ANA CAROLINA FURLANETTO MANÇANARES

**Análise proteômica do intestino primitivo de embriões
bovinos**

**São Paulo
2012**

ANA CAROLINA FURLANETTO MANÇANARES

Análise proteômica do intestino primitivo de embriões bovinos

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

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo

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
27/11/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2547
FMVZ

Mançanares, Ana Carolina Furlanetto
Análise proteômica do intestino primitivo de embriões bovinos / Ana
Carolina Furlanetto Mançanares. – 2012.
94 f.

Dissertação (Mestrado) - 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.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Proteômica. 2. Intestino primitivo. 3. Embrião. 4. MudPIT.
5. Proteínas. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise Proteômica do Intestino Primitivo de Embriões Bovinos", protocolado sob o nº 1904/2010, utilizando 30 (trinta) embriões 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 24/03/2010.

We certify that the Research "Proteomic analysis on bovine embryonic intestine", protocol number 1904/2010, utilizing 30 (thirty) bovine embryos, 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 03/24/2010.

São Paulo, 25 de março de 2010

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Folha de avaliação

Nome: MANÇANARES, Ana Carolina Furlanetto.

Título: Análise proteômica do intestino primitivo de embriões bovinos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, pois sem ele nada seria possível.

Aos meus pais, Humberto e Marina, por representarem os maiores exemplos da minha vida e pelos esforços imensuráveis! Muito Obrigada por lutar, por confiar e por me amar. Amo vocês!

Ao meu irmão Daniel, que me apoiou em todos os momentos e por sempre me ajudou nos meus sonhos!

Ao Vinícius, por sempre ficar do meu lado desde o começo, me apoiando e incentivando, me dando forças para continuar mesmo nos momentos mais difíceis. Essa é mais uma conquista nossa!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, por acreditar em mim, pela força e incentivo. Obrigada pelos conselhos, por me ensinar a lutar pelo que acredito e acima de tudo, pela oportunidade de poder crescer.

A Dra. Lillian de Jesus Oliveira, por me co-orientar neste projeto e por me estender a mão quando parecia que o túnel não tinha fim. Obrigada por me ensinar a escrever, a discutir, pensar e criar.

A Profa. Dra. Érica Zimberknopf pelas sugestões, pela ajuda nos momentos difíceis e pelo incentivo.

Aos Professores da Pós-graduação pelos ensinamentos que tanto acrescentaram na minha vida profissional.

Aos Professores Dr. Flávio Vieira Meirelles, Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, Dr. Felipe Perecin e Dra. Daniele Martins, por me receberem no LMMD e ter me dado condições necessárias para a finalização deste trabalho.

A todos os funcionários do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ pela amizade e companheirismo, especialmente ao Ronaldo, Maícon e Jaqueline.

À Profa. Dra. Celina A. F. Mançanares, que me introduziu e incentivou a seguir a carreira científica. Obrigada por me apoiar e ajudar em todos os momentos. Muito mais do que tia, você é uma grande amiga!

À Vanessa Oliveira e Aline Souza, que me receberam em Pirassununga e me aguentaram por tempo suficiente pra eu ser eternamente grata. Vocês me acolheram (junto com a Celina) e cuidaram de mim no momento em que mais precisei.

Aos amigos Mateus e Laíse que tornaram este caminho mais fácil de ser percorrido. Obrigada pela compreensão, carinho e amizade. Vocês tiveram uma participação mais que especial na minha vida!

Aos amigos da pós-graduação Sarmiento, Erika, Juliana, Thaís, Greyson e Rafael, pela amizade e pela cumplicidade!

Aos amigos do coração Marina, Phelipe e Marcio, que foram mais do que amigos, fizeram parte da minha família, me ajudando e apoiando sempre!

Ao André Franciollí que me acolheu na sua casa e foi um ótimo amigo. Obrigada pelos ensinamentos em histologia e pelas aulas de embriologia. Adoro você!

Aos amigos da FZEA que me receberam, me acolheram e me fizeram adorar Pirassununga e querer ficar pra sempre! Rodrigo, Juliano, Rafael, Marquinho, Fabiana, Paulinho, Náira, Tiago, Natalia, Mariane Pedrinho, Laís, Prof. Heidge e tantos outros que fizeram parte de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus sogros Eliane e Marco, por todo apoio, incentivo e por terem me acolhido em sua família.

A grande amiga Nida, que me ajudou com suas palavras de conforto, carinho e suas inúmeras orações.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Enfim, a todos que atravessaram a minha vida... MUITO OBRIGADA!

RESUMO

MANÇANARES, A.C.F. **Análise proteômica do intestino primitivo de embriões bovinos**. [Proteome analysis of primitive gut from bovine embryo]. 2012. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O desenvolvimento de biotecnologia de embriões em animais de produção é prejudicado por perdas no primeiro trimestre da gestação, idade em que o intestino primitivo está sendo estabelecido. O estudo das proteínas contidas no intestino primitivo nesta fase inicial da gestação pode aumentar o conhecimento sobre as vias moleculares envolvidas no desenvolvimento embrionário normal e em perdas de embriões, assim como a sua participação na organogênese e diferenciação celular. Intestino primitivo de embriões de bovinos a partir dos 39 SD $\pm$ 4 dias de desenvolvimento (variando de 33 a 45 dias) foram coletados em um matadouro local. As amostras foram processadas e agrupadas para análise proteômica shotgun label-free usando MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology). Análise funcional e de via foram feitas usando FatiGO (www.babelomics.org); Pathway Express (<http://vortex.cs.wayne.edu/ontoexpress>) para identificar as ontologias relevantes e vias canônicas ou não-canônicas representada pelas proteínas expressas no Intestino primitivo. Um total de 74 proteínas ou sequências randômicas foram identificadas, correspondentes a 30 proteínas específicas expressas pelo Intestino primitivo bovino. Das 30 proteínas únicas, 21 proteínas foram utilizadas na ontologia e análise de vias. As análises mostraram um enriquecimento de ontologias relacionadas com a ligação (N = 5); atividade catalítica (N = 6); organela intracelular (N = 6). Houve um enriquecimento de ontologias associado às modificações do citoesqueleto; processo de diferenciação celular (N = 3), a migração celular (N = 4) e no metabolismo celular (N = 6). Além disso, a via e a análise de rede mostraram um enriquecimento de vias de comunicação entre células, tais como junções comunicantes e “tight” e as vias de adesão focal. Além disso, as vias envolvidas no movimento celular (por exemplo, vias de regulação do citoesqueleto de actina e a migração transendotelial de leucócitos) foram extremamente enriquecimento no grupo de proteínas expressas pelo Intestino primitivo bovino. Nossos resultados sugerem que as células do intestino primitivo tem alto perfil migratório e são compostas de células não totalmente diferenciadas,

com alto metabolismo celular. A migração e a diferenciação destas células poderiam determinar o destino do embrião em desenvolvimento. Além disso, a compreensão da função e interação de proteínas expressas pelo embrião normal fornecerá informações sobre o impacto das biotecnologias reprodutivas no desenvolvimento do embrião durante a implantação e placentação.

Palavras-chave: Proteômica. Intestino primitivo. Embrião. MudPIT. Proteína.

ABSTRACT

MANÇANARES, A.C.F. **Proteomic analysis of primitive gut from bovine embryo.** [Análise proteômica do intestino primitivo de embriões bovinos]. 2012. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The development of embryo biotechnology in farm animals is hampered by embryo losses in first trimester of gestation, period in which the primitive gut is being established. The study of proteins contained in the primitive gut at this early stage of pregnancy may increase the knowledge about the molecular pathways involved in normal embryonic development and loss of embryos, as well as their involvement in organogenesis and cell differentiation. Primitive gut from bovine embryos on day 39 SD $\pm$ 4 of development (ranging from 33 to 45 days) were collected at a local slaughterhouse. The samples were processed and pooled for label-free shotgun proteomics analysis using MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) tandem MSE acquisition. Functional and pathway analysis using FatiGo (www.babelomics.org); Pathway Express (<http://vortex.cs.wayne.edu/ontoexpress>) and Ingenuity Pathway Analysis (www.ingenuity.com) were used to identify relevant ontologies and canonical or noncanonical pathways represented by the expressed proteins in the primitive gut. A total of 74 protein sequences were identified corresponding to 30 unique proteins expressed by the bovine primitive gut. Out of 30 unique proteins, 21 proteins were used on the ontology and pathway analysis. The ontology analysis showed an enrichment of ontologies related to binding (N=5); catalytic activity (N=6); intracellular organelle (N=6). There was an enrichment of ontologies associated to cytoskeleton modifications; cell differentiation process (N=3); cellular migration (N=4) and cell metabolism (N=6). Furthermore, the pathway and the network analysis showed an enrichment of cell-to-cell communication pathways such as gap and tight junction, and focal adhesion pathways. In addition, pathways involved in cellular movement (regulation of actin cytoskeleton and leukocyte transendothelial migration) were extremely enriched in the group of proteins expressed by the bovine primitive gut. Our results suggested that the cells from primitive gut have high migratory profile and are composed of not fully differentiated cells with high cellular metabolism. The proper migration and

differentiation of these cells would dictate the fate of the developing embryo. Moreover, understanding the function and interaction of proteins expressed by normal embryo will give clues of the impact of the reproductive biotechnologies in embryo development during the window between implantation and placentation.

Keyword: Proteomic.Primitive gut. Embryo. MudPIT. Protein.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação esquemática dos derivados do intestino primitivo. I: Intestino anterior; II: Intestino médio; III: Intestino posterior; 1: Estomodeu; 2: Primórdio da tireoide; 3: Membrana Orofaringea; 4: Faringe e bolsas faríngeas; 5: Divertículo respiratório; 6: Primórdio do esôfago; 7: Primórdio do estômago; 8: Broto do fígado; 9: Broto pancreático; 10: Primórdio do Intestino delgado; 11: Ducto vitelino; 12: Primórdio do ceco; 13: Primórdio do resto do intestino grosso; 14: Membrana da cloaca; 15: Primórdio do trato urinário conectado com o alantóide (HYTTEL et al., 2009).29
- Figura 2 – Representação esquemática das etapas de preparo das amostras e MS^E.41
- Figura 3 – Fotografia e esquema de embrião bovino apresentando CR 1,6 cm com idade gestacional estimada entre 38/40 dias. A: âmnio (a); saco vitelino (sv); alantoide (al); fígado (f); coração (c); intestino médio (im). B: arcos faríngeos (af); esôfago (ef); estômago (et); intestino anterior (ipa); intestino médio (im); intestino posterior (ipt); alantoide (al); ducto vitelino (dv). C, detalhe da região de conexão do saco vitelino com intestino primitivo; delimitação do cordão umbilical (pontilhado). D, vista ventral da região abdominal mostrando a localização do intestino (ip) primitivo em relação ao fígado (f) e em E o fígado foi removido, para melhor identificação dos primórdios do estômago policavitário (e) e intestino primitivo (ip). F, estômago (e), intestino anterior (icr), médio (im) e posterior (ipt). Detalhe da comunicação com o intestino primitivo (ip) através do ducto vitelino (dv). Barra: 0,2 cm.....46
- Figura 4 – Fotomicrografia do intestino primitivo (na região da alça intestinal) de embrião bovino (CR 1,4 cm), idade gestacional estimada de 30 a 32 dias. Em A, observar as células indiferenciadas de formato alongado (setas cheias), no lúmen, borda em escova (Be), mesênquima (Ms) e epitélio intestinal (Ei). Em B, corte longitudinal do intestino primitivo, na região luminal, a bordadura em escova (Be), mesênquima (Ms) e epitélio intestinal (Ei).47
- Figura 5 – Classes de ontologias que foram funcionalmente enriquecidas, baseado nos resultados do FatiGO. Em A, classes de ontologias representadas componente celular; em B, processos biológicos e em C função molecular.....57
- Figura 6 – Cluster de interesse com vias de sinalizações enriquecidas. Em A, vias de sinalização do sistema imune. Em B, vias de sinalização do citoesqueleto. Em C, vias de sinalização de metabolismo de carboidrato.60

Figura 7 – Fotomicrografia de imunofluorescência para β -tubulina e vimentina em corte congelado de intestino primitivo de embriões bovinos com idade aproximada de 45 a 50 dias de gestação (CR 2,9 e 3,4 cm). Em A, C e E núcleo marcado com Hoechst 33342 (azul). Em B controle negativo. Em D e F, marcação positiva para Beta-tubulina e Vimentina, respectivamente; Mesênquima (Me) ; Epitélio intestinal (Ei) e lúmen intestinal (seta).62

ANEXO

Anexo A - <i>Pathway Express</i> das 10 vias significativamente representadas.....	84
---	-----------

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1 – Idades gestacionais e crown-rump de embriões bovinos utilizados no MudPIT – São Paulo – 2012	38
Tabela 2 – Lista das proteínas expressas no intestino primitivo de embriões bovino – São Paulo – 2012.	49
Tabela3 – Processos biológicos que estão diferencialmente enriquecidos pelas proteínas contidas no intestino primitivo ^a – São Paulo – 2012.....	54
Tabela 4 – Componentes celulares que estão diferencialmente enriquecidos pelas proteínas contidas no intestino primitivo ^a – São Paulo – 2012.....	55
Tabela 5 – Funções moleculares que estão diferencialmente enriquecidos pelas proteínas contidas no intestino primitivo ^a – São Paulo – 2012.....	56
Tabela 6 – Vias de ativação que estão diferencialmente enriquecidos pelas proteínas contidas no intestino primitivo ^a – São Paulo – 2012.....	59
Quadro 1 – principais anotações do gene ontology e vias de ativação das proteínas identificadas ^a – São Paulo – 2012.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IP	Intestino Primitivo
MudPIT	Técnica de identificação multidimensional de proteínas
MCI	Massa Celular Interna
HOX	Homeobox
Shh	Sonic Hedgehog
AP	Antero-posterior
Cdx2	Homeobox caudal 2
Pdx1	Homeobox pancreático e duodenal 1
MS	Espectrometria de massas
m/z	Massa/Carga
MS/MS	Espectrometria de massa Tandem
CID	Dissociação induzida por colisão
KEGG	Kyoto Encyclopedia de Genes e Genomes
GO	Gene Ontology
SIF	Serviço de Inspeção Federal
CR	Crown Rump
ACTC1	Actin alpha cardiac muscle 1
ACTA1	Actin alpha skeletal muscle
ACTB	Actin cytoplasmic 1
ACTG1	Actin cytoplasmic 2
ACTG2	Actin gamma enteric smooth muscle
ACTA2	Alpha 2 actin
AFP	Alpha fetoprotein
LOC508098	Artiodactyl specific sub telomeric protein
HSPB1	Heat shock protein beta 1
HBA	Hemoglobin subunit alpha 1
HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
KRT8	Keratin type II cytoskeletal 8
MT1A	Metallothionein 1
MT1E	Metallothionein 1E
MT2A	Metallothionein 2
PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3 precursor

RGN	Regucalcin
TKT	Transketolase
TUBA1B	Tubulin alpha 1B chain
TUBA1A	Tubulin alpha 1B chain 1
TUBA1C	Tubulin alpha 1C chain
TUBA1D	Tubulin alpha-1D chain
TUBB2A	Tubulin beta 2B chain
TUBB2C	Tubulin beta 2C chain
TUBB3	Tubulin beta 3 chain
TUBB4	Tubulin beta 4 chain
TUBB2B	Tubulin beta 5 chain
VIM	Vimentin

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO - FORMAÇÃO DO EMBRIÃO	25
2.2	DESENVOLVIMENTO DO INTESTINO PRIMITIVO.....	27
2.3	GENES ENVOLVIDOS NA DIFERENCIAÇÃO DO INTESTINO PRIMITIVO 30	
2.4	ANÁLISE PROTEÔMICA	31
2.5	BANCO DE DADOS.....	32
3	OBJETIVO	35
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAL E MÉTODO	37
4.1	COLETA DE MATERIAL	37
4.2	MICROSCOPIA DE LUZ	37
4.3	NANOUPLC TANDEM NANOESI-MS ^E	38
4.4	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	43
5	RESULTADOS	45
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO	71
	REFERENCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento embrionário é período de rápido crescimento e diferenciação celular para formação dos principais tecidos, órgãos e sistemas (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Neste período, o desenvolvimento do intestino primitivo (IP) é fundamental para a organogênese, uma vez que os tratores gastrointestinal e respiratório são formados a partir do alongamento do (IP). O IP é dividido em 3 porções: anterior, que dá origem aos arcos faríngeos, o sistema respiratório, o esôfago, o estômago, assim como o fígado e o pâncreas; a porção média, que permanece temporariamente ligada ao saco vitelino através do ducto vitelino, que formará o intestino delgado; e a porção posterior que formará o intestino grosso (HYTTTEL et al., 2009).

O primeiro terço da gestação, idade em que o intestino primitivo está sendo rápido desenvolvimento coincide com as perdas gestacionais de embriões produzidos *in vitro*. A maioria dessas perdas é decorrente de anormalidades no embrião ou na placenta, alterações no ambiente uterino ou nas interações materno-fetais (WILMUT; SALES; ASHWORTH, 1986). Portanto o estudo das proteínas expressas (proteômica) no intestino primitivo durante a fase inicial da gestação pode auxiliar o entendimento do desenvolvimento embrionário e sua participação na organogênese e diferenciação celular.

A proteômica é definida como a identificação e quantificação de todas as proteínas expressas em uma amostra biológica (FERREIRA et al., 2010). Atualmente, a proteômica tem sido empregada para analisar misturas cada vez mais complexas de proteínas provenientes de lisados celulares e extratos de tecidos, com o intuito de detectar diferenças quantitativas e qualitativas na expressão proteica global (proteoma) (WESTERMEIER; NAVEN, 2002). Uma maior resolução do proteoma e a identificação de proteínas menos abundantes, frequentemente perdidas quando utilizados os géis de eletroforese bidimensional, é conseguida com uma das técnicas de espectrometria de massas chamada de MudPIT (Tecnologia multidimensional de identificação de proteínas, do inglês *Multidimensional Protein Identification Technology*) (WASHBURN; WOLTERS; YATES, 2001).

Assim, este trabalho trará subsídio para o entendimento dos processos envolvidos no desenvolvimento normal do embrião e compreensão do que pode estar alterado em casos de defeitos de diferenciação e congênitos (NATH et al., 2009).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, descrevemos o desenvolvimento embrionário desde a fertilização até a formação do embrião. Mais especificamente é discutido o desenvolvimento do intestino primitivo; os genes envolvidos na sua diferenciação em outros órgãos e os métodos disponíveis para análise proteômica em amostras biológicas.

2.1 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO - FORMAÇÃO DO EMBRIÃO

O período embrionário em bovinos corresponde do 15º ao 45º dia de gestação, durante o qual os principais tecidos, órgãos e sistemas são formados. O período fetal se estende a partir do 45º dia, período onde as principais características da forma externa do corpo são reconhecidas (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O período de pré-implantação em mamíferos, corresponde o intervalo entre a fecundação do oócito até a implantação, onde o conceito segue pela tuba uterina até o útero (WATSON; NATALE; BARCROFT, 2004).

Em bovinos, o período de pré-implantação ocorre até o 24º dia de gestação, e durante este período o embrião transcorre significativo crescimento e diferenciação celular (ALEXOPOULOS et al., 2005).

Em humanos, aproximadamente 3 dias após a fertilização, as células do embrião compactado dividem-se novamente para formar uma mórula de 16 células. Durante o processo de compactação, as células mais ao exterior da mórula permanecem fortemente aderidas para a formação do trofoectoderma, enquanto as células internas se reúnem em um pólo do embrião para formar a massa celular interna (MCI). Há ainda a secreção de líquido para a formação de um celoma embrionário chamada de blastocelo e a formação do blastocisto (SADLER, 2005).

A MCI dará ao embrião propriamente dito. Ainda duas camadas celulares são formadas na região da MCI, o hipoblasto e epiblasto. O hipoblasto será responsável pela formação do endoderma que reveste o saco vitelino primitivo e de parte do

mesoderma extra-embriônico; e o epiblasto originará o ectoderma do âmnio e do embrião e formação da linha primitiva (MOORE; PERSAUD, 2004; HYTTEL et al., 2009). Enquanto o trofoectoderma desenvolverá os tecidos extra-embriônicos que dão suporte ao desenvolvimento do embrião/feto durante a gestação (MADDOX-HYTTEL et al., 2003; TORRES-PADILLA, 2008).

Aos 18 dias de gestação, os embriões bovinos estão na fase de gástrula (EVANS; SACK, 1973) que é caracterizada conversão do disco bilaminar em três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma. A MCI dará origem a duas camadas de células, interna e externa, especificado como o hipoblasto e epiblasto, respectivamente, para estabelecer o disco embrionário bilaminar, enquanto o trofoectoderma desenvolverá os tecidos extra-embriônicos que dão suporte ao desenvolvimento do embrião/feto durante a gestação (MADDOX-HYTTEL et al., 2003; TORRES-PADILLA, 2008).

Aos 18 dias de gestação os embriões bovinos apresentam-se na fase de gástrula (EVANS; SACK, 1973). Exibindo completa formação do epiblasto, que originará ectoderma do âmnio, ectoderma do embrião e formação da linha primitiva; e hipoblasto, responsável pela formação do endoderma que reveste o saco vitelino primitivo e de parte do mesoderma extra-embriônico (HYTTEL et al., 2009).

As maiores transformações ocorrem durante a gastrulação quando o disco bilaminar é convertido em três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma (WEINSTEIN, 2005).

Até o 24º dia de gestação, período pré-implantacional, o embrião sofre significativo crescimento e diferenciação celular, seguindo da tuba uterina até o útero para posterior implantação (WATSON; NATALE; BARCROFT, 2004; ALEXOPOULOS et al., 2005).

No começo da terceira semana de gestação, a linha primitiva surge após a migração das células do epiblasto para o plano mediano. Estas células da linha primitiva sofrem invaginação e originam as células mesenquimais, que vão migrar ventral, lateral e cefalicamente entre o hipoblasto e epiblasto. Neste período o epiblasto começa a ser chamado de ectoderma e o hipoblasto deslocado, pelas células mesenquimais, forma o endoderma do embrião. O mesoderma intra-embriônico formado pelas células mesenquimais dá origem à terceira camada germinativa. E o mesoderma extra-embriônico se une com as células da linha

primitiva, migrando para a borda do disco embrionário, cobrindo assim o âmnio e o saco vitelino. A partir da formação destas três camadas germinativas é que se originam todos os principais órgãos e sistemas do corpo (BREWER; WILLIAMS, 2004; MOORE; PERSAUD, 2004).

No início da quarta semana, o embrião sofre dobramento nos planos mediano e horizontal, convertendo o disco embrionário trilaminar achatado em um embrião cilíndrico, assumindo a forma de “C”. Este dobramento ocorre em função do rápido crescimento, principalmente do encéfalo e medula espinhal (MOORE; PERSAUD, 2004) e causa a incorporação de parte do saco vitelínico pelo embrião, dando origem ao intestino primitivo que derivará o trato digestivo, os pulmões, o fígado e o pâncreas (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.2 DESENVOLVIMENTO DO INTESTINO PRIMITIVO

Na quarta semana do desenvolvimento embrionário, o disco embrionário trilaminar sofre dobramentos para a formação de um embrião mais cilíndrico. O dobramento ocorre em função do rápido crescimento, principalmente do encéfalo e medula espinhal (MOORE; PERSAUD, 2004).

O intestino primitivo é formado através do dobramento cefálico, caudal e lateral do embrião, onde uma porção do saco vitelino, revestida por endoderma, é incorporada ao embrião (SADLERCARLSON, 1996; DE SANTA BARBARA; VAN DEN BRINK; ROBERTS, 2003; SADLER, 2005).

É composto por três camadas germinativas: a endoderme, que forma o revestimento epitelial da luz do tubo; mesoderma, que forma as camadas de músculo liso; e ectoderma que inclui as estruturas digestivas mais anteriores e posteriores e o sistema nervoso entérico (DE SANTA BARBARA; VAN DEN BRINK; ROBERTS, 2003).

Durante o desenvolvimento embrionário, o intestino primitivo possui quatro eixos: antero-posterior, dorso-ventral, esquerdo-direito e radial. A diferenciação e o desenvolvimento morfológico ao longo do eixo antero-posterior dá origem a três

regiões do intestino primitivo: região anterior, média e posterior (DE SANTA BARBARA; VAN DEN BRINK; ROBERTS, 2003).

O intestino primitivo dá origem a uma série de derivados do endoderma (Figura 1). O intestino anterior derivará os arcos faríngeos, o sistema respiratório, o esôfago, o estômago, assim como o fígado e o pâncreas. O intestino médio forma intestino delgado, e o intestino posterior dá origem ao intestino grosso (HYTTEL et al., 2009).

A porção média do intestino primitivo permanece temporariamente ligada ao saco vitelino por meio do pedículo do embrião ou ducto vitelino. Este ducto é amplo no início do desenvolvimento, mas com o crescimento do embrião, torna-se estreito (SADLER, 2001; MANÇANARES, 2007).

O trato intestinal, pouco depois de sua formação, consiste de uma camada simples de epitélio colunar endodérmico cercado por uma camada de mesoderma esplancnopleural. No processo de histogênese do epitélio intestinal podem-se destacar três fases como sendo as mais relevantes: (1) fase inicial de proliferação e morfogênese epitelial, (2) um período intermediário de diferenciação celular durante o qual aparecem os tipos celulares distintos que, caracterizam o epitélio intestinal, e (3) fase final de amadurecimento bioquímico e funcional dos diferentes tipos de células epiteliais. Nota-se também, uma diferenciação da parede mesenquimal do intestino, em várias camadas de tecido conjuntivo e musculatura lisa ricamente innervada (CARLSON, 1996; DE SANTA BARBARA; VAN DEN BRINK; ROBERTS, 2003).

Fonte: (HYTTEL et al., 2009).

Figura 1 – Representação esquemática dos derivados do intestino primitivo. I: Intestino anterior; II: Intestino médio; III: Intestino posterior; 1: Estomodeu; 2: Primórdio da tireoide; 3: Membrana Orofaríngea; 4: Faringe e bolsas faríngeas; 5: Divertículo respiratório; 6: Primórdio do esôfago; 7: Primórdio do estômago; 8: broto do fígado; 9: Broto pancreático; 10: Primórdio do Intestino delgado; 11: Ducto vitelino; 12: Primórdio do ceco; 13: Primórdio do resto do intestino grosso; 14: Membrana da cloaca; 15: Primórdio do trato urinário conectado com o alantóide

O desenvolvimento do intestino médio caracteriza-se pelo rápido alongamento do intestino e de seu mesentério, resultando na alça intestinal primária. Na região do ápice, essa alça mantém uma comunicação livre com o saco vitelino, através do estreito ducto vitelino. Ao longo do desenvolvimento, o ramo cefálico da alça forma a porção mais distal do duodeno, o jejuno e parte do íleo. Enquanto que, o ramo caudal transforma-se na porção inferior do íleo, no ceco, no apêndice, no cólon ascendente e nos dois terços proximais do cólon transversal (2001).

Três processos fundamentais podem ser definidos durante o desenvolvimento embrionário do sistema de órgãos do tubo intestinal primitivo. A primeira é a regionalização do tubo intestinal, de modo que regiões distintas, com funções

diferenciadas são formadas ao longo do eixo ântero-posterior. A segunda é a padronização radial do tubo, a fim de alcançar a colocação correta do epitélio, tecido conjuntivo, as camadas musculares, plexos nervosos, vasculares e linfáticos e glândulas. O terceiro é um auto-renovação contínua do epitélio gastrointestinal a partir de células-tronco, que persiste na vida pós-natal e adulto. Eventos de sinalização celular entre as camadas epiteliais e mesenquimais teriam um papel importante na coordenação dos aspectos fundamentais do desenvolvimento do trato gastrointestinal, no entanto a natureza molecular dos mecanismos de sinalização ainda é mal compreendida (KEDINGER; SIMON-ASSMANN; LACROIX, 1986; YASUGI, 1993; WELLS; MELTON, 1999).

2.3 GENES ENVOLVIDOS NA DIFERENCIAÇÃO DO INTESTINO PRIMITIVO

A expressão coordenada de genes no mesoderma determina o tipo de estrutura que será formada por meio da expressão de genes homeobox (HOX) e sua indução é consequente da expressão do gene sonic hedgehog (Shh) por todo endoderma do intestino primitivo. Após ser especificado por esse código, o mesoderma molecularmente instrui o endoderma para a diferenciação dos diversos derivados dos intestinos médio e posterior e interações semelhantes são responsáveis pela divisão do intestino anterior (RAMALHO-SANTOS; MELTON; MCMAHON, 2000; SADLER, 2001; DE SANTA BARBARA; VAN DEN BRINK; ROBERTS, 2003).

O gene Hox desempenha um papel importante na padronização do intestino ao longo do eixo antero-posterior (AP) (ROBERTS et al., 1995; WAROT et al., 1997; ROBERTS et al., 1998). Alguns genes próximos aos Hox, pertencentes ao grupo de genes chamados Parahox, estão envolvidos na formação das estruturas do intestino primitivo. O fator de transcrição homeobox tipo caudal 2 (CDX2) está envolvido na formação de estruturas do intestino posterior, enquanto que o homeobox pancreático e duodenal 1 (PDX1) é inicialmente expressado no intestino anterior, posteriormente torna-se importante para o desenvolvimento do pâncreas (HYTTEL et al., 2009).

O gene Shh, localizado na endoderme do intestino primitivo, atua na regulação de alguns órgãos, como por exemplo, a separação da traquéia e esôfago no início do desenvolvimento, o brotamento pulmonar, contribuindo assim para a ramificação morfogênica e proliferação do pulmão (IOANNIDES et al., 2003).

Alguns genes que contribuem para a padronização do tecido em respeito a diferenciação e proliferação das células no desenvolvimento embrionário. Entre suas diversas funções, o gene Wnt foi proposto a desempenhar um papel na especificação do trato gastrointestinal (WELLS; MELTON, 1999), sendo essencial para o estabelecimento do eixo dorso-ventral (PARR; MCMAHON, 1994; WODARZ; NUSSE, 1998).

2.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

A proteômica tem por objetivo estudar proteínas de misturas proteica complexas tais como lisados celulares. Método de avaliação do proteoma permite a determinação sistemática da identidade, quantidade, atividade e interações moleculares das proteínas expressas por um tecido ou tipo celular, em uma determinada condição biológica (WILKINS et al., 1996; SCHMIDT; AEBERSOLD, 2006) e fundamenta-se em princípios bioquímicos, biofísicos e de bioinformática (CELIS et al., 1996; WILKINS et al., 1996; LARKIN et al., 2010).

Atualmente, para o estudo do proteoma vem sendo utilizada a espectrometria de massas (MS), que baseia-se na determinação precisa da relação massa-carga (m/z) de íons em fase gasosa. Antes, a MS destinava-se apenas à identificação de moléculas pequenas e voláteis, mas, com o desenvolvimento de técnicas de ionização branda (onde os íons formados possuem baixa energia interna, permitindo a observação de espécies iônicas moleculares com pouca ou nenhuma fragmentação), sua aplicação à análise de moléculas grandes e polares, como peptídeos e proteínas, tornou-se possível e bem sucedida (LARSEN; ROEPSTORFF, 2000).

Assim, de acordo com o método de ionização apropriado, primeiramente, ocorre à geração de íons com base em compostos orgânicos ou inorgânicos. Logo

em seguida, em um analisador de massas, esses íons são separados por meio de sua relação m/z e, por fim, detectados quantitativamente. Um processador de dados converte, então, a magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z , gerando um espectro de massas correspondente (SEIDLER et al., 2010).

Em alguns casos, visando à caracterização da estrutura molecular e uma maior confiabilidade em experimentos de quantificação, os íons principais ou de interesse podem ser selecionados e fragmentados para posteriores análises de MS. Essa técnica denominada espectrometria de massas em *tandem* ou MS/MS, permite que, a partir de um íon precursor, fragmentos sejam gerados por colisão com moléculas de gás (dissociação induzida por colisão - CID) e analisados. Hoje, devido à alta resolução e grande sensibilidade, a análise por MS é um método eficiente e estabelecido dentro dos propósitos da proteômica (CEGLAREK et al., 2002).

Uma alternativa promissora para a análise proteômica é a utilização de cromatografia acoplada à MS/MS. Um método já utilizado é denominado “*NanoUPLC tandem nanoESI-MS^E*” (MS^E) e faz parte das chamadas técnicas de identificação em larga escala de proteoma MudPIT. Resultados iniciais demonstraram que a utilização de cromatografia de ultraperformance leva a ganhos significativos nas informações coletadas acerca de compostos como peptídeos e proteínas. Além disso, a junção de nano-UPLC com MS/MS utilizando *electrospray* como fonte de ionização permite a análise de compostos biológicos pouco abundantes em uma amostra (WUHRER; KOELEMAN; DEELDER, 2009).

2.5 BANCO DE DADOS

Uma vez identificadas e quantificadas as proteínas, é necessária a integração de todos os dados obtidos, para um posterior estudo organizado das relações biológicas nas quais as mesmas estão inseridas. Vale a pena ressaltar que, em muitos casos, não é a atividade de uma proteína de maneira individual, mas sim as vias biológicas e redes de interações onde essa está inserida, as responsáveis, de fato, pelo fenótipo ou pela grande variedade de respostas de um organismo a um determinado estímulo (QUACKENBUSH, 2007). Nesse sentido, algumas

ferramentas de bioinformática foram eficientemente desenvolvidas para explorar e analisar o interactoma, definido como sendo a lista completa de interações físicas mediada por todas as proteínas de um organismo, com o objetivo de entender como propriedades globais e locais de complexos formados por macromoléculas, principalmente interações proteína-proteína, impactam em diversas condições biológicas (FLIRI; LOGING; VOLKMANN, 2010).

O entendimento das relações biológicas está na possibilidade de integrar as informações das redes criadas a outros tipos de informações, como, por exemplo, às armazenadas no *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)(KANEHISA, 2002) e que fazem referência a vias metabólicas previamente descritas, ou a anotações de *Gene Ontology* (GO) (ASHBURNER et al., 2000). O *Gene Ontology* tem por objetivo agrupar e normatizar as diversas informações sobre as funções gênicas em um vocabulário próprio e que pode ser aplicado a todos os organismos. Criaram-se, então, as anotações de GO que, divididas em três categorias principais e hierarquicamente estruturadas, enquadram os produtos gênicos em: processo biológico, função molecular e componente celular(ASHBURNER et al., 2000).

Entretanto, o proteoma não deve ser visto como uma característica fixa de um organismo, sendo que a expressão protéica constitui-se em um fluxo dinâmico, respondendo a diferentes estímulos e sendo extremamente variável em diferentes situações médicas (BANKS et al., 2000).

Por fim, uma vez que a análise proteômica gera informações acerca das proteínas presentes em complexos sistemas de interação, esta vem sendo utilizada como um instrumento para identificar possíveis marcadores biológicos para prognósticos, diagnósticos e tratamentos de diversas condições médicas (AEBERSOLD; MANN, 2003; BINZ; HOCHSTRASSER; APPEL, 2003).

Assim, pode-se dizer que a caracterização do perfil protéico do intestino primitivo de embriões bovinos pode colaborar para o entendimento da participação do vitelo na organogênese embrionária, assim como processo de diferenciação celular, além da importância para o entendimento dos mecanismos moleculares que causariam perdas gestacionais, e outros efeitos comprometedores da gestação.

OBJETIVO

3 OBJETIVO

Determinar o perfil protéico diferencial do intestino primitivo em bovinos utilizando a tecnologia de MudPit (Multidimensional Protein Identification Technology) tandem MS^E.

2.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar qualitativamente as proteínas contidas no intestino primitivo de embriões bovinos provenientes de abatedouro;
- Analisar o interactoma das proteínas contidas no intestino primitivo de embriões bovinos;
- Imunolocalização das proteínas de interesse contidas no intestino primitivo embriões bovinos entre os dias 30-50 da gestação.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 COLETA DE MATERIAL

Foram coletados úteros gestantes de bovinos provenientes de Frigorífico com supervisão do SIF (Serviço de Inspeção Federal) no município de Sertãozinho – SP. Em cada corno uterino foi realizada uma incisão no sentido craniocaudal da cérvix uterina em direção ao corno gestante.

Os períodos gestacionais dos embriões foram estimados segundo a metodologia determinada por Evans e Sack (1973), com mensuração da distância do ponto maior da cabeça numa extremidade e a última vértebra sacral na extremidade oposta (Crown Rump / CR), utilizando-se um paquímetro.

4.2 MICROSCOPIA DE LUZ

Os embriões foram colocadas em solução fixadora de paraformaldeído 4% em PBS pH 7,4 a 0,1M. Após a fixação, o material foi desidratado em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em parafina. Foram obtidos cortes seriados com espessura de 5µm em micrótomo, submetidos a coloração de hematoxilina e eosina para posterior descrição. Após a coloração, as lâminas foram montadas com lamínulas.

4.3 NANOUPLC TANDEM NANOESI-MS^E

Para proteômica *Shotgun*, foram utilizados 8 amostras de intestino primitivo entre 33 e 45 dias de gestação (Tabela 1). As amostras foram armazenadas em criotubos e colocadas em nitrogênio líquido para posterior preparação das amostras.

Tabela 1 – Idade gestacional e Crown-rump de embriões bovinos utilizados no MudPit – São Paulo – 2012

CR (cm)	Período Gestacional (dias)
3,6	42
1,1	33
2,3	38
2,1	37
2,9	40
2,9	40
4,4	45
Total	276
Média	39
Desvio Padrão	4

4.3.1 Preparo das Amostras

Apreparação das amostras foi realizada no Laboratório de Morfologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) – FZEA/USP – Pirassununga.

As amostras foram agrupadas e 200 µL de solução contendo 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM KCl, 0.1% (m/v) SDS (do inglês: *sodium dodecyl sulfate*) e 10 mM DTT (do inglês: *dithiothreitol*) foram adicionadas às amostras e misturadas 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 (Eppendorf). O pellet

formado foi dissolvido em 200 µL de tampão fosfato (pH 7.2). Um volume contendo 50µg foi purificado e suas proteínas concentradas em filtros para centrifugação Microcon 0,5mL (Amicon Bioseparation, Millipore, Bedford, USA) para obter uma concentração final de 50µg de proteínas totais em 50µL de volume final. Uma vez concentradas as proteínas, o processo de digestão trípica foi iniciada por desnaturação das proteínas com 0.2% (m/v) de surfactante RapiGest (Waters, Milford-USA) durante 15 min a 80°C. As proteínas foram reduzidas usando 10 mM DTT (preparado em 50 mM NH₄HCO₃) 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 37°C durante a noite. Após a digestão, foram adicionados 10 µL de TFA (do inglês: *trifluoroacetic acid*) 5% a 37°C por 90 min para hidrolisar o surfactante RapiGest. Por fim, foi adicionado 5 µL de padrão interno (25 fmol/µL de álcool desidrogenase I) (SwissProt accession number P00330).

4.3.2 Condições: NanoUPLC tandem nanoESI-MS^E

Os experimentos de NANOUPLC TANDEM NANOESI-MS^E foram conduzidos no Laboratório de Aplicações de Pesquisa e desenvolvimento em Espectrometria de massas, Waters Corporation, Barueri, SP, Brasil.

Utilizou-se 250ng de proteína total por 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 x 15 cm conjugada com uma coluna SCX 5 mm, 180 mm x 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 30s. 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, Manchester, Inglaterra), 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 voo (*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 protéica e os dados quantitativos foram gerados utilizando-se algoritmos (SILVA 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 um servidor ProteinLynxGlobalServer v.2.4 (PLGS) com licença ExpressionE v.2.4 foi utilizado. Os bancos de dados UniProtKB / Swiss-Prot 57.1 e um UniProtKB / TrEMBL Release 40.1 (Uniprot - <http://www.uniprot.org/>) foram utilizados e as condições de busca foram baseados em taxonomia de *Bos taurus*, máximo permitido de clivagens perdidas pela tripsina até 1, modificações variáveis por carbamidometil (C), e acetil N-terminal e oxidação (M). As proteínas identificadas foram organizadas por PLGs em uma lista que corresponde a uma proteína única para ambas às condições 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, aquelas apresentando escores mais altos foram consideradas

(CHAMBERY et al., 2009; LI et al., 2009). As etapas de preparo da amostra e MSE estão representadas na figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática das etapas de preparo das amostras e MS^E

4.3.3 Anotação e procura de proteínas contidas no intestino primitivo bovino – conversão para ortólogosou homólogos humanos

Nas condições do presente estudo, os resultados obtidos foram apresentados sob a forma de lista de proteínas identificadas no intestino primitivo. O primeiro passo na construção do interactoma foi a padronização dos IDs de identificação das proteínas utilizando o banco de dados do Universal Protein Resource (Uniprot - <http://www.uniprot.org/>) UniProtKB / Swiss-Prot 57.1 e um UniProtKB / TrEMBL Release 40.1 baseado em taxonomia de *Bos taurus*. Dessa busca, o UniProtID foi padronizado para cada proteína encontrada, bem como RefSeq [identificação única de cada proteína no banco de dados do NCBI (do inglês: *National Center for Biotechnology Information*), símbolo e o nome oficial para cada proteína]. Quando

uma proteína não pôde ser identificada, a sequência FASTA foi obtida e uma análise de homologia de seqüências entre outras espécies foi realizada utilizando a plataforma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para a identificação de possíveis proteínas homólogas, utilizou-se *Homo sapiens* como espécie de referência. Para a análise funcional, tanto o símbolo quanto a RefSeq da proteína foram utilizados.

4.3.4 Análise de Ontologia das Proteínas Contidas no Intestino Primitivo

A análise do interactoma foi realizada utilizando FatiGo (um programa baseado na web para criação de perfis funcionais; <http://www.babelomics.org>) para identificar o enriquecimento funcional e também SNOW (*Studying Networks in the Omic World*) (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>). Além disso, Pathway Express (<http://vortex.cs.wayne.edu/ontoexpress>) foi utilizado para identificar vias de sinalização relevantes representadas pelo conjunto de proteínas contidas no intestino primitivo. *Pathway Express*(PE) calcula um valor de probabilidade (P), com base na densidade de proteínas que pertencem a uma determinada via usando o banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (DRAGHICI et al., 2007). Adicionalmente, o PE calcula também um valor extra de significância chamado valor de γP . O valor γP é calculado com base no fator de perturbação de cada uma das proteínas da lista em estudo na determinada via de sinalização. Esse cálculo leva em conta a localização da proteína na via de ativação, bem como as consequências de sua expressão. Por exemplo, na via de ativação do fator de crescimento semelhante à insulina (do inglês IGF1: insulin growth fator 1), a expressão aumentada da insulina em uma amostra proteica terá um impacto maior na modulação dessa via de sinalização do que um aumento de outros fatores secundários como MAPK (do inglês: *mitogen-activated protein kinase*) que atuam em várias vias de ativação como regulação da expressão gênica e durante o ciclo celular (PEARSON et al., 2001).

Tanto P_e e γP os valores são combinados para gerar o fator de impacto, que foi usado para classificar os caminhos de acordo com seu significado biológico. Uma via foi considerada significativamente se o valor de $\gamma P \leq 0,05$.

4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os IP frescos foram embebidos em *Tissue-Tek OCT*, congelados e armazenados -80°C . Foram obtidos cortes seriados com espessura de $5\mu\text{m}$ em um micrótomo criostato. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro silanizadas, fixadas em acetona a -20°C por 10 min e secas em temperatura ambiente por 1 h. Os cortes foram reidratados em tampão TRIS – HCL pH 7,5 (TBS, 60,57 g de Tris para 500 mL de água ultrapura e em seguida incubados com solução de bloqueio (TBS suplementado com 10% soro de cabra) por 1 h. Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos primários beta-tubulina (código sc-47751, Santa Cruz) e Vimentina (código sc-73254, Santa Cruz) diluídos em 1:100 em TBS suplementado com 1% de soro de cabra *overnight* a 4°C em câmara úmida. Como controle negativo, outros cortes foram incubados com anticorpo irrelevante para o controle de isotipo (IgG, n-5284.1) em TBS suplementado com 1% de soro de cabra. Os cortes foram então lavados por 3 vezes em TBS contendo 1% de soro de cabra e incubados com anticorpo secundário (Rabbit anti-rat, Alexa Fluor 488, A21210, Invitrogen; Goat anti-mouse, FITC, F0479, Dako, respectivamente) por 45 min. Os cortes foram lavados em TBS suplementado com 1% de soro de cabra por 3 vezes e em seguida, corados com Hoescht 33342 ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) por 10 min. Os cortes foram lavados mais 3 vezes com TBS, e as lâminas foram montadas com lamínulas usando reagente Prolong® Antifade (Invitrogen, P36934).

As lâminas foram analisadas usando o microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan 2 (Zeiss, Göttingen, Alemanha) sob objetiva de 40x e usando o filtro Zeiss 02 (filtro DAPI), filtro Zeiss 03 (filtro FITC) e filtro Zeiss 15 (filtro rodamina). Imagens digitais foram adquiridas usando AxioVision software (Zeiss) e a câmera de alta resolução Zeiss AxioCam MRM câmera digital.

5 RESULTADOS

Análise morfológica do Intestino Primitivo

Macroscopicamente o intestino médio de embriões bovino com idade gestacional estimada entre 38/40 dias pôde ser observado cranialmente a membrana alantoide, caudalmente ao fígado (Figura 3-A e D), e conectado temporariamente ao saco vitelino através do ducto vitelino (Figura 3-A, B, C e G).

Ao longo do desenvolvimento, o ramo cranial da alça forma a porção mais distal do duodeno, o jejuno e parte do íleo. Enquanto que, o ramo caudal transforma-se na porção inferior do íleo, ceco, cólon ascendente e nos dois terços proximais do cólon transversal (SADLER, 2005) (Figura 3-B, E e F).

Na altura do intestino médio, as alças intestinais fazem saliência na porção umbilical e constituem a hérnia umbilical devido à falta de espaço no abdome para seu crescimento (ALMEIDA, 1999) e o aumento do comprimento do intestino é muito maior que o aumento do comprimento do embrião (CARLSON, 1996; ALMEIDA, 1999; DE SANTA BARBARA; VAN DEN BRINK; ROBERTS, 2003) (Figura 3-C).

Sob microscopia de luz, o intestino primitivo de embrião bovino com idade aproximada entre 30 e 32 dias, apresentou o epitélio iniciando sua diferenciação com células colunares estratificadas e bordadura em escova (endoderma) seguida por células mesenquimais indiferenciadas provenientes do mesoderma (Figura 4).

Figura 3 – Fotografia e esquema de embrião bovino apresentando CR 1,6 cm com idade gestacional estimada entre 38/40 dias. A: âmnio (a); saco vitelino (sv); alantoide (al); fígado (f); coração (c); intestino médio (im). B: arcos faríngeos (af); esôfago (ef); estômago (et); intestino anterior (ipa); intestino médio (im); intestino posterior (ipt); alantoide (al); ducto vitelino (dv). C, detalhe da região de conexão do saco vitelino com intestino primitivo; delimitação do cordão umbilical (pontilhado). D, vista ventral da região abdominal mostrando a localização do intestino (ip) primitivo em relação ao fígado (f) e em E o fígado foi removido, para melhor identificação dos primórdios do estômago polcavitario (e) e intestino primitivo (ip). F, estômago (e), intestino anterior (icr), médio (im) e posterior (ipt). Detalhe da comunicação com o intestino primitivo (ip) através do ducto vitelino (dv). Barra: 0,2 cm

Figura 4 – Fotomicrografia do intestino primitivo (na região da alça intestinal) de embrião bovino (CR 1,4 cm), idade gestacional estimada de 30 a 32 dias. Em A, observar as células indiferenciadas de formato alongado (setas cheias), no lúmen, borda em escova (Be), mesênquima (Ms) e epitélio intestinal (Ei). Barra 50 μm.

Identificação das proteínas contidas no Intestino primitivo

Para a análise das proteínas, foram utilizados 8 embriões de bovinos que foram dissecados, congelados, agrupados e posteriormente processados.

Foram encontradas 74 proteínas ou sequências randômicas no “pool” de amostras do intestino bovino. Destas 74 sequências, 30 correspondem a proteínas únicas (Tabela 2).

Por meio do uso da ferramenta da web SNOW (*Studying Networks in the Omic World*) (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>), foram obtidas as ontologias para cada proteína expressada (Quadro 1).

Tabela 2 – Lista das proteínas expressas no Intestino primitivo de embriões bovino – São Paulo – 2012.

Protein Name/ Nome	Refseq ID	Protein Symbol/ Símbolo	UniPROT ID	Average Mass/ Massa Média	Score	Matched Peptides/C ontagem de Peptídeo	Sequence Coverage/ Cobertura de Sequência (%)
Actin alpha cardiac muscle 1	NP001029757	ACTC1	Q3ZC07	42019,1	3168,9	14	31,03
Actin alpha skeletal muscle	NP776650	ACTA1	P68138; A4IFM8	42037,2	3171,2	14	30,50
Actin cytoplasmic 1	NP776404	ACTB	P60712; D7RIF5; P60713; A0S012; Q9MZW1; Q0PGG4; A1XSX3; Q4JHR5; Q9XSX8	32105,8	4482,7	17	51,5
Actin cytoplasmic 2	NP001028790	ACTG1	P63258; O46401; Q862P9; Q4U3D1; Q9TTW4	22107,2	4482,7	17	51,47
Actin gamma enteric smooth muscle	NP001013610	ACTG2	Q5E9B5	41877,0	3168,9	14	31,12
Alpha 2 actin	NP001029674	ACTA2	Q58DT9; A5D7J0; P62739; Q0PEU1; Q862L0	32203,6		15	34,15
Alpha fetoprotein	NP001029434	AFP	Q3SZ57	68587,9	140,3	14	19,67
Artiodactyl specific sub telomeric protein	NP001124221	LOC508098	B3VNC2	25440,3	145,3	3	19,15
Heat shock protein beta 1	NP001020740	HSPB1	Q3T149	22393,1	84,2	6	38,31
Hemoglobin subunit alpha 1	NP001070890	HBA	P01967; P01966; P01968; P09423	15087,3	2093,5	4	36,17
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteinA1	NP001039376	HNRNPA1	P09867	34196,3		1	5,00
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	NP001070388	HNRNPU	A2VDN7	90452,5		4	6,06
Keratin type II cytoskeletal 8	NP001028782	KRT8	Q6B856; D0VWY9; Q148E2	53627,4	631,2	8	14,02
Metallothionein 1	NP001035582	MT1A	P58280; Q8MII4; P67982; P09577; P55943; P67983	5968,9		4	65,57
Metallothionein 1E	NP001108329	MT1E	Q17QH0; P09578; Q6R522; Q2NKV6	6011,5	3198,9	3	34,43
Metallothionein 2	NP001068608	MT2A	P68302; Q2KIX0; P55942; P68301; Q6R521	6036,7	3198,9	3	34,43
Phosphoglycerate mutase 1	NP001029226	PGAM1	Q3SZ62	28852,1	257,7	4	13,78
protein disulfide-isomerase A3 precursor	NP776758	PDIA3	D3K382; C6JUQ0; A5D7E8; P38657	56972,8		18	30,69
Regucalcin	NP776382	RGN	Q9TTJ5; B3VSC1	33357,4	177,7	6	17,06
Transketolase	NP001003906	TKT	A7E3W4; A7Z014; A5PJ79; Q6B855	67087,5	175,0	9	19,13
Tubulin alpha 1B chain	NP001108328	TUBA1B	P81947	50151,8	1082,1	7	21,95
Tubulin alpha 1B chain 1	NP001159977	TUBA1A	D0VWZ0	50135,8	128,8	6	21,95
Tubulin alpha 1C chain	NP001029376	TUBA1C	Q3ZCJ7	49857,4	1082,1	6	20,49
Tubulin alpha-1D chain	NP001039875	TUBA1D	Q862L2	10379,7	1085,0	3	44,44
Tubulin beta 2B chain	NP001003900	TUBB2A	Q6B856; D0VWY9; Q148E2	45512,4	1028,7	7	25,62
Tubulin beta 2C chain	NP001029835	TUBB2C	Q3MHM5; Q2HJ86	50057,1		7	26,29
Tubulin beta 3 chain	NP001070595	TUBB3	Q2T9S0	50432,9		6	14,00
Tubulin beta 4 chain	NP001029869	TUBB4	Q3ZBU7	49585,9		6	25,68
Tubulin beta 5 chain	NP001040014	TUBB2B	Q2KJD0; C7F7S5	33959,2	1506,8	9	32,66
Vimentin	NP776394	VIM	P48616; A4ZYA6	53713,8	1086,6	8	18,45

Protein Symbol/ Símbolo	UniPROT Id_HUMAN	Connections / Conexões	Gene Ontology	KEGG
ACTG1	P63261	24	nucleotide binding; structural constituent of cytoskeleton; protein binding; ATP binding; soluble fraction; cytoplasm; cytosol; cytoskeleton; cellular component movement; actin cytoskeleton; cortical cytoskeleton; identical protein binding; sarcomere organization; response to calcium ion	Focal adhesion; Adherens junction; Tight junction; Leukocyte transendothelial migration; Regulation of actin cytoskeleton; Vibrio cholerae infection; Pathogenic Escherichia coli infection; Hypertrophic cardiomyopathy (HCM); Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC); Dilated cardiomyopathy; Viral myocarditis
TUBB4	P04350	21	nucleotide binding; GTPase activity; structural molecule activity; GTP binding; cytoplasm; microtubule; cilium; microtubule-based process; microtubule-based movement; internode region of axon; cell projection; cell soma; myelin sheath; protein complex; protein polymerization	Gap junction; Pathogenic Escherichia coli infection
TUBB2B	Q9BVA1	13	nucleotide binding; GTPase activity; structural molecule activity; GTP binding; cytoplasm; microtubule; microtubule-based process; microtubule-based movement; mitosis; neuron differentiation; protein complex; protein polymerization	Gap junction; Pathogenic Escherichia coli infection
VIM	P08670	10	structural molecule activity; structural constituent of cytoskeleton; protein binding; cytoplasm; cytoskeleton; intermediate filament; cellular component movement; protein kinase binding; axon; interspecies interaction between organisms; intermediate filament-based process	
HNRNPU	Q00839	9	nucleotide binding; nuclear mRNA splicing; via spliceosome; nucleic acid binding; DNA binding; RNA binding; protein binding; ATP binding; nucleus; spliceosomal complex; nucleobase; nucleoside; nucleotide and nucleic acid metabolic process; RNA splicing; cell surface; nucleobase; nucleoside; nucleotide kinase activity; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex	Spliceosome
TUBA1A	Q71U36	7	nucleotide binding; GTPase activity; structural molecule activity; GTP binding; cytoplasm; microtubule; cytoplasmic microtubule; microtubule-based process; microtubule-based movement; protein domain specific binding; protein complex; protein polymerization	Gap junction; Pathogenic Escherichia coli infection
ACTB	P60709	5	nucleotide binding; structural constituent of cytoskeleton; protein binding; ATP binding; soluble fraction; cytoplasm; cytosol; cellular component movement; axonogenesis; protein kinase binding; axon; cortical cytoskeleton; NuA4 histone acetyltransferase complex; protein complex; nitric-oxide synthase binding; MLL5-L complex	Focal adhesion; Adherens junction; Tight junction; Leukocyte transendothelial migration; Regulation of actin cytoskeleton; Vibrio cholerae infection; Pathogenic Escherichia coli infection; Hypertrophic cardiomyopathy (HCM); Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC); Dilated cardiomyopathy; Viral myocarditis
HNRNPA1	P09651	3	nucleotide binding; nuclear mRNA splicing; via spliceosome; nucleic acid binding; single-stranded DNA binding; single-stranded RNA binding; protein binding; nucleus; nucleoplasm; spliceosomal complex; nucleolus; cytoplasm; RNA export from nucleus; transport; RNA splicing; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex; mRNA transport; nuclear import	Spliceosome
MT1A	P04731	2	copper ion binding; cytoplasm; biological_process; zinc ion binding; cadmium ion binding; metal ion binding	

Protein Symbol/ Símbolo	UniPROT Id_HUMAN	Connections / Conexões	Gene Ontology	KEGG
KRT8	P05787	2	structural molecule activity; protein binding; cytoplasm; apoptosis; cytoskeleton organization; Z disc; tumor necrosis factor-mediated signaling pathway; sarcolemma; interspecies interaction between organisms; keratin filament; response to other organism proteasome complex; intracellular; soluble fraction; insoluble fraction; nucleus; cytoplasm; spindle; cytoskeleton; plasma membrane; regulation of translational initiation; anti-	
HSPB1	P04792	2	apoptosis; cellular component movement; response to unfolded protein; cell death; response to heat; cell surface; Z disc; identical protein binding; ubiquitin binding; contractile fiber	MAPK signaling pathway; VEGF signaling pathway
TUBB2C	P68371	1	nucleotide binding; GTPase activity; structural molecule activity; GTP binding; cytoplasm; cytoskeleton; microtubule; cellular component movement; microtubule-based process; microtubule-based movement; natural killer cell mediated cytotoxicity; MHC class I protein binding; protein complex; unfolded protein binding; protein polymerization	Gap junction; Pathogenic Escherichia coli infection
TUBB2A	Q13885	1	nucleotide binding; GTPase activity; structural molecule activity; protein binding; GTP binding; cytoplasm; microtubule; microtubule-based process; microtubule-based movement; mitosis; neuron differentiation; protein complex; protein polymerization	Gap junction; Pathogenic Escherichia coli infection
MT2A	P02795	1	protein binding; cellular copper ion homeostasis; zinc ion binding; metal ion binding	
TKT	P29401	0	catalytic activity; transketolase activity; calcium ion binding; protein binding; cytosol; metabolic process; transferase activity; regulation of growth	Pentose phosphate pathway; Metabolic pathways
PDIA3	P30101	0	protein disulfide isomerase activity; cysteine-type endopeptidase activity; phospholipase C activity; protein binding; endoplasmic reticulum; endoplasmic reticulum lumen; protein import into nucleus; protein retention in ER lumen; signal transduction; isomerase activity; melanosome; positive regulation of apoptosis; cell redox homeostasis	Antigen processing and presentation
PGAM1	P18669	0	catalytic activity; bisphosphoglycerate mutase activity; 2; 3-bisphospho-D-glycerate 2-phosphohydrolase activity; phosphoglycerate mutase activity; cytosol; glycolysis; regulation of glycolysis; metabolic process; hydrolase activity; isomerase activity; intramolecular transferase activity; phosphotransferases; protein kinase binding; regulation of pentose-phosphate shunt; respiratory burst	Glycolysis / Gluconeogenesis; Metabolic pathways
TUBA1B	P68363	0	nucleotide binding; microtubule cytoskeleton organization; GTPase activity; structural molecule activity; structural constituent of cytoskeleton; protein binding; GTP binding; cytoplasm; microtubule; microtubule-based process; microtubule-based movement; protein complex; protein polymerization	Gap junction; Pathogenic Escherichia coli infection
ACTA1	P68133	0	nucleotide binding; stress fiber; structural constituent of cytoskeleton; protein binding; ATP binding; cytoplasm; cytoskeleton; striated muscle thin filament; actin filament; muscle contraction; response to mechanical stimulus; response to extracellular stimulus; cell growth; myosin binding; muscle thin filament assembly; response to long exposure to lithium ion; skeletal muscle fiber adaptation; ADP binding; response to steroid hormone stimulus; skeletal muscle fiber development	

Protein Symbol/ Símbolo	UniPROT Id_HUMAN	Connections / Conexões	Gene Ontology	KEGG
AFP	P02771	0	ovulation from ovarian follicle; liver development; copper ion binding; extracellular region; extracellular space; cytoplasm; transport; response to organic substance; nickel ion binding; sexual reproduction; pancreas development; organ regeneration; progesterone metabolic process; metal ion binding	
ACTG2	P63267	0	nucleotide binding; protein binding; ATP binding; cytoplasm; cytoskeleton	Vascular smooth muscle contraction

Quadro 1 – Principais anotações do Gene Ontology e vias de ativação das proteínas identificadas^a – São Paulo – 2012.

^a A análise foi realizada utilizando SNOW (*Studying Networks in the Omic World*), para encontrar associações entre os termos do Gene Ontology e vias de ativação através do KEGG ((Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) de cada proteína.

Estudo de Enriquecimento Funcional das Categorias de Ontologia das Proteínas Expressas pelo IP de Embriões Bovinos

O FatiGo web (<http://www.babelomics.org>) foi usado para realizar análise de enriquecimento funcional para determinar ontologias em que proteínas diferencialmente reguladas foram mais frequentes. O total de 32 classes de ontologia foram representadas, sendo elas separadas por 3 domínios: 12 processos biológicos (Tabela 3); 8 componentes celular (Tabela 4) e 12 funções moleculares (Tabela 5).

As ontologias que foram mais enriquecidas em componente celular (Figura 5-A) são: organela intracelular (75%) e projeção celular com (25%). Dentro dessas ontologias se encontram proteínas que participam da constituição do citoesqueleto, contração das fibras musculares e projeções neuronais.

Em processo biológico (Figura 5-B) houve duas principais ontologias: processo celular do metabolismo do carboidrato (42%) e diferenciação celular cell differentiation (25%). As proteínas presentes nessas ontologias, participam do metabolismo de carboidratos, como glicose e glucose, e também do processo de diferenciação celular, como desenvolvimento da célula, desenvolvimento e diferenciação dos músculos.

Nas ontologias relacionadas a função molecular (Figura 5-C), atividade catalítica (50%) e ligação(42%) foram as mais enriquecidas. As proteínas presentes nessa classe de ontologia, estão relacionadas com a aceleração do metabolismo da célula, bem como a produção de energia, e a ligação de alguns componentes como a miosina, o cobre e GTP (Trifosfato de guanosina) na célula.

Tabela3– Processos biológicos que estão diferencialmente enriquecidos pelas proteínas contidas no intestino primitivo^a – São Paulo – 2012.

Ontology Term/ Termo de Ontologia	Proteins Expressed in the Primitive Intestine/ Proteínas Expressas no Intestino primitivo	% of proteins in the ontology/ % de proteínas na ontologia	P value/ Valor de P
<i>Cellular carbohydrate metabolic process</i>			
Monosaccharide metabolic process (GO: 0005996)	ACTA1; ACTB; PGAM1; TKT	13,3	0,036
Glucose metabolic process (GO: 0006006)	ACTA1; ACTB; PGAM1; TKT	13,3	0,013
Glucose catabolic process (GO: 0006007)	ACTA1; ACTB; PGAM1; TKT	13,3	0,002
Hexose metabolic process (GO: 0019318)	ACTA1; ACTB; PGAM1; TKT	13,3	0,021
Glycolysis (GO: 0006096)	ACTA1; ACTB; PGAM1	10,0	0,016
<i>Cytoskeleton organization</i>			
Actomyosin structure organization (GO: 0031032)	ACTA1; ACTC1; ACTG1	10,0	0,003
<i>Cell differentiation</i>			
Cell development (GO: 0048468)	ACTA1; ACTB; ACTC1; ACTG1; TUBB2A; TUBB2B; TUBB3	23,3	0,007
Striated muscle cell differentiation (GO:0051146)	ACTA1; ACTC1; ACTG1	10,0	0,021
Muscle cell development (GO: 0055001)	ACTA1; ACTC1; ACTG1	10,0	0,002
<i>Protein complex assembly</i>			
Protein polymerization (GO: 0051258)	TUBA1A; TUBA1B; TUBA1C; TUBB2A; TUBB2B; TUBB2C; TUBB3; TUBB4	26,7	<0,001
Cellular protein complex assembly (GO:0043623)	TUBA1A; TUBA1B; TUBA1C; TUBB2A; TUBB2B; TUBB2C; TUBB3; TUBB4	26,7	<0,001
<i>Microtubule-based process</i>			
Microtubule-based movement (GO: 0007018)	TUBA1A; TUBA1B; TUBA1C; TUBB2A; TUBB2B; TUBB2C; TUBB3; TUBB4	26,7	<0,001

^a A análise foi realizada utilizando-FatiGo uma ferramenta web para encontrar associações significativas de termos Gene Ontology com grupos de proteínas(Al-Shahrour et al., 2007).

Tabela 4– Componentes celulares que estão diferencialmente enriquecidos pelas proteínas contidas no intestino primitivo^a – São Paulo – 2012.

Ontology Term/ Termo de Ontologia	Proteins Expressed in the Primitive Intestine/ Proteínas Expressas no Intestino primitivo	% of proteins in the ontology/ % de proteínas na ontologia	P value/ Valor de P
Intracellular organelle			
Actin cytoskeleton (GO: 0015629)	ACTA1; ACTA2; ACTC1; ACTG1	13,3	0,032
Microtubule cytoskeleton (GO: 0015630)	HSPB1; TUBA1A; TUBA1B; TUBA1C; TUBB2A; TUBB2B; TUBB2C; TUBB3; TUBB4	30,0	<0,001
Cytoskeletal part (GO: 0044430)	ACTA1; ACTC1; HSPB1; KRT8; TUBA1A; TUBA1B; TUBA1C; TUBB2A; TUBB2B; TUBB2C; TUBB3; TUBB4; VIM	43,3	<0,001
Myofibril (GO: 0030016)	ACTA1; ACTC1; HSPB1; KRT8	13,3	<0,001
Contractile fiber (GO: 0043292)	ACTA1; ACTA2; ACTC1; HSPB1; KRT8	16,7	<0,001
Soluble fraction (GO: 0005625)	ACTB; ACTC1; ACTG1; HSPB1; TKT	16,7	<0,001
Cell projection			
Axon (GO: 0030424)	ACTB; TUBB3; TUBB4; VIM	13,3	<0,001
Neuron projection (GO: 0043005)	ACTB; TUBB3; TUBB4; VIM	13,3	0,032

^a A análise foi realizada utilizando-FatiGo uma ferramenta web para encontrar associações significativas de termos Gene Ontology com grupos de genes (Al-Shahrour et al., 2007).

Tabela 5– Funções moleculares que estão diferencialmente enriquecidos pelas proteínas contidas no intestino primitivo^a – São Paulo – 2012.

Ontology Term/ Termo de Ontologia	Proteins Expressed in the Primitive Intestine/ Proteínas Expressas no Intestino primitivo	% of proteins in the ontology/ % de proteínas na ontologia	P value/ Valor de P
Catalytic activity			
Hydrolase activity, acting on acid anhydrides (GO:0016817)	ACTC1; TUBA1A; TUBA1B; TUBA1C; TUBB2A; TUBB2B; TUBB2C; TUBB3; TUBB4	30,0	<0,001
Hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides (GO:0016818)	ACTC1; TUBA1A; TUBA1B; TUBA1C; TUBB2A; TUBB2B; TUBB2C; TUBB3; TUBB4	30,0	<0,001
Phosphoglycerate kinase activity (GO: 0004618)	ACTA1; ACTB	6,7	0,004
Pyrophosphatase activity (GO: 0016462)	ACTC1; TUBA1A; TUBA1B; TUBA1C; TUBB2A; TUBB2B; TUBB2C; TUBB3; TUBB4	30,0	<0,001
Nucleoside-triphosphatase activity (GO: 0017111)	ACTC1; TUBA1A; TUBA1B; TUBA1C; TUBB2A; TUBB2B; TUBB2C; TUBB3; TUBB4	30,0	<0,001
GTPase activity (GO: 0003924)	TUBA1A; TUBA1B; TUBA1C; TUBB2A; TUBB2B; TUBB2C; TUBB3; TUBB4	26,7	<0,001
Binding			
Myosin binding (GO: 0017022)	ACTA1; ACTC1	6,7	0,041
Copper ion binding (GO: 0005507)	AFP; MT1A; MT1E	10,0	0,015
GTP binding (GO: 0005525)	TUBA1A; TUBA1B; TUBA1C; TUBB2A; TUBB2B; TUBB2C; TUBB3; TUBB4	26,7	<0,001
Cadmium ion binding (GO: 0046870)	MT1A; MT1E	6,7	0,010
Guanyl nucleotide binding (GO: 0019001)	TUBA1A; TUBA1B; TUBA1C; TUBB2A; TUBB2B; TUBB2C; TUBB3; TUBB4	26,7	<0,001
Structural molecule activity			
Structural constituent of cytoskeleton (GO:0005200)	ACTA1; ACTB; ACTG1; TUBA1B; VIM	16,7	<0,001

^aA análise foi realizada utilizando-FatiGo uma ferramenta web para encontrar associações significativas de termos Gene Ontology com grupos de genes (AL-SHAHROUR et al., 2007).

Figura 5 – Classes de ontologias que foram funcionalmente enriquecidas, baseado nos resultados do FatiGO. Em A, classes de ontologias representadas componente celular; em B, processos biológicos e em C função molecular

Vias de ativação diferencialmente enriquecidas pelas proteínas expressas no intestine primitivo

O software Pathway Express (<http://vortex.cs.wayne.edu/ontoexpress>) foi utilizado para identificar vias das proteínas que foram representadas. O total de 10 vias foram significativamente representadas pelas proteínas expressas pelo IP (Tabela 6) (Anexo A).

Destas 10, as vias com maior fator de impacto, ou seja, mais enriquecidas, estão relacionadas com a comunicação celular. Dentre elas estão as junções Gap, junções aderentes, junções tipotighte adesão focal. Estas vias sugerem que estas proteínas tem a função de estabelecer pontos de ligação entre as células, estabelecendo assim a comunicação entre elas.

Assim como na análise de ontologia, as vias de ativação envolvidas no movimento celular (por exemplo, vias de regulação do citoesqueleto de actina e

ainda a migração transendotelial de leucócitos) foram extremamente enriquecidas pelas proteínas expressas no intestino primitivo de embriões bovinos.

A via de sinalização do VEGF está envolvido no desenvolvimento vascular no embrião, sugerindo assim um papel importante do intestino primitivo na formação dos vasos sanguíneos durante a embriogênese.

Nossos resultados sugerem que as células do intestino primitivo tem alto perfil migratório e são compostos de células não totalmente diferenciadas, com alto metabolismo celular. A adequada migração e a diferenciação destas células podem ser fundamentais para o desenvolvimento embrionário em bovinos.

Tabela 6 – Vias de ativação que estão diferencialmente enriquecidos pelas proteínas contidas no intestino primitivo^a – São Paulo – 2012.

Pathway Name/ Nome da Via	IF ^b	Proteins Expressed in the Primitive Intestine/ Proteínas Exoressas no Intestini Primitivo	IP/TPP ^b	%IP/TPP in the Pathway	P value ^b
Cell Communication					
Gap junction	28,68	TUBA1A; TUBA1B; TUBA1C; TUBB2A; TUBB2B; TUBB2C; TUBB3; TUBB4	8/96	25.806	<0,001
Adherens junction	5,40	ACTB; ACTG1	2/78	6.452	0,005
Tight junction	4,34	ACTB; ACTG1	2/135	6.452	0,013
Focal adhesion	3,58	ACTB; ACTG1	2/203	6.452	0,028
Infectious Diseases					
<i>Vibrio cholerae</i> infection	22,56	ACTA1; ACTA2; ACTB; ACTC1; ACTG1; ACTG2	6/62	19.355	<0,001
Organismal Systems					
Cardiac muscle contraction	5,18	ACTB; ACTG1	2/87	6.452	0,006
Leukocyte transendothelial migration	4,58	ACTB; ACTG1	2/119	6.452	0,010
Antigen processing and presentation	2,22	PDIA3	1/89	3.226	0,108
Cell Motility					
Regulation of actin cytoskeleton	3,45	ACTB; ACTG1	2/217	6.452	0,032
Signal Transduction					
VEGF signaling pathway	2,40	HSPB1	1/74	3.226	0,091

^a *Pathway Express* foi utilizado para determinar as vias que são diferencialmente reguladas (DRAGHICI et al., 2007).

^b Abreviaturas são as seguintes: IF, Fator de Impacto; IP/TPP, número de proteínas diferencialmente reguladas/número total de proteínas envolvidas na via; Pvalue, que é o valor corrigido P pelo fator de impacto.

Construção de Interactomas

Para a construção das interações entre as proteínas, o plugin do software Cytoscape foi utilizado. O ClueGO analisa relações de grupos funcionais no contexto biológico. Na análise das interações entre proteína-proteína, formaram-se 3 clusters de interesse.

O primeiro cluster (Figura 6-A), participa das vias de sinalização do sistema imune. Esta via resulta na polarização celular e na reorganização da actina, sugerindo assim que as células estão migrando e se diferenciando. As vias de sinalização do citoesqueleto (Figura 6-B) e vias de sinalização do metabolismo de carboidrato (Figura 6-C).

Figura 6 – Cluster de interesse com vias de sinalizações enriquecidas. Em A, vias de sinalização do sistema imune. Em B, vias de sinalização do citoesqueleto. Em C, vias de sinalização de metabolismo de carboidrato

Imunofluorescência

A imunofluorescência foi usada para validação dos dados de proteômica, mostrando que algumas das proteínas encontradas pela proteômica também foram encontradas na imunofluorescência. Para isso, foram analisados a expressão de dois marcadores, os anticorpos β -tubulina e vimentina.

A β -tubulina (Figura 7-D), por ser o maior constituinte do citoesqueleto, mostrou-se fortemente marcado no mesênquima do intestino primitivo, assim como a vimentina, que é um marcador para células da mesoderma, também marcadas na área mesenquimal do intestino primitivo (Figura 7-F).

Figura 7 – Fotomicrografia de imunofluorescência para β -tubulina e vimentina em corte congelado de intestino primitivo de embriões bovinos com idade aproximada de 45 a 50 dias de gestação (CR 2,9 e 3,4 cm). Em A, C e E núcleo marcado com Hoechst 33342 (azul). Em B controle negativo. Em D e F, marcação positiva para Beta-tubulina e Vimentina, respectivamente; Mesênquima (Me); Epitélio intestinal (Ei) e lúmen intestinal (seta)

6 DISCUSSÃO

Pouco se sabe a respeito das proteínas sintetizadas no intestino primitivo da espécie bovina. Para tanto, utilizamos as referências que dizem respeito às proteínas presentes no trato gastrointestinal de outras espécies, como camundongos e humanos, e proteínas presentes na proliferação de câncer e tumores, já que o intestino é um órgão de alta taxa de proliferação celular, para a discussão das funções das proteínas encontradas neste estudo.

O intestino primitivo é conhecido por originar órgãos importantes do trato respiratório (arcos faríngeos, pulmões, traquéia, laringe e faringe), todo o trato gastrointestinal, bem como o fígado e o pâncreas (HYTTEL et al., 2009).

Foram encontradas 30 proteínas no intestino primitivo que foram categorizadas em 32 classes de ontologias e 10 vias de sinalização foram enriquecidas.

As ontologias podem ser divididas em 3 domínios: função molecular, que descreve a atividade que as proteínas executam dentro do organismo; processo biológico, que descreve os objetivos biológicos da proteína dentro do organismo e por fim, componente celular, que descreve o local de ação dessa proteína (HARRIS et al., 2004).

Dentre as ontologias apresentadas em função molecular, a *catalytic activity* ou atividade catalítica representou 50% das ontologias, 42% foram representadas pela ontologia *binding* ou ligação e 8% das ontologias são representadas por *structural molecule activity* ou atividade molecular estrutural. Esses resultados sugerem que as proteínas encontradas nessas ontologias participam, dos processos de aceleração de reações químicas, ligações e interações entre moléculas e reestruturação molecular da célula para ocorrer à migração e formação de novos órgãos do trato gastrointestinal.

No processo biológico, as ontologias enriquecidas foram: *Cellular carbohydrate metabolic process* com 42% e *cell differentiation* com 25% das proteínas de cada uma dessas ontologias, sugerindo assim que as proteínas envolvidas estão envolvidas no metabolismo de açúcares como a glicose que é utilizada no consumo de energia pela célula e na diferenciação celular.

As ontologias presentes em componente celular são *Intracellular organelle* organela intracelular com 75% e *Cell projection* ou projeções celulares com 25% das proteínas presentes em cada ontologia.

Foram identificadas em nossos estudos 10 vias de ativação através da utilização do software Pathway Express.

A primeira via de ativação são as *gap junctions* são especializadas no contato intercelular em eucariotos que promovem a comunicação celular. Através de dois hemicanais (conexões), elas promovem a mediação da troca de pequenas moléculas entre as células (SOHL; MAXEINER; WILLECKE, 2005), como íons, aminoácidos, sinais elétricos e metabólitos (STAINS; CIVITELLI, 2005).

As *Adherens junction*, são vias formadas por estruturas especializadas que funcionam como mediadores da adesão celular, ou seja, permite o contato entre as células e aumentando o potencial de migração, permitindo assim a morfogênese do tecido e a homeostase. Os mecanismos da adesão celular são responsáveis pela montagem das células e pela conexão com o citoesqueleto, que irá determinar a arquitetura do tecido (GUMBINER, 1996).

As vias de sinalização do sistema imune, como as vias encontradas nos nossos estudos, *Leukocyte transendothelial migration* e *Antigen processing and presentation*, são reconhecidas como mediadores da resposta anti-inflamatória através da regulação e recrutamento de células do sistema imune inato e adaptativo (ZABEL et al., 2006; DE PAEPE; CREUS; DE BLEECKER, 2008). As quimiocinas, por exemplo, tem participado da regulação processos biológicos, incluindo angiogênese, implantação do embrião e migração das células germinativa e tronco durante o desenvolvimento embrionário (ROSTENE; KITABGI; PARSADANIAN, 2007; SALAMONSEN; HANNAN; DIMITRIADIS, 2007).

Outro cluster encontrado em nossas análises, está relacionado ao metabolismo de aminoácido como a arginina. Produtos do metabolismo da arginina como o óxido nítrico pode induzir a vascularização local (FUKUMURA et al., 2001), portanto o enriquecimento desse cluster pode representar a expressão de proteínas que induzem a formação dos vasos durante o processo de organogênese do embrião bovino. A via de sinalização do VEGF está envolvido no desenvolvimento vascular do embrião. O VEGF é o maior promotor da proliferação e diferenciação das células endoteliais desde os primeiros estágios do desenvolvimento. Os vasos

sanguíneos iniciais surgem a partir da agregação entre angioblastos no saco vitelino do embrião (RISAU, 1997). A inibição ou interrupção do VEGF resulta na letalidade do embrião devido a falha no desenvolvimento dos vasos sanguíneos (MATSUMOTO, T.; CLAEISSON-WELSH, 2001)

Uma importante proteína encontrada em nosso estudo é a actina. Sabe-se que esta proteína é essencial para a divisão celular, migração, formação de junções celulares e regulação da forma celular. Foram encontradas 6 isoformas de actina, sendo divididas em dois grupos: as isoformas musculares, que são expressas principalmente nos músculos esquelético, cardíaco e musculatura lisa (MCHUGH; CRAWFORD; LESSARD, 1991; TONDELEIR et al., 2009); e as isoformas citoplasmáticas, que estão presentes em todas células, desde aves até mamíferos (PERRIN; ERVASTI, 2010).

A isoforma α actina cardíaca (ACTC1), está relacionada com a organização das miofibrilas cardíacas durante o desenvolvimento embrionário e perinatal (KUMAR et al., 1997). Utilizando um modelo *knockout* murinho (CRAWFORD et al., 2002) foi sugerido que α actina esquelética (ACTA1) participa ativamente na formação da musculatura esquelética, promovendo a contração involuntária dos músculos dos sistemas vascular, respiratório, gastrointestinal e urogenital (CHEEVER, 2011). A presença da ACTA1 no intestino primitivo é justificável, já que é ele quem vai originar os principais órgãos dos sistemas respiratório e gastrointestinal.

A isoforma α actina músculo liso (ACTA2) é encontrada na musculatura do sistema vascular e respiratório e regula a contração vascular e pressão sanguínea (SCHILDMEYER et al., 2000) enquanto que γ actina de músculo liso entérico (ACTG2) é predominante no trato gastrointestinal e urogenital, e está presente em pouca quantidade na maioria dos músculos lisos (MCHUGH; LESSARD, 1988; LESLIE et al., 1990; MCHUGH; CRAWFORD; LESSARD, 1991).

As isoformas de actina citoplasmáticas são divididas em β e γ -actina. A primeira (ACTB) é a proteína mais abundante que constitui o citoesqueleto de células eucarióticas, responsável pela motilidade celular; e a γ -actina (ACTG1) pode ter um papel estático, mantendo as estruturas bases da actina (CHEEVER, 2011).

A tubulina é o principal componente dos microtúbulos. Estes são essenciais em todas as células eucarióticas, com funções desde transporte celular até motilidade da célula e mitose (HYAMS; LLOYD, 1993). A expressão de várias

isoformas de tubulina e actina pelo intestino primitivo sugere que essas moléculas agem em conjunto para que ocorra proliferação e migração celular de forma apropriada e conseqüentemente uma formação de órgãos adequada para o desenvolvimento embrionário bovino.

A alfa-fetoproteína (AFP), uma glicoproteína embrionária também encontrada em nossas análises, é produzida durante a gestação pelo saco vitelino, pelo fígado fetal e pelo trato gastrointestinal (GULBIS et al., 1998). Acredita-se que ela contribui para a sobrevivência e desenvolvimento do embrião, diminuindo a atividade do sistema imunológico materno, inibindo assim o reconhecimento do embrião como um corpo estranho pelos tecidos maternos (MATSUMOTO, F. S., 2007). Sua expressão diminui drasticamente após o nascimento (ANDREWS; DZIADEK; TAMAOKI, 1982), e é reativada no indivíduo adulto durante condições de proliferação de hepatócitos, como a regeneração do fígado e em tumores (SPEAR, 1999) de origem do intestino primitivo (MCINTIRE et al., 1975).

Outra proteína, proteína do shock térmico beta 1 (HSPB1), também conhecida como HSP27 em humanos, é uma proteína choque térmico que é sintetizada em resposta a algum tipo de estresse celular ou a algum estímulo, sendo ele físico, químico ou biológico (ARRIGO et al., 2005). HSP27 é conhecida também por ser expressa durante o desenvolvimento do músculo esquelético e cardíaco em diversos organismos, incluindo humanos (ABU SHAMA et al., 1999) e camundongos (GERNOLD et al., 1993) além de aparecer na sinalização de apoptose (BRUEY et al., 2000), a inibição da polimerização de actina (BENNDORF et al., 1994), e estabilização de filamento de actina (HUOT et al., 1996).

A citoqueratina 8 (KRT8) juntamente com a 18 (KRT18), são proteínas que compõem os filamentos intermediários das células epiteliais, formando a estrutura tridimensional da célula. São os primeiros a serem expressos durante a embriogênese em camundongos (JACKSON et al., 1980). São expressos em tecidos extra-embrionários, como trofoectoderma e saco vitelino, e em tecidos embrionários, como trato gastrointestinal, pulmões, e a maioria dos outros epitélios simples (MOLL et al., 1982).

A principal função das metalotioneínas (MT) é controlar a homeostase de cobre e zinco e detoxificar metais – cádmio e mercúrio – (retirar as substâncias potencialmente tóxicas de dentro do organismo) (KAGI, 1991; ROESIJADI, 1992),

além de estar relacionada com a regulação do desenvolvimento embrionário; regulação da diferenciação, proliferação celular e inibição de apoptose celular (KAGI; SCHAFFER, 1988; HISHIKAWA et al., 1999; KLAASSEN; LIU; CHOUDHURI, 1999; DAVIS; COUSINS, 2000; COYLE et al., 2002; PEDERSEN et al., 2009).

A relação da MT com o desenvolvimento dos tecidos tem sido verificada in vivo em rim, fígado e mucosa lingual (NISHIMURA; NISHIMURA; TOHYAMA, 1989; QUAIFFE et al., 1994). No rim de neonatos e fetos, a MT foi identificada, utilizando imuno-histoquímica, no epitélio do túbulo renal, mudando de localização para o córtex renal durante o desenvolvimento. Já no fígado de fetos e neonatos, a expressão da MT nos hepatócitos é forte e localizada no citoplasma e núcleo. Essa expressão diminui com o desenvolvimento hepático, acompanhado pelo desaparecimento da marcação nuclear. Desta forma, a imuno-expressão da MT diminui à medida que o tecido se desenvolve, de forma que tecidos bem diferenciados expressam menos MT (NISHIMURA; NISHIMURA; TOHYAMA, 1989).

A família MT é composta por pelo menos 4 isoformas: MT1, MT2, MT3 e MT4 (NORDBERG; NORDBERG, 2000). A MT1 e MT2 são expressas em quase todos os órgãos do corpo, células em cultura, e são induzidas por uma grande variedade de agentes indutores de estresse, como metais pesados e agentes oxidativos. MT1 e MT2 apresentam maior expressão no fígado, estando envolvidas na manutenção da homeostasia do Zn. MT3 é expressa no cérebro e sua ação é de inibição da proliferação neuronal. MT4 é expressa especificamente em células epiteliais da língua e da pele e possui a função relacionada à diferenciação de células epiteliais escamosas de epitélios estratificados (VASAK; HASLER, 2000; SATO; KONDOH, 2002; THEOCHARIS et al., 2004). Assim, sugerimos que as isoformas de metalotioneína encontradas em nossos estudos, podem estar localizadas principalmente no fígado e rim.

As Fosfoglicerato mutase (PGAM1) são enzimas glicolítica que catalisam reações reversíveis que converte 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato em 2, 3-bisfosfoglicerato (2, 3-BPG), para liberar a energia que é essencial para o crescimento celular (DURANY et al., 2000; NARAYANAN; NARAYANAN; NIXON, 2004).

É dividido em 2 subunidades: a forma B (PGAM1), e a forma M (PGAM2). A isoforma mais abundante da fosfoglicerato mutase é a PGAM1, que foi encontrada

em feto humano normal e em cérebro de adulto (OMENN; CHEUNG, 1974), além de estar presente em câncer em humanos, incluindo carcinoma (DURANY et al., 2000) e câncer de pulmão (CHEN et al., 2003).

A PDIA3 (*protein disulfide isomerase-associated 3*, também conhecida ERp57) é uma das proteína que catalisa a oxidação, a redução e a isomerização de pontes de dissulfeto intra e intermolecular para garantir o dobramento correto de proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático (ER) (FREEDMAN; HIRST; TUIE, 1994), mas também podem estar presentes no citosol, núcleo, membrana plasmática e matriz extracelular. Podem se ligar a sequências específicas de DNA, que codificam proteínas de reparo do DNA, o que sugere que eles desempenham um papel na regulação da resposta ao estresse (CHICHIARELLI et al., 2007).

A *regucalcin* (RGN) desempenha múltiplas funções no fígado, rim e em células neuronais. A expressão da regucalcin tem o papel de regular o Calcio intracelular, inibição de homeostase de Calcio, sinalização e ação inibitória nas células proliferativa do fígado em regeneração, e ativação de protease (YAMAGUCHI, 2000). Regucalcin regula a expressão de várias proteínas quinases, tirosina quinases, proteínas fosfatase, e atua também como uma proteína reguladora em vias de sinalização intracelular (YAMAGUCHI, 2005). O aumento da expressão de RGN suprime a proliferação celular (NAKAGAWA; SAWADA; YAMAGUCHI, 2005), inibe a expressão de oncogêneses e aumenta a expressão de genes supressores de tumor (TSURUSAKI; YAMAGUCHI, 2003), que promovem a proliferação celular. O intestino primitivo é um orgão de alta capacidade proliferativa corroborando com a expressão the regucalcin pelo IP bovino.).

A vimentina é um filamento intermediário presente na maioria das células mesenquimais, sendo usada como marcador do desenvolvimento celular e tecidual (IVASKA et al., 2007). Está envolvida em funções importantes na organização celular, como adesão, migração, sinalização e até no posicionamento das organelas no citoplasma (LAZARIDES, 1980; IVASKA et al., 2007).

Estudos em ratos knockout, revelaram que a perda de vimentina determina alterações morfológicas da glia, prejudica a cicatrização de feridas e causa perda da integridade do endotélio vascular. Esses resultados sugerem a função organizadora e de adesão celular da vimentina (COLUCCI-GUYON et al., 1999; ECKES et al., 2000).

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Por meio da análise proteômica pelo método MudPIT, foi possível encontrar 30 proteínas únicas, expressas no intestino primitivo. foram feitas anotações de ontologia e vias de sinalização.

No estudo do interactoma, do ponto de vista de enriquecimento funcional foi possível concluir que nas três classes do gene ontology, as proteínas encontradas estão relacionadas com migração celular, diferenciação celular e alto metabolismo de carboidrato.

Conseguimos observar através de imunofluorescência, a marcação positiva da imunolocalização das proteínas vimentina e beta tubulina.

Assim, nossos resultados sugerem que as células do intestino primitivo tem alto perfil migratório e são compostas de células não totalmente diferenciadas, com alto metabolismo celular. A presença de proteínas com funções relacionadas a migração e a diferenciação destas celular iria determinar o destino do embrião em desenvolvimento.

REFERENCIAS

ABU SHAMA, K. M.; SUZUKI, A.; HARADA, K.; FUJITANI, N.; KIMURA, H.; OHNO, S.; YOSHIDA, K. Transient up-regulation of myotonic dystrophy protein kinase-binding protein, MKBP, and HSP27 in the neonatal myocardium. **Cell Structure and Function**, v. 24, n. 1, p. 1-4, 1999.

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

ALEXOPOULOS, N. I.; VAJTA, G.; MADDUX-HYTTEL, P.; FRENCH, A. J.; TROUNSON, A. O. Stereomicroscopic and histological examination of bovine embryos following extended in vitro culture. **Reprod Fertil Dev**, v. 17, n. 8, p. 799-808, 2005.

ALMEIDA, J. M. **EMBRIOLOGIA VETERINARIA COMPARADA**: GUANABARA, 1999

ANDREWS, G. K.; DZIADEK, M.; TAMAOKI, T. Expression and methylation of the mouse alpha-fetoprotein gene in embryonic, adult, and neoplastic tissues. **J Biol Chem**, v. 257, n. 9, p. 5148-5153, 1982.

ARRIGO, A. P.; FIRDAUS, W. J.; MELLIER, G.; MOULIN, M.; PAUL, C.; DIAZ-LATOUD, C.; KRETZ-REMY, C. Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by Hsp27 expression. **Methods**, v. 35, n. 2, p. 126-138, 2005.

ASHBURNER, M.; BALL, C. A.; BLAKE, J. A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J. M.; DAVIS, A. P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S. S.; EPPIG, J. T.; HARRIS, M. A.; HILL, D. P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J. C.; RICHARDSON, J. E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G. M.; SHERLOCK, G.; CONSORTIUM, G. O. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25-29, 2000.

BANKS, R. E.; DUNN, M. J.; HOCHSTRASSER, D. F.; SANCHEZ, J. C.; BLACKSTOCK, W.; PAPPIN, D. J.; SELBY, P. J. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. **Lancet**, v. 356, n. 9243, p. 1749-1756, 2000.

BENNDORF, R.; HAYESS, K.; RYAZANTSEV, S.; WIESKE, M.; BEHLKE, J.; LUTSCH, G. Phosphorylation and Supramolecular Organization of Murine Small

Heat-Shock Protein Hsp25 Abolish Its Actin Polymerization-Inhibiting Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 32, p. 20780-20784, 1994.

BINZ, P. A.; HOCHSTRASSER, D. F.; APPEL, R. D. Mass spectrometry-based proteomics: current status and potential use in clinical chemistry. **Clin Chem Lab Med**, v. 41, n. 12, p. 1540-1551, 2003.

BREWER, S.; WILLIAMS, T. Finally, a sense of closure? Animal models of human ventral body wall defects. **Bioessays**, v. 26, n. 12, p. 1307-1321, 2004.

BRUEY, J. M.; DUCASSE, C.; BONNIAUD, P.; RAVAGNAN, L.; SUSIN, S. A.; DIAZ-LATOUD, C.; GURBUXANI, S.; ARRIGO, A. P.; KROEMER, G.; SOLARY, E.; GARRIDO, C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. **Nat Cell Biol**, v. 2, n. 9, p. 645-652, 2000.

CARLSON, B. M. **EMBRIOLOGIA HUMANA E BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO**: GUANABARA, 1996

CEGLAREK, U.; MULLER, P.; STACH, B.; BUHRDEL, P.; THIERY, J.; KIESS, W. Validation of the phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: sensitive newborn screening for phenylketonuria. **Clin Chem Lab Med**, v. 40, n. 7, p. 693-697, 2002.

CELIS, J. E.; GROMOV, P.; OSTERGAARD, M.; MADSEN, P.; HONORE, B.; DEJGAARD, K.; OLSEN, E.; VORUM, H.; KRISTENSEN, D. B.; GROMOVA, I.; HAUNSO, A.; VAN DAMME, J.; PUYPE, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; RASMUSSEN, H. H. Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. **FEBS Lett**, v. 398, n. 2-3, p. 129-134, 1996.

CHAMBERY, A.; VISSERS, J. P.; 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. **J Proteome Res**, v. 8, n. 2, p. 1047-1058, 2009.

CHEEVER, T. R. **Actin Isoforms in Neuronal Structure and Function**. FACULTY OF THE GRADUATE SCHOOL OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA, UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2011. 157 p.

CHEN, G. A.; GHARIB, T. G.; WANG, H.; HUANG, C. C.; KUICK, R.; THOMAS, D. G.; SHEDDEN, K. A.; MISEK, D. E.; TAYLOR, J. M. G.; GIORDANO, T. J.; KARDIA, S. L. R.; IANNETTONI, M. D.; YEE, J.; HOGG, P. J.; ORRINGER, M. B.; HANASH,

S. M.; BEER, D. G. Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 23, p. 13537-13542, 2003.

CHICHIARELLI, S.; FERRARO, A.; ALTIERI, F.; EUFEMI, M.; COPPARI, S.; GRILLO, C.; ARCANGELI, V.; TURANO, C. The stress protein ERp57/GRP58 binds specific DNA sequences in HeLa cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 210, n. 2, p. 343-351, 2007.

COLUCCI-GUYON, E.; GIMENEZ, Y. R. M.; MAURICE, T.; BABINET, C.; PRIVAT, A. Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin. **Glia**, v. 25, n. 1, p. 33-43, 1999.

COYLE, P.; PHILCOX, J. C.; CAREY, L. C.; ROFE, A. M. Metallothionein: the multipurpose protein. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, n. 4, p. 627-647, 2002.

CRAWFORD, K.; FLICK, R.; CLOSE, L.; SHELLY, D.; PAUL, R.; BOVE, K.; KUMAR, A.; LESSARD, J. Mice lacking skeletal muscle actin show reduced muscle strength and growth deficits and die during the neonatal period. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 16, p. 5887-5896, 2002.

DAVIS, S. R.; COUSINS, R. J. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1085-1088, 2000.

DE PAEPE, B.; CREUS, K. K.; DE BLEECKER, J. L. Chemokines in idiopathic inflammatory myopathies. **Front Biosci**, v. 13, n., p. 2548-2577, 2008.

DE SANTA BARBARA, P.; VAN DEN BRINK, G. R.; ROBERTS, D. J. Development and differentiation of the intestinal epithelium. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 7, p. 1322-1332, 2003.

DRAGHICI, S.; KHATRI, P.; TARCA, A. L.; AMIN, K.; DONE, A.; VOICHITA, C.; GEORGESCU, C.; ROMERO, R. A systems biology approach for pathway level analysis. **Genome Res**, v. 17, n. 10, p. 1537-1545, 2007.

DURANY, N.; JOSEPH, J.; JIMENEZ, O. M.; CLIMENT, F.; FERNANDEZ, P. L.; RIVERA, F.; CARRERAS, J. Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase, creatine kinase and enolase activity and isoenzymes in breast carcinoma. **Br J Cancer**, v. 82, n. 1, p. 20-27, 2000.

ECKES, B.; COLUCCI-GUYON, E.; SMOLA, H.; NODDER, S.; BABINET, C.; KRIEG, T.; MARTIN, P. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. **J Cell Sci**, v. 113 (Pt 13), n., p. 2455-2462, 2000.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Zentralbl Veterinarmed C**, v. 2, n. 1, p. 11-45, 1973.

FERREIRA, C. R.; TURCO, E. G. L.; SARAIVA, S. A.; BERTOLLA, R. P.; PERECIN, F.; SOUZA, G. H. F. M.; MURGU, M.; GARCIA, J. S.; CORTEZZI, S. S.; MEIRELLES, F. V.; KLITZKE, C. F.; CABRAL, E. C.; MIGLINO, M. A.; PORCIUNCULA, P. M.; LEAL, C. L. V.; JUNIOR, E. B.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; D'ALEXANDRI, F.; SMITH, L. C.; EBERLIN, M. N. Proteomics, Metabolomics and Lipidomics in Reproductive Biotechnologies: The MS Solutions. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n., p. s277-s289, 2010.

FLIRI, A. F.; LOGING, W. T.; VOLKMANN, R. A. Cause-effect relationships in medicine: a protein network perspective. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, n. 11, p. 547-555, 2010.

FREEDMAN, R. B.; HIRST, T. R.; TUIE, M. F. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. **Trends Biochem Sci**, v. 19, n. 8, p. 331-336, 1994.

FUKUMURA, D.; GOHONGI, T.; KADAMBI, A.; IZUMI, Y.; ANG, J.; YUN, C. O.; BUERK, D. G.; HUANG, P. L.; JAIN, R. K. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 5, p. 2604-2609, 2001.

GERNOLD, M.; KNAUF, U.; GAESTEL, M.; STAHL, J.; KLOETZEL, P. M. Development and tissue-specific distribution of mouse small heat shock protein hsp25. **Dev Genet**, v. 14, n. 2, p. 103-111, 1993.

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. **Mol Hum Reprod**, v. 4, n. 9, p. 857-862, 1998.

GUMBINER, B. M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 345-357, 1996.

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

HARRIS, M. A.; CLARK, J.; IRELAND, A.; LOMAX, J.; ASHBURNER, M.; FOULGER, R.; EILBECK, K.; LEWIS, S.; MARSHALL, B.; MUNGALL, C.; RICHTER, J.; RUBIN, G. M.; BLAKE, J. A.; BULT, C.; DOLAN, M.; DRABKIN, H.; EPPIG, J. T.; HILL, D. P.; NI, L.; RINGWALD, M.; BALAKRISHNAN, R.; CHERRY, J. M.; CHRISTIE, K. R.; COSTANZO, M. C.; DWIGHT, S. S.; ENGEL, S.; FISK, D. G.; HIRSCHMAN, J. E.; HONG, E. L.; NASH, R. S.; SETHURAMAN, A.; THEESFELD, C. L.; BOTSTEIN, D.; DOLINSKI, K.; FEIERBACH, B.; BERARDINI, T.; MUNDODI, S.; RHEE, S. Y.; APWEILER, R.; BARRELL, D.; CAMON, E.; DIMMER, E.; LEE, V.; CHISHOLM, R.; GAUDET, P.; KIBBE, W.; KISHORE, R.; SCHWARZ, E. M.; STERNBERG, P.; GWINN, M.; HANNICK, L.; WORTMAN, J.; BERRIMAN, M.; WOOD, V.; DE LA CRUZ, N.; TONELLATO, P.; JAISWAL, P.; SEIGFRIED, T.; WHITE, R. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Database issue, p. D258-261, 2004.

HISHIKAWA, Y.; KOJI, T.; DHAR, D. K.; KINUGASA, S.; YAMAGUCHI, M.; NAGASUE, N. Metallothionein expression correlates with metastatic and proliferative potential in squamous cell carcinoma of the oesophagus. **Br J Cancer**, v. 81, n. 4, p. 712-720, 1999.

HUOT, J.; HOULE, F.; SPITZ, D. R.; LANDRY, J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. **Cancer Res**, v. 56, n. 2, p. 273-279, 1996.

HYAMS, J. S.; LLOYD, C. W. **Microtubules**. New York: Wiley-Liss, 1993

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M.; BETTERIDGE, K. **Essentials of domestic animal embryology**: Saunders/Elsevier, 2009

IOANNIDES, A. S.; HENDERSON, D. J.; SPITZ, L.; COPP, A. J. Role of Sonic hedgehog in the development of the trachea and oesophagus. **J Pediatr Surg**, v. 38, n. 1, p. 29-36; discussion 29-36, 2003.

IVASKA, J.; PALLARI, H. M.; NEVO, J.; ERIKSSON, J. E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 10, p. 2050-2062, 2007.

JACKSON, B. W.; GRUND, C.; SCHMID, E.; BURKI, K.; FRANKE, W. W.; ILLMENSEE, K. Formation of Cytoskeletal Elements during Mouse Embryogenesis - Intermediate Filaments of the Cytokeratin Type and Desmosomes in Pre-Implantation Embryos. **Differentiation**, v. 17, n. 3, p. 161-179, 1980.

KAGI, J. H.; SCHAFFER, A. Biochemistry of metallothionein. **Biochemistry**, v. 27, n. 23, p. 8509-8515, 1988.

KAGI, J. H. Overview of metallothionein. **Methods Enzymol**, v. 205, n., p. 613-626, 1991.

KANEHISA, M. The KEGG database. **Novartis Found Symp**, v. 247, n., p. 91-101; discussion 101-103, 119-128, 244-152, 2002.

KEDINGER, M.; SIMON-ASSMANN, P.; LACROIX, B. [Development of the digestive function: regulation of the maturation of intestinal brush border enzymes]. **Reprod Nutr Dev**, v. 26, n. 2B, p. 691-702, 1986.

KLAASSEN, C. D.; LIU, J.; CHOUDHURI, S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 39, n., p. 267-294, 1999.

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 Clin Appl**, v. 1, n. 11, p. 1446-1461, 2007.

KUMAR, A.; CRAWFORD, K.; CLOSE, L.; MADISON, M.; LORENZ, J.; DOETSCHMAN, T.; PAWLOWSKI, S.; DUFFY, J.; NEUMANN, J.; ROBBINS, J.; BOIVIN, G. P.; O'TOOLE, B. A.; LESSARD, J. L. Rescue of cardiac alpha-actin-deficient mice by enteric smooth muscle gamma-actin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 9, p. 4406-4411, 1997.

LARKIN, S. E.; ZEIDAN, B.; TAYLOR, M. G.; BICKERS, B.; AL-RUWAILI, J.; AUKIM-HASTIE, C.; TOWNSEND, P. A. Proteomics in prostate cancer biomarker discovery. **Expert Rev Proteomics**, v. 7, n. 1, p. 93-102, 2010.

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.

LAZARIDES, E. Intermediate Filaments as Mechanical Integrators of Cellular Space. **Nature**, v. 283, n. 5744, p. 249-256, 1980.

LESLIE, K. O.; MITCHELL, J. J.; WOODCOCK-MITCHELL, J. L.; LOW, R. B. Alpha smooth muscle actin expression in developing and adult human lung. **Differentiation**, v. 44, n. 2, p. 143-149, 1990.

LI, G. Z.; VISSERS, J. P.; 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.

MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N. I.; VAJTA, G.; LEWIS, I.; ROGERS, P.; CANN, L.; CALLESEN, H.; TVEDEN-NYBORG, P.; TROUNSON, A. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. **Reproduction**, v. 125, n. 4, p. 607-623, 2003.

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)**. Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São paulo, 2007. 115 p.

MATSUMOTO, F. S. **Caracterização das proteínas do saco vitelínico de embriões bovinos Bos indicus**. Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. 91 p.

MATSUMOTO, T.; CLAESSEON-WELSH, L. VEGF receptor signal transduction. **Sci STKE**, v. 2001, n. 112, p. re21, 2001.

MCHUGH, K. M.; LESSARD, J. L. The development expression of the rat alpha-vascular and gamma-enteric smooth muscle isoactins: isolation and characterization of a rat gamma-enteric actin cDNA. **Mol Cell Biol**, v. 8, n. 12, p. 5224-5231, 1988.

MCHUGH, K. M.; CRAWFORD, K.; LESSARD, J. L. A comprehensive analysis of the developmental and tissue-specific expression of the isoactin multigene family in the rat. **Developmental Biology**, v. 148, n. 2, p. 442-458, 1991.

MCINTIRE, K. R.; WALDMANN, T. A.; MOERTEL, C. G.; GO, V. L. Serum alpha-fetoprotein in patients with neoplasms of the gastrointestinal tract. **Cancer Res**, v. 35, n. 4, p. 991-996, 1975.

MOLL, R.; FRANKE, W. W.; SCHILLER, D. L.; GEIGER, B.; KREPLER, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. **Cell**, v. 31, n. 1, p. 11-24, 1982.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clinica**: Elsevier - Health Sciences Division, 2004

NAKAGAWA, T.; SAWADA, N.; YAMAGUCHI, M. Overexpression of regucalcin suppresses cell proliferation of cloned normal rat kidney proximal tubular epithelial NRK52E cells. **Int J Mol Med**, v. 16, n. 4, p. 637-643, 2005.

NARAYANAN, N. K.; NARAYANAN, B. A.; NIXON, D. W. Resveratrol-induced cell growth inhibition and apoptosis is associated with modulation of phosphoglycerate mutase B in human prostate cancer cells: two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry evaluation. **Cancer Detection and Prevention**, v. 28, n. 6, p. 443-452, 2004.

NATH, A. K.; KRAUTHAMMER, M.; LI, P.; DAVIDOV, E.; BUTLER, L. C.; COPEL, J.; KATAJAMAA, M.; ORESIC, M.; BUHIMSCHI, I.; BUHIMSCHI, C.; SNYDER, M.; MADRI, J. A. Proteomic-based detection of a protein cluster dysregulated during cardiovascular development identifies biomarkers of congenital heart defects. **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. e4221, 2009.

NISHIMURA, N.; NISHIMURA, H.; TOHYAMA, C. Localization of metallothionein in female reproductive organs of rat and guinea pig. **J Histochem Cytochem**, v. 37, n. 11, p. 1601-1607, 1989.

NORDBERG, M.; NORDBERG, G. F. Toxicological aspects of metallothionein. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 46, n. 2, p. 451-463, 2000.

OMENN, G. S.; CHEUNG, S. C. Y. Phosphoglycerate Mutase Isoenzyme Marker for Tissue Differentiation in Man. **American Journal of Human Genetics**, v. 26, n. 3, p. 393-399, 1974.

PARR, B. A.; MCMAHON, A. P. Wnt genes and vertebrate development. **Curr Opin Genet Dev**, v. 4, n. 4, p. 523-528, 1994.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS GIBSON, T.; XU, B. E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M. H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocr Rev**, v. 22, n. 2, p. 153-183, 2001.

PEDERSEN, M. O.; LARSEN, A.; STOLTENBERG, M.; PENKOWA, M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. **Prog Histochem Cytochem**, v. 44, n. 1, p. 29-64, 2009.

PERRIN, B. J.; ERVASTI, J. M. The actin gene family: function follows isoform. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 67, n. 10, p. 630-634, 2010.

QUACKENBUSH, J. Extracting biology from high-dimensional biological data. **J Exp Biol**, v. 210, n. Pt 9, p. 1507-1517, 2007.

QUAIFE, C. J.; FINDLEY, S. D.; ERICKSON, J. C.; FROELICK, G. J.; KELLY, E. J.; ZAMBROWICZ, B. P.; PALMITER, R. D. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. **Biochemistry**, v. 33, n. 23, p. 7250-7259, 1994.

RAMALHO-SANTOS, M.; MELTON, D. A.; MCMAHON, A. P. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. **Development**, v. 127, n. 12, p. 2763-2772, 2000.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, n. 6626, p. 671-674, 1997.

ROBERTS, D. J.; JOHNSON, R. L.; BURKE, A. C.; NELSON, C. E.; MORGAN, B. A.; TABIN, C. Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. **Development**, v. 121, n. 10, p. 3163-3174, 1995.

ROBERTS, D. J.; SMITH, D. M.; GOFF, D. J.; TABIN, C. J. Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. **Development**, v. 125, n. 15, p. 2791-2801, 1998.

ROESIJADI, G. Metallothioneins in Metal Regulation and Toxicity in Aquatic Animals. **Aquatic Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 81-114, 1992.

ROSTENE, W.; KITABGI, P.; PARSADANIAN, S. M. Chemokines: a new class of neuromodulator? **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 11, p. 895-903, 2007.

SADLER, T. W. **EMBRIOLOGIA MEDICA - LANGMAN**: GUANABARA, 2001

SADLER, T. W. **Langman embriologia médica**. : secondary title. Rio de Janeiro, 2005, 347 p.

SALAMONSEN, L. A.; HANNAN, N. J.; DIMITRIADIS, E. Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. **Semin Reprod Med**, v. 25, n. 6, p. 437-444, 2007.

SATO, M.; KONDOH, M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. **Tohoku J Exp Med**, v. 196, n. 1, p. 9-22, 2002.

SCHILDMEYER, L. A.; BRAUN, R.; TAFFET, G.; DEBIASI, M.; BURNS, A. E.; BRADLEY, A.; SCHWARTZ, R. J. Impaired vascular contractility and blood pressure homeostasis in the smooth muscle alpha-actin null mouse. **Faseb Journal**, v. 14, n. 14, p. 2213-2220, 2000.

SCHMIDT, A.; AEBERSOLD, R. High-accuracy proteome maps of human body fluids. **Genome Biol**, v. 7, n. 11, p. 242, 2006.

SEIDLER, J.; ZINN, N.; BOEHM, M. E.; LEHMANN, W. D. De novo sequencing of peptides by MS/MS. **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 634-649, 2010.

SILVA, J. C.; DENNY, R.; DORSCHER, 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. **Anal Chem**, v. 77, n. 7, p. 2187-2200, 2005.

SOHL, G.; MAXEINER, S.; WILLECKE, K. Expression and functions of neuronal gap junctions. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 3, p. 191-200, 2005.

SPEAR, B. T. Alpha-fetoprotein gene regulation: lessons from transgenic mice. **Semin Cancer Biol**, v. 9, n. 2, p. 109-116, 1999.

STAINS, J. P.; CIVITELLI, R. Gap junctions in skeletal development and function. **Biochim Biophys Acta**, v. 1719, n. 1-2, p. 69-81, 2005.

THEOCHARIS, S. E.; MARGELI, A. P.; KLIJANIENKO, J. T.; KOURAKLIS, G. P. Metallothionein expression in human neoplasia. **Histopathology**, v. 45, n. 2, p. 103-118, 2004.

TONDELEIR, D.; VANDAMME, D.; VANDEKERCKHOVE, J.; AMPE, C.; LAMBRECHTS, A. Actin isoform expression patterns during mammalian development and in pathology: insights from mouse models. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 66, n. 10, p. 798-815, 2009.

TORRES-PADILLA, M. E. Cell identity in the preimplantation mammalian embryo: an epigenetic perspective from the mouse. **Hum Reprod**, v. 23, n. 6, p. 1246-1252, 2008.

TSURUSAKI, Y.; YAMAGUCHI, M. Overexpression of regucalcin modulates tumor-related gene expression in cloned rat hepatoma H4-II-E cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 90, n. 3, p. 619-626, 2003.

VASAK, M.; HASLER, D. W. Metallothioneins: new functional and structural insights. **Curr Opin Chem Biol**, v. 4, n. 2, p. 177-183, 2000.

WAROT, X.; FROMENTAL-RAMAIN, C.; FRAULOB, V.; CHAMBON, P.; DOLLE, P. Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. **Development**, v. 124, n. 23, p. 4781-4791, 1997.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R., 3RD. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nat Biotechnol**, v. 19, n. 3, p. 242-247, 2001.

WATSON, A. J.; NATALE, D. R.; BARCROFT, L. C. Molecular regulation of blastocyst formation. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, n., p. 583-592, 2004.

WEINSTEIN, D. C. Teaching resources. Mesodermal differentiation: signal integration during development. **Sci STKE**, v. 2005, n. 299, p. tr23, 2005.

WELLS, J. M.; MELTON, D. A. Vertebrate endoderm development. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, n., p. 393-410, 1999.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Expression Proteomics. In: (Ed.). **Proteomics in Practice**: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002, p.11-160.

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 amino acid analysis. **Biotechnology (N Y)**, v. 14, n. 1, p. 61-65, 1996.

WILMUT, I.; SALES, D. I.; ASHWORTH, C. J. Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. **J Reprod Fertil**, v. 76, n. 2, p. 851-864, 1986.

WODARZ, A.; NUSSE, R. Mechanisms of Wnt signaling in development. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 14, n., p. 59-88, 1998.

WUHRER, M.; KOELEMAN, C. A.; DEELDER, A. M. Two-dimensional HPLC separation with reverse-phase-nano-LC-MS/MS for the characterization of glycan pools after labeling with 2-aminobenzamide. **Methods Mol Biol**, v. 534, n., p. 79-91, 2009.

YAMAGUCHI, M. The role of regucalcin in nuclear regulation of regenerating liver. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 276, n. 1, p. 1-6, 2000.

YAMAGUCHI, M. Role of regucalcin in maintaining cell homeostasis and function (review). **Int J Mol Med**, v. 15, n. 3, p. 371-389, 2005.

YASUGI, S. Role of Epithelial-Mesenchymal Interactions in Differentiation of Epithelium of Vertebrate Digestive Organs. **Development Growth & Differentiation**, v. 35, n. 1, p. 1-9, 1993.

ZABEL, B. A.; ZUNIGA, L.; OHYAMA, T.; ALLEN, S. J.; CICHY, J.; HANDEL, T. M.; BUTCHER, E. C. Chemoattractants, extracellular proteases, and the integrated host defense response. **Experimental Hematology**, v. 34, n. 8, p. 1021-1032, 2006.

ANEXO A

(*Pathway Express* das 10 vias significativamente representadas)

Figura 8 -Via de ativação“junções GAP”, com fator de impacto de 28.68, sendo representada pelas isoformas de Tubulina

Figura 9 – Via de ativação “infecção por *Vibrio cholerae*”, com fator de impacto de 22.77, sendo representada pela isoforma de Actina

Figura 10 - Via de ativação “Junções aderentes”, com fator de impacto de 5.46, sendo representada pela isoforma de Actina

Figura 11 - Via de ativação “Contração do músculo cardíaco”, com fator de impacto de 5.24, sendo representada pela isoforma de Actina

Figura 13 - Via de ativação “Junções tipo Tight”, com fator de impacto de 4,40, sendo representada pela isoforma de Actina

Figura 16 - Via de ativação “Via de sinalização do VEGF”, com fator de impacto de 2.42, sendo representada pela proteína de choque térmico HSP27

Figura 17 - Via de ativação “Processamento e apresentação de antígeno”, com fator de impacto de 2.25, sendo representada pela Proteína dissulfeto isomerase família A (PDIA3 ou BRp57)