

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**PROTEÔMICA DO FLUÍDO UTERINO E DO EMBRIÃO DURANTE
A GESTAÇÃO INICIAL EQUINA**

RUBIA ALVES SCHMITH

Botucatu - SP
Abril/2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**PROTEÔMICA DO FLUÍDO UTERINO E DO EMBRIÃO DURANTE
A GESTAÇÃO INICIAL EQUINA**

RUBIA ALVES SCHMITH

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Cezinande de Meira
Coorientadora: Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Botucatu - SP

Abril/2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Schmith, Rubia Alves.

Proteômica do fluído uterino e embrião durante a
gestação inicial / Rubia Alves Schmith. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Cezinande de Meira

Coorientador: Fabiana Ferreira de Souza

Capes: 50504002

1. Gravidez. 2. Endométrio. 3. Espectrometria de massa.
4. Proteínas.

Palavras-chave: Endométrio; Espectrometria de massas;
Gestação; Proteína; Reconhecimento-materno.

Nome do autor: Rubia Alves Schmith

Título: **PROTEÔMICA DO FLUÍDO UTERINO E DO EMBRIÃO DURANTE A GESTAÇÃO INICIAL EQUINA**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cezinande de Meira

Presidente e orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu - SP

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro titular

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu - SP

Profa. Dra. Priscilla do Nascimento Guasti

Membro titular

Departamento de Reprodução Animal - Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral -
FAEF – Garça - SP

Profa. Dra. Fernanda Saules Ignácio

Membro titular

Departamento de Reprodução Animal - Faculdade Eduvale - Avaré - SP

Profa. Dra. Fernanda Maria Pazinato

Membro titular

Departamento de Clínicas Veterinárias - Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC -
Xanxerê - SC

Data da Defesa, 15 de abril de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo apoio e incentivo em cada decisão tomada, sem vocês eu nunca chegaria até aqui.

Ao meu orientador, professor Meira, por conversar muito comigo e nunca negar ajuda quando precisei. Agradeço ainda por todo crescimento profissional e pessoal que aprendi nesse tempo de convivência com o senhor.

A professora Fabiana, por me acolher assim que iniciei a pós-graduação, por me ensinar tudo no laboratório, por me incentivar quando tudo estava dando errado. Muito obrigada por tudo.

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo para a realização deste trabalho, muito obrigada por toda ajuda e incentivo, sem vocês não seria possível a realização deste trabalho.

A todos os professores, laboratórios e funcionários do departamento de cirurgia veterinária e reprodução animal da FMVZ. Obrigada por sempre estarem a disposição em ajudar na realização deste projeto.

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

*“A alegria que se tem em pensar e aprender
faz-nos pensar e aprender ainda mais”*

Aristoteles

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ca	Cálcio
CL	Corpo lúteo
COX	Cicloxigenase
COX-1	Cicloxigenase-1
COX-2	Cicloxigenase-2
EqIFN- δ 1	Interferon equino delta 1
EqIFN- δ 2	Interferon equino delta 2
GM2AP	Proteína ativadora de GM2
HSP10	Proteína de choque térmico 10
HSP60	Proteína de choque térmico 60
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
mm	Milímetro
mL	Mililitro
mOsm	Miliosmol
ng	Nanograma
OXTR	Receptor de ocitocina
P4	Progesterona
P19	Uterocalina
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PGFM	13,14-dihidro-15-ceto PGF2 α
pl	Ponto isoelétrico
PTGS1	Prostaglandina endoperoxido sintase 1
PTGS2	Prostaglandina endoperoxido sintase 2
PLA2	Fosfolipase A2

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Fertilização	2
2.2. Clivagem e compactação.....	3
2.3. Desenvolvimento embrionário	3
2.4. Formação da cápsula embrionária.....	5
2.5. Mobilidade Embrionária	7
2.6. Reconhecimento materno da gestação	10
2.7. Implantação	12
2.8. Proteômica do endométrio e histotrofo	14
REFERÊNCIAS.....	17
OBJETIVOS	32
CAPÍTULO 2 - Proteínas do fluido uterino de éguas e sua relação no início da migração embrionária	33
1. Introdução	35
2. Materiais e métodos	36
2.1. Reagentes	36
2.2. Aspectos éticos.....	36
2.3. Seleção de Animais	37
2.4. Modelo experimental.....	37
2.5. Colheita do líquido uterino e dos embriões.....	37
2.6. Proteômica.....	39
2.7. Ontologia gênica	41
2.8. Análise dos dados.....	41
3. Resultados	41
4. Discussão	47
Conflitos de interesse.....	51

Agradecimentos	51
Contribuição dos autores	51
Referências	51
Anexos.....	57

RESUMO

SCHMITH, R. A. **Proteômica do fluido uterino e embrião durante a gestação inicial**. Botucatu, 2020, 100 p., Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu.

O presente estudo teve como objetivo descrever o perfil proteico do embrião equino e do fluido uterino durante a fase inicial do reconhecimento materno da gestação. Foram utilizadas 10 éguas, sem anormalidades uterinas, de 5 a 8 anos de idade. O acompanhamento folicular diário foi realizado até a detecção de um folículo (35 mm) para indução da ovulação, o dia seguinte realizava a inseminação artificial e posteriormente o D0 sendo o dia da ovulação da égua. O líquido uterino foi colhido, usando tampão vaginal comercial de humanos nos dias 7 (D7), 10 (D10) e 12 (D12) de gestação. Nos mesmos períodos, após a retirada do tampão vaginal, os embriões foram colhidos por fluxo retrógrado utilizando-se tampão fosfato-salina pH 7,2. O processamento do líquido uterino foi de centrifugação e dos embriões foram sonicação e centrifugação para proteômica. A concentração de proteína total foi determinada e uma alíquota (50 µg) foi digerida “*in solution*” com tripsina, seguida da análise por espectrometria de massas. Após a análise estatística multivariada, foram identificadas 171 proteínas, sendo 29 no embrião e 142 no líquido uterino. Foram encontradas 15 proteínas mais abundantes nos embriões, sendo 10 no D10 e 5 no D12. Já no líquido uterino, 6 proteínas foram mais abundantes no D7, 3 no D10 e 6 no D12. As principais funções moleculares foram atividade catalítica e de ligação e os processos biológicos mais significativos foram o processo celular e metabólico. Este estudo descreveu proteínas que foram abundantes no fluido do endométrio e no embrião equino, fornecendo indicações sobre a nutrição e metabolismo embrionários e fatores pré-implantação no período de reconhecimento materno da gestação.

Palavras-chaves: endométrio, espectrometria de massas, gestação, proteína, reconhecimento-materno

ABSTRACT

SCHMITH, R. A. (2020). **Proteomics of uterine fluid and embryo during initial pregnancy**. Botucatu, 2020, 100 p., PhD, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho", School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu.

The aim of this study was to describe the protein profile of the equine embryo and uterine fluid, during the maternal recognition of pregnancy. Ten mares from 5 to 8 years of age, without uterine abnormalities were used. Daily follicular monitoring was performed until the detection of the preovulatory follicle (35 mm) to induce ovulation, the next day performed artificial insemination and then D0 was the mare's ovulation day. The uterine fluid was collected using commercial human vaginal tampon at 7 (D7), 10 (D10) and 12 (D12) of the gestation. In the same moments, after withdraw vaginal tampon, the embryos were collected by retrograde flushing using phosphate-saline buffer pH 7.2. The processing of the uterine fluid was centrifugation and the embryos were sonicated and centrifuged for proteomics. The total protein concentration was determined and an aliquot (50 µg) was digested "in solution" with trypsin, followed by analysis by mass spectrometry. After data analysis by multivariate statistical, 171 proteins were identified, 29 in the embryo and 142 in the uterine fluid. Fifteen abundant proteins were found in the embryos, 10 proteins in the D10 and 5 in the D12. In the uterine fluid, 6 proteins were more abundant in the D7, 3 in the D10 and 6 in the D12. The main molecular functions were catalytic and binding activity and the most significant biological processes were the cellular and metabolic processes. This study described proteins that were abundants in the uterine fluid and the equine embryo, providing indications about the embryonary nutrition, metabolism, and pre-implantation factors in the period of maternal recognition of pregnancy.

Key words: endometrium, mass spectrometry, gestation, protein, maternal-recognition

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nos mamíferos, o sucesso do estabelecimento da gestação depende da sanidade uterina (GINTHER, 1985b) e da comunicação entre o endométrio e o concepto para que ocorra a implantação embrionária (KLEIN, 2016). Contudo, a mobilidade embrionária na espécie equina, sendo alvo de maior estudo com relação ao reconhecimento materno da gestação. E desta forma, mais estudos são necessários para elucidar as interações entre o útero e o embrião na espécie equina.

Diferentemente de outras espécies, como humanos (EVANS et al., 2019) que possuem um fator luteotrófico produzido e liberado pelo concepto, ou como em ruminantes (MORAES et al., 2020) e suínos (GEISERT et al., 2017) que liberam fatores antiluteolíticos, nos equinos ainda não se sabe exatamente os mecanismos de comunicação entre o concepto e a fêmea. A mobilidade embrionária intrauterina é a principal característica do reconhecimento materno em equino, a qual o distingue de outras espécies (GILBERT, 2010).

Estudos sobre os mecanismos de reconhecimento materno da gestação são essenciais para a espécie equina, já que 17% das perdas gestacionais ocorrem próximas ao período de fixação do embrião (ALLEN, 2001). As funções e os processos biológicos, assim como vias metabólicas e antiluteolíticas podem explicar a perda da gestação e identificar marcadores do reconhecimento materno da gestação (SMITS et al., 2018). Desta maneira, a proteômica é uma ferramenta que pode contribuir para determinar as vias envolvidas no reconhecimento materno da gestação de equinos (SWEGEN et al., 2017).

Baseado nisso, a proposta deste estudo é identificar e quantificar as proteínas do embrião e do fluido uterino equino durante as fases iniciais do reconhecimento materno da gestação usando abordagem proteômica, na tentativa de estabelecer relações entre o concepto e o útero durante a fase de maior mobilidade embrionária e início do reconhecimento materno da gestação. Ainda, pretende-se identificar fatores antiluteolíticos liberados pelo concepto e compreender as vias do processo inicial da gestação. Dessa forma, os resultados poderão servir de embasamento para obtenção de marcadores que permitam estabelecer os mecanismos do reconhecimento inicial da gestação equina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fertilização

A reprodução e a embriogênese no equino possuem características únicas que as diferenciam de outras espécies de animais domésticos, roedores e humanos (BETTERIDGE, 2007).

Após a ruptura do folículo, o oócito é capturado pelas fimbrias da tuba uterina e atinge rapidamente a junção istmo-ampolar, local da fertilização (GINTHER, 1992). Os espermatozoides migram até este local e a fecundação ocorre quando há fusão da zona pelúcida do oócito com a cabeça espermática (HAFEZ; HAFEZ, 2004; CAIXETA et al., 2008).

A ligação dos gametas é um processo coordenado por receptores proteicos específicos no oócito e no espermatozoide. A zona pelúcida é sintetizada pelo oócito em maturação, sendo sua matriz extracelular constituída por glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 e ZP3, presentes em todas as espécies de mamíferos. ZP1 e ZP2 são glicoproteínas estruturais, enquanto ZP3 atua como receptor espermático (HERRLER et al., 2000). Apenas espermatozoides com acrossomo intacto podem se ligar à ZP3. A ligação da cabeça espermática à ZP3 permite interações com outras zonas que estimulam a reação do acrossomo, liberando enzimas que promovem uma abertura da zona pelúcida para que o espermatozoide possa atingir a membrana vitelínica (GADELLA, 2008). A região equatorial da cabeça espermática liga-se à membrana vitelínica estimulando o oócito à retomada da segunda divisão meiótica, liberando o segundo corpúsculo polar (GINTHER, 1992; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A fecundação induz uma série de oscilações (ondas) intracelulares de Ca^{+2} que promovem alterações citoplasmáticas e nucleares no oócito, essenciais para o início da embriogênese. As principais funções são: a exocitose dos grânulos corticais, a descondensação da cabeça do espermatozóide, a finalização da meiose com a expulsão do segundo corpúsculo polar e a formação do pronúcleo masculino e feminino. (GINTHER, 1992).

Particularidade do embrião equino é a liberação de PGE para abertura da junção útero tubárica, assim podem sair os oócitos não fertilizados de ciclos anteriores. (FLOOD; JONG; BETTERIDGE, 1979; ALLEN, 2000).

2.2. Clivagem e compactação

Após o estadio de zigoto, os embriões sofrem uma série de divisões mitóticas. A primeira clivagem do embrião equino ocorre 24 horas após a fecundação (HERRLER et al., 2000). Nas divisões celulares não ocorre aumento da massa celular. O diâmetro de um embrião clivado, de um zigoto e um oócito pré-ovulatório não se alteram até a formação da blastocela (GINTHER, 1992; BETTERIDGE, 2000). A clivagem do zigoto inicia-se por divisão e as células irmãs resultantes são denominadas blastômeros. As divisões iniciais ocorrem simultaneamente em todos os blastômeros, e posteriormente a sincronização é perdida (GINTHER, 1992).

No estadio de 8 células, os blastômeros formam um arranjo frouxo, com espaço abundante entre eles. Na terceira clivagem há alteração desse comportamento e os blastômeros se aglomeram e aumentam o contato, formando uma massa esférica compacta de células. O arranjo compacto é estabilizado por junções do tipo “*gap*” que se formam entre as células externas da massa celular, permitindo o transporte de pequenas moléculas e íons (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Aproximadamente 4 a 5 dias após a fecundação, o embrião apresenta 16 a 32 células (GINTHER, 1992) e neste período é denominado mórula (HERRLER et al., 2000). No 5º dia após a ovulação o embrião está na fase de mórula compacta e começa a secretar prostaglandina E₂ (PGE₂). A PGE₂ estimula o relaxamento da musculatura lisa da tuba uterina, permitindo que o embrião se mova progressivamente com o auxílio do batimento ciliar rítmico, entrando no útero (WEBER et al., 1991; WEBER; WOODS; LICHTENWALNER, 1995; BATTUT et al., 1998; GASTAL et al., 1998).

2.3. Desenvolvimento embrionário

Em geral o embrião passa pela papila útero-tubárica e chega ao útero aproximadamente 6 dias após a ovulação, no seu estágio de desenvolvimento entre mórula ou blastocisto inicial, apresentando uma zona pelúcida e o início da formação de uma cápsula de glicoproteína acelular (MCKINNON et al., 2011).

O trofoblasto é constituído por células colunares com microvilosidades que auxiliam na captação de nutrientes. Posteriormente, este grupo celular originará a porção embrionária da placenta. Já o embrioblasto, que é formado a partir da massa celular interna, formará o embrião contendo as camadas

germinativas (GINTHER, 1992). O embrião se expande rapidamente após a migração da tuba e entrada no útero, ocorrendo uma diminuição progressiva na espessura da zona pelúcida até o seu total desaparecimento. Quando no útero, em poucos dias, a zona pelúcida vai se desfazendo da cápsula, a qual permanece revestindo completamente o embrião (CROSSETT et al., 2005; STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005).

A gastrulação, primeira mudança morfo genética que um embrião sofre em seu desenvolvimento, é o período no qual ocorre a transição de uma esfera simples e não estruturada de células para um conceito organizado e de múltiplas camadas distinguíveis, contendo todos os principais precursores dos tecidos do organismo adulto, como endoderme, mesoderme e ectoderme (NARASIMHA; LEPTIN, 2000; MYERS; SEPICH; SOLNICA-KREZEL, 2002; CHUAI; WEIJER, 2009). O primeiro evento da diferenciação durante o desenvolvimento embrionário é o distanciamento do trofocotoderma da massa celular interna. Rapidamente a cavidade do blastocisto começa a ampliar-se e definir-se, demarcando em um dos pólos a massa celular interna (BETTERIDGE, 2007; GAIVÃO et al., 2014).

As células da massa celular interna se diferenciam em camadas internas e externas para formar o disco embrionário bilaminar (SOLNICA-KREZEL, 2005; GILBERT, 2010; VEJLSTED, 2010). A camada interna do disco embrionário (hipoblasto) estará formada aproximadamente no 12º dia e dará origem as estruturas extraembrionárias (SOLNICA-KREZEL, 2005; VEJLSTED, 2010). O hipoblasto é derivado das células que migram da massa celular interna e seguem para se alinhar na cavidade da blastocel, completando o saco vitelino bilaminar (GILBERT, 2010). O epiblasto está localizado acima do hipoblasto e possui células progenitoras do embrião. Quando se desenvolve um espessamento e alongamento do epiblasto é formada a linha primitiva, e o futuro eixo longitudinal do corpo (GAIVÃO et al., 2014). Ao longo da linha primitiva, as células do epiblasto migram para a linha média, para serem transformadas em células do mesoderma ou endoderma. Algumas células precursoras desta linhagem são incorporadas no hipoblasto formando o endoderma definitivo. Já as células epiteliais remanescentes se diferenciam em ectoderma (GILBERT, 2010; DEGRELLE et al., 2011). No 14º dia de desenvolvimento, uma terceira membrana emerge do disco embrionário entre a ectoderme e a endoderme para

formar o saco vitelino trilaminar (MCKINNON et al., 2011). Entre o 10° até o 16° dia o crescimento embrionário é aproximadamente 3,4 mm por dia, e a entrada de líquidos chega até 3 mL no 16° dia (WAELCHLI; BETTERIDGE, 1996).

Após a migração dos precursores do mesoderma e do endoderma pela linha primitiva, as camadas germinativas se diferenciam para gerar tecidos específicos ao longo dos eixos embrionários. A ectoderme vai dar origem a epiderme e os tecidos neurais, a camada interna (endoderme) desenvolve o trato digestivo e o mesoderma vai produzir os demais órgãos, tecido conjuntivo e células sanguíneas (SOLNICA-KREZEL, 2005). Um pequeno sulco na linha média do disco bilaminar vai se alongando e definindo o eixo anteroposterior e a futura cabeça e cauda do embrião. Em geral, o endoderma é internalizado antes do mesoderma, e as células endodérmicas migram individualmente (IDKOWIAK et al., 2004; DEGRELLE et al., 2011).

Algumas partes do ectoderma e mesoderma passam pelo disco embrionário e formam o saco amniótico que envolve inicialmente o embrião. Na região posterior do intestino surgirá o saco alantoidiano, cujo crescimento será direcionado ventralmente ao embrião. Em seguida, outras porções do endoderma e mesoderma irão formar o córion, a placenta (córion - alantoide) e que posteriormente desenvolveram a cinta coriônica, finalizando a formação embrionária e dos anexos fetais (SOLNICA-KREZEL, 2005).

2.4. Formação da cápsula embrionária

Em torno de 6,5 dias após a ovulação, é observada uma cápsula entre o trofotoderma e a zona pelúcida, coincidindo com a blastulação e a entrada do embrião em desenvolvimento no útero (BETTERIDGE et al., 1982). À medida que a zona pelúcida se torna mais fina e os embriões se expandem em tamanho, a zona pelúcida é absorvida, sendo a cápsula a única camada que envolve o embrião. A função da cápsula é semelhante à da zona pelúcida; manter o embrião na sua forma esférica durante o período do reconhecimento materno da gestação, uma característica da espécie equina (GINTHER, 1992).

Embora fina, a cápsula de glicocálix é resistente, flexível e elástica funcionando como uma proteção física ao conceito durante a fase de migração, permitindo com a movimentação de uma extremidade à outra dos cornos uterinos (ORIOU; SHAROM; BETTERIDGE, 1993; BETTERIDGE, 2000; STOUT;

MEADOWS; ALLEN, 2005; ARAR et al., 2007; QUINN et al., 2007; TACHIBANA et al., 2014), ao atuar como uma camada anti-adesiva devido a sua alta concentração de ácido siálico (CHU et al., 1997; STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005). O ácido siálico é constituído de glicoproteínas carregadas negativamente, as quais propiciam efeito antiaderente e regulador do movimento intrauterino do embrião, auxiliando no acúmulo e captação de secreções endócrinas e exócrinas (DENKER et al., 2000; ALLEN; WILSHER, 2009). As secreções do endométrio contêm a uterocalina e a uteroglobina, que são proteínas de transporte de nutrientes para o embrião, incorporadas na cápsula nos primeiros dias de gestação (MCDOWELL et al., 2004). O peso seco da cápsula aumenta até o 18º dia de gestação, mas ainda não foi esclarecido se essa produção é contínua ou decorrente do acúmulo de proteínas ligadas a esta camada (ORIOLE; SHAROM; BETTERIDGE, 1993).

A manutenção da forma esférica, uma característica do embrião equino (ALLEN; WILSHER, 2009) e o período prolongado de migração uterina estão ligados à supressão da secreção de PGF2 α pelo endométrio e reconhecimento materno da gestação (MCDOWELL et al., 1988).

A cápsula é fundamental para a sobrevivência do embrião, a qual proporciona resistência mecânica à estrutura, suportando as forças propulsoras do miométrio durante a fase de mobilidade embrionária (STOUT; MEADOWS; ALLEN, 2005). A fixação do embrião no local da placentação está associada com a fluidez e com o padrão de ligação de proteínas e o mecanismos enzimáticos que dissolvem a cápsula (ORIOLE et al., 1993; CHU et al., 1997; DENKER HW, 2000; ARAR et al., 2007; QUINN et al., 2007). Não se sabe exato o dia ou como ocorre a degradação da cápsula embrionária, porém, aos 18 dias após a ovulação, os embriões podem ser recuperados com a cápsula intacta ou em fragmentos por vários dias após. Logo, estima-se que no dia 21 é quando há a degradação desta porção embrionária (DENKER; BETTERIDGE; SIROIS, 1987; ENDERS; LIU, 1991a).

A cápsula também atua como defesa biológica contra-ataques virais, bacterianos ou componentes imunológicos maternos. Cápsulas com defeitos mostraram que a ausência ou alteração do perfil de proteínas impedem a

redução das concentrações de ácido siálico com posterior dissolução da capsula, interferindo no processo de fixação embrionária (ARAR et al., 2007).

A capsula é formada principalmente pela microglobulina $\beta 2$, a qual está associada com a fixação do embrião. Contudo outras proteínas podem ser encontradas, como a fosfolipase A2 e a proteína beta 2M que sofrem uma degradação progressiva (QUINN et al., 2007).

Durante a expansão do embrião a capsula é responsável por aumentar a captação de glicose, frutose, água e íons como substratos energéticos (LANE et al., 2001). A produção de glicose pelo útero da égua se mantém estável durante o início da gestação, com aproximadamente 5 a 6 mg (ZAVY et al., 1982). Porém, o embrião estimula ativamente a expressão de transportadores específicos de glicose e frutose no útero contribuindo para maior captação dos substratos energéticos (GIBSON et al., 2018). Outro componente do sistema de trocas entre o embrião e a égua é o saco vitelínico. Antes da fixação, há expressão da proteína ativadora de GM2 (GM2AP), a qual é responsável pelo transporte e catabolismo de lipídeos e fosfolipídeos (QUINN et al., 2006). A parede do saco vitelino também produz a proteína 3 que se liga ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-like) que é necessário para o desenvolvimento embrionário (HERRLER et al., 2000), síntese e metabolização de esteroides (GOFF et al., 1993; RAESIDE et al., 2004), além da $\text{PGF}2\alpha$ e PGE_2 (STOUT; ALLEN, 2002).

2.5. Mobilidade Embrionária

Um dos principais determinantes do ambiente uterino adequado para o estabelecimento da gestação é o fornecimento contínuo de progesterona pelo CL (STOUT, 2016). O principal esteroide sintetizado pelo CL entre 7 a 14 dias após ovulação é a 17α -hidroxiprogesterona (GOFF et al., 1993). A progesterona reduz a contratilidade uterina e assegura o reconhecimento materno da gestação no período pré-implantação (HOLTAN et al., 1991; LYE et al., 1998; CHALLIS et al., 2000). Além disso, este hormônio é responsável pela produção de conteúdo histotrófico pelo endométrio, o qual é fonte nutricional primária do embrião até a placentação (AURICH; BUDIK, 2015).

Baixas concentrações de progesterona são incompatíveis com a manutenção da gestação acima de 2 ng/mL. Maior sobrevivência embrionária é

observada com concentrações acima de 4 ng/mL (GINTHER, 1985a; BALL et al., 1986; ALLEN, 2001). Em éguas com ciclos aluteais induzidos (ambiente com progesterona < 1,0 ng/mL), o desenvolvimento embrionário é comprometido, com menor diâmetro dos embriões, estágio embrionário mais precoce e de menor qualidade (LEISINGER et al., 2018).

A progesterona é importante para o transporte embrionário em muitas espécies (camundongo, vacas e humanos), já que regula o batimento ciliar das tubas uterinas facilitando o transporte dos embriões até o útero. Porém nos equinos, a PGE₂ secretada pelo embrião é responsável pelo relaxamento da musculatura lisa das tubas uterinas e transporte embrionário até o útero (WESSEL; SCHUCHTER; WALT, 2004; STOUT, 2006; BYLANDER et al., 2010). Dentro do útero, o embrião equino se movimenta livremente e a mobilidade intrauterina é a primeiro processo do mecanismo de inibição luteolítica (GINTHER, 1983a; STOUT; ALLEN, 2001).

A mobilidade embrionária intrauterina é a principal característica do reconhecimento materno em equino, a qual o distingue de outras espécies. Aproximadamente 60% do tempo, entre os dias 9 e 11, os embriões estão localizados no corpo uterino (GILBERT, 2010). A menor mobilidade é observada no dia 9 após a ovulação e ocorrendo o seu aumento progressivo até a máxima mobilidade entre os dias 11 e 14. O embrião passa por todo útero a cada 2 horas (GINTHER, 1983a; LEITH; GINTHER, 1984). A taxa média de movimento da vesícula embrionária foi estimada em 3,4 mm/min (GINTHER, 1983a). Conceptos gêmeos se movem independentemente indicando que o próprio embrião estimula a contratilidade (GINTHER, 1984). A restrição da mobilidade para menos de dois terços da superfície endometrial resulta na perda da gestação. (GINTHER, 1983a; STOUT; ALLEN, 2001). As contrações e as dobras miométrais facilitam a mobilidade da vesícula, mecanismo que está relacionado com a produção e liberação de PGE₂, PGF₂α e PGI-2 pelo embrião e endométrio, promovendo as contrações que impulsionam a vesícula (KASTELIC; ADAMS; GINTHER, 1987; GASTAL et al., 1998).

As prostaglandinas são essenciais na mobilidade embrionária e são produzidas a partir do ácido araquidônico, via enzima ciclooxigenase (COX), que está presente na membrana das células endometriais (BERRIDGE; IRVINE,

1984; NEEDLEMAN et al., 1986; SHIMIZU; WOLFE, 1990; BERTAN; BINELLI; MADUREIRA, 2006). Há duas isoformas da enzima, a COX-1 e a COX-2 (HABENICHT et al., 1985). No início da gestação, a COX-1 é regulada positivamente no endométrio das éguas, enquanto a expressão de COX-2 é diminuída (ATLI et al., 2010). No embrião de 8 a 14 dias, a expressão de COX-1 é constante e em baixos níveis. A COX-2 atinge os maiores níveis nos dias 12 a 14, o que poderia estar associado com maior mobilidade embrionária (HANDLER et al., 2003; AURICH; BUDIK, 2004). O embrião expressa ambas as COXs, e na inibição seletiva da COX-2, a COX-1 pode manter a produção de prostaglandina suficiente para estimular a contração uterina e promover a mobilidade. Os fatores liberados pelo embrião são insuficientes para induzir a luteólise porque não atingem a circulação e atuam apenas no local (MCDOWELL et al., 1988; STOUT; ALLEN, 2002; EALY; EROH; SHARP, 2010).

Nas éguas não-gestantes no 14º dia após a ovulação, a ocitocina ao se ligar no seu receptor endometrial estimula a liberação de PGF2 α , estabelecendo uma retroalimentação positiva com a hipófise, resultando na luteólise funcional e posteriormente a regressão estrutural do corpo lúteo, fazendo com que a égua retorne a um novo ciclo (KINDAHL et al., 1982; GINTHER, 1985b). A ocitocina desempenha um papel central na regulação da liberação de PGF2 α durante a luteólise, e a expressão alterada de seu receptor é um aspecto integral do reconhecimento materno da gestação. A produção de ocitocina foi verificada nas células epiteliais luminiais e glandulares superficiais do endométrio (BAE; WATSON, 2003). Os níveis de ocitocina são baixos durante a ovulação e no início do diestro, com elevação das concentrações séricas na fase lútea média e tardia (BEHRENDT-ADAM et al., 1999). In vitro, a suplementação de ocitocina no meio de cultivo de células endometriais resultou em maior liberação de PGF2 α (EALY; EROH; SHARP, 2010). Os níveis de transcritos dos receptores de ocitocina no endométrio não diferem entre as éguas gestantes e não-gestantes no momento da luteólise (KLEIN et al., 2010; DE RUIJTER-VILLANI; VAN TOL; STOUT, 2015), mas os níveis proteicos são menores em éguas gestantes quando comparados a éguas não-gestantes (SHARP et al., 1997; STARBUCK et al., 1998).

2.6. Reconhecimento materno da gestação

Nas éguas gestantes o reconhecimento materno é baseado na comunicação do concepto com a fêmea, que ocorre em vista do movimento da vesícula embrionária ao longo do lúmen uterino, fixação e orientação da vesícula para que o polo embrionário se localize na região mesométrica do útero (ALLEN; STEWART, 2001). A comunicação bem-sucedida entre o concepto e a égua estimula a contínua secreção de progesterona, levando a um ambiente uterino receptivo (MCCRACKEN; GLEW; SCARAMUZZI, 1970; ROBERTS; XIE; MATHIALAGAN, 1996).

O reconhecimento materno da gestação dos equinos difere das outras espécies, em ruminantes podemos identificar o fator parácrino interferon tau que exibe funções antiluteolíticas, já em suínos identificamos os estrógenos derivado dos embriões e atuam no endométrio (BAZER et al. 1997; GEISERT et al. 1990; GINTHER, 1983b; BAZER; OTT; SPENCER, 1998). Em equinos o sinal de reconhecimento da gestação derivado do embrião ainda não foi identificado. Porém, a expressão de dois genes que codificam uma proteína semelhante à família do interferon foi descrita, interferon delta 1 (EqIFN- δ 1) e 2 (EQIFN- δ 2), os quais estão presentes em baixos níveis no início da gestação (COCHET; VAIMAN; LEFÈVRE, 2009). O concepto equino também sintetiza estrógeno durante este período, porém como o hormônio está envolvido no reconhecimento materno da gestação ainda não está claro (BUDIK et al. 2010; COCHET et al. 2009; KLEIN 2015). Os estrógenos são metabolizados a partir do sexto dia de vida, atuando localmente regulando a sua biodisponibilidade. Alguns experimentos foram inconclusivos tentando provar que os estrógenos produzidos pelos conceptos podem prolongar a função do corpo lúteo (KLEIN, 2015).

O embrião cessa o movimento próximo ao dia 16, indicando que reconhecimento ocorre entre os dias 11 a 14 após a ovulação (GINTHER, 1985b; LEITH; GINTHER, 1985; STOUT; ALLEN, 2001). A permanência da função lútea não está associada com a redução dos sítios de ligação da PGF2 α no corpo lúteo, mas com a limitação de liberação de PGF2 α (VERNON et al., 1979). Durante o reconhecimento materno foi evidenciada uma proteína com massa molecular de 1 a 6 kDa, que é capaz de reduzir a produção de PGF2 α (ABABNEH et al. 2000). O concepto diminui, mas não previne a liberação de

PGF2 α uterina durante o início da gestação (BERGLUND et al., 1982; WATSON; SERTICH, 1989; EALY; EROH; SHARP, 2010). As proteínas presentes no fluido do saco vitelino equino e embrionária próximo do reconhecimento materno da gestação (dia 13) foram identificadas e quantificadas. Detectaram a regulação positiva de vários inibidores da síntese de prostaglandinas no fluido uterino de éguas gestantes incluindo PTGR1, GSTP1 e ANXA1. Este foi o primeiro estudo que identificou proteínas que se relacionaram com a interação materno-fetal (SMITS et al., 2018).

O período pré-implantação vem sendo investigado, e diversos estudos sobre vias de sinalização, adesão e a identificação de processos biológico das proteínas evidenciam algumas características do reconhecimento materno da gestação. Contudo, o sinal embrionário para reconhecimento materno na égua ainda é incerto (KLEIN, 2015). A análise de proteínas da blastocle de embriões colhidos no dia 8 após a ovulação e incubados por 48 e 72 horas foi descrita. A principal função molecular detectada foi de tradução e regulação de processos metabólicos, que foi relacionado com o crescimento do embrião (SWEGEN et al., 2017).

A adesão focal desempenha papel importante no desenvolvimento materno-fetal. As alterações na adesão focal pela força mecânica podem estar relacionadas com sensores mecânicos no endométrio. Somente o contato já induzirá uma mudança, porém pode não haver uma resposta (BURGHARDT et al., 2009). As aderências focais e seus efeitos são dependentes da composição e rigidez da matriz extracelular (KATZ et al., 2000; GALBRAITH et al., 2002). Em contrapartida somente o embrião é capaz de suprimir a secreção de PGF, sugerindo que não é apenas o contato de qualquer substância que causa a atenuação da secreção de PGF, mas o próprio embrião é necessário pelo menos por 24 horas para diminuir a liberação de PGF (KLOHONATZ et al., 2019).

Algumas linhas de pesquisa focam no prolongamento da vida útil do CL. O óleo de amendoim ou de coco infundidos no útero prolongam o diestro na égua (WILSHER and ALLEN, 2011). Em contrapartida os estudos que colocaram o endométrio equino em cultivo com contato no óleo de amendoim nos dias 9 e 11 de gestação não causou diminuição na produção de PGF, possivelmente porque neste momento o embrião não atingiu a sua maior mobilidade e conseqüentemente não ocorreu a sinalização (KLOHONATZ et al., 2019).

A identificação das proteínas do embrião tem como objetivo elucidar quais as moléculas responsáveis pelo reconhecimento materno e determinar quais processos são fisiológicos acontecem durante este período. A presença do fator de gestação precoce, uma proteína imunossupressora e que pode ser detectada no soro 2 dias após a ovulação, pelo teste de inibição da roseta foi caracterizada como uma forma extracelular de heat shock protein 10 – HSP10 (CAVANAGH 1996; TAKAGI et al., 1998; OHNUMA et al. 2000). Os embriões no dia 25 de gestação expressam mais transcritos desta proteína do que nos embriões do dia 8, sendo localizada nas células do trofoblasto (HATZEL et al., 2014).

Um estudo identificou proteínas em embriões equinos a partir do 14º até 100 dias de gestação. Diferenças foram observadas entre as massas de 30 a 40 KDa e polipeptídios de 20 KDa que se assemelham a transferrina e alfa-fetoproteína (MCDOWELL et al., 2004). Os sinais do embrião para o reconhecimento materno não foi determinado, mas sugeriu-se que estas duas proteínas podem estar envolvidas no mecanismo antiluteolítico (MCDOWELL et al., 2004). A alfa-fetoproteína é uma glicoproteína produzida pelo saco vitelínico e fígado fetal e está presente em diversos mamíferos (KASHYAP et al., 2001). Em equinos estudos indicam que a presença desta proteína está associada com o bem-estar do feto (SORENSEN et al., 1990). Nas éguas em que ocorre a perda embrionária ou desenvolvimento de placentite, a expressão da alfa-fetoproteína está aumentada. Já em éguas mais velhas, mas sadias a expressão já se encontra diminuída (CANISSO et al., 2015; VINCZE et al., 2015; VINCZE et al., 2018).

2.7. Implantação

Originalmente a parada da vesícula embrionária ocorre nos dias 15, 16 ou 17 após a ovulação em éguas (GINTHER, 1983a). A fixação do embrião é resultado do aumento da contratilidade uterina e do tamanho da vesícula embrionária que se fixa na base de um dos cornos uterinos (GINTHER, 1983b; GASTAL et al., 1996). Interessantemente, ao mesmo tempo em que o tônus uterino aumenta, o seu padrão contrátil se altera e coincide com o período de fixação do conceito (GASTAL et al., 1996). No dia da fixação o embrião está localizado centralmente em uma visão transversal do corno uterino devido à espessura uniforme da parede uterina. No dia 17 inicia-se a modificação do seu

formato esférico e o embrião passa a ter contornos irregulares e o formato triangular. O ápice se localiza na região dorsal do lúmen uterino, entretanto o embrião não permanece estático, e em seu contorno observam-se mudanças causadas por contrações miométrais que parecem exercer ação compressora da vesícula já fixada (GINTHER, 1983b; GASTAL et al., 1996). Alterações desproporcionais na espessura da parede uterina ocorre entre os dias 16 e 21, enquanto ao mesmo tempo a parede ventral torna-se menos espessa e mais lisa. Portanto, a orientação do embrião é conduzida pela combinação da invasão desproporcional da parede dorsal do útero e por ação do atrito com o útero, forçando a parte mais espessa da parede do concepto, e o polo embrionário se posicionar na porção ventral do útero (GINTHER, 1984).

Em gestações gemelares, 97% dos embriões se fixam entre o dia 16 e o dia 18. Aproximadamente 70% de embriões gemelares se fixam no mesmo corno uterino (GINTHER, 1984). Muitas perdas embrionárias acontecem no momento da fixação do embrião, logo uma melhor compreensão sobre as interações moleculares pode auxiliar no diagnóstico e tratamento de éguas propensas a perda embrionária (HAYES et al., 2008; QUINN et al. 2007). Quando ocorre a luteólise observa-se na cápsula embrionária um aumento da fosfolipase A2. Estas enzimas são responsáveis por clivar glicerofosfolídeos e liberar ácido graxos (BIRTS et al. 2007). Suas sinalizações podem estar relacionadas com a inflamação e hemostasia, assim pode estar ligado a remoção e degeneração da cápsula do embrião (HAYES et al., 2008).

Algumas interações de proteínas no momento da fixação foram estudadas. A lactadherin é uma glicoproteína da membrana do glóbulo de gordura do leite e está presente no endométrio de ratos, humanos e bovinos (CERIANI et al. 1983, BOCCA et al. 2012; KLEIN et al. 2006). Há um aumento da expressão durante a fase do estro e atinge níveis mais elevados durante a implantação do embrião (FRANCHI et al. 2011). Suas funções estão relacionadas com a adesão celular, angiogênese e reabsorção de ácidos graxos (TAYLOR et al.1997; UCHIYAMA et al. 2014; KHALIFEH-SOLTANI et al. 2014; BARUA et al.,2018). Em equinos foi observada a expressão no estro, na fase de reconhecimento materno e no 5º mês de gestação e diferentemente das outras espécies sua expressão se mantém em níveis estáveis (Barua et al.,2018).

2.8. *Proteômica do endométrio e histotrofo*

Apesar de não haver um fator relacionado com o reconhecimento materno da gestação em equinos, algumas proteínas secretadas pelo endométrio foram descritas. A uteroglobina, uterocalina e uteroferrina são dependentes de P4 sendo detectadas por imunohistoquímica durante a gestação (ELLENBERGER et al., 2008).

A uteroglobina é uma proteína de baixa massa molecular com aproximadamente 10 kDa, precursora da superfamília secretoglobina, é secretada pelo endométrio e sua secreção é dependente de progesterona (BEIER, 1968). O gene que codifica esta proteína foi descrito em ratos, humanos, suínos e éguas (SINGH et al., 1988; NORDLUND-MÖLLER et al., 1990; BEIER-HELLWIG et al., 1995; SAGAL; NIETO, 1998). Existem pelo menos dois genes codificadores da uteroglobina no útero de éguas, sendo que o mais expresso está presente durante a luteólise (MÜLLER-SCHOETTLE et al. 2002; QUINN et al. 2007). Em equinos, é encontrada nas secreções uterinas durante a fase lútea, porém foi detectada em pulmão, útero e próstata nesta espécie (BEIER-HELLWIG et al., 1995; MÜLLER-SCHÖTTLE et al., 2005). A uteroglobina tem sítio de ligação lipofílico que se liga a eicosanoides como a PGF₂ α e poderia influenciar na receptividade endometrial e implantação do embrião (VON DER DECKEN et al., 2005; MUKHERJEE; ZHANG; CHILTON, 2007).

A uterocalina ou P19 é uma das principais proteínas relacionadas com o útero, nutrição e gestação, sendo mais abundantes na fase de diestro e início da gestação e produzidas pelas células glandulares do endométrio (CROSSRTT et al., 1998). É uma proteína altamente catiônica (pI ~ 9.4), o que justifica sua alta afinidade de ligação na cápsula do embrião equino. São secretadas por glândulas endometriais desde a fase lútea até aproximadamente 25 dias de gestação (ELLENBERGER et al., 2008). As secreções de uterocalina foram mais altas durante o pico de produção de P4 pelo corpo lúteo primário e depois diminuiu. Um aumento ocorre novamente quando os cálices endometriais se formam e diminuindo quando os cálices começaram a degenerar (STEWART; KENNEDY; SUIRE, 2000; SUIRE et al., 2001). Estes resultados sugerem que a uterocalina é uma proteína transportadora de nutrientes para o embrião, de pequenas moléculas hidrofóbicas como os esteroides e eicosanoides que conduzem vitaminas e minerais através da cápsula e do saco vitelínico

(STEWART; KENNEDY; SUIRE, 2000; CROSSETT et al., 2005; SUIRE et al., 2001; KENNEDY, 2004). A função da uterocalina pode ser como um fator materno necessário para sustentar o embrião durante a gestação, ou pode ser incorporada à cápsula embrionária (QUINN et al., 2006).

A concentração de uterocalina varia ao longo da gestação sendo que há maior expressão no início da gestação e durante o período de formação dos cálices endometriais (ELLENBERGER et al., 2008). A incorporação da uterocalina à cápsula pode explicar o aumento do peso dessa estrutura durante o período de maior migração embrionária (ORIOLE; SHAROM; BETTERIDGE, 1993). A carga positiva desta proteína facilita a sua ligação com os resíduos de ácido siálico carregados negativamente na cápsula embrionária (ORIOLE; SHAROM; BETTERIDGE, 1993; CROSSETT; ALLEN; STEWART, 1996). A suplementação de uterocalina no meio de produção de embriões *in vitro* tem efeito positivo na formação da cápsula, mas não altera os baixos resultados das clivagens iniciais após a transferência para as receptoras (SMITS et al., 2012).

Em éguas gestantes quando, PGF2 α apresentaram menores concentrações de uterocalina, indicando que a secreção da proteína é mantida pela progesterona (SUIRE et al., 2001). Já em éguas idosas, com degeneração endometrial e alto padrão de glândulas anormais, a uterocalina é secretada de forma assíncrona contribuindo para a morte embrionária precoce (STEWART et al., 2000; HOFFMANN et al., 2003).

A uteroferrina é outra proteína também secretada pelas glândulas endometriais a partir do dia 16° até 72° dias da gestação e é também dependente das secreções de progesterona (ELLENBERGER et al., 2008). São pertencentes ao grupo de enzimas fosfatase ácida e com massa molecular de 35 kDa (MCDOWELL et al., 1982). A função da uteroferrina é transportar ferro através das células do trofoblasto ou via membranas de vesículas celulares (WOODING et al., 2000, 2001). A uteroferrina não está elevada durante toda a gestação. A formação de cálices endometriais estimula um aumento no estrogênio sérico que é sugerido como fator estimulador da produção uterina de uteroferrina. Em éguas ovariectomizadas, a administração de progesterona aumenta as secreções uterinas de uteroferrina e essa secreção também foi amplificada pelo estrogênio (MCDOWELL; SHARP; GRUBAUGH, 1987).

O crescimento e desenvolvimento embrionários até a implantação são mantidos por secreções endometriais denominada histotrofo (Crossett et al., 1996). Os aminoácidos de origem materna são essenciais para a síntese de proteínas, funções celulares e nutrição do embrião nos primeiros dias de vida (VAN WINKLE 2001; HYDE et al. 2003; MARTIN et al. 2003; BAZER et al. 2015). Os transportadores de aminoácidos nas membranas do endométrio e concepto são expressos no início da gestação. O embrião é dependente dos fatores histotróficos nos primeiros 40 dias, sendo assim as membranas do concepto recrutam transportadores de aminoácidos para o fornecimento de nutrientes necessários para o crescimento embrionário e desenvolvimento placentário (GIBSON et al., 2018).

Existem algumas descrições sobre proteínas das células endometriais de éguas cultivadas “*in vitro*”, colhidas 12 a 14 dias após a ovulação, foram classificadas com ponto isoelétrico entre 5,5 a 6,5 e massa molecular de 22 e 60 Kda (MCDOWELL et al., 2004). As apolipoproteínas foram identificadas por transcriptômica e proteômica no endométrio e embrião equino, sendo mais um grupo de proteínas atribuídas a nutrição do embrião e ao transporte de lipídeos (KLEIN; TROEDSSON, 2011; SWEGEN et al., 2017).

Éguas gestantes ou cíclicas apresentam proteínas com diferentes abundâncias. As proteínas identificadas foram relacionadas com o transporte de lipídeos através da cápsula e do concepto (uterocalina), motilidade uterina (ACTB, CAPZB), metabolismo e geração de ATP (ARK1A1, IDH1, ENO1, CKB), tolerância imunológica materna (FGB, HP, GC), proliferação e diferenciação celular (14-3-3, CLIC1, HSPA8, HSP90AA1) e angiogênese (HP, CLIC1). Algumas alterações como degeneração endometrial crônica podem causar deficiência na produção histotrófica durante o período pré-implantação e acarretar perda embrionária (MORRIS and ALLEN 2002; ALLEN et al. 2007).

Há algumas hipóteses de prováveis proteínas que estão relacionadas com as alterações no ambiente uterino antes da entrada do concepto no útero. A presença do concepto muda o ambiente uterino, os vasos sanguíneos uterinos aumentam de calibre, o número de células diminui e apresenta material histotrófico entre as dobras uterinas. A investigação de proteínas durante a fase de estro e diestro de éguas identificou 10 proteínas relevantes. Estas proteínas foram relacionadas com defesa, resposta inflamatória e imunológica, durante o

estro, e atividades de transporte de pequenas moléculas e resposta imune (MALONEY, et al., 2018).

As proteínas do fluido uterino de éguas inseminadas e colhido no 5º dias após a ovulação são relacionadas com o metabolismo de ferro e a tolerância imunológica. Provavelmente um mecanismo de sinalização do sistema imunológico ao reconhecimento materno (LANCHEROS-BUITRAGO et al., 2019). Assim como as proteínas reguladoras da síntese de prostaglandina estão presentes no reconhecimento materno da gestação prostaglandina redutase 1 (PTGR1), glutathione transferase 1 (GSTP1) e anexina A1 (ANXA1) (SMITS et al., 2018). No 7º dia após ovulação algumas proteínas são mais abundantes em éguas gestantes, relacionadas com o transporte de lipídios através da cápsula, motilidade uterina, metabolismo e geração de ATP, tolerância imunológica materna, proliferação celular e diferenciação e angiogênese (CAMOZZATO et al., 2019; BASTOS et al., 2019). A ceruplasmina é uma proteína de resposta positiva a fase aguda da inflamação. Já as proteínas serotransferrina e a albumina têm respostas opostas ao da ceruplasmina. Estão envolvidas no mesmo processo biológico responsável pela homeostase celular de íons de ferro, função de ligação e podem ser encontrados em exossomos (GRUYS et al., 2005; LANCHEROS-BUITRAGO et al., 2019). O aumento dos níveis séricos de ceruplasmina está associado com o estresse oxidativo, manutenção e controle homeostase do processo redox e inflamatório (SKARŽYŃSKA et al., 2018).

Alterações no proteoma do fluido uterino durante o desenvolvimento embrionário inicial em éguas estão relacionadas com a presença do concepto, sugerindo que podem ser importantes para o desenvolvimento embrionário e reconhecimento materno da gestação (BASTOS et al., 2018). Alguns estudos estão contribuindo para a compreensão do reconhecimento materno da gestação em equinos, mas até neste momento continuam incertos quais os fatores envolvidos neste processo.

REFERÊNCIAS*

ABABNEH, M. M.; TROEDSSON, M. H.; MICHELSON, J. R.; SEGUIN, B. E.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

Partial characterization of an equine conceptus prostaglandin inhibitory factor. **Journal Reproduction Fertility Supplementary**, v. 56, , p. 607–613, 2000.

ALLEN, W. R. The Physiology of Early Pregnancy in the Mare. **Proc. Annu. Conv. Am. Assoc. Equine Practnr**, p. 338–354, 2000.

ALLEN, W. R. Luteal Deficiency and Embryo Mortality in the Mare. **Reproductive Domestic Animal**, v. 36, p. 121–131, 2001.

ALLEN, W. R.; STEWART, F. Equine placentation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 13, p. 623–634, 2001.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S. A review of implantation and early placentation in the mare. **Placenta**, v. 30, n. 12, p. 1005–15, 2009.

ARAR, S.; CHAN, K. H.; QUINN, B. A.; WAELCHLI, R. O.; HAYES, M. A.; BETTERIDGE, K. J.; MONTEIRO, M. A. Desialylation of core type 1 O-glycan in the equine embryonic capsule coincides with immobilization of the conceptus in the uterus. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 8, p. 1110–1115, 2007.

ATLI, M. O.; KURAR, E.; KAYIS, S. A.; ASLAN, S.; SEMACAN, A.; CELIK, S.; GUZELOGLU, A. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1–2, p. 124–132, 2010.

AURICH, C.; BUDIK, S. Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandins in early equine embryos. **in: Proceedings of a Workshop on Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare III.**, p. 31–32, 2004.

AURICH, C.; BUDIK, S. Early pregnancy in the horse revisited – does exception prove the rule? **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 50, 2015.

BAE, S. E.; WATSON, E. D. A light microscopic and ultrastructural study on the presence and location of oxytocin in the equine endometrium. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 909–921, 2003.

BALL, B. A. Embryonic loss in mares. Incidence, possible causes, and diagnostic considerations. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 4, n. 2, p. 263–290, 1988.

BALL, B. A.; LITTLE, T. V.; HILLMAN, R. B.; WOODS, G. L. Pregnancy rates at Days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares. **Theriogenology**, v. 26, n. 5, p. 611–619, 1986.

BARUA, S.; MACEDO A.; KOLB, D. S.; WYNNE-EDWARDS, K. E.; KLEIN, C. Milk-fat globule epidermal growth factor 8 (MFGE8) is expressed at the embryo-fetal-maternal interface in equine pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, p. 585-590, 2018.

BASTOS, H. B. A.; MARTINEZ, M. N.; CAMOZZATO, G. C.; ESTRADÉ, M. J.; BARROS, E.; VITAL, C. E.; VIDIGAL, P. M. P.; MEIKLE, A.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Proteomic profile of histotroph during early embryo development in mares. **Theriogenology**, v. 125, p. 224–235, 2018.

BATTUT, I.; COLCHEN, S.; FIENI, F.; TAINTURIER, D.; BRUYAS, J. F. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. **Equine veterinary journal. Supplement**, v. 25, n. 25, p. 60–62, 1998.

BAZER, F. W.; OTT, T. L.; SPENCER, T. E. Endocrinology of the transition from recurring estrous cycles to establishment of pregnancy in sub-primate mammals. In: **In: Bazer F.W. (eds) Endocrinology of Pregnancy. Contemporary Endocrinology**, Humana Pre ed. [s.l.: s.n.]p. 1998.

BAZER, F. W.; THATCHER, W. W. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F_{2α} by the uterine endometrium. **Prostaglandins**, v. 14, n. 2, p. 397–401, 1977.

BEHRENDT-ADAM, C. Y.; ADAMS, M. H.; SIMPSON, K. S.; MCDOWELL, K. J. Oxytocin-Neurophysin I M Rna Abundance in Equine. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 16, n. 3, p. 183–192, 1999.

BEIER-HELLWIG, K.; KREMER, H.; BONN, B.; LINDER, D.; BANDER, H.; BEIER, H. M. Partial Sequencing and Identification of Three Proteins from Equine Uterine Secretion Regulated by Progesterone. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 30, p. 295–298, 1995.

BERGLUND, L. A.; SHARP, D. C.; VERNON, M. W.; THATCHER, W. W. Effect of pregnancy and collection technique on prostaglandin F in the uterine lumen of Pony mares. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 32, p. 335–341, 1982.

BERRIDGE, M. J.; IRVINE, R. F. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. **Nature**, v. 312, n. 22, p. 315–321, 1984.

BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 824–840, 2006.

BETTERIDGE, K. J. Comparative aspects of equine embryonic development. p. 691–702, 2000.

BETTERIDGE, K. J. Equine embryology: An inventory of unanswered questions. **Theriogenology**, v. 68, p. S9–S21, 2007.

BETTERIDGE, K. J.; EAGLESOME, M. D.; MITCHELL, D.; FLOOD, P. F.; BERIAULT, R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **Journal of anatomy**, v. 135, n. Pt 1, p. 191–209, 1982.

BIRTS, C. N.; BARTON, C. H.; WILTON, D. C. A catalytically independent physiological function for human acute phase protein group IIA phospholipase A2: cellular uptake facilitates cell debris removal. **Journal Biology Chemical**. v. 283, p. 5034–5045, 2007.

BOCCA, S. M.; ANDERSON, S.; AMAKER, B.; SWANSON, R. J.; FRANCHI, A.; LATTANZIO, F.; OEHNINGER, S. Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8): a novel protein in the mammalian endometrium with putative roles in implantation and placentation. **Placenta**, v. 33, n. 10, p. 795-802, 2012.

BOERBOOM, D.; BROWN, K. A.; VAILLANCOURT, D.; POITRAS, P.; GOFF, A. K.; WATANABE, K.; DORÉ, M.; SIROIS, J. Expression of Key Prostaglandin Synthases in Equine Endometrium During Late Diestrus and Early Pregnancy1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 2, p. 391–399, 2004.

BOGLÁRKA, V.; ANDRÁS, G.; MARGIT, K.; FERENC, B.; ÁDÁM, B.; GYÖRGY, T. H.; OTTÓ, S. Equine alpha-fetoprotein levels in Lipizzaner mares with normal pregnancies and with pregnancy loss **Theriogenology**. v. 84, p. 1581–1586, 2015.

BURGHARDT, R. C.; BURGHARDT, J. R.; TAYLOR, J. D.; REEDER, A. T.; NGUEN, B. T.; SPENCER, T. E. Enhanced focal adhesion assembly reflects increased mechanosensation and mechanotransduction at maternal-conceptus interface and uterine wall during ovine pregnancy. **Reproduction**. v. 137, n. 3, p. 567–82. 2009.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C. Pregnancy: Physiology and Diagnosis. In: **Manual of Equine Reproduction**. 3 ra ed. ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2011. p. 85–93.

BROSNAHAN, M. M.; MILLER, D. C.; ADAMS, M.; ANTCZAK, D. F. IL-22 Is Expressed by the Invasive Trophoblast of the Equine (*Equus caballus*) Chorionic Girdle. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 9, p. 4181–4187, 2012.

BYLANDER, A.; NUTU, M.; WELLANDER, R.; GOKSÖR, M.; BILLIG, H.; LARSSON, D. J. Rapid effects of progesterone on ciliary beat frequency in the mouse fallopian tube. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 48, 2010.

CAIXETA, E. S.; FAGUNDES, N. S.; CAIXETA, M. S.; PYLES, E. S. S. Desenvolvimento embrionário inicial equino-Revisão. **Revista portuguesa de ciencias veterinarias**, v. 103, n. 14, p. 25–34, 2008.

CAMOZZATO, G. C.; MARTINEZ, M. N.; BASTOS, H. B. A.; FIALA-RECHSTEINER, S.; MEIKLE, A.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Ultrastructural and histological characteristics of the endometrium during early embryo development in mares. **Theriogenology**. v. 1, n. 123, p.1-10, 2019.

CANISSO, I. F.; BALL, B. A.; SCOGGIN, K. E.; SQUIRES, E. L.; WILLIAMS, N. M.; TROEDSSON, M. H. Alpha-fetoprotein is present in the fetal fluids and is increased in plasma of mares with experimentally induced ascending placentitis. **Animal Reproduction Science**. v. 154, p.48–55, 2015.

CERIANI, R. L.; PETERSON, J. A.; LEE, J. Y.; MONCADA, R.; BLANK, E. W. Characterization of cell surface antigens of human mammary epithelial cells with monoclonal antibodies prepared against human milk fat globule. **Somatic Cell Genetic**, v. 9, n. 4, p. 415-427, 1983.

CHALLIS, J. R. G.; MATTHEWS, S. G.; GIBB, W.; LYE, S. J. Endocrine and paracrine of birth at term and preterm. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 5, p. 514–550, 2000.

CHU, J. W. K.; SHAROM, F. J.; ORIOL, J. G.; BETTERIDGE, K. J.; CLEAVER, B. D.; SHARP, D. C. Biochemical changes in the equine capsule following prostaglandin- induced pregnancy failure. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, n. 3, p. 286–295, 1997.

CHUAI, M.; WEIJER, C. J. Regulation of cell migration during chick gastrulation. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 19, n. 4, p. 343–349, 2009.

COCHET, M.; VAIMAN, D.; LEFÈVRE, F. Novel interferon delta genes in mammals: Cloning of one gene from the sheep, two genes expressed by the horse conceptus and discovery of related sequences in several taxa by genomic database screening. **Gene**, v. 433, n. 1–2, p. 88–99, 2009.

CROSSETT, B., ALLEN, W. R. AND STEWART, F. A 19 kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. **Biochemical Journal**. v. 320, p. 137-143, 1996.

CROSSETT, B.; SUIRE, S.; HERRLER, A.; ALLEN, W. R.; STEWART, F. Transfer of a Uterine Lipocalin from the Endometrium of the Mare to the Developing Equine Conceptus¹. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 3, p. 483–490, 1998.

CRUMP, A.; DONALDSON, W. L.; MILLER, J.; KYDD, J. H.; ALLEN, W. R.; ANTCZAK, D. F. Expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens on horse trophoblast. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 35, p. 379–388, 1987.

DE RUIJTER-VILLANI, M.; VAN TOL, H. T. A.; STOUT, T. A. E. Effect of pregnancy on endometrial expression of luteolytic pathway components in the mare. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 5, p. 834–845, 2015.

DEGRELLE, S. A.; LÊCAO, K. A.; HEYMAN, Y.; EVERTS, R. E.; CAMPION, E.; RICHARD, C.; DUCROIX-CRÉPY, C.; TIAN, X. C.; LEWIN, H. A.; RENARD, J. P.; ROBERT-GRANIÉ, C.; HUE, I. A small set of extra-embryonic genes defines a new landmark for bovine embryo staging. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 79–89, 2011.

DENKER, H. W. .; BETTERIDGE, K. J. .; SIROIS, J. S. Shedding of the capsule and proteinase activity in the horse. **Journal Reproduction and fertility. Supplement**, v. 35, p. 708, 1987.

DENKER HW. Structural Dynamics and Function of Early Embryonic Coats. **Cells Tissues Organs**, n. 166, p. 180–207, 2000.

DONALDSON, W. L.; ZHANG, C. H.; ORIOL, J. G.; ANTCZAK, D. F. Invasive equine trophoblast expresses conventional class I major histocompatibility complex antigens. **Development**, v. 110, n. 1, p. 63–71, 1990.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Concentration of prostaglandins F in uterine venous plasma of anesthetized mares during the estrous cycle and early

pregnancy. **Prostaglandins**, v. 11, n. 2, p. 251–260, 1976.

EALY, A. D.; EROH, M. L.; SHARP, D. C. Prostaglandin H synthase Type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. **Animal reproduction science**, v. 117, n. 1–2, p. 99–195, 2010.

ELLENBERGER, C.; WILSHER, S.; ALLEN, W. R.; HOFFMANN, C.; KÖLLING, M.; BAZER, F. W.; KLUG, J.; SCHOON, D.; SCHOON, H. A. Immunolocalisation of the uterine secretory proteins uterocalin, uteroferrin and uteroglobin in the mare's uterus and placenta throughout pregnancy. **Theriogenology**, v. 70, n. 5, p. 746–757, 2008.

ENDERS, A. C.; LIU, I. K. Lodgement of the equine blastocyst in the uterus from fixation through endometrial cup formation. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 44, p. 427–438, 1991a.

ENDERS, A. C.; LIU, I. K. M. Trophoblast- Uterine Interactions During Equine Chorionic Girdle Cell Maturation , Migration , and Transformation. **The american journal of anatomy**, v. 192, p. 366–381, 1991b.

EVANS, H. M.; L, E.; GUSTUS; SIMPSON, M. E. Concentration of the gonadotropov hormone in pregnant mare's serum. **Journal of experimental medicine**, v. 58, n. 5, p. 569–574, 1988.

EVANS, J.; HUTCHISON, J.; SALAMONSEN, L. AL.; GREENING, D. W. Proteomic insights into endometrial receptivity and embryo-endometrial epithelium interaction for implantation; critical determinants of fertility. **Proteomics**, v. 20, p. 1, 2019.

FRANCHI, A.; BOCCA, S.; ANDERSON, S.; RIGGS, R.; OEHNINGER, S. Expression of milk fat globule EGF-factor 8 (MFG-E8) mRNA and protein in the human endometrium and its regulation by prolactin. **Molecular Human Reproduction**, v. 17, n. 6, p. 360-371, 2011.

GADELLA, B. M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.229-236, 2008.

FLOOD, P. F.; JONG, A.; BETTERIDGE, K. J. The location of eggs retained in the oviducts of mares. **Journal of Reproduction and fertility**, v. 57, n. 2, p. 291–294, 1979.

GAIVÃO, M. M. F.; RAMBAGS, B. P. B.; STOUT, T. A. E. Gastrulation and the establishment of the three germ layers in the early horse conceptus. **Theriogenology**. p. 1–12, 2014.

GALBRAITH, C. G.; YAMADA, K. M.; SHEETZ, M. P. The relationship between force and focal complex development. **Journal Cell Biology**. v. 159, n. 4, p. 695–705, 2002.

GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Factor related to the time of fixation of the conceptus in mares. **Theriogenology**, n. 96, p. 1171–1180, 1996.

GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; TORRES, C. A. A.; GINTHER, O. J. Effect of PGE₂ on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology**, v. 50, n. 7, p. 989–999, 1998.

GEISERT, R. D.; WHYTE, J. J.; MEYER, A. E.; MATHEW, D. J.; JUÁREZ, M. R.; LUCY, M. C.; PRATHER, R. S.; SPENCER, T. E. Rapid conceptus elongation in the pig: An interleukin 1 beta 2 and estrogen-regulated phenomenon. **Molecular Reproduction Development**. v. 84, p. 760-774, 2017.

GILBERT, S. F. Early embryonic development. In: **Developmental biology**. Ninth edit ed. Sunderland, MA: S.F. Sinauer Associates, Inc, 2010. p. 175–325.

GIBSON, C.; RUIJTER-VILLANI, M.; RIETVELD, J.; STOUT, T. A. E. Amino acid transporter expression in the endometrium and conceptus membranes during early equine pregnancy **Reproduction, Fertility and Development**, 2018.

GIBSON, C.; RUIJTER-VILLANI, M.; RIETVELD, J.; STOUT, T. A. E. Expression of glucose transporters in the endometrium and early conceptus membranes of the horse. **Placenta**. v. 68, p. 23–32, 2018.

GINTHER, O. J. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 19, n. 4, p. 603–611, 1983a.

GINTHER, O. J. Fixation and orientation of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 19, n. 4, p. 613–623, 1983b.

GINTHER, O. J. Mobility of twin embryonic vesicles in mares. **Theriogenology**, v. 22, n. 1, p. 83–95, 1984.

GINTHER, O. J. Embryonic loss in mares: Incidence, time of occurrence, and hormonal involvement. **Theriogenology**, v. 23, n. 1, p. 77–89, 1985a.

GINTHER, O. J. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, n. S3, p. 41–47, 1985b.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. Second ed, ed. WI, USA: Equiservices Publishing, 1992.

GOFF, A. K.; LEDUC, S.; POITRAS, P.; VAILLANCOURT, D. Steroid synthesis by equine conceptuses between days 7 and 14 and endometrial steroid metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 10, n. 3, p. 229–236, 1993.

GOFF, A.; PONTBRIAND, D.; SIROIS, J. Oxytocin stimulation of plasma 15-keto-13, 14-dihydro prostaglandin F-2 alpha during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. **Journal of reproduction and fertility, Supplement**, v. 35, p. 253–260, 1987.

GROSS, T. S.; THATCHER, W. W.; HANSEN, P. J.; JOHNSON, J. W.; HELMER, S. D. Presence of an intracellular endometrial inhibitor of prostaglandin synthesis during early pregnancy in the cow. **Prostaglandins**, v. 35, n. 3, p. 359–378, 1988.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **J Zhejiang Journal of Zhejiang University Science B**. v. 6, n. 11, p. 1045–56, 2005.

HABENICHT, A. J. R.; GOERIG, M.; GRULICH, J.; ROTHE, D.; GRONWALD, R.; LOTH, U.; SCHETTLER, G.; KOMMERELL, B.; ROSS, R. Human platelet-derived growth factor stimulates prostaglandin synthesis by activation and by rapid de novo synthesis of cyclooxygenase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, n. 4, p. 1381–1387, 1985.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Monole, 2004.

HAYES, M. A.; QUINN, B. A.; KEIRSTEAD, N. D.; KATAVOLOS, P.; WAELCHLI, R.O.; BETTERIDGE, K. J. Proteins Associated With the Early Intrauterine Equine Conceptus. **Reproduction Domestic Animal**. v. 43, n. 2, p. 232–237. 2008.

HANDLER, J.; KÖNIGSHOFER, M.; KINDAHL, H.; SCHAMS, D.; AURICH, C. Secretion patterns of oxytocin and PGF2 α -metabolite in response to cervical dilatation in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 59, n. 5–6, p. 1381–1391, 2003.

HERRLER, A.; PELL, J. M.; ALLEN, W. R.; BEIER, H. M.; STEWART, F. Horse Conceptuses Secrete Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 31. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1804–1811, 2000.

HINRICHS, K.; SERTICH, P. L.; PALMER, E.; KENNEY, R. M. Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 80, n. 2, p. 395–401, 1987.

HOFFMANN, C.; BAZER, F. W.; KLUG, J.; ALLEN, W. R.; AUPPERLE, H.; ELLENBERGER, C.; SCHOON, H. A. Morpho-functional studies regarding the pathogenesis of equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions-preliminary results. **Pferdeheilkunde**, v. 19, n. 6, p. 666–669, 2003.

HOLTAN, D. W.; HOUGHTON, E.; SILVER, M.; FOWDEN, A. L.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D. Plasma progestagens in the mare, fetus and newborn foal. **Journal of reproductive and fertility. Supplement**, v. 44, p. 517–528, 1991.

IDKOWIAK, J.; WEISHEIT, G.; PLITZNER, J.; VIEBAHN, C. Hypoblast controls mesoderm generation and axial patterning in the gastrulating rabbit embryo. **Development Genes and Evolution**, v. 214, n. 12, p. 591–605, 2004.

KASHYAP, R.; JAIN, A.; NALESNIK, M.; CARR., B; BARNES, J.; VARGAS, H. E. Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein in adults and children. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 46, p. 1709–13, 2001.

KASTELIC, J. P.; ADAMS, G. P.; GINTHER, O. J. Role of progesterone in mobility, fixation, orientation, and survival of the equine embryonic vesicle. **Theriogenology**, v. 27, n. 4, p. 655–663, 1987.

KATZ, B. Z.; ZAMIR, E.; BERSHADSKY, A.; KAM, Z.; YAMADA, K. M.; GEIGER, B. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. **Molecular Biology Cell**. v. 11, n. 3, p. 1047–60, 2000.

KHALIFEH-SOLTANI, A.; MCKLEROY, W.; SAKUMA, S.; CHEUNG, Y. Y.; THARP, K.; QIU, Y.; TURNER, S. M.; CHAWLA, A.; STAHL, A.; ATABAI, K.

Mfge8 promotes obesity by mediating the uptake of dietary fats and serum fatty acids. **Nature Medicine**. v. 20, n. 2, p. 175–183, 2014.

KENNEDY, M. W. Uterocalin – Provider of Essential Lipids and Amino Acids To the Pre-Placentation Equine Conceptus. in: **Proceedings of a Workshop on Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare III.**, n. 16, p. 53–56, 2004.

KINDAHL, H.; KNUDSEN, O.; MADEJ, A.; EDQVIST, L. E. Progesterone, prostaglandin F-2 alpha, PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare. **Journal of Reproductive and Fertility**, v. 32, p. 353–359, 1982.

KLEIN, C.; SCOGGIN, K. E.; AELY, A. D.; TROEDSSON, M. H. T. Transcriptional Profiling of Equine Endometrium During the Time of Maternal recognition of pregnancy. **Biology of reproduction**, v. 83, n. 1, p. 102–103, 2010.

KLEIN, C.; TROEDSSON, M. H. T. Transcriptional Profiling of Equine Conceptuses Reveals New Aspects of Embryo-Maternal Communication in the Horse¹. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 5, p. 872–885, 2011.

KLEIN, C. Pregnancy Recognition and Implantation of the Conceptus in the Mare. Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals: Tribute to 45 Year Anniversary of Roger V. Short's "Maternal Recognition of Pregnancy", **Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology**. 216, 2015.

KLEIN, C. Maternal Recognition of Pregnancy in the Context of Equine Embryo Transfer. **Journal of Equine Veterinary Science** v. 41, p. 22–28, 2016.

KLEIN, C.; BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.; EINSPANIER, R.; MEYER, H. H.; SCHMIDT, S. E.; REICHENBACH, H. D.; VERMEHREN, M.; SINOWATZ, F.; BLUM, H.; WOLF, E. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. **Biology Reproduction**. v. 74, n. 2, p. 253-264, 2006.

KLOHONATZ, K. M.; NULTON, L. C.; HESS, A. M.; BOUMA, G. J.; BRUEMMER, J. E. The role of embryo contact and focal adhesions during maternal recognition of pregnancy. **Plos One**. 14 (3): e0213322. 2019.

LANCHEROS-BUITRAGO, J.; RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; GREGORY, J.; BASTOS, H.; CAMACHO, C. A.; CABALLEROS, J. E.; CAZALES, N.; BARROS, E.; JOSÉ DE JESUS SILVA M.; PIMENTEL. A.; MATTOS, R. C. Ceruloplasmin, serotransferrin and albumin presented different abundance in mares' uterine fluid five days after insemination, **Theriogenology**. 2019.

LANE, M.; O'DONOVAN, M. K.; SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E.; GARDNER, D. K. Assessment of metabolism of equine morulae and blastocysts. **Molecular Reproduction Development**. v. 59, p. 33–37, 2001.

LEISINGER, C. A.; MEDINA, V.; MARKLE, M. L.; PACCAMONTI, D. L.; PINTO, C. R. F. Morphological evaluation of Day 8 embryos developed during induced aluteal cycles in the mare. **Theriogenology**, v. 105, p. 178–183, 2018.

LEITH, G. S.; GINTHER, O. J. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 22, n. 4, p. 401–8, 1984.

LEITH, G. S.; GINTHER, O. J. Mobility of the conceptus and uterine contractions in the mare. **Theriogenology**, v. 24, n. 6, p. 701–711, 1985.

LYE, S. J.; OU, C. W.; TEOH, T. G.; ERB, G.; STEVENS, Y.; CASPER, R.; PATEL, F. A.; CHALLIS, J. R. G. The molecular basis of labour and tocolysis. **Fetal and Maternal Medicine Review**, v. 10, n. 3, p. 121–136, 1998.

MALONEY, S. E.; KHAN, F. A.; CHENIER, T. S.; AMORIM, M. D.; HAYES, M. A.; SCHOLTZ, E. L. A comparison of the uterine proteome of mares in oestrus and diestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 3, p. 473–479, 2018.

MORAES, J. G. N.; BEHURA, S. K.; BISHOP, J. V.; HANSEN, T. R.; GEARY, T. W.; SPENCER, T. E. Analysis of the Uterine Lumen in Fertility-Classified Heifers: II. Proteins and Metabolites. **Biology Reproduction**, v. 102, p. 571–587, 2020.

MULLER-SCHOTTLE, F.; BOGUSZ, A.; GROTZINGER, J.; HERRLER, A.; KRUSCHE, C. A.; BEIER-HELLWIG, K.; BEIER, H. M. Full-length complementary DNA and the derived amino acid sequence of horse uteroglobin. **Biology Reproduction**, v. 66, p. 1723–1728, 2002.

MCCRACKEN, J. A.; GLEW, M. E.; SCARAMUZZI, R. J. Corpus luteum regression induced by prostaglandin F₂α. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 25, n. 11, p. 1076–1077, 1970.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; FAZLEABAS, A.; ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W. Partial characterization of the equine uteroferrin-like protein. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 32, p. 329–34, 1982.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; FAZLEABAS, A. T.; ROBERTS, R. M. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins synthesized and released by conceptuses and endometria from pony mares. **Reproduction**, v. 89, n. 1, p. 107–115, 2004.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; GRUBAUGH, W. Comparison of progesterone and progesterone + oestrogen on total and specific uterine proteins in pony mares. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 35, p. 335–42, 1987.

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; GRUBAUGH, W.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. **Biology of reproduction**, v. 39, n. 2, p. 340–8, 1988.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine reproduction**. John Wiley ed. [s.l.: s.n.]

MUKHERJEE, A. B.; ZHANG, Z.; CHILTON, B. S. Uteroglobin: A steroid-inducible immunomodulatory protein that founded the Secretoglobin superfamily. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 7, p. 707–725, 2007.

MÜLLER-SCHÖTTLE, F.; BOGUSZ, A.; GRÖTZINGER, J.; HERRLER, A.; KRUSCHE, C. A.; BEIER-HELLWIG, K.; BEIER, H. M. Full-Length Complementary DNA and the Derived Amino Acid Sequence of Horse Uteroglobin1. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 6, p. 1723–1728, 2005.

MYERS, D. C.; SEPICH, D. S.; SOLNICA-KREZEL, L. Convergence and extension in vertebrate gastrulae: Cell movements according to or in search of identity? **Trends in Genetics**, v. 18, n. 9, p. 447–455, 2002.

NARASIMHA, M.; LEPTIN, M. Cell movements during gastrulation: Come in and be induced. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 169–172, 2000.

NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic acid metabolism. **Annual review of biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 69–102, 1986.

NORDLUND-MÖLLER, L.; ANDERSSON, O.; AHLGREN, R.; SCHILLING, J.; GILLNER, M.; GUSTAFSSON, J. Å.; LUND, J. Cloning , Structure , and Expression of rat binding protein for polychlorinated biphenyls. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 21, p. 12690–12693, 1990.

ORIOLO, J. G.; BETTERIDGE, K. J.; CLARKE, A. J.; SHAROM, F. J. Mucin- like glycoproteins in the equine embryonic capsule. **Molecular Reproduction and Development**, v. 34, n. 3, p. 255–265, 1993.

ORIOLO, J. G.; SHAROM, F. J.; BETTERIDGE, K. J. Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. **Journal of reproduction and fertility**, v. 99, n. 2, p. 653–664, 1993.

OZEL, C.; GUZELOGLU, A.; HITIT, M.; ATLI, O. M.; KURAR, E.; KAYIS, S. A. Expressão das isoformas de fofolipase A2 em endométrio equino durante o ciclo de estro e primeiros gravídeos. **Reprodução, fertilidade e desenvolvimento**, v. 27, n. 1, p. 148, 2014.

QUINN, B. A.; CASWELL, D. E.; LILLIE, B. N.; WAELCHLI, R. O.; BETTERIDGE, K. J.; HAYES, M. A. The GM2-activator protein is a major protein expressed by the encapsulated equine trophoblast. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1–4, p. 391–394, 2006.

QUINN, B. A.; HAYES, M. A.; WAELCHLI, R. O.; KENNEDY, M. W.; BETTERIDGE, K. J. Changes in major proteins in the embryonic capsule during immobilization (fixation) of the conceptus in the third week of pregnancy in the mare. **Reproduction**, v. 134, n. 1, p. 161–170, 2007.

RAESIDE, J. I.; HEATHER, L. C.; RENAULD, R. L.; WAELCHLI, R. O.; BETTERIDGE, K. J. Estrogen Metabolism in the Equine Conceptus and Endometrium During Early Pregnancy in Relation to Estrogen Concentrations in Yolk-Sac Fluid. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1120–1127, 2004.

ROBERTS, R. M.; XIE, S.; MATHIALAGAN, N. Maternal Recognition of Pregnancy. **Biology of reproduction**, v. 54, p. 294–302, 1996.

SAGAL, R. G.; NIETO, A. Cloning and sequencing of the cDNA coding for pig pre-uteroglobin/clara cell10 kDa protein. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 45, n. 1, p. 205–213, 1998.

SIMPSON, K. S.; ADAMS, M. H.; BEHRENDT-ADAM, C. Y.; BAKER, C. B.; MCDOWELL, K. J. Differential gene expression in day 12 and day 15 equine conceptuses. **Journal of reproduction and fertility**. v. 56, p. 539–547, 2000.

SHARP, D. C.; THATCHER, M.; SALUTE, M. E.; FUCHS, A. Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin induced prostaglandin F₂ α release during the oestrous cycle and early pregnancy in pony mares. **Journal of reproduction and fertility**, v. 109, p. 137–144, 1997.

SKARŻYŃSKA, E.; ZBOROWSKA, H.; JAKIMIUK, A. J.; KARLIŃSKA, M.; LISOWSKA-MYJAK, B. Variations in serum concentrations of C-reactive protein, ceruloplasmin, lactoferrin and myeloperoxidase and their interactions during normal human pregnancy and postpartum period. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 46, p. 83-7, 2018.

SHIMIZU, T.; WOLFE, L. S. Arachidonic Acid Cascade and Signal Transduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 55, n. 1, p. 1–15, 1990.

SINGH, G.; KATYAL, S. L.; BROWN, W. E.; PHILLIPS, S.; KENNEDY, A. L.; ANTHONY, J.; SQUEGLIA, N. Amino-acid and cDNA nucleotide sequences of human Clara cell 10 kDa protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 950, n. 3, p. 329–337, 1988.

SMITS, K.; GOVAERE, J.; PEELMAN, L. J.; GOOSSENS, K.; DE GRAAF, D. C.; VERCAUTEREN, D.; VANDAELE, L.; HOOGEWIJS, M.; WYDOOGHE, E.; STOUT, T.; VAN SOOM, A. Influence of the uterine environment on the development of in vitro-produced equine embryos. **Reproduction**, v. 143, n. 2, p. 173–181, 2012.

SMITS, K.; WILLEMS, S.; VAN STEENDAM, K.; VAN DE VELDE, M.; DE LANGE, V.; VERVERS, C.; ROELS, K.; GOVAERE, J.; VAN NIEUWERBURGH, F.; PEELMAN, L.; DEFORCE, D.; VAN SOOM, A. Proteins involved in embryo-maternal interaction around the signalling of maternal recognition of pregnancy in the horse. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5249, 2018.

SOLNICA-KREZEL, L. Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation. **Current Biology**, v. 15, n. 6, p. 213–228, 2005.

SORENSEN, K.; NEELY, D. P.; READ, W.; GRAPPELL, P. M. Measurement and clinical significance of equine fetal protein in pregnant mares serum. **Journal Equine Veterinary Science**. v. 10, p. 417–21, 1990.

SQUIRES, E. L.; GINTHER, O. J. Follicular and luteal development in pregnant mares. **Journal of reproductive and fertility. Supplement**, n. 23, p. 429–433, 1975.

STARBUCK, G. R.; STOUT, T. A. E.; LAMMING, G. E.; ALLEN, W. R.; FLINT, A. P. F. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, n. 2, p. 173–179, 1998.

STEWART, F.; ALLEN, W. R.; MOOR, R. M. Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. **Journal of endocrinology**, v. 71, p. 371–382, 1976.

STEWART, F.; GERSTENBERG, C.; SUIRE, S.; ALLEN, W. R. Imunolocalização

de uma nova proteína (P19) no endométrio de éguas férteis e subférteis. **Journal of reproduction and fertility, Suplement**, v. 56, p. 593–599, 2000.

STEWART, F.; KENNEDY, M. W.; SUIRE, S. A novel uterine lipocalin supporting pregnancy in equids. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 10, p. 1373–1378, 2000.

STOUT, T. A. E. Equine embryo transfer : review of developing potential. **Equine veterinary Journal**, v. 38, n. 5, p. 467–478, 2006.

STOUT, T. A. E. Embryo-maternal communication during the first 4 weeks of equine pregnancy. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 349–354, 2016.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. The role of oxytocin in luteolysis in the cycling mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, n. 3–4, p. 351–354, 1999.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 121, n. 5, p. 771–775, 2001.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Prostaglandin E2 and F2 α production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. **Reproduction**, v. 123, n. 2, p. 261–268, 2002.

STOUT, T. A. E.; MEADOWS, S.; ALLEN, W. R. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 3–4, p. 269–281, 2005.

SUIRE, S.; STEWART, F.; BEAUCHAMP, J.; KENNEDY, M. W. Uterocalin, a lipocalin provisioning the preattachment equine conceptus: fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization. **Biochemical Journal**, v. 356, n. 2, p. 369–376, 2001.

SWEGEN, A.; GRUPEN, C. G.; GIBB, Z.; BAKER, M. A.; DE RUIJTER-VILLANI, M.; SMITH, N. D.; STOUT, T. A. E.; AITKEN, R. J. From Peptide Masses to Pregnancy Maintenance: A Comprehensive Proteomic Analysis of The Early Equine Embryo Secretome, Blastocoel Fluid, and Capsule. **Proteomics**, v. 17, n. 17–18, p. 1–13, 2017.

TACHIBANA, Y.; SAKURAI, T.; BAI, H.; SHIOTA, K.; NAMBO, Y.; NAGAOKA, K.; IMAKAWA, K. RNA-seq analysis of equine conceptus transcripts during embryo fixation and capsule disappearance. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e114414, 2014.

TAYLOR, M. R.; COUTO, J. R.; SCALLAN, C. D.; CERIANI, R. L.; PETERSON, J. A. Lactadherin (formerly BA46), a membrane-associated glycoprotein expressed in human milk and breast carcinomas, promotes Arg- Gly-Asp (RGD)-dependent cell adhesion. **DNA Cell Biology**. v. 16, n. 7, p. 861–869. 1997.

THATCHER, W. W.; MEYER, M. D.; DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. **Journal of reproduction and fertility. Supplement.**, v. 49, p. 15–28, 1995.

UCHIYAMA, A.; YAMADA, K.; OGINO, S.; YOKOYAMA, Y.; TAKEUCHI, Y.; UDEY, M. C.; ISHIKAWA, O.; MOTEGI, S. MFG-E8 regulates angiogenesis in cutaneous wound healing. **Animal Journal Pathology**. v. 184, n. 7, p. 1981–1990. 2014.

VEJLSTED, M. Embryo cleavage and blastulation. In: HYTTEL P, SINOWATZ F, VEJLSTED F, ET AL. (Ed.). **Essentials of domestic animal embryology**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010. p. 68–78.

VERNON, M. W.; STRAUSS, S.; SIMONELLI, M.; ZAVY, M. T.; AFIADA, C. C. Specific PGF 2α . **Journal of reproduction and fertility, Supplement**, v. 27, p. 421–429, 1979.

VINCZE, B.; SOLYMOSI, N.; DEBNAR, V.; KÚTVÉOLGYI, G.; KRIKO, E.; WÉOLFLING, A.; SZENCI, O. Assessment of equine alpha-fetoprotein levels in mares and newborn foals in the periparturient period **Theriogenology**. v. 122, p. 53-60, 2018.

VON DER DECKEN, V.; DELBRÜCK, H.; HERRLER, A.; BEIER, H. M.; FISCHER, R.; HOFFMANN, K. M. V. Recombinant bovine uteroglobin at 1.6 Å resolution: A preliminary X-ray crystallographic analysis. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 61, n. 5, p. 499–502, 2005.

WÄELCHLI, R. O.; BETTERIDGE, K. J. Osmolality of equine blastocyst fluid from day 11 to day 25 of pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 6, p. 981–988, 1996.

WATSON, E. D. Do mares possess an intracellular endometrial inhibitor of prostaglandin synthesis during early pregnancy? **Theriogenology**, v. 36, n. 1, p. 67–71, 1991.

WATSON, E. D.; SERTICH, P. L. Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 331–336, 1989.

WEBER, J. A.; FREEMAN, D. A.; VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Prostaglandin E 2 Secretion by Oviductal Transport-Stage Equine Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 4, p. 540–543, 1991.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L.; LICHTENWALNER, A. B. Relaxatory Effect of Prostaglandin E 2 on Circular Smooth Muscle Isolated from the Equine Oviductal Isthmus. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 125–130, 1995.

WESSEL, T.; SCHUCHTER, U.; WALT, H. Ciliary motility in bovine oviducts for sensing rapid non-genomic reactions upon exposure to progesterone. **Hormone and Metabolic Research**, v. 36, n. 3, p. 136–141, 2004.

WILSHER, S.; ALLEN WR. Intrauterine administration of plant oils inhibits luteolysis in the mare. **Equine Veterinary Journal**. v. 43, n. 1, p. 99-105, 2011.

WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; FOWDEN, A. L.; ALLEN, W. R. Separate Sites and Mechanisms for Placental Transport of Calcium, iron and glucose in the equine placenta. **Placenta**, v. 21, p. 635–645, 2000.

WOODING, F. B. P.; MORGAN, G.; FOWDEN, A. L.; ALLEN, W. R. A structural and immunological study of chorionic gonadotrophin production by equine trophoblast girdle and cup cells. **Placenta**, v. 22, n. 8–9, p. 749–767, 2001.

ZAVY, M. T.; CLARK, W. R.; SHARP, D. C.; MICHAEL, R. R.; BAZER, F. W. Comparison of glucose, fructose, ascorbic acid and glucosephosphate isomerase enzymatic activity in uterine flushings from nonpregnant and pregnant guts and pony Mares. **Biology Reproduction**. v. 27 p. 1147–1158, 1982.

HIPÓTESE

- 1) Há expressão proteica diferenciada no fluido uterino de éguas no início da gestação.
- 2) O reconhecimento materno da gestação na égua é mediado por proteínas secretadas pelo embrião ou útero.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Descrever o perfil proteico do fluido uterino no início da gestação e do embrião equino.

Objetivos Específicos

- Identificar e quantificar as proteínas do embrião equino com 7, 10 e 12 dias por espectrometria de massas.
- Analisar o proteoma do fluido uterino no início do período de reconhecimento materno da gestação.
- Relacionar as proteínas secretadas pelo embrião com as possíveis proteínas agregadas ao útero.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2 - Proteínas do fluido uterino de éguas e sua relação no início da migração embrionária

Insights of uterine fluid proteins and its relation with embryo migration in equine

(Artigo redigido segundo as normas da revista Animal Reproduction Science
<https://www.journals.elsevier.com/animal-reproduction-science>)

Rúbia Alves Schmith*, Fabiana Ferreira de Souza, Cezinande de Meira

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

*Autor correspondente: Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, FMVZ, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: rubiaschmith@gmail.com

Todos os autores contribuíram igualmente para este estudo

Resumo

O objetivo deste estudo foi traçar uma relação entre o perfil proteico do embrião equino e do fluido uterino durante a fase inicial do reconhecimento materno da gestação. Foram utilizadas 10 éguas sadias, de 5 a 8 anos de idade. As éguas foram acompanhadas por ultrassonografia diariamente até a detecção de um folículo pré-ovulatório, induzidas e inseminadas. O líquido uterino e os embriões foram colhidos no período gestação (D7, D10 e D12). Após a colheita, os embriões foram lavados em tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,2, sonicados, centrifugados e o sobrenadante armazenado. As amostras de líquido uterino foram centrifugadas e armazenadas para proteômica. A concentração de proteína total foi determinada e uma alíquota foi digerida *in solution*, seguida da análise por espectrometria de massas (ESI Q-TOF MS/MS) com abordagem *shotgun*. Após a análise dos dados, foram identificadas 171 proteínas, sendo 29 no embrião e 142 no líquido uterino. Foram encontradas 15 proteínas diferenciais nos embriões, sendo 10 no grupo D10 e 5 no grupo D12, já no grupo D7 todas as diferenciais se apresentaram com baixa expressão. No líquido uterino, 8 proteínas foram mais relevantes, sendo 1 de maior importância no grupo D7, 3 no grupo D10 e 4 no grupo D12. As principais funções moleculares foram atividade catalítica e de ligação e os processos biológicos mais significativos foram o processo celular e metabólico. Este estudo descreve proteínas que são expressas pelo endométrio e o embrião equino, fornecendo algumas indicações na nutrição do embrião, no metabolismo no período de maior mobilidade embrionária e início do reconhecimento materno da gestação.

Palavras-chave: Equino; Embrião; Proteômica; Reconhecimento-materno-gestação; Útero

1. Introdução

Nos equinos a principal característica do embrião, que o distingue das outras espécies é a sua prolongada mobilidade no lúmen uterino. A partir do dia 9 da gestação a mobilidade aumenta até chegar ao máximo nos dias 11-14. A seguir ocorre a interrupção de movimento entre 15-18 dias (Ginther, 1983; Leith e Ginther, 1984; Stout e Allen, 2001).

A mobilidade intrauterina e a liberação de prostaglandinas tanto pelo útero quanto pelo embrião geram o movimento e a primeira etapa do mecanismo de inibição luteolítica (Ginther, 1983; Stout e Allen, 2001). Nesta fase inicial de mobilidade entre os dias 9 e 11 de gestação, o embrião passa aproximadamente 60% do seu tempo no corpo uterino (Gilbert, 2010).

As contrações e as dobras miométrais facilitam a mobilidade da vesícula, mecanismo que está relacionado com as proteínas reguladoras da síntese de prostaglandinas pelo embrião e endométrio, promovendo as contrações e impulsionando a vesícula. Eventos fundamentais para o reconhecimento materno da gestação e inibição da luteólise (Kastelic, et al., 1987; Gastal et al., 1998; Stout e Allen, 2001; Swegen et al., 2017; Smits et al., 2018).

O momento do reconhecimento materno da gestação em equinos vem sendo estudado, sendo estimado que ocorra entre os dias 12 a 14 (Klein e Troedsson, 2011). Estudos sobre as vias relacionadas ao reconhecimento estão contribuindo para desvendar esse fato (Klein et al., 2010). Nos animais domésticos a interação entre a gestante e o embrião já foi estudada através da espectrometria de massas em bovinos (Munoz, 2012; Forde, 2014), suínos (Jalali et al., 2015), ovinos (Brooks et al., 2016) e equinos (Smits et al., 2018).

Há algumas hipóteses de prováveis proteínas que estão relacionadas com as alterações no ambiente uterino antes da entrada do conceito no útero. O embrião equino sofre modificações nas suas células indiferenciadas até a implantação e se comunica com a fêmea para garantir sua nutrição e sobrevivência (Mcdowell et al., 1993). A presença do embrião muda o ambiente uterino, os vasos sanguíneos uterinos aumentam de calibre, o número de células diminui e apresenta material histotrófico entre as dobras uterinas (Maloney, et al., 2018).

Em éguas gestantes os processos biológicos no útero se relacionam ao transporte de lipídeos, proliferação e diferenciação celular, metabolismo e geração

de ATP, sistema imunológico e angiogênese, sendo que estas alteram o perfil durante o desenvolvimento embrionário (Bastos et al., 2019; Camozzato et al., 2019). O metabolismo de ferro e a tolerância imunológica são provavelmente mecanismos de sinalização do sistema imunológico ao reconhecimento materno (Lancheros-buitrago et al., 2019). A expressão de proteínas no útero foi relacionada aos processos de defesa, resposta inflamatória e imunológica, durante o estro, e atividades de transporte de pequenas moléculas e resposta imune, durante o diestro (Maloney et al., 2018). Dentre as proteínas envolvidas com as funções de transporte de moléculas, destaca-se a uterocalina, uma lipocalina induzida pela progesterona produzida pelo endométrio de éguas gestantes e em diestro. Esta proteína é uma transportadora de lipídeos e aminoácidos (Mcdowell et al., 1993; Suire et al., 2001).

Alterações da proteômica do fluido uterino durante o desenvolvimento embrionário inicial em éguas estão relacionadas com a presença do embrião, sugerindo que podem ser importantes para o desenvolvimento embrionário (BASTOS et al., 2018). Por ter um reconhecimento materno da gestação diferente das outras espécies, estudos são necessários para descrever o perfil proteômico do embrião, do fluido uterino nas diferentes fases do ciclo estral e as interações entre as secreções uterina e o embrião durante a gestação. Deste modo, este estudo tem como objetivo analisar o perfil proteico do embrião equino e correlacionar com as proteínas encontradas no fluido uterino.

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza e obtidos das empresas Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), GE Healthcare Life Sciences (São Paulo, São Paulo, Brazil), Waters Corp. (Barueri, São Paulo, Brazil) e Thermo Fisher Scientific (São Paulo, São Paulo, Brazil), quando não foram citados.

2.2. Aspectos éticos

A pesquisa foi realizada de acordo com os preceitos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e mediante aprovação da Comissão de Ética Institucional no Uso de Animais protocolo

134/2016.

2.3. Seleção de Animais

Este estudo foi realizado no período da estação reprodutiva de 2016/2017, foram incluídas no estudo 10 éguas adultas entre 5 a 10 anos de idade. Selecionadas pelo exame ginecológico e ultrassonográfico. Os critérios de inclusão foram fêmeas mestiças, com exame citológico uterino negativo e cíclicas. As amostras foram colhidas das mesmas fêmeas em ciclos consecutivos e nos casos em que o embrião não foi obtido, um novo ciclo foi aguardado e a colheita repetida. Caso o animal desse negativo em 3 lavados consecutivos era retirado do experimento.

Os animais foram mantidos sob luz natural, alimentados com ração concentrada e feno *coast-cross* (*Cynodon dactylon*), suplementação mineral e a água foi fornecida *ad libitum*.

2.4. Modelo experimental

O desenvolvimento folicular foi acompanhado diariamente até a detecção de um folículo ≥ 35 mm e edema uterino acentuado. Neste momento, a ovulação foi induzida com 2.000 UI de hCG (Chorulon®; MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e a inseminação artificial foi realizada 24 horas após a indução da ovulação com sêmen fresco com 1×10^9 espermatozoides móveis, de um único garanhão de fertilidade comprovada. A ovulação foi confirmada 1 dia (D0) após a inseminação artificial. Nos dias D7 (n = 10), D10 (n = 10) e D12 (n = 10) após a ovulação foram colhidas as amostras de fluido uterino e embriões. Apenas foram utilizados embriões com estágio de desenvolvimento de blastocisto expandido e de qualidade grau 1.

Fluido uterino e embriões foram preparados para análise de proteínas com abordagem *shotgun* (ESI Q-TOF MS/MS), e os resultados foram interpretados e relacionados entre os embriões e fluido uterino (Figura 1).

2.5. Colheita do líquido uterino e dos embriões

O líquido uterino foi colhido nos dias D7, D10 e D12 antes da colheita do embrião. Se após este processo no lavado uterino a colheita do embrião fosse negativa, esta amostra era descartada. Utilizava-se para colheita do líquido uterino

tampão vaginal comercial (Mini OB®; Johnson & Johnson Industrial Ltda., São José dos Campos, Brasil), como descrito e modificado por Malschitzky et al. (2008). O tampão vaginal foi inserido no útero por via transcervical e mantido por 30 minutos. Então, os tampões foram retirados e colocados imediatamente em tubo cônico de 50 mL, centrifugados a 800g por 10 minutos para colheita do líquido e retirada dos debris celulares. O líquido recuperado foi novamente centrifugado a 10.000g, por 1 hora, a 4° C. O sobrenadante foi armazenado a - 80°C até a análise proteômica.

Os embriões foram colhidos após o processo de colheita do líquido por lavagem uterina (Squires et al., 2003), com ringer lactato aquecido à 37° C, realizada com sonda de 11 mm de diâmetro (32 Fr, ref. 19009, Minitube®, Porto Alegre, Brasil) no D7 e 10. Para a colheita dos embriões no D12 foi utilizada sonda de silicone de 15 mm. Após a colheita, os embriões foram lavados 10 vezes em PBS pH 7,2 (130 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 10 mM NaH₂PO₄) e armazenados em PBS pH 7.2 contendo inibidores de proteases (0,8 mmol EDTA, 1,0 µg/mL aprotinina, 1,0 µg/mL leupeptina e 35,0 µg/mL PMSF) à - 80° C.

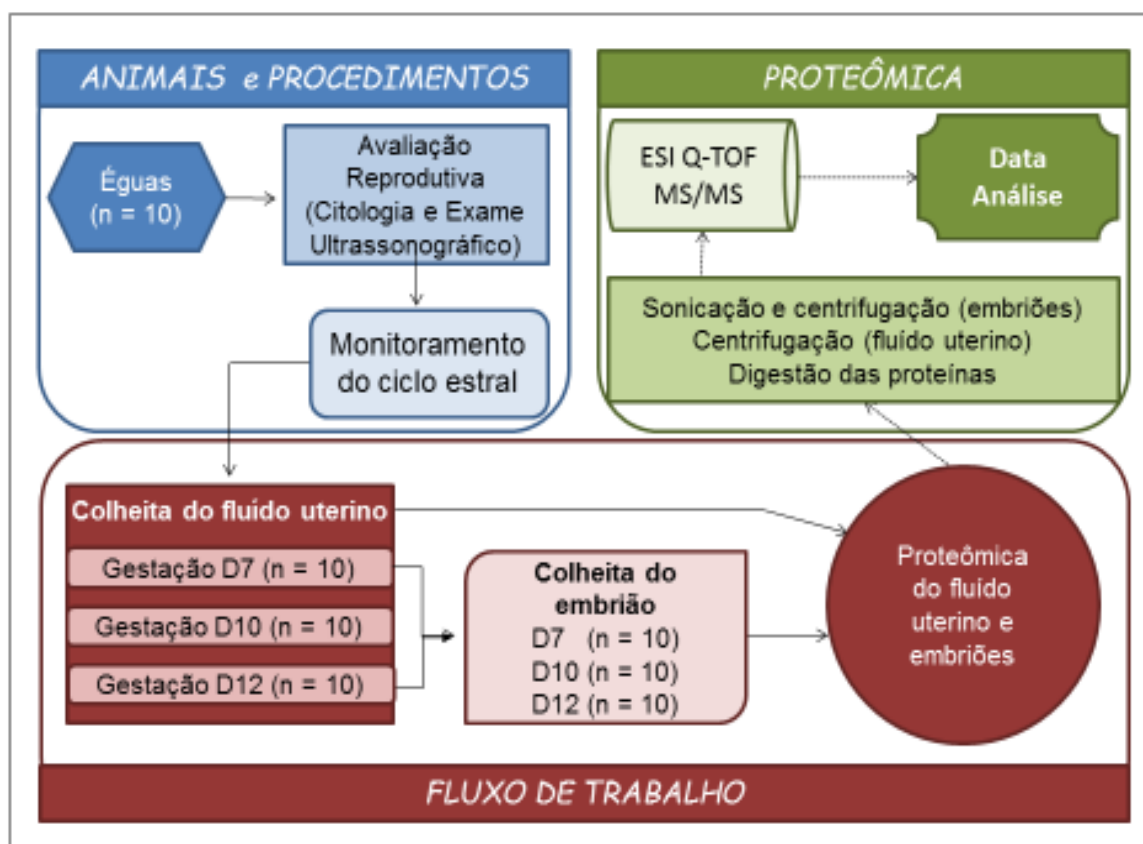


Figura 1. Modelo experimental.

2.6. Proteômica

Os embriões foram descongelados em banho de gelo e sonicados. Foi utilizada probe de 3,0 mm, numa amplitude de 20%, durante 30 segundos em gelo, sendo este procedimento repetido por 10 vezes, com intervalos de um minuto entre as séries. Após a sonicação as amostras de embrião foram centrifugadas a 10.000g, durante 60 minutos, a 4° C e o sobrenadante foi recolhido.

O fluido uterino e extrato proteico obtido dos embriões foram usados para quantificar a concentração de proteína total. A concentração foi mensurada pelo ensaio do ácido bicinonínico (BCA), de acordo com a metodologia descrita por Smith et al. (1985).

A quantificação de proteína total foi confirmada por eletroforese SDS-PAGE. Então, uma alíquota de fluido uterino e dos embriões, contendo 50 µg de proteína foi usada para digestão triptídica de acordo com Codognoto et al. (2018). As amostras foram acrescidas de uma solução aquosa de ureia a 8M na proporção de 1: 2. A redução das pontes dissulfeto foi conduzida com 5 mM de DTT em bicarbonato de amônio 50 mM, por 25 minutos a 56° C em banho seco. A mistura foi homogeneizada e alquilada com 14 mM de iodoacetamida em bicarbonato de amônio 50 mM, mantida por 30 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz. O excesso de iodoacetamida livre (*quench*) foi realizado adicionando-se 5 mM de DTT em bicarbonato de amônio (1: 5). Para reduzir a concentração de ureia para 1,6 M foi acrescida solução aquosa de 1 mM de CaCl₂ na solução final. Em seguida, uma solução de 20 ng/µL de tripsina (proporção de 1: 50 de enzima substrato) foi acrescida na amostra, seguido de uma incubação a 37° C durante 16 horas. Ao final, a ação enzimática da tripsina foi interrompida com 0,4 % de ácido trifluoroacético diluído em solução aquosa e o pH verificado (< 2,0). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2.500g, durante 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para colunas de dessalinização (Sep-Pak C18, Waters Corporation, Milford, MA, USA) após estabilização da coluna de acordo de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram concentradas (SPD1010 Integrated SpeedVac™ System, Waltham, MA, USA) para 1 µL e armazenadas a -20° C até a realização da espectrometria de massas.

Para espectrometria de massas, as amostras foram descongeladas, diluídas

em ácido fórmico 0,1 % na proporção de 0,7 µg de proteína/µL, homogeneizadas em agitador de tubos e centrifugadas a 1.100g por 5 minutos. A seguir, 20 µL do sobrenadante foram depositados em tubos para análise no espectrômetro de massas (Clear glass 12 x 32 mm screw neck total recovery vial com tampa, Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Para análise de proteínas por espectrometria de massas, uma alíquota de 4,5 µL, resultante da digestão dos peptídeos foi separada por uma coluna C18 (100 µm x 100 mm) RP-nano UPLC (Waters® nanoACQUITY UPLC®, Waters Corporation, Milford, MA, USA) acoplada ao espectrômetro de massas Q-TOF (Micromass Q-Tof PREMIER Mass Spectrometer, Waters Corporation, Milford, MA, USA) com fonte de nanoelectrospray, com uma taxa de fluxo de 0,600 µL/minuto. O gradiente de 2-90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico foi usado, durante 60 minutos. A voltagem do nanoelectrospray foi mantida em 3,5 kV, uma voltagem cone de 30 V e temperatura da fonte de 100 µC. O instrumento foi operado em modo *top three*, no qual um espectro de massa (MS) é adquirido seguido por MS/MS dos três picos mais intensos detectados. Após a fragmentação MS/MS, o ion foi mantido na lista de exclusão por 60 segundos e para a análise de peptídeos de clivagem endógena, um tempo de exclusão real foi usado.

Os espectros foram adquiridos usando o software MassLynx v.4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) e os arquivos de dados brutos foram convertidos para um formato de lista de picos (.mgf, mascot generic format) sem somar os *scans* e buscados contra o banco de dados UniprotSProt_012017 (<http://www.uniprot.org/>) taxonomia *Equus caballus*, usando a ferramenta Mascot version 2.3.02 e Mascot Distiller MDRO version 2.4.0.0 (Matrix Science Inc, Boston, MA, USA). A quantificação relativa de cada proteína na mistura foi determinada pelo “*exponentially modified protein abundance index*” (emPAI), obtido pelo software Mascot Distiller (Ishihama et al., 2005).

Os parâmetros de procura incluíram tripsina como protease, com permissão de no máximo de 1 clivagem perdida, carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Tolerância de 0,1 Da para ambos precursores (MS) e fragmento (MS/MS) de íons, e massa molecular monoisotópica foram usados.

2.7. Ontologia gênica

Após identificação proteica, a anotação da ontologia gênica das proteínas resultantes foi obtida no UniprotKB (www.uniprot.org.br) usando as categorias função molecular, processo biológico e componente celular (Boutet et al., 2016). Também foram elaboradas figuras, referentes à ontologia gênica por grupo, cujo dados foram obtidos no Panther version 10 (<http://www.pantherdb.org>, Huaiyu et al., 2016).

2.8. Análise dos dados

Os resultados foram submetidos à análise multivariada. Para isso, as variáveis foram normalizadas. Foram excluídas proteínas dos grupos que não foram encontradas em pelo menos a metade do número de amostras de cada grupo (10 animais). Foi realizada também a soma dos emPAIs de cada animal e o seu valor dividido pelo emPAI de cada proteína, sendo então esse resultado utilizado para a análise estatística.

A divisão dos grupos foi realizada pelo agrupamento não hierárquico, utilizando dados fornecidos pelo usuário. Calculou-se a média de cada *cluster* formando as repetições até que nenhuma das variáveis fosse reatribuída a um *cluster* diferente. Os resultados foram apresentados pela análise dos componentes principais (PCA) para descrever as variações amostrais entre grupos na matriz de pontuação e análise parcial dos quadrados mínimos (PLS-DA) para indicar a relevância proteica na caracterização dos grupos. O PLS-DA foi utilizado para atribuir às amostras de acordo com as classes, indicando a importância das proteínas na classificação e cálculo das variáveis no escore de projeção (pontuação VIP score). Os resultados do ANOVA, seguido pela análise de Fisher's LSD, foram usados para confirmar os resultados do VIP escore fornecido pela análise PLS-DA. As proteínas importantes foram consideradas quando a pontuação VIP foi $\alpha \geq 1$ (Checa et al., 2015).

O software *Metabolomic Data Analysis - MetaboAnalyst version 3.0* (Xia e Wishart, 2016) foi utilizado para as análises.

3. Resultados

Foram identificadas 171 proteínas neste estudo, sendo 29 proteínas encontradas no embrião equino e 142 proteínas detectadas no líquido uterino.

Dentre estas proteínas, 15 diferiram entre os embriões e também no útero, sendo que maior abundância foi observada no D10 e D12.

Os grupos de embriões e fluido uterino foram separados em 3 *clusters* de acordo com a PCA com somatória de PC1 e PC2 de 69% e 54,2%, respectivamente (Figura 2 e 3).

Para que os resultados do estudo fossem mais seguros, os dados obtidos no PLS-DA demonstrados pelo VIP score ($Q_2 = 0,96$ nos embriões e $Q_2 = 0,64$ no fluido uterino) (Figura 4 e 5) foram comparados com o ANOVA e apenas 1 proteína não foi incluída no ANOVA (HSP10) nos grupos de embriões.

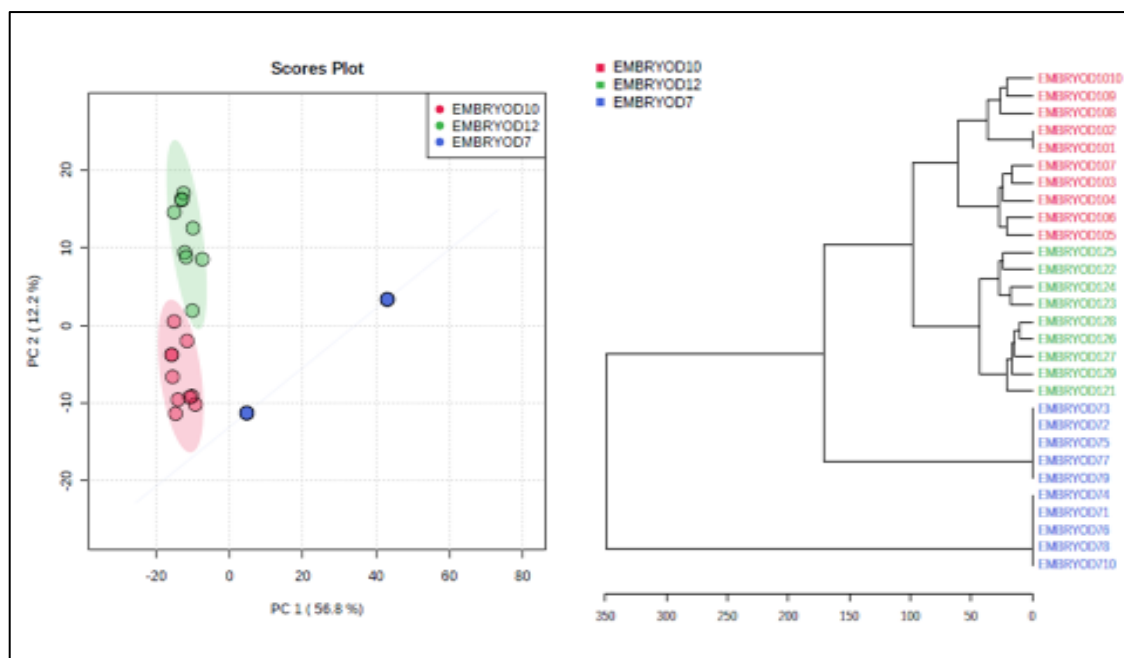


Figura 2. Análise multivariada da proteômica dos embriões D7, D10 e D12. A. Análise de componente principal (PCA), na qual nota-se a somatória de PC1 + PC2 >50%. B. Formação dos *clusters* no dendograma.

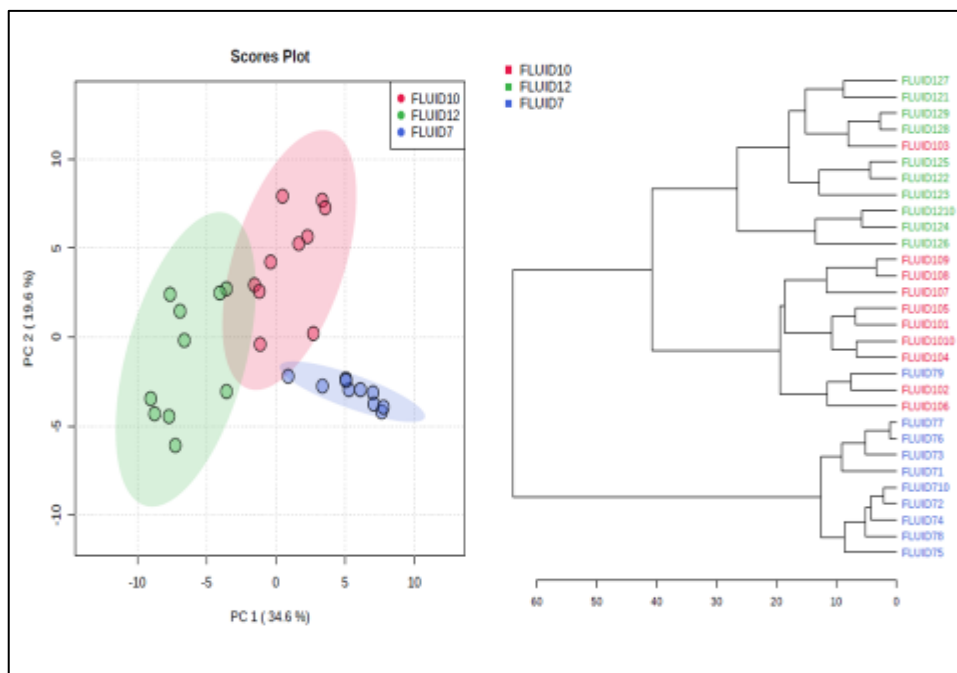


Figura 3. Análise multivariada da proteômica do fluido uterino no D7, D10 e D12. A. Análise de componente principal (PCA), na qual nota-se a somatória de PC1 + PC2 >50%. B. Formação dos *clusters* no dendrograma.

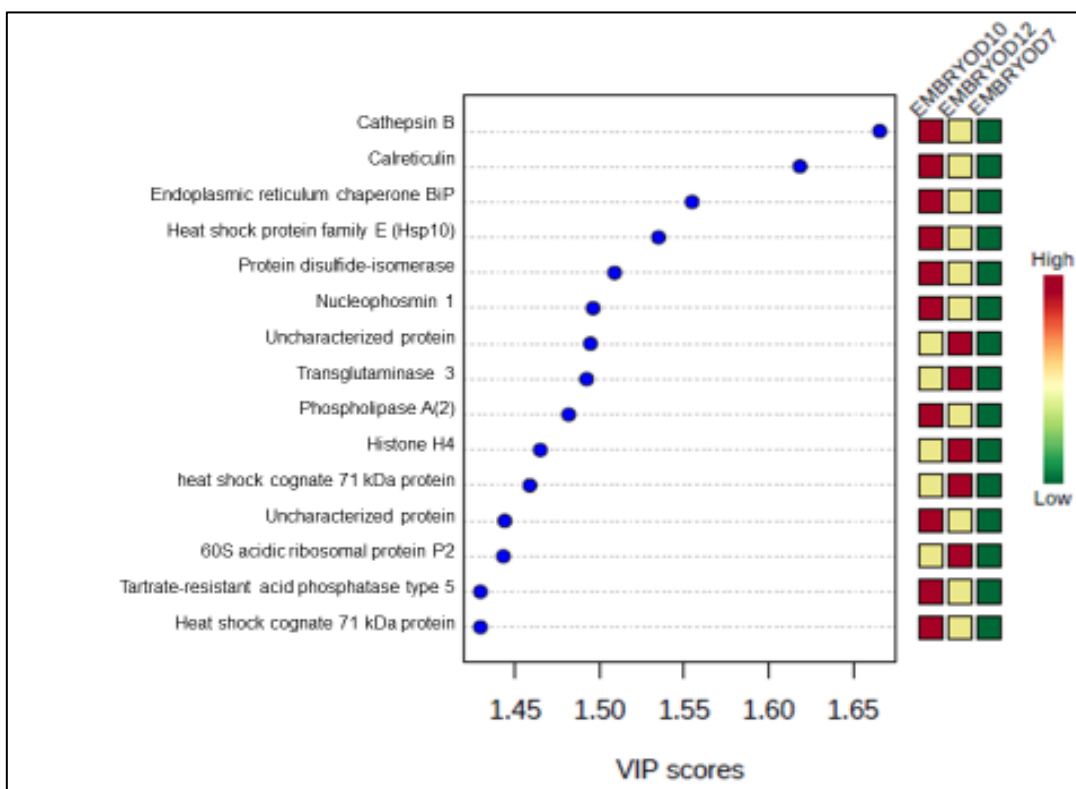


Figura 4. Resultados da análise multivariada representada pelo VIP score classificada com PLS-DA dos embriões D7, D10 e D12.

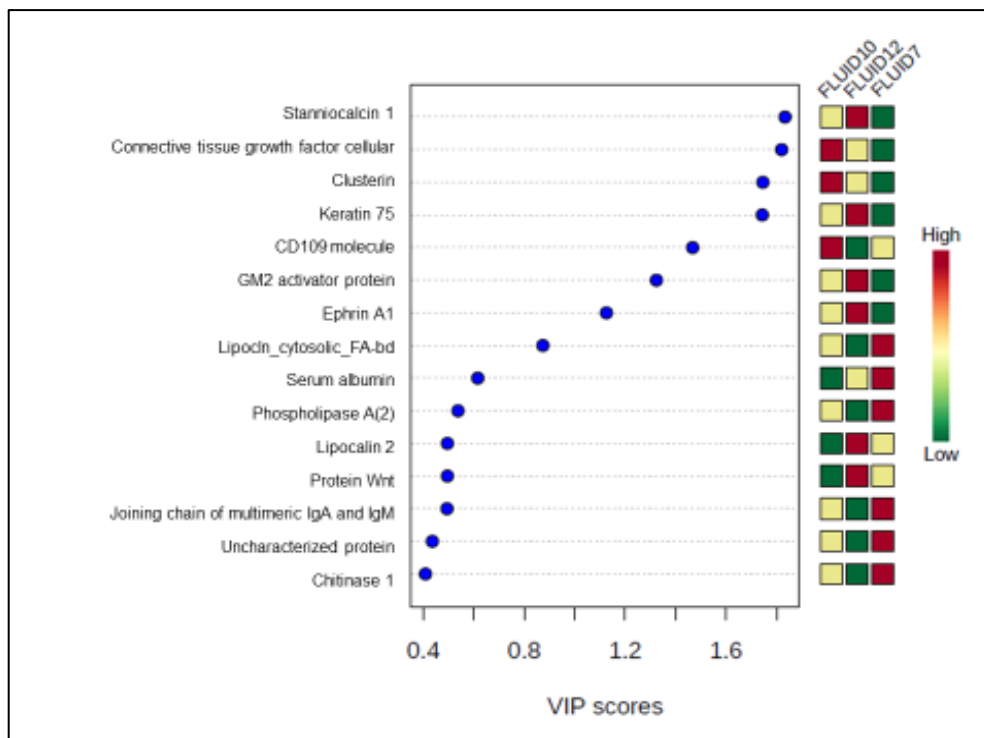


Figura 5. Resultados da análise multivariada representada pelo VIP score classificada com PLS-DA do fluido uterino D7, D10 e D12.

Na ontologia gênica as principais funções moleculares dos grupos de embriões D7, D10 e D12 foram atividade catalítica (39%, 39%, 42%, respectivamente) e de ligação (40%, 41%, 38%, respectivamente); processos biológicos mais significativos foram o processo celular (30%, 34%, 34%, respectivamente) e metabólico (17%, 19%, 7%, respectivamente); já em relação ao compartimento celular foram identificados na célula (21%, 22%, 23%) e nas organelas (11%, 13%, 13%, respectivamente) (Figura 6).

Na análise bioinformática de ontologia gênica dos grupos gestante de líquido uterino D7, D10 e D12 observamos a função molecular de ligação (53 %, 50%, 50%, respectivamente) e atividade catalítica (33%, 38%, 38%, respectivamente). O processo biológico mais evidente foram processo celular (26%, 26%, 27%, respectivamente) e metabólico (13%, 15%, 15%, respectivamente) e o compartimento celular em destaque foram a célula (17%, 21%, 21%, respectivamente) e a região extracelular (21%, 18%, 17%, respectivamente). (Figura 7).

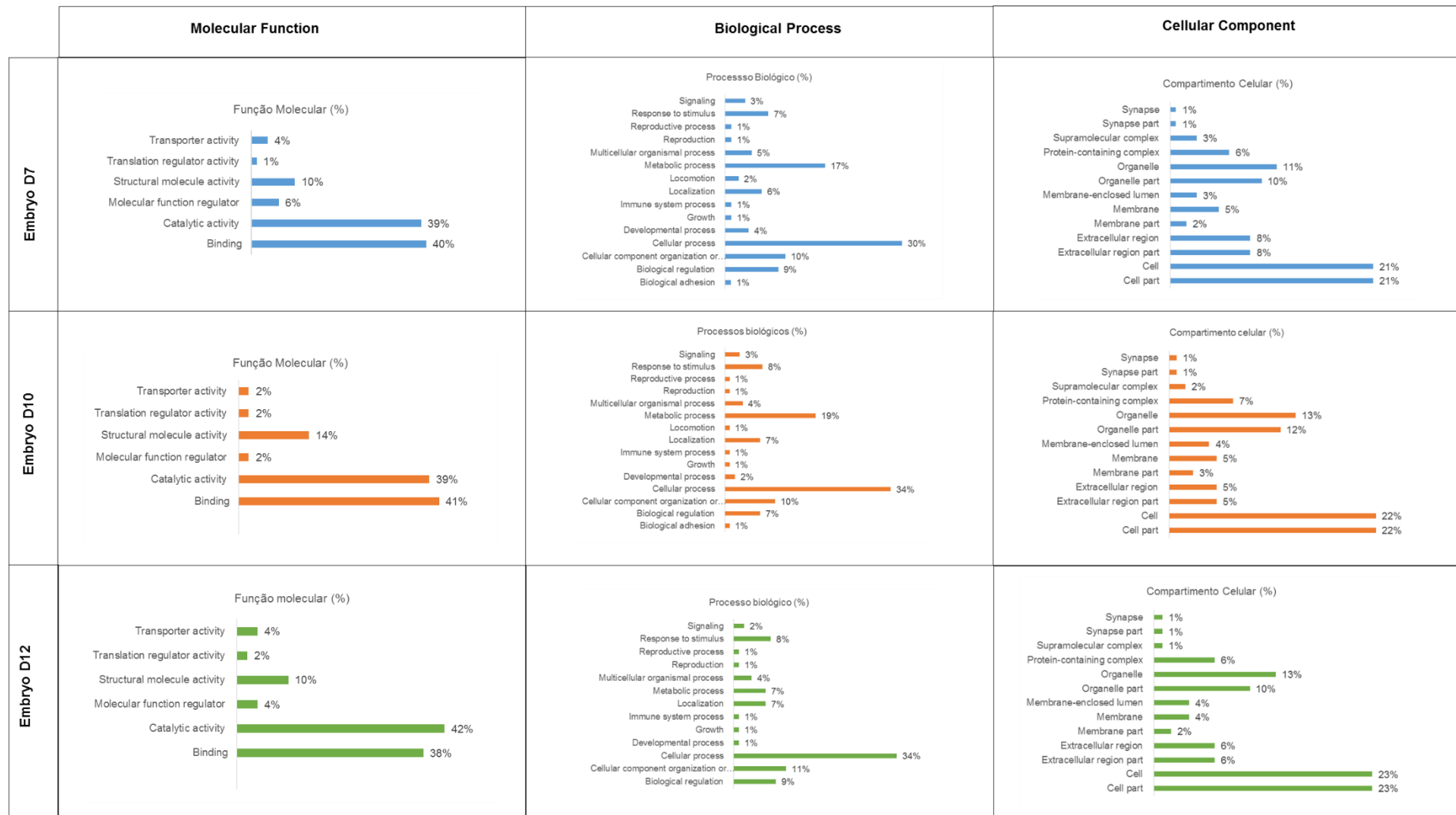


Figura 6. Ontologia gênica de cada grupo de embriões D7, D10 e D12, considerando a função molecular, o processo biológico e o compartimento celular.

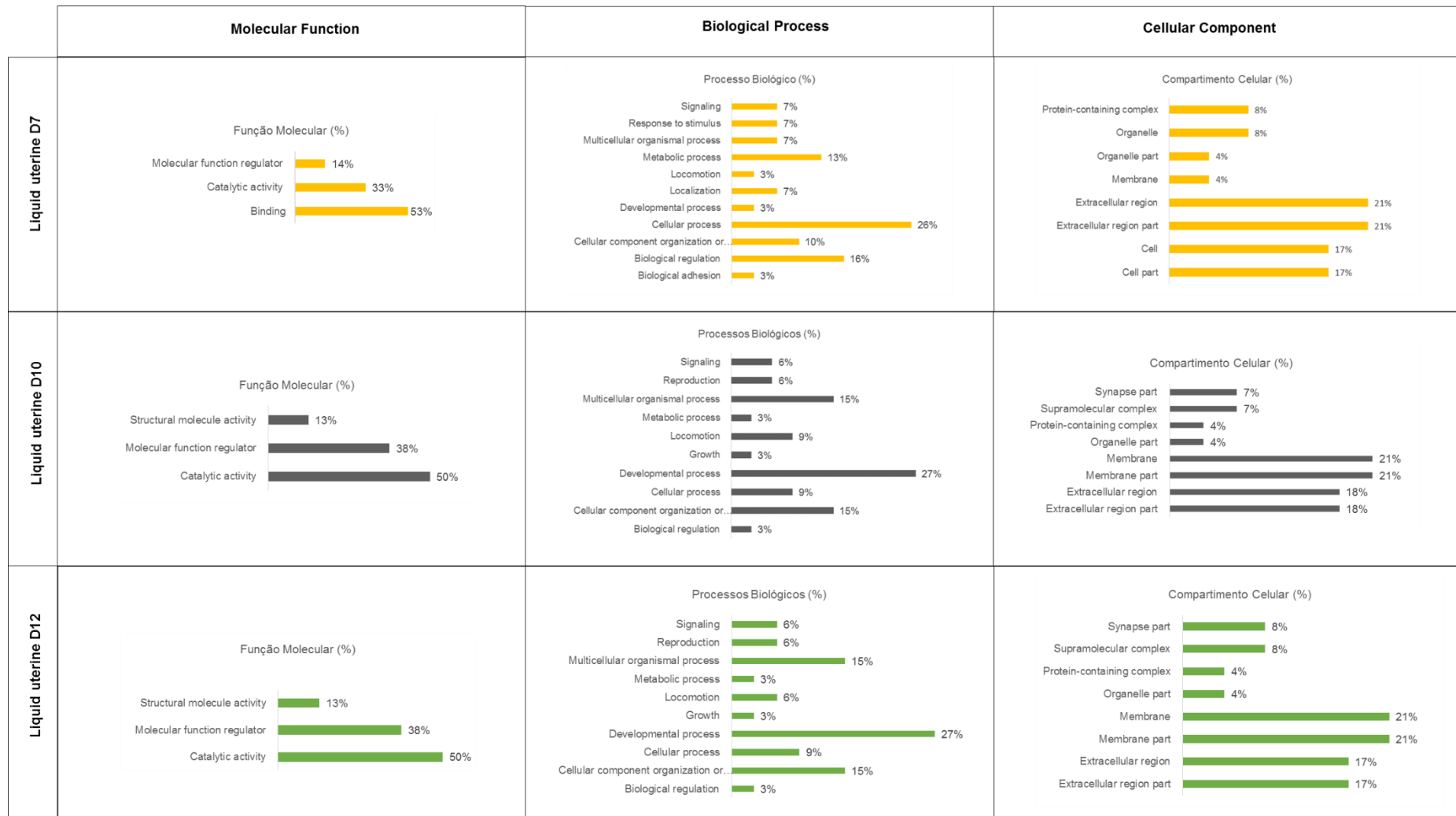


Figura 7. Ontologia gênica dos líquidos uterino dos grupos gestação D7, 10 e 12.

4. Discussão

O número de proteínas identificado para os embriões e líquido uterino foi inferior aos resultados obtidos em outros estudos (Swegen et al., 2017; Smits et al., 2018), possivelmente pela diferença entre a metodologia de análise empregada. Apesar disso, os agrupamentos formados de acordo com a expressão proteica nos embriões e líquido uterino, na análise de PCA, apresentou valor da somatória de $PC1 + PC2 > 50\%$, indicando a confiabilidade na separação dos clusters (Lira et al., 2010). Nesta análise, a divisão dos clusters foi evidente nos embriões D10 e D12, contudo no fluido uterino houve uma combinação entre os grupos de gestantes, sugerindo que apesar do desenvolvimento embrionário, o ambiente uterino se mantém praticamente estável, especialmente pelo fato do estudo ter sido desenvolvido durante a fase de maior mobilidade embrionária e início do reconhecimento materno da gestação e possivelmente em outros períodos e de acordo com a necessidade do embrião/feto o ambiente uterino se modifique.

Em estudo que comparou o fluido uterino da égua cíclica e gestante determinou expressão diferencial das proteínas nos dois grupos, sendo que 40% apresentaram como principal função molecular de ligação (Smits et al., 2018). Ainda estes autores observaram que o principal componente celular se encontra na região extracelular e está de acordo com o trabalho de (Swegwn et al., 2017). Similarmente, nossos resultados indicaram que a principal função molecular foi de ligação em todos grupos de líquido uterino e principais componentes celular a própria célula e a região extracelular.

Já no embrião, a principal função molecular foi atividade catalítica, processos biológicos relacionados a processo celular e metabólico, e os principais componentes celular a própria célula e organelas.

De fato, como em outras espécies, estas proteínas podem estar envolvidas no reconhecimento materno da gestação em equinos, já que estas moléculas ainda não foram elucidadas (Klein, 2016). Em relação às moléculas envolvidas com as funções da cápsula embrionária (Quinn et al., 2007; Stewart, et al., 2000), sistema imunológico na gestação (Nair et al., 2017) e angiogênese (Silva et al., 2011) foram estudados, tanto em relação aos transcritos, como as proteínas correlacionadas (Bauersachs; Wolff, 2012; Smits et al., 2018).

Nos embriões D10 houve uma up-regulation de 10 proteínas, as quais estão

envolvidas em diferentes processos celulares, mas especialmente de proteção contra o estresse térmico, atuando no dobramento e estabilização de proteínas, tradução proteica, metabolismo lipídeos e parte estrutural das células.

Endoplasmic reticulum chaperone BiP (F6YG82), heat shock protein family E (Hsp10) member 1 (F6T0A6), protein disulfide-isomerase (F6VSN9), heat shock cognate 71 kDa protein (A2Q0Z1), as quais estão envolvidas na proteção contra o estresse térmico, atuando no dobramento e estabilização de proteínas. As chaperonas são proteínas responsáveis pelo dobramento de proteínas na sua forma inativa (estrutura primária) evitando a degradação. Mediante o estresse térmico, elevação da temperatura celular, há desnaturação das proteínas e desdobramento e as heat shock, por possuírem características de chaperonas, evitam a degradação proteica nesta situação, já que promovem o redobramento correto das proteínas.

A cathepsin B (F6YNH6) e tartrate-resistant acid phosphatase type 5 (F6WFF6) estão envolvidas no catabolismo e metabolismo celular, que também se encontra acentuado nesta fase de desenvolvimento embrionário. A cathepsin foi encontrada nas células do trofoblasto de camundongos, que se acumulam em pequenas vesículas atuando como um zimógeno até o momento da implantação. Quando ativada atua como um lisossomo fagocitando células e se aderindo ao útero (Afonso et al., 1997). De acordo com nosso trabalho a cathepsin está mais expressa nos embriões D10 sugerindo que neste momento é a maior produção deste precursor enzimático inativo que por sua vez vai ser liberado no momento da implantação. Já em bovinos esta proteína pode ser utilizada como um marcador de qualidade embrionária. A inibição da catepsina B melhora a competência do desenvolvimento embrionário, aumentando o número de embriões de boa qualidade (Balboula et al., 2010). No nosso estudo verificamos que a expressão nos embriões D12 da cathepsin B estavam diminuídos em relação ao D10 e observamos a qualidade dos embriões recuperados que eram somente de grau 1.

A calreticulin (F6TQR2) e phospholipase A (2) (PLA2G2A), tem interação seletiva com os íons do cálcio e se relacionam na regulação positiva da migração endotelial e metabolismo de lipídeos, respectivamente. A calreticulin no endométrio de camundongos interage com receptores das integrinas que atuam na adesão celular, são consideradas marcadores da implantação (Cheng et al., 2009).

Encontramos maior expressão no embrião D10 sugerindo que está maior produção está associada a maior mobilidade do embrião neste momento. A nucleophosmin 1 (F6X9D3) se liga na cromatina e RNA e exporta para o núcleo fazendo movimento direcionado.

Já nos embriões D12 as principais funções e processos metabólicos envolvidos foram organização estrutural, tradução e processo catabólico denotando maior atividade durante esta fase do desenvolvimento embrionário.

Uncharacterized protein (F6VQ14), é constituinte estrutural do ribossomo que atuam nas reações químicas e vias que resultam na formação de uma proteína no citoplasma, especificando a sequência de aminoácidos na proteína.

Transglutaminase 3 (F6YMM5) são enzimas catalíticas que se ligam em íons metálicos.

A proteína 60S acidic ribosomal protein P2 (Q6X9Z5) e ribosomal protein S5 (F6TNE1) é constituinte estrutural do ribossomo e, portanto, estão relacionadas com a tradução proteica. A heat shock cognate 71 kDa protein (A2Q0Z0) não parte estrutural do ribossomo, mas também está relacionada a adição de aminoácidos a uma cadeia polipeptídica.

A histone H4 (F6V9V9) regulam a transcrição e estabilidade cromossômica. A acessibilidade ao DNA é regulada por meio de um conjunto complexo de modificações pós-traducionais de histonas, também chamadas de código de histonas e remodelação de nucleossomos.

Nos líquidos uterinos houve uma up-regulation das proteínas lipocln_cytosolic_FA-bd_dom domain-containing protein (F7CWT0) no grupo D7, cellular communication network factor 2 (F6X0K3), clusterin (Q29482), CD109 molecule (F6V1V8) no grupo D10 e stanniocalcin (F7AKV6), keratin 75 (F6S8W6), GM2 activator protein (Q3S4D6) e ephrin A1 (F6WFS0) no grupo D12.

Com relação aos resultados do PLS-DA observamos no fluido uterino, diferenças marcantes entre os grupos.

A lipocln_cytosolic_FA-bd_dom domain-containing protein (F7CWT0) pertence a família das lipocalinas e está associada a interação e transporte de moléculas com baixa massa molecular.

A cellular communication network factor 2 (F6X0K3) na regulação positiva da cascata da ERK1 e ERK2, a qual é essencial para proliferação celular,

diferenciação, adesão, migração e sobrevivência.

A clusterin (Q29482) atuam na interação e estabilização da dobragem de proteínas mediada por chaperonas, o que pode impedir a sua agregação e precipitação.

CD109 molecule (F6V1V8) impede ou reduz a atividade de uma endopeptidase, qualquer enzima que hidrolisa ligações peptídicas em polipeptídeos.

As stanniocalcin (F7AKV6) são hormônios polipeptídicos e suas funções estão relacionadas ao metabolismo de cálcio e fósforo e na gestação de espécies como suínos, bovinos e ratos (Xião et al., 2006; Song et al., 2009). Foram expressas em éguas gestantes no início da gestação, coincidindo com o desaparecimento da cápsula embrionária e são produzidas pelas glândulas endometriais (Klein et al., 2010; Kikuchi et al., 2011). No início da gestação em ratas e equinos a stanniocalcin é expressa em níveis basais e aumenta com o passar do tempo (Xião et al., 2006; Kikuchi et al., 2011). Outra característica interessante, na gestação de ratas, é que no local da implantação e em torno do blastocisto se encontra alta expressão desta proteína. Sugerindo que o embrião induz a produção de stanniocalcin no local de implantação (Xião et al., 2006). No nosso estudo evidenciamos o aumento gradativo da expressão de stanniocalcin como sabemos que para o reconhecimento materno aconteça o embrião deve estar em movimento no útero por isso pode ser um indicativo de aumento gradativo da expressão da proteína.

A keratin 75 (F6S8W6) é uma célula precursora adquire os recursos especializados de uma célula progenitora hematopoiética, uma classe de tipos de células progenitoras mielóides e linfóides.

A GM2 activator protein (Q3S4D6) participam do processo catabólico (degradação) e metabolismo de macromoléculas. Antes da fixação do embrião são expressas altas concentrações, fazem parte do transporte e catabolismo de lipídeos e fosfolipídeos (QUINN et al., 2006).

A ephrin A1 (F6WFS0) faz uma série de sinais moleculares como consequência da ligação de um receptor de efrina a uma efrina. O processo de quimiotaxia que direciona a migração do crescimento do axônio para um local alvo específico em resposta a uma combinação de sinais de atração e repulsão.

Este estudo descreve algumas proteínas de muitas que são expressas no endométrio e no embrião durante a fase de maior mobilidade embrionária. As

comparações neste período fornecem possíveis papéis do suporte nutricional e sinalizações de fatores pré implantacionais. Mais estudos são necessários para descrever as interações da fase de maior mobilidade embrionária.

Conflitos de interesse

Os autores afirmam que não têm conflitos de interesse a serem declarados.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), CNPEM, Campinas, Brasil pelo suporte com o NanoAcquity Ultra Performance LC acoplado à fonte de nanoelectrospray no espectrômetro de massas Q-TOF Premier. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Contribuição dos autores

Contribuições substanciais para concepção e desenho (R.A.S, F.F.S e C.M); aquisição de dados (R.A.S, V.M.C, L.C, T.M.S.C, E.R.Jr, V.V.); análise e interpretação dos dados (R.A.S, F.F.S, V.M.C e C.M); As análises estatísticas (R.A.S, V.M.C, F.F.S e C.M), elaboração do manuscrito (R.A.S, F.F.S.,V.V. ,C.M); revisar criticamente o manuscrito quanto a conteúdo intelectual importante (R.A.S, F.F.S e C.M); e aprovação final do manuscrito para publicação (todos os autores).

Referências

- Afonso, S.; Romagnano, L.; Babiarez, L. The expression, function of cystatin C, cathepsin B, and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. *Development*. v. 124, p. 3415-3425, 1997.
- Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 334-346.
- Aurrand, L.M., Galland, F., Bazin, H., Zakharyev, V.M., Imhof, B.A., Naquet, P. Vanin-1, a novel GPI-linked perivascular molecule involved in thymus homing. *Immunity*. 5, 391-405, 1996.

- Bauersachs, S. & Wolf, E. Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase. *Anim Reprod Sci.* 134, 84-94, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.015>
- Balboula, A. Z.; Yamanaka, K.; Sakatani, M.; Hegab, A. O.; Zaabel, S. M.; Takahashi, M. Intracellular cathepsin B activity is inversely correlated with the quality and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Molecular Reproduction & Development.* v. 77, p. 1031–1039, 2010.
- Baker, S.S., Cardullo, R.A., Thaler, C.D., 2002. Sonication of mouse membranes reveals distinct proteins domains. *Biol Reprod.* 66, 57-64.
- Bastos, H.B.A., Martinez, M.N., Camozzato, G.C., Estradé, G.C., Barros, E., Vital, C.E., Vidigal, P.M.P., Meikle, A., Jobim, M.I.M., Gregory, R.M, Mattos, R.C. Proteomic profile of histotroph during early embryo development in mares. *Theriogenology*, 125, 224-235, 2019.
- Boomsma, C.M, Kavelaars, A., Eijkemans, M.J.; Lentjes, E.G., Fauser, B.C., Heijnen, C.J., Macklon, N.S., 2009. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in FIV. *Hum Reprod* 24, 1427-1435.
- Boutet, E., Lieberherr, D., Tognolli, M., Schneider, M., Parit, B., Bridge, A.J., Poux, S., Bougueleret, L., Xenarios, I., 2016. UniProtKB/Swiss-Prot, the manually annotated section of the Uniprot Knowledgebase: how to use the entry view. *Methods Mol. Biol.* 1374, 23-54.
- Checa, A., Bedia, C., Jaumot, J., 2015. Lipidomic data analysis: Tutorial, practical guidelines and applications. *Anal. Chim. Acta.* 885, 1-16.
- Cheng, S. Q.; He, J. L.; Dong, Y. L.; Liu, X. Q.; Ding, Y. B.; Gao, R. F.; Tan, Y.; Ye, Q.; Tian, Z. L.; Wang, Y. X. Characterization of calreticulin expression in mouse endometrium during embryo implantation. *Biological Research.* v. 42, p. 505-516, 2009.
- Ginther, O. J., 1985. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. *Equine Vet. J.* 3, 41-47.
- Forde, N. et al. Proteomic analysis of uterine fluid during the pre-implantation period of pregnancy in cattle. *Reproduction*, 2014. doi.org/10.1530/REP-13-0010.
- Gastal, M.O.; Gastal, E.L.; Torres, C.A.A.; Ginther, O.J. Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares. *Theriogenology*, 50, 989-999, 1998.
- Gilbert, S.F. Early embryonic development. In: *Developmental biology*. Ninth edit

- ed. Sunderland, MA: S.F. Sinauer Associates, Inc, 2010. p. 175–325.
- Ginther, O.J. Mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology*, v. 19, n. 4, 603-611, 1983.
- Hayes, M.A., Quinn, B.A., Lillie, B.N., Côté, O., Bienzle, D., Waelchli, R.O., Betteridge, K.J. Changes in various endometrial proteins during cloprostenol-induced failure of early pregnancy in mares. *Anim Reprod*; 9(49), 723-741, 2012.
- Huaiyu, M., Poudel, S., Muruganujan, A., Casagrande, J.T., Thomas, P.D. 2016. PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.*44, 336-342.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., Mann, M. 2005. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics*. 4, 1265-1272, 2005.
- Jalali, B. M., Bogacki, M., Dietrich, M., Likso, P. & Wasielek, M. Proteomic analysis of porcine endometrial tissue during periimplantation period reveals altered protein abundance. *Journal of proteomics* 125, 76–88, 2015. doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.003.
- Kaskow, B.J., Proffitt, J.M., Blangero, J., Moses, E.K., Abraham, L.J. Diverse biological activities of the vascular non-inflammatory molecules - the Vanin pantetheinases. *Biochem Biophys Res Commun*. 417, 653-658, 2012.
- Kastelic, J.P.; Adams, G.P.; Ginther, O.J. Role of progesterone in mobility, fixation, orientation, and survival of the equine embryonic vesicle. *Theriogenology*. 27, 655–663, 1987.
- Klein, C. Early pregnancy in the mare: old concepts revisited. *Domest Anim Endocrinol*. 56, 212-217, 2016.
- Klein, C. & Troedsson, M. H. Maternal recognition of pregnancy in the horse: a mystery still to be solved. *Reprod Fertil Dev* 23, 952–963, 2011 doi.org/10.1071/RD10294.
- Klein, C., Scoggin, K. E., Ealy, A. D. & Troedsson, M. H. Transcriptional profiling of equine endometrium during the time of maternal recognition of pregnancy. *Biol Reprod* 83, 102–113, 2010. doi.org/10.1095/biolreprod.109.081612.
- Lancheros-buitrago, J.; Rodriguez-villamil, P.; Gregory, J.; Bastos, H.; Camacho, C.

- A.; Caballeros, J. E.; Cazales, N.; Barros, E.; de Jesus Silva M. J.; Pimentel, A.; Mattos, R. C. Ceruloplasmin, serotransferrin and albumin presented different abundance in mares' uterine fluid five days after insemination, *Theriogenology*. 2019.
- Lillie, B.N., Traficante, E., Walker, M.E., Arroyo, L.G., Waelchli, R.O., Betteridge, K.J., Hayes, M.A. Endometrial expression of capsule-associated proteins and cytokines during the third week of pregnancy in mares. *Anim Reprod Sci*. 121, 254-256, 2010.
- Leith, G.S.; Ginther, O.J. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology*. 22, 401-408, 1984.
- Lyra, W.S., Silva, E.C., Araújo, M.C.U., Fragoso, M.D., Veras, G. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. *Quím Nova*. 33, 1594-1597, 2010.
- Maloney, S.E., Khan, F.A., Chenier, T.S., Amorim, M.D., Hayes, M.A., Scholtz, E.L. A comparison of the uterine proteome of mares in oestrus and diestrus. *Reprod Dom Anim*. 54, 473-479, 2019.
- Malschitzky, E., Fiala, S., Esmeraldino, A.T., Neves, A.P., Garbade, P., Jobim, M.I.M. 2008. Persistent mating-induced endometritis susceptibility: the role of uterine secretion. *Pferdeheilkunde*. 24, 74-78.
- Mcdowell, K.J., Sharp, D.C., Fazleabas, A.T., Roberts, R.M. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins synthesized and released by conceptuses and endometria from pony mares. *J. Reprod. Fertil*. 89, 107-115, 1993.
- Mickolajczyk, M., Skrzypczak, J., Szymanowski, K., Wirstlein, P. 2003. The assessment of LIF in uterine flushings – a possible new diagnostic tool in states of impaired infertility. *Biol. Reprod*. 3, 259–270.
- Munoz, M. et al. Proteome of the early embryo-maternal dialogue in the cattle uterus. *J Proteome Res* 11, 751–766, 2012. doi.org/10.1021/pr200969a.
- Nair, R.R., Verma, P., Singh, K. Immune-endocrine crosstalk during pregnancy. *Gen Comp Endocrinol*. 242, 18-23, 2017.
- Nilsson, E.P., Garfinkel, A.S., Schotz, M.C. Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. *Annu Rev Biochem*. 49, 667-693, 1998.
- Padua, M.B., Kowalski, A.A., Canas, M.Y., Hansen, P.J. The molecular phylogeny

- of uterine serpins and its relationship to evolution of placentation. *FASEB J*, 24, 526-537, 2010.
- Quinn BA, Hayes MA, Waelchli RO, Kennedy MW, Betteridge KJ. Changes in major proteins in the embryonic capsule during immobilization (fixation) of the conceptus in the third week of pregnancy in the mare. *Reproduction*. 134, 161-170, 2007.
- Silva, L.A., Klein, C., Ealy, A.D., Sharp, D.C. Conceptus-mediated endometrial vascular changes during early pregnancy in mares: an anatomic, histomorphometric, and vascular endothelial growth factor receptor system immunolocalization and gene expression study. *Reproduction*. 142, 593-603, 2011.
- Rifai, N., Bachorik, P.S., Albers, J.J. Lipoproteins and Apolipoproteins. In: *Text Book of Clinical Chemistry*. Edited by Burtis C, Ashwood, E, 3rd edn. Philadelphia: WB Saunders & Co; 1999.
- Squires, E.L., Carnevale, E.M., Mccue, P.M., Bruemmer, J.E. 2003. Embryo technologies in the horse. *Theriogenol*. 59, 151-170.
- Smits, K., Willems, S., Steendam, K.V., De Velde, M.V., De Lange, M., Ververs, C., Roels, K., Govaere, J., Nieuwerburgh, F.V., Peelman, L., Deforce, D., Soom, A.V. Proteins involved in embryomaternal interaction around the signalling of maternal recognition of pregnancy in the horse. *Scientific Reports*. 8, 5249, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-23537-6
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*. 150, 76-85, 1985.
- Stewart F, Kennedy MW, Suire S. A novel uterine lipocalin supporting pregnancy in equids. *Cell Mol Life Sci*. 57, 1373-1378, 2000.
- Stout, T.A.E.; Allen, W.R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. *Journal of Reproduction and Fertility*, 121, 771-775, 2001.
- Suire, S., Stewart, F., Beauchamp, J. & Kennedy, M. W. Uterocalin, a lipocalin provisioning the preattachment equine conceptus: fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization. *Biochem J* 356, 369–376 2001.
- Xia, J., Wishart, D.S., 2016. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 55, 1-91.

Xiao, L. J.; Yuan, J. X.; Song, X. X.; Li, Y. C.; Hu, Z. Y.; Liu, Y. X. Expression and regulation of stanniocalcin 1 and 2 in rat uterus during embryo implantation and decidualization. *Reproduction*. v. 131, n. 6, p. 1137-1149, 2006.

Anexos 1. Resultados da espectrometria de massa e ontologia gênica de proteínas extraídas do embrião e fluido uterino de equinos. Ontologia genética obtida no UniprotKB (www.uniprot.org).

Name	ID	Score	Mass (Da)	emPAI	Gene ontology		
					Molecular functions	Biological process	Cellular compartment
3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	F6RYZ0	36	68795	0.04	Adenylylsulfate kinase activity, ATP binding, sulfate adenylyltransferase (ATP) activity	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate biosynthetic process, sulfate assimilation	***
17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1	F7BFY1	39	33167	0.10	Estradiol 17-beta-dehydrogenase activity	Estrogen biosynthetic process	Cytosol
60S acidic ribosomal protein P2	Q6X9Z5	91	11715	0.29	Structural constituent of ribosome	Structural constituent of ribosome	***
60S acidic ribosomal protein P2	H9GZL8	66	6187	0.58	Structural constituent of ribosome	Translational elongation	Cytosol, cytosolic large ribosomal subunit
Acetyl-CoA acetyltransferase 2	F7C5T6	49	40178	0.07	Acetyl-CoA C-acetyltransferase activity, acetyl-CoA C-acyltransferase activity	Fatty acid beta-oxidation	Cytosol, mitochondrion, nucleus,
Aconitase 1	F6U0H9	65	94662	0.03	3 iron, 4 sulfur cluster binding, 4 iron, 4 sulfur cluster binding, aconitate hydratase activity, iron-responsive element binding	Cellular iron ion homeostasis, citrate metabolic process, intestinal absorption, post-embryonic development, regulation of translation, response to iron(II) ion, tricarboxylic acid cycle	Cytoplasm
Actin, alpha, cardiac muscle 1	F6R1X9	54	42334	0.07	ATP binding, myosin binding	Actin filament organization, actin-myosin filament sliding, heart contraction, mesenchyme migration, positive regulation of gene expression	Cytoskeleton
Actin, cytoplasmic 1	F6T3Y8	73	40875	0.07	ATP binding	***	Cytoskeleton

Actinin alpha 4	F6YV53	99	86875	0.03	Actin binding, calcium ion binding	***	***
Adenosine deaminase RNA specific B1	F7DBJ2	20	77008	0.04	Double-stranded RNA adenosine deaminase activity, double-stranded RNA binding, tRNA-specific adenosine deaminase activity	Adenosine to inosine editing, RNA processing	Nucleolus, nucleus, cytoplasm
Adenylyl cyclase-associated protein	F6SRP7	28	51755	0.06	Actin binding, adenylate cyclase binding	Actin polymerization or depolymerization, cell morphogenesis, establishment or maintenance of cell polarity	Cytoskeleton
Adenylate kinase 2, mitochondrial	F6XJN4	30	25850	0.13	Adenylate kinase activity, ATP binding	ADP biosynthetic process, AMP metabolic process, ATP metabolic process	Mitochondrion
ADP ribosylation factor 3	F6TD06	32	20645	0.14	GTP binding	Intracellular protein transport, vesicle-mediated transport	Plasma membrane, cytoplasm
AF4/FMR2 family member 4	F6SE46	20	127752	0.02	***	Regulation of gene expression, spermatid development	Nucleus
Aldo-keto reductase family 1 member B	F7DMQ3	34	35998	0.09	Alcohol dehydrogenase (NADP+) activity, alditol:NADP+ 1-oxidoreductase activity, oxidoreductase activity	***	Cytosol
Alpha-amylase	F6QDH8	190	58000	0.10	Alpha-amylase activity, alpha-amylase activity (releasing maltohexaose), cation binding	Carbohydrate metabolic process	***
Alpha-1B-glycoprotein	F6VJR6	640	54561	0.30	***	***	Extracellular region
Alpha-2-macroglobulin	F6R942	140	163607	0.04	Endopeptidase inhibitor activity	***	Extracellular space
Annexin A1	Q8HZM6 ANXA1	435	38998	0.24	Calcium-dependent phospholipid binding, calcium-dependent protein binding, calcium ion binding, phospholipase A2 inhibitor activity	Actin cytoskeleton reorganization, adaptive immune response, alpha-beta T cell differentiation, arachidonic acid secretion, cell surface receptor signaling pathway, cellular response to glucocorticoid stimulus, cellular response to hydrogen peroxide, cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus, DNA duplex unwinding, endocrine pancreas development,	Extracellular space and exosome, early endosome, endosome membrane, protein, nucleus, plasma membrane, cytoplasm, cilium, membrane, peripheral membrane protein, cytoplasmic vesicle membrane,

						estrous cycle, gliogenesis, G protein-coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger, granulocyte chemotaxis, hepatocyte differentiation, inflammatory response, innate immune response, insulin secretion, keratinocyte differentiation, monocyte chemotaxis, myoblast migration involved in skeletal muscle regeneration, negative regulation of exocytosis, negative regulation of interleukin-8 secretion, negative regulation of phospholipase A2 activity, negative regulation of T-helper 2 cell differentiation, neutrophil clearance, peptide cross-linking, phagocytosis, positive regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis, positive regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle, positive regulation of interleukin-2 production, positive regulation of neutrophil apoptotic process, positive regulation of prostaglandin biosynthetic process, positive regulation of T cell proliferation, positive regulation of T-helper 1 cell differentiation, positive regulation of vesicle fusion, positive regulation of wound healing, prolactin secretion, prostate gland development, regulation of cell population proliferation, regulation of cell shape, regulation of hormone secretion, regulation of inflammatory response, regulation of interleukin-1 production, regulation of leukocyte migration, response to drug, response to estradiol, response to interleukin-1, response to peptide hormone, response to X-ray	secretory vesicle lumen, phagocytic cup
Ankyrin repeat and SOCS box containing 8	F6YTT0	15	32155	0.09	***	Intracellular signal transduction, protein ubiquitination	***
Apolipoprotein A1	F6Z2L5	857	30312	1.09	Apolipoprotein A-I receptor binding, chemorepellent	Adrenal gland development, blood vessel endothelial cell migration, cholesterol	Extracellular region, secreted

					<p>activity, enzyme binding, heat shock protein binding, high-density lipoprotein particle receptor binding, identical protein binding, phosphatidylcholine – sterol O-acyltransferase activator activity, phospholipid binding</p>	<p>biosynthetic process, efflux, homeostasis and import, endothelial cell proliferation, glucocorticoid metabolic process, G protein-coupled receptor signaling pathway, high-density lipoprotein particle assembly and remodeling, integrin-mediated signaling pathway, lipid storage, lipoprotein biosynthetic and metabolic process, negative regulation of: cell adhesion molecule production, cytokine secretion involved in immune response, heterotypic cell-cell adhesion, hydrolase activity, inflammatory response, interleukin-1 beta secretion, tumor necrosis factor-mediated signaling pathway and very-low-density lipoprotein particle remodeling, peptidyl-methionine modification, phosphatidylcholine biosynthetic process, phospholipid efflux and homeostasis, positive regulation of: cholesterol efflux and esterification, hydrolase activity, lipid biosynthetic process, phagocytosis, phospholipid efflux, Rho protein signal transduction, stress fiber assembly and substrate adhesion-dependent cell spreading, protein oxidation and stabilization, regulation of: Cdc42 protein signal transduction, cholesterol transport, intestinal cholesterol absorption and protein phosphorylation, reverse cholesterol transport, triglyceride catabolic process and homeostasis, very-low-density lipoprotein particle remodeling, vitamin transport</p>	
Apolipoprotein A-II	F6RM73	914	11396	2.19	<p>Apolipoprotein receptor binding, cholesterol binding, high-density lipoprotein particle and receptor binding, lipase inhibitor activity,</p>	<p>Cholesterol transport, homeostasis and metabolic process, high-density lipoprotein particle assembly and remodeling, lipoprotein metabolic process, low-density lipoprotein particle remodeling, negative regulation of lipase</p>	<p>Chylomicron, spherical high-density lipoprotein particle, very-low-density lipoprotein particle</p>

					phosphatidylcholine binding	activity, tryglyceride-rich lipoprotein particle remodeling	
Apolipoprotein C2	F7A1W7	257	11190	0.60	Lipid binding, lipoprotein lipase activator activity, phospholipase activator activity, phospholipase binding	Chylomicron remnant clearance, high-density lipoprotein particle clearance, lipid metabolic process, lipid transport, negative regulation of very-low-density lipoprotein particle clearance, positive regulation of: lipoprotein lipase activity, phospholipase activity and phospholipid catabolic process	Chylomicron, intermediate-density lipoprotein particle, low-density lipoprotein particle, spherical high-density lipoprotein particle
Apolipoprotein H	F6Z041	58	39822	0.07	***	***	***
Armadillo repeat containing 3	F7BB13	26	96384	0.03	***	***	***
Argininosuccinate synthase 1	F7D8L9	16	46889	0.06	Amino acid binding, argininosuccinate synthase activity, ATP binding, identical protein binding	Arginine biosynthetic process, argininosuccinate metabolic process, aspartate metabolic process, cellular response to laminar fluid shear stress, circadian rhythm, citrulline metabolic process, negative regulation of leukocyte cell-cell adhesion, positive regulation of nitric oxide biosynthetic process, urea cycle	Cytosol, mitochondrion, cytoplasm
Aspartate aminotransferase	F6YXZ8	185	47709	0.22	L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase activity, pyridoxal phosphate binding	Aspartate biosynthetic process, aspartate catabolic process, fatty acid transport, glutamate catabolic process to 2-oxoglutarate, glutamate catabolic process to aspartate, oxaloacetate metabolic process, response to ethanol	Mitochondrion, Plasma Membrane
ATPase H+ transporting accessory protein 2	F7CR40	111	39081	0.07	Signaling receptor activity	Positive regulation of Wnt signaling pathway	Plasma Membrane, external side of plasma membrane
ATP synthase membrane subunit f	F6TBB2	63	10383	0.29	***	***	integral component of membrane
ATP synthase subunit	F7BYD1	33	11354	0.26	Proton transmembrane transporter activity	ATP synthesis coupled proton transport	Mitochondrion
ATP synthase F1 subunit delta	H9GZX2	85	12963	0.26	Proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	Aerobic respiration, ATP synthesis coupled proton transport, mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport, mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex assembly	Mitochondrion

ATP synthase subunit alpha	F6XUJ2	51	59713	0.06	ADP binding, angiostatin binding, ATP binding, MHC class I protein binding, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	ATP synthesis coupled proton transport, lipid metabolic process, mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport, negative regulation of endothelial cell proliferation, positive regulation of blood vessel endothelial cell migration	Mitochondrion, Nucleus, Plasma Membrane
ATP synthase subunit beta	F6U187	39	56223	0.05	Angiostatin binding, ATP binding, MHC class I protein binding, proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	Angiogenesis, cellular response to interleukin-7, lipid metabolic process, mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport, negative regulation of cell adhesion involved in substrate-bound cell migration, positive regulation of blood vessel endothelial cell migration, regulation of intracellular pH	Mitochondrion, Plasma Membrane, cell surface, proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)
ATP synthase subunit d, mitochondrial	F6YAZ0	27	18578	0.18	Proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	ATP synthesis coupled proton transport, mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport	Mitochondrion
Barrier to autointegration factor 1	F6YEV8	23	10280	0.29	DNA binding	Chromosome condensation, chromosome segregation, DNA integration	Nucleus
Beta-casein	Q9GKK3	321	27089	1.01	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity	Lactation, negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity, negative regulation of lactation	Extracellular region or secreted
Beta-galactosidase	F6RVL4	155	77241	0.08	Beta-galactosidase activity	Carbohydrate metabolic process	Vacuole
Beta-hexosaminidase	F6VE62	43	56008	0.12	Acetylglucosaminyltransferase activity, beta-N-acetylhexosaminidase activity, identical protein binding, N-acetyl-beta-D-galactosaminidase activity	astrocyte cell migration, cellular calcium ion homeostasis, cellular protein metabolic process, ganglioside catabolic process, glycosaminoglycan metabolic process, lipid storage, locomotory behavior, lysosome organization, male courtship behavior, myelination, neuromuscular process controlling balance, oligosaccharide catabolic process, oogenesis, penetration of zona pelúcida, phospholipid biosynthetic process, positive regulation of transcription by RNA polymerase II, regulation of cell shape, sensory perception of sound, skeletal system development	Extracellular region or secreted, Lysosome
Beta-lactoglobulin-1	P02758	246	20673	0.35	Retinol binding	***	Extracellular region or secreted

Beta-2-microglobulin	P30441	75	13532	0.22	***	Antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I, Immune response	Extracellular region or secreted
Calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase 2	F6RN62	29	48240	0.07	ATP binding, protein kinase activity	***	***
Calcyphosine	F6XZQ1	33	20978	0.14	Calcium ion binding	***	***
Calreticulin	F6TQR2	121	47688	0.22	Androgen receptor binding, androgen receptor binding, carbohydrate binding, integrin binding, mRNA binding, ubiquitin protein ligase binding, unfolded protein binding	Cellular senescence, cortical actin cytoskeleton organization, endoplasmic reticulum unfolded protein response, negative regulation of cell cycle arrest, negative regulation of intracellular steroid hormone receptor signaling pathway, negative regulation of neuron differentiation, negative regulation of retinoic acid receptor signaling pathway, negative regulation of transcription by RNA polymerase II, negative regulation of translation, negative regulation of trophoblast cell migration, peptide antigen assembly with MHC class I protein complex, positive regulation of cell population proliferation, positive regulation of dendritic cell chemotaxis, positive regulation of endothelial cell migration, positive regulation of gene expression., positive regulation of NIK/NF-kappaB signaling, positive regulation of phagocytosis, positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading, protein export from nucleus, protein folding, protein localization to nucleus, protein stabilization, regulation of meiotic nuclear division	Endoplasmic reticulum lumen
Cathepsin L	F7BZ41	85	37928	0.09	Cysteine-type endopeptidase activity	Proteolysis involved in cellular protein catabolic process	Extracellular region or secreted, lysosome
Cathepsin V	F7BPX8	93	37827	0.08	Cysteine-type endopeptidase activity	Proteolysis involved in cellular protein catabolic process	Extracellular region or secreted, lysosome
Cathepsin Z	F6S2C3	60	34817	0.10	Cysteine-type endopeptidase activity	Proteolysis involved in cellular protein catabolic process	Extracellular region or secreted, lysosome
Carbonic anhydrase 2	F6YS25	98	29228	0.10	Carbonate dehydratase activity, zinc ion binding	***	***

Carboxylic ester hydrolase	F6PRI5	600	62283	0.05	Carboxylic ester hydrolase activity, sterol esterase activity, triglyceride lipase activity	Lipid catabolic process	Extracellular region or secreted
Carboxypeptidase	F6QJ78	51	54786	0.06	Serine-type carboxypeptidase activity	Proteolysis involved in cellular protein catabolic process	Nucleoplasm
Casein alpha s1	F7DGH6	73	25257	0.13	***	Response to 11-deoxycorticosterone, response to dehydroepiandrosterone, response to estradiol, response to progesterone	Extracellular region or secreted, extracellular space, integral component of membrane
Cellular communication network factor 2	F6X0K3	82	32396	0.10	heparin binding, insulin-like growth factor binding, integrin binding, protein C-terminus binding	angiogenesis, cartilage condensation, cell adhesion, cell differentiation, cell-matrix adhesion, cell migration, chondrocyte proliferation, fibroblast growth factor receptor signaling pathway, integrin-mediated signaling pathway, lung development, negative regulation of cell death, negative regulation of gene expression, ossification, positive regulation of cell differentiation, positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade, positive regulation of JNK cascade, positive regulation of stress fiber assembly, reactive oxygen species metabolic process, regulation of chondrocyte differentiation, tissue homeostasis	Extracellular region or secreted
Cell division cycle 27	F6RN71	29	92940	0.04	Ubiquitin protein ligase activity	Anaphase-promoting complex-dependent catabolic process, cell division, metaphase/anaphase transition of mitotic cell cycle, positive regulation of mitotic metaphase/anaphase transition, protein ubiquitination	Nucleus
Ceruloplasmin	F6PQ46	51	122786	0.03	Chaperone binding, copper ion binding, ferroxidase activity	Cellular iron ion homeostasis, iron ion homeostasis, iron ion transport	Extracellular region or secreted, plasma membrane
Chloride intracellular channel protein	F6ZHQ5	16	27317	0.11	Chloride channel activity, voltage-gated ion channel activity	Regulation of cell cycle, regulation of ion transmembrane transport	Membrane, cytoplasm

Chromosome 13 C16orf89 homolog	F6XS73	109	41953	0.07	Protein homodimerization activity	***	Cytosol, membrane
Citron rho-interacting serine/threonine kinase	F6PMM0	30	236306	0.01	ATP binding, metal ion binding, protein serine/threonine kinase activity	Intracellular signal transduction, mitotic cytokinesis	***
Chitinase 1	F7AJP3	219	67973	0.15	Chitinase activity, chitin binding, endochitinase activity	Carbohydrate metabolic process, chitin catabolic process	Extracellular region e space, cytoplasm
Chitobiase	F6TSN2	17	43343	0.08	Chitinase activity, chitin binding	Carbohydrate metabolic process, chitin catabolic process	***
Chromagranin –A	F7BS54	102	49974	0.06	***	Adenylate cyclase-activating adrenergic receptor signaling pathway involved in cardiac muscle relaxation, negative regulation of catecholamine secretion	Extracellular space, chromaffin granule, secretory granule
Chromo domain-containing protein	F7ASV5	47	48896	0.06	***	***	Nucleus
Citrate synthase	F6XMS1	43	52063	0.06	Citrate (Si)-synthase activity	Carbohydrate metabolic process, citrate metabolic process, tricarboxylic acid cycle	Mitochondrion
Clathrin heavy chain	F7BV85	37	194314	0.02	Clathrin light chain binding, structural molecule activity	Clathrin coat assembly, intracellular protein transport, mitotic cell cycle, receptor-mediated endocytosis	Cytoplasmic vesicle membrane
Clusterin	Q29482	62	52691	0.06	Amyloid- beta binding, low-density lipoprotein particle receptor binding, misfolded protein binding, protein-containing complex binding, tau protein binding, ubiquitin protein ligase binding, unfolded protein binding	cell morphogenesis, central nervous system myelin maintenance, chaperone-mediated protein complex assembly, chaperone-mediated protein folding, immune complex clearance, intrinsic apoptotic signaling pathway, microglial cell activation, microglial cell proliferation, negative regulation of amyloid fibril formation, negative regulation of amyloid-beta formation, negative regulation of cellular response to thapsigargin, negative regulation of cellular response to tunicamycin, negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage, negative regulation of protein homooligomerization, negative regulation	Cytosol, Mitochondrion, Extracellular region or secreted

						of response to endoplasmic reticulum stress, positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity, positive regulation of amyloid-beta formation, positive regulation of apoptotic process, positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway, positive regulation of neurofibrillary tangle assembly, positive regulation of neuron death, positive regulation of nitric oxide biosynthetic process, positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process, positive regulation of protein homooligomerization, positive regulation of receptor-mediated endocytosis, positive regulation of tau-protein kinase activity, positive regulation of tumor necrosis factor production, positive regulation of ubiquitin-dependent protein catabolic process, protein import, protein stabilization, regulation of amyloid-beta clearance, regulation of cell population proliferation, regulation of neuronal signal transduction, response to misfolded protein, response to virus	
Coagulation factor V	F7DZ01	114	166604	0.05	Copper ion binding	Blood circulation, blood coagulation	Extracellular region or secreted
Cofilin 1	F7DXG8	322	18719	0.16	Actin filament binding, signaling receptor binding	actin filament fragmentation, establishment of cell polarity, mitotic cytokinesis, neural crest cell migration, neural fold formation, positive regulation by host of viral process, positive regulation of actin filament depolymerization, protein phosphorylation, regulation of dendritic spine morphogenesis, response to amino acid, response to virus.	Cytoskeleton, cell-cell junction, focal adhesion, lamellipodium

Cofilin 2	F7CT91	51	18708	0.16	Actin filament binding	Actin filament fragmentation, muscle cell cellular homeostasis, positive regulation of actin filament depolymerization, sarcomere organization, skeletal muscle tissue development	Cytoskeleton, Z disc
Creatine kinase B	F6Y2Q4	42	42976	0.07	ATP binding, creatine kinase activity, kinase activity, ubiquitin protein ligase binding	Phosphocreatine biosynthetic process	Cytosol, extracellular space
Chromosome 4 C7orf31 homolog	F6XPI7	16	68576	0.05	***	***	Cytoskeleton, centrosome
Chromosome 10 open reading frame 71	F6WYG9	29	84255	0.04	***	Positive regulation of calcineurin-NFAT signaling cascade	***
Chromosome 13 C16orf89 homolog	F6XS73	58	41953	0.08	Protein homodimerization activity	***	Cytosol, membrane
Cystathionine gamma-lyase	F7D1J3	123	44746	0.24	Carbon-sulfur lyase activity, cystathionine gamma-lyase activity, pyridoxal phosphate binding	Cysteine biosynthetic process via cystathionine, transsulfuration	***
Cysteine and histidine rich 1	F6R2N8	16	41859	0.07	Zinc ion binding	***	***
Cytochrome C oxidase subunit 411	F6ZKC8	53	19527	0.15	Cytochrome-c oxidase activity	Mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen	Cytosol, Mitochondrion, Nucleus
Cytochrome C oxidase subunit 5A	F7CZM1	57	16997	0.44	Cytochrome-c oxidase activity	Mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen	Mitochondrion
Cytochrome C oxidase subunit 5B	F6W7C0	34	13934	0.21	Cytochrome-c oxidase activity	Mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport, mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen	Mitochondrion
Diazepam binding inhibitor, acyl-CoA binding protein	F6ZEV8	114	9908	0.35	Fatty-acyl-CoA binding	***	***
D-dopachrome tautomerase like	F6VPI8	37	12921	0.23	Protease binding	Positive regulation of inflammatory response	Extracellular region or secreted

DHFR domain-containing protein	F6PUB9	45	21641	0.16	Dihydrofolate reductase activity, NADP binding	Dihydrofolate metabolic process, folic acid metabolic process positive regulation of nitric-oxide synthase activity, regulation of removal of superoxide radicals, tetrahydrobiopterin biosynthetic process, tetrahydrofolate biosynthetic process	Mitochondrion
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	F6WQI9	24	59585	0.06	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycotransferase activity	Protein N-linked glycosylation via asparagine	Endoplasmic reticulum
E2F transcription factor 7	F6PWP1	24	65418	0.04	DNA binding, DNA-binding transcription factor activity, DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific, sequence-specific DNA binding, transcription factor binding	Negative regulation of transcription by RNA polymerase II, positive regulation of transcription by RNA polymerase II, regulation of cell cycle	Nucleus
Elongation factor 1-alpha 1	A2Q0Z0	47	50435	0.14	GTPase activity, GTP binding, translation elongation factor activity	Cellular response to epidermal growth factor stimulus, regulation of D-erythro-sphingosine kinase activity, translation, translational elongation	Plasma membrane, Nucleus,
Endoplasmin-like protein	F6ZUJ2	255	92644	0.06	ATP binding, unfolded protein binding	Protein folding, ubiquitin-dependent ERAD pathway	Endoplasmic reticulum, perinuclear region of cytoplasm
Endoplasmic reticulum chaperone BiP	F6YG82	202	72032	0.09	ATPase activity, ATPase activity, coupled, ATP binding, heat shock protein binding, misfolded protein binding, protein domain specific binding, protein folding chaperone, ribosome binding, ubiquitin protein ligase binding, unfolded protein binding	Cellular response to glucose starvation, cellular response to interleukin-4, cellular response to unfolded protein, cerebellar Purkinje cell layer development, cerebellum structural organization, chaperone cofactor-dependent protein refolding, endoplasmic reticulum unfolded protein response, ER overload response, maintenance of protein localization in endoplasmic reticulum, negative regulation of apoptotic process, negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway, positive	Cytosol, endoplasmic reticulum chaperone complex, mitochondrion, nucleus, plasma membrane, cell surface, cytoplasm, endoplasmic reticulum – golgi intermediate compartment, membrane, midbody

						regulation of cell migration, positive regulation of protein ubiquitination, posttranslational protein targeting to membrane, translocation, protein refolding, response to unfolded protein, toxin transport, ubiquitin-dependent ERAD pathway	
Endoplasmic reticulum resident protein 29	F7DNY7	56	29224	0.10	***	Activation of MAPK activity, negative regulation of gene expression, negative regulation of protein secretion, positive regulation of gene expression, protein secretion, regulation of endoplasmic reticulum stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway	Endoplasmic reticulum, Melanosome
Ephrin A1	F6WFS0	39	23094	0.15	Ephrin receptor binding	Axon guidance, ephrin receptor signaling pathway	Plasma membrane
Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	F6X756	53	17598	0.19	Guanyl-nucleotide exchange factor activity, translation elongation factor activity	Translational elongation	Cytosol, eukaryotic translation elongation factor 1 complex
Eukaryotic translation elongation factor 1 delta	F6UNR3	133	70939	0.04	Guanyl-nucleotide exchange factor activity, translation elongation factor activity	Cellular response to ionizing radiation, translational elongation	Cytosol, nucleus, fibrillary, nucleoplasm
Eukaryotic translation initiation factor 4A1	F6XTN1	39	46353	0.06	ATP binding, double-stranded RNA binding, RNA binding, RNA helicase activity, translation initiation factor activity	Cytoplasmic translational initiation	***
Eukaryotic translation initiation factor 4B	F6YK14	49	68999	0.04	RNA strand annealing activity	Eukaryotic translation initiation factor 4F complex assembly	Polysome
Ezrin	F7BPT4	76	69439	0.04	actin filament binding, ATPase binding, cell adhesion molecule binding, disordered domain specific binding,	Actin cytoskeleton reorganization, actin filament bundle assembly, astral microtubule organization, cellular protein-containing complex localization, cellular response to cAMP, cortical microtubule	Cytoskeleton actin filament, ciliary basal body, Cytosol, endosome, nucleus

					identical protein binding, microtubule binding, protein C-terminus binding, protein kinase A catalytic subunit binding, protein kinase A regulatory subunit binding, S100 protein binding	organization, establishment of centrosome localization, establishment of endothelial barrier, establishment or maintenance of apical/basal cell polarity, filopodium assembly, intestinal D-glucose absorption, leukocyte cell-cell adhesion, membrane to membrane docking, microvillus assembly, negative regulation of ERK1 and ERK2 cascade, negative regulation of interleukin-2 secretion, negative regulation of p38MAPK cascade, negative regulation of T cell receptor signaling pathway, negative regulation of transcription by RNA polymerase II, phosphatidylinositol-mediated signaling, positive regulation of cellular protein catabolic process, positive regulation of early endosome to late endosome transport, positive regulation of gene expression., positive regulation of multicellular organism growth, positive regulation of protein localization to early endosome, positive regulation of protein localization to plasma membrane, positive regulation of protein secretion, protein kinase A signaling, protein localization to cell cortex, protein localization to plasma membrane, receptor internalization, regulation of cell shape, regulation of microvillus length, regulation of organelle assembly, sphingosine-1-phosphate receptor signaling pathway, terminal web assembly	
Fanconi-associated nuclease	F6QKT5	16	115890	0.03	DNA binding, metal ion binding, phosphodiesterase I activity	Interstrand cross-link repair	Nucleus
Far upstream element binding protein 1	F6ZYU6	29	67974	0.04	RNA binding	Regulation of transcription, DNA-templated	***

Fatty acid binding protein 3	F6Q6W4	30	14990	0.23	lipid binding	***	***
Fatty acid binding protein 5	F6RGN2	41	15426	0.22	Fatty acid binding, identical protein binding, retinoic acid binding	Glucose homeostasis, glucose metabolic process, negative regulation of glucose transmembrane transport, phosphatidylcholine biosynthetic process, positive regulation of cold-induced thermogenesis, positive regulation of peroxisome proliferator activated receptor signaling pathway, regulation of prostaglandin biosynthetic process, regulation of retrograde trans-synaptic signaling by endocannabinoid, regulation of sensory perception of pain	Extracellular region or secreted, Nucleus, cytoplasm, postsynaptic density
Fetuin B	F6RRV1	85	41791	0.07	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity, metalloendopeptidase inhibitor activity	Binding of sperm to zona pelúcida, negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular region, extracellular space,
FERM, ARH/RhoGEF and pleckstrin domain protein 2	F6US11	30	118929	0.03	Cytoskeletal protein binding, Rac guanyl-nucleotide exchange factor activity	Actin cytoskeleton reorganization, cell adhesion, hair cycle process, neuron remodeling, osteoclast differentiation, podosome assembly, Rac protein signal transduction, regulation of integrin activation, regulation of Rho protein signal transduction, semaphorin-plexin signaling pathway	Cytoskeleton, cytoplasm
Fibronectin	F7CN05	24	255932	0.01	***	***	Extracellular region or secreted
Fidgetin like 1	F6X5F5	17	74888	0.04	ATPase activity, ATP binding, microtubule-severing ATPase activity	Cellular response to ionizing radiation, cytoplasmic microtubule organization, male meiotic nuclear division, negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway, osteoblast differentiation, regulation of cell cycle, regulation of double-strand break repair via homologous recombination	Nucleus, perinuclear region of cytoplasm

Flavin-containing monooxygenase	F6ZE81	21	60873	0.05	Flavin adenine dinucleotide binding, monooxygenase activity, N,N-dimethylaniline monooxygenase activity, NADP binding	***	Endoplasmic reticulum, integral component of membrane
Galectin	F7DYV0	31	15086	0.23	Carbohydrate binding, laminin binding	Myoblast differentiation, plasma cell differentiation, positive regulation of viral entry into host cell, T cell costimulation	Extracellular region or secreted
Gelsolin	F7DHZ1	15	85644	0.03	Actin filament binding, calcium ion binding	Actin filament severing, actin nucleation, barbed-end actin filament capping	***
GC vitamin D binding protein	F6TOP6	101	54425	0.05	Vitamin D binding, vitamin transmembrane transporter activity	***	Extracellular space, cytoplasm
Globin A1	F6RDD3	925	16186	0.65	Heme binding, hemoglobin alpha binding, metal ion binding, organic acid binding, oxygen binding, oxygen carrier activity	Cellular oxidant detoxication, hydrogen peroxidase catalytic process	Hemoglobin complex
Glucuronic acid epimerase	F7CXB5	19	70227	0.04	Calcium ion binding, heparosan-N-sulfate-glucuronate 5-epimerase activity, protein homodimerization activity	Heparan sulfate proteoglycan biosynthetic process, heparin biosynthetic process	Golgi apparatus
Glucos-6-phosphate isomerase	F6ZE54	86	63098	0.05	Glucose-6-phosphate isomerase activity, intramolecular transferase activity, monosaccharide binding	Erythrocyte homeostasis, gluconeogenesis, glucose 6-phosphate metabolic process, glucose homeostasis, glycolytic process, in utero embryonic development, mesoderm formation	Cytosol, plasma membrane (ciliary membrane)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F6YV40	85	36029	0.17	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD ⁺) (phosphorylating) activity, NAD binding, NADP binding	Glucose metabolic process, glycolytic process	Cytosol

Glycine cleavage system H protein	F6QT19	31	14205	0.24	***	Glycine decarboxylation via glycine cleavage system	Mitochondrion
GM2 activator protein	Q3S4D6	166	21042	0.34	Beta-N acetylhexosaminidase activity, enzyme activator activity	Ganglioside catabolic process, learning or memory, lipid storage, neuromuscular process controlling balance, oligosaccharide catabolic process	***
Grainyhead like transcription factor 2	F7BG04	18	71384	0.05	Chromatin DNA binding, DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific, DNA-binding transcription factor activity, intronic transcription regulatory region sequence-specific DNA binding, sequence-specific DNA binding	Anterior neural tube closure, bicellular tight junction assembly, brain development, camera-type eye development, cardiac ventricle morphogenesis, cell adhesion, cell population proliferation, embryonic cranial skeleton morphogenesis, embryonic digit morphogenesis, epidermis development, epithelial cell morphogenesis involved in placental branching, epithelium migration, face development, lung epithelial cell differentiation, lung lobe morphogenesis, multicellular organism growth, negative regulation of keratinocyte differentiation, neural tube development, positive regulation of telomerase activity, regulation of DNA methylation, regulation of transcription by RNA polymerase II	Nucleus, nucleoplasm, cell-cell junction
GSK3-beta interaction protein-like protein	F6WH47	17	16801	0.18	Protein kinase A regulatory subunit binding, protein kinase binding, protein kinase inhibitor activity	Intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress, positive regulation of canonical Wnt signaling pathway	Nucleus, cytoplasm
H15 domain-containing protein	F6S2F8	54	21423	0.16	Double-stranded DNA binding, nucleosomal DNA binding	Chromosome condensation, negative regulation of chromatin silencing, negative regulation of DNA recombination, nucleosome assembly, nucleosome positioning, regulation of transcription, DNA-templated	Nucleus, Chromosome

Haptoglobin	F6XWM5	154	38824	0.24	Hemoglobin binding, serine-type endopeptidase activity	Acute inflammatory response, positive regulation of cell death, response to organic substance	Extracellular space
Heat shock cognate 71 KDa protein	A2Q0Z1	146	71082	0.04	ATPase activity, ATPase activity, coupled, ATP binding, clathrin-uncoating ATPase activity, heat shock protein binding, misfolded protein binding, protein folding chaperone, unfolded protein binding	axo-dendritic transport, cellular response to heat, cellular response to unfolded protein, chaperone cofactor-dependent protein refolding, chaperone-mediated autophagy translocation complex disassembly, chaperone-mediated protein transport involved in chaperone-mediated autophagy, late endosomal microautophagy, mRNA processing, negative regulation of transcription, DNA-templated, protein refolding, protein targeting to lysosome involved in chaperone-mediated autophagy, response to unfolded protein, RNA splicing, slow axonal transport, vesicle-mediated transport	Plasma membrane, nucleus, cytoplasm, melanosome
Heat shock protein family A (Hsp70) member 4	F6YZJ4	38	95449	0.03	***	Chaperone-mediated protein complex assembly, protein insertion into mitochondrial outer membrane	Cytosol, extracellular exosome, nucleus
Heat shock protein family B (small) member 1	F7E3Y7	107	23161	0.13	Protein folding chaperone, protein homodimerization activity, protein kinase C binding, protein kinase C inhibitor activity	Anterograde axonal protein transport, chaperone-mediated protein folding, intracellular signal transduction, negative regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway, positive regulation of: angiogenesis, blood vessel endothelial cell migration, endothelial cell chemotaxis by VEGF-activated vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway, interleukin-1 beta production and tumor necrosis factor biosynthetic process; regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling, response to virus	Nucleus, plasma membrane, axon cytoplasm, Z disc
Heat shock protein family D (Hsp60) member 1	F6Z587	58	61250	0.05	Apolipoprotein A-I binding, ATP binding, chaperone binding,	'de novo' protein folding, activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process, apoptotic	Cytosol, Endosome, Extracellular region or secreted, Mitochondrion,

					double-stranded RNA binding, high-density lipoprotein particle binding, lipopolysaccharide binding, p53 binding, ubiquitin protein ligase binding, unfolded protein binding	mitochondrial changes, B cell cytokine production, B cell proliferation, cellular response to interleukin-7, interaction with symbiont, isotype switching to IgG isotypes, MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway, negative regulation of apoptotic process, positive regulation of interferon-alpha production, positive regulation of interferon-gamma production, positive regulation of interleukin-10 production, positive regulation of interleukin-12 production, positive regulation of interleukin-6 production, positive regulation of macrophage activation, positive regulation of T cell activation, positive regulation of T cell mediated immune response to tumor cell, protein import into mitochondrial intermembrane space, protein refolding, protein stabilization, response to cold, response to unfolded protein, T cell activation	plasma membrane, cell surface, coated vesicle, secretory granule
Heat shock protein HSP 90-beta	Q9GKX8	1171	83527	0.59	ATP binding, ATP-dependent protein binding, disordered domain specific binding, DNA polymerase binding, double-stranded RNA binding, heat shock protein binding, histone deacetylase binding, histone methyltransferase binding, nitric-oxide synthase regulator activity, peptide binding, protein dimerization activity, protein folding chaperone, protein homodimerization activity, protein kinase binding, protein kinase regulator activity, tau protein	Axon extension, cellular response to heat, cellular response to interleukin-4, central nervous system neuron axonogenesis, chaperone-mediated protein complex assembly, establishment of cell polarity, negative regulation of apoptotic process, negative regulation of cell cycle arrest, negative regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process, negative regulation of transforming growth factor beta activation, placenta development, positive regulation of cell differentiation, positive regulation of cyclin-dependent protein kinase activity, positive regulation of nitric oxide biosynthetic process, positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation, positive regulation of phosphoprotein phosphatase activity, positive regulation of protein kinase B	Plasma membrane, extracellular region or secreted, nucleus, cytoplasm, melanosome.

					binding, TPR domain binding, ubiquitin protein ligase binding, unfolded protein binding	signaling, positive regulation of protein localization to cell surface, positive regulation of telomerase activity, positive regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway, protein folding, protein stabilization, regulation of interferon-gamma-mediated signaling pathway, regulation of protein ubiquitination, regulation of type I interferon-mediated signaling pathway, supramolecular fiber organization, telomerase holoenzyme complex assembly, telomere maintenance via telomerase, virion attachment to host cell	
Heat shock protein HSP 90-alpha	Q9GKX7	167	85116	0.07	ATPase activity, ATP binding, disordered domain specific binding, nitric-oxide synthase regulator activity, TPR domain binding, unfolded protein binding	cellular response to heat, positive regulation of nitric oxide biosynthetic process, protein folding, protein stabilization, response to antibiotic, response to cold, response to heat	Cell membrane, nucleus, cytoplasm, melanosome
Hemoglobin subunit alpha	P01958	422	15293	1.03	Heme binding, iron ion binding, organic acid binding, oxygen binding and carrier activity	Cellular oxidant detoxication, hydrogen peroxide catabolic process	Cytosol, hemoglobin complex, haptoglobin-hemoglobin complex
Hemopexin	F6X1I8	56	52066	0.06	Heme transporter activity, metal ion binding	Cellular iron ion homeostasis, heme metabolic process, hemoglobin metabolic process, positive regulation of humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin, positive regulation of immunoglobulin production, positive regulation of interferon-gamma-mediated signaling pathway, positive regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein	Extracellular region or secreted
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D like	F6WHS3	176	34258	0.20	RNA binding, sequence-specific DNA binding, sequence-specific	Regulation of RNA metabolic process	Nucleoplasm, nucleus, ribonucleoprotein complex

					double-stranded DNA binding		
IFI30 lysosomal thiol reductase	F7BN14	178	114050	0.11	***	***	***
IF rod domain-containing protein	F6ZND8	160	60174	0.05	***	***	Cytoskeleton, keratin filament
IF rod domain-containing protein	F6SHJ8	133	61575	0.05	***	***	Cytoskeleton, keratin filament
IF rod domain-containing protein	F6WKL7	25	55019	0.06	***	***	Cytoskeleton, keratin filament
IF rod domain-containing protein	F6UU86	97	42260	0.14	Structural molecule activity	***	Cytoskeleton, intermediate filament
Ig-like domain-containing protein	F7CAC5	171	12395	0.54	Antigen binding, immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway, complement activation, classical pathway, defense response to bacterium, innate immune response, phagocytosis, engulfment, phagocytosis, recognition, positive regulation of B cell activation	Extracellular region secreted, plasma membrane
Innate immunity activator	F6ZDQ9	30	66151	0.04	Adherens junction maintenance, innate immune response, positive regulation of protein ubiquitination	***	***
Insulin like growth factor binding protein 6	F7DEB1	98	25991	0.13	Fibronectin binding, insulin-like growth factor I binding, insulin-like growth factor II binding	Regulation of insulin-like growth factor receptor signaling pathway	Extracellular space, insulin-like growth factor binary complex
Iduronidase alpha-L-	F7E202	18	72646	0.04	L-iduronidase activity	Carbohydrate metabolic process	***
Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1, cytosolic	F6R7J2	24	47918	0.06	Isocitrate dehydrogenase (NADP+) activity, magnesium ion binding, NAD binding	Isocitrate metabolic process, NADP metabolic process	Cytosol, mitochondrion, peroxisome

Joining chain of multimeric IgA and IgM	A0A0B4J1C4	349	18297	0.16	Immunoglobulin receptor binding	***	Pentameric IgM immunoglobulin complex
Kappa-casein	P82187	35	21122	0.16	***	Lactation, protein stabilization	Extracellular region or secreted
Kazrin, perioplakin interacting protein	F7CLP2	18	79235	0.04	***	***	***
Keratin 1	F7B7X0	75	66282	0.09	***	***	Cytoskeleton, keratin filament
Keratin 75	F6S8W6	28	59504	0.06	***	***	Cytoskeleton, keratin filament
Keratin 77	F6WGX6	116	63242	0.05	***	***	Keratin filament
KIAA1324	F6TRZ6	23	114564	0.03	***	Autophagosome assembly, cellular response to starvation, positive regulation of autophagosome assembly	Endosome, golgi apparatus, lysosome, plasma membrane
KIAA2012	F6YAR8	31	69310	0.05	***	***	***
KN motif and ankyrin repeat domains 1	F6QI97	25	149785	0.02	***	negative regulation of actin filament polymerization	Cytoskeleton, cytoplasm
L-lactate dehydrogenase	F6W3T1	163	37292	0.08	l-lactate dehydrogenase activity	Carbohydrate metabolic process, carboxylic acid metabolic process	Cytoplasm
Leiomodin 3	F6UIX7	17	65776	0.05	actin monomer binding, tropomyosin binding	actin filament organization, muscle contraction, myofibril assembly, pointed-end actin filament capping	Cytoskeleton,
Leucine rich repeat containing 9	F6TS65	32	129827	0.03	***	***	***
LDL receptor related protein associated protein 1	F7C9H8	100	34171	0.09	heparin binding, low-density lipoprotein particle receptor binding, receptor antagonist activity	***	Endoplasmic reticulum
Lipocalin 2	F6TIR2	55	23247	0.13	Small molecule binding	***	***
Lipoaln_cytosolic_F A-bd_dom domain-containing protein	F7CWT0	2007	20807	6.03	Small molecule binding	***	***

Lysine methyltransferase 5C	F7ARI5	24	53333	0.06	Histone methyltransferase activity (H4-K20 specific)	Histone H4-K20 trimethylation	Nucleus
LRRcap domain-containing protein	F6YLY4	40	26921	0.11	Histone binding	Nucleocytoplasmic transport, regulation of apoptotic process	***
Malate dehydrogenase	F7CZS6	186	36646	0.08	L-malate dehydrogenase activity	Carbohydrate metabolic process, malate metabolic process, NADH metabolic process, oxaloacetate metabolic process, tricarboxylic acid cycle	Cytosol
Macrophage migration inhibitory factor	F6S243	58	12566	0.24	Chemoattractant activity, cytokine activity, cytokine receptor binding, dopachrome isomerase activity, identical protein binding, phenylpyruvate tautomerase activity	cell population proliferation, cell surface receptor signaling pathway, negative regulation of DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator, negative regulation of cell aging, negative regulation of cell cycle arrest, negative regulation of gene expression, negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator, negative regulation of macrophage chemotaxis, positive regulation of B cell proliferation, positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade, positive regulation of cytokine secretion, positive regulation of fibroblast proliferation, positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation, positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation, positive regulation of protein kinase A signaling, positive regulation of tumor necrosis factor production, prostaglandin biosynthetic process, protein homotrimerization	Cytosol, extracellular region or secreted, nucleus, plasma membrane
Mannosidase beta	F6WRK2	73	95238	0.07	Beta-mannosidase activity	Glycoprotein catabolic process	Lysosome
Metallothionein	F7DM22	40	7101	0.43	metal ion binding	cellular response to cadmium ion, cellular response to copper ion, cellular response	Nucleus, cytoplasm

						to zinc ion, cellular zinc ion homeostasis, detoxification of copper ion	
Mitogen-activated protein kinase kinase 5	F6PIL4	15	140215	0.02	ATP binding, MAP kinase kinase activity, protein kinase activity	Activation of MAPKK activity, intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress	***
Moesin	F6PUX2	21	67827	0.04	Actin binding	***	Cytoskeleton
Myosin heavy chain 9	F6X485	49	207004	0.01	Actin-dependent ATPase activity, actin filament binding, ADP binding, ATP binding, integrin binding, microfilament motor activity, protein domain specific binding, protein homodimerization activity, protein membrane adaptor	Actin cytoskeleton reorganization, actin filament-based movement, actomyosin structure organization, angiogenesis, blood vessel endothelial cell migration, cell-cell adhesion, cytokinetic process, establishment of meiotic spindle localization, establishment of T cell polarity, in utero embryonic development, lysosome localization, meiotic spindle organization, membrane protein ectodomain proteolysis, monocyte differentiation, myoblast fusion, negative regulation of actin filament severing, phagocytosis, engulfment, plasma membrane repair, platelet formation, positive regulation of protein processing in phagocytic vesicle, protein transport, regulated exocytosis, regulation of cell shape, regulation of plasma membrane repair, uropod organization	Cytoskeleton, actomyosin contractile ring, myosin II complex, spindle, stress fiber, cytosol, nucleus, plasma membrane.
Myosin light chain 1	F7AX54	123	17090	0.17	Calcium ion binding	***	***
Myosin XVIIIIB	F7AQ14	20	282568	0.01	Actin binding, ATP binding, motor activity	Cardiac muscle fiber development, in útero embryonic development, vasculogenesis	Cytoskeleton, filamentous actin, unconventional myosin complex, Z disc
N-acetylglucosamine-6-sulfatase	F7CVA2	51	57920	0.05	Glycosaminoglycan binding, metal ion binding, N-acetylglucosamine-6-sulfatase activity	Glycosaminoglycan metabolic process	Lysosome

Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF	F7C1X7	57	38747	0.09	beta-2 adrenergic receptor binding, beta-catenin binding, chloride channel regulator activity, dopamine receptor binding, growth factor receptor binding, molecular adaptor activity, PDZ domain binding, phosphatase binding, protein self-association	Actin cytoskeleton organization, adenylate cyclase-activating dopamine receptor signaling pathway, auditory receptor cell stereocilium organization, bile acid secretion, cellular phosphate ion homeostasis, establishment of epithelial cell apical/basal polarity, establishment of Golgi localization, gland morphogenesis, glutathione transport, microvillus assembly, negative regulation of canonical Wnt signaling pathway, negative regulation of cell migration, negative regulation of cell population proliferation, negative regulation of ERK1 and ERK2 cascade, negative regulation of mitotic cell cycle, negative regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling, negative regulation of platelet-derived growth factor receptor signaling pathway, negative regulation of protein kinase B signaling, negative regulation of sodium:proton antiporter activity, nuclear migration, phospholipase C-activating dopamine receptor signaling pathway, positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway, protein localization to plasma membrane, regulation of cell shape, regulation of cell size, regulation of excretion, regulation of protein kinase activity, renal phosphate ion absorption, renal sodium ion transport, sensory perception of sound	Endomembrane system
Neogenin 1	F6PQZ7	34	150451	0.02	Signaling receptor activity	Axon guidance, iron ion homeostasis, positive regulation of BMP signaling pathway	Plasma membrane pathway
Neuroepithelial cell transforming 1	F6RGP9	19	63005	0.05	Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity	cellular response to hydrogen peroxide, cellular response to ionizing radiation, intracellular signal transduction, myoblast migration, positive regulation of apoptotic process, positive regulation of GTPase	***

						activity, positive regulation of Rho protein signal transduction	
NLR family pyrin domain containing 14	F6U2W1	21	127763	0.03	ATP binding	***	***
NPC intracellular cholesterol transporter 2	F7CIW5	187	16477	0.21	Cholesterol binding, sterol binding	Cholesterol efflux, intracellular cholesterol transport, sterol transport	***
NRDE-2, necessary for RNA interference, domain containing	F6QFW4	34	134401	0.02	RNA interference, Chromatin silencing by small RNA	***	***
Nuclear autoantigenic sperm protein	F7CBN0	32	36856	0.19	alcohol dehydrogenase (NADP+) activity, alditol:NADP+ 1-oxidoreductase activity, oxidoreductase activity	aldehyde catabolic process, D-glucuronate catabolic process, L-ascorbic acid biosynthetic process	Cytosol
Nuclear receptor corepressor 2	F6UWM2	15	85644	0.03	chromatin binding, histone deacetylase binding, Notch binding, nuclear hormone receptor binding, protein N-terminus binding, RNA polymerase II regulatory region DNA binding, sequence-specific DNA binding, transcription corepressor activity	negative regulation of androgen receptor signaling pathway, negative regulation of production of miRNAs involved in gene silencing by miRNA, negative regulation of transcription by RNA polymerase II, regulation of cellular ketone metabolic process by negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	Nucleus
Nucleobindin 2	F6Y426	52	50376	0.06	Calcium ion binding	Negative regulation of appetite	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment
Nucleolin	F6X3K0	194	69313	0.20	DNA topoisomerase binding, identical protein binding, mRNA 5'-UTR binding, protein C-terminus binding, RNA binding, telomeric DNA binding	Angiogenesis, cellular response to epidermal growth factor stimulus, cellular response to leukemia inhibitory factor, negative regulation of translation, positive regulation of mRNA splicing, via spliceosome, positive regulation of transcription by RNA polymerase II, positive regulation of transcription of	Nucleolus, nucleoplasm, nucleus, spliceosomal complex, cell cortex, cytoplasmic ribonucleoprotein granule,

						nucleolar large rRNA by RNA polymerase I, regulation of RNA metabolic process	ribonucleoprotein complex
Nucleophosmin 1	F6X9D3				chromatin binding, histone binding, RNA binding	chromatin remodeling, positive regulation of transcription by RNA polymerase II, regulation of centrosome duplication, ribosomal large subunit biogenesis, ribosomal large subunit export from nucleus, ribosomal small subunit biogenesis, ribosomal small subunit export from nucleus, rRNA export from nucleus	Cytoskeleton, centrosome, nucleolus, nucleoplasm, cytoplasm, ribonucleoprotein complex
Nucleoside diphosphate kinase	F6YY66	75	25749	0.11	ATP binding, nucleoside diphosphate kinase activity	CTP biosynthetic process, GTP biosynthetic process, purine nucleotide metabolic process, pyrimidine nucleotide metabolic process, regulation of apoptotic process, UTP biosynthetic process	***
Olfactory receptor	F7BLJ1	18	34130	0.10	G protein-coupled receptor activity, G protein-coupled serotonin receptor activity, neurotransmitter receptor activity, olfactory receptor activity	Chemical synaptic transmission, G protein-coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger	Plasma membrane
Otogelin	F6QL90	22	319792	0.01	Alpha-L arabinofuranosidase activity, structural molecule activity	L-arabinose metabolic process, adult locomotory behavior, sensory perception of sound	Extracellular region or secreted
PDZ domain containing 2	F6VQN5	16	304085	0.01	***	***	***
Peptidase D	F6Y2H3	33	55647	0.05	Aminopeptidase activity, manganese ion binding	***	***
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	A5YBL8	45	23850	0.14	Cyclosporin A binding, metal ion binding, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity, unfolded protein binding	Chaperone-mediated protein folding, protein peptidyl-prolyl isomerization, protein refolding	***
Peroxiredoxin	F6RCA8	23	17175	0.17	Thioredoxin peroxidase activity	Cell redox homeostasis, cellular response to oxidative stress, hydrogen peroxide catabolic process	Mitochondrion, peroxisome, cytoplasm

Peroxiredoxin 1	F6S6J4	59	22348	0.15	Thioredoxin peroxidase activity	Cell redox homeostasis, leukocyte activation, removal of superoxide radicals, response to oxidative stress	Cytosol
Phosphatidylethanolamine binding protein 1	F6QXW2	145	21439	0.14	***	Negative regulation of MAPK cascade, sperm capacitation	Cell surface
Phospholipase A (2)	F7BBP1	102	17071	0.20	Calcium ion binding, phospholipase A2 activity, phospholipase A2 activity (consuming 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine), phospholipase A2 activity (consuming 1,2-dioleoylphosphatidylethanolamine), phospholipid binding	Arachidonic acid secretion, lipid catabolic process, phosphatidic acid metabolic process, positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	Extracellular region or secreted
Phosphoglycerate kinase	F7D1R1	31	42642	0.07	ADP binding, ATP binding, phosphoglycerate kinase activity, protein-disulfide reductase activity	cellular response to hypoxia, epithelial cell differentiation, gluconeogenesis, glycolytic process, negative regulation of angiogenesis, plasminogen activation, positive regulation of oxidative phosphorylation	Cytosol, extracellular space, membrane raft
Phospholipid-transporting ATPase	F6SX17	27	134156	0.02	ATPase-coupled intramembrane lipid transporter activity, ATP binding, magnesium ion binding	Phospholipid translocation	Membrane, multi-pass membrane protein
Polymeric immunoglobulin receptor	F6W1N4	624	84264	0.15	***	***	Integral component of membrane
Polypyrimidine tract binding protein 2	F6UCW6	47	54569	0.06	mRNA binding	mRNA splice site selection, negative regulation of RNA splicing, regulation of neural precursor cell proliferation, regulation of RNA splicing, regulation of translation	Nucleus, spliceosomal complex
Profilin	F6UJ33	261	15205	0.43	Actin binding	Actin cytoskeleton organization, positive regulation of actin filament bundle assembly, regulation of actin filament polymerization	***
Prosaposin	F6YQM5	61	58862	0.06	beta-galactosidase activity, ganglioside GM1 binding, ganglioside GM2 binding, ganglioside GM3 binding, ganglioside GP1c binding,	adenylate cyclase-inhibiting G protein-coupled receptor signaling pathway, antigen processing and presentation, cellular response to organic substance, cerebellar Purkinje cell differentiation, cochlea development, corneocyte	Endosome, Extracellular region or secreted, Lysosome

					ganglioside GT1b binding, G protein-coupled receptor binding, lipid antigen binding, phospholipid binding, protease binding, protein homodimerization activity	development, cornified envelope assembly, epithelial cell differentiation involved in prostate gland development, galactosylceramide catabolic process, ganglioside GM1 transport to membrane, glucosylceramide metabolic process, inclusion body assembly, intracellular protein transport, lysosomal protein catabolic process, lysosomal transport, micturition, myelination, negative regulation of hydrogen peroxide-induced cell death, neuromuscular process controlling balance, NK T cell differentiation, positive regulation of hydrolase activity, positive regulation of MAPK cascade, prostate gland growth, protein secretion, regulation of lipid metabolic process, sensory perception of sound, walking behavior	
Prostaglandin reductase 1	F6PWC8	84	36011	0.08	15-oxoprostaglandin 13-oxidase activity	***	Cytoplasm
Protein disulfide-isomerase	F6VSN9	51	57020	0.12	identical protein binding, peptide disulfide oxidoreductase activity, protein disulfide isomerase activity	cell redox homeostasis, cellular response to interleukin-7, positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway, protein folding, response to endoplasmic reticulum stress	Endoplasmic reticulum, Extracellular region or secreted
Protein S100	F7BND9	37	11510	0.30	Calcium-dependent protein binding, calcium ion binding, protein homodimerization activity, S100 protein binding	Positive regulation of smooth muscle cell migration, regulation of cell population proliferation	Nucleus, cytoplasm, ruffle
Protein tyrosine phosphatase, receptor type F	F7C1W3	37	214456	0.01	Protein tyrosine phosphatase activity	Peptidyl-tyrosine dephosphorylation, protein dephosphorylation, synaptic membrane adhesion	***
Protein Wnt	F6YC71	17	40399	0.08	Frizzled binding	Cell fate commitment, neuron differentiation, positive regulation of JNK cascade	Extracellular matrix
Proteasome subunit alpha type	F7BRA4	75	27838	0.11	endopeptidase activity, NF-kappaB binding, RNA binding, threonine-type endopeptidase activity	positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity, proteasomal protein catabolic process, proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process, proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	Nucleus, cytoplasm
Pseudouridine 5'-phosphatase	F6Q1R8	122	23394	0.27	Magnesium ion binding, phosphatase activity	***	Integral component of membrane

Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 2	F6SSJ8	21	63221	0.05	Oxidoreductase activity	***	***
Pyruvate kinase	F6W3M5	39	59324	0.06	Kinase activity, magnesium ion binding, potassium ion binding, pyruvate kinase activity	***	***
Phosphoglycerate mutase	F7DQS6	67	23766	0.12	Bisphosphoglycerate mutase activity, phosphoglycerate mutase activity, protein kinase binding	Glycolytic process, regulation of glycolytic process, regulation of pentose-phosphate shunt, respiratory burst.	Cytosol
Prothrombin	F7BFJ1	23	71904	0.04	Calcium ion binding, enzyme activator activity, heparin binding, lipopolysaccharide binding, serine-type endopeptidase activity, signaling receptor binding, thrombospondin receptor activity.	Acute-phase response, antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide, cell surface receptor signaling pathway, cytolysis by host of symbiont cells, fibrinolysis, negative regulation of astrocyte differentiation, negative regulation of cytokine production involved in inflammatory response, negative regulation of proteolysis, neutrophil mediated killing of gram-negative bacterium, platelet activation, positive regulation of blood coagulation, positive regulation of cell growth, positive regulation of cell population proliferation, positive regulation of collagen biosynthetic process, positive regulation of lipid kinase activity, positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling, positive regulation of phospholipase C-activating G protein-coupled receptor signaling pathway, positive regulation of protein localization to nucleus, positive regulation of protein phosphorylation, positive regulation of reactive oxygen species metabolic process, positive regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol, regulation of cell shape, regulation of gene expression.	Extracellular space, external side of plasma membrane.

RAB1B, member RAS oncogene family	F6TGA5	43	22328	0.13	GTPase activity, GTP binding	Autophagosome assembly, endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport, intracellular protein transport, positive regulation of glycoprotein metabolic process, Rab protein signal transduction, regulation of autophagosome assembly, virion assembly	Golge apparatus, endomembrane system, endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment
Rab GDP dissociation inhibitor	F6Z4J4	32	49573	0.06	GTPase activator activity, rab GDP-dissociation inhibitor activity, rab GTPase binding	Protein transport, small GTPase mediated signal transduction, vesicle-mediated transport	***
RAD23 homolog B, nucleotide excision repair protein	F6X3S7	42	40495	0.07	Damaged DNA binding, polyubiquitin modification-dependent protein binding, proteasome binding, ubiquitin binding	Nucleotide-excision repair, proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	Cytosol, nucleus
Ras related GTP binding B	F7A8H8	14	36977	0.09	GTP binding	***	***
Receptor protein-tyrosine kinase	F6T421	16	132432	0.02	ATP binding, transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	***
Retinal dehydrogenase 1	F7CKH3	60	55387	0.05	Aldehyde dehydrogenase (NAD) activity, benzaldehyde dehydrogenase (NAD+) activity	***	***
Retinol-binding protein	F6W135	34	19157	0.15	Retinol binding, retinol transmembrane transporter activity	Retinol transport	Extracellular region or secreted
Retinol-binding protein 4	Q28369	70	233449	0.13	Retinol binding, retinol binding, retinol transmembrane transporter activity	Retinol transport	Extracellular region or secreted

Ribosomal_L23eN domain-containing protein	F6ULU9	66	17675	0.19	Structural constituent of ribosome	Ribosomal large subunit assembly, translation	Cytosol
Ribosome binding protein 1	F7D6B3	95	103173	0.03	***	Protein transport	Endoplasmic reticulum, integral component of endoplasmic reticulum membrane
Ribosomal protein L4	F6VX41	26	48929	0.06	RNA binding, structural constituent of ribosome	Translation	Cytosol, Endoplasmic reticulum, Nucleus
Ribosomal protein L11	F6UB53	93	20507	0.14	5S rRNA binding, RNA binding, structural constituent of ribosome, ubiquitin ligase inhibitor activity, ubiquitin protein ligase binding	Cytoplasmic translation, negative regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process, negative regulation of protein neddylation, positive regulation of gene expression, positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator, positive regulation of protein binding, protein localization to nucleus, protein stabilization, protein targeting, ribosomal large subunit assembly rRNA processing	Cytosolic large ribosomal subunit, nucleus, nucleoplasm, polysomal ribosome
Ribosomal protein L18	F6YJR6	56	21693	0.14	RNA binding, structural constituent of ribosome	Translation	Cytosolic large ribosomal subunit
Ribosomal protein L26	F6TSK0	28	17248	0.20	mRNA 5'-UTR binding, RNA binding, structural constituent of ribosome	cellular response to gamma radiation, cytoplasmic translation, DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in cell cycle arrest, positive regulation of DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in transcription of p21 class mediator, positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator, positive regulation of translation, regulation of translation involved in cellular response to UV, ribosomal large subunit biogenesis, rRNA processing	Cytosol, Nucleus

Ribosomal protein S5	F6TNE1	43	23033	0.13	mRNA binding, rRNA binding, structural constituent of ribosome	Ribosomal small subunit assembly, translation	Cytosol, ribosome
Ribosomal protein S16	F6Q4A3	56	18002	0.16	RNA binding, structural constituent of ribosome	Cellular response to leukemia inhibitory factor, maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA), translation.	cytosolic small ribosomal subunit, small ribosomal subunit
Ribosomal protein S19	F6YZX2	51	16606	0.20	Fibroblast growth factor binding, identical protein binding, protein kinase binding, RNA binding, structural constituent of ribosome	Antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide, defense response to Gram-negative bacterium, erythrocyte differentiation, killing of cells of other organism, maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA), monocyte chemotaxis, negative regulation of respiratory burst involved in inflammatory response, Notch signaling pathway, nucleolus organization, positive regulation of respiratory burst involved in inflammatory response, ribosomal small subunit assembly, translation	Cytosol, Nucleus, postsynaptic density
Ribosomal protein S28	F6WVD1	32	7893	0.45	Structural constituent of ribosome	Cytoplasmic translation, maturation of SSU-rRNA, ribosomal small subunit assembly	Cytosol, polysomal ribosome
RNA binding motif protein 3	F6YEU3	96	16940	0.20	Ribosomal large subunit binding, RNA binding	Positive regulation of mRNA splicing, via spliceosome, regulation of RNA metabolic process, regulation of translation	Nucleus, ribonucleoprotein complex
RNA binding motif protein 3	F6YEU3	90	16940	0.17	Ribosomal large subunit binding, RNA binding	Positive regulation of mRNA splicing, via spliceosome, regulation of RNA metabolic process, regulation of translation	Nucleus, nucleoplasm, spliceosomal complex
RNA binding motif protein X-linked	F6XJB9	80	42360	0.07	RNA binding	Positive regulation of mRNA splicing, via spliceosome, regulation of RNA metabolic process	Nucleus, ribonucleoprotein complex

RNA binding motif protein X-linked	F6XJB9	57	42306	0.16	RNA binding	Positive regulation of mRNA splicing, via spliceosome, regulation of RNA metabolic process	Nucleus, ribonucleoprotein complex
Round spermatid basic protein 1 like	F6W8Q5	23	74643	0.04	***	***	Nucleus
Secreted phosphoprotein 1	F7AYC1	21	35113	0.09	Extracellular matrix binding, integrin binding	Androgen catabolic process, cell adhesion, cellular response to testosterone stimulus, osteoblast differentiation, positive regulation of bone resorption, positive regulation of estradiol secretion, positive regulation of transcription, DNA-templated, response to vitamin D	extracellular space, Golgi apparatus
Serine incorporator 2	F6U4M5	23	50147	0.06	***	Phosphatidylserine metabolic process, sphingolipid metabolic process	***
Serotransferrin	P27425	821	80268	0.11	Ferric iron binding, ferric iron transmembrane transport activity	Cellular iron ion homeostasis,	Extracellular region, secreted
Serpin domain-containing protein	F7BF31	86	47102	0.06	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of endopeptidase activity	Extracellular space
Serpin Family G member 1	F7CZW9	35	52818	0.06	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of complement activation, lectin pathway, negative regulation of endopeptidase activity, regulation of blood coagulation	Extracellular region or secreted
Serum albumin	F7BAY6	10775	70324	3.66	Metal ion binding	***	Extracellular space
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	F7CNE1	51	13238	0.23	RNA binding	Spliceosomal snRNP assembly	Cytosol, nucleus
Small ubiquitin-related modifier	F6T937	137	11211	0.27	Enzyme binding	Negative regulation of DNA binding, protein sumoylation	Nucleus
SMU1 DNA replication regulator and spliceosomal factor	F6QY78	17	57143	0.05	***	mRNA splicing, via spliceosome, RNA splicing	Nucleus, precatalytic spliceosome, U2-type precatalytic spliceosome
Solute carrier family 25 member 4	F6TQZ8	54	34808	0.10	ATP:ADP antiporter activity	Apoptotic mitochondrial changes, negative regulation of necroptotic process	Mitochondrion

Sorbitol dehydrogenase	F7A1C3	64	38626	0.08	identical protein binding, L-idoitol 2-dehydrogenase activity, NAD binding, zinc ion binding	flagellated sperm motility, fructose biosynthetic process, L-xylitol catabolic process, sorbitol catabolic process	Extracellular region or secreted, mitochondrion,
SR-related CTD associated factor 11	F6XJL6	25	155557	0.02	***	Protein import into peroxisome matrix, spliceosomal complex assembly	Nuclear, nucleolus, peroxisome membrane
Stanniocalcin 1	F7AKV6	433	28095	0.40	Hormone activity	***	Extracellular region or secreted
Stanniocalcin 1	F7AKV6	34	28095	0.12	Hormone activity	Cellular calcium ion homeostasis	Extracellular region or secreted
Stratifin	F7CIM1	47	27885	0.11	identical protein binding, phosphoprotein binding, protein domain specific binding, protein kinase binding	establishment of skin barrier, intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage, keratinization, keratinocyte development, negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process, negative regulation of keratinocyte proliferation, positive regulation of cell growth, positive regulation of epidermal cell differentiation, positive regulation of protein export from nucleus, regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity, regulation of epidermal cell division, release of cytochrome c from mitochondria	Cytosol, nucleus
Spectrin beta, non-erythrocytic 5	F6PMZ7	21	414368	0.01	Actin binding, dynactin binding, dynein intermediate chain binding, identical protein binding, kinesin binding, myosin tail binding, phospholipid binding, protein self-association, spectrin binding	Golgi organization, lysosomal transport	***
Splicing factor proline and glutamine rich	F7C177	47	48896	0.06	RNA binding, transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	Alternative mRNA splicing, via spliceosome	Nucleus
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	F6X7Q3	176	74135	0.04	Electron transfer activity, flavin adenine dinucleotide binding, oxidoreductase activity, succinate dehydrogenase (ubiquinone) activity,	Mitochondrial electron transport, succinate to ubiquinone, tricarboxylic acid cycle	Mitochondrion

					succinate dehydrogenase activity		
Supervillin	F6VNU5	24	246024	0.01	Actin filament binding	Cytoskeleton organization	***
Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	F6WFF6	261	37684	0.18	Acid phosphatase activity, ferric iron binding, ferrous iron binding	Bone resorption, ossification	***
Testis expressed 47	F7CU28	13	29614	0.11	***	***	***
Thioredoxin	O97508	116	12014	0.29	Peptide disulfide oxidoreductase activity, protein disulfide oxidoreductase activity	Cell redox homeostasis, glycerol ether metabolic process, negative regulation of hydrogen peroxide-induced cell death, negative regulation of protein export from nucleus, negative regulation of transcription by RNA polymerase II, oxidation-reduction process, positive regulation of DNA binding, positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation, response to radiation	Nucleus, Extracellular region or secreted, Cytoplasm
Thioredoxin domain containing 17	F6RTH0	33	14193	0.21	Protein-disulfide reductase activity	***	Cytosol
Threonine synthase like 1	F6Y6A7	17	84041	0.03	Pyridoxal 5'-phosphate	***	***
Thymopoietin	F7D0U2	29	39994	0.08	DNA binding, inorganic phosphate transmembrane transporter activity	Phosphate ion transmembrane transport	Mitochondrion
Thymopoietin	F7CPD9	39	50332	0.06	DNA binding	***	***
Thymocyte selection associated high mobility group box	F7BRB0	15	54415	0.05	DNA binding	***	Nucleus
TPR_REGION domain-containing protein	F6W9B1	20	41524	0.07	Heat shock protein binding, protein dimerization activity	Chaperone cofactor-dependent protein refolding, chaperone-mediated protein folding, protein-containing complex assembly	***
Transaldolase	F7BA40	31	33970	0.10	Sedoheptulose-7-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate	Carbohydrate metabolic process, pentose-phosphate shunt, non-oxidative branch	***

					glyceronetransferase activity		
Transglutaminase 3	F6YMM5	1088	77161	0.65	Metal ion binding, protein-glutamine gamma-glutamyltransferase activity	Peptide cross-linking	***
Transcription factor binding to IGHM enhancer 3	F6T5E1	29	61336	0.05	DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific, protein dimerization activity, RNA polymerase II cis-regulatory region sequence-specific DNA binding	Humoral immune response, positive regulation of cell adhesion, positive regulation of transcription by RNA polymerase II, regulation of osteoclast differentiation	Cytosol, nucleus, necloplasm
Transgelin	F6QXN5	87	23157	0.13	***	Epithelial cell differentiation	***
Transketolase	F7D9J2	250	65355	0.16	Cofactor binding, protein homodimerization activity, transketolase activity	Glyceraldehyde-3-phosphate biosynthetic process, regulation of growth	Nucleus
Transporter	F6U983	27	69675	0.05	Dopamine:sodium symporter activity, neurotransmitter:sodium symporter activity, norepinephrine:sodium symporter activity	Dopamine uptake involved in synaptic transmission, norepinephrine transport	Plasma Membrane, integral component of plasma membrane,
Triosephosphate isomerase	F6TZS9	36	26979	0.11	Protein homodierization activity, triose-phosphate isomerase activity, ubiquitin protein ligase binding	Gluconeogenesis, glyceraldehyde-3-phosphate biosynthetic process, glycerol catabolic process, glycolytic process, multicelular organismo development	Cytosol
Tripeptidyl peptidase 1	F6TJX5	71	62223	0.05	Endopeptidase activity, metal ion binding, serine-type endopeptidase activity, tripeptidyl-peptidase activity	Bone resorption, central nervous system development, epithelial cell differentiation, lysosome organization, neuromuscular process controlling balance, peptide catabolic process, protein localization to chromosome, telomeric region, proteolysis	Endosome, recycling endosome, golgi apparatus, lysosome
Tropomyosin 3	F6ZTR4	35	32987	0.09	Actin filament binding	Actin filament organization, muscle contraction	Cytoskeleton and actin filament
Tubulin alpha chain	F6YRE0	113	50578	0.18	GTPase activity, GTP binding, structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process, microtubule cytoskeleton organization, mitotic cell cycle	Cytoskeleton

Tubulin beta chain	F7BHV8	327	47919	0.13	Calcium ion binding, GTPase activity, GTP binding, structural constituent of cytoskeleton	Microtubule-based process, microtubule cytoskeleton organization, mitotic cell cycle, negative regulation of microtubule polymerization	Cytoskeleton
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	F6XEB4	70	27899	0.11	Protein domain specific binding	***	***
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon	F6XA04	23	26658	0.11	Calcium channel regulator activity, histone deacetylase binding, identical protein binding, ion channel binding, phosphoserine residue binding, potassium channel regulator activity, protein domain specific binding, protein heterodimerization activity, scaffold protein binding, ubiquitin protein ligase binding	Cellular response to heat, cerebral cortex development, hippocampus development, MAPK cascade, negative regulation of calcium ion export across plasma membrane, negative regulation of calcium ion transmembrane transporter activity, negative regulation of peptidyl-serine dephosphorylation, neuron migration, positive regulation of protein export from nucleus, protein localization to nucleus, protein targeting, regulation of cytosolic calcium ion concentration, regulation of membrane repolarization, regulation of potassium ion transmembrane transporter activity	Nucleus, plasma membrane, cytoplasm
Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	A0A0B4J1C5	68	15004	0.20	Protein tag, structural constituent of ribosome, ubiquitin protein ligase binding	Modification-dependent protein catabolic process, protein ubiquitination, translation	Cytosol, endoplasmic reticulum, nucleus, plasma membrane
Uncharacterized protein	F6SP11	321	11145	0.61	***	***	***
Uncharacterized protein	F6QAU5	89	11604	0.58	Antigen binding, immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway, complement activation, classical pathway, defense response to bacterium, innate immune response, phagocytosis,	Immunoglobulin complex, circulating, external side of plasma membrane

						engulfment, phagocytosis, recognition, positive regulation of B cell activation	
Uncharacterized protein	F6XNT7	44	20804	0.16	Endoribonuclease activity, ribonuclease T2 activity, RNA binding	RNA catabolic process	Extracellular region
Uncharacterized protein	F6S6S0	47	24718	0.12	DNA binding, bending, non-sequence-specific DNA binding, bending, transcription factor binding	Activation of innate immune response, cell chemotaxis, chromatin remodeling, developmental process, DNA ligation involved in DNA repair, DNA recombination, positive regulation of autophagy, positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade, positive regulation of innate immune response, positive regulation of interferon-alpha secretion, positive regulation of interleukin-1 beta secretion, positive regulation of interleukin-1 secretion, positive regulation of interleukin-6 production, positive regulation of NIK/NF-kappaB signaling, positive regulation of transcription by RNA polymerase II, positive regulation of tumor necrosis factor production, regulation of signaling receptor activity, regulation of transcription, DNA-templated, regulation of transcription by RNA polymerase II	Nucleus, cytoplasm
Uncharacterized protein	F7BCR9	19	138095	0.02	***	***	***
Uncharacterized protein	F6TW55	54	11628	0.26	***	***	***
Uncharacterized protein	F7C0C0	43	23462	0.13	RNA binding, sequence-specific DNA binding, sequence-specific double-stranded DNA binding	Regulation of RNA metabolic process	Nucleus, nucleoplasm, ribonucleoprotein complex
Uncharacterized protein	H9GZQ9	289	37984	0.35	Antigen binding, immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway, complement activation, classical pathway, defense response to bacterium, innate immune response, phagocytosis,	Immunoglobulin complex, circulating, external side of plasma membrane, integral

						engulfment and recognition, positive regulation of B cell activation	component of membrane
Uncharacterized protein	F7DL64	133	29591	0.24	RNA binding, sequence-specific DNA binding, sequence-specific double-stranded DNA binding	Regulation of RNA metabolic process	Nucleoplasm, nucleus, ribonucleoprotein complex
Uncharacterized protein	F7DMT2	16	18915	0.16	Calcium ion binding, G-protein beta/gamma-subunit complex binding, heterotrimeric G-protein binding	Centriole replication, mitotic cell cycle, nucleotide-excision repair	Centriole, centrosome, ciliary basal body
Uncharacterized protein	F6V7C1	44	47509	0.06	Magnesium ion binding, phosphopyruvate hydratase activity	Glycolytic process	Cytosol
Uncharacterized protein	H9GZR2	335	37362	0.25	Antigen binding, immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway, complement activation, classical pathway, defense response to bacterium, innate immune response, phagocytosis, engulfment, recognition, positive regulation of B cell activation	Immunoglobulin complex, circulating, external side of plasma membrane, integral component of membrane
Uncharacterized protein	F6VYF8	31	13699	0.22	WW domain binding	***	Nucleus
Uncharacterized protein	F7DW69	246	70455	0.15	ATPase activity, ATPase activity, coupled, ATP binding, heat shock protein binding, misfolded protein binding, protein folding chaperone, ubiquitin protein ligase binding, unfolded protein binding.	Cellular response to unfolded protein, chaperone cofactor-dependent protein refolding, positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process, protein refolding, regulation of mitotic spindle assembly, response to unfolded protein, vesicle-mediated transport.	Cytosol, nucleus, plasma membrane, cytoplasm
Uncharacterized protein	H9GZV1	185	36571	0.08	Antigen binding, immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway, complement activation, classical pathway, defense response to bacterium, innate immune response, phagocytosis,	Extracellular region or secreted, plasma membrane

						engulfment, phagocytosis, recognition, positive regulation of B cell activation	
Uncharacterized protein	H9GZU8	334	36463	0.08	Antigen binding, immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway, complement activation, classical pathway, defense response to bacterium, innate immune response, phagocytosis, engulfment, phagocytosis, recognition, positive regulation of B cell activation	Extracellular region or secreted, plasma membrane
Uncharacterized protein	H9GZN9	95	50092	0.06	Antigen binding, immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway, complement activation, classical pathway, defense response to bacterium, innate immune response, phagocytosis, engulfment, phagocytosis, recognition, positive regulation of B cell activation	Immunoglobulin complex, circulating, external side of plasma membrane
Uncharacterized protein	F6T0A6	90	10906	0.74	ATP binding, chaperone binding, metal ion binding, unfolded protein binding	Chaperone cofactor-dependent protein refolding	mitochondrial matrix
Uncharacterized protein	H9GZU9	728	36388	0.26	***	***	***
Uncharacterized protein	F6VSN2	718	23656	0.60	Dinitrosyl-iron complex binding, glutathione peroxidase activity, glutathione transferase activity, S-nitrosoglutathione binding.	Glutathione metabolic process, linoleic acid metabolic process, negative regulation of ERK1 and ERK2 cascade, negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway, negative regulation of interleukin-1 beta production, negative regulation of JUN kinase activity, negative regulation of monocyte chemotactic protein-1 production, negative regulation of nitric-oxide synthase biosynthetic process, negative regulation of tumor necrosis factor production, xenobiotic metabolic process	Cytosol, mitochondrion, TRAF2-GSTP1 complex

Uncharacterized protein	H9GZT5	98	36979	0.08	Antigen binding, immunoglobulin receptor binding	B cell receptor signaling pathway, complement activation, classical pathway, defense response to bacterium, innate immune response, phagocytosis, engulfment, phagocytosis, recognition, positive regulation of B cell activation	Immunoglobulin complex, circulating, external side of plasma membrane
Uncharacterized protein	F6RMD0	51	87298	0.03	Serine-type endopeptidase activity	Complement activation	Extracellular region
Uncharacterized protein	F6XAY6	31	29814	0.11	***	Nucleosome assembly	Nucleus
Uncharacterized protein	F6XAD7	37	21672	0.14	Structural constituent of ribosome	Mitochondrial transcription, translation	Mitochondrial large ribosomal subunit
Uncharacterized protein	F6ZI35	62	27155	0.11	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity, heme binding, heparin sulfate proteoglycan binding, heparin binding, immunoglobulin binding, serine-type endopeptidase inhibitor activity, signaling receptor binding, zinc ion binding	Antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide, cytolysis in other organism, defense response to fungus, heme transport, negative regulation of angiogenesis, negative regulation of cell adhesion mediated by integrin, negative regulation of cell growth, negative regulation of cell population proliferation, negative regulation of endopeptidase activity, negative regulation of endothelial cell chemotaxis, negative regulation of fibrinolysis, negative regulation of lamellipodium assembly, negative regulation of vascular endothelial growth factor signaling pathway, platelet activation, positive regulation of apoptotic process, positive regulation of blood vessel remodeling, positive regulation of focal adhesion assembly, positive regulation of immune response to tumor cell, regulation of actin cytoskeleton organization, regulation of gene expression, regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation, regulation of platelet	Endosome, Extracellular region or secreted, lysosome

						activation, regulation of protein complex assembly	
Uncharacterized protein	F6XSF7	27	194551	0.01	Endopeptidase inhibitor activity	Complement activation, immunoglobulin mediated immune response, inflammatory response	Extracellular region or secreted
Uncharacterized protein	F6VQ14	52	11655	0.30	Protein kinase activator activity, ribonucleoprotein complex binding, structural constituent of ribosome	Cytoplasmic translation, translational elongation	Cytosol,
Uterocalin	Q28388	2075	21019	5.89	Small molecule binding	***	Extracellular region or secreted
Uteroglobin	F6R114	42	9907	0.30	Signal transduction	***	Extracellular region or secreted, cytoplasm
Valosin containing protein	F7BWW6	52	89798	0.03	ATPase activity, ATP binding, polyubiquitin modification-dependent protein binding	Autophagosome maturation, ER-associated misfolded protein catabolic process, macroautophagy, mitotic spindle disassembly, retrograde protein transport, ER to cytosol, ubiquitin-dependent ERAD pathway	Cytosol, Endoplasmic reticulum, Nucleus
Vanin 1 (CN hydrolase domain-containing protein)	F6Z129	156	58221	0.05	Pantetheine hydrolase activity	Acute inflammatory response, cell-cell adhesion, chronic inflammatory response, innate immune response, negative regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway, pantothenate metabolic process, positive regulation of T cell differentiation in thymus	***
Vitelline membrane outer layer 1 homolog	F6X1X3	211	22028	0.13	***	***	***
WAP four-disulfide core domain 2	F6QP34	43	13863	0.21	Aspartic-type endopeptidase inhibitor activity, serine-type endopeptidase inhibitor activity	***	Extracellular region or secreted
WD repeat-containing protein 76	F6QUL7	32	60883	0.05	DNA binding	Cellular response to DNA damage stimulus, regulation of DNA damage checkpoint	Nucleus

Xin actin binding repeat containing 2	F6WK18	19	379158	0.01	Actin filament binding, alpha-actinin binding	Actin cytoskeleton organization, cardiac muscle tissue morphogenesis, cell-cell junction organization, ventricular septum development	Cytoskeleton
Zinc finger protein 341	F7DPE7	14	92738	0.04	DNA binding, DNA-binding transcription activator activity, DNA-binding transcription factor activity	Regulation of transcription, DNA-templated	Nucleus

