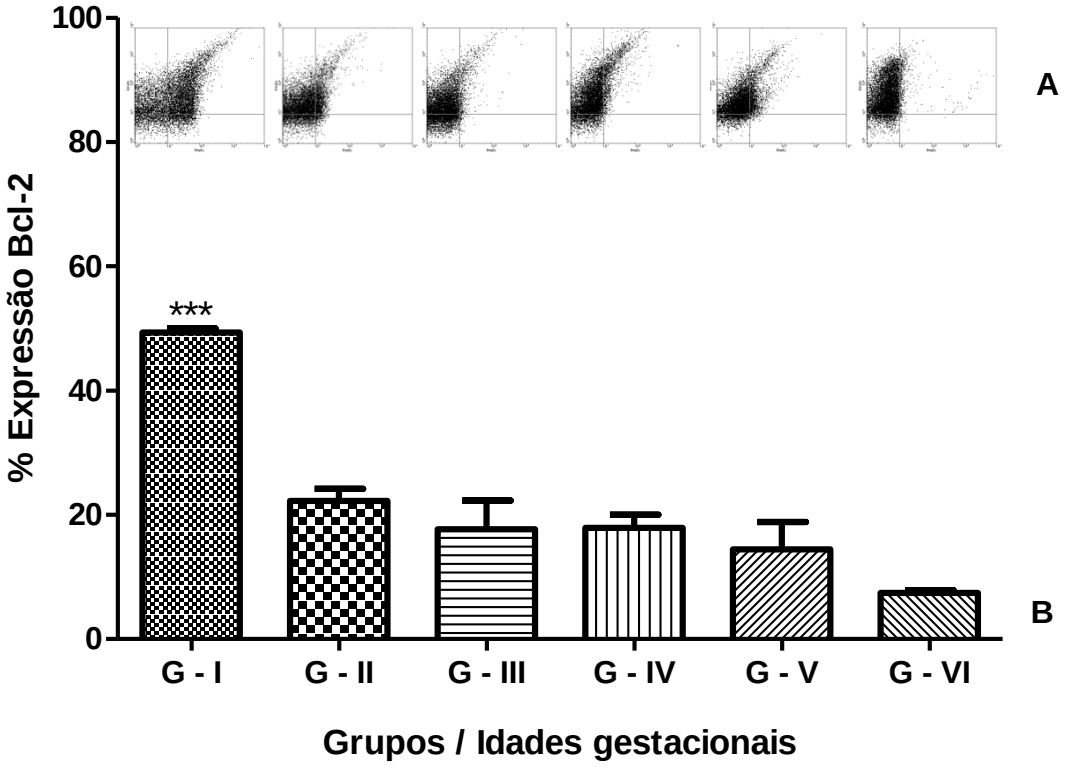
A expressão do marcador Bcl-2 no Grupo I foi significativa (Tabela 12) em relação aos outros grupos, também apresentou uma relação inversamente proporcional (Gráfico 7).

Tabela 12 - Expressão do marcador Bcl-2 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	Grupo II $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
Bcl-2	49.3±0.7	22.2±1.9	17.7±4.7	17.9±2.1	14.4±4.4	7.4±0.4

X = média DP = desvio padrão

Gráfico 9 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador Bcl-2 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB



Os marcadores Bax e Bad expressaram de forma significativa nos grupos IV, V e VI (Tabela 13 e 14), a relação for proporcional a idade gestacional (Gráfico 8 e 9). Os marcadores Anexina V e PI (apoptose e necrose) expressaram de forma significativa (Gráfico 10 e 11), a Anexina V expressou nos grupos I e II enquanto que o PI (Iodeto de propídeo) expressou nos Grupos V e VI (Gráfico 11).

Tabela 13 - Expressão do marcador BAX nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012.

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	Grupo II $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
Bax	11.6±0.4	19.4±12.3	17.8±12.2	27.0±0.9	44.1±13.4	53.8±9.4

X = média DP = desvio padrão

Gráfico 10 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador Bax nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB

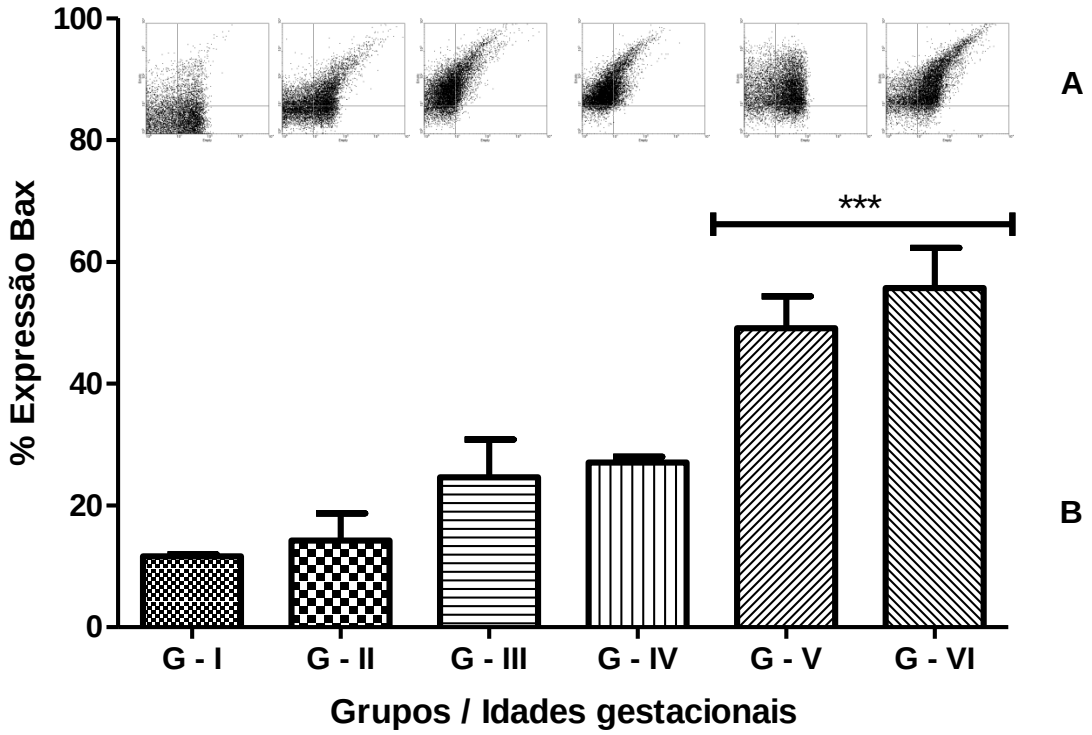
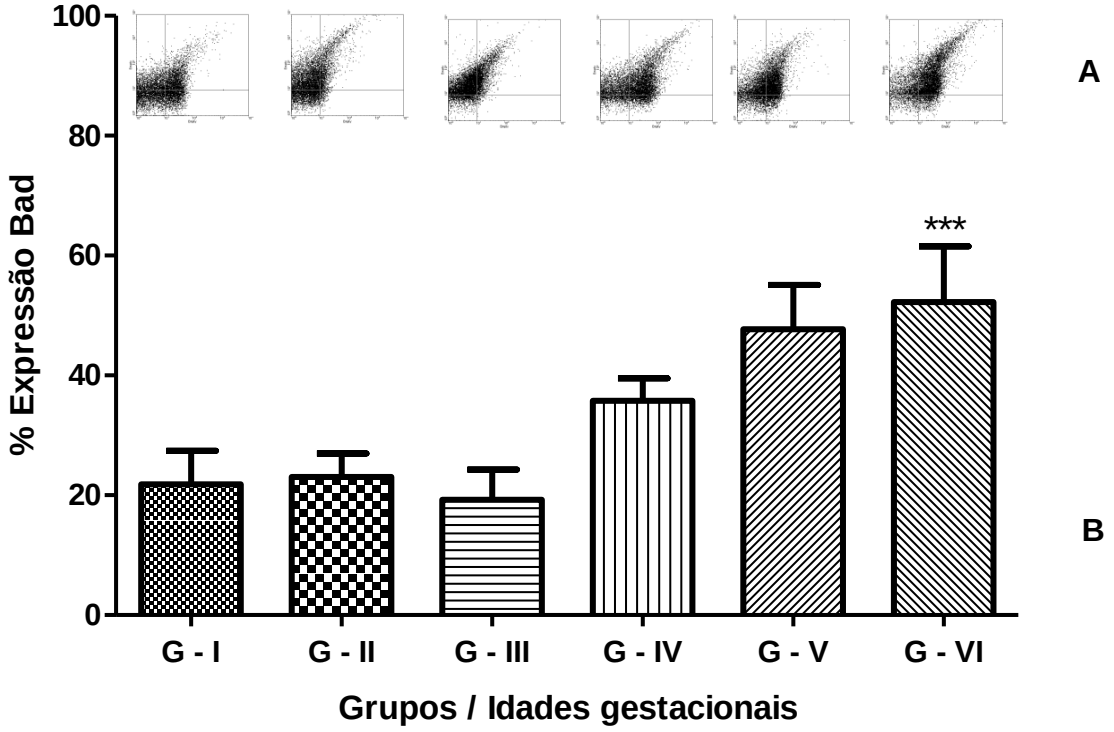


Tabela 14 - Expressão do marcador Bad nos diferentes períodos de gestação em células do saco vitelino de embriões bovino representando a média±DP de cada grupo analisado, São Paulo, 2012

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	Grupo II $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
Bad	21.8±5.6	23.1±3.9	19.2±5.0	35.8±3.8	47.7±7.4	52.3±9.3

X = média DP = desvio padrão

Gráfico 11 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador Bad nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB



5.4.4 **Análise do potencial elétrico de membrana mitocondrial**

Os gráficos correspondem a 6 grupos conformados por amostras do SVEB: Grupo I (23 - 27 dias), Grupo II (28 - 32 dias), Grupo III (33 - 37 dias), Grupo IV (38 – 42 dias), Grupo V (43 – 47 dias) e Grupo VI (48 – 52 dias).

Nossos resultados amostraram que o aumento de células ativas é crescente nos grupos I ao VI, que é oposto para as células inativas (Gráfico 10). Apresentou uma correlação positiva com um $r^2 = 0,94$ (Gráfico 11).

Gráfico 12 – (A) gráfico do tipo histograma adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do potencial elétrico mitocondrial nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB

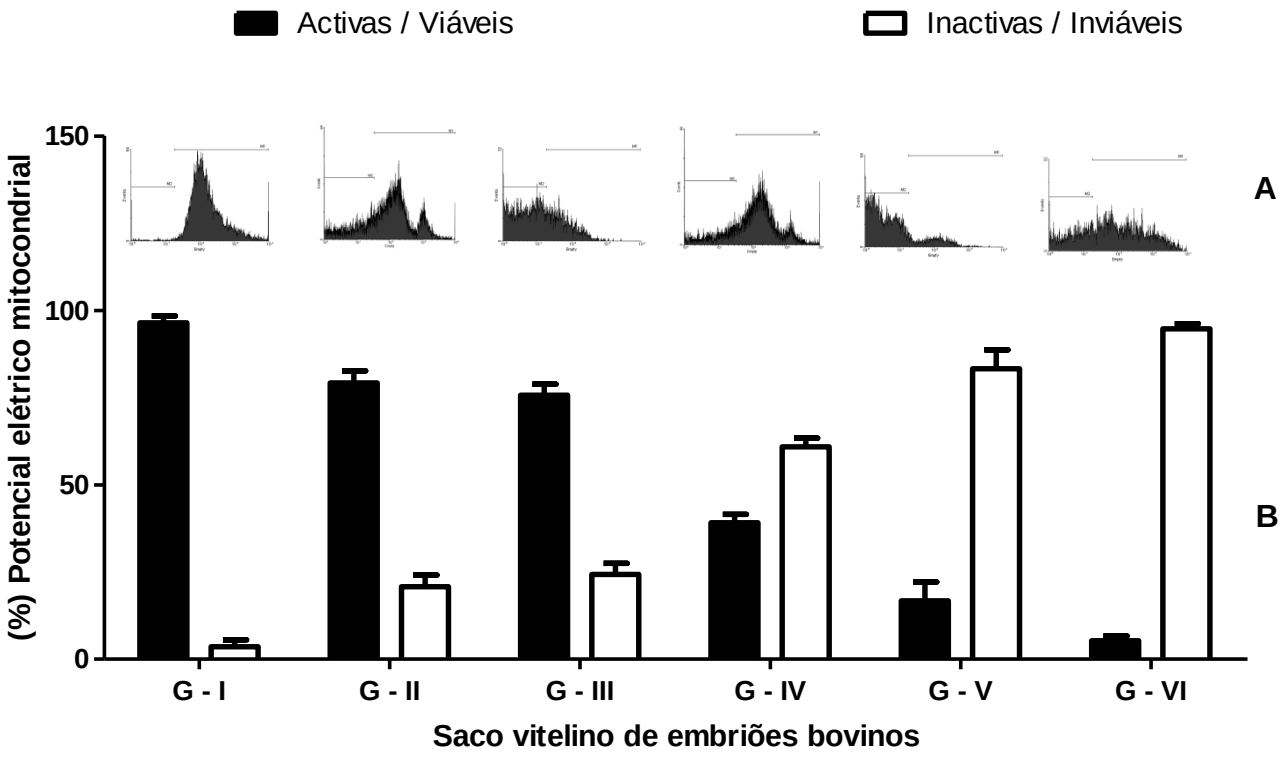
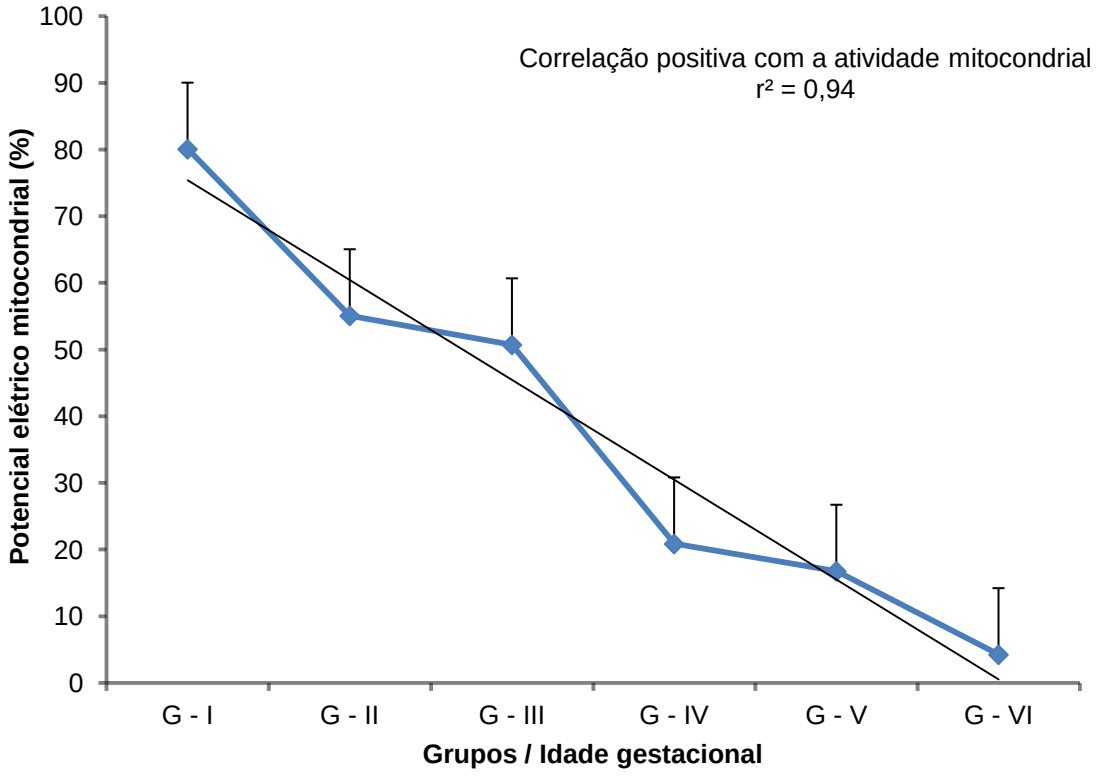


Gráfico 13 - Regressão linear do potencial elétrico mitocondrial obtido por citometria de fluxo das células do saco vitelino de embriões bovinos nos diferentes grupos de gestação analisados



5.4.5 **Expressão de marcadores nucleares e citoplasmáticos envolvidos em vias de sinalização, síntese e angiogênese**

Os gráficos correspondem a 6 grupos conformados por amostras do SVEB: Grupo I (23 - 27 dias), Grupo II (28 - 32 dias), Grupo III (33 - 37 dias), Grupo IV (38 – 42 dias), Grupo V (43 – 47 dias) e Grupo VI (.48 – 52 dias)

Nossos resultados mostraram que o marcador HSP47 teve um aumento significativo (Tabela 15) no grupo de menor idade gestacional em comparação com os outros grupos (Gráfico 12). Na expressão do receptor R1 do VEGF mostrou um aumento nos grupos I e II (Tabela 16), estando diminuído nos outros grupos (Gráfico 13).

Tabela 15 - Expressão do marcador HSP47 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	GrupoII $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
HSP47	29.8±9.9	5.6±0.5	7.4±1.4	7.2±0.9	3.0±0.7	2.1±0.7

X = média DP = desvio padrão

Gráfico 14 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador HSP47 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB

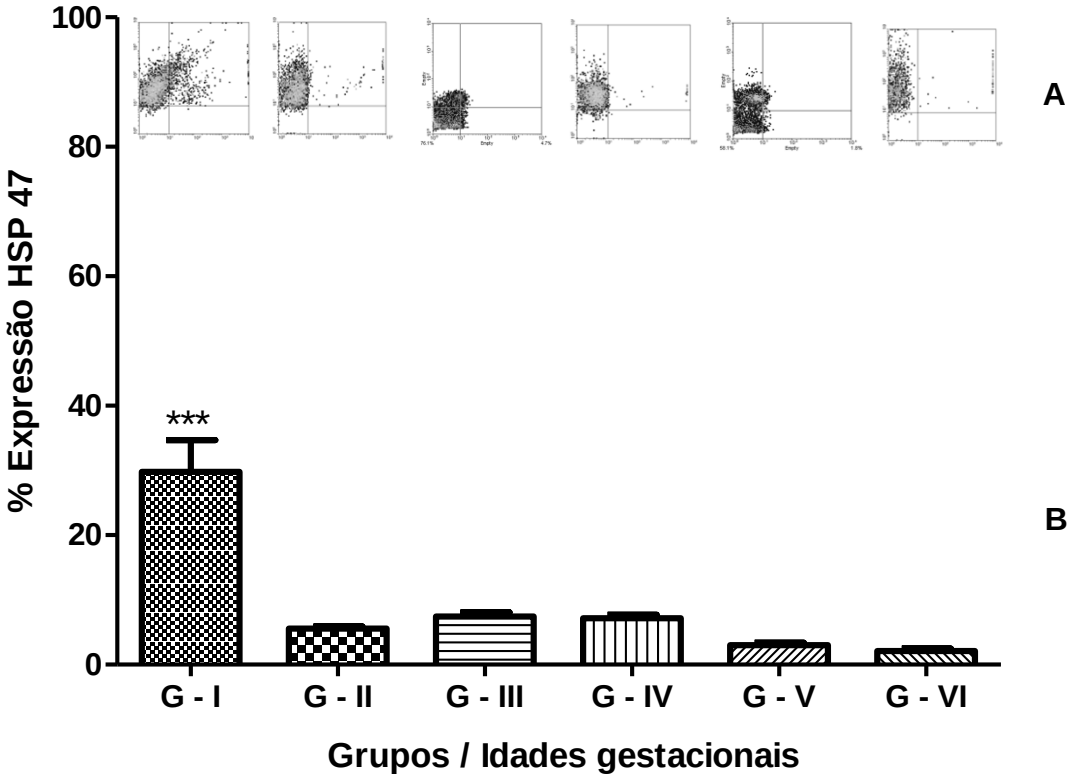
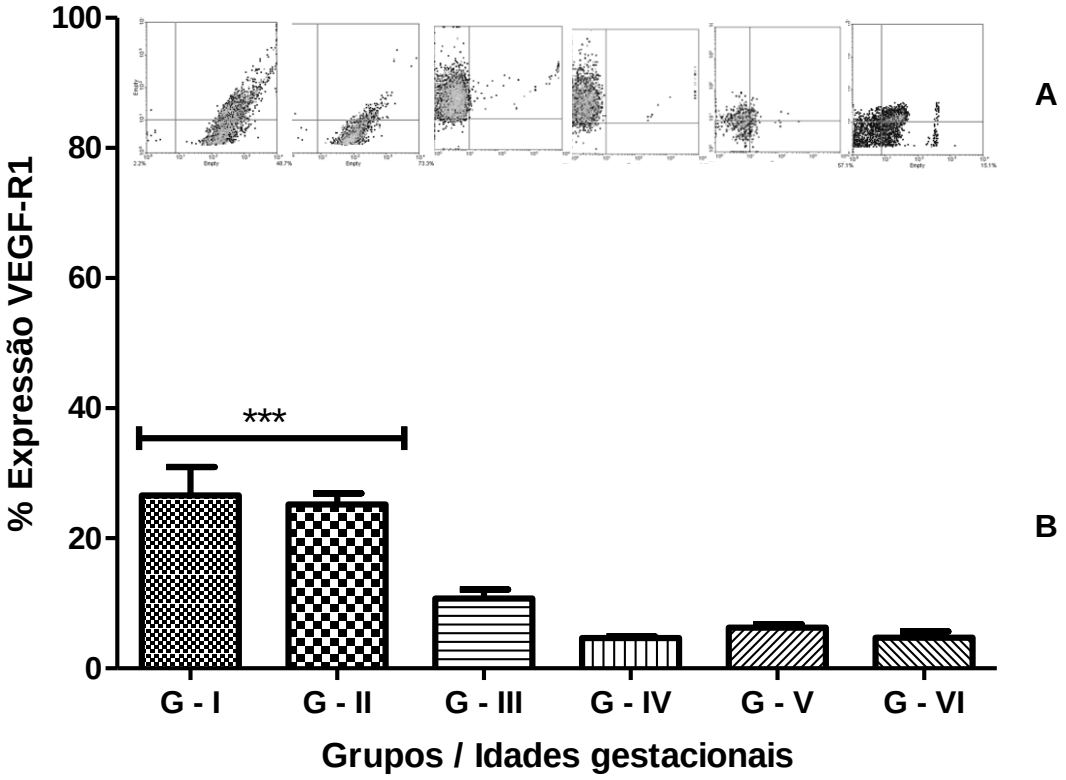


Tabela 16 - Expressão do marcador VEGF-R1 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a Média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	GrupoII $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
VEGF-R1	26.6±8.8	25.2±3.0	10.8±2.7	4.7±0.4	6.3±0.9	4.7±1.6

X = média DP = desvio padrão

Gráfico 15 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do receptor de VEGF-R1 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB



A expressão do marcador Citocromo-c mostrou um aumento proporcional (Gráfico) 14 nos grupos I ao VI (Tabela 17), enquanto que o receptor TNF mostrou aumento no grupo I (Tabela 18) mostrando uma relação inversamente proporcional (Gráfico 15).

Tabela 17 - Expressão do marcador Citocromo-c nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	Grupo II $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
Citocromo-c	17.7±2.2	23.1±0.8	33.0±9.3	46.8±8.8	42.2±4.2	43.8±4.2

X = média DP = desvio padrão

Gráfico 16 - (A) gráfico do tipo *dot plot* adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador citocromo-c nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB

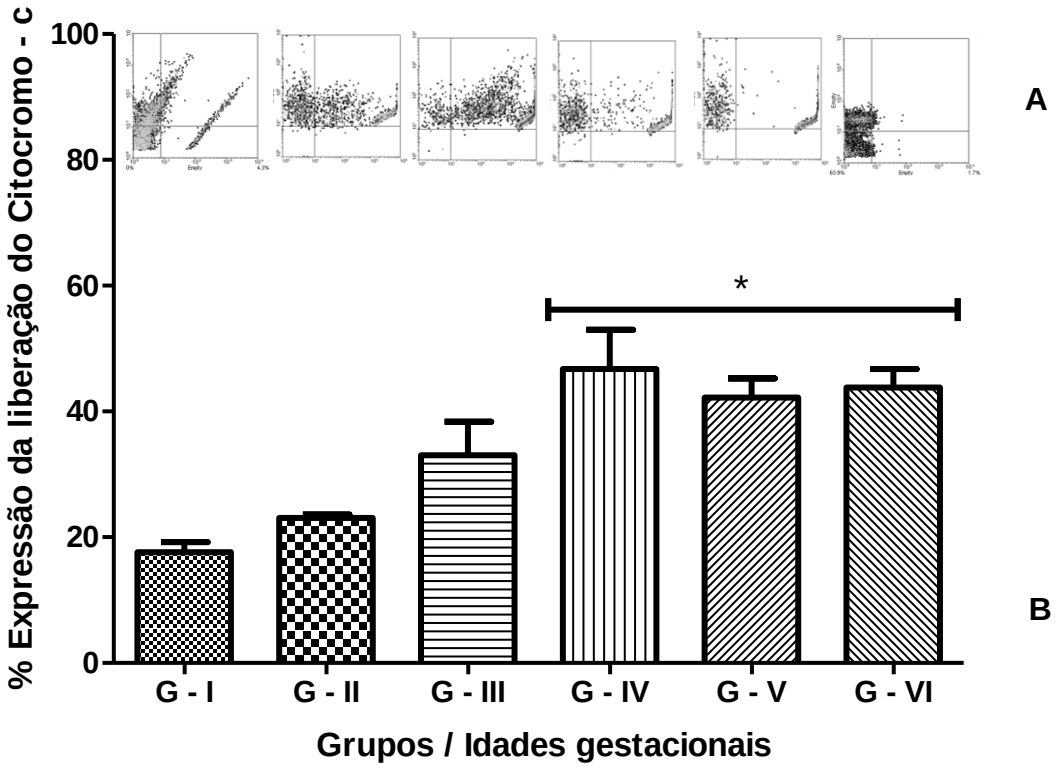
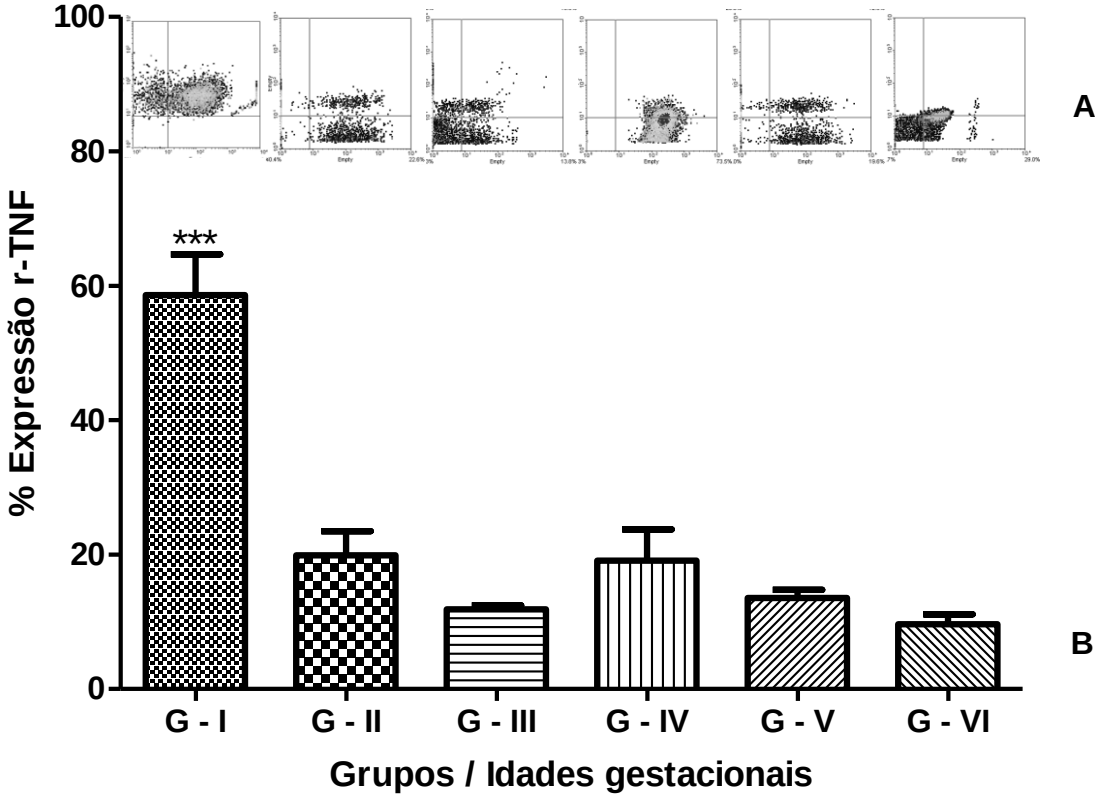


Tabela 18 - Expressão do marcador r-TNF nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	Grupo II $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
r-TNF	58.6±12.2	19.9±6.2	11.9±1.1	19.1±8.0	13.6±2.4	9.6±2.9

X = média DP = desvio padrão

Gráfico 17 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do receptor de TNF nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB



5.4.6 **Expressão de marcadores de maturação, diferenciação de células-tronco**

Os gráficos correspondem a 6 grupos conformados por amostras do SVEB: Grupo I (23 - 27 dias), Grupo II (28 - 32 dias), Grupo III (33 - 37 dias), Grupo IV (38 – 42 dias), Grupo V (43 – 47 dias) e Grupo VI (48 – 52 dias).

As análises dos marcadores de superfície das células vitelinas, por citometria de fluxo, indicaram, nas idades embrionárias iniciais descritas como grupo I e II, níveis consideráveis de marcadores primitivos característicos de pluripotencia como Oct-3/4 (46.8±3.9) e NANOG (44.5±5.3). Esses marcadores apresentaram níveis aumentados com o decorrer do desenvolvimento embrionário, mostrando 57.5±11.1 de Oct-3/4 e 53.6±2.9 de NANOG. O marcador de células precursoras hematopoiéticas CD133 também apresentou aumento de marcação com o desenvolvimento embrionário, variando de 39.68±2.90 no Grupo I, para 58.28±13.36 no Grupo VI. Além destes, os marcadores de células estromais mantiveram níveis consideráveis de CD90 (22.74±5.82) no Grupo VI e de Stro-1 (10.91±6.23) no Grupo V (Tabela 19 – 23) e presentes nos gráficos 16 – 20.

Tabela 19 - Expressão do marcador Stro-1 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	Grupo II $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
Stro-1	4.6±0.5	5.6±3.1	8.8±0.8	2.7±0.4	10.9±6.2	8.9±4.1

X = média DP = desvio padrão

Gráfico 18 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador Stro-1 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB

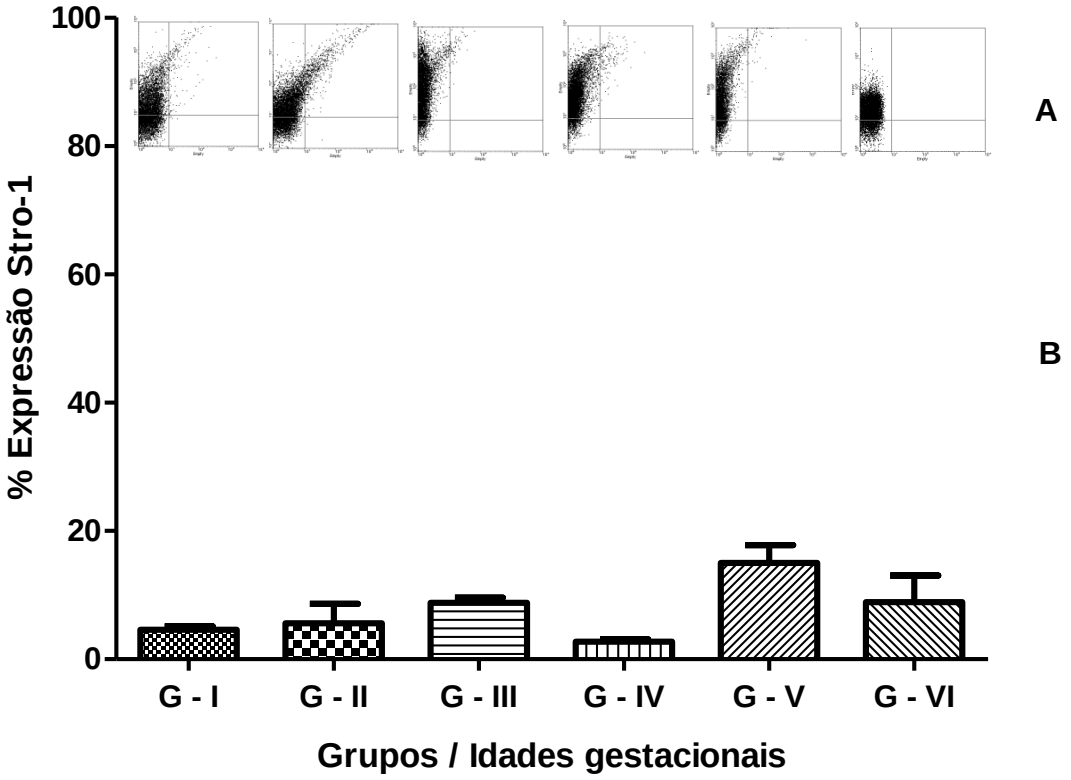


Tabela 20 - Expressão do marcador CD90 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a média±DP de cada grupo analisado, São Paulo 2012

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	Grupo II $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
CD90	14.9±0.9	7.7±4.3	6.9±3.3	11.9±0.9	20.8±3.9	22.8±5.8

X = média DP = desvio padrão

Gráfico 19 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador CD90 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB

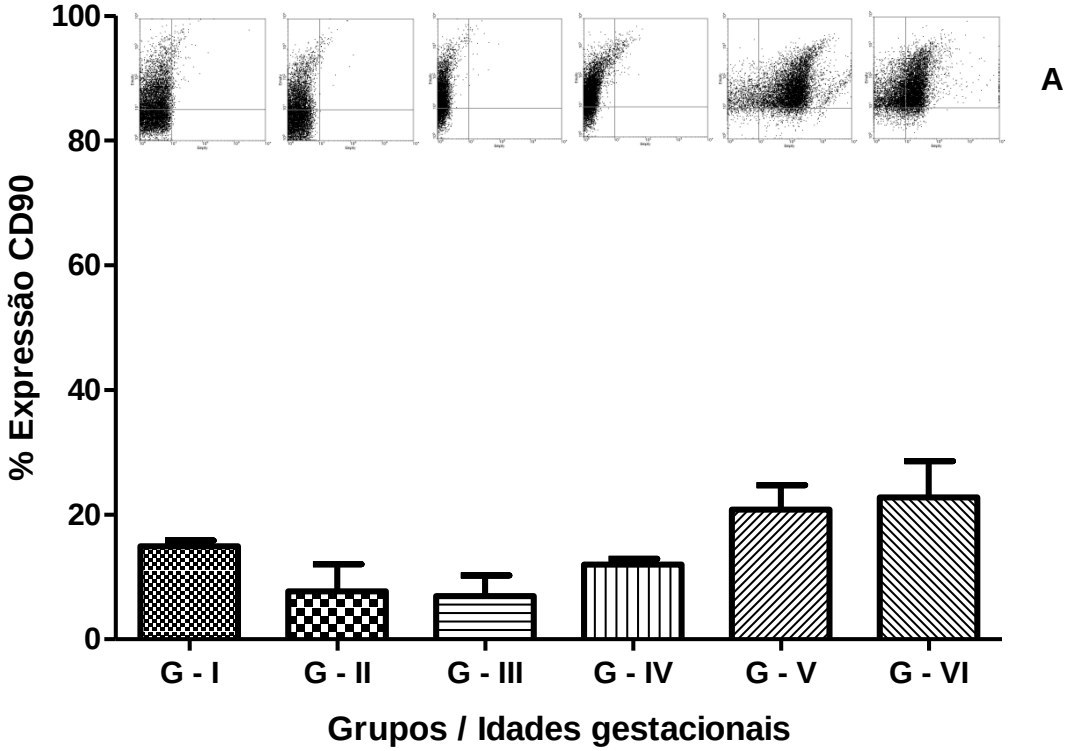


Tabela 21 - Expressão do marcador NANOG nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a édia±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	Grupo II $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
NANOG	44.5±5.3	39.6±12.1	35.3±14.8	43.8±18.9	42.8±17.3	53.6±2.9

X = média DP = desvio padrão

Gráfico 20 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador NANOG nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB

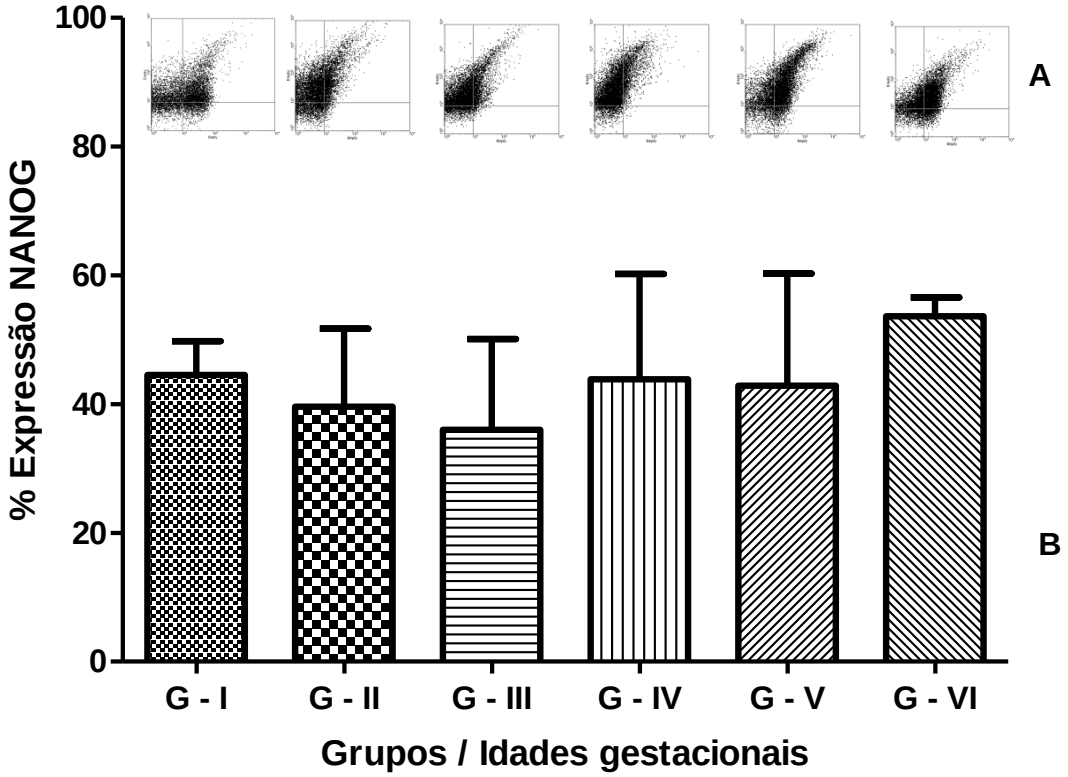


Tabela 22 - Expressão do marcador Oct-3/4 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	Grupo II $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
Oct-3/4	46.8±3.9	32.9±7.5	42.1±15.9	46.2±14.8	46.4±1.9	57.5±11.1

X = média DP = desvio padrão

Gráfico 21 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador Oct-3/4 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB

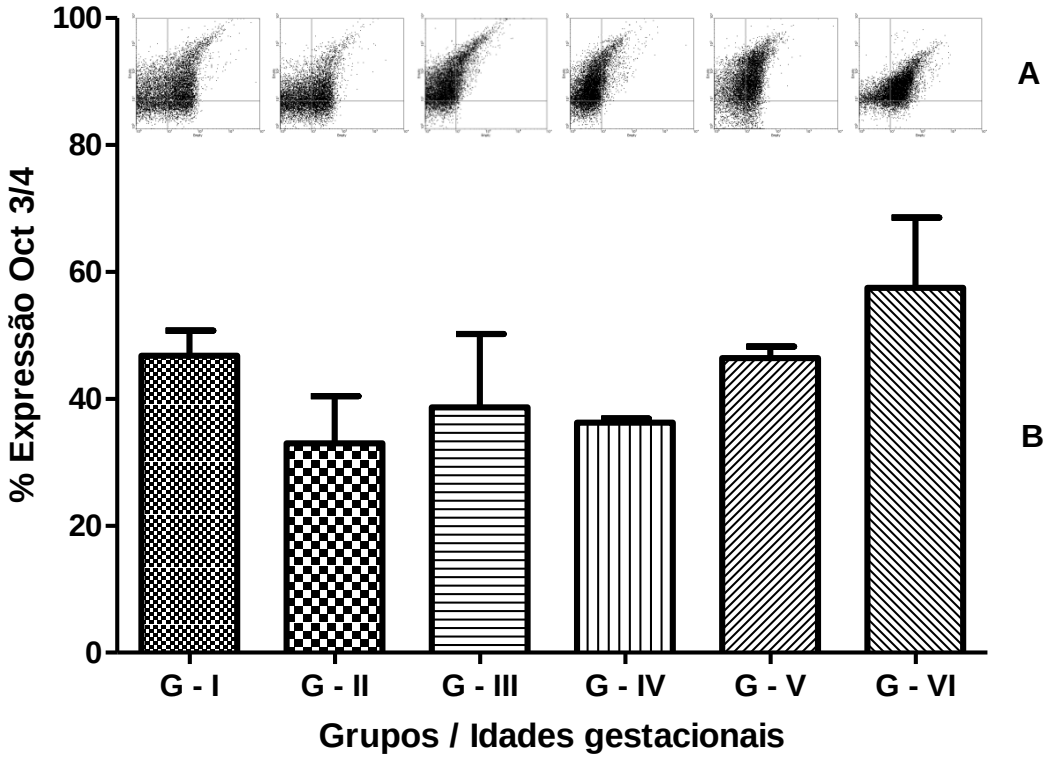
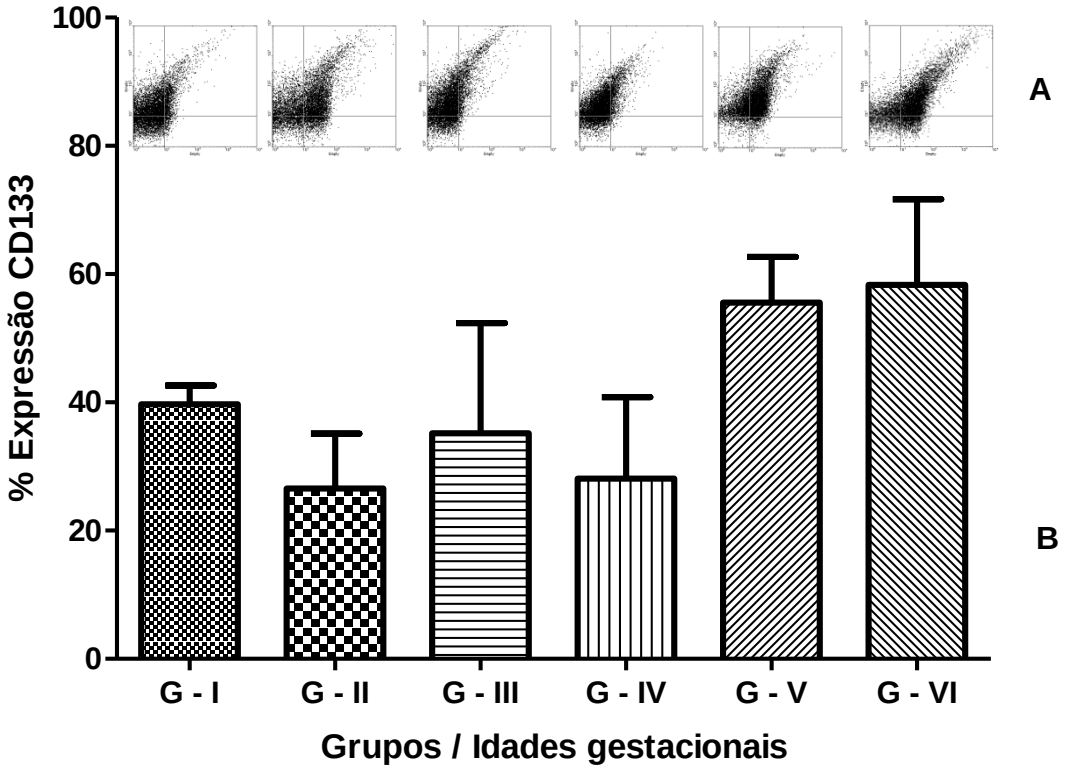


Tabela 23 - Expressão do marcador CD133 nos diferentes períodos de gestação em células do SVEB representando a média±DP de cada grupo analisado. São Paulo, 2012

Marcador	Grupo I $X \pm DP$	Grupo II $X \pm DP$	Grupo III $X \pm DP$	Grupo IV $X \pm DP$	Grupo V $X \pm DP$	Grupo VI $X \pm DP$
CD133	39.7±2.9	26.5±8.6	35.2±17.2	28.1±12.7	55.5±7.1	58.3±13.4

X = média DP = desvio padrão

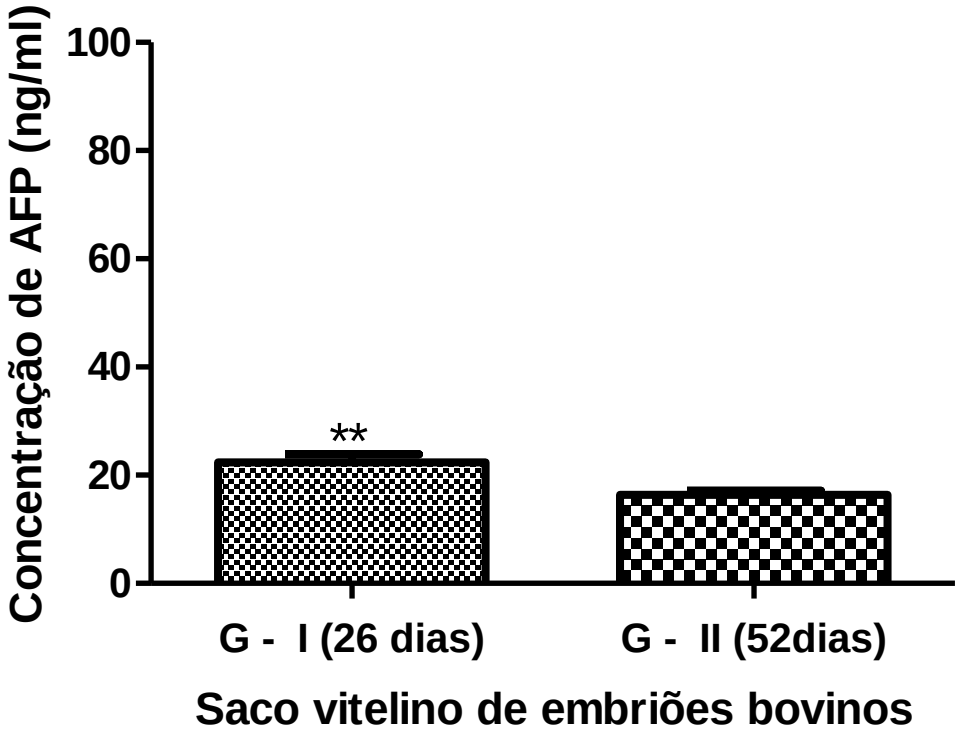
Gráfico 22 - (A) gráfico do tipo dot plot adquirido pelo citômetro de fluxo e analisado pelo software WinMDI 2.9. (B) gráfico de barras representando a média ± DP da expressão do marcador CD133 nos diferentes estágios gestacionais nas células do SVEB



5.5 DETERMINAÇAO BIOQUÍMICA DO SACO VITELINO

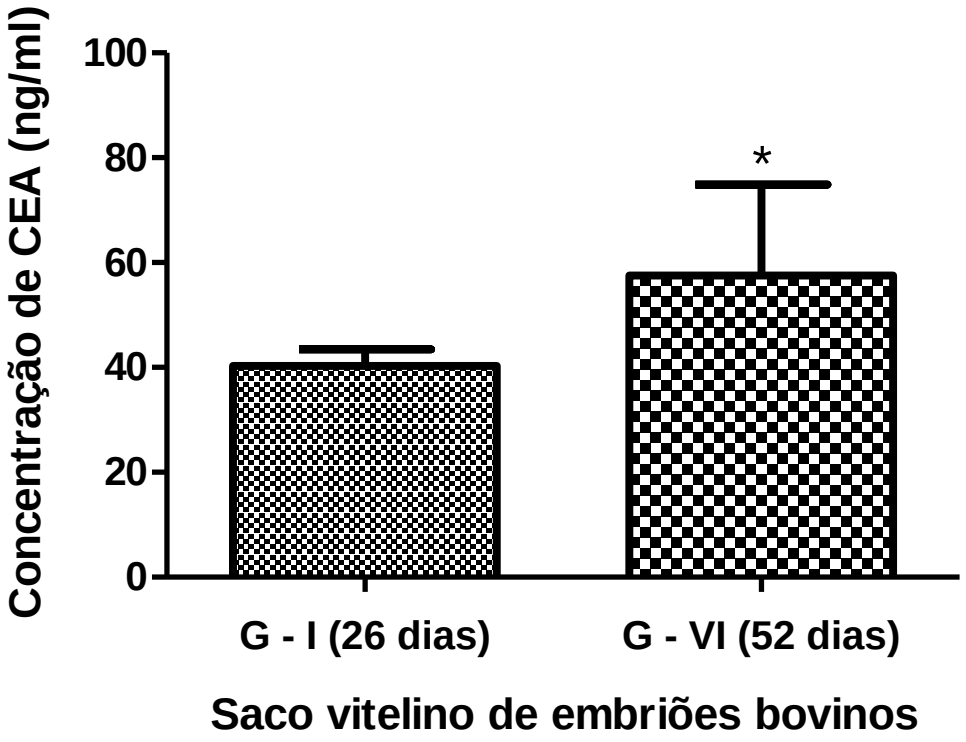
A AFP é uma glicoproteína que pertence ao grupo das proteínas oncofetais e é produzida pelo saco vitelino e no fígado fetal. As amostras do SVEB de 26 dias demonstraram que a concentração da AFP sofre uma significativa diminuição com o avanço da idade gestacional, até os 52 dias de gestação manteve a queda nos níveis desta proteína como foi observado no gráfico 23.

Gráfico 23 – Gráfico de barras da concentração da AFP nas amostras de SVEB de 26 e 52 dias de gestação obtida por quimioluminescência



O antígeno carcino-embrionário (CEA) demonstrou um aumento com o avanço da gestação como observado no gráfico 24. O CEA é foi a primeira proteína Isolada de tumores de colón. Ela pertence a uma família de glicoproteínas com massa molecular aproximada de 180-200 KD

Gráfico 24 – Gráfico de barras da concentração do CEA nas amostras de SVEB de 26 e 52 dias de gestação, obtidos por quimioluminescência



6 DISCUSSÃO

Os avanços obtidos nas duas últimas décadas no campo da bioquímica, biologia molecular e celular permitiram importantes progressos na compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento, diferenciação e maturação celular. Atualmente, dispomos de várias técnicas especializadas para identificação das alterações genéticas, epigenéticas, metabólicas e moleculares presentes em diversas condições fisiológicas e patológicas, além de marcadores biológicos e agentes terapêuticos, que foram identificados e construídos especificamente a partir do estudo das vias de sinalização, do metabolismo e morte celular, expressão de moléculas de superfície, e de outros fatores relacionados à sobrevivência celular, tais como a vascularização e componentes do micro-ambiente relacionados aos diversos tipos celulares e teciduais (O'FARRELL, P. et al., 1989; GODOVAC-ZIMMERMANN; BROWN, 2001; NICHOLSON, J. K.; LINDON, 2008).

A compreensão abrangente de todo esse grande volume de informações ou banco de dados, deve possibilitar a melhora nas áreas da embriologia e reprodução (KATZ-JAFFE; GARDNER, 2007; GALDOS-RIVEROS et al., 2010b), como também o uso de ferramentas mais apropriadas para a busca dos métodos que tenham a maior eficácia e o menor risco de efeitos adversos ou resultados sem significado relevante. A busca de marcadores específicos como ferramentas diagnósticas e prognósticas hoje coexistem com o estudo intenso das vias bioquímicas do metabolismo celular que possam servir de alvo para intervenções terapêuticas dirigidas, e até mesmo "personalizadas" para cada tipo de organismo ou de célula.

Os experimentos realizados para a detecção dos índices proliferativos que foram comparados aos obtidos nas fases do ciclo celular por citometria de fluxo, nos ensaios de proliferação Wizard, mostraram-se altamente específicos para a marcação das células das amostras do saco vitelino, e que se encontravam em fase de proliferação nos períodos inicias da gestação, quando comparadas aos períodos finais do desenvolvimento do saco vitelino.

6.1 MORFOLOGIA DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS

O desenvolvimento embrionário marca o inicio da gestação em bovinos. Nesta espécie, o período embrionário estende-se da fecundação até 45 dias (EVANS; SACK, 1973; HYTTEL; SINOWATS; VEJLSTED, 2010).

Durante este período ocorre um rápido crescimento e diferenciação celular, onde tecidos, órgãos e sistemas são estabelecidos e as principais características morfológicas externas do corpo embrionário são reconhecidas (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O aparecimento das estruturas iniciais determinará, ainda neste período, a sustentação imediata do embrião, a qual afetará o desenvolvimento adequado da placenta e do futuro feto (ALBERTO et al., 2008).

Este estudo foi iniciado então com embriões bovinos identificados como Grupo I dos 23 aos 27 dias de idade embrionária, os quais se apresentam envoltos pela membrana amniótica, com presença do pedículo embrionário, membrana corioalantoide vascularizada, saliência cardíaca, estomodeu, encéfalo anterior, somitos, cauda, região dos arcos branquiais, neuroporo cranial em fechamento, região do fígado e local de formação da crista mesonéfrica. A partir dos 25 dias de gestação o embrião apresenta-se em forma de C, constituído por pedículo embrionário, tubo neural, somitos, saliência cardíaca, arco mandibular, neuroporo cranial, neuroporo caudal e estomodeu. Aos 29 dias de gestação, inicia-se a formação dos membros torácicos e os arcos faríngeos, distinguindo-se a região cefálica, área cardíaca e somitos. Aos 37 dias destaca-se a pigmentação da retina, região de encéfalo anterior, curvatura cervical, medula espinal, cordão umbilical e cavidade oral. Aos 42 dias de gestação nota-se presença de cauda, focinho e curvatura cervical. Aos 48 dias de gestação, período no qual os embriões do grupo identificado como Grupo VI estão com membros torácico e pélvicos bem desenvolvidos, corroborando com as características descritas por Evans; Sack (1973).

Ao analisar a sequência de eventos que fazem parte do desenvolvimento do saco vitelino de embriões bovinos, aos 23 dias o mesmo localiza-se na porção ventral de embrionária e apresenta uma forma bifurcada

bastante alongada. Aos 25 dias o saco vitelino apresenta-se próximo a membrana amniótica que envolve ao embrião, porém, aos 29 dias o saco vitelino apresenta menos tamanho devido a sua regressão. Aos 37 dias o saco vitelino justapõe-se ao âmnio, com aspecto de uma “folha seca” e nas fases mais avançadas do desenvolvimento embrionário, como aos 42 dias, ocorre o enovelamento das extremidades do saco vitelino em direção ao cordão umbilical.

Esta característica referente à diminuição de tamanho da membrana vitelina bovina a partir dos 29 dias contradiz Latshaw (1987), o qual afirma que em ruminantes o saco vitelino, independente da fase de desenvolvimento, é grande, vascular e completamente cercado pela cavidade extra-embrionária.

Além disso, o saco vitelino de embriões bovinos, com o decorrer do desenvolvimento embrionário, modifica sua posição anatômica de inserção. Primeiramente o saco vitelino situa-se na região ventral do embrião em formação, onde mantém, segundo Pereda; Cerisola; Poso. (1987), Pereda; Motta (1999) e Mançanares (2007), uma conexão com o intestino primitivo proveniente do intestino posterior. Porém, com a deslocação do pedículo embrionário para o estabelecimento do cordão umbilical, diferentemente do relatado por Latshaw (1987); Russe et al. (1992) e Assis Neto et al.(2010) para embriões bovinos, os quais afirmaram que o mesmo se solta do corio e se reduz a uma estrutura solida na forma de um cordão a partir dos 20 dias, e após 70 dias torna-se vestigial e desaparece.

Nestas espécies, portanto, o saco vitelino é funcional durante um curto período de tempo (NODEN; LAHUNTA, 1990). Porém, suas funções nesta fase são muito importantes, destacando-se dentre delas absorção e digestão de nutrientes maternos, síntese de proteínas (GALDOS-RIVEROS et al., 2010a) formação da circulação vitelina e secreção intravascular de nutrientes (LATSHAW, 1987; BARON, 2003), além de algumas funções exercidas pelo fígado, antes que o fígado fetal se desenvolva (GULBIS et al., 1998).

Em relação a morfologia microscópica da membrana vitelino, alguns conceitos e teorias referem sobre a existência de uma célula-tronco precursora das linhagens sanguíneas e endoteliais denominada hemangioblasto. Estas sugerem que os mesmos surjam primeiramente no saco vitelino, na região mesenquimal do mesmo originando as “ilhotas sanguíneas”. Segundo Sadler

(2005) e Zago; Covas (2006), os hemangioblastos centrais formam as primeiras células-tronco hematopoéticas, enquanto os hemangioblastos periféricos se diferenciam em angioblastos, os precursores endoteliais. Nossos achados em microscopia óptica confirmam que em todas as idades analisadas havia presença de ilhas sanguíneas de médio tamanho, repletas por eritrócitos primitivos no interior, localizadas na região mesenquimal da membrana. A membrana vitelina analisada em MEV apresentou dados semelhantes aos encontrados na microscopia óptica. As ilhas sanguíneas apresentam-se como elevações globosas na superfície da membrana quando analisada por este tipo de microscopia. Essas elevações são visíveis dos 25 aos 29 dias. Porém, com o decorrer do desenvolvimento embrionário essas ilhotas sanguíneas agrupam-se e fundem-se umas as outras, formando tubos endoteliais (SADLER, 2005; PESSOLATO, 2011)

A superfície da membrana apresenta cavidades e vasos sanguíneos com células sendo liberadas na luz dos vasos, células sanguíneas liberadas no interior da membrana, além de uma grande quantidade de partículas e células liberadas por toda a superfície externa da membrana, assim como observado por Pereda; Monge; Niimi (2010) no saco vitelino humano em seus diversos trabalhos (PEREDA; CERISOLA; POZO, 1987; PEREDA; MOTTA, 1999; PEREDA, 2001; PEREDA; NIIMI, 2008; PEREDA; GIANFRANCO; NIIMI, 2009; PEREDA; MONGE; NIIMI, 2010), os quais propõem que antes da circulação saco vitelino-embrião estar estabelecida transportando células sanguíneas primitivas ao embrião através dos vasos vitelinos, uma transferência de material e de células sanguíneas maduras ao embrião são produzidas através do ducto vitelino. Além disso, Pereda; Monge; Niimi (2010) descreveram também que essas cavidades vistas em toda a superfície da membrana vitelina são uma continuidade do orifício luminal das vesículas endodérmicas, as quais suprem a demanda celular sanguínea do embrião a partir do estabelecimento da circulação, da mesma forma descrita por (PESSOLATO, 2011) em embriões ovinos.

Na microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi possível identificar vesículas localizadas na região endodermal da membrana vitelina. Estas, dos 23 aos 27 dias, não apresentavam células no interior, as quais estavam presentes dos 28 a 47 dias. Em relação a isso, Pereda; Monge; Niimi (2010)

observaram também na microscopia eletrônica de transmissão (MET) a presença de espaços arredondados localizados na região endodérmica da membrana vitelina humana, os quais os denominaram de vesículas endodérmicas. Estas vesículas, em seus achados, abrigavam eritrócitos maduros no interior. Interessantemente, Pessolato (2011) em embriões ovinos verificou também a presença de tais vesículas, porém ao contrário do descrito pelo grupo citado, possuíam eritrócitos primitivos localizadas no lúmen das mesmas. De qualquer forma, os achados de Pessolato (2011) confirmam tal hipótese, uma vez que sugerem a possibilidade do surgimento sanguíneo no saco vitelino ocorrer não apenas da região mesodérmica da membrana, mas ser oriundo também da camada germinativa endodermal (PEREDA; NIIMI, 2008).

À microscopia eletrônica de transmissão, de maneira geral, a membrana vitelina apresenta camada simples de epitélio formando a região endodérmica, com células de formato cúbico e prismático, citoplasma claro e escuro, assim como descrito em bovinos (RÜSSE et al., 1992), possuindo grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, grande quantidade de mitocôndrias, desmossomos, núcleo com cromatina condensada e em grande parte, presença de mais de um nucléolo, evidenciando uma grande atividade proliferativa e de síntese por parte destas células (SHANDLEY; ALCORN; WINTOUR, 1997; ALBERTS et al., 2011). A membrana apresenta também região mesenquimal vascular (MANÇANARES, 2007; DIETERLEN-LIÈVRE; CORBEL; SALAUN, 2010), Abaixo da região mesenquimal encontra-se a região mesotelial, formada por uma camada simples de endotélio, o qual apresenta microvilos em sua superfície, assim como, descrito por Pereda; Monge; Niimi (2010), e vesículas de secreção na região citoplasmática, sugerindo alta atividade secretora por estas células (ALBERTS et al., 2011). Podemos supor ainda que esta persistência do epitélio colunar simples durante todo o período embrionário, tanto da camada endodermal como mesotelial do saco vitelino de embriões bovinos, corresponde ao encontrado em morcegos por Enders et al. (1976).

De acordo com Pereda; Monge; Niimi (2010) os orifícios endodermais são frequentemente visualizados entre a quarta e quinta semana após a concepção em mulheres. Porém, segundo Enders (1993) a maior função das

células mesoteliais hipertrofiadas durante a gestação é a absorção de proteínas e outras substâncias do fluído exocelômico. Entretanto o mesmo autor afirma que as células endodermais hipertrofiadas podem sintetizar e secretar substâncias dentro da circulação fetal (ENDERS; WIMSATT; KING, 1976).

6.2 PERFÍL METABOLÔMICO DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS

Antes de interpretar o significado destes sinais de RMN, a origem celular requer atenção. Observações recentes estão lançando questões sobre a relevância direta para a compreensão do perfil lipídico e sua relação com estruturas da membrana celular. As células contêm uma quantidade considerável de lípideos, fosfolípideos e lípideos polares neutros, tais como triglicerídeos (TG) e ésteres de colesterol (CE). Tomados em conjunto, perfazem cerca de 4-16% do total e alguns 20-50% de massa celular seca. Estes lípidos são normalmente limitados a bicamadas de membrana, incluindo a membrana plasmática e as membranas de várias organelas, tais como o retículo endoplasmático (RE), o Aparelho de Golgi e microssomas. No entanto, por exemplo, as análises de cadeias lipídicas por 1H RMN são raramente observado no cérebro, que é rico em teor de fosfolipídeos e TG. Isso implica diretamente que os lipídeos obtidos nos espectros de 1H NMR devem apresentar uma única propriedade estrutural e bioquímica que os distinguem da maior parte dos lipídeos de outros tecidos (SHULMAN; ROTHMAN; BLAMIRE, 1994; BARBA; CABAÑAS; ARÚS, 1999; BLANKERBERG; NARULA; STRAUSS, 1999).

O metabolismo é o estudo das transformações químicas que ocorrem no organismo. Os caminhos que segue uma determinada substancia constituem sua via metabólica ou rota metabólica e seus produtos formados intermediários de outras vias metabólicas secundários (VIEIRA; GAZZINELLI; MARES-GUIA, 1998).

O metabolismo embrionário é peça fundamental para entender as principais chaves que o levaram até o final da gestação, embora a membrana vitelina seja a responsável pelo sucesso desta, é de muito interesse o estudo dos metabolitos presentes no saco vitelino de embriões bovinos.

A bioquímica do embrião, até o terceiro dia do desenvolvimento *in vitro* (7 ou 8 células), é caracterizada por uma baixa atividade metabólica; apresenta uma capacidade limitada para utilizar glicose e assim gerar energia a partir dos baixos níveis de oxidação do piruvato, lactato e aminoácidos não essenciais. A a partir de 8 células utiliza a glicose como nutriente de escolha e necessita tanto aminoácidos essenciais como não essenciais para a proliferação e diferenciação celular (VEECK; ZANINOVIĆ, 2003).

Diferentes estudos relacionam os perfis metabólicos obtidos, com o potencial reprodutivo do embrião, encontrando diferenças da viabilidade no metabolismo da glicose e piruvato (GARDNER et al., 2001) e o turn-over dos aminoácidos.

O mio-inositol é um álcool açúcar de seis carbonos mais abundante dos nove isômeros de inositol nas células. Os derivados do mio-inositol, como a fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato desempenha uma função como via de sinalização celular, síntese de esteroides, regulação intracelular do cálcio e integridade celular (NISHIZUKA, 1992; BERRIDGE, 1993; BEEMSTER; GROENEN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2002). O mio-inositol desencadeia a liberação de cálcio intracelular e ativa a proteína C quinase (GREENE; COPP, 1997; BEEMSTER; GROENEN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2002).

O mio-inositol é um fator de crescimento *in vitro* e sua ausência pode causar alterações na pele, fígado e intestino em animais (EAGLE et al., 1957; BEACH; FLICK, 1982).

Os níveis de mio-inositol são elevados em fetos em comparação com adultos (HALLMAN et al., 1985), a concentração deste metabólito em vários tecidos, incluindo o pulmão é elevado em relação ao estágio de desenvolvimento, e a síntese do mio-inositol a partir da glicose-6-fosfato, aparentemente acontece em algum tecido (HALLMAN et al., 1985)

O mio-inositol é um elemento envolvido em vias de sinalização dependentes de cálcio, entretanto as vias de apoptose intrínsecas ligadas às variações quantitativas deste composto e a formação de metabolitos intermediários como a fosfatidil-3-inositol. Há um interesse pelo mio-inositol na patogênese das desordens reprodutivos como infertilidade, aborto espontâneo, pré-eclampsia e malformações congênitas como espinha bífida e Síndrome de

Down (GREENE; COPP, 1997; BEEMSTER; GROENEN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2002).

As analise metabolômica do saco vitelino de embriões bovinos mostraram a presença do mio-inositol em todos os períodos gestacionais. Supostamente, diferentes quantidades poderiam ser estabelecidas em relação às funções deste metabolito na involução celular, pois as atividades mitocondriais, avaliadas pelo potencial elétrico e vias de apoptose mostraram aumentadas nestas amostras.

A colina é um nutriente essencial durante o desenvolvimento fetal, na forma de fosfolipideos como fosfatidilcolina e esfingomielina utilizados para sintetizar o neurotransmissor acetilcolina, ele cede grupos metila para depois ser oxidados a betaina. Elevadas quantidades de colina são requeridas, para o crescimento fetal, para serem transportadas pela placenta da circulação materna (GARNER et al., 1993).

A colina é o maior metabolito fornecido ou que da sustentação e suporte ao feto, a betaína e glicerofosfocolina (GFC) seriam os veículos de transferência da colina entre a mãe e o feto (GARNER et al., 1993; ZEISEL, 2006). Por isso a estreita relação entre esses dois metabólitos: colina e glicerofosfocolina.

A deficiência de colina provoca apoptose porque interrompe a capacidade proliferativa na formação dos distintos órgãos como fígado, rins, cérebro (ZEISEL, 2006). O metabolismo da colina, metionina e do folato interagem no momento em que a homocisteina é convertida a metionina. Assim, a deficiência da colina deve ser considerada em relação com esses outros metabólitos ou nutrientes (FINKELSTEIN, 2000).

Em roedores, a colina é necessária para o fechamento normal do tubo neural na gestação inicial (FISHER et al., 2001; FISHER et al., 2002). O metabolismo da colina e o folato se cruzam nas vias para doação de grupos metila, dado que as reações de metilação são o mecanismo com o qual, influencia o fechamento do tubo neural. Desta forma a deficiência de colina e folato tem similar efeito na proliferação de células-tronco e apoptose no desenvolvimento do cérebro (CRACIUNESCU et al., 2003; CRACIUNESCU et al., 2004).

A colina e seu derivado glicerofosfocolina (GFC) demonstraram estarem presentes nas amostras do saco vitelino de embriões bovinos distribuídos nos seis grupos gestacionais, sendo que o metabolismo de lipídeos é uma rota metabólica importante para o desenvolvimento normal do embrião. O aumento na razão de fosfocolina para glicerofosfocolina, obtida por 1H- RMN correlaciona-se com capacidade proliferativa. Esta afirmação é possível de ser respondida pelo fato destes lipídeos serem o substrato para a membrana fosfolipídica, o que eleva o conteúdo lipídico e as vias necessárias ao anabolismo ou catabolismo (KENT, 1990; 2005).

Em termos absolutos, as células parecem conter uma maior quantidade de lipídeos na fase G_2/M do ciclo celular. Observações importantes observadas nas amostras do saco vitelino de bovinos, nos diferentes períodos de gestação analisadas neste projeto. Portanto, seria de esperar que as alterações lipídicas e as taxas de proliferação devem-se ao estado metabólico de tecido (MAY et al., 1986).

O glutamato é um componente da glutationa, é um precursor do ácido γ-aminobutirico (GABA), um neurotransmissor, e de prolina e ornitina (DEVLIN, 2011). A formação do glutamato no citosol é um ponto essencial em alguns processos celulares, se o glutamato entra na via de desaminação, base e energia (ATP) são produzidas, em oposição à via de transaminação, que fornece os aminoácidos e energia (ATP) para processos biossintéticos (WELBOURNE et al., 2001).

O glutamato é uma molécula chave no metabolismo celular, é o mais abundante neurotransmissor do sistema nervoso central em mamíferos (DANBOLT, 2001; NOORLANDER et al., 2004). Na maioria de tipos celulares o aminoácido não essencial esta envolvido em processos metabólicos tais como síntese de proteínas, metabolismo energético e fixação de amônia. O metabolismo do glutamato é importante para o próprio crescimento e desenvolvimen to do feto em humanos. Níveis de glutamato na circulação fetal devem ser estritamente regulados porque níveis elevados são neurotóxicos (NOORLANDER et al., 2004). Alem de participar no crescimento e desenvolvimento do feto humano (NOORLANDER et al., 2004).

Moores et al. (1994) encontraram que glutamato esta presente na placentação ovina, sendo que nossos resultados mostraram a presença do

glutamato nos estágios embrionários podemos sugerir que ela se encontra presente no saco vitelino durante o desenvolvimento embrionário bovino. Outro aspecto que corrobora esta afirmação é que o glutamato esta presente no grupo VI, que indica o estagio fetal, ele encontra-se distribuído nos outros grupos, esse achados sugerem que o glutamato esta presente não somente no período fetal também no embrionário.

A glutamina esta intimamente relacionada com o glutamato. Este metabólito pode ser sintetizada em vários tecidos a partir do α-cetoglutarato e glutamato via glutamato aminotransferase e glutamina sintetase, ambas, enzimas citosólicas. Este metabólito desempenha uma serie de papeis fisiológicos importantes que incluem: (I) transferência de nitrogênio entre órgãos, (II) detoxificação de amônia e manutenção do equilíbrio ácido-básico durante a acidose, (III) precursor de nitrogênio para a síntese e degradação proteica, (IV) substrato energético para as células do sistema imune, em particular macrófagos e linfócitos, e também enterocitos (células da mucosa intestinal). Estudos *in vitro* sugerem que a diminuição da concentração de glutamina plasmática pode afetar e comprometer o funcionamento dessas células (JEPSON et al., 1988; PARRY-BILLINGS et al., 1990; ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996).

No desenvolvimento embrionário, o saco vitelino cumpre diversas funções para a sobrevivência do embrião entre elas é o primeiro lugar onde se inicia a hematopoese (PALIS, JAMES; YODER, 2001), nossos resultados sugerem que a presença da glutamina no saco vitelino de embriões bovinos é importante na manutenção das células do sistema imune, no estagio de maior susceptibilidade a perdas embrionárias (GALDOS-RIVEROS et al., 2010a).

A glutamina pode ser metabolizada e convertida a glutamato pela glutamina sintetase e então para α-cetoglutarato na qual pode ser oxidado pelo ciclo do ácido tricarboxilico (ciclo de Krebs) para gerar ATP, que é de grande importância no inicio do desenvolvimento embrionário (WU; ORLEFORS; BERGSTROM, 2000).

A alanina resulta da transferência de um grupo amina para o piruvato. Assim, a alanina possui uma relação próxima a vias metabólicas como a glicose, a gliconeogênese e o ciclo do ácido tricarboxilico (ciclo de Krebs).

Patridge e Leese (1996) quantificaram a depleção e aparecimento de aminoácidos em grupos de embriões bovino *in vitro* e *in vivo* em estágios do desenvolvimento. Esses autores observaram que durante a fase de zigoto somente a glutamina sofria significante depleção. Já no estágio de quatro células, treze aminoácidos são utilizados em grandes quantidades e no estagio do blastocisto somente quatro. Outra observação importante foi de que em todos os estágios de desenvolvimento houve o aparecimento de alanina o que sugere um papel importante desse aminoácido como meio de exportação dos íons amônia produzidos (DONNAY; PARTRIDGE; LEESE, 1999), uma vez que os embriões não possuem um ciclo de uréia funcional (PARTRIDGE; LEESE, 1996; ORSI; LEESE, 2004).

A formação do sistema renal no embrião acontece entre os dias 25 a 26 de gestação (CAGNOTO et al., 2009). Nossos resultados mostraram que a alanina esteve presente somente no grupo I com idade gestacional de 26 dias, o que sugere que o sistema renal ocupa a função da alanina até o final da gestação.

A taurina é abundante no cérebro, rim, coração e apresenta uma relação importante com a saúde e doença destes órgãos. Apresenta diversas funções biológicas como neurotransmissor no cérebro, estabilizador da membrana celular, citoprotetor (SCHAFFER et al., 2003) e facilitador no transporte de íons tais como sódio, potássio, cálcio e magnésio. A taurina pode ser sintetizada no corpo através cisteina quando a vitamina B6 esta presente (BIDRI; CHOAY, 2003).

A taurina é um abundante aminoácido livre intracelular com ação antioxidante na recuperação de intermediários tóxicos, na imunidade, na regulação do cálcio intracelular, no controle da hipertensão, por causa da sua abundancia na osmoregulação, e pode reduzir os efeitos prejudiciais da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o cultivo *in vitro*. Pode desempenhar um papel necessário no desenvolvimento do cérebro. Forma conjugados com ácidos biliares e pode aumentar o fluxo biliar e ampliar a remoção do colesterol pelo fígado (DEVLIN, 2011).

Em camundongos *knockout* com deficiência de taurina apresentou uma redução na fertilidade, perda da visão devido a degeneração da retina por mecanismos apoptóticos A taurina é um metabolito com função protetora para

o embrião, porque esta ligada com a inibição de formação de radicais livres em embriões bovinos (CAMARGO et al., 2002).

Estudos *in vivo* em varias espécies tem apresentado que a taurina é essencial em alguns aspetos do desenvolvimento em mamíferos, e tem demonstrado que baixos níveis estão associados com lesões patológicas, incluindo cardiomiopatia, degeneração da retina e atraso no crescimento, especialmente se a deficiência ocorre durante o desenvolvimento (STURMAN, JOHN A., 1988; STURMAN, J. A., 1993). Em gatos a deficiência da taurina durante o desenvolvimento embrionário mostrou um numero elevado de abnormalidades (STURMAN, J A et al., 1985).

Alguns aminoácidos são considerados sondas úteis para estudos de neurotransmissores neurais excitatórios devido a sua capacidade para interagir especificamente com estes sistemas em tecidos neurais de mamíferos (HASHIMOTO et al., 1993).

Segundo Fischer et al. (1991) o aspartato esta presente em elevadas concentrações na area cortical do cérebro de embriões durante os estágios iniciais da gestação. O aspartato é o metabólito que se encontra mais envolvido com vias metabólicas e sua presença é vital para o desenvolvimento do embrião através do saco vitelino, em nossos achados encontramos o aspartato ao longo da gestação.

A valina é um derivado do piruvato, sabe-se que é sintetizada do piruvato mitocondrial, já que a primeira reação da via biossintética da valina, catalizada pela enzima acetolactato sintase (Ilv2), ocorre na mitocôndria (FALCO; DUMAS; LIVAK, 1985).

As duas formas da valina L e D foram estudadas na aplicação em meios de cultura, por apresentar propriedades antiproliferativas em células endometriais (HONGPAISAN, 2000). Esta pesquisa mostra a importância deste metabólito, porque ele poderia controlar a transformação de alguns tipos celulares por mediação tanto do gene como da proteína. A valina foi encontrada no saco vitelino nos diferentes grupos gestacionais.

A valina esta relacionada com anemia falciforme, que é ocasionada pela substituição do acido glutâmico por valina na cadeia de β-hemoglobina (NAOUM, 1997), o que infere que este metabolito presente no saco vitelino poderia ser indicado como um potencial biomarcador embrionário.

A lisina é um metabólito que participa na degradação de aminoácidos, a via metabólica do acido aspártico é responsável pela síntese de quatro aminoácidos, entre eles a lisina, alem disso ela é cetogênica. O esqueleto carbônico entra no metabolismo intermediário como acetoacetil CoA. A lisina tem um ε- e um α-amino-grupo, que é transferido para o α-cetoglutarato por uma enzima bifuncional, com um intermediário chamado sacaropina (PAPES et al., 1999; DEVLIN, 2011).

A lisina mostrou estar relacionada com a taxa de ovulação e mortalidade embrionária aos 30 dias de gestação em suínos (MURGAS; TORRES; DONZELE, 1995). Em camundongos, a lisina mostrou estar envolvida em um complexo mecanismo de ativação mitocondrial no fígado (SCISLOWSKI; FOSTER; FULLER, 1994). No metabolismo da lisina, a enzima L-lisina ketoglutarato mostrou uma elevada atividade nos estágios iniciais do desenvolvimento, que vai diminuindo gradualmente durante o desenvolvimento do cérebro em ratos (RAO; PAN; CHANG, 1992).

A creatina é uma molécula não essencial da dieta, que é sintetizada da arginina, metionina e glicina. Primariamente pelo pâncreas e fígado (WALKER, 2006). Tem duas enzimas envolvidas na biossintese da creatina. A arginina: glicina amidinotransferase e s-adenosilmetionina: guanidinoacetato N-metiltransferase, que apresentam distribuição especifica em cada órgão. Os tecidos que sintetizam creatina em quantidades significantes não apresentam níveis elevados da creatina kinase (SNOW; MURPHY, 2001). No pâncreas de mamíferos contem elevados níveis das duas enzimas, e o pâncreas foi o primeiro órgão que mostrou ser capaz de converter arginina, glicina e S-adenocilmetionina para creatina (WALKER, 2006).

A creatina esteve levemente presente no saco vitelino dos diferentes grupos, o que sugere que o embrião encontra-se sintetizando este metabólito que forma parte de principais vias metabólicas tais como a síntese de uréia que indicaria que o embrião esta metabolizando aminoácidos importantes para seu desenvolvimento. O aumento da uréia circulante poderia alterar o ambiente uterino e prejudicar o desenvolvimento do embrião

A creatinina ou anhidro de cretina é um produto da decomposição de fosfato de creatina no músculo. A perda da molécula de água a partir dos resultados de creatina na formação de creatinina. Ela é transferida para os rins

pelo plasma sanguíneo, depois ela é eliminada da circulação plasmática por filtração glomerular e excreção tubular parcial. A creatinina é produzida normalmente numa taxa quase ínfima pelo corpo, em adultos a creatinina e a creatina são metabolizadas no pâncreas, rins, fígado e músculo (RULE et al., 2004).

A dihidrouracila é um metabolito que participa no metabolismo de nucleotídeos, especificamente, no catabolismo de pirimidino-nucleotídeos. O metabolismo de nucleotídeos é importante pela participação de alguns nucleotídeos ou de seus componentes em reações ou como precursores de substâncias de interesse biológico (VIEIRA; GAZZINELLI; MARES-GUIA, 1998). A dihidrouracila esteve presente em todos os grupos analisados, o que sugere que o saco vitelino, mesmo em involução continua com importantes funções metabólicas.

A indução de apoptose é uma opção viável e importante abordagem terapêutica para o controle do crescimento, diferenciação e manutenção celular. As variações dos aminoácidos tirosina, fenilalanina entre outros, podem promover o bloqueio à progressão do ciclo celular na fase G_0/G_1. O controle da apoptose está intimamente ligado ao ciclo celular , e os aminoácidos no controle da progressão do ciclo celular pela regulação da expressão genética (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). Assim, neste estudo a alanina, subproduto do metabolismo da fenilalanina, presente no grupo I (23 a 27 dias de gestação) mostrou-se um marcador importante na fase inicial de gestação e supostamente é um metabólito intermediário envolvido na indução de apoptose e parada de proliferação celular, como observado nos demais grupos experimentais, ao longo da gestação.

As mitocôndrias são organelas metabólicas importantes que geram ATP para fornecer energia e que contêm enzimas e/ou proteínas funcionais que regulam a apoptose. Apoptose induzida por estes aminoácidos, por exemplo, estão relacionados ao perfil metabólico. Este tipo de morte celular por apoptose é mais lento e também depende das alterações da integridade e função mitocondrial (SUSIN et al., 1999). Os potenciais elétricos das mitocôndrias das amostras dos diferentes períodos de gestação do saco vitelino mostraram diminuição da interação da sonda catiônica rodamina 123 aos elétrons da

membrana interna mitocondrial foram inversamente proporcionais à idade gestação.

Por outro, lado aminoácidos específicos modulam os membros da família anti-apoptótica Bcl-2 que desempenham importantes papéis na manutenção da integridade mitocondrial. A perda de integridade mitocondrial leva à liberação de citocromo-c, que pode levar à morte celular caspase-dependente, e liberação do fator de indução de apoptose, o que pode levar a morte celular caspase independente (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). Possivelmente, as variações da alanina detectadas nos amostras do saco vitelino do grupo I, modula o potencial transmembrana mitocondrial, e consequentemente esta modulação leva à liberação do citocromo-c da mitocôndria para o citosol e ativação das caspases.

Jackowski (1996) estudou o acúmulo de lipídeos (LP), de precursores dos lipídeos e derivados em eventos periódicos associados a fases distintas do ciclo celular. O estudo demonstrou, em uma célula mitogeno-estimulada, o acumulo de LP é coordenado na fase S do ciclo celular (embora a síntese LP não seja dependente da síntese de DNA). Mais especificamente, nos primeiros estudos as análises espectrais e as fases do ciclo celular mostraram que: (a) o acúmulo de líquido LP ocorre na fase S como um resultado do ciclo celular dependente de oscilações nas taxas de síntese e degradação de derivados do LP, (b) um *turnover* mais rápido de LP ocorre em a fase G_1 e continua até o limite G_1/S (C) a limitação da taxa de biossíntese de derivados de LP, está também ativado na forma de células-ciclo-dependentes, a partir no G_1, aumentando constantemente em S e G_2/M, e observa-se um declínio acentuado durante a fase S e acelera novamente como células reentradas em G_1. Durante a fase G_1 ambos os caminhos de derivados LP mediados por hidrólise são, portanto, a máxima atividade celular. Esta evidência sugere que a produção máxima de lipídeos em um tumor (ou em uma célula de proliferação rápida) provavelmente ocorre na fase G_1 e é mantida na fase S (onde biossíntese LP está parado), fornecendo uma possível explicação para a correlação positiva entre os derivados de LP a intensidade do sinal nas células tumorais. Em contraste, a biossíntese de lipídeos parece ser parada, durante a fase G_1, e não se observou a biossíntese nestas células.

Estudos realizados em ^{1}H-RMN, demonstraram perfis importantes que estão estreitamente associados a processos de morte celular, como os compostos contendo grupos metil (CH3), do metileno (CH2) e de lipídios de cadeias longas. Em particular, o aumento significativo de CH2 , CH3 e lipídios foram observados em cultura de células , e diminuição de glutamina e glutamato, colina e taurina, após o tratamento com diferentes estímulos (BLANKENBERG et al., 1996; HAKUMÄKI; KAUPPINEN, 2000; BEZABEH et al., 2001). Estes resultados indicam que as variações observadas são, de fato características independentes da natureza do estímulo da apoptose; estas informações biológicas são úteis sobre a determinação do perfil metabólico relacionado com a morte celular programada.

6.3 PERFÍL PROTÉICO DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS

Com o sequenciamento 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.

Um correto número de células no blastocisto é requerido para um desenvolvimento normal do embrião. Durante o desenvolvimento embrionário, a metilação do DNA desempenha uma função importante na regulação da expressão gênica. A demetilação do genoma ocorre após a fertilização seguido de uma nova metilação tão breve como acontece a diferenciação (HAN et al., 2003; REIK; SANTOS; DEAN, 2003; RIDEOUT; EGGAN; JAENISCH, 2001).

O stress oxidativo ocorre porque há uma produção de ROS e enzimas antioxidantes reducem o stress oxidativo por remoção do ROS, que possuem radicais livres que induzem dano celular (TAKAHASHI et al., 2004). A gestação aumenta o stress oxidativo por aumento da atividade metabólica na mitocôndria e reduz a capacidade de remoção dos antioxidantes (WISDON et al., 1991).

O saco vitelino de embriões bovinos é uma membrana extra-embrionária que durante a gestação da suporte do tipo nutritivo, trocas gasosas, remoção de resíduos e suporte imunológico e endocrinológico para o desenvolvimento embrionário e fetal (YANG et al., 2002).

Filamentos de actina ou tubulina do citoesqueleto, histona, sub unidades da hemoglobina, HSP-β1, proteína ribossomal, marcadores da matrix extracelular vimentina e anexina 2 e 5 foram encontradas no SVEB. De acordo com Reutelingsperger et al. (2002) estas proteínas demonstraram estar expressas durante todo o desenvolvimento estudado. As Anexinas são proteínas estruturais que apresentam uma atividade liga ao Calcio para fosfolipideos, são conhecidos biomarcadores da apoptose A família de proteínas HSP são reguladores da apoptose que interage com componentes chave da sinalização apoptótica (CONCANNON; GORMAN; SAMALI, 2003), a HSP-β1 demonstrou estar presente no SVEB o que corrobora os achados de Chae et al. (2005) que encontraram estas proteínas nos tecidos extra-embrionários de embriões suínos.

A enolase e lactato desidrogenase são enzimas que participam no metabolismo anaeróbico da glicose. A placenta de mamíferos incluindo do homem são dependentes da glicose com respiração mitocondrial limitada e principalmente conversão anaeróbica da glicose para o lactato (HAUGUEL; SHAFRIR, 2001). Essas proteínas estiveram presentes nas amostras de saco vitelino de embriões bovinos.

A actina é uma proteína essencial para a divisão celular, migração, formação de junções celulares e regulação da forma celular. No SVEB foram encontradas nove isoformas de actina divididas em: musculares, que são expressas principalmente nos músculos esquelético, cardíaco e musculatura lisa (MCHUGH; CRAWFORD; LESARD, 1991; TONDELEIR et al., 2009) e citoplasmáticas, que estão presentes em todas as células, tanto em aves como em mamiferos (PERRIN; ERVASTI, 2010).

A α-fetoproteina (AFP) é uma glicoproteina com massa molecular de 68 - 70 kD, produzida pelo saco vitelino e fígado fetal durante o desenvolvimento embrionário dos mamíferos. Embrionariamente, ela é detectada no saco vitelino a partir da sexta semana de gestação em humanos (GITLIN, D.;

PERRICELLI, 1970; TOMASI, 1977), em camundongos no 10º dia de gestação (DZIADEK, 1978), em aves no 7º dia de gestação (MARTIN et al., 1985). Em tubaroes, a AFP esta presente no saco vitelino e fígado em quantidades menores quando comparadas com o trato gastrointestinal (NISHI; HIRAI, 1973). A função fisiológica normal da AFP é desconhecida, mas é atribuídas funções como absorção, transporte e deposito intracelular de metabólitos, assim como a incorporação de ácidos graxos poli-insaturados no desenvolvimento do cérebro em mamíferos (URIEL et al., 1983), ácido retinóico, metais pesados, drogas e esteróides (TOMASI, 1977). Já Daffos; Foresteir, (1988) propõem uma função de proteção do feto, evitando a rejeição deste pela mãe.

Uma diminuição na produção de AFP resultaria na diminuição significativa na concentração desta no soro embrionário, com consequente perda da pressão osmótica coloidal e movimentação de água na corrente sanguínea aos tecidos vasculares. A perda do balance nestes fluidos podem provocar bolhas e edemas que conduziriam a falhas na morfogênese do embrião mamífero (GRABOWSKI, 1977). As concentrações da AFP nas diferentes idades gestacionais da AFP nas diferentes idades gestacionais demonstraram que nos grupos I e II sofreram uma queda significativa em relação aos outros grupos, devido à transição do órgão que produz e sintetiza esta proteína, o saco vitelino. A função de síntese e transporte esta sobre controle do desenvolvimento do fígado fetal que exercerá sua função de agora em diante.

Em nossos resultados, foi encontrada a presença da AFP nos grupos estudados, especificamente, no dia 25º até o dia 41º de gestação. Este fato demonstra que a AFP é embrionária e esta presente no começo do desenvolvimento fetal. As diferentes concentrações de AFP do SVEB esta relacionada com importantes vias metabólicas, como o dos carboidratos e lipídios.

Thomas et al. (1990) detectaram proteínas envolvidas em processos hematopoiéticos durante a formação do embrião. A transtiretina, AFP e transferrina foram detectadas no saco vitelino e no fígado fetal em ratos. A transferrina é uma proteína de massa molecular de 85 KDa essencialmente produzida pelo fígado, apresentando uma função de transporte de ferro. De

acordo com Streu et al. (2000) a transferrina, uma glicoproteína presente em altas concentrações no fluido amniótico, realizava o transporte de ferro durante a gestação, suprindo o aumento da demanda fetal de ferro. Esta proteína tem influencia no controle da produção de progesterona modulando a função endócrina do trofoblasto. A transferrina demonstrou estar presente nas amostras do SVEB, e sua concentração metabólica foi diminuindo com o aumento da idade gestacional o que corroboram os resultados de Andrews et al. (1992), os quais indicam que a TF encontra-se diminuída com o avanço da gestação quando comparado com TF proveniente de cultura *in vitro* na qual altas concentrações de TF sugerem um transporte abnormal desta proteína, o que desencadearia num desenvolvimento abnormal do embrião ou morte embrionária.

A partir do 11,5 dias de gestação em camundongos, pequenas quantidades de TF são sintetizadas no saco vitelino visceral e são transportadas através do saco vitelino para a circulação materna por mecanismos de pinocitose e por receptores mediados por endocitose. A TF é uma proteína de ligação ao ferro que é fundamental para a diferenciação. Um aumento nos níveis de TF resultaria em um desenvolvimento abnormal do embrião conhecido como síndrome do edema, que consiste numa sequencia de eventos dismorfogenéticos que são comparados com mecanismos de teratogenese (WILSON, J. G., 1973; ANDREWS et al., 1992).

6.4 CICLO CELULAR E MORTE CELULAR DO SACO VITELINO DE EMBRIÕES BOVINOS

A apoptose e a necrose representam dois mecanismos diferentes pelo qual as células morrem, sendo desencadeadas por diferentes estímulos e desempenham um papel chave na supressão do crescimento celular, que ocorre durante a embriogênese , na remodelagem tecidual no adulto, na atrofia do tecido e na regressão do crescimento de células transformadas. A apoptose é caracterizada pelo encolhimento da célula, com diminuição do volume nuclear, *blebbing* da membrana, condensação acentuada e marginalização da

cromatina nuclear, formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA em regiões internucleossômicas que dão origem a múltiplos pares de bases, em média de 180-200pb. Por outro lado, a morte celular por necrose pode ocorrer em resposta a agressões e injúrias exógenas e endógenas, como isquemia, toxinas, hipertermia e trauma celular direto. Necrose é caracterizada pelo inchaço das células, destruição de organelas, rompimento de membranas, lise da cromatina nuclear, sem condensação, e a degradação do DNA sem a produção de em um espectro de tamanhos de pares de bases (BEZABEH et al., 2001).

O desenvolvimento e manutenção dos organismos multicelulares dependem de uma interação entre as células que o constituem. No desenvolvimento embrionário, muitas células produzidas em excesso são levadas à morte, contribuindo para a formação dos órgãos e tecidos (MEIER; FINCH; EVAN, 2000). A apoptose é a forma de morte celular programada, com especial relevância para o período do desenvolvimento embrionário, onde participa ativamente nos processos de organogênese e de involução (SOLÁ et al., 2005).

As mitocôndrias são importantes para o funcionamento celular porque produzem ATP (adenosin trifosfato), regulam o ciclo de Krebs, metabolismo de ácidos graxos, uréia e alguns hormônios; além disso, elas mediam os processos de morte celular, regulam o balanço iônico e armazenam cofatores importantes para a homeostase (DESAGHER; MARTINOU, 2000; GOGVADZE; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY, 2006; TARAZONA, A. M. et al., 2006; TARAZONA, A.M.; OLIVERA-ANGEL; LENIS, 2010).

O saco vitelino apresentou uma alta atividade mitocondrial nos primeiros estágios de gestação, entre 23 a 27 dias (Grupo I), o que sugere uma atividade metabólica ainda favorável para o embrião (TARAZONA, A. M. et al., 2006).

A mitocôndria desempenha um papel central na ativação das caspases através da liberação do citocromo-c (via intrínseca) (TARAZONA, A.M.; OLIVERA-ANGEL; LENIS, 2010), em nossos resultados a expressão do citocromo-c apresenta um aumento nos grupos com idades avançadas, entre 33 a 57 dias (Grupo III – VI), o que representaria a ativação da apoptose mediante as caspases e portanto demonstraria que o saco vitelino estaria

involuindo para delegar sua função à placenta no decorrer do processo embrionário.

Durante o processo de apoptose a membrana mitocondrial torna-se permeável a muitas proteínas, dentro destas, o citocromo-c (DESAGHER; MARTINOU, 2000; PERKINS; BOSSY-WETZEL; ELLISMAN, 2009; ULIVIERI, 2010) o que explicaria o aumento proporcional com o avanço da idade gestacional.

As caspases pertencem à família das cisteinas proteases (possuem uma cisteina no sitio ativo) que possuem a capacidade de reconhecer e clivar substratos que contenham resíduos de aspartato (NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, 1997). A expressão da caspase 3 no grupos I foi altamente significativa em comparação com os outros grupos, pelo qual pensaríamos que apresenta uma relação com a expressão dos marcadores de síntese, por tanto a involução do saco vitelino estaria relacionada com a indução da apoptose.

A necrose é um tipo de morte celular, na qual as células sofrem uma perda da permeabilidade celular e consequente, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Pela expressão dos marcadores Anexina V/PI visualizamos um aumento progressivo da necrose na medida em que idade gestacional do saco vitelino aumenta porem a expressão da Anexina V torna-se diminuída no avanço da idade gestacional, o qual demonstraria que o saco vitelino torna-se disfuncional pela perda da atividade celular no metabolismo e a função que desempenha na supervivência do embrião no primeiro terço da gestação.

A Anexina-V foi o marcador com maior expressão em todas as idades embrionárias. Interessantemente, este marcador além de expresso por células-tronco, é responsável pela ativação apoptótica celular (ANAZETTI; MELO, 2007). Neste caso, podemos inferir que o saco vitelino nesta espécie, por ser transitório, já apresenta mecanismos de ativação apoptótica desde idades iniciais enquanto ele está ainda ativo, conforme encontramos em dados de microscopias óptica, eletrônica de transmissão, eletrônica de varredura das idades analisadas.

A partir deste perfil de superexpressão, podemos sugerir outra função ainda não descrita do saco vitelino: como anticoagulante placentário

(BARRETO FILHO; MARQUES JUNIOR, 1993; DE LAAT et al., 2007), pois pode manter a homeostase dos tecidos placentários com papel funcional de maturação e não descolamento da placenta (GALDOS-RIVEROS et al., 2010a), o que poderia levar a um aborto ainda no período embrionário.

Durante a apoptose uma cascata de eventos levam um organismo a uma morte celular programada, mas tem agentes que tentam evitar o processo, são conhecidos como membros da família da Bcl-2 (HOCKENBERY et al., 1990). Este e seus homólogos pertencem a uma família de proteínas que promovem ou previnem a apoptose. São potentes reguladores das mudanças mitocôndrias durante a apoptose e necrose (SKOMMER; WLODKOWIC; DEPTALA, 2007).

Entre os membros que inibem a apoptose temos: Bcl-2 e Bcl-X_L, a expressão do marcador Bcl-2 no saco vitelino mostrou um aumento significativo no grupo com menor idade gestacional (Grupo I) o que sugere que ainda apresenta uma atividade metabólica funcional, a apoptose estaria presente por estar participando nos processos de organogênese e na involução.

Os outros membros da família Bcl-2 que promovem a apoptose, entre eles as proteínas BAX e BAD apresentam atividade pro-apoptótica (YANG et al., 1995; ZHA et al., 1996). A expressão dos marcadores BAX e BAD mostrou um aumento significativo da atividade apoptótica no saco vitelino, demonstrando uma correlação positiva e aumento deste marcador nas idades mais velhas. A involução do saco vitelino acontece muito cedo nos ruminantes (MOSSMAN, 1987; NODEN; LAHUNTA, 1990). A expressão dos marcadores de morte celular (apoptose e necrose) mostrou que o saco vitelino com idade gestacional menor, especificamente entre 23 a 27 dias (Grupo – I), apresenta atividade funcional significativa em comparação com os outros grupos, nos quais os processos de apoptose tardia e conseqüente necrose encontram-se ativados.

A superfamília dos receptores fatores de necrose tumoral (rTNF) inclui diversos receptores, entre eles o r-TNFR-1, Fas/CD95, TRAIL. Os membros da família r-TNF têm por principal característica um domínio extracelular rico em cisteína (ASHKENAZI, 2002). A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília

dos receptores de fatores de necrose tumoral (r-TNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (BUDIHARDJO et al., 1999).

A expressão do marcador r-TNF no saco vitelino com idades mais novas (Grupo – I) demonstra que esta via de apoptose esta ativada (BUDIHARDJO et al., 1999; ASHKENAZI, 2002). Nos outros grupos a expressão encontra-se diminuída pela inatividade ou processo de involução do saco vitelino.

O ciclo celular é um processo pela qual as células se reproduzem, e faz parte no crescimento e desenvolvimento de todos os seres vivos (NURSE, 2000). Os eventos de maior transcendência do ciclo celular são as que dizem respeito a copia e particionamento do material hereditário que é a replicação do DNA cromossômico durante a fase S e separando os cromossomas replicados durante a mitose (NURSE, 2000).

Andrews et al. (1992) estudaram o ciclo celular de células sanguíneas do saco vitelino de embriões de ratas na qual observaram um aumento na fase S do ciclo celular que indica uma parada na capacidade proliferativa e demora na regulação que normalmente ocorre nas fases G_0/G_1 e G_2/M de tecidos, células maturas e linhagens celulares em cultura (O'FARRELL, P. et al., 1989). O ciclo celular do saco vitelino de embriões bovinos apresentou um aumento das células haplóides com DNA fragmentado, uma parada na fase G_0/G_1 de todos os grupos gestacionais, aumento da fase S e uma parada da fase G_2/M que indica uma diminuição da capacidade proliferativa que corrobora com os resultados da expressão do marcador PCNA, desta maneira podemos afirmar que quanto maior a idade gestacional menor é a capacidade de proliferação celular do saco vitelino.

Nossos estudos somam-se aos de Andrews et al. (1992), relativamente a interrupção que sofreu na fase G_0/G_1 dos nossos experimentos. Estes indicam um atraso ou dano do DNA que se mostrou pela expressão e aumento da população Sub G_1, em todos os grupos gestacionais. O'Farrell et al. (1989) demonstram que as células que se encontram na fase S estão em atraso na regulação do ciclo celular que normalmente ocorre nas fases G_1 e G_2 em tecidos e células (ALBERTS et al., 2011).

A importância dos tipos individuais de colágenos no desenvolvimento e morfogênese de embriões de camundongos tem sido demonstrada por vários

estudos (LÖHLER; TIMPL; JAENISCH, 1984; LI, S. W. et al., 1995; COSGROVE et al., 1996; LIU, X. et al., 1997).

A HSP 47 é uma proteína de shock térmico que cumpre uma função de chaperona molecular. Essas proteínas se ligam a cadeias polipeptídicas parcialmente enoveladas e as ajudam a atingir sua conformação nativa da maneira mais favorável energeticamente. Alem disso, elas são extremamente importantes nas condições do citoplasma, pois elas impedem que proteínas recém-sintetizadas se associem erroneamente. Contudo, a conformação final tridimensional da proteína é especificada pela sua sequencia de aminoácidos: as chaperonas apenas tornam o processo de enovelamento mais eficiente e confiável (ALBERTS et al., 2011)

A capacidade de síntese avaliada pela expressão da proteína HSP47 mostrou um aumento significativo no grupo de menor idade gestacional, porém em menor proporção no resto dos grupos gestacionais, a proteína HSP47 esta localizada no reticulo endoplasmático das células produtoras de colágeno, e esta intimamente associada com a taxa de montagem do procolágeno (TASAB; BATTEN; BULLIED, 2000; BROWN et al., 2005; TAGUCHI et al., 2011).

Nagai et al. (2000) afirma que a deficiência da proteína HSP47 impede ao colageno I de formar a estrutura triple helicoidal do procolágeno presente nas células, resultando em um desenvolvimento embrionário anormal. Tais resultados nos levam a pensar que a diminuição da expressão do marcador HSP47 nos grupos II a VI do saco vitelino, estão perdendo a capacidade de síntese do procolágeno com o decorrer da idade gestacional, originada pelo aumento da apoptose, que consequentemente levaria a morte e involução do mesmo.

O desenvolvimento *in situ* de células epiteliais provenientes do precursor de células mesodermais (angioblasto) é conhecido como vasculogênese. A vasculogênese compartilha os processos de proliferação de células endoteliais e formação do lúmen com a angiogênese, a formação das redes vasculares pela germinação de células epiteliais vindas de vasos existentes (PALIS, J.; MCGRATH; KINGSLEY, 1995; PEREDA, 2001)

Existem muitos tecidos com capacidade angiogênica, como por exemplo, vasos cerebrais em mamíferos (particularmente no hipotálamo e corpo pineal), retina, ovários testículos, glândulas salivares, sinovia e fígado.

Similar capacidade angiogênica tem apresentado os adipócitos, células epidermais, macrófagos, linfócitos T e no saco vitelino embrionário (FAJARDO, 1989).

Durante a embriogênese, a expressão do receptor do VEGF-R1 encontra-se criticamente envolvido na formação do sistema vascular através da regulação do crescimento e sobrevivência dos vasos sanguíneos (BREIER, 2000). O saco vitelino é uma membrana vascularizada durante as primeiras semanas do desenvolvimento do embrião (PALIS, J.; MCGRATH; KINGSLEY, 1995; PALIS, J. et al., 2001). O VEGF parece ser um dos mais importantes na família, atua como um elemento regulador da angiogênese temporária, sendo produzido de modo parácrino pela endoderme (RISAU; FLAMME, 1995; NICO et al., 2001; KÖHN-LUQUE et al., 2011).

Este fator de crescimento é importante para um desenvolvimento normal da vasculogênese e angiogênese no saco vitelino, que demonstrou ser expressa nos dói s primeiros grupos (I e II) com idades gestacionais menores em comparação com os outros grupos, isto nos sugere a presença ativa do VEGF no mesoderme do saco vitelino contribuindo na formação da vascularização vitelino, que também observamos nos achados histológicos.

Cheung (1997) estudou o VEGF no desenvolvimento embrionário e fetal, e afirmou o papel critico deste fator de crescimento em ratos transgênicos que necessitam de uma cópia do gene do VEGF, este animais morrem “in útero”, afetados por uma angiogênese aberrante no saco vitelino e no embrião propriamente dito.

O processo de involução do saco vitelino produz a inibição do VEGF como observado nos grupos III a VI. As demandas metabólicas direcionam a vascularização dos tecidos extra-embrionários para a formação da placenta, que acompanhara o desenvolvimento normal do embrião até o nascimento.

6.5 MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

A marcação celular é uma importante ferramenta que define o potencial e a plasticidade característica de uma população celular. Neste sentido, Pessolato (2011) observou uma contradição da literatura em descrever a potencialidade das células-tronco do saco vitelino como pluripotenciais (BEIGUELMAN, 2000; CHO et al., 2006). As células-tronco pluripotentes são apenas aquelas extraídas da massa celular interna do blastocisto (THOMSON et al., 1998; LIU et al., 2004; LINHENG; LI; TING XIE, 2005). Após este estágio as células possuem uma potencialidade mais limitada, uma multipotencialidade (PESSOLATO, 2011). Portanto, as células vitelinas apesar de serem extraídas de estágios iniciais de desenvolvimento embrionário são consideradas células-tronco adultas (ZAGO; COVAS, 2006; PESSOLATO et al., 2010).

Apesar da inconsistência da literatura em relação ao potencial das células-tronco do saco vitelino, foi possível observar que, mesmo sendo estas células consideradas células-tronco adultas multipotentes pela classificação e consenso geral, as mesmas mantêm níveis consideráveis de marcadores primitivos característicos de pluripotência como Oct-3/4 e NANOG (THOMSON et al., 1998; LIU et al., 2004) em todas as idades embrionárias. Surpreendentemente, as células vitelinas dos embriões bovinos estudados apresentaram um aumento na marcação de tais marcadores com o decorrer do desenvolvimento embrionário. Fato este que não era esperado, uma vez que contradiz literaturas renomadas de padronização das células-tronco dos mais diferentes tecidos.

Além disso, as células vitelinas apresentaram marcação significativa do marcador CD133, gene este que é essencialmente expresso pelo hemangioblasto (MILLAUER et al., 1993; KABRUN et al., 1997; FORRAI; ROBB, 2003; BERTRAND; TRAVER, 2009; LANCRIN et al., 2009), e por células-tronco hematopoéticas primitivas de cordão umbilical (ZAGO; COVAS, 2006). No trabalho de Pessolato (2011) em que foram analisadas células-tronco primitivas do saco vitelino de embriões ovinos em diferentes idades de desenvolvimento, foi observada por Real Time, uma alta expressão deste gene principalmente entre as idades de 24 e 27 dias, quando segundo ela, tal gene

era provavelmente requerido para o desenvolvimento das ilhas sanguíneas (MANDRIOTA; MENOUD; PEPPER, 1996). Interessantemente, este marcador também apresentou aumento nos índices de expressão com o decorrer do desenvolvimento embrionário em nossas análises em bovinos, contradizendo toda a literatura de embasamento deste marcador.

O marcador de superfície celular Stro-1 é considerado o melhor marcador para células-tronco mesenquimais (KOLF; CHO; TUAN, 2007), porém não é exclusivo para este tipo de célula, uma vez que a determinação de tal tipo celular depende de uma gama de outros fatores de transcrição, bem como de diferenciação e morfológicos. O CD 90 já é um marcador expresso em uma série de linhagens celulares fibroblásticas estromais, endoteliais, e algumas linhagens celulares tumorais. Está envolvido na adesão e migração (SICLARI; QIN, 2010), ou seja, é considerado um marcador de células-tronco em um estágio mais acometido de desenvolvimento. No presente estudo, o contrário do esperado para o estágio de desenvolvimento dos embriões estudados, tais marcadores mantiveram índices consideráveis, porém baixos em todas as idades analisadas. No entanto, apesar de semelhante aos outros marcadores, estes também apresentaram um nível de marcação aumentado com o desenvolvimento embrionário.

Estas características reforçam a hipótese de que as células vitelinas contradizem as características moleculares esperadas para outros tipos de células-tronco. Elas apresentam marcadores de um potencial mais amplo de diferenciação que deveriam ter sido perdidos em estágios bem anteriores aos que os mesmos apresentam, segundo a literatura afirma em células humanas.

Talvez este perfil fosse alterado se as mesmas fossem submetidas a condições de cultura, mas não mudaria o fato do saco vitelino ser uma interessante e enigmática fonte de células, com potencial de utilização em diversas áreas de pesquisa.

7 CONCLUSÕES

O desenvolvimento do embrião é complexo e influenciado por diversos fatores, sendo totalmente dependente de um balanço adequado entre o metabolismo que engloba a proliferação, diferenciação e morte celular. O saco vitelino é um anexo embrionário presente em todas as espécies de vertebrados, portanto desempenha funções chave durante o desenvolvimento embrionário, durante este processo muitas células serão criadas e outras são levadas a morte, contribuindo para a formação dos órgãos e tecidos. Embora o tempo de vida do saco vitelino seja curto a importância dele perdurara durante toda a vida do novo ser. A involução do saco vitelino de embriões bovinos tanto morfologicamente como bioquimicamente, determina o fim do primeiro trimestre de gestação e fisiologicamente significa a sobrevivência do embrião frente a diversos estímulos.

Os resultados apresentados neste exemplar permitiram concluir:

- A análise morfológica do saco vitelino mostrou uma involução a partir do dia 30° de gestação embrionária bovina;
- O saco vitelino demonstrou ser um órgão que sintetiza, transporta importantes proteínas para o embrião tais como filamentos de actina ou tubulina do citoesqueleto, histona, sub unidades da hemoglobina, HSP-β1, proteína ribossomal, marcadores da matrix extracelular vimentina.
- O saco vitelino demonstrou a presença de metabolitos que estão relacionados com o desenvolvimento do embrião tais como alanina, mio-inositol, taurina, colina e glicerofosfocolina, cadaverina, glutamato, glutamina, lactato, hidrouracila, creatina e creatinina, aspartato e lisina.
- O saco vitelino demonstrou ser fonte de células-tronco adultas expressas nos marcadores Stro-1, CD90, CD133, NANOG,
- Ocorreu uma correlação entre a presença de metabolitos e proteínas envolvidos nas de vias de sinalização da morte celular nos diferentes períodos de gestação do saco vitelino de embriões bovinos.
- O saco vitelino demonstrou apoptose nas idades mais novas e necrose nas idades mais velhas.

REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.

ALBERTO, M. L. V.; TRUJILLO, H. A. G.; RIVEROS, A. C. G.; LIMA, E. B.; MIGLINO, M. A.; SANTOS, J. M. Bovine Meroanencephaly and Gastroschisis: a Macro and Microscopic Study. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 37, n. 3, p. 192-195, 2008.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALKER, P. **Fundamentos da Biologia celular**. Porto Alegre: ARTMED, 2011. 843 p.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ANDREWS, J. E.; EBRON-MCCOY, M.; ZUCKER, R. M.; ELSTEIN, K. H.; ROGERS, J. M. In vitro/in vivo comparison of yolk-sac function and embryo development. **Toxicology in Vitro**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 1992.

ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 6, p. 420-430, 2002.

ASSIS NETO, A. C.; PEREIRA, F. T. V.; SANTOS, T. C.; AMBROSIO, C. E.; LEISER, R.; MIGLINO, M. A. Morpho-physical Recording of Bovine Conceptus (Bos indicus) and Placenta from Days 20 to 70 of Pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 5, p. 760-772, 2010.

BARBA, I.; CABAÑAS, M. E.; ARÚS, C. The Relationship between Nuclear Magnetic Resonance-Visible Lipids, Lipid Droplets, and Cell Proliferation in Cultured C6 Cells. **Cancer Research**, v. 59, n. 8, p. 1861-1868, 1999.

BARON, M. H. Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. **Experimental Hematology**, v. 31, n. 12, p. 1160-1169, 2003.

BARONE, R. Anatomie comparèe dês mammifères domestiques. In: (Ed.). **Book title**. Paris: Vigot Frères, 1976. v.2, p.579-605

BARRETO FILHO, J. B.; MARQUES JUNIOR, A. P. Aspectos histológicos da placenta de vacas zebu. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 45, n., p. 385-393, 1993.

BEACH, D. C.; FLICK, P. K. Early effect of myo-inositol deficiency on fatty acid synthetic enzymes of rat liver. **Biochim Biophys Acta.**, v. 711, n., p. 452-459, 1982.

BEEMSTER, P.; GROENEN, P.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. Involvement of Inositol in Reproduction. **Nutrition Reviews**, v. 60, n. 3, p. 80-87, 2002.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature**, v. 361, n. 6410, p. 315-325, 1993.

BETTERIDGE, K. J.; FLÉCHON, J. E. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 155-187, 1988.

BEZABEH, T.; MOWAT, M. R. A.; JAROLIM, L.; GREENBERG, A. H.; SMITH, I. C. P. Detection of drug-induced apoptosis and necrosis in human cervical carcinoma cells using 1H NMR spectroscopy. **Cell Death Differ**, v. 8, n., p. 219-224, 2001.

BIDRI, M.; CHOAY, P. Taurine: a particular aminoacid with multiple functions. **Ann Pharm Fr.**, v. 61, n. 6, p. 385-391, 2003.

BIELINSKA, M.; NARITA, N.; HEIKINHEIMO, M.; PORTER, S. B.; WILSON, D. B. Erythopoisis and vasculogenesis in embryonic bodies lacking visceral yolk sac endoderm. **Blood**, v. 88, n., p. 3720-3730, 1996.

BINNECK, E. As ômicas: integrando a bioinformação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, n. 32, p. 28-37, 2004.

BJÖRKMAN, N. Placentação. In: H. Dellman e E. M. Brown (Ed.). **Book title**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982, p.279-294

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

BLANKENBERG, F.; STORRS, R.; NAUMOVSKI, L.; GORALSKI, T.; SPIELMAN, D. Detection of apoptotic cell death by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Blood**, v. 87, n. 5, p. 1951-1956, 1996.

BLANKERBERG, F.; NARULA, J.; STRAUSS, W. In vivo detection of apoptotic cell death: A necessary measurement for evaluating therapy for myocarditis, ischemia, and heart failure. **Journal of Nuclear Cardiology**, v. 6, n. 5, p. 531-539, 1999.

BLOOM, W.; BARTELMEZ, G. W. Hematopoiesis in young human embryos. **American Journal of Anatomy**, v. 67, n. 1, p. 21-53, 1940.

BLUMENTHAL, A. B.; KRIEGSTEIN, H. J.; HOGNESS, D. S. The Units of DNA Replication in Drosophila melanogaster Chromosomes. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 38, n., p. 205-223, 1974.

BOATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 725-731, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248-254, 1976.

BRAMBELL, F.; ROGERS, W. THE PASSIVE IMMUNITY OF THE YOUNG MAMMAL. **Biological Reviews**, v. 33, n. 4, p. 488-531, 1958.

BREIER, G. Functions of the VEGF/VEGF Receptor System in the Vascular System. **Semin Thromb Hemost**, v. 26, n. 05, p. 553,560, 2000.

BRILL, A.; TORCHINSKY, A.; CARP, H.; TODER, V. The Role of Apoptosis in Normal and Abnormal Embryonic Development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 16, n. 10, p. 512-519, 1999.

BROWN, K. E.; BROADHURST, K. A.; MATHAHS, M. M.; BRUNT, E. M.; SCHMIDT, W. N. Expression of HSP47, a collagen-specific chaperone, in normal and diseased human liver. **Lab Invest**, v. 85, n. 6, p. 789-797, 2005.

BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. BIOCHEMICAL PATHWAYS OF CASPASE ACTIVATION DURING APOPTOSIS. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 15, n. 1, p. 269-290, 1999.

BUTT, J. H.; WILSON, T. H. Development of sugar and amino acid transport by intestine and yolk sac of the guinea pig. **American Journal of Physiology -- Legacy Content**, v. 215, n. 6, p. 1468-1477, 1968.

CAGNOTO, D. G.; GUERRA, R. R.; ALBERTO, M. V.; AMBRÓSIO, C. E.; SANTOS, J. M.; MIGLINO, M. A. Morfologia e desenvolvimento ultraestrutural do sistema renal de embriões bovinos com idade gestacional entre 10 e 50 dias. **Ciencia Rural**, v. 39, n. 7, p. 2154-2161, 2009.

CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M.; ARAÚJO, M. C. C. Taurina no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n., p. 396-404, 2002.

CASTEDO, M.; PERFETTINI, J.-L.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K.; MEDEMA, R.; KROEMER, G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2825-2837, 2004.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by Streptomyces species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. Suppl 2, p. 14555-14561, 2003.

CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; NICHOLS, J.; LEE, S.; TWEEDIE, S.; SMITH, A. Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 643-655, 2003.

CHAMBERY, A.; VISSERS, J. P. C.; LANGRIDGE, J. I.; LONARDO, E.; MINCHIOTTI, G.; RUVO, M.; PARENTE, A. Qualitative and Quantitative Proteomic Profiling of Cripto−/− Embryonic Stem Cells by Means of Accurate Mass LC−MS Analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 2, p. 1047-1058, 2009.

CHANDECK, C.; MOOI, W. J. Oncogene-induced Cellular Senescence. **Adv Anat Pathol**, v. 17, n. 1, p. 42-48, 2010.

CHEUNG, C. Y. Vascular Endothelial Growth Factor: Possible Role in Fetal Development and Placental Function. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 4, n. 4, p. 169-177, 1997.

CIEMERYCH, M. A.; SICINSKI, P. Cell cycle in mouse development. v. 24, n. 17, p. 2877-2898, 2005.

CLINE, M. J.; MOORE, M. A. S. Embryonic Origin of the Mouse Macrophage. **Blood**, v. 39, n. 6, p. 842-849, 1972.

COLNAGO, L. A.; ALMEIDA, F. C. L.; VALENTE, A. P. **Espectrometria de Massas e RMN Multidimensional e Multinuclear** - Revolução no estudo de macromoléculas biológicas **QUIMICA NOVA NA ESCOLA**, v. 1, n. 16, p. 9-14, 2002.

CONCEIÇÃO, R. A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; CARVALHO, A. F.; FRANCIOLLI, A. L. R.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. Aspectos morfológicos do saco vitelino em roedores da subordem Hystricomorpha: paca (Agouti paca) e cutia (Dasyprocta aguti). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n., p. 253-259, 2008.

COON, J. J.; UEBERHEIDE, B.; SYKA, J. E. P.; DRYHURST, D. D.; AUSIO, J.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F. Protein identification using sequential ion/ion reactions and tandem mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 27, p. 9463-9468, 2005.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUZA, M. J.; SILVA, T. L.; LEÃO, M. Contributos da Citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletin de Biotecnologia**, v. 71, n., p. 19-33, 2002.

COSGROVE, D.; MEEHAN, D. T.; GRUNKEMEYER, J. A.; KORNAK, J. M.; SAYERS, R.; HUNTER, W. J.; SAMUELSON, G. C. Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. **Genes & Development**, v. 10, n. 23, p. 2981-2992, 1996.

CRACIUNESCU, C. N.; ALBRIGHT, C. D.; MAR, M.-H.; SONG, J.; ZEISEL, S. H. Choline Availability During Embryonic Development Alters Progenitor Cell Mitosis in Developing Mouse Hippocampus. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 11, p. 3614-3618, 2003.

CRACIUNESCU, C. N.; BROWN, E. C.; MAR, M.-H.; ALBRIGHT, C. D.; NADEAU, M. R.; ZEISEL, S. H. Folic Acid Deficiency During Late Gestation Decreases Progenitor Cell Proliferation and Increases Apoptosis in Fetal Mouse Brain. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 1, p. 162-166, 2004.

DAFFOS, F.; FORESTIER, F. **Médecine et Biologie du Foetus Humain**. Paris: Maloine, 1988

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 1, p. 1-105, 2001.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell Death: Critical Control Points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-219, 2004.

DARZYNKIEWICZ, Z.; CRISSMAN, H.; JACOBBERGER, J. W. Cytometry of the cell cycle: Cycling through history. **Cytometry Part A**, v. 58A, n. 1, p. 21-32, 2004.

DE LAAT, B.; WU, X.-X.; VAN LUMMEL, M.; DERKSEN, R. H. W. M.; DE GROOT, P. G.; RAND, J. H. Correlation between antiphospholipid antibodies that recognize domain I of ß2-glycoprotein I and a reduction in the anticoagulant activity of annexin A5. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1490-1494, 2007.

DE SOUSA, M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. Análise de Proteomas: O despertar da era pós-genômica. **Revista on line-Biotecnologia Ciência ε Desenvolvimento**, v. 2, n. 7, p. 12-14, 1999.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. **Involvement of nitrogen-containing compounds in beta-lactam biosynthesis and its control**, v.26. 67-82 p.

DENAULT, J.-B.; SALVESEN, G. S. Caspases: Keys in the Ignition of Cell Death. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4489-4500, 2002.

DEREN, J. J.; PADYKULA, H. A.; WILSON, T. H. Development of structure and function in the mammalian yolk sac : II. Vitamin B12 uptake by rabbit yolk sacs. **Developmental Biology**, v. 13, n. 3, p. 349-369, 1966a.

DEREN, J. J.; PADYKULA, H. A.; WILSON, T. H. Development of structure and function in the mammalian yolk sac. 3. The development of amino acid transport by rabbit yolk sac. **Development Biology**, v. 13, n. 3, p. 370-384, 1966b.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J.-C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 9, p. 369-377, 2000.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2011. 1252 p.

DIETERLEN-LIÈVRE, F.; CORBEL, C.; SALAUN, J. Allantois and placenta as developmental sources of hematopoietic stem cells. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n., p. 1079-1087, 2010.

DIMRI, G. P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer cell**, v. 7, n. 6, p. 505-512, 2005.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 843-847, 2001.

DOBRUCKI, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Chromatin condensation and sensitivity of DNA in situ to denaturation during cell cycle and apoptosis Ð a confocal microscopy study. **Micron**, v. 32, n., p. 645-652, 2001.

DOCHERTY, S. M.; IIES, R. K.; WATHEN, N.; CHARD, T. The temporary anatomical structures prominent in the first trimester may be fulfilling exchange functions assigned to the placenta in the second and third trimester. **Human Reproduction**, v. 11, n. 6, p. 1157-1161, 1996.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212-217, 2006.

DONNAY, I.; PARTRIDGE, R. J.; LEESE, H. J. Can embryo metabolome be use for selecting bovine embryos before transfer? **Reprod Nutr Dev.**, v. 39, n. 5-6, p. 523-533, 1999.

DÜNDAR, M.; KOÇAK, I.; ÇULHACI, N.; EROL, H. Determination of apoptosis through Bax expression in cryptorchid testis: an experimental study. **Pathology & Oncology Research**, v. 11, n. 3, p. 170-173, 2005.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285-294, 2005.

DZIADEK, M. Modulation of alphafetoprotein synthesis in the early postimplantation mouse embryo. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 46, n. 1, p. 135-146, 1978.

EAGLE, H.; OYAMA, V. I.; LEVY, M.; FREEMAN, A. E. Myo-inositol as an essential growth factor for normal and malignant human cells in tissue culture. **J. Biol. Chem.**, v. 226, n., p. 191-205, 1957.

EDENBERG, H. J.; HUBERMAN, J. A. Eukaryotic Chromosome Replication. **Annual Review of Genetics**, v. 9, n. 1, p. 245-284, 1975.

ENDERS, A. C.; SCHLAFKE, S.; LANTZ, K. C.; LIU, I. K. M. Endoderm cells of the equine yolk sac from Day 7 until formation of the definitive yolk sac placenta. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. S15, p. 3-9, 1993.

ENDERS, A. C.; WIMSATT, W. A.; KING, B. F. Cytological development of yolk sac endoderm and protein-absorptive mesothelium in the little brown bat, Myotis lucifugus. **American Journal of Anatomy**, v. 146, n. 1, p. 1-29, 1976.

ENGEL, S.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Chemical Ecology of Marine Microbial Defense. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 10, p. 1971-1985, 2002.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 2, n. 1, p. 11-45, 1973.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-156, 1981.

FAJARDO, L. F. The complexity of endothelial cells. A review. **Amer J Clin Pathol**, v. 92, n. 2, p. 241-250, 1989.

FALCO, S. C.; DUMAS, K. S.; LIVAK, K. J. Nucleotide sequence of the yeast ILV2 gene which encodes acetolactate synthase. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 11, p. 4011-4027, 1985.

FENN, J.; MANN, M.; MENG, C.; WONG, S.; WHITEHOUSE, C. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

FINKELSTEIN, J. A. M. E. S. D. Pathways and Regulation of Homocysteine Metabolism in Mammals. **Semin Thromb Hemost**, v. 26, n. 03, p. 219,226, 2000.

FISCHER, G. H.; D`ANIELLO, A.; VETERE, A.; PADULA, L.; CUSANO, G. P.; MAN, E. H. Free D-aspartate and D-alanine in normal and Alzheimer brain. **Brain Res. Bull.**, v. 26, n., p. 983-985, 1991.

FISHER, M. C.; ZEISEL, S. H.; MAR, M.-H.; SADLER, T. W. Inhibitors of choline uptake and metabolism cause developmental abnormalities in neurulating mouse embryos. **Teratology**, v. 64, n. 2, p. 114-122, 2001.

FISHER, M. C.; ZEISEL, S. H.; MAR, M.-H.; SADLER, T. W. Perturbations in choline metabolism cause neural tube defects in mouse embryos in vitro. **The FASEB Journal**, v., n., p., 2002.

FUKUDA, T. Fetal hemopoiesis. **Virchows Archiv B Cell Pathology Zell-pathologie**, v. 14, n. 1, p. 197-213, 1973.

FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. Plant metabolomics: potential for practical operation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 4, p. 347-354, 2005.

GADUE, P.; WEISS, M. J. Stem cells unscramble yolk sac hematopoiesis. **Blood**, v. 114, n. 8, p. 1455-1456, 2009.

GAGE, F. H. Mammalian Neural Stem Cells. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1433-1438, 2000.

GALDOS-RIVEROS, A. C.; REZENDE, L. C.; PESSOLATO, A. G. T.; MIGLINO, M. A. A relação biológica entre o saco vitelino e o embrião. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p. 13, 2010a.

GALDOS-RIVEROS, A. C.; REZENDE, L. C.; PESSOLATO, A. G. T.; ZOGNO, M. A.; RICI, R. E.; MIGLINO, M. A. The structure of the bovine yolk sac: a study microscopic In: 5 (Ed.). **Book title**. Badajoz: FORMATEX RESEARCH CENTER, 2012. v.5,

GALDOS-RIVEROS, A. C.; TOLEDO-PIZA, A.; MARIA, D. A.; MENDONÇA, R. Z.; MIGLINO, M. A. La membrana vitelina de embriones bovinos, un modelo experimental de interes para estudios proteómicos. Análisis del perfil proteico mediante electroforesis bidimensional. **Proteómica**, v. 1, n. 6, p. 56-61, 2010b.

GALDOS-RIVEROS, A. C.; TOLEDO-PIZA, A.; REZENDE, L. C.; MARIA, D. A.; MIGLINO, M. A. Proteômica: novas fronteiras na pesquisa clinica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p. 24, 2010c.

GARDNER, D. K.; LANE, M.; STEVENS, J.; SCHOOLCRAFT, W. B. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. **Fertility and Sterility**, v. 76, n. 6, p. 1175-1180, 2001.

GARNER, S. C.; CHOU, S. C.; MAR, M. H.; COLEMAN, R. A.; ZEISEL, S. H. Characterization of choline metabolism and secretion by human placental trophoblasts in culture. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1168, n. 3, p. 358-364, 1993.

GERMAN, J. B.; WATKINS, S. M.; FAY, L.-B. Metabolomics in Practice: Emerging Knowledge to Guide Future Dietetic Advice toward Individualized Health. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 105, n. 9, p. 1425-1432, 2005.

GIBNEY, M. J.; WALSH, M.; BRENNAN, L.; ROCHE, H. M.; GERMAN, B.; VAN OMMEN, B. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 3, p. 497-503, 2005.

GITLIN, D.; PERRICELLI, A. Synthesis of serum albumin, prealbumin, alpha-foetoprotein, alpha-1-antitrypsin and transferrin by the human yolk sac. **Nature**, v. 228, n. 5275, p. 995-997, 1970.

GITLIN, D.; PERRICELLI, A.; GITLIN, G. M. Synthesis of α-Fetoprotein by Liver, Yolk Sac, and Gastrointestinal Tract of the Human Conceptus. **Cancer Research**, v. 32, n. 5, p. 979-982, 1972.

GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; BROWN, L. R. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, n. 1, p. 1-57, 2001.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1757, n. 5–6, p. 639-647, 2006.

GONZALEZ-CRUSSI, F.; ROTH, L. M. The human yolk sac and yolk sac carcinoma. An ultrastructural study. **Human Pathology**, v. 7, n. 6, p. 675-691, 1976.

GRABOWSKI, C. T. Altered electrolyte and fluid balance. In: J. G. Wilson e F. C. Fraser (Ed.). **Book title**. New York: Plenum Press, 1977, p.155-170

GREENE, N. D. E.; COPP, A. J. Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse. **Nature**, v. 3, n., p. 60-66, 1997.

GROSS, B. A. BioMEMs. In: CONFERENCE NAME, 2004:**Anais.** Publication, 1-5 Sept. 2004, 5129-5129 p.

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 absorptive role of secondary yolk sac. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, n. 9, 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. **Nat Biotech**, v. 17, n. 10, p. 994-999, 1999.

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

HAGER, J. Recent trends in mass spectrometer development. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 4, p. 845-850, 2004.

HAKUMÄKI, J. M.; KAUPPINEN, R. A. 1H NMR visible lipids in the life and death of cells. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 8, p. 357-362, 2000.

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, v. 169, n. 3, p. 453-468, 2006.

HALLMAN, M.; SAUGSTAD, O. D.; PORRECO, R. P.; EPSTEIN, B. L.; GLUCK, L. Role of myoinositol in regulation of surfactant phospholipids in the newborn. **Early Hum Dev**, v. 10, n. 3-4, p. 245-254, 1985.

HAND, R. Eukaryotic DNA: Organization of the Genome for Replication. **Cell**, v. 15, n., p. 317-325, 1978.

HARRIS, H. **The Birth of the Cell**: Yale University Press, 2000

HASHIMOTO, A.; KUMASHIRO, S.; NISHIKAWA, T.; OKA, T.; TAKAHASHI, K.; MITO, T.; TAKASHIMA, S.; DOI, N.; MIZUTANI, Y.; YAMAZAKI, T.; KANEKO, T.; OOTOMO, E. Embryonic Development and Postnatal Changes in Free d-

Aspartate and d-Serine in the Human Prefrontal Cortex. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 1, p. 348-351, 1993.

HEINLEIN, C.; SPEIDEL, D. High-Resolution Cell Cycle and DNA Ploidy Analysis in Tissue Samples. In: (Ed.). **Book title**: John Wiley & Sons, Inc., 2001,

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HESSELDAHL, H.; LARSEN, J. F. Ultrastructure of human yolk sac: Endoderm, mesenchyme, tubules and mesothelium. **American Journal of Anatomy**, v. 126, n. 3, p. 315-335, 1969.

HOCKENBERY, D.; NUNEZ, G.; MILLIMAN, C.; SCHREIBER, R. D.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**, v. 348, n. 6299, p. 334-336, 1990.

HONGPAISAN, J. INHIBITION OF PROLIFERATION OF CONTAMINATING FIBROBLASTS BY D-VALINE IN CULTURES OF SMOOTH MUSCLE CELLS FROM HUMAN MYOMETRIUM. **Cell Biology International**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2000.

HOYES, A. D. The human foetal yolk sac: An ultrastructural study of four specimens. **Zellforsch Mikrosk Anatomy**, v. 99, n., p. 469-490, 1969.

HYTTEL, P.; SINOWATS, F.; VEJLSTED, M. **Essentials of Domestic Animal Embryology**. USA: ELSEVIER HEALTH SCIENCE, 2010. 472 p.

JACKOWSKI, S. Cell Cycle Regulation of Membrane Phospholipid Metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 34, p. 20219-20222, 1996.

JEPSON, M. M.; BATES, P. C.; BROADBENT, P.; PELL, J. M.; MILLWARD, D. J. Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 255, n. 2, p. E166-E172, 1988.

JONES, C. J. P.; JAUNIAUX, E. Ultrastructure of the materno-embryonic interface in the first trimester of pregnancy. **Micron**, v. 26, n. 2, p. 145-173, 1995.

JUNQUEIRA, L. C. V.; ZAGO, D. **Embriologia médica e comparada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 291 p.

KATAYAMA, I.; KAYANO, H. Yolk Sac with Blood Island. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 8, p. 617-617, 1999.

KATZ-JAFFE, M. G.; GARDNER, D. K. Embryology in the era of proteomics. **Theriogenology**, v. 68, n., p. S125-S130, 2007.

KENT, C. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. **Prog. Lipid Res.**, v. 29, n., p. 87-105, 1990.

KENT, C. Regulatory enzymes of phosphatidylcholine biosynthesis: a personal perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1733, n. 1, p. 53-66, 2005.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KING, B. F. Comparative anatomy of the placental barrier. **Bibliotheca anatomica**, v. 22, n., p. 13-28, 1982.

KING, K. L.; CIDLOWSKI, J. A. CELL CYCLE REGULATION AND APOPTOSIS1. **Annual Review of Physiology**, v. 60, n. 1, p. 601-617, 1998.

KÖHN-LUQUE, A.; DE BACK, W.; STARRUß, J.; MATTIOTTI, A.; DEUTSCH, A.; PÉREZ-POMARES, J. M.; HERRERO, M. A. Early Embryonic Vascular Patterning by Matrix-Mediated Paracrine Signalling: A Mathematical Model Study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24175, 2011.

KOLF, C.; CHO, E.; TUAN, R. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 204, 2007.

KOSHLAND, D. The cell cycle. **Science**, v. 246, n. 4930, p. 545, 1989.

KRAMER-ALBERS, E. M.; BRETZ, N.; TENZER, S.; WINTERSTEIN, C.; MOBIUS, W.; BERGER, H.; NAVE, K. A.; SCHILD, H.; TROTTER, J. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? **Proteomics - Clinical Applications**, v. 1, n. 11, p. 1446-1461, 2007.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recomendations of the Nomenclature Committee on Cell Death **Cell Death Differ.**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

LARSEN, M. R.; ROEPSTORFF, P. Mass spectrometric identification of proteins and characterization of their post-translational modifications in proteome analysis. **Fresenius J Anal Chem**, v. 366, n. 6-7, p. 677-690, 2000.

LASKEY, R.; FAIRMAN, M.; BLOW, J. S phase of the cell cycle. **Science**, v. 246, n. 4930, p. 609-614, 1989.

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

LENZ, E. M.; WILSON, I. D. Analytical Strategies in Metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 443-458, 2006.

LI, G. Z.; VISSERS, J. P. C.; SILVA, J. C.; GOLICK, D.; GORENSTEIN, M. V.; GEROMANOS, S. J. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **PROTEOMICS**, v. 9, n. 6, p. 1696-1719, 2009.

LI, S. W.; PROCKOP, D. J.; HELMINEN, H.; FÄSSLER, R.; LAPVETELÄINEN, T.; KIRALY, K.; PELTARRI, A.; AROKOSKI, J.; LUI, H.; ARITA, M. Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2 alpha 1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone. **Genes & Development**, v. 9, n. 22, p. 2821-2830, 1995.

LIU, H.; SADYGOV, R. G.; YATES, J. R. A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 14, p. 4193-4201, 2004.

LIU, K. H.; BREWTON, R. G.; BAUMBACH, G. A.; GODKIN, J. D. Characterization of Protein Production by Ovine Placental Membranes: Identification of A Placental Retinol-Binding Protein. **Endocrinology**, v. 129, n. 1, p. 126-132, 1991.

LIU, X.; WU, H.; BYRNE, M.; KRANE, S.; JAENISCH, R. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 5, p. 1852-1856, 1997.

LLOYD, J. B.; BECKMAN, D. A.; BRENT, R. L. Nutritional role of the visceral yolk sac in organogenesis-stage rat embryos. **Reproductive Toxicology**, v. 12, n. 2, p. 193-195, 1998.

LLOYD, J. B.; WILLIANS, K. E.; MOORE, A. T.; BECK, F. Selective uptake and intracellular digestion of protein by rat yolk sac. In: W. A. Hemmings (Ed.). **Book title**. Cambridge: University Press, 1976. v.2, p.168-178

LÖHLER, J.; TIMPL, R.; JAENISCH, R. Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. **Cell**, v. 38, n. 2, p. 597-607, 1984.

LUM, J. J.; DEBERARDINIS, R. J.; THOMPSON, C. B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 6, p. 439-448, 2005.

MANÇANARES, C. A. F. **Análise morfológica da área de transição do intestino primitivo para o saco vitelino em embriões e fetos bovinos (24 a**

50 dias de gestação). FMVZ, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. 115 p.

MARTIN, B.; VRANCKX, R.; DENOULET, P.; NUNEZ, E. A. α-fetoprotein expression in intra- and extraembryonic fluids of developing chick embryo. **Developmental Biology**, v. 111, n. 2, p. 352-358, 1985.

MAY, G. L.; WRIGHT, L. C.; HOLMES, K. T.; WILLIAMS, P. G.; SMITH, I. C. P.; WRIGHT, P. E.; FOX, R. M.; MOUNTFORD, C. E. Assignment of methylene proton resonances in NMR spectra of embryonic and transformed cells to plasma membrane triglyceride. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n., p. 3048-3053, 1986.

MEDVINSKY, A. L.; SAMOYLINA, N. L.; MULLER, A. M.; DZIERZAK, E. A. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. **Nature**, v. 364, n. 6432, p. 64-67, 1993.

MEEHAN, R. R.; BARLOW, D. P.; HILL, R. E.; HOGAN, B. L.; HASTIE, N. D. Pattern of serum protein gene expression in mouse visceral yolk sac and foetal liver. **The EMBO Journal**, v. 3, n., p. 1881-1885, 1984.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 796-801, 2000.

MELINO, G. The Sirens' song. **Nature**, v. 412, n. 6842, p. 23, 2001.

MERKLE, F. T.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Neural stem cells in mammalian development. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, n. 6, p. 704-709, 2006.

MIGLIACCIO, G.; MIGLIACCIO, A. R.; PETTI, S.; MAVILIO, F.; RUSSO, G.; LAZZARO, D.; TESTA, U.; MARINUCCI, M.; PESCHLE, C. Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac----liver transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 78, n. 1, p. 51-60, 1986.

MIGLINO, M. A. O enigma vitelínico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, n., p. 86, 2009.

MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; WENCESLAU, C. V.; PFARRER, C.; LEISER, R. The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, v. 66, n. 6–7, p. 1699-1702, 2006.

MINUTH, W. W.; TIEDEMANN, K. The pig yolk sac II. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 68, n. 2, p. 147-158, 1980.

MITCHISON, J. M. **The biology of the cell cycle**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 313 p.

MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. The

Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 631-642, 2003.

MOLINA, R.; BONFRER, J.; BANFI, G.; BUGUGNANI, M. J.; CORNU, F.; HANNEMANN-POHL, K.; HUBL, W.; MERZ, O.; BACH, M.; MACK, M. External evaluation of LIAISON tumour marker assays on the fully automated chemiluminescent LIAISON immunoassay analyser. **Clin Lab.**, v. 46, n. 3-4, p. 169-179, 2000.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clinica**. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2004. 609 p.

MOORE, M. A. S.; METCALF, D. Ontogeny of the Haemopoietic System: Yolk Sac Origin of In Vivo and In Vitro Colony Forming Cells in the Developing Mouse Embryo*. **British Journal of Haematology**, v. 18, n. 3, p. 279-296, 1970.

MOORES, R. R.; VAUGHN, P. R.; BATTAGLIA, F. C.; FENNESSEY, P. V.; WILKENING, R. B.; MESCHIA, G. Glutamate metabolism in fetus and placenta of late-gestation sheep. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 267, n. 1, p. R89-R96, 1994.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes: comparative ontogeny and morphology; evolution; phylogenetic significances; basic functions; research opportunities**. London: Macmilian, 1987

MUNGUR, R.; GLASS, A. D. M.; GOODENOW, D. B.; LIGHTFOOT, D. A. Metabolite Fingerprinting in Transgenic Nicotiana tabacum Altered by the Escherichia coli Glutamate Dehydrogenase Gene. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2005, n. 2, p. 198-214, 2005.

MURGAS, L. D. S.; TORRES, C. A. A.; DONZELE, J. L. Efeito do consumo de energia sobre a idade e peso corporal de marrãs à puberdade. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 24, n. 3, p. 409-416, 1995.

NAGAI, N.; HOSOKAWA, M.; ITOHARA, S.; ADACHI, E.; MATSUSHITA, T.; HOSOKAWA, N.; NAGATA, K. Embryonic Lethality of Molecular Chaperone Hsp47 Knockout Mice Is Associated with Defects in Collagen Biosynthesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, n. 6, p. 1499-1506, 2000.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**: Sarvier, 1997. 172 p.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 299-306, 1997.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems biology: Metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1054-1056, 2008.

NICO, B.; VACCA, A.; DE GIORGIS, M.; RONCALI, L.; RIBATTI, D. Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2

Expression in the Chick Embryo Area Vasculosa. **The Histochemical Journal**, v. 33, n. 5, p. 283-286, 2001.

NISHI, S.; HIRAI, H. Radioimmunoassay of a-fetoprotein in hepatoma, other liver diseases, and pregnancy. **Gann Monogr. Cancer Res**, v. 14, n., p. 79-87, 1973.

NISHIZUKA, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. **Science**, v. 258, n. 5082, p. 607-614, 1992.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.-I.; SMITH, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nat Genet**, v. 24, n. 4, p. 372-376, 2000.

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

NOGALES, F. F.; BELTRAN, E.; GONZALEZ, F. Morphological changes of the secondary human yolk sac early pregnancy wastage. In: (Ed.). **Book title**. Heildelberg: Springer-Verlag, 1993, p.174-194

NOORLANDER, C. W.; DE GRAAN, P. N. E.; NIKKELS, P. G. J.; SCHRAMA, L. H.; VISSER, G. H. A. Distribution of Glutamate Transporters in the Human Placenta. **Placenta**, v. 25, n. 6, p. 489-495, 2004.

NURSE, P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. **Cell**, v. 100, n., p. 71-78, 2000.

O'FARRELL, P.; EDGAR, B.; LAKICH, D.; LEHNER, C. Directing cell division during development. **Science**, v. 246, n. 4930, p. 635-640, 1989.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592-603, 2004.

OKAMOTO, K.; OKAZAWA, H.; OKUDA, A.; SAKAI, M.; MURAMATSU, M.; HAMADA, H. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. **Cell**, v. 60, n. 3, p. 461-472, 1990.

OLIVEIRA, C. M. **DIFERENÇAS NAS EXPRESSÕES GÊNICAS DO SACO VITELÍNO DE EMBRIÕES BOVINOS PROVENIENTES DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E FIV**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. 125 p.

OPRESCU, S.; THIBAULT, C.; ZIMMERMANN, A. M. DUPLICATION DE L'ADN DANS LES OEUFS DE LAPINE APRÈS LA FÉCONDATION. **Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.**, v. 5, n. 1, p. 151-156, 1965.

ORSI, N. M.; LEESE, H. J. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyil alcohool **Theriogenology**, v. 61, n., p. 561-572, 2004.

PADYKULA, H. A.; DEREN, J. J.; WILSON, T. H. Development of structure and function in the mammalian yolk sac : I. Developmental morphology and vitamin B12 uptake of the rat yolk sac. **Developmental Biology**, v. 13, n. 3, p. 311-348, 1966.

PALIS, J.; CHAN, R. J.; KONISKI, A.; PATEL, R.; STARR, M.; YODER, M. C. Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 8, p. 4528-4533, 2001.

PALIS, J.; MCGRATH, K. E.; KINGSLEY, P. D. Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants. **Blood**, v. 86, n. 1, p. 156-163, 1995.

PALIS, J.; YODER, M. C. Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. **Experimental Hematology**, v. 29, n. 8, p. 927-936, 2001.

PAN, G.; THOMSON, J. A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. **Cell Res**, v. 17, n. 1, p. 42-49, 2007.

PAPES, F.; KEMPER, E. L.; CORD-NETO, G.; LANGONE, F.; P., A. Lysine degradation through the saccharopine pathway in mammals: involvement of both bifunctional and monofunctional lysine-degrading enzymes in mouse. **Biochem. J.**, v. 344, n., p. 555-563, 1999.

PARDEE, A. G1 events and regulation of cell proliferation. **Science**, v. 246, n. 4930, p. 603-608, 1989.

PARRY-BILLINGS, M.; BLOMSTRAND, E.; MCANDREW, N.; NEWSHOLME, E. A. A Communicational Link Between Skeletal Muscle, Brain, and Cells of the Immune System. **Int J Sports Med**, v. 11, n. S 2, p. S122,S128, 1990.

PARTRIDGE, R.; LEESE, H. Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 6, p. 945-950, 1996.

PEREDA, J. Significado morfofuncional del saco vitelino durante el periodo embrionario humano: revisión del problema e impacto en clínica. **Contribuciones Científicas y Tecnológicas, Area Ciencias Médicas**, v., n. 128, p. 25-47, 2001.

PEREDA, J.; CERISOLA, H.; POZO, J. El saco vitelino humano: superficies endodermica y mesotelial analizadas por microscopia electronica de barrido. **Anales de Anatomia Normal**, v. 6, n., p. 90-92, 1987.

PEREDA, J.; CORRER, S.; MOTTA, P. M. The structure of the human yolk sac: a scanning and transmission electron microscopic analysis. **Arch Histol Cytol**, v. 57, n. 2, p. 107-117, 1994.

PEREDA, J.; GIANFRANCO, F.; NIIMI, G. The vital role of yolk sac in the survival of the human embryo: facts, evidences and open questions. **Cell and Tissue Biology Research**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2009.

PEREDA, J.; MONGE, J. I.; NIIMI, G. Two different pathways for the transport of primitive and definitive blood cells from the yolk sac to the embryo in humans. **Microscopy Research and Technique**, v. 73, n. 8, p. 803-809, 2010.

PEREDA, J.; MOTTA, P. M. New advances in human embryology: morphofunctional relationship between the embryo and the yolk sac. **Medical Electron Microscopy**, v. 32, n. 2, p. 67-78, 1999.

PEREDA, J.; NIIMI, G. Embryonic erythropoiesis in human yolk sac: Two different compartments for two different processes. **Microscopy Research and Technique**, v. 71, n. 12, p. 856-862, 2008.

PERKINS, G.; BOSSY-WETZEL, E.; ELLISMAN, M. H. New insights into mitochondrial structure during cell death. **Experimental Neurology**, v. 218, n. 2, p. 183-192, 2009.

PESSOLATO, A. G. T. **Caracterização das células-tronco do saco vitelino e análise ultraestrutural da membrana vitelina de embriões ovinos (*Ovis aries*)**. FMVZ, universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. 153 p.

RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Autophagy and Metabolism. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1344-1348, 2010.

RANGANATH, R. M.; RAO-NAGASHREE, N. Role of programmed cell death in development. In: (Ed.). **Book title**: Academic Press, 2001. v.Volume 202, p.159-242

RAO, V. V.; PAN, X.; CHANG, Y.-F. Developmental changes of l-lysine-ketoglutarate reductase in rat brain and liver. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 103, n. 1, p. 221-224, 1992.

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

RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 11, n. 1, p. 73-91, 1995.

ROBERTSON, D. G. Metabonomics in Toxicology: A Review. **Toxicological Sciences**, v. 85, n. 2, p. 809-822, 2005.

ROCHFORT, S. Metabolomics Reviewed: A New “Omics” Platform Technology for Systems Biology and Implications for Natural Products Research. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1813-1820, 2005.

ROGERS, A. W. **Techniques of autoradiography**. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1973. 429 p.

ROSNER, M. H.; VIGANO, M. A.; OZATO, K.; TIMMONS, P. M.; POIRIE, F.; RIGBY, P. W. J.; STAUDT, L. M. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. **Nature**, v. 345, n. 6277, p. 686-692, 1990.

ROSSANT, J.; PETERSON, R. **Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. 558 p.

ROWBOTTOM, D. G.; KEAST, D.; MORTON, A. R. The Emerging Role of Glutamine as an Indicator of Exercise Stress and Overtraining. **Sports Medicine**, v. 21, n. 2, p. 80-97, 1996.

RULE, A. D.; LARSON, T. S.; BERGSTRALH, E. J.; SLEZAK, J. M.; JACOBSEN, S. J.; COSIO, F. G. Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. **Ann Intern Med.**, v. 141, n. 12, p. 929-937, 2004.

RÜSSE, I.; SINOWATZ, F.; RICHTER, L.; LEHMANN, M.; SCHALLENBERGER, E. The development of the yolk sac in ruminants (sheep and cattle). **Anat Histol Embryo**, v. 21, n. 4, p. 324-347, 1992.

SADLER, T. W. **Langman Embriologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 347 p.

SCHAFFER, S.; AZUMA, J.; TAKAHASHI, K.; MOZAFFARI, M. Why is taurine cytoprotective? **Adv Exp Med Biol.**, v. 526, n., p. 307-321, 2003.

SCHWAB, W. Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 837-849, 2003.

SCHWANN, T.; SMITH, H.; SCHLEIDEN, M. J. **Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants**: The Sydenham Society, 1847. 268 p.

SCISLOWSKI, P. W.; FOSTER, A. R.; FULLER, M. F. Regulation of oxidative degradation of L-lysine in rat liver mitochondria. **Biochem J.**, v. 300, n. 3, p. 887-891, 1994.

SHANDLEY, L.; ALCORN, D.; WINTOUR, M. Ovine Amniotic and Allantoic Epithelia Across Gestation. **The Anatomical Record.**, v. 248, n., p. 542–553, 1997.

SHAPIRO, H. M. Estimation of Membrane Potential by Flow Cytometry. In: (Ed.). **Book title**: John Wiley & Sons, Inc., 2001,

SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry**. New Jersey: Wiley-Liss, 2003. 681 p.

SHARP, L. W. **An Introduction to Cytology**. New York: McGraw Hill Book Company, 1921. 432 p.

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 of Embryology and Experimental Morphology**, v. 85, n. 1, p. 191-206, 1985.

SHULMAN, R. G.; ROTHMAN, D. L.; BLAMIRE, A. M. NMR studies of human brain function. **Trends Biochem Sci.**, v. 19, n. 12, p. 522-526, 1994.

SICLARI, V.; QIN, L. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 5, n. 1, p. 78, 2010.

SILVA, J. C.; DENNY, R.; DORSCHEL, C. A.; GORENSTEIN, M.; KASS, I. J.; LI, G.-Z.; MCKENNA, T.; NOLD, M. J.; RICHARDSON, K.; YOUNG, P.; GEROMANOS, S. Quantitative Proteomic Analysis by Accurate Mass Retention Time Pairs. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 7, p. 2187-2200, 2005.

SILVA, T. L.; REIS, A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J. C. Citometria de fluxo: Funcionalidade celular line em bioprocessos. **Boletin de Biotecnologia**, v. 77, n., p. 32-40, 2004.

SKOMMER, J.; WLODKOWIC, D.; DEPTALA, A. Larger than life: Mitochondria and the Bcl-2 family. **Leukemia Research**, v. 31, n. 3, p. 277-286, 2007.

SMITH, R. K. W.; JOHNSON, M. H. Analysis of the third and fourth cell cycles of mouse early development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 76, n. 1, p. 393-399, 1986.

SNOW, R. J.; MURPHY, R. M. Creatine and creatine transporter: A review. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 224, n., p. 169-181, 2001.

SOLÁ, S.; PEDRO, T.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, C. M. P. Apoptose: Uma questão de vida ou de morte. **Biologias**, v. 2, n., p. 9, 2005.

SOPRANO, D. R.; SOPRANO, K. J.; GOODMAN, D. S. Retinol-binding protein and transthyretin mRNA levels in visceral yolk sac and liver during fetal development in the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n., p. 7330-7334, 1986.

STREU, A.; JESCHKE, U.; RICHTER, D. U.; MÜLLER, H.; BRIESE, V.; FRIESE, K. Human amniotic fluid transferrin stimulates progesterone production

by human trophoblast cells in vitro. **Zentralbl Gynakol.**, v. 122, n. 8, p. 407-412, 2000.

STURMAN, J. A. Taurine in development. **Physiological Reviews**, v. 73, n. 1, p. 119-147, 1993.

STURMAN, J. A. Taurine in Development. **The Journal of Nutrition**, v. 118, n. 10, p. 1169-1176, 1988.

STURMAN, J. A.; GARGANO, A. D.; MESSING, J. M.; IMAKI, H. Feline maternal taurine deficiency:effect on mother and offspring. **The Journal of Nutrition**, v. 116, n., p. 655-667, 1985.

SUSIN, S. A.; LORENZO, H. K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; SNOW, B. E.; BROTHERS, G. M.; MANGION, J.; JACOTOT, E.; COSTANTINI, P.; LOEFFLER, M.; LAROCHETTE, N.; GOODLETT, D. R.; AEBERSOLD, R.; SIDEROVSKI, D. P.; PENNINGER, J. M.; KROEMER, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 441-446, 1999.

TAGUCHI, T.; NAZNEEN, A.; AL-SHIHRI, A. A.; TURKISTANI, K. A.; RAZZAQUE, M. S. Heat Shock Protein 47: A Novel Biomarker of Phenotypically Altered Collagen-Producing Cells. **ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA**, v. 44, n. 2, p. 35-41, 2011.

TARAZONA, A. M.; OLIVERA-ANGEL, M.; LENIS, Y. Y. Rol de la mitocondria y el stress oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro* **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 42, n., p. 125-133, 2010.

TARAZONA, A. M.; RODRÍGUEZ, J. I.; RESTREPO, L. F.; OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial Activity, Distribution and Segregation in Bovine Oocytes and in Embryos Produced in Vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 1, p. 5-11, 2006.

TÁRNOK, A. Slide-based cytometry for cytomics—A minireview. **Cytometry Part A**, v. 69A, n. 7, p. 555-562, 2006.

TARRANT, J. M. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. **The Veterinary Journal**, v. 170, n. 3, p. 278-288, 2005.

TASAB, M.; BATTEN, M. R.; BULLIED, N. J. Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 10, p. 2204-2211, 2000.

THOMAS, T.; SOUTHWELL, B. R.; SCHREIBER, G.; JAWOROWSKI, A. Plasma protein synthesis and secretion in the visceral yolk sac of the fetal rat: Gene expression, protein synthesis and secretion. **Placenta**, v. 11, n. 5, p. 413-430, 1990.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies Within. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312-1316, 1998.

TIEDEMANN, K. The amniotic, allantoic and yolk sac epithelia of the cat: SEM and TEM studies. **Anatomy and Embryology**, v. 158, n. 1, p. 75-94, 1979.

TIEDEMANN, K. On the yolk sac of the cat. **Cell and Tissue Biology Research**, v. 173, n., p. 109-127, 1976.

TIEDEMANN, K.; MINUTH, W. W. The pig yolk sac I. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 68, n. 2, p. 133-146, 1980.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de Técnicas para histologia normal e patológica**. Barueri: Manole, 2003. 331 p.

TOMASI, T. B. Structure and Function of Alpha-Fetoprotein. **Annual Review of Medicine**, v. 28, n. 1, p. 453-465, 1977.

ULIVIERI, C. Cell death: Insights into the ultrastructure of mitochondria. **Tissue and Cell**, v. 42, n. 6, p. 339-347, 2010.

URIEL, J.; TROJAN, J.; MORO, R.; PINEIRO, A. Intracellular uptake of alpha-fetoprotein: a marker of neural differentiation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 417, n., p. 321-329, 1983.

USAMI, M.; MITSUNAGA, K.; NAKAZAWA, K. Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for developmental toxicity studies. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 3, p. 521-526, 2007.

VAN DER KOOY, D.; WEISS; SAMUEL. Why Stem Cells? **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1439-1441, 2000.

VEECK, L. L.; ZANINOVIĆ, N. **An atlas of human blastocysts**. London: Parthenon Pub. Group, 2003

VIANT, M. R.; ROSENBLUM, E. S.; TJEERDEMA, R. S. NMR-Based Metabolomics: A Powerful Approach for Characterizing the Effects of Environmental Stressors on Organism Health. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 21, p. 4982-4989, 2003.

VIEIRA, E. C.; GAZZINELLI, G.; MARES-GUIA, M. **Bioquímica Celular e Biologia Molecular**. Belo Horizonte: Atheneu, 1998. 368 p.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do METABOLOMA. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 36, n., p. 58-69, 2006.

VINDELOV, L. L.; CHRISTENSEN, J.; KEIDING, N.; SPANG-THOMSEN, M.; NISSEN, N. I. Long-Term Storage of Samples for Flow Cytometric DNA Analysis. **Cytometry**, v. 3, n. 5, p. 317-322, 1982.

WALKER, J. B. Creatine: Biosynthesis, Regulation, and Function. In: (Ed.). **Book title**: John Wiley & Sons, Inc., 2006, p.177-242

WATKINS, S. M.; HAMMOCK, B. D.; NEWMAN, J. W.; GERMAN, J. B. Individual metabolism should guide agriculture toward foods for improved health and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 3, p. 283-286, 2001.

WEAVER, B. A. A.; CLEVELAND, D. W. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. **Cancer cell**, v. 8, n. 1, p. 7-12, 2005.

WECKWERTH, W.; MORGENTHAL, K. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 22, p. 1551-1558, 2005.

WELBOURNE, T.; ROUTH, R.; YUDKOFF, M.; NISSIM, I. The Glutamine/Glutamate Couplet and Cellular Function. **Physiology**, v. 16, n. 4, p. 157-160, 2001.

WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; LIZIER, N. F.; PIGNATARI, G. C.; KERKIS, I. Mesenchymal Progenitor Cells from Canine Fetal Tissues: Yolk Sac, Liver, and Bone Marrow. **Tissue Engineering Part A**, v. 1, n., p. 1-35, 2011.

WILKERSON, M. J. Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v., n. 0, p., 2011.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J.-C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Arnino Acid Analysis. **Nat Biotech**, v. 14, n. 1, p. 61-65, 1996.

WILSON, E. B. **The cell in development and heredity**. Michigan: Garland Pub., 1925. 1232 p.

WILSON, J. G. **Environment and birth defects**. New York: Academic Press, 1973. 305 p.

WINTERS, L. M.; GREEN, W. W.; CONSTOCK, R. E. Prental development of the bovine. **Minnesota Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.** , v. 50, n., p. 1-50, 1942.

WITCHI, E. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. **Contribution to Embryology, Carnegie Institute**, v. 32, n., p. 67-80, 1948.

WOLF, E.; ARNOLD, G. J.; BAUERSACHS, S.; BEIER, H. M.; BLUM, H.; EINSPANIER, R.; FRÖHLICH, T.; HERRLER, A.; HIENDLEDER, S.; KÖLLE, S.; PRELLE, K.; REICHENBACH, H. D.; STOJKOVIC, M.; WENIGERKIND, H.; SINOWATZ, F. Embryo-Maternal Communication in Bovine – Strategies for Deciphering a Complex Cross-Talk. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 276-289, 2003.

WROBEL, K. H.; SÜB, F. Identification and temporospatial distribution of bovine primordial germ cells prior to gonadal sexual differentiation. **Anatomy and Embriology**, v. 197, n., p. 451-467, 1998.

WU, F.; ORLEFORS, H.; BERGSTROM, M. Uptake of C- and C-labelled glutamate, glutamine and aspartate in vitro e in vivo. **Anticancer Research**, v. 20, n., p. 251-256, 2000.

YAMASHITA, A. Role of yolk sac endodermal cells with special reference to the fetal macrophage differentiation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 2, p. 139-144, 1996.

YANG, E.; ZHA, J.; JOCKEL, J.; BOISE, L. H.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces bax and promotes cell death. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 285-291, 1995.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2006. 264 p.

ZEISEL, S. H. Choline: Critical Role During Fetal Development and Dietary Requirements in Adults. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 229-250, 2006.

ZHA, J.; HARADA, H.; YANG, E.; JOCKEL, J.; KORSMEYER, S. J. Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL. **Cell**, v. 87, n. 4, p. 619-628, 1996.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological Features of Cell Death. **Physiology**, v. 19, n. 3, p. 124-128, 2004.

ZONG, W.-X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes & Development**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2006.