

# CONTRIBUIÇÃO E PERSPECTIVAS DO IMPACTO DA PROTEÔMICA EM ESTUDO DE PLACENTAS E MEMBRANAS EMBRIONÁRIAS E FETAIS

CONTRIBUTION AND PERSPECTIVES OF THE IMPACT OF PROTEOMICS IN STUDY OF PLACENTAS AND EMBRYONIC AND FETAL MEMBRANES

A. C. F. MANÇANARES<sup>1\*</sup>, E. ZIMBERKNOPF<sup>2</sup>, C. R. FERREIRA<sup>3</sup>, M. A. MIGLINO<sup>1</sup>

## REVISÃO

### RESUMO

Abordagens proteômicas revolucionaram a análise de amostras biológicas por permitir a identificação de padrões ainda não caracterizados de expressão de proteínas e/ou suas interações e modificações pós-traducionais em diferentes tecidos, como a placenta ou em embriões e fetos em diferentes estágios de desenvolvimento. Esta nova fronteira de conhecimento se constitui atualmente numa ferramenta fundamental para a elucidação de problemas biológicos, por fornecer informações que não podem ser obtidas por métodos mais focalizados, ou com alvos específicos. Essa revisão salienta as novas perspectivas geradas pela contribuição da proteômica baseada na eletroforese bidimensional (2D-PAGE) associada à espectrometria de massas (MS) para o estudo da placenta, das membranas embrionárias e do embrião, com ênfase nas comparações entre condições normais e aqueles provenientes de estados patológicos ou conseqüentes ao uso de biotecnologias reprodutivas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Análise de proteínas. Espectrometria de massas. Bioinformática. Eletroforese bidimensional.

### SUMMARY

Proteomic approaches on the analysis of biological samples led to outstanding research allowing the identification of non-characterized protein expression and its role on protein interactions and post-translational modifications during embryonic development or as a consequence of pathological states. This new frontier of knowledge is, nowadays, an essential contribution to the elucidation of biological problems, by providing information that can not be obtained by other target driven methods. This review highlights the new perspectives of proteomics studies based on bidimensional electrophoresis (2D-PAGE) associated to mass spectrometry (MS) analytical methods on placenta, embryonic membranes and embryo evaluation, with emphasis on comparisons between normal and diseased tissues consequent to reproductive biotechnologies manipulation.

**KEYWORDS:** Protein analysis. Mass spectrometry. Bioinformatics. Bidimensional electrophoresis.

## INTRODUÇÃO

Enquanto o genoma representa a soma de todos os genes de um indivíduo, o proteoma, ao contrário, não é uma característica fixa de um organismo. O proteoma é a expressão protéica do genoma de um determinado organismo ou tecido, modificando-se de acordo com o estado de desenvolvimento do tecido ou ainda de acordo com as condições ambientais nas quais o indivíduo se encontra. Assim, fenômenos como *splicing* alternativo de RNA e modificações protéicas pós-traducionais levam a existência de mais proteínas no proteoma do que genes no genoma, especialmente para eucariotos (DI CIERO & BELLATO; 2003).

O termo proteoma foi proposto por WILKINS & WILLIAMS (1994) para descrever o estudo do conteúdo de proteínas expressas por um genoma ou, no caso de organismos multicelulares, ao complemento protéico expresso por um tecido ou por células diferenciadas (WILKINS et al., 1996). Após a euforia provocada pelo sequenciamento dos genomas de vários organismos, a comunidade científica percebeu que, para se compreender a função gênica em toda sua plenitude, era necessário o estudo em larga escala das proteínas por ele expressas. Constatou-se que, embora importante, a análise das sequências de nucleotídeos nem sempre refletem uma relação direta com sua expressão protéica e, conseqüentemente, de atividade biológica (GYGI et al., 1999).

Dessa forma, o estudo do proteoma permite a identificação, caracterização funcional e a interação entre proteínas essenciais para a célula. Posteriormente esse tipo de estudo foi estendido a outras biomoléculas. Esses esforços deram origem às abordagens denominadas “ômicas” como a transcriptômica, lipidômica e metabolômica, respectivamente, o estudo das proteínas transcritas, ácidos graxos, vias metabólicas, e assim por diante. Atualmente, os subconjuntos de metabolômica estão evoluindo como a lipidômica, glicômica e fluxômica, com o objetivo final de integrar o quadro das “ômicas” por meio do interactoma de genes transcritos, proteínas e metabólitos representantes da complexidade da função celular (DENNIS, 2009).

O objetivo inicial de um estudo proteômico é a identificação em larga escala de todas as proteínas presentes em uma célula ou tecido. 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 protéica global (WESTERMEIER & NAVEN, 2002).

Nesse contexto se insere o estudo do proteoma de embriões e anexos embrionários, utilização de métodos analíticos como os géis de eletroforese bidimensional (2D) a espectrometria de massas (MS), a complexidade do embrião e aspectos desconhecidos do processo de embriogênese começam a ser revelados. O interesse por esses estudos deve-se a diversos aspectos. Em

ruminantes, cerca de 40% da morte embrionária precoce ocorre no período pré-implantação, ou seja, entre 8 e 17 dias de gestação (HUMBLLOT, 2001; THATCHER et al., 2001), período no qual o estabelecimento da comunicação materno-fetal com a participação do *interferon tau* é essencial (BAZER et al., 1997). Assim, o proteoma nessa fase gestacional, a análise das modificações protéicas pós-traducionais, interações proteína-proteína, existência de isoformas, atividade e estrutura das proteínas presentes nos tecidos embrionários e nas membranas embrionárias e fetais, contribuirão para a compreensão da relação materno-fetal, e, certamente para o aprimoramento de biotecnologias tais como a inseminação artificial, a transferência de embriões, a fertilização *in vitro* e a clonagem. Nesse sentido, as aplicações da proteômica deverão rapidamente impactar métodos de avaliação da fertilidade e de diagnóstico de infertilidade nos animais e humanos, assim como, podem levar à otimização de protocolos reprodutivos relacionados à cultura de embriões e oócitos, seleção de oócitos para fertilização *in vitro* e de embriões para transferência com a utilização de biomarcadores para o diagnóstico de infertilidade (FERREIRA et al., 2010).

No estudo da placenta e membranas embrionárias, essa abordagem vem revelando a complexidade das estruturas responsáveis pela manutenção e desenvolvimento do embrião, desde a fase pré-implantacional até o final da gestação. A formação da placenta, a qual interliga o feto em desenvolvimento ao corpo da mãe, é uma característica essencial da gestação em mamíferos. O desenvolvimento da placenta e sua função são precisamente regulados e coordenados para promover a troca de nutrientes e produtos residuais entre o sistema circulatório materno e fetal (WOODING et al., 1994). No final da gestação, a placenta passa por mudanças rápidas em preparação para o parto, dentre essas a maturação placentária é tida como um pré-requisito para o descolamento parcial e sub-liberação da membrana fetal (WILLIAMS et al., 1987; STALLMACH et al., 2001). Portanto, a placenta desempenha um papel importante na patogênese de algumas doenças congênitas, promove a transmissão transplacentária teratogênica de agentes microbianos, e contribui para a falha na gestação de bezerros clonados (HILL et al., 1999). Assim, as proteínas controlam a maioria dos processos celulares, as quais ocorrem em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (AEBERSOLD & MANN, 2003), certamente envolvidas no entendimento da patogênese de diversos processos como os citados anteriormente. Além disso, a compreensão do envolvimento das proteínas na organogênese e diferenciação celular deverão ter aplicação no campo da terapia celular, com a identificação de proteínas e fatores de transcrição envolvidos nesse contexto, os quais podem também, potencialmente, ser utilizados como biomarcadores de tal processo (POTTEN et al., 1997).

## PROTEOMA DO EMBRIÃO

Ao contrário do que ocorre com o genoma relativamente estático e idêntico nas células somáticas de um organismo, o proteoma em embriões encontra-se em estado dinâmico, respondendo a estímulos externos e internos (GODOVAC-ZIMMERMANN & BROWN, 2003). A grande diversidade de proteínas controla os processos celulares, em forma de enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais, fatores de transcrição e receptores celulares (D'SOUZA et al., 2000; AEBERSOLD & MANN, 2003). Assim, o estudo do proteoma nessas amostras biológicas de origem embrionária permitiriam apreciar o efeito da regulação da expressão gênica que ocorre pós-transcrição e pós-tradução, fornecendo numerosos esclarecimentos quanto à sua função biológica e envolvimento nos processos metabólicos intracelulares envolvidos na diferenciação tecidual (HOOGLAND et al., 1999; FEY; LARSEN, 2001; ISFORT, 2002; WOLF et al., 2003; CHAZE et al., 2008; SUTOVSKY, 2009), as quais de maneira freqüente não poderiam ser detectadas em análises quantitativas de RNAm (GYGI et al., 1999). Espera-se assim, com uso de ferramentas proteômicas, proporcionar a caracterização abrangente de biomarcadores indicativos do estado de desenvolvimento embrionário e relacionados à sanidade do ambiente materno-fetal (WOLF et al., 2003; RIDING et al. 2008 a; DEGRELLE et al., 2009; BELLIDO et al., 2010), às patologias congênitas (NATH et al., 2009), à embriotoxicidade (USAMI et al., 2008) e à viabilidade embrionária (KATZ-JAFFE et al., 2009; ROYÉRE et al., 2009, DEGRELLE et al., 2009).

## PROTEÔMICA

Nesse artigo vamos nos restringir à descrição da estratégia proteômica por meio da utilização da eletroforese bidimensional em gel de poli(acrilamida) (2D-PAGE) combinada à espectrometria de massas (MS) com fonte de ionização por electrospray (ESI) ou ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) (HAGER, 2004). As técnicas de ESI e MALDI são consideradas formas brandas de ionização de moléculas biológicas de alto peso molecular. O termo "ionização branda" significa que os íons formados possuem baixa energia interna, o que permite a observação de espécies iônicas moleculares com pouca ou nenhuma fragmentação. Após a ionização, as moléculas carregadas devem ser separadas por seus valores de massa-carga ( $m/z$ ) em um ou mais analisadores de massas, como os do tipo tempo-de-vôo (TOF) ou quadrupolo (ROCHA et al., 2005).

Na ionização do tipo MALDI, resumidamente, a solução contendo a amostra é misturada a uma solução super-saturada de matriz orgânica, colocada sobre uma placa metálica e bombardeada por um feixe de laser de alta potência com comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção de matriz, resultando em íons em fase gasosa que seguirão para o analisador de massas (KNOCHENMUSS & ZENOBI, 2003). Após dessorvidos da matriz, os íons são

acelerados sob alto vácuo por meio da aplicação de um potencial diferencial (entre 15-30 kV). Se o analisador foi do tipo TOF, o tempo necessário para atingir o detector é proporcional a tensão aplicada e a relação aplicada  $m/z$  dos íons (PIELES et al., 1993; DATTA & PIHUR, 2010).

Na ionização por ESI, a solução contendo os analitos atravessa um capilar metálico, no qual é aplicada alta voltagem. Forma-se então um spray contendo gotículas contendo alta densidade de cargas (positivas ou negativas), as quais são evaporadas com auxílio de fluxo de nitrogênio aquecido. Com a evaporação do solvente contido nas gotículas, a alta densidade de cargas culmina num evento de explosão coulômbica, causando a "ejeção" dos íons para a fase gasosa (GROSS, 2004).

A eletroforese 2D-PAGE é uma ferramenta bastante tradicional em estudos proteômicos, com o objetivo de isolar as proteínas em *spots* de acordo com seu ponto isoelétrico e peso molecular, para dessa forma, identificá-las para posteriormente relacioná-las a sua atividade biológica (O'FARRELL, 1975; ROCHA et al. 2005; GORG et al., 2004). A 2D-PAGE tem um grande poder de resolução quando se trata de proteínas intactas e tem sido também utilizada para diferenciar isoformas e estados modificados das proteínas (MOTOYAMA, 2008).

Como método de separação de proteínas que antecede a MS com fonte de ESI, geralmente utiliza-se a cromatografia líquida (THIEDE et al., 2005). Dessa maneira, após a separação das proteínas por meio da eletroforese 2D-PAGE, os *spots* presentes no gel são recortados, purificados e submetidos à digestão triptica para obtenção dos peptídeos e sua posterior análise por MS, permitindo a identificação e quantificação das proteínas de maneira ainda mais acurada (PANDEY & MANN, 2000; GYGI et al., 1999; TYERS & MANN, 2003; DEGRELLE et al., 2009). Além de HPLC, novas estratégias visando separação mais rápida e eficiente têm surgido, principalmente em consequência a necessidade de análise de amostras complexas, onde uma mistura de muitas proteínas pode ser encontrada (THIEDE et al., 2005, MOTOYAMA, 2008). Uma das técnicas de separação cromatográfica mais rápida e eficiente é a cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC), por permitira eficiente separação de pequenos fragmentos protéicos para posterior análise por MS (WASHBURN et al., 2001; PENG et al., 2003). Por UPLC ESI-MS uma mistura complexa de peptídeos é carregada diretamente numa coluna bifásica microcapilar com uma matriz de troca catiônica forte e outra de fase reversa em sequência. A coluna bifásica microcapilar é colocada diretamente em linha com o espectrômetro de massas, caracterizando a fragmentação em peptídeos em *tandem* MS (HERNÁNDEZ, 2009). Esse tipo de estudo proteômico é denominado de proteômica *shotgun* (MOTOYAMA, 2008).

Por vezes, a detecção de espectros de massas é feita mais de uma vez, sendo então denominados UPLC MS/MS, MALDI-TOF MS/MS, ou por vezes, quando as detecções são feitas  $n$  repetidas vezes, utiliza-se a denominação  $MS^n$ . O objetivo nesse caso é aumentar

ainda mais a acurácia do método, principalmente em amostras complexas e em pequenas quantidades

## ESTUDOS ENVOLVENDO PROTEÔMICA EM PLACENTAS E MEMBRANAS EMBRIONÁRIAS E FETAIS

A análise proteômica de placenta, anexos embrionários e do próprio trato reprodutivo tem sido utilizada com diferentes objetivos. Vários são os exemplos que podemos encontrar na literatura.

Em bovinos, a análise das proteínas contidas no líquido amniótico pode ser importante para a avaliação do ambiente materno-fetal e do estado de desenvolvimento do feto provenientes de monta natural ou de protocolos de fertilização *in vitro* (FIV) e transferência nuclear. Foi observado o aumento dos níveis de proteína antimicrobiana catelicidina bovina (CAMP) identificada e quantificada por 2D-PAGE associada a *mass fingerprinting* MALDI-TOF MS em amostras de fetos produzidos por FIV. Esse fato poderia estar relacionado a alterações da função placentária ou do desenvolvimento fetal (RIDING et al., 2008).

A abordagem proteômica foi utilizada para examinar as diferenças na expressão proteica em amostras de placenta humana de fetos gerados por procedimentos de tecnologia de reprodução assistida (ART- *assisted reproductive technologies*) comparando-os a fertilização normal. No total, 20 proteínas foram identificadas por MALDI-TOF MS, incluindo proteínas envolvidas no transporte da membrana, metabolismo de ácidos nucleicos, resposta ao estresse e do citoesqueleto. No grupo, ART foram identificadas anexina 3, *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNP) C1/C2, *nucleosome assembly protein1* (SNAP 1), *ferritin light polypeptide-like* (FTL) e *ATP synthase alpha-subunit gene* (ATP5A) e relacionadas a alterações nas funções placentárias nesse grupo (ZHANG et al., 2008).

Em outro estudo, identificou-se o aumento de 12 proteínas em vilosidades placentárias humanas com perda precoce de gestação (*early pregnancy loss* - EPL). Essas proteínas parecem ser relacionadas com os processos envolvidos na rede de sinalização e regulação da atividade celular, tais como defesa da célula contra espécies reativas a oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS), diferenciação, proliferação, metabolismo, transcrição, apoptose e proteólise. Anomalias significativas na estrutura tridimensional de algumas dessas proteínas foram observadas (LIU et al., 2006).

Alguns resultados sugerem que a má formação da placenta de suínos clonados possa ser causada por apoptose de células de placenta. Uma expressão diferencial de 43 proteínas foi encontrada, muitas delas relacionadas a apoptose, revelando a importância do estudo proteômico para a compreensão da fisiopatologia dessa condição (LEE et al., 2007).

Em outro estudo, a neurocinina B (NKB) estava aumentada na placenta em situações de pré-eclâmpsia. A NKB elevada foi capaz de reduzir por sua vez a expressão de 20 proteínas em culturas de

citotrofoblastos. Quatro dessas proteínas foram envolvidas em vias de defesa antioxidantes, enquanto duas possuem função de inibição da coagulação intravascular, levando a conclusão que a NKB pode contribuir para a patogênese da pré-eclâmpsia (SAWICKI et al., 2003).

Amostras de placentas humanas normais e pacientes com pré-eclâmpsia foram estudadas com o auxílio 2D-PAGE e 2D-*immunoblotting*. A partir dessa análise, a dinactina p-50, proteína relacionada ao *turn over* celular foi identificada e relacionada a pré-eclâmpsia e a níveis de severidade da doença (MINE et al., 2007).

A aplicação prática da clonagem animal por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) tem apresentado uma baixa taxa de sucesso. Foi utilizada uma abordagem proteômica utilizando 2D-PAGE e MS para se avaliar uma possível disfunção placentária em TNCS. Foram utilizadas placenta originadas de TNCS com morte pós-natal do feto comparando-se a placentas normais originadas de inseminação artificial. Na comparação, 33 *spots* de proteínas estavam diferencialmente expressas nas placenta TNCS. A proteína TIMP-2 (Metalloproteínase inibitor 2) foi encontrada em maior quantidade em placentas derivadas de TNCS, proteína esta que está relacionada à matriz extracelular e remodelação tecidual durante a prenhez. Os resultados revelaram perfis proteômicos modificados nas placentas TNCS, o que resultaria em perdas fetais (KIM et al., 2005).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A construção de um banco de dados de proteômica para a placenta em seus diversos estágios do desenvolvimento fetal, assim como a caracterização do proteoma do embrião no início da gestação serão fundamentais para compreender as diferenças morfofisiológicas entre placentas normais e aquelas presentes em conceitos gerados por outras técnicas de biotecnologia, o que resultará no aprimoramento dessas últimas. Embora a análise proteômica seja de alta complexidade em células e tecidos eucarióticos, essa abordagem tem se disseminado e contribuído para a compreensão do papel das proteínas em particular na placenta e no embrião. As abordagens “ômicas” pode se relacionar, espelhando a complexidade celular e levando a elucidação de redes complexas de integração de vias metabólicas e o interactoma de genes transcritos, proteínas e metabólitos, que fazem parte da função celular.

## REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, v.402, p.198-207, 2003.
- BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; OTT, T. L. Interferon-tau; a novel pregnancy recognition signal. *American Society for Reproductive Immunology*, v.37, p.137-143, 1997.

- BELLIDO, M. L.; RADPOUR, R.; LAPAIRE, O.; DE BIE, I.; HÖSLI, I.; BITZER, J. MALDI-TOF Mass Array Analysis of RASSF1 and SERPINB5 Methylation Patterns in Human Placenta and Plasma. **Biology of Reproduction Papers in Press**. Published on January 14, 2010.
- 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. **Journal of Proteome Research**, v.8, p.1047–1058. 2009.
- CHAZE, T.; MEUNIER, B.; CHAMBON, C.; JURIE, C.; PICARD, B. In vivo proteome dynamics during early bovine myogenesis. **Proteomics**. v.8, n.20, p.4236-4248, 2008.
- DATTA, S.; PIHUR, V. Feature selection and machine learning with mass spectrometry data. **Methods in Molecular Biology**, v.593, p.205-229, 2010.
- DE SOUZA, M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. O análise de Proteomas: O despertar da área pós-genômica. **Revista on-line Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. p.12-14, 2003.
- DEGRELE, S. A.; BLOMBERG, L. A.; GARRETT, W. M.; LI, R. W.; TALBOT, N. C. Comparative proteomic and regulatory network analysis of the elongating pig conceptus. **Proteomics**, v.9, p.2678-2694, 2009.
- DENNIS, E. A. Lipidomics joins the omics evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**. v.106, n.7, p.2089-2090, 2009.
- DI CIERO, L.; BELLATO, C. M. PROTEOMA: Avanços Recentes em Técnicas de Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massa. **Revista on line - Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n.29, p.158-164. 2003.
- D'SOUZA, A. L.; MASUDA, K.; OTTEN, L. M.; NISHIDA, Y.; KNUDSON, W.; THONAR, E. J. Differential effects of interleukin-1 on hyaluronan and proteoglycan metabolism in two compartments of the matrix formed by articular chondrocytes maintained in alginate. **Arch Biochem Biophys**. v.374, n.1, p.59-65, 2000.
- FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v.246, n.4926, p.64-71, 1989.
- FERREIRA, C. R.; TURCO, E. G. L.; SARAIVA, S. A.; BERTOLLA, R. P.; PERECIN, F.; SOUZA, G. H. M. F.; 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.; BORGES JR, E.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; D'ALEXANDRI, F.; SMITH, C. S.; EBERLIN, M. N. Proteomics, metabolomics and lipidomics in reproductive biotechnologies: the MS solutions. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.38, (Supl 2), p.s277-s289, 2010.
- FEY, S. J.; LARSEN, P. M. 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis. **Curr. Opin. Chemistry & Biology**, v.5, n.1, p.26-33, 2001.
- GODOVAC-ZIMMERMAN, J. AND BROWN, L.R. Proteomics Approaches to Elucidation of Cellular Signalling. **Curr. Opin. Molecular Therapy**, v.5, p.241-249. 2003.
- GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v.4, p.3665-3685, 2004.
- GYGI, S. P.; RIST, B.; GERBER, S. A.; TURECEK, F.; GELB, M. H.; AEBERSOLD, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nature**, v.17, p.994-999, 1999.
- GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 518p. 2004.
- HAGER, J. W. Recent trends in mass spectrometer development. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.378, n.4, p.845-850, 2004.
- HERNÁNDEZ, L.G. **Análise proteômica aplicada à ontogenia, comportamento e aprendizagem em abelhas**. 2009. 81p. Tese de doutorado em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 2009.
- HILL, J. R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**. Jun; v.51, n.8, p.1451–1465. 1999.
- HOOGLAND, C.; SANCHEZ, J. C.; WALTHER, D.; BAUJARD, V.; BAUJARD, O.; TONELLA, L.; HOCHSTRASSER, D. F.; APPEL, R. D. Two-dimensional electrophoresis resources available from ExPASy. **Electrophoresis**, v.20, n.18, p.3568-3571, 1999.
- HUMBLLOT, P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Theriogenology**, v.56, p.1417-1433, 2001.
- ISFORT, R. J. Proteomic analysis of striated muscle. **Journal Chromatogr. B. Analyt Technol. Biomed. Life Science**, v.771, n.1-2, p.155-165, 2002.
- KATZ-JAFFE, M. G.; MCREYNOLDS, S.; GARDNER, D. K.; SCHOOLCRAFT, W. B. The role

- of proteomics in defining the human embryonic secretome. **Molecular Human Reproduction**, v.15, n.5, p.271–277, 2009.
- KIM, H. R.; KANG, J. K.; YOON, J. T.; SEONG, H. H.; JUNG, J. K.; LEE, H. M.; PARK, S. C.; JIN, D. I. Protein profiles of bovine placenta derived from somatic cell nuclear transfer. **Proteomics**, v.5, p.4264–4273, 2005.
- KNOCHENMUSS, R.; ZENOBI, R. MALDI ionization: the role of in-plume processes. **Chem. Rev.**, v.103, n.2, p.441–452, 2003.
- KRÄMER-ALBERS, E.M., N. BRETZ, S. TENZER, C. WINTERSTEIN, W. MÖBIUS, H. BERGER, K.-A. NAVE, H. SCHILD, J. TROTTER. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? **Proteomics-Clinical Applications**, n.1, p.1446–1461, 2007.
- LEE, S. Y., PARK, J. Y., CHOI, Y. J., CHO, S. K., AHN, J. D., KWON, D. N., HWANG, K. C., KANG, S. J., PAIK, S. S., SEO, H. G., LEE, H. T., KIM, J. H. Comparative proteomic analysis associated with term placental insufficiency in cloned pig. **Proteomics**, v.7, n.8, p.1303–15, 2007.
- 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, p.1696–1719, 2009.
- LIU, A. X.; ZHANG, W. W.; ZHOU, T. H.; ZHOU, C. Y.; YAO, W. M.; QIAN, Y. L.; HUANG, H. F. Proteomics analysis on the alteration of protein expression in the placental villous tissue of early pregnancy loss. **Biology of Reproduction**, v.75, p.414–20, 2006.
- MINE, K.; KATAYAMA, A.; MATSUMURA, T.; NISHINO, T.; KUWABARA, Y.; ISHIKAWA, G.; MURATA, T.; SAWA, R.; OTSUBO, Y.; SHIN, S.; TAKESHITA, T. Proteome analysis of human placenta: pre-eclampsia versus normal pregnancy. **Placenta**, v.28, p.676–87, 2007.
- MOTOYAMA, A. Multidimensional LC Separations in Shotgun Proteomics. **Analytical Chemistry**, v.80, p.7187–7193, 2008.
- 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.4221, 2009.
- O'FARRELL, P. H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.250, p.4007–4021, 1975.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, n.6788, p.837–846, 2000.
- PENG, J., ELIAS, J. E.; THOREEN, C. C.; LICKLIDER, L. J.; GYGI, S. P. Evaluation of Multidimensional Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC/LCMS/MS) for Large-Scale Protein Analysis: The Yeast Proteome. **Journal of Proteome**, v.2, n.1, p.43–50, 2003.
- PIELES, U.; ZÜRCHER, W.; SCHÄR, M.; MOSER, H. E. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. **Nucleic Acids Research**, v.21, n.14, p.3191–3196, 1993.
- POTTEN, C. S.; WILSON, J. W.; BOOTH, C. Regulation and Significance of Apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. **Stem Cells**, v.15, n.2, p.82–93, 1997.
- RIDING, G. A.; HILL, J. R.; JONES, A.; HOLLAND, M. K.; JOSH, P. F.; LEHNERT, S. A. Differential proteomic analysis of bovine conceptus fluid proteins in pregnancies generated by assisted reproductive **Technologies Proteomics**, v.8, p.2967–2982, 2008.
- ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Eletroforese bidimensional e análise de proteoma. **Comunicado Técnico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, n.136, p.1–12, 2005.
- ROYÈRE, D.; FEUERSTEIN, P.; CADORET, V.; PUARD, V.; UZBEKOVA, S.; DALBIES-TAN, R.; TEUSAN, R.; HOULGATTE, R.; LABAS, V.; GUÉRIF, F. Non invasive assessment of embryo quality: proteomics, metabolomics and oocyte-cumulus dialogue. **Gynecol Obstet Fertil**, v.37, n.11–12, p.917–920, 2009.
- SAWICKI, G.; DAKOUR, J.; MORRISH, D. W. Functional proteomics of neurokinin B in the placenta indicated a novel role in regulating cytotrophoblast antioxidant defenses. **Proteomics**, v.3, p.2044–51, 2003.
- 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. **Analytical Chemistry**, v.77, p. 2187–2200, 2005.

STALLMACH, T., HEBISCH, G., MEIER, K., DUDENHAUSEN, J. W., VOGEL, M. Rescue by birth: defective placental maturation and late fetal mortality. **Obstetrics & Gynecology**, v.97, p.505–509, 2001.

SUTOVSKY, P. Proteomic analysis of mammalian gametes and sperm-oocyte interactions. **Journal of reproduction and fertility**, v.66, p.103-116, 2009.

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1435-1450, 2001.

THIEDE, B.; HÖHENWARTERB, W.; KRAHA, A.; MATTOWC, J.; SCHMIDB, M.; SCHMIDT, F.; JUNGBLUT, P. R. Peptide mass fingerprinting. **Methods**, v.35, p.237–247, 2005.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v.422, n.6928, p.193-197, 2003.

USAMI, M.; MITSUNAGA, K.; NAKAZAWA, K.; DOI, O. Proteomic analysis of selenium embryotoxicity in cultured postimplantation rat embryos. **Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.**, v.83, n.2, p.80-96, 2008.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein Identification technology. **Nature Biotechnology**, v.19, p. 242- 247. 2001.

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

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; JAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, E.; 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. **Bio. Technology**, v.14, p.61-65, 1996.

WILLIAMS, W. F., MARGOLIS, M. J., MANSPEAKER, J., DOUGLASS, L. W., DAVIDSON, J. P. Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention. **Theriogenology**. v.28, p.312–323, 1987.

WOLF, E.; ARNOLD, G. J.; BAUERSACHS, S.; BEIER, H. M.; BLUM, H.; EINSPANIER, R.; FRÖHLICH, T.; HERRLER, A.; HIENDLEDER, S.; KÖLLE, S.; PRELLE, K.; REICHENBACH, H. D.; STOJKOVIC, M.; WENIGERKIND, H.; SINOWATZ, F. Embryo-Maternal Communication in Bovine – Strategies for Deciphering a Complex Cross-Talk. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.276–289, 2003.

WOODING, F. B., MORGAN, G., BRANDON, M. R., CAMOUS, S., Calcium transport and the localisation of calbindin-D9k in the ruminant placenta during the second half of pregnancy. **Cell and Tissue Research**, v.276, p.387–397, 1994.

ZHANG, Y., ZHANG, Y. L., FENG, C., WU, Y. T., LIU, A. X., SHENG, J. Z., CAI, J., HUANG, H. F. Comparative proteomic analysis of human placenta derived from assisted reproductive technology. **Proteomics**. v.8, n.20, p.4344-56, 2008.