



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



ANÁLISE METALOPROTEÔMICA DE CÁLCIO, FERRO E ZINCO
EM COLOSTRO, LEITE DE TRANSIÇÃO E LEITE MADURO
HUMANOS

CARLA MARIANE COSTA POZZI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: Estrutura e Função*.

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

**BOTUCATU – SP
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ANÁLISE METALOPROTEÔMICA DE CÁLCIO, FERRO E ZINCO
EM COLOSTRO, LEITE DE TRANSIÇÃO E LEITE MADURO
HUMANOS

CARLA MARIANE COSTA POZZI

PROF. DR. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral
e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: Estrutura
e Função*.

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

**BOTUCATU – SP
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Pozzi, Carla Mariane Costa.

Análise metaloproteômica de cálcio, ferro e zinco em colostro, leite de transição e leite maduro humanos / Carla Mariane Costa Pozzi. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Capes: 20801009

1. Metaloproteínas. 2. Colostro. 3. Leite humano. 4. Lactação.

Palavras-chave: Fases de lactação; Leite materno; Metaloproteínas.

Auxílio-Financeiro:

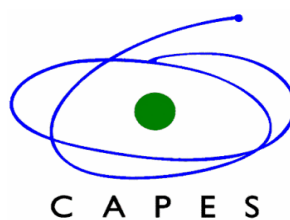
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)



**Dedico este trabalho à minha avó Adelina.
Que você esteja em um lugar melhor!**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Carlos e Marilene, por me apoiarem em todos os momentos da minha vida e por terem me incentivado a estudar desde que eu me conheço por gente, sempre dizendo: “É bom você estudar porque nós nunca vamos pagar faculdade particular!”. Mesmo antes de eu saber o que era uma faculdade.

A toda minha família: Henrique, vó Ana e tios por sempre acreditarem em mim e me darem força.

A todos meus bons amigos de Curitiba, principalmente Kamy, Léo, Dani, Ana e Lu! Amo vocês!

Ao meu orientador Pedro Padilha, pela dedicação, paciência e bondade. Muito obrigada por tudo!

Ao pessoal do laboratório: Cilene, José, Camila, Paulas, Felipe, Tete, Bruna, Mari e Nubya. Vocês fizeram com que os meus dias fossem melhores! Obrigada pelas conversas, risadas, churrascos de pão de alho e cantorias no laboratório! E por serem minha rocha (by José).

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), especialmente ao Carlos.

Ao Prof. Marco Aurélio Zezzi Arruda, da Unicamp, por ceder seu laboratório, e ao Herbert pela grande ajuda da digestão e análise das proteínas.

Ao Prof. Fábio Gozzo e ao Hector, do laboratório Dalton da Unicamp, pela análise das proteínas por espectrometria de massas.

A todas as mães que tão prontamente doaram seu leite para a realização desta pesquisa, meu eterno agradecimento!

A todas as pessoas que ajudaram na coleta de leite.

À Secretaria de Saúde de Botucatu, por permitir que as coletas fossem feitas na Policlínica CSI.

À Fapesp, pela concessão da bolsa e reserva técnica.

“Quando nada parece dar certo, vou ver o cortador de pedras martelando sua rocha talvez 100 vezes, sem que uma única rachadura apareça. Mas na centésima primeira martelada a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela que conseguiu isso, mas todas as que vieram antes”.

Jacob Riis

CURSOS, RESUMOS E DISCIPLINAS CURSADAS

-RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

CAVECCI, B.; MORAES, P. M.; POZZI, C. M. C.; NEVES, R. F.; LIMA, P.; PADILHA, P. Utilização de extração ultra-sônica na determinação da digestibilidade aparente em rações para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). In: 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. Anais da 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

POZZI, C. M. C.; SANTOS, P. R. M.; Padilha, Pedro. Fracionamento de proteínas do leite materno por eletroforese bidimensional. In: X Workshop da Pós-Graduação, 2011, Botucatu. Anais do X Workshop da Pós-Graduação, 2011.

POZZI, C. M. C.; MORAES, P. M.; LIMA, P. M.; SANTOS, F. A.; CAVECCI, B.; ARRUDA, M. A. Z. ; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Zinc mapping by SRXRF in protein spots of fish muscle of the Amazon region - Brazil. In: Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXVII, 2011, Búzios. Proceedings, 2011.

LIMA, P. M.; NEVES, R. F.; SANTOS, F. A.; MORAES, P. M.; PEZZATO, L. E. ; CAVECCI, B.; MACHADO, A. U. ; POZZI, C. M. C.; PADILHA, P. M. Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle tissue by SRXRF and GFAAS after 2D-PAGE separation: Preliminary results. In: 3rd International Symposium on Metallomics, 2011, Munster. Anais do 3rd International Symposium on Metallomics, 2011.

MORAES, P. M.; LIMA, P. M.; NEVES, R. F.; SANTOS, F. A.; POZZI, C. M. C.; CAVECCI, B.; MACHADO, A. U. ; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Calcium mapping by SR XRF in protein spots of fish muscle from Amazon region - Brazil. In: 3rd International Symposium on Metallomics, 2011, Munster. Anais do 3rd Symposim on Metallomics, 2011.

LIMA, P. M.; SANTOS, F. A.; MORAES, P. M.; NEVES, R. F.; POZZI, C. M. C.; CAVECCI, B.; MACHADO, A. U. ; CASTRO, G. R.; PADILHA, P. M. Analytical approaches to the

metalloomic study of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: II International Congress on Analytical Proteomics - ICAP, 2011, Ourense. Book of Abstracts, 2011.

POZZI, C. M. C. ; SANTOS, P. R. M. ; VIEIRA, J. C. S. ; LIMA, P. M. ; MORAES, P. M. ; SANTOS, F. A. ; BALDASSINI, W. A. ; CAVECCI, B. ; BRAGA, C. P. ; PADILHA, P. M. Análise proteômica de colostro, leite de transição e leite maduro humanos por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). In: 5to. Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2012, Montevideo. Anais do 5to. Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2012.

SANTOS, F. A. ; FRANZINI, V. P. ; BRAGA, C. P. ; SANTOS, A. ; ZARA, L. F. ; BALDASSINI, W. A. ; POZZI, C. M. C. ; PADILHA, C. C. F. ; PADILHA, P. M. . Utilização de cabelo como biomarcador de contaminação de mercúrio em comunidades localizadas em Rondônia/Brasil. In: 5to. Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2012, Montevideo. 5to. Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2012.

-APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS NA FORMA DE PAINEL EM EVENTOS CIENTÍFICOS

POZZI, C. M. C. ; SANTOS, P. R. M. ; PADILHA, P. Fracionamento de proteínas do leite materno por eletroforese bidimensional. X Workshop da Pós-Graduação, 2011, Botucatu.

POZZI, C. M. C. ; SANTOS, P. R. M. ; VIEIRA, J. C. S. ; LIMA, P. M. ; MORAES, P. M. ; SANTOS, F. A. ; BALDASSINI, W. A. ; CAVECCI, B. ; BRAGA, C. P. ; PADILHA, P. M. . Análise proteômica de colostro, leite de transição e leite maduro humanos por eletroforese bidimensional (2D-PAGE). 5to. Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2012, Montevideo.

-APRESENTAÇÃO ORAL DE TRABALHOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

POZZI, C. M. C.; MORAES, P. M.; LIMA, P. M.; SANTOS, F. A.; CAVECCI, B.; ARRUDA, M. A. Z. . Zinc mapping by SRXRF in protein spots of fish muscle of the Amazon region - Brazil. XXXVII Colloquium Spectroscopicum Internationale, 2011, Búzios.

-PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

X Workshop da Pós-Graduação do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu. Botucatu - 2011.

XXXVII Colloquium Spectroscopicum Internationale. Búzios - 2011.

Simpósio da Biologia Geral e Aplicada. Botucatu – 2011/2012.

5to. Congreso Iberoamericano de Química Analítica. Montevideu - 2012.

-CURSOS

Bioinorganic speciation analysis and metallomics. Campinas - 2011.

Análise Genômica: Presente e Futuro. Botucatu – 2012.

Métodos analíticos para o estudo de macromoléculas. Botucatu – 2012.

Espectrometria de massas para análise de metabólitos. Botucatu – 2012.

-DISCIPLINAS CURSADAS

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada – 2 créditos

Estratégias analíticas para estudos metalômicos de amostras biológicas – 5 créditos

Análise de Dados – 4 créditos

Tópicos Avançados da Biologia da Reprodução e do Desenvolvimento – 2 créditos

Fundamentos de Métodos Analíticos Aplicados em Análise de Alimentos – 5 créditos

RESUMO

Neste trabalho de Dissertação, buscou-se avaliar as metaloproteínas presentes em amostras de colostro, leite de transição e leite maduro humanos. Utilizando-se técnicas clássicas da proteômica - eletroforese bidimensional, espectrometria de massas e bioinformática - e uma técnica clássica de determinação de metais - a absorção atômica - foi possível identificar e avaliar a ligação de cálcio, ferro e zinco a algumas proteínas do leite materno. Essa nova área de estudo, denominada metaloproteômica, procura compreender o papel dos íons metálicos em sistemas biológicos, mais especificamente o seu papel em relação às proteínas. Três grupos de proteínas foram identificados: soroalbumina, IgA secretória (sIgA) e β -caseína. Encontrou-se cálcio e ferro ligados à sIgA, cálcio e zinco ligados à soroalbumina, e cálcio, ferro e zinco ligados à β -caseína. As peculiaridades dessas interações são discutidas no texto. Além disso, analisou-se as mudanças na expressão dessas proteínas do decorrer da lactação com base nas imagens dos géis de poliacrilamida. A sIgA esteve presente em maiores concentrações no colostro, a β -caseína foi mais expressa no leite de transição e maduro e não houve alteração na expressão da soroalbumina.

ABSTRACT

At this present work, the goal was to evaluate metalloproteins in samples of human colostrum, transitional milk and mature milk. Making use of classical techniques of proteomics – two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and bioinformatic tools – and a classic technique of metal determination – atomic absorption – it was possible to identify and evaluate the binding of calcium, iron and zinc to some human milk proteins. This new area of study, named metalloproteomics, seeks the understanding of the role of metal ions in biological systems, mostly proteins. Three groups of proteins were identified: serum albumin, secretory IgA (sIgA) and β -casein. It was found calcium and iron bound to sIgA, calcium and zinc bound to serum albumin and calcium, iron and zinc bound to β -casein. The specialties of these interactions are discussed in the text. Besides, the changes in these proteins expressions, based in gel analysis, were evaluated. sIgA presented higher concentrations in colostrum, β -casein in transitional and mature milk, and serum albumin presented no alterations.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAS – espectrometria de absorção atômica

Acet – acetileno

Al – alumínio

Ala - alanina

Asp – asparagina

Au - ouro

Ca – cálcio

CHAPS - Sulfato de 3-[(3-cloroaminopropil)-dimetilamônio]-1-propano

Co - cobalto

Cu - cobre

Da - dalton

ESI – ionização por electrospray

FAAS – espectrometria de absorção atômica com atomização por chama

Fe - ferro

FPLC – cromatografia líquida de desempenho rápido

g – grama

h - horas

HPLC – cromatografia líquida de alta performance

Hg - mercúrio

IEF – focalização isoeletrica

IgA – imunoglobulina A

His - histidina

Kcal – quilocaloria

kDa – quilodalton

kV - quilovolt

L- litro

LC-MS – espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida

m – massa

mA - miliampere

M – molar

mM - milimolar

MALDI – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz

MALDI/TOF/MS – espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador tempo-de-vôo

Mbar - milibar

MeCN - acetonitrila

MFGM – membrana de glóbulos lipídicos do leite

Mg - magnésio

mg – miligrama

Mn - manganês

mL – mililitro

MM – massa molar

Mm - milímetro

MS – espectrometria de massas

MS/MS – espectrometria de massas sequencial

m/z – razão massa/carga

nano-LC/ESI/MS/MS – espectrômetro de massas com fonte ESI acoplado a cromatografia líquida nano-capilar

Ni - níquel

nm - nanometro

pH – potencial hidrogeniônico

pI – ponto isoelétrico

PO₄³⁻ - fosfato

Pt - platina

SDS – dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese denaturante em gel de poliacrilamida

sIgA - imunoglobulina A secretória

UPLC – cromatografia líquida de ultra performance

UV – ultravioleta

V - volt

v – volume

Vh – volt-hora

Zn - zinco

µg – micrograma

µL - microlitro

2D-PAGE – eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

°C – graus Celsius

%Vol – volume normalizado de um spot no gel

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. Introdução e Justificativas | 1 |
| 1.1 Fases da lactação | 2 |
| 1.2 Composição Nutricional do Leite Materno | 3 |
| 1.2.1 Carboidratos | 3 |
| 1.2.2 Lipídios | 4 |
| 1.2.3 Proteínas | 5 |
| 1.2.4 Minerais | 6 |
| 1.2.5 Vitaminas | 7 |
| 1.3 Proteômica | 8 |
| 1.4 Metaloproteômica | 9 |
| 1.5 Técnicas | 10 |
| 1.5.1 Eletroforese bidimensional | 11 |
| 1.5.2 Espectrometria de massas | 12 |
| 1.5.3 Espectrometria de absorção atômica | 14 |
| 2. Objetivos | 15 |
| 3. Parte Experimental | 16 |
| 3.1 Equipamentos e Acessórios | 16 |
| 3.2 Reagentes e Soluções | 16 |
| 3.3 Coleta de leite | 18 |
| 3.4 Quantificação das proteínas | 19 |
| 3.5 Separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) | 19 |
| 3.6 Tratamento das imagens | 21 |
| 3.7 Determinação dos metais nos spots protéicos por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) | 21 |
| 3.8 Identificação das proteínas por espectrometria de massas (nano-LC/ESI/MS/MS) | 23 |
| 4. Resultados | 26 |
| 4.1 Quantificação das proteínas | 26 |
| 4.2 Separação das proteínas por 2D-PAGE | 27 |
| 4.3 Identificação das proteínas por espectrometria de massas | 31 |
| 4.4 Análise de mudança de expressão das proteínas identificadas | 34 |
| 4.5 Determinação de cálcio, ferro e zinco ligados às proteínas | 34 |
| 4.6 Avaliação das proteínas | 38 |

| | |
|-------------------------------|----|
| 4.6.1 β -caseínas | 38 |
| 4.6.2 Imunoglobulinas | 40 |
| 4.6.3 Soroalbumina | 43 |
| 5. Conclusão | 47 |
| 6. Referências Bibliográficas | 48 |
| 7. Anexos | 57 |
| 7.1 Anexo I | 57 |
| 7.2 Anexo II | 58 |
| 7.3 Anexo III | 60 |
| 7.4 Anexo IV | 61 |
| 7.5 Anexo V | 65 |

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

O leite é um fluido secretado por todos os mamíferos e é produzido para atender as exigências nutricionais, defensivas e fisiológicas dos recém-nascidos. É uma solução aquosa de lactose, sais orgânicos e inorgânicos, e numerosos compostos em níveis residuais, no qual estão dispersas partículas coloidais de três faixas de tamanho: proteínas do soro dissolvidas em nível molecular, caseínas dispersas em grandes agregados (micelas), e lipídios emulsionados como grandes glóbulos (FOX, 2008).

O leite materno fornece todos os nutrientes, vitaminas e minerais de que o recém-nascido precisa para o seu crescimento nos seis primeiros meses, e nenhum outro líquido ou alimento é necessário. Além disso, o leite materno possui, em sua composição, anticorpos da mãe que ajudam a combater doenças. Só o ato de amamentar estimula sozinho o crescimento apropriado da boca e mandíbula, e a secreção de hormônios para a digestão e saciedade (UNICEF, 2012). Uma nutrição adequada durante a infância é essencial para garantir que as crianças atinjam todo o seu potencial em relação ao crescimento, saúde e desenvolvimento (WHO, 2008).

O aleitamento cria uma conexão especial entre mãe e filho, e essa interação tem repercussões positivas na vida da criança em termos de estimulação, comportamento, fala, sensação de bem-estar e segurança, e interação da criança com outras pessoas. Ele também diminui o risco de condições crônicas que possam surgir posteriormente, como obesidade, colesterol alto, pressão alta, diabetes, asma e leucemias. Estudos também têm demonstrado que crianças que foram alimentadas com leite materno se saem melhor em testes de inteligência e comportamento quando comparadas àquelas que foram alimentadas com fórmulas infantis (UNICEF, 2012).

Para a mãe, o aleitamento materno apresenta benefícios a curto e longo prazo. O risco de hemorragia pós-parto pode ser reduzido se o aleitamento começa imediatamente após o parto, e há evidências de que o risco de câncer de mama e de ovário é menor entre as mulheres que amamentaram. Quando o aleitamento é exclusivo, o retorno da fertilidade pode ser atrasado e a perda de peso acelerada. Estudos também demonstraram uma associação entre a interrupção precoce do aleitamento e depressão pós-parto em mães (UNICEF, 2012; WHO, 2008).

É consenso entre pesquisadores a fundamental importância dos minerais como componentes estruturais e funcionais dos seres vivos, como, por exemplo, no aspecto estrutural o cobre, selênio e o zinco presente nas metalotioneínas e, no aspecto funcional, o papel catalisador que esses íons exercem nos sistemas enzimáticos. Os íons metálicos ligados às proteínas e metaloproteínas representam uma grande porção do número total de proteínas. Estima-se que

aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas requerem a presença de um íon metálico para realizar alguma atividade biológica (HARAGUSHI, 2004). Atualmente, o desenvolvimento de metodologias analíticas que permitam uma avaliação segura das metaloproteínas e/ou proteínas ligadas a metais presentes em fluídos biológicos e em tecidos dos seres vivos é de fundamental importância, principalmente em relação aos chamados micronutrientes metálicos, os quais apresentam faixa de essencialidade e toxicidade muito próximas e que são transportados em nível celular por diferentes proteínas. Devido ao importante papel que essas biomoléculas exercem sobre as atividades biológicas dos seres vivos, novas áreas científicas, denominadas metalômica e metaloproteômica, foram propostas recentemente e permitiram a integração de estudos tradicionalmente analíticos com estudos inorgânicos e bioquímicos (HARAGUSHI, 2004; GARCIA et al., 2006).

Nesse contexto, o estudo da metaloproteômica do leite materno poderá fornecer informações valiosas sobre como um íon metálico está distribuído e coordenado às proteínas *in vivo*, como também da concentração individual da espécie metálica, contribuindo, assim, na elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas presentes em amostras de leite materno em diferentes estágios de lactação.

1.1 Fases da Lactação

O colostro, produção láctea do primeiro ao sexto-dia pós-parto, é um fluido acumulado nas células alveolares nos últimos meses de gravidez e secretado nos primeiros dias pós-parto. É produzido em pequenas quantidades, aproximadamente de 40 a 50 mL no primeiro dia, mas é do que o recém-nascido normalmente precisa. O colostro é rico em glóbulos brancos e anticorpos, especialmente IgA secretória (sIgA), e contém uma porcentagem maior de proteínas, minerais e vitaminas lipossolúveis (A, E e K) do que leites posteriores (Tabela 1). Uma de suas principais funções é promover imunidade ao recém-nascido no momento em que ele é exposto aos microrganismos presentes no meio-ambiente (WHO, 2008; ANVISA, 2008; URUAKPA, 2002).

O leite começa a ser produzido em quantidades maiores alguns dias após o parto. No terceiro dia, o recém-nascido toma aproximadamente de 300 a 400mL e, no quinto dia, de 500 a 800mL de leite. Do sétimo ao décimo-quarto dia após o parto, o leite é chamado de “leite de transição”, e é aquele produzido no período intermediário entre o colostro e o leite maduro. Embora se considere como um “período de transição”, poucos nutrientes atingem o décimo-quarto dia com seus valores definitivos. O processo de transição perdura, na verdade, por todo o primeiro mês de lactação, mas convencionou-se definir como leite maduro aquele produzido

posteriormente ao décimo-quinto dia pós-parto (WHO, 2008; ANVISA, 2008; LAURINDO et al., 1992).

A concentração dos nutrientes cai notavelmente no decorrer do primeiro mês de lactação e geralmente estabiliza após esse período. Essa alteração reflete as mudanças nas necessidades do recém-nascido, que tem a taxa de crescimento reduzida com o passar do tempo e também melhora a capacidade de digerir e absorver os nutrientes (DONANGELO E TRUGO, 2003).

1.2 Composição Nutricional do Leite Materno

O leite materno contém todos os nutrientes de que o recém-nascido precisa nos primeiros seis meses de vida, incluindo gordura, carboidratos, proteínas, vitaminas, minerais e água. É facilmente digerido e eficientemente utilizado. Também contém fatores bioativos que ajudam na digestão e absorção de nutrientes e a desenvolver o sistema imune imaturo do recém-nascido, promovendo proteção contra agentes infecciosos (WHO, 2008).

1.2.1 Carboidratos

A lactose é o principal carboidrato do leite materno e, depois da água, é o constituinte que está presente em maior quantidade no leite (70g/L). Outros carboidratos, presentes em porcentagens mínimas, são representados pela glicose, galactose, oligossacarídeos e glicoproteínas (LAURINDO et al., 1992; DONANGELO E TRUGO, 2003).

A lactose é um dos componentes mais estáveis do leite materno, com variações refletindo principalmente a heterogeneidade dos indivíduos. Os níveis no leite aumentam levemente durante os primeiros dias pós-parto, mas permanecem estáveis no leite maduro (DONANGELO E TRUGO, 2003).

As altas concentrações de lactose no leite materno são importantes para o organismo do recém-nascido, pois seu produto metabólico, a galactose, entra na constituição dos galactolipídeos integrantes do sistema nervoso central. A lactose ainda exerce ação facilitadora sobre a absorção de cálcio, fósforo, magnésio e manganês. Quanto à atividade anti-infecciosa na mucosa intestinal, a lactose age em conjunto com o fator bífido para promover o crescimento do *Lactobacillus bifidus*, levando à queda do pH local e tornando o ambiente impróprio para o crescimento de bactérias patogênicas (LAURINDO et al., 1992; DONANGELO E TRUGO, 2003).

Os lipídios são os constituintes mais variáveis do leite materno. A gordura total aumenta durante a lactação (Tabela 1) e pode decrescer com infecções e desnutrição da mãe. Também varia de acordo com a dieta materna e composição corpórea (DONANGELO E TRUGO, 2003).

Os triacilgliceróis representam ao menos 98% da composição lipídica do leite, seguido de fosfolipídios (0,7%), colesterol (0,5%) e pequenas quantidades de ácidos graxos livres e mono- e diacilgliceróis (DOANANGELO E TRUGO, 2003; JENSEN et al., 1995).

A gordura do leite é uma fonte extraordinária de energia, nutrientes lipossolúveis e lipídios bioativos. Atua no transporte de micronutrientes como vitaminas lipossolúveis e têm propriedades imunossupressoras, anti-inflamatórias e antimicrobianas (CASADO et al., 2009).

1.2.3 Proteínas

Durante o primeiro mês de lactação, o teor de proteínas do leite materno decresce rapidamente e declina muito mais lentamente após esse período. Elas podem ser agrupadas em 3 grandes grupos: mucinas, caseínas e proteínas do soro (LONNERDAL, 2003).

As proteínas presentes em maiores quantidades no soro são as imunoglobulinas, a α -lactoalbumina, a lactoferrina, a soroalbumina e a lactoperoxidase. A caseína consiste de várias subunidades (α , β e k-caseínas) e forma micelas com Ca^{2+} e PO_4^{3-} (LONNERDAL E FORSUM, 1985)

As mucinas envolvem os glóbulos de lipídios na MFGM. Contribuem somente com uma pequena porcentagem da quantidade total das proteínas do leite e a sua concentração não muda durante a lactação (LONNERDAL, 2003).

Os teores de caseína e das proteínas do soro, por outro lado, mudam drasticamente no início da lactação; a concentração das proteínas do soro é bastante alta, principalmente devido à IgA secretória e lactoferrina, enquanto a caseína é praticamente indetectável nos primeiros dias. Subsequentemente, a síntese de caseína na glândula mamária e a sua concentração no leite aumentam, enquanto a concentração das proteínas do soro diminui, o que ocorre parcialmente devido ao maior volume de leite que passa a ser produzido. Como consequência, não há uma proporção “fixa” de proteínas do soro em relação à caseína; ela varia durante a lactação, de aproximadamente 80:20, no início, para 50:50 no final. Como a composição de aminoácidos dessas duas classes de proteínas é diferente, o teor de aminoácidos no leite humano também varia durante o período de lactação (LONNERDAL, 2003; LONNERDAL E ATKINSON, 1989).

As proteínas do leite materno são uma importante fonte de aminoácidos para o recém-nascido. Também promovem a digestão e absorção de outros nutrientes, como os minerais, melhorando a sua biodisponibilidade. Proporcionam defesa contra agentes infecciosos, aprimoramento da função imunológica e desenvolvimento e maturação do intestino (CASADO et al., 2009).

1.2.4 Minerais

Os elementos essenciais presentes no leite são classificados em macroelementos – cálcio, cloro, fósforo, magnésio, potássio e sódio –, que estão em maiores quantidades, e microelementos ou elementos-traço – cobre, crômio, ferro, flúor, manganês, selênio, zinco, etc., que são encontrados em baixa concentração e são essenciais aos processos biológicos. No geral, a quantidade dos minerais constituintes do leite materno não tem relação com a dieta da mãe ou com os níveis sanguíneos maternos. Uma exceção é o selênio, que reflete a dieta e status materno, assim como diferenças geográficas. A fase de lactação afeta o nível de todos os minerais do leite, com as mudanças mais rápidas ocorrendo nos primeiros dias pós-parto (DONANGELO E FRUGO, 2003; SANTOS, 2009).

O processo de formação dos ossos do recém-nascido demanda uma grande quantidade de cálcio. Ele também é essencial para a integridade de membranas, coagulação sanguínea e na contração muscular. A sua concentração aumenta no decorrer das primeiras semanas de lactação e alcança aproximadamente 280mg/L no leite maduro. Uma parte significativa do cálcio é associada com a fração lipídica. Na fração aquosa, está presente em compostos de baixa massa molar ou associado a proteínas do soro. Participa também da formação das micelas das caseínas (BATES E PRENTICE, 1994).

A maior demanda por ferro no corpo humano vem da hemoglobina, mas ele tem funções estruturais e catalíticas em muitas outras proteínas e/ou compartimentos celulares, principalmente na mioglobina e mitocôndria. O leite materno contém menos ferro do que outros alimentos, mas a sua absorção e biodisponibilidade são altas. A lactoferrina, uma proteína do soro que se liga ao ferro com alta afinidade, é apontada como a responsável por esse fenômeno. A concentração total de ferro é maior nos primeiros dias pós-parto, decrescendo durante o primeiro mês de lactação e mantendo-se mais estável nos períodos seguintes. O nível de ferro no leite materno não é afetado pela sua quantidade no corpo da mãe ou por qualquer tipo de suplementação (WHO, 2008; DONANGELO E TRUGO, 2003; BATES E PRENTICE, 1994).

Zinco é o mineral que está presente em maior quantidade nas células. Tem um papel fundamental na função de mais de 300 classes de enzimas, na estabilização da dupla hélice do DNA, no controle da expressão gênica, entre outros. De todos os minerais que se ligam a proteínas, o zinco é o mais abundante (SHI E CHANCE, 2010).

A sua concentração no leite materno não é afetada nem por fatores ambientais (consumo de zinco com origem em “alimentos naturais” ou em suplementos, interação com outros nutrientes, cigarro e contraceptivos orais), nem por fatores constitucionais (parto prematuro, número de filhos, gravidez na adolescência, má nutrição, infecções e diabetes). A fase de lactação é a única variável associada com mudanças importantes na concentração de zinco. Nos primeiros dias pós-parto, a concentração cai acentuadamente, passando para uma queda gradual durante as seis semanas seguintes e alcançando níveis estáveis no terceiro mês. A maior parte do zinco no leite materno está associada à lactoferrina, soroalbumina e a substâncias de baixa massa molar, como citrato e picolinato. A biodisponibilidade do zinco no leite materno é alta, e é usado de forma bastante eficiente pelos recém-nascidos. Apesar de as fórmulas infantis conterem três vezes mais zinco do que o leite, as crianças que são alimentadas com leite materno mantêm níveis mais altos de zinco no plasma do que aqueles que são alimentados com a fórmula infantil (DONANGELO E TRUGO, 2003; BATES E PRENTICE, 1994; LONNERDAL et al., 1992).

1.2.5 Vitaminas

Todas as vitaminas nutricionalmente essenciais são encontradas no leite materno. Elas estão presentes em quantidades normalmente suficientes para o recém-nascido, a menos que a mãe seja deficiente. A exceção é a vitamina D, pois a criança precisa de exposição à luz solar para produzi-la endogenamente (WHO, 2008; DONANGELO E TRUGO, 2003).

As vitaminas hidrossolúveis do leite materno são um grupo diversificado de compostos orgânicos de baixa massa molar que atuam no metabolismo intermediário. Consistem de ácido ascórbico (vitamina C), tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina, piridoxina (vitamina B6), ácido fólico, pantotenato (vitamina B5), biotina e vitamina B12. As vitaminas hidrossolúveis, como a vitamina B12, são ligadas a proteínas do soro específicas (DONANGELO E TRUGO, 2003; PICCIANO, 1995).

Vitaminas lipossolúveis estão presentes no núcleo dos glóbulos de lipídio (vitamina A, vitamina K) ou ligadas a membranas ou a proteínas específicas (vitamina E, vitamina D). Atuam como antioxidantes (vitamina E), na formação de ossos e dentes (vitamina D), na visão,

reprodução e manutenção da estrutura epitelial (vitamina A) e na coagulação sanguínea (vitamina K). As concentrações de vitaminas lipossolúveis diminuem significativamente ao longo das primeiras semanas de lactação (Tabela 1) (DONANGELO, 2003; BATES E PRENTICE, 1994; CANFIELD et al., 1995; LAMMI-KEEFE, 1995).

1.3 Proteômica

O termo proteoma refere-se às proteínas expressas por um genoma em um dado momento. Enquanto o genoma proporciona somente informação estática, o proteoma fornece uma visão geral da maquinaria da célula (MANSO et al., 2005).

Uma análise abrangente em alta-escala das proteínas é o objetivo da ciência do proteoma, a proteômica. Sua área de atuação é ampla; ela engloba a identificação e quantificação de proteínas nas células, tecidos e fluidos biológicos; análise de mudanças na expressão normal das proteínas *versus* a expressão em células doentes; caracterização de modificações pós-traducionais; estudos de interações proteína-proteína; e outras aplicações (BERANOVA-GIORGIANNI, 2003).

Embora o conceito de análise global de proteínas tenha sido proposto há 30 anos, a pesquisa em proteômica só iniciou realmente na metade dos anos 90, que aconteceu devido ao desenvolvimento concomitante de três áreas: eletroforese bidimensional (2D-PAGE); espectrometria de massas para a análise de proteínas separadas por 2D-PAGE com alta sensibilidade e especificidade; e pesquisa em alta-escala do genoma, que produziu um grande número de sequências que foram catalogadas em vários bancos de dados. A eletroforese bidimensional, espectrometria de massas e a bioinformática são ferramentas-chave para o estudo do proteoma (MANSO et al., 2005).

O leite de todos os mamíferos é dominado por somente algumas proteínas que estão presentes em grande quantidade, entre as quais estão: caseínas, imunoglobulinas, α -lactoalbumina, lactoferrina e soroalbumina. Apesar disso, o proteoma do leite é extremamente complexo. Uma grande parte dessa complexidade é consequência das numerosas modificações pós-traducionais e variantes genéticas dessa limitada lista de proteínas. Outra parte é devido às muitas proteínas presentes em baixas concentrações que requerem alguma forma de enriquecimento para serem vistas (O'DONNELLA, 2004).

Desafios importantes para o uso da proteômica dizem respeito à elucidação de diferentes variantes genéticas, mudanças no grau de fosforilação ou glicosilação e a localização de modificações pós-traducionais (MANSO et al., 2005). Além da 2D-PAGE e da espectrometria de massas, outras técnicas são usadas na busca pela elucidação dos itens citados. Chianese et al.

(1992) e Mamone et al. (2003) usaram *immunoblotting* e eletroforese em gel de poliacrilamida para estudar a heterogeneidade das caseínas, enquanto Moreno et al. (2000) usaram FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*) e HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) para estudar o grau de glicosilação e fosforilação da caseína ovina.

O leite também contém um número considerável de proteínas que estão presentes em baixas concentrações e que também podem ser estudadas com o uso de técnicas da proteômica. Apesar de sua baixa concentração, essas proteínas frequentemente têm uma significância biológica crucial, atuando como proteínas regulatórias, proteínas de transdução de sinal, receptores e enzimas. São raramente vistas em mapas tradicionais de 2D-PAGE, ou porque a elevada quantidade das proteínas “principais” impede a sua detecção, ou devido a uma solubilização incompleta durante o processo de extração. A detecção dessas proteínas, na maioria das vezes, exige a remoção daquelas que são abundantes e/ou o uso de imunodetecção específica (MANSO et al., 2005). Murakami et al. (1998) usaram imuno-absorventes para remover α -lactoalbumina, lactoferrina e IgA secretória do colostro e leite maduro humano. As proteínas de “baixa abundância” foram separadas por 2D-PAGE e microsequeenciadas. Dentre as proteínas identificadas estavam a β 2-microglobulina, proteína ligante de ácido-graxo, clusterina, transferrina, etc.

1.4 Metaloproteômica

A química dos íons metálicos tem desempenhado um papel fundamental na evolução da bioquímica. Alguns elementos-traço são conhecidos por serem essenciais (Fe, Cu, Co, Mo, Zn) ou benéficos (V, Cr, Ni, Se, B) para o crescimento de plantas e saúde e nutrição humana. Outros (Cd, Hg, Pb) são potencialmente tóxicos e mecanismos homeostáticos são requeridos para regular o seu nível intracelular (LOBINSKI et al., 2006).

Como um organismo, além da transcrição e tradução, deve assimilar apropriadamente os metais necessários para funcionar, a química de uma célula não deve ser caracterizada somente pelo seu genoma e proteoma, mas também pela distribuição dos metais e metalóides existentes entre as diferentes espécies e compartimentos celulares - o metaloma. Essa distribuição refere-se à totalidade de espécies metálicas individuais em uma célula, englobando os elementos inorgânicos (livres e complexados) e o conjunto de seus complexos com biomoléculas, especialmente com proteínas, que é o metaloproteoma (SZPUNAR, 2004).

O campo de pesquisa que estuda os metalomas e suas correlações com genomas e proteomas é referido como metalômica. A metalômica tem como objetivos a verificação da distribuição das

espécies metálicas e metalóides, bem como a elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas que contêm íons metálicos em suas estruturas, tais como as metaloproteínas e as proteínas ligadas a metais. O estudo de metaloma pode fornecer informações tais como: (i) elemento (espécie metálica ou metalóide) distribuído entre os compartimentos celulares de determinado tipo de célula; (ii) seu meio de coordenação (à qual biomolécula está incorporado ou a qual bioligante está complexo); (iii) as concentrações das espécies metálicas individuais presentes; e (iv) a estrutura da biomolécula (MOUNICOU et al., 2009; GÓMEZ-ARIZ et al., 2004; SZPUNAR, 2005).

Uma metaloproteína é definida como uma proteína cuja função é conferida por um metal. Essa função pode ser conferida através da estabilização da estrutura terciária ou quaternária da proteína, da necessidade da presença do metal para atividade catalítica, reações redox em oxidoredutases, etc. A confirmação de uma proteína como metaloproteína e a identificação do metal intrínseco podem, juntamente com análise por bioinformática da sua sequência, fornecer pistas importantes da sua função e estrutura do sítio ativo (MOUNICOU, 2009; GÓMEZ-ARIZ et al., 2004; SZPUNAR, 2005; SHI E CHANCE, 2011).

As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas ligadas a metais. Elas constituem um grupo de proteínas que contêm um cofator metálico incorporado por meio de ligações específicas, caracterizando-se pela alta afinidade da interação metal-proteína. Já as proteínas ligadas a metais constituem um grupo de proteínas em que os íons metálicos são incorporados por ligações não-específicas, caracterizando-se pela baixa afinidade da ligação metal-proteína e, conseqüentemente, pela quebra fácil dessa ligação. Fracamente ligados às proteínas estão os íons monovalentes como o sódio e potássio. De intensidade moderada, magnésio e cálcio. Dentre os metais que apresentam forte ligação às proteínas estão, mais freqüentemente, os metais de transição, como ferro, cobre, zinco, manganês, molibdênio e cobalto, que devido às suas propriedades (densidade, pequeno raio atômico e interação via eletromagnética e forças eletrostáticas), estão ligados à maioria das metaloproteínas (SILVA, 2009).

1.5 Técnicas

A metaloproteômica é definida como a caracterização funcional e estrutural das metaloproteínas em uma escala genômica. Técnicas importantes frequentemente empregadas na metaloproteômica incluem ferramentas clássicas da proteômica, como espectrometria de massas e 2D-PAGE, cromatografia de afinidade, bioinformática para análise de sequências e modelagem

por homologia, espectroscopia de absorção de raios-X e outras ferramentas baseadas em radiação síncrotron (SHI E CHANCE, 2008).

A combinação dessas técnicas fornece uma abordagem poderosa para o entendimento da função das metaloproteínas. Vantagens dessa abordagem incluem o isolamento de proteínas de uma célula ou tecido nativo; potenciais desvantagens são a perda potencial de metal nativo e dificuldades em gerar quantidades suficientes da proteína de interesse para análise de alta relação sinal-ruído (SHI E CHANCE, 2008).

1.5.1 Eletroforese bidimensional

A 2D-PAGE (eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida) é uma poderosa técnica de separação que permite a resolução simultânea de centenas de proteínas. Essa alta resolução decorre do fato de que a primeira e segunda dimensão são baseadas em duas características independentes das proteínas – ponto isoelétrico e massa molar -, o que permite uma separação eficiente de proteínas com massas molares e pontos isoelétricos similares (BERANOVA-GIORGIANNI, 2003; O'DONNELLA et al., 2004).

A primeira dimensão é a focalização isoelétrica (IEF). Nela, as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico em fitas contendo géis com um gradiente de pH. As faixas de pH utilizadas podem ser lineares ou não lineares, “amplas” (ex: 3-10), “médias” (ex: 4-7) “estreitas” (ex: 4,5-5,5) e “ultra-estreitas” (ex: 4,9-5,3). As faixas amplas de pH permitem uma visão geral das proteínas expressas, mas elas não proporcionam a resolução espacial necessária para uma separação eficiente das proteínas em um proteoma complexo. Pode ocorrer uma co-migração e sobreposição das proteínas com propriedades eletroforéticas similares, o que dificulta a sua detecção, quantificação e identificação. Uma solução para esse problema envolve o uso de gradientes de pH mais “estreitos” (BERANOVA-GIORGIANNI, 2003; ONG E PANDLEY, 2001).

Na segunda dimensão, que tipicamente é a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), as proteínas são separadas com base na sua massa molar. Cada ponto (*spot*) visualizado no gel pode ser considerado como uma coordenada ortogonal de uma proteína que migrou especificamente em função de seu ponto isoelétrico (eixo x) e sua massa MOLECULAR (eixo y) (BERANOVA-GIORGIANNI, 2003; LABORATÓRIO DE PROTEÔMICA – UNIFESP, 2012; GÖRG et al., 2004).

Para se aproveitar da alta resolução da 2D-PAGE, as proteínas da amostra devem ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas para promover a ruptura das interações

moleculares e garantir que cada spot represente um polipeptídeo individual. Em se tratando de simplicidade e reprodutibilidade, seria altamente desejável que o processo de extração das proteínas tivesse uma única etapa, mas não há um método único de preparo de amostras que possa ser aplicado universalmente a todos os tipos de amostras analisadas por 2D-PAGE. Embora um grande número de protocolos-padrão tenha sido publicado, eles têm que ser adaptados para cada tipo de amostra e para a proteína de interesse. Duas recomendações gerais, entretanto, podem ser feitas: o preparo deve ser o mais simples possível e modificações na proteína devem ser evitadas. Para isso, enzimas proteolíticas devem ser inativadas, amostras contendo uréia não devem ser aquecidas, etc (GÖRG et al., 2004).

A comparação em larga-escala das diferenças nas expressões das proteínas não seria possível sem a capacidade de se manipular grandes conjuntos de dados gerados por múltiplas corridas eletroforéticas e, por isso, a análise das imagens dos géis por um software é fundamental. Desta maneira, proteínas podem ser quantificadas e os spots em múltiplos géis podem ser combinados e comparados. Análise estatística pode ser feita em grupos de spots em conjuntos de géis, e variações, diferenças e similaridades podem ser avaliadas (BERANOVA-GIORGIANNI, 2003; ONG, 2001).

A 2D-PAGE foi por muitos anos, e ainda é, um dos métodos mais populares de separação de proteínas. Os estudos proteômicos de leite materno aproveitam do seu alto poder de resolução para a identificação de centenas de proteínas por gel e isoformas. Fortunato et al. (2003) caracterizaram mais de 100 proteínas de membrana no colostro previamente separadas com fitas de 18cm tanto em faixa de pH de 3 a 10 quanto de 4 a 7. Em outro estudo, conduzido por Poth et al., foi possível identificar, através de 2D-PAGE e MALDI-TOF-MS, 5 fosfoformas da β -caseína e 8 fosfoformas da α_{s1} -caseína, o que mostra o alto poder de resolução da 2D-PAGE.

1.5.2 Espectrometria de massas

Proteínas fracionadas por 2D-PAGE podem ser identificadas com base em características únicas que são medidas por um espectrômetro de massas.

O princípio básico da espectrometria de massas (MS) é gerar íons de compostos inorgânicos ou orgânicos por qualquer método apropriado, para separá-los pela sua razão massa-carga (m/z) e detectá-los qualitativa e quantitativamente pela sua m/z e abundância. É uma ferramenta analítica indispensável em química, bioquímica, farmácia, medicina e muitos campos relacionados da ciência. É usada para análise de bibliotecas combináveis, células, seqüenciamento de biomoléculas, etc. A elucidação da estrutura de substâncias desconhecidas, a análise de analitos

forenses e ambientais, o controle de qualidade de remédios, alimentos e polímeros: todos dependem fortemente da espectrometria de massas (GROSS, 2011).

O espectrômetro de massas é composto de três sistemas básicos: uma fonte de ionização, um analisador de massas e um sistema de detecção (Figura 1).

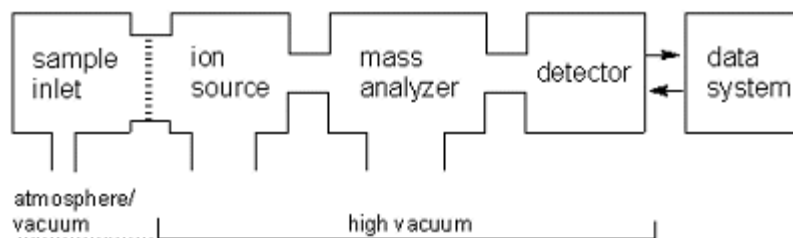


Figura 1: Componentes básicos de um espectrômetro de massas. A fonte de ionização, o analisador de massas e o detector são operados sob alto vácuo. A introdução da amostra pode ser feita a pressão atmosférica ou a vácuo, e sistemas mais novos têm softwares “acoplados” usados para coletar e processar dados do detector (GROSS, 2011).

Na fonte de ionização, as amostras são ionizadas antes da análise. Algumas técnicas são muito energéticas e causam fragmentação extensiva. Outras são mais brandas e somente produzem íons das espécies moleculares. O advento de técnicas de ionização mais brandas, como Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI) e Ionização por Electrospray (ESI), possibilitaram a expansão da espectrometria de massas para os campos de biologia e ciências biomédicas, e atualmente são os métodos mais empregados (HOFFMAN E STROOBANT, 2007; GROSS, 2011).

ESI é uma técnica de ionização branda que realiza a transferência de íons da solução para a fase gasosa. Esta técnica é extremamente útil para a análise de moléculas grandes, não-voláteis e que podem adquirir carga, como proteínas e ácidos nucleicos. Na ESI, a solução é composta de um solvente volátil contendo o analito iônico em concentrações bastante baixas, tipicamente de 10^{-6} a 10^{-4} mol/L. Além disso, a transferência de íons da fase condensada até a fase gasosa começa a pressão atmosférica e gradualmente prossegue para o alto vácuo do analisador de massas. Essa suavidade na ionização faz com que a ESI seja considerado “as asas dos elefantes moleculares” (GROSS, 2011). Como esta técnica ioniza moléculas diretamente da solução, é facilmente acoplável a técnicas de cromatografia líquida como HPLC, μ HPLC e eletroforese capilar (KLITZKE, 2012; GUERRERA E KLEINER, 2005).

1.5.3 Espectrometria de absorção atômica

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica em que átomos gasosos livres absorvem radiação eletromagnética em um comprimento de onda específico, produzindo um sinal correspondente mensurável que é proporcional à concentração dos átomos livres presentes no caminho óptico (IVANOVA, 2005).

Um espectrômetro de absorção atômica consiste de:

- 1) uma fonte de radiação (lâmpada de catodo oco), que emite o espectro do elemento a ser analisado;
- 2) um sistema de atomização, no qual os átomos livres do analito são formados;
- 3) um monocromador, que é usado para dispersar os vários comprimentos de onda emitidos pela fonte de radiação e selecionar o feixe de interesse; e
- 4) um detector, que mede a intensidade da radiação e amplifica o sinal resultante (MARSHAL, 1997).

Dentre os métodos mais comuns de atomização na espectrometria de absorção atômica, está a atomização por chama (FAAS). Em um atomizador de chama, uma solução de amostra é nebulizada por um fluxo de oxidante gasoso, misturada com um combustível gasoso, e levada à chama onde ocorre a atomização. Há uma série de processos que ocorrem durante a atomização, exemplificados na Figura 2. Primeiro a solução é transformada, por um nebulizador, em névoa, que vai para a chama. Na chama ocorre a evaporação do solvente e formação de partículas sólidas muito pequenas, que sofrem vaporização com dissociação em seus átomos componentes que, inicialmente, estarão em seu estado fundamental. Alguns átomos podem ser excitados pelo calor da chama, resultando em espectros de emissão. Outros absorvem energia da lâmpada de catodo oco, que é a fonte de radiação externa que emite o espectro do elemento a ser analisado. A diferença da energia emitida pela lâmpada e a que chega até o detector é usada para calcular a quantidade de energia que foi absorvida, sendo possível, a partir da absorbância medida, calcular a concentração do elemento de interesse na solução (SKOOG ET AL., 2002; BASSET et al., 1981).

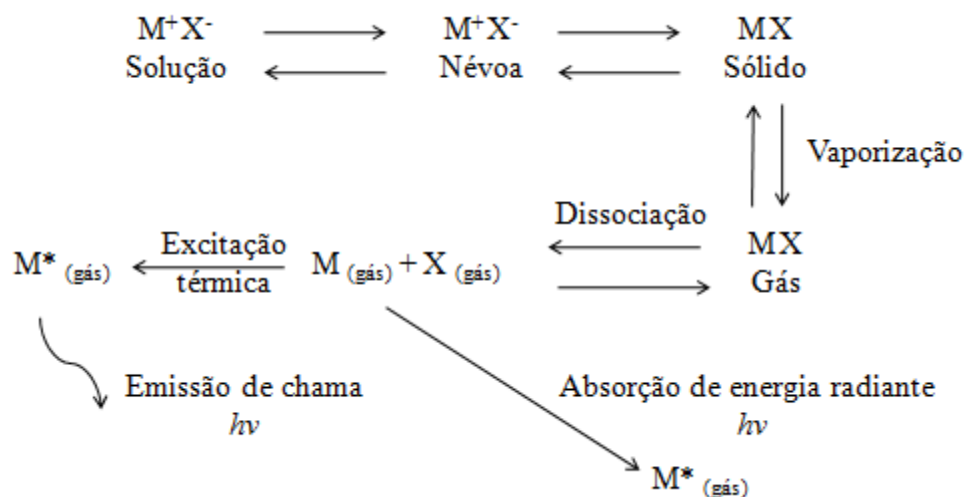


Figura 2: Processos que ocorrem durante a atomização por chama (BASSET et al., 1981).

A análise de amostras biológicas pode trazer alguns problemas. Como o analito pode estar presente em diferentes estados de oxidação, combinado com diferentes ânions ou ligados a proteínas ou outros ligantes orgânicos, a porção orgânica da amostra pode causar grandes interferências da matriz durante o processo de detecção. Para minimizar essas interferências, um procedimento comumente realizado é a digestão/mineralização úmida da porção orgânica da amostra com ácidos fortes em bloco digestor ou forno de microondas (MARSHAL, 1997). Os principais ácidos utilizados são ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido perclórico, além de peróxido de hidrogênio e Água Régia (mistura de ácido clorídrico e ácido nítrico).

Em um trabalho conduzido por Silvestre et al. (1999), determinou-se cobre, ferro e zinco em colostro, leite de transição e leite maduro humanos de 30, 60 e 90 dias através de FAAS com mineralização das amostras em microondas. As quantidades de cálcio, ferro e zinco estavam nas faixas reportadas por outros autores e apresentaram um decaimento gradual durante o período de lactação.

2. OBJETIVOS

- Fracionamento por 2D-PAGE das proteínas de leite materno em amostras de colostro, leite de transição e leite maduro.
- Identificação das proteínas por nano-LC-ESI/MS/MS após o seu fracionamento.
- Avaliação das mudanças de expressão das proteínas identificadas de acordo com a fase de lactação.

-Determinação qualitativa de cálcio, ferro e zinco ligados às proteínas por FAAS nas amostras de colostro, leite de transição e leite maduro.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos e Acessórios

- Agitador por efeito Vórtex, marca Thermolyne, modelo M-37600 (Dubuque, EUA);
- Balança analítica, marca Mettler, modelo AG245 (Bedford, EUA);
- Banho Maria, marca Marconi, modelo MA 156/6 (Piracicaba, Brasil);
- Cuba para eletroforese do tipo SDS PAGE, marca GE (Uppsala, Suécia);
- Espectrofotômetro UV/Visível, marca ThermoSpectronic, modelo Genesys 6 (Rochester, EUA);
- Espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU AA 6800;
- Mesa Agitadora, marca Quimis, modelo Q225M (Diadema, Brasil);
- Sistema de purificação PURELAB Ultra, marca ELGA LabWater (Saint Maurice, França);
- Sistema para SDS-PAGE, marca Amersham Biosciences, modelo SE 600 Ruby (Uppsala, Suécia);
- Sistema para focalização isoeletrica, marca GE Healthcare, modelo Ettan IPGphor 3 (Uppsala, Suécia);
- Ultracentrífuga refrigerada, marca BioAgency, modelo Bio-Spin-R (São Paulo, Brasil);
- Vidrarias convencionalmente utilizada em um laboratório de Química Analítica.

3.2 Reagentes e Soluções

- Ácido Acético Glacial, $C_2H_4O_2$, MM = 60,05 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ácido Clorídrico, HCl, MM = 36,46 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);

- Ácido Etilenodiaminotetracético dipotássico (K₂EDTA), C₁₀H₁₄O₈N₂K₂·2H₂O, MM = 404,46 g/mol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);
- Ácido Fosfórico 85%, H₃PO₄, MM = 98,00 g/mol (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Ácido Nítrico, HNO₃, MM = 63,01 g/mol (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Acrilamida, C₃H₅NO, MM = 71,08 g/mol (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Agarose grau Biologia Molecular (BioAgency, São Paulo, Brasil);
- Albumina de Soro Bovino (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Anfólitos, pH de 3 a 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Azul de Bromofenol, C₁₉H₉Br₄NaO₅S, MM = 691,94 g/mol (BioAgency, São Paulo, Brasil);
- Coomassie blue G-250, C₄₇H₅₀N₃NaO₇S₂, MM = 854,03 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Ditiotreitól (DTT), C₄H₁₀O₂S₂, MM = 154,24 g/mol (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), C₁₂H₂₅NaO₄S, MM = 288,28 g/mol (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Etanol, C₂H₆O, MM = 46,07 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Fitas para focalização isoeétrica com anfólitos imobilizados de pH 3 a 10 e 4 a 7 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Glicerol 87%, C₃H₈O₃, MM = 92,09 g/mol (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Inibidor de protease Complete Mini, EDTA-free (Roche)
- Iodoacetamida, C₂H₄INO, MM = 184,96 g/mol (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Kit de digestão de proteínas *In-Gel Digest_{ZP} Kit* (Millipore, Millerica, EUA)
- Metanol, CH₄O, MM = 32,04 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- N, N'-metilenobisacrilamida, C₇H₁₀N₂O₂, MM = 154,17 g/mol (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);

- N, N', N, N'-tetrametilenodiamina (TEMED), $C_6H_{16}N_2$, MM = 116,20 g/mol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA);
- Óleo Mineral (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Padrão Proteico de Massa Molar (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Persulfato de Amônio, $N_2H_8S_2O_8$, MM = 228,20 g/mol (Mallinckrodt, Paris, França);
- Sulfato de Amônio, $H_8N_2O_4S$, MM = 132,14 g/mol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil);
- Sulfonato de 3-[3-cloroamidopropil-dimetilamonio]-1-propano (CHAPS), $C_{32}H_{58}N_2O_7S$, MM = 614,88 g/mol (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Tiourea, CH_4N_2S , MM = 76,12 g/mol (Synth, Diadema, Brasil);
- Tris-hidroximetil amino metano, $C_4H_{11}O_3N$, MM = 121,14 g/mol (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia);
- Ureia, CH_4N_2O , MM = 60,06 g/mol (BioAgency, São Paulo, Brasil).

3.3 Coleta de leite

As coletas de colostro, leite de transição e leite maduro foram feitas de cinco lactantes da área de abrangência do Centro Policlínica Central (CSI) de Botucatu-SP. As amostras foram armazenadas a $-20^{\circ}C$. Antes da coleta, todas as lactantes que concordaram em participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam um pequeno questionário (Anexos II e III). O processo de coleta do leite materno foi feito por uma enfermeira, seguindo normas técnicas da REDEBLH (BLH-IFF/NT-16.04 – Ordenha: Procedimentos Higiênico-Sanitários).

Para que fosse mantido o sigilo das participantes, elas foram denominadas “Lactante A”, “Lactante B”, “Lactante C”, “Lactante D” e “Lactante E”. Os dias de cada coleta estão listados na Tabela 2.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu (Anexo I).

Tabela 2: Dias de coleta das amostras de leite de cada lactante

| Lactante | Dias de lactação |
|----------|------------------|
| A | 4, 7 e 25 |
| B | 3, 14 e 41 |
| C | 5, 12 e 39 |
| D | 3, 15 e 40 |
| E | 5, 9 e 21 |

3.4 Quantificação das proteínas

A concentração de proteínas totais das amostras de leite materno foi determinada pelo método do Biureto usando albumina de soro bovino como padrão. Curvas analíticas de calibração foram construídas com concentrações de 10 a 100g/L a partir de uma solução estoque de albumina (100 g/L).

Um total de 50 μ L de amostra/padrão e 2,5mL do reativo de Biureto foram misturados e levados a banho-maria a 32°C por 10min. Após 5 minutos em temperatura ambiente, as leituras foram feitas em 545nm.

3.5 Separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

As amostras de colostro, leite de transição e leite materno das cinco lactantes foram descongeladas e a camada de gordura foi separada da fase aquosa por centrifugação a 4000g, 4°C e 30min de acordo com Lonnerdal e Forsum (1985). O leite desengordurado foi diluído em uma solução de solubilização contendo uréia 7 mol/L; tiouréia 2 mol/L; CHAPS (Sulfato de 3-[(3-cloroaminopropil)-dimetilamônio]-1-propano) a 2% (m/v); anfólitos 0,5% (v/v) em pH variando de 3 a 10 e 4 a 7; azul de bromofenol 0,002% (m/v); e inibidor de protease. A diluição do leite foi feita de tal forma que a concentração de proteínas totais resultante fosse a mesma para todas as amostras: 1,5 μ g/ μ L. Um volume de 250 μ L dessa solução foi adicionado às fitas de 13cm contendo gel de poliacrilamida e com gradiente de pH de 3 a 10 e de 4 a 7 para que estas fossem reidratadas com solução contendo a própria amostra.

As fitas foram reidratadas por 12h em bandeja de reidratação a temperatura ambiente, e, em seguida, levadas para o sistema de focalização isoeletrica (IEF) EttanTM IPGphorTM 3 (GE HEALTHCARE). As corridas tanto para as fitas com gradiente de pH de 3 a 10 quanto para as

de 4 a 7 foram realizadas seguindo-se as programações recomendadas pelo fabricante, descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Programação utilizada na IEF para as fitas com gradiente de pH 3-10 e 4-7

| Etapa | Padrão de alteração de voltagem* | Gradiente de pH | | | |
|-------|----------------------------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <u>3 a 10</u> | | <u>4 a 7</u> | |
| | | Tensão (V) | Acúmulo (Vh) | Tensão (V) | Acúmulo (Vh) |
| 1 | Degrau | 500 | 500 | 500 | 500 |
| 2 | Gradiente | 1000 | 800 | 1000 | 800 |
| 3 | Gradiente | 8000 | 11300 | 8000 | 11300 |
| 4 | Degrau | 8000 | 2900 | 8000 | 5400 |

*Existem duas opções para o padrão de alteração de voltagem. Quando a etapa é o “degrau”, o equipamento segura a voltagem constante por toda a duração da etapa, e, quando é “gradiente”, a voltagem aumenta linearmente em relação ao tempo.

Após a IEF, as fitas foram equilibradas em duas etapas. Na primeira delas, utilizou-se 5 mL de solução contendo uréia 6 mol/L, SDS 2% (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol/L (pH 8,8), azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 2% (m/v), para manter as proteínas em suas formas reduzidas. Na segunda etapa, utilizou-se uma solução de composição similar, substituindo-se, no entanto, o DTT por iodoacetamida 2,5% (m/v), para obter-se a alquilação dos grupos tióis das proteínas e com isso prevenir uma possível reoxidação (GORG et al., 2000; SILVA JUNIOR, 2000; BERKELMAN E STENSTEDT, 1998).

Na segunda etapa do processo eletroforético (SDS-PAGE), as fitas foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 12,5% (m/v), previamente preparado em placa de 180 x 160 x 1,5mm. Aplicou-se os padrões de massa molar - β -fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa) - ao lado das fitas e ambos foram selados com solução de agarose 0,5% (m/v). A programação da corrida, feita na cuba SE 600 Ruby (Amersham Biosciences), está descrita na Tabela 4.

Tabela 4: Programação da SDS-PAGE

| Etapa | Corrente | Tempo |
|-------|------------|---------|
| 1 | 7,5 mA/gel | 15min |
| 2 | 15 mA/gel | 4h30min |

Após o período de corrida, as proteínas foram fixadas no gel, durante 1h, empregando-se uma solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v). As proteínas foram reveladas empregando-se o corante Coomassie coloidal, que ficou em contato com o gel durante 48h.

3.6 Tratamento das imagens

Para o tratamento das imagens, os géis foram escaneados no e suas imagens analisadas pelo programa ImageMaster Platinum, versão 7.0. As imagens passaram por um processo de edição automática e manual para a retirada de falsos spots e, após a limpeza, foram obtidos dados como número de spots por gel, pI e massa molar dos spots e quantidade de proteína presente em cada spot. Para a obtenção deste último dado, utilizou-se o volume normalizado dos spots em um gel, calculado a partir da fórmula:

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{s=1}^n Vol_s} \times 100, \text{ onde } Vol_s \text{ é o volume do spot } S \text{ em um gel contendo } n \text{ spots.}$$

Também se calculou o grau de similaridade entre os géis das diferentes amostras fazendo-se um procedimento denominado *matching*, no qual são encontrados spots equivalentes entre os vários géis.

3.7 Determinação dos metais nos spots protéicos por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)

Devido à dificuldade em se analisar todos os spots de todos os géis pelas técnicas de espectrometria de absorção atômica e espectrometria de massas, foram escolhidos apenas os géis da lactante B para serem estudados mais profundamente. Essa escolha foi feita pelos seguintes motivos:

- Quantidade de leite suficiente para as próximas análises
- Bom fracionamento dos spots (Figuras 5,6 e 7)
- Número alto de spots por gel (Tabela 8)

-Diferenças consideráveis entre os géis das três fases de lactação (Tabela 8)

Para a determinação de cálcio, ferro e zinco pela espectrometria de absorção atômica, foram feitas, para cada amostra, duas corridas (são feitos dois géis por corrida) em momentos diferentes, mas nas mesmas condições, e em faixa de pH de 3 a 10 e de 4 a 7.

Após a revelação dos géis, os spots (dos géis em duplicata) foram recortados com a ponta de uma ponteira e mineralizados com ácidos em bloco digestor para a eliminação da fração orgânica de acordo com os procedimentos descritos a seguir: os spots foram transferidos para balões de Kjeldahl (denominados balões de digestão) de 25mL. Para cada balão de digestão foram transferidas alíquotas de 3mL de ácido sulfúrico concentrado e 1mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de balões de digestão foi colocado em bloco digestor da Marconi em temperatura de aproximadamente 40°C até completa mineralização das amostras (extrato transparente). Em seguida os extratos ácidos obtidos foram transferidos para balões volumétricos de 10mL completando-se os volumes com água ultrapura. Após essa etapa, no caso exclusivo de determinação de cálcio, lantânio foi adicionado aos extratos até uma concentração final de 10g/L para evitar a formação de compostos refratários (sais de cálcio).

Para a construção das curvas analíticas, soluções padrão aquoso de cálcio, ferro e zinco em meio de H_2SO_4 0,10mol/L e de lantânio – no caso da solução padrão de cálcio – foram preparadas a partir da diluição dos padrões Titrisol (Merck) contendo 1000mg/L dos analitos. As faixas ótimas de concentração das curvas analíticas foram as sugeridas no manual do equipamento. Para cada curva analítica foi preparado um branco que continha todos os componentes das soluções padrão menos o analito de interesse, conforme descrito a seguir: branco da curva analítica do cálcio – 5mL H_2SO_4 0,10mol/L + 20mL de solução 10g/L de lantânio + água ultrapura até o volume de 100mL do balão volumétrico; branco da curva analítica do ferro e zinco - 5mL H_2SO_4 0,10mol/L + água ultrapura até o volume de 100mL do balão volumétrico.

Finalmente, as condições operacionais utilizadas para as determinações de Ca, Fe e Zn por FAAS foram as descritas no manual do fabricante do equipamento (Cookbook, Shimadzu AA – 6800, 2000) e constam na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros utilizados nos ajustes do FAAS – SHIMADZU AA-6800 para as determinações de Ca, Fe e Zn

| Elementos | Ca | Fe | Zn |
|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Corrente da lâmpada | 3mA | 5mA | 6mA |
| Estequiometria da chama | Oxidante Ar-Acet | Oxidante Ar-Acet | Oxidante Ar-Acet |
| Fenda | 0,5nm | 0,5nm | 0,5nm |
| Comprimento de onda | 324,7nm | 258,3nm | 213,9nm |
| Fluxo de gás combustível | 0,70L/min | 0,70L/min | 0,70L/min |

3.8 Identificação das proteínas por espectrometria de massas (nano-LC/ESI/MS/MS)

Inicialmente, os *spots* de proteínas a serem caracterizados por espectrometria de massas foram recortados do gel de poliacrilamida e cada um deles foi colocado em um pocinho de uma placa, denominada Zip Plate (Millipore), na qual foi feita a digestão trípica. A digestão trípica foi feita com o uso de um kit específico (*In-Gel Digest_{ZIP} Kit*) que, além de digerir a proteína, purifica os peptídeos obtidos.

As análises dos peptídeos presentes nos digestos protéicos por LC-MS foram realizadas em um cromatógrafo Waters nanoAcquity UPLC acoplado a um espectrômetro Waters Synapt HDMS, equipado com fonte de nanoESI. Tipicamente, 2 a 5 μL de amostra aquosa foram injetados pelo auto-injetor do sistema UPLC e direcionados a uma pré-coluna (Waters Symmetry C₁₈, 20mm \times 180 μm d.i., partículas de 5 μm), onde foram dessalinizadas por 3 min com fluxo de 5,0 $\mu\text{L}/\text{min}$ de 97:3 H₂O/MeCN com 0,1% ácido fórmico v/v, sendo então transferidas para a coluna analítica (Waters BEH130 C₁₈, 100mm \times 100 μm i.d., partículas de 1,7 μm) e eluídas com com fluxo de 1,0 $\mu\text{L}/\text{min}$ de acordo com a Tabela 6.

A detecção dos peptídeos foi feita de forma *online* pelo espectrômetro de massas, configurado para operar em modo de aquisição dependente de dados (DDA), contendo uma função de MS (*fullscan* de m/z 200 a 2000), três funções de MS/MS e uma função de padrão externo de calibração (*lockmass*). Como demais parâmetros do espectrômetro de massas estão voltagem do capilar 3,0 kV, voltagem do cone 30 V, temperatura da fonte 100°C, fluxo do gás de nanoESI 0,5 L/h, energias de colisão das celas *Trap* e *Transfer* respectivamente em 6 e 4 eV, detector em 1700 V. Os espectros de MS (*fullscan*) e MS/MS (espectro de íons fragmentos por dissociação induzida por colisão) foram adquiridos a uma taxa de 1 espectro s^{-1} . Previamente às

análises, o instrumento foi calibrado com oligômeros de ácido fosfórico (solução de H₃PO₄ 0,05% v/v em H₂O/MeCN 50:50) de *m/z* 90 a 1960. Argônio a uma pressão de 9,7.10⁻³ mbar foi utilizado como gás de colisão.

Tabela 6: Gradiente linear aplicado na eluição das proteínas

| Tempo (min) | % A (H ₂ O com 0,1% ácido fórmico v/v) | % B (MeCN com 0,1% ácido fórmico v/v) |
|-----------------------|---|---|
| 0 | 97 | 3 |
| 5 | 85 | 15 |
| 10 | 65 | 35 |
| 22 | 40 | 60 |
| 26 | 3 | 97 |
| 28 | 97 | 3 |
| 30 | 97 | 3 |

As corridas de LC-MS foram processadas pelo software ProteinLynx Global Server v.2.2. (Waters) e analisadas por busca em banco de dados empregando-se o sistema MASCOT v.2.2. (Matrix Science Ltd). Como parâmetros da busca foram selecionados digestão com tripsina com até 1 sítio de clivagem ignorado, oxidação em resíduos de metionina como modificação variável e tolerância de massa de peptídeos e fragmentos ambos em ±0,5 Da. As buscas foram feitas no banco de dados NCBInr.

O esquema de toda a parte experimental deste trabalho pode ser visto na Figura 3.

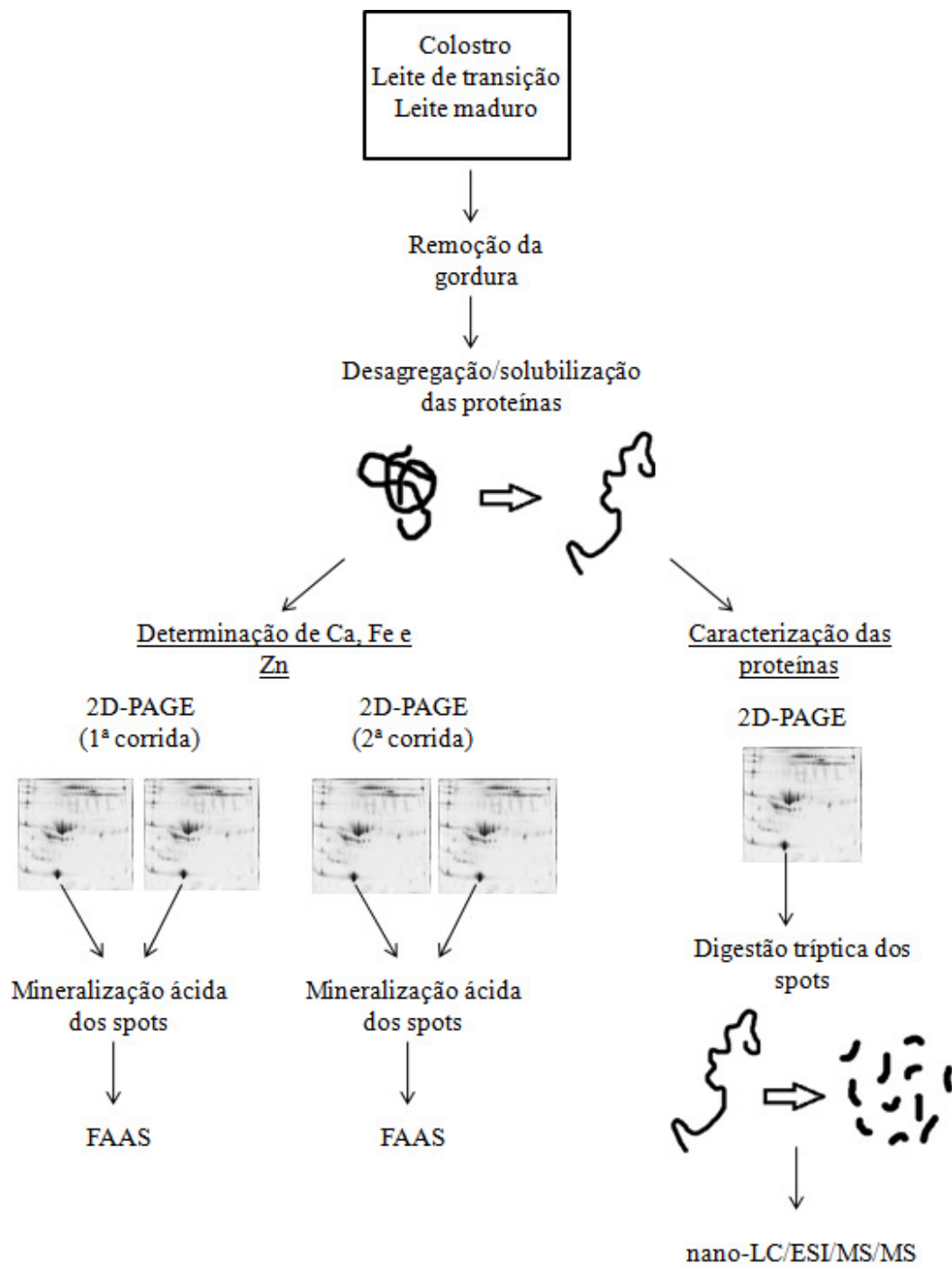


Figura 3: Esquema geral dos experimentos

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação das proteínas

Os resultados da determinação de proteínas pelo método do Biureto estão na Tabela 7 e a concentração de proteínas totais em relação ao tempo de lactação pode ser observada na Figura 4.

Tabela 7: Determinação de proteína total nas amostras de colostro, leite de transição e leite maduro.

| | Proteínas totais (g/L) | | |
|------------|------------------------|-----------|--------|
| | Colostro | Transição | Maduro |
| Lactante A | 26,344 | 28,375 | 15,841 |
| Lactante B | 34,741 | 22,202 | 24,696 |
| Lactante C | 27,831 | 20,051 | 13,278 |
| Lactante D | 27,831 | 20,051 | 13,278 |
| Lactante E | 21,904 | 17,508 | 18,129 |

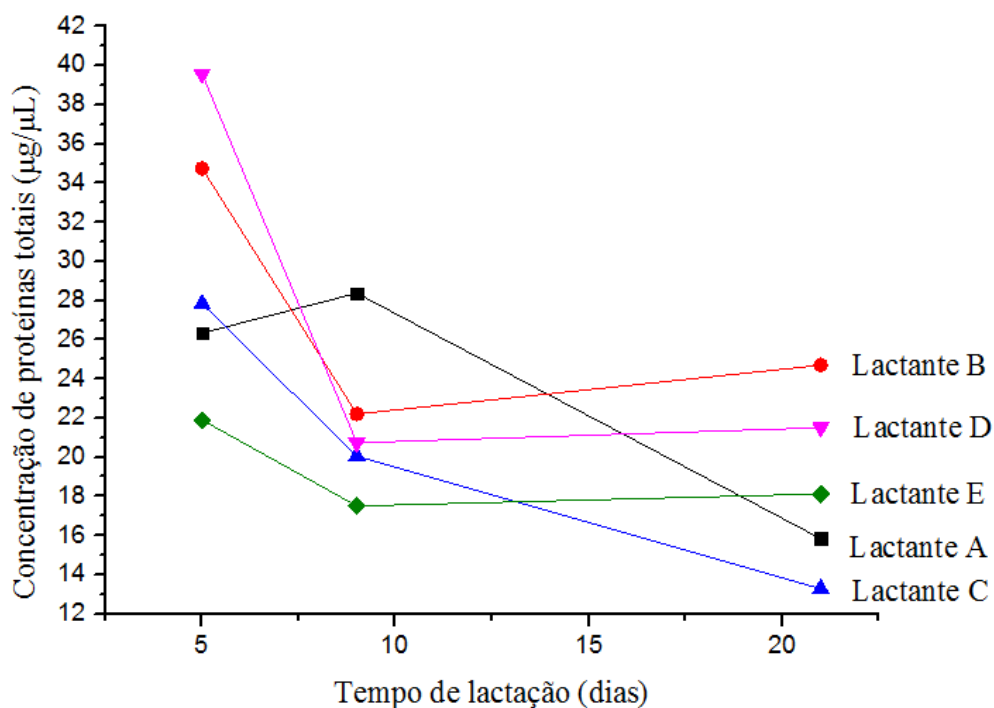


Figura 4: Concentração de proteínas totais (g/L) pelo tempo de lactação, em dias, para cada lactante.

De acordo com Laurindo et al. (1992), a concentração de proteínas totais no colostro, leite de transição e leite maduro é, em média, de 27, 16 e 12g/L, respectivamente.

Os resultados obtidos para a maioria das amostras não seguem exatamente esse padrão, mas isso é justificado pelo fato de que a composição do leite pode variar em cada mãe.

Apesar disso, fica claro, com base na Tabela 7 e Figura 4, que o conteúdo proteico do leite foi alto no início do período de lactação e que diminuiu com o tempo. A alta concentração de proteínas no colostro é devido, principalmente, às altas concentrações de IgA secretória e lactoferrina, que impulsionam o sistema imune imaturo do recém-nascido (DONANGELO E TRUGO, 2003; RIORDAN, 2005).

4.2 Separação das proteínas por 2D-PAGE

A 2D-PAGE foi feita com fitas de pH de 3 a 10 e 4 a 7 para a separação na primeira dimensão (IEF) e com géis com concentração de acrilamida de 12,5% na segunda dimensão (SDS-PAGE) de separação das proteínas. As imagens dos géis correspondentes ao colostro, leite de transição e leite maduro da lactante B podem ser observadas nas figuras 5, 6 e 7, respectivamente. (As imagens dos géis e informações referentes a número de spots e porcentagem de *matching* das outras quatro lactantes estão no anexo IV).

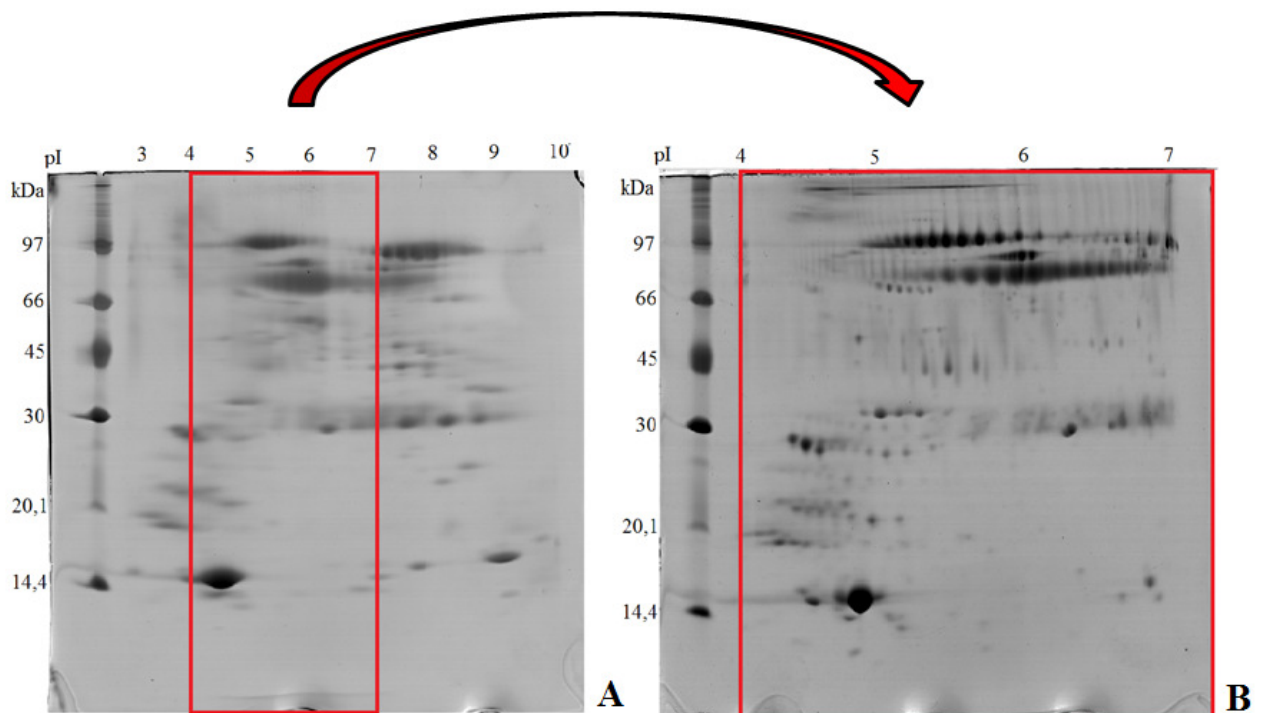


Figura 5: Géis obtidos de colostro em pH 3-10 (A) e pH 4-7 (B)

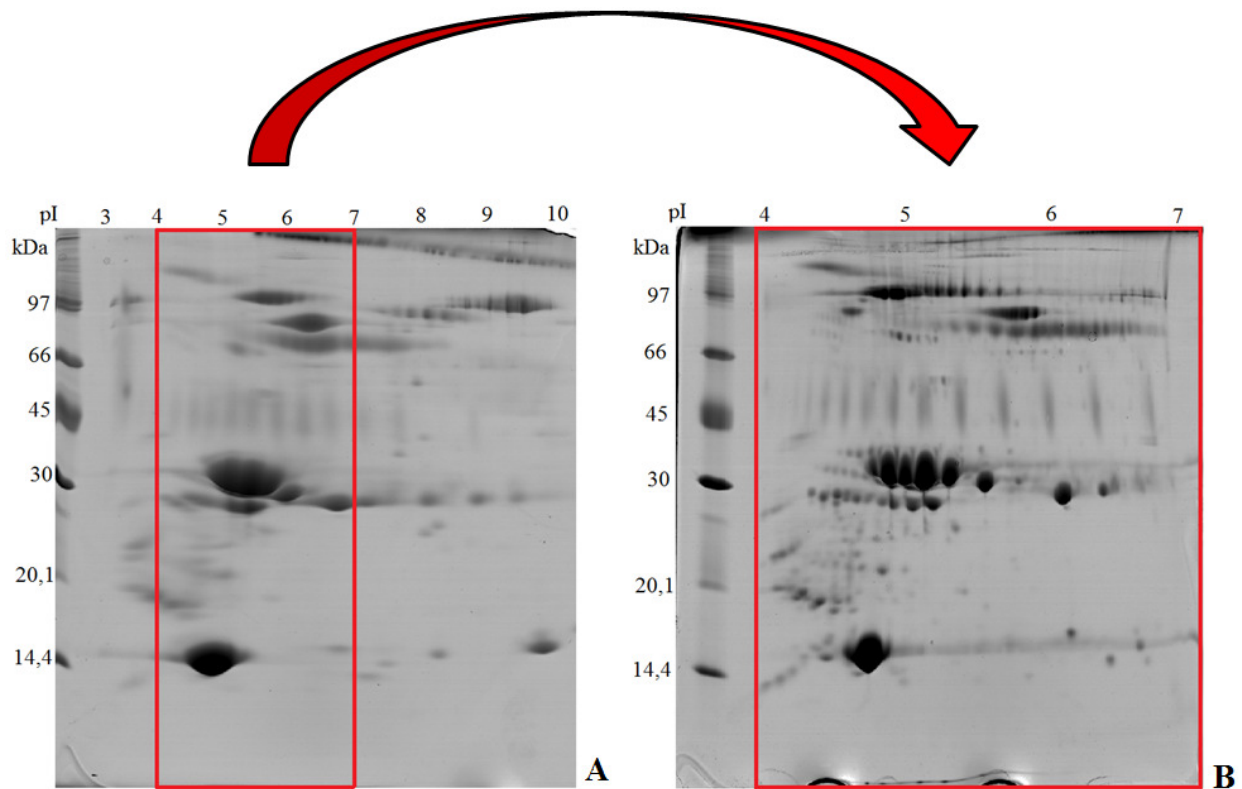


Figura 6: Géis obtidos de leite de transição em pH 3-10 (A) e pH 4-7 (B)

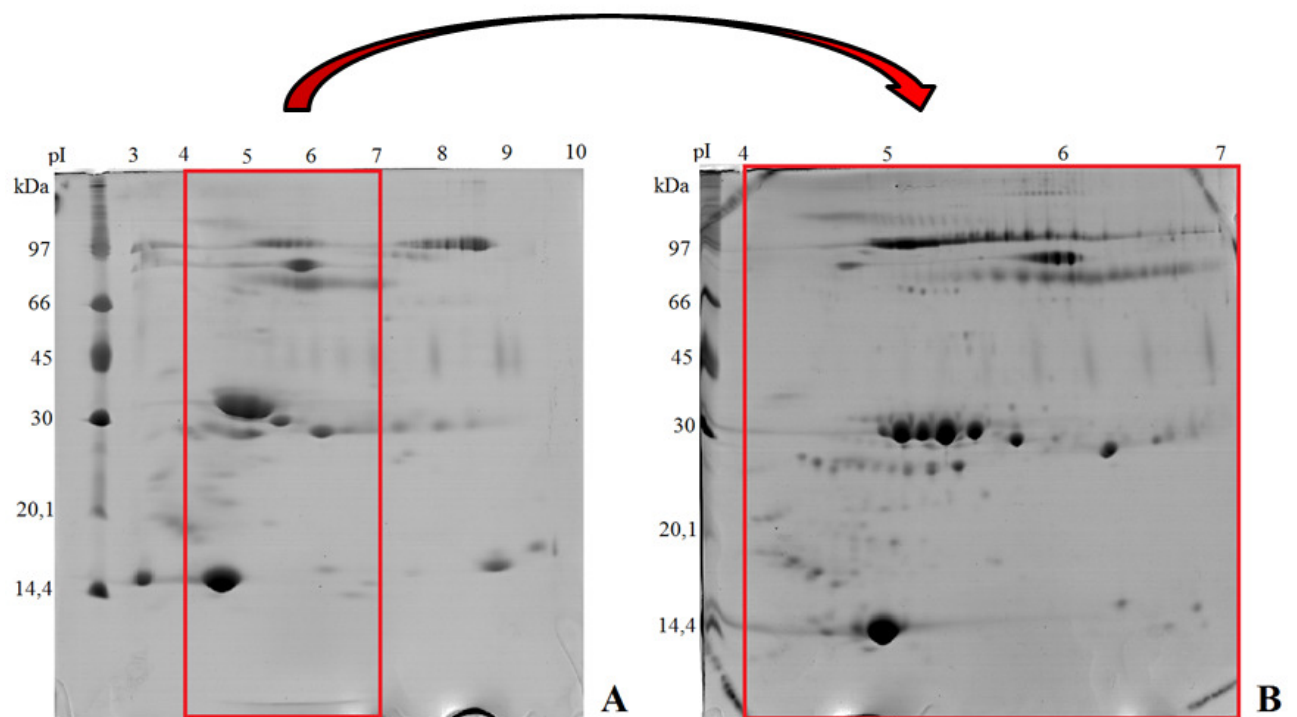


Figura 7: Géis obtidos de leite maduro em pH 3-10 (A) e pH 4-7 (B)

Pode-se dizer que a IEF é a etapa da 2D-PAGE mais “problemática”, exigindo maior cuidado e critério do operador. É ela a etapa limitante do processo, já que a quantidade de proteína que

pode ser aplicada na fita é limitada e há restrições em relação aos compostos presentes na solução contendo as proteínas que é aplicada na fita. Ela é particularmente sensível a impurezas iônicas de baixa massa molar, que podem interferir na separação e subsequente visualização dos spots. Sais, por exemplo, devem estar presentes em concentração menor que 10mM (GE HEALTHCARE, 2007).

Levando isso em conta, tentou-se reduzir ao mínimo o número de etapas de preparo de amostra, a fim de se garantir que a separação das proteínas pela IEF fosse realizada da melhor forma possível. Os únicos procedimentos prévios à IEF foram a remoção da gordura do leite e adição de solução de solubilização. Esta solução (uréia 7 mol/L; tiouréia 2 mol/L; CHAPS (Sulfato de 3-[(3-cloroaminopropil)-dimetilamônio]-1-propano) a 2% (m/v); anfólitos 0,5% (v/v) em pH variando de 3 a 10 e 4 a 7; azul de bromofenol 0,002% (m/v); e inibidor de protease) é composta de substâncias que mantêm a proteína completamente desagregada e solubilizada. A desnaturação completa garante que a proteína esteja presente em somente uma configuração e evita a agregação e interação inter-molecular. Já a etapa de remoção de gordura é importante porque lipídios formam complexos com o CHAPS presente na solução de solubilização, reduzindo a sua efetividade na solubilização das proteínas (GE HEALTHCARE, 2007).

O motivo pelo qual a IEF foi realizada a partir de fitas com faixas de pH tanto de 3 a 10 quanto de 4 a 7 é que, apesar de os géis obtidos com pH 3-10 mostrarem um perfil global dos spots, há uma aglomeração de spots em certas regiões. No colostro, por exemplo, somente na faixa de pH de 5 a 8, estão presentes 65% dos spots totais (Figura 8), o que faz com que a exploração mais minuciosa dessa área seja importante.

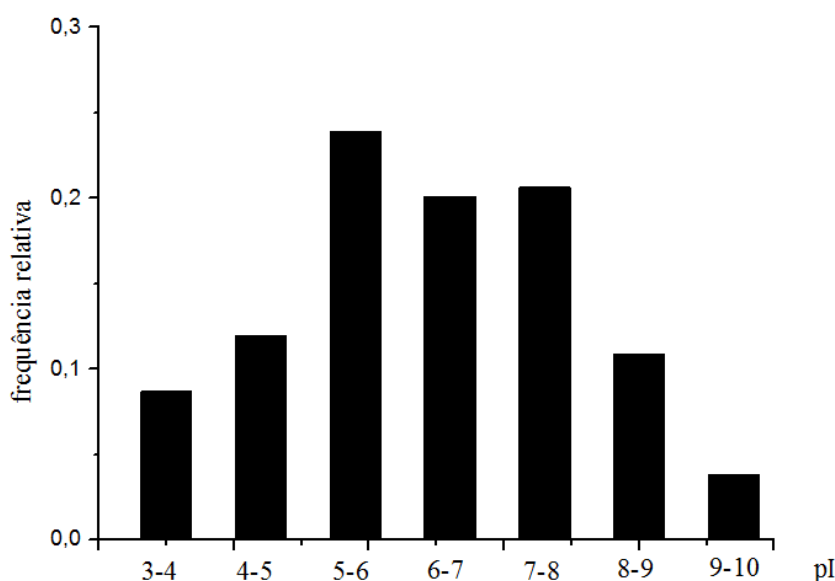


Figura 8: Distribuição dos spots em gel 3-10 de colostro baseado no pI. Na região de pH de 5 a 8 estão presentes 65% dos spots totais.

A utilização de faixas de pH de 4 a 7 permite se fazer um “zoom” da área de interesse, transformando o que, às vezes, é visualizado como apenas uma mancha em pH 3-10, em uma sequência de spots em pH 4-7, possibilitando uma melhor visualização e análise das proteínas ali presentes. De fato, o universo de proteínas amplia-se significativamente nos géis de pH 4-7, já que, enquanto o número de spots nos géis de pH 3-10 ficou em $171,7 \pm 9,7$, nos géis de pH 4-7 esse número subiu para $405,5 \pm 52,9$ spots (Tabela 8). Essa grande diferença pode ser justificada pelo fato de muitas proteínas importantes do leite e suas isoformas possuírem pI dentro dessa faixa, como:

- α -lactoalbumina: 4,7 (Murakami et al., 1998)
- FABP (*fatty acid-binding protein*): 5,7 (Murakami et al., 1998)
- β -caseína: 4,9-5,8 (Poth et al., 2008)
- α_{s1} -caseína: 4,4-5,3 (Poth et al., 2008)
- butirofilina: 5,32 (Fortunato et al., 2003)
- soroalbumina: 5,8-6,2 (Murakami et al., 1998), etc.

Em um estudo conduzido por Poth et al. (2008), foi possível identificar, em uma estreita faixa de pH de 4,9 a 5,8, seis β -caseínas com diferentes níveis de fosforilação e, em uma faixa de 4,4 a 5,3, nove tipos de α_{s1} -caseína. Isso mostra que o universo de proteínas do leite materno é muito rico e o uso de fitas com faixas de pH mais estreitas é útil para a sua análise.

Tabela 8: Média do número de spots e porcentagem de *matching* nos géis de colostro, leite de transição e leite maduro em pH 3-10 e 4-7 da lactante B calculados pelo software *ImageMaster Platinum v.7*.

| | Colostro | | Leite de transição | | Leite maduro | |
|--------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| | Média de spots | % <i>matching</i> | Média de spots | % <i>matching</i> | Média de spots | % <i>matching</i> |
| 3 a 10 | $174,5 \pm 13,4$ | 54 | $168 \pm 12,7$ | 48 | $172,5 \pm 9,2$ | 39 |
| 4 a 7 | $390 \pm 46,7$ | 64 | $463,5 \pm 31,8$ | 53 | $363 \pm 4,2$ | 61 |

Outro dado importante é a porcentagem de *matching*. Este parâmetro, calculado pelo *ImageMaster Platinum*, mede o quanto os géis são semelhantes entre si com base no pareamento das imagens. Na Tabela 8 pode-se ver que, apesar de os géis de colostro, leite de transição e leite maduro serem visualmente parecidos entre si, o número de spots equivalentes não ultrapassa os

64%. Segundo Szpunar (2005), para duas amostras apresentarem perfis proteicos similares, o valor do *matching* deve ser maior que 70%.

Essas diferenças de porcentagem de *matching* entre os géis de colostro, leite de transição e leite maduro podem ser explicadas pelo fato de que as proteínas do leite podem ser reguladas positiva ou negativamente, dependendo da fase de lactação. Os vários tipos de caseínas, por exemplo, estão presentes em baixas concentrações nos primeiros dias de lactação, enquanto as quantidades de sIgA e IgM são bastante altas no colostro, mas vão diminuindo no decorrer da lactação, dando lugar à IgG (LONNERDAL, 2003; GAO et al., 2012). Se a concentração dessas proteínas é muito baixa em determinada amostra, a sua detecção no gel torna-se difícil.

4.3 Identificação das proteínas por espectrometria de massas

Para a caracterização das proteínas por espectrometria de massas, géis de colostro, leite de transição e leite maduro foram obtidos por 2D-PAGE em faixas de pH 3-10 e 4-7. Alguns spots foram recortados e, antes de serem analisados no espectrômetro de massas, passaram por uma digestão trípica. Spots tanto dos géis obtidos em pH 3-10 quanto 4-7 foram selecionados para a análise, porém, somente poucos spots recortados de géis em pH 4-7 puderam ser corretamente identificados. Um melhor processamento dos dados e análise mais criteriosa dos bancos de dados devem ser feitos para se conseguir resultados melhores.

A busca em banco de dados gerou, para vários spots, a identificação de mais de uma proteína. Desse modo, selecionou-se a proteína que apresentou a maior pontuação (score). A tabela 9 apresenta as proteínas identificadas e a figura 9 a sua localização no gel.

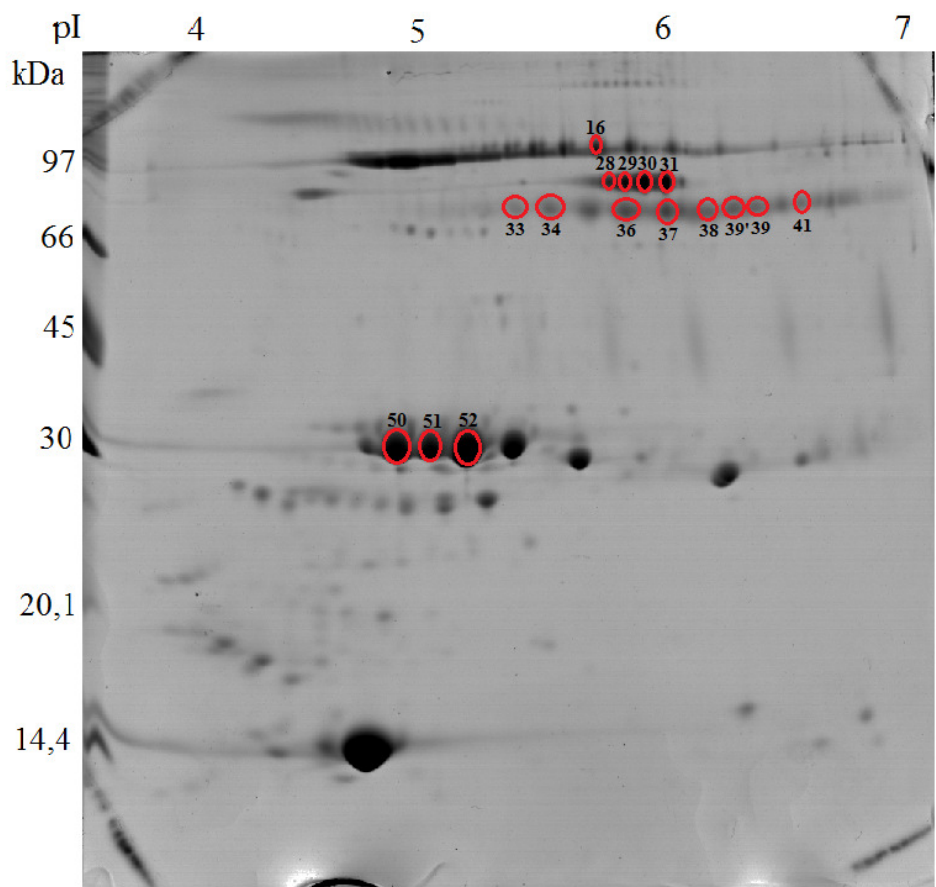


Figura 9: Localização das proteínas identificadas por espectrometria de massas no gel obtido de leite maduro em faixa de pH de 4 a 7

Tabela 9: Proteínas identificadas por espectrometria de massas

| Spot | Proteína | Acesso | Score | pI/MW(Da) | Cobertura (%) |
|------|--|----------|-------|------------|---------------|
| 16 | transmembrane secretory component | AAB20203 | 57 | 5.58/84480 | 4 |
| 28 | serum albumin | CAA23754 | 286 | 6.05/71351 | 12 |
| 29 | serum albumin precursor | AAF01333 | 292 | 5.91/71211 | 12 |
| 30 | serum albumin | CAA23754 | 315 | 6.05/71351 | 18 |
| 31 | unnamed protein product | CAA23753 | 417 | 5.92/71281 | 20 |
| 33 | Ig alpha-1 chain C region | P20758 | 64 | 5.63/38602 | 5 |
| 34 | immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region | AAC82528 | 145 | 6.06/38430 | 12 |
| 36 | immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region | AAC82528 | 175 | 6.06/38430 | 17 |
| 37 | immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region | AAC82528 | 158 | 6.06/38430 | 17 |
| 38 | immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region | AAC82528 | 108 | 6.06/38430 | 5 |
| 39 | immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region | AAC82528 | 97 | 6.06/38430 | 5 |
| 41 | immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region | AAC82528 | 58 | 6.06/38430 | 5 |
| 50 | beta-casein | CAA39270 | 83 | 5.52/25296 | 12 |
| 51 | beta-casein | CAA39270 | 72 | 5.52/25296 | 12 |
| 52 | beta-casein | CAA39270 | 72 | 5.52/25296 | 12 |

4.4 Análise de mudança de expressão das proteínas identificadas

Tendo-se identificado as proteínas, foi feita a análise de expressão dos spots para se verificar se eles estavam sendo super ou subexpressos nas amostras de colostro, leite de transição e leite maduro. Para essa análise, o software ImageMaster Platinum calculou a média e o desvio-padrão correspondentes ao parâmetro vol% (volume normalizado) de cada spot.

A comparação foi feita entre colostro e leite de transição, e leite de transição e leite maduro. Os resultados, obtidos a partir da análise de quatro géis de cada amostra, podem ser visualizados nas tabelas localizadas nas seções em que se avalia as proteínas individualmente.

A literatura ainda não apresenta claramente quanto deve ser a diferença de expressão entre spots de diferentes géis para que se possa garantir que, realmente, há uma significativa variação entre as expressões das proteínas (ERAVCI et al., 2007; CHLOE E LEE, 2003; CANDIANO et al., 2004; CUTLER et al., 2003). O problema na análise de expressão é que há uma variação intrínseca entre os géis devido a vários fatores, como o preparo da amostra, a quantidade de proteínas totais aplicada e a polimerização do gel (MANUAL DO USUÁRIO – GE HEALTHCARE; CUTLER et al., 2003).

Nos estudos de Eravci *et al.* (2007) e Choe *et al.* (2003) as análises afirmam que variações quanto à expressão de proteínas no gel somente são consideradas relevantes se alcançarem diferenças da ordem de 100% ou superiores. Já O'Dwyer et al. (2011) consideraram uma mudança na expressão de 75% relevante para seus estudos. Considerando tudo isso, estabeleceu-se, para esta dissertação, um valor intermediário de 90% para que a mudança na expressão fosse considerada relevante.

4.5 Determinação de cálcio, ferro e zinco ligados às proteínas

A determinação da concentração de cálcio, ferro e zinco nos spots proteicos foi feita por FAAS conforme procedimento descrito no item 3.7. Os resultados apresentados na Tabela 10 correspondem à média das leituras das duas corridas.

Esses dados devem ser encarados como resultados qualitativos, pois, apesar de ser determinada a concentração dos metais nos spots, não foram feitas corridas suficientes para uma análise quantitativa. O motivo pelo qual se fez apenas duas corridas é que a digestão dos spots e análise dos metais no espectrômetro de absorção atômica são processos extremamente laboriosos, não havendo tempo/material suficientes para a análise de muitos spots provenientes

de muitas repetições. Como o número de spots por gel para serem analisados neste trabalho era muito grande, decidiu-se somente pela análise qualitativa. As duas corridas foram feitas mais a caráter de confirmação, ou seja, só são apresentados, na tabela abaixo, os resultados que puderam ser confirmados nas duas corridas.

Tabela 10: Determinação, nas três fases de lactação, de cálcio, ferro e zinco associados às proteínas identificadas

| | Cálcio (mg/L) | | | Ferro (mg/L) | | | Zinco (mg/L) | | |
|--|----------------------|------------------|---------------|---------------------|------------------|---------------|---------------------|------------------|---------------|
| | <u>Colostro</u> | <u>Transição</u> | <u>Maduro</u> | <u>Colostro</u> | <u>Transição</u> | <u>Maduro</u> | <u>Colostro</u> | <u>Transição</u> | <u>Maduro</u> |
| <u>Curva de calibração</u> | | | | | | | | | |
| Padrão 1 | 0,1000 | 0,1000 | 0,1000 | 0,1000 | 0,1000 | 0,1000 | 0,0400 | 0,0400 | 0,0400 |
| Padrão 2 | 0,2000 | 0,2000 | 0,2000 | 0,3000 | 0,3000 | 0,3000 | 0,0800 | 0,0800 | 0,0800 |
| Padrão 3 | 0,4000 | 0,4000 | 0,4000 | 0,6000 | 0,6000 | 0,6000 | 0,1600 | 0,1600 | 0,1600 |
| Padrão 4 | 0,8000 | 0,8000 | 0,8000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 0,2000 | 0,2000 | 0,2000 |
| <u>Proteína</u> | | | | | | | | | |
| transmembrane secretory component (16) | | | | 0,03715 | 0,2346 | 0,1328 | | | |
| serum albumin (28) | | 0,0260 | | | | | | | |
| serum albumin precursor (29) | | 0,0099 | | | | | 0,0184 | 0,04235 | 0,0135 |
| serum albumin (30) | 0,11125 | 0,0820 | 0,1385 | | | | | | |
| unnamed protein product (31) | | 0,0282 | | | | | | | |
| Ig alpha-1 chain C region (33) | | | | | | | | | |
| immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region (34) | | | | | | | | | |
| immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region (36) | 0,13125 | | 0,37905 | | | | | | |
| immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region (37) | | 0,0131 | | | | | | | |

| | | | | | |
|--|--------|--|--------|---------|--------|
| immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region (38) | | | | | |
| immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region (39) | | | | | |
| immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region (41) | | | | | |
| beta-casein (50) | 0,0325 | | | 0,0405 | |
| beta-casein (51) | | | | | 0,0031 |
| beta-casein (52) | 0,0788 | | 0,2176 | 0,13935 | |

4.6 Avaliação das proteínas

4.6.1 β -caseínas

A caseína como uma classe de proteínas consiste de várias subunidades (α , β e κ -caseínas) que formam micelas com Ca^{2+} e PO_4^{3-} , dando ao leite sua aparência branca característica. Sabe-se que ela também liga zinco e cobre. A β -caseína, que tem 24 kDa, é a principal caseína encontrada no leite materno. Atividades biológicas atribuídas à β -caseína ou aos seus fragmentos incluem o aumento da absorção de cálcio, imunoestimulação e modulação, estímulo da síntese de DNA, etc (LONNERDAL et al., 1982; LONNERDAL E FORSUM, 1985; KROENIG et al., 1998).

Um total de três spots – 50, 51 e 52 – (Figura 9) foram identificados neste trabalho como β -caseínas, localizadas no gel em uma faixa de pH de 5 a 5,2 e massa molar igual a 31kDa. O que diferencia essas três isoformas é o número de grupos fosfato ligados, sendo que quanto menor o pI, maior o número de fosfatos (POTH et al., 2008).

A caseína humana é uma proteína bastante estudada. Sabe-se que a sua síntese é baixa nos primeiros dias de lactação para, com o passar do tempo, ser uma das proteínas mais expressas do leite materno (LONNERDAL, 2003), o que foi de fácil comprovação neste trabalho. Pode-se verificar na Tabela 11 que a expressão das β -caseínas identificadas aumentou drasticamente do colostro para o leite de transição, mas manteve-se constante deste para o maduro (com exceção do spot 50). Não se sabe ao certo do por que as caseínas irem em sentido contrário das demais proteínas do leite materno, ou seja, estar presente em menor concentração no início da lactação enquanto a maior parte das outras proteínas apresenta sua concentração máxima justamente no colostro. Uma possível razão para isso acontecer é que a glândula mamária pode ainda não estar completamente desenvolvida (KROENIG et al., 1998).

A variação na expressão da β -caseínas é tão grande que é possível visualizar essa diferença “a olho nu” a partir da observação do gel. A Figura 11 apresenta o spot 50 em gel de colostro e leite maduro, assim como os picos em 3D correspondentes a esse spot.

Tabela 11: Variação na expressão dos spots correspondentes às β -caseínas identificadas¹

| Spot | Proteína | Variação na expressão da proteína entre colostro e leite de transição | Variação na expressão da proteína entre leite de transição e leite maduro |
|------|-------------|---|---|
| 50 | beta-casein | +548,9% ² | -119,2% |
| 51 | beta-casein | +484,2% | -41,2% |
| 52 | beta-casein | +1352,7% | +30,5% |

¹A variação na expressão foi considerada significativa se acima de 90%

²O sinal de + significa que a proteína está superexpressa e o sinal de – significa que a proteína está subexpressa.

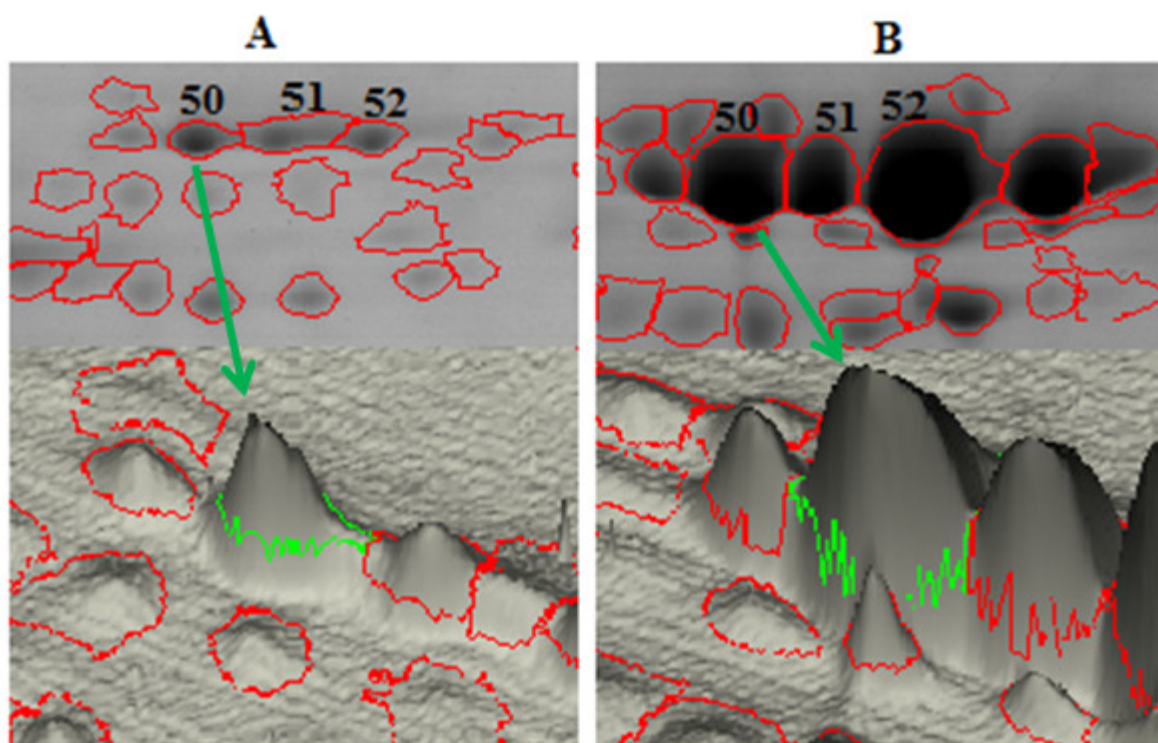


Figura 11: Variação na expressão da β -caseína (spot 50) do colostro (A) para o leite maduro (B). Os picos em 3D, relativos às intensidades dos spots no gel, foram obtidos pelo programa ImageMaster Platinum v.7.

Foram encontrados cálcio, ferro e zinco em todos os spots identificados como β -caseína (Tabela 10). Como já foi dito, a ligação da β -caseína com cálcio, juntamente com grupos fosfato, é o que forma as micelas. O cálcio complexa-se a resíduos

fosforilados de serina e treonina próximo ao N-terminal e, durante a digestão, os fosfopeptídeos formados mantêm o cálcio solúvel, facilitando a sua absorção pelo organismo da criança. Foi demonstrado que esses fosfopeptídeos, em leite bovino, também podem ligar outros cátions divalentes (HURREL et al., 1989), como o ferro e o zinco, mas existem poucos estudos a respeito (SATO E NAITO, 1986; HANSEN et al., 1996).

Os fosfopeptídeos formados após a digestão da β -caseína, além de serem importantes para uma melhor absorção dos elementos em questão, são conhecidos por apresentar propriedades prebióticas e antimicrobianas. Sugere-se que um dos mecanismos antimicrobianos, baseado na capacidade que esses peptídeos têm de ligar ferro (o que foi demonstrado para a β -caseína inteira neste trabalho), seja privar as bactérias patogênicas do acesso ao ferro, que é um nutriente essencial para o seu crescimento.

4.6.2 Imunoglobulinas

Foram identificados dois componentes formadores da IgA secretória (sIgA). O spot de número 16 foi identificado como “componente secretório transmembrana”, e os spots 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 39’ e 41 (Figura 9) como a “região constante da cadeia pesada alfa-1”. O componente secretório transmembrana apresentou pI de 5,8 e massa molar de 96,8kDa, enquanto as regiões constantes da cadeia pesada alfa-1 estavam presentes em uma faixa de pI de 5.5 a 6.5 e massa molar de 80kDa.

A sIgA é uma imunoglobulina dimérica de 420kDa, sendo que cada parte monomérica é formada por duas cadeias leves (iguais para todas as classes de imunoglobulinas) e pela cadeia pesada, também chamada de alfa, e que tem uma massa molar de aproximadamente 60kDa. A cadeia pesada é composta de quatro domínios: um variável e três constantes. Duas partes monoméricas são mantidas juntas por uma proteína conhecida como “cadeia J” e pelo componente secretório, que protege a imunoglobulina de ser degradada por enzimas proteolíticas, permitindo a sua sobrevivência no trato gastrointestinal e combate a agentes infecciosos (Figura 12) (KERR, 1990).

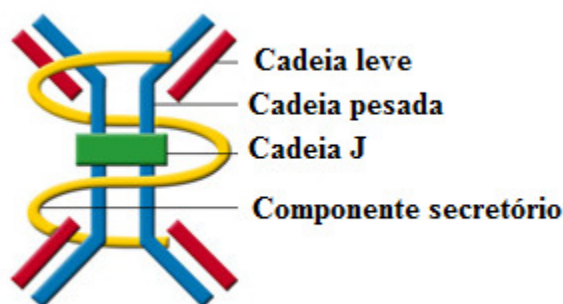


Figura 12: Estrutura da IgA (Adaptado de <http://www.invivogen.com/review-iga>)

Não se deve confundir o “componente secretório transmembrana”, que é o que foi identificado neste trabalho, com o “componente secretório”, já que o primeiro é precursor do segundo. O componente secretório transmembrana, que tem uma massa molar de 100kDa, liga-se à IgA com alta afinidade e a transporta para a superfície luminal de células epiteliais, onde é clivado por uma ou mais proteases para liberar a IgA associada ao componente secretório (KERR, 1990).

A lactante secreta no leite sIgAs antígeno-específicas, que protegem a criança de patógenos aos quais a mãe tenha sido exposta durante toda a sua vida. Ela tem como principal ação a ligação a microrganismos e macromoléculas, impedindo a sua aderência a superfícies mucosas e prevenindo o contato do patógeno com o epitélio. Outros mecanismos de ação da sIgA envolvem a neutralização das toxinas liberadas por patógenos e a prevenção da translocação bacteriana através da barreira epitelial (LONNERDAL, 2010; GRASSI et al., 2001).

A sIgA está presente em altas concentrações no início da lactação e a sua produção diminui consideravelmente após os primeiros dias (DONANGELO E TRUGO, 2003; RIORDAN, 2005; LONNERDAL, 2010). A análise de expressão feita neste trabalho está de acordo com o que já foi estudado, o que pode ser visto na Tabela 12. Para todas as proteínas avaliadas, houve uma queda de expressão significativa do colostro para o leite de transição. Já do leite de transição para o leite maduro não houve alteração significativa (>90%), o que indica que, após a considerável queda inicial, a produção da sIgA se estabiliza.

Tabela 12: Variação na expressão dos componentes da sIgA no decorrer da lactação¹

| Spots | Proteína | Variação na expressão da proteína entre colostro e leite de transição | Variação na expressão da proteína entre leite de transição e leite maduro |
|--------------|--|--|--|
| 33 | Ig alpha-1 chain C region | -154,8% ² | +68,8% |
| 34 | immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region | -99,4% | 0 |
| 36 | immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region | -124,86% | +46,7% |
| 37 | immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region | -111,5% | +19,6% |
| 38 | immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region | -140,6% | +40,78% |
| 39' | immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region | -99,5% | +36% |
| 39 | immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region | -135% | +19% |
| 41 | immunoglobulin alpha-1 heavy chain constant region | -77,5% | +21,5% |

¹A variação na expressão foi considerada significativa se acima de 90%

²O sinal de + significa que a proteína está superexpressa e o sinal de – significa que a proteína está subexpressa.

Gao et al. (2012), em um estudo proteômico envolvendo leite de transição e leite maduro, também concluíram que a produção de sIgA diminui no decorrer da lactação e

que, aliado a isso, há um aumento na síntese de IgG. Eles propuseram, baseado neste fato, que a função do leite muda de somente “matar patógenos” em recém-nascidos para promover o sistema imune independente em crianças mais velhas.

Em relação aos metais ligados, encontrou-se ferro associado ao componente secretório transmembrana nas três fases de lactação, e cálcio ligado à região constante da cadeia pesada alfa-1 nos spots 36 e 37. Praticamente não há trabalhos relatando a ligação da IgA ou sIgA a íons metálicos. Uma exceção é o estudo desenvolvido por Odintsova et al. (2010), no qual se estudou a hidrólise específica de β -caseínas pela sIgA. Eles descobriram que essa atividade em específico da sIgA é mediada por íons metálicos, em especial ferro, seguido de cálcio, cobalto e níquel. Também se apresentou a primeira evidência de que a sIgA purificada de leite de mães saudáveis possui íons metálicos ligados intrinsecamente ($Ca > Mg \geq Al > Fe \approx Zn \geq Ni \geq Cu \geq Mn$).

No presente trabalho, apresenta-se a primeira evidência de que o cálcio atua, mais especificamente, na cadeia pesada da IgA, e que o ferro liga-se ao seu componente secretório. Em relação a este último, pôde-se verificar que ligação persiste nas três fases de lactação, indicando que ligação é específica e de alguma forma importante para a atividade da sIgA. Até o momento, entretanto, a única função conhecida da ligação desses íons metálicos à sIgA é a que foi descoberta por Odintsova et al (2010). Também não se tem muita informação do motivo de a sIgA hidrolisar especificamente a β -caseína, mas acredita-se que isso acontece porque os peptídeos liberados da hidrólise desta proteína têm propriedades antimicrobianas e probióticas. Assim, essa função catalítica da sIgA pode ser uma forma de aumentar a defesa que o leite materno proporciona à criança.

4.6.3 Soroalbumina

A soroalbumina ou produtos relacionados foram identificados em quatro spots presentes em uma faixa de pH de 5,83 a 6,02 e massa molar igual de 86kDa (Figura 9). Mais especificamente, os spots 28 e 30 foram identificados como soroalbumina, o 29 como precursor da soroalbumina e o 31 como um produto sem nome do gene que codifica para a soroalbumina.

A soroalbumina humana é a proteína mais abundante no plasma e é a principal moduladora da distribuição de fluidos entre os compartimentos do corpo. Ela possui uma grande capacidade de ligar compostos, servindo como depósito e carreadora de

várias substâncias endógenas e exógenas (FANALI et al., 2012). Apesar de ser uma das proteínas mais abundantes do leite materno, não há funções fisiológicas associadas a ela no leite além de ser fonte de aminoácidos para a criança e, por isso, tem recebido pouca atenção.

Não houve mudança na expressão de nenhum dos spots correspondentes à soroalbumina entre os géis de colostro, leite de transição e leite maduro (Tabela 13). De fato, concentrações reportadas no colostro e leite maduro estão na faixa de 0,4 a 1,0mg/mL para ambas fases de lactação (LONNERDAL et al., 1976; WOODHOUSE E LONNERDAL, 1998; SANCHEZ-POZO et al., 1986). Acredita-se que a soroalbumina não é secretada pela glândula mamária, mas sim transferida da circulação materna por mecanismos de endocitose e por vazamentos na junção entre as células epiteliais mamárias. Isso, aliado ao fato de a soroalbumina do leite materno ser idêntica àquela encontrada no plasma, explica o fato de a sua concentração não mudar no decorrer da lactação (LONNERDAL E ADKINS, 2000; LONNERDAL E ATKINSON, 1989).

Tabela 13: Variação na expressão da soroalbumina no decorrer da lactação¹

| Spots | Proteína | Variação na expressão da proteína entre colostro e leite de transição | Variação na expressão da proteína entre leite de transição e leite maduro |
|--------------|-------------------------|--|--|
| 28 | serum albumin | +44,8% ² | -17,3% |
| 29 | serum albumin precursor | +41,9% | -13,5% |
| 30 | serum albumin | -33,4% | +77,9% |
| 31 | unnamed protein product | +30% | +23,4% |

¹A variação na expressão foi considerada significativa se acima de 90%

²O sinal de + significa que a proteína está superexpressa e o sinal de – significa que a proteína está subexpressa.

Foram encontrados zinco e cálcio ligados a diversos spots (Tabela 10). A soroalbumina possui sítios de ligação para vários íons metálicos e, até hoje, três sítios principais foram encontrados. No primeiro, localizado no N-terminal, Cu (II), Co (II) e Ni (II) são coordenados por átomos de nitrogênio da Asp1, Ala2 e His3. O segundo é representado pelo grupo tiol da Cys34, que liga íons de Au (I), Hg (II) e Pt (II). O terceiro, devido à sua geometria pseudo-octaédrica, é capaz de ligar estavelmente diferentes íons metálicos, dentre eles o Zn (II), por quem a soroalbumina tem alta afinidade (Fanali et al., 2012). De fato, ela é a maior transportadora de zinco no plasma e estima-se que mais de 98% do zinco esteja ligado a esta proteína (GIROUX E HENKIN, 1973).

A soroalbumina é formada por três domínios (I, II e III) (Figura 13) que são mantidos juntos por interações fracas. Blindauer et al. (2009) propuseram que o sítio de ligação do zinco localiza-se entre os domínios I e II e que a sua ligação promove a cooperação alostérica entre esses domínios, que são importantes para a função biológica da proteína.

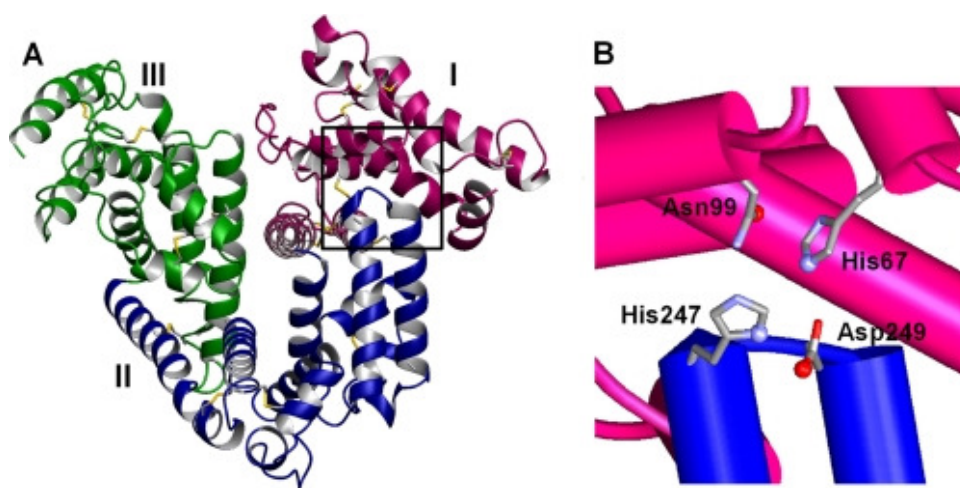


Figura 13: A- Estrutura da soroalbumina humana com os domínios I, II e III. B- Sítio proposto de ligação do zinco (Blindauer et al., 2009).

É de se estranhar que, mesmo estando em altas concentrações no leite materno, não haja função fisiológica conhecida para esta proteína. O fato de ela ligar zinco, entretanto (o que foi confirmado *in vivo* neste trabalho), sugere que ela contribui para o aumento da biodisponibilidade desse metal. Não se sabia ao certo se a ligação era forte o suficiente para persistir no intestino da criança (LONNERDAL E ADKINS, 2000), mas os resultados obtidos neste trabalho indicam que a ligação realmente é forte. Pode-se fazer essa afirmação porque todos os procedimentos feitos antes e durante a

eletroforese, por serem processos de eliminação de impurezas e de desagregação das proteínas, garantem que só os metais fortemente ligados permaneçam associados. Essa ligação forte e específica caracteriza uma metaloproteína, que é uma proteína cuja função é definida por um metal. E, como já foi mencionado, a ligação do zinco à soroalbumina promove a cooperação alostérica entre os seus domínios, permitindo que ela exerça as suas funções (BLINDAUER ET AL., 2009). Outra evidência de que a ligação é forte foi a determinação de zinco em spots gerados nas três fases de lactação, sugerindo que o papel da soroalbumina como fornecedora de zinco é constante e importante para a criança no decorrer de toda a lactação.

A biodisponibilidade de zinco é questão de grande importância para a nutrição do recém-nascido. Em 1976, um estudo conduzido por Walravens e Hambridge demonstrou que crianças alimentadas com fórmulas infantis (que na época disponibilizavam zinco na forma de sais) possuíam níveis de zinco muito menores do que aqueles apresentados por crianças amamentadas. Como boa parte do zinco no leite materno está associado a proteínas e compostos de baixa massa molar, como o citrato, fica evidente que a sua absorção pelo recém-nascido se dá preferencialmente dessa forma. A soroalbumina, portanto, sendo uma das proteínas mais abundantes do leite, é de extrema importância no que diz respeito à biodisponibilidade de zinco no organismo do recém-nascido.

Além de zinco, encontrou-se cálcio ligado a todos os spots identificados como soroalbumina. Ela é uma importante carreadora de íons de cálcio no sangue, mas ainda não se identificou um sítio de ligação distinto e não há motivos típicos de ligação de cálcio em sua superfície. Na verdade, acredita-se que os íons de cálcio interajam com a soroalbumina bastante inespecificamente via múltiplos carboxilatos presentes em sua superfície (FANALI et al., 2012).

O fato de neste trabalho ter sido encontrado cálcio ligado aos quatro spots sugere que essa ligação não é tão inespecífica como se pensa e que talvez a sua ligação seja importante para a função da proteína.

No leite, pouca atenção foi dada à ligação de cálcio à soroalbumina. Bocca et al. (2000), em um estudo em que se fez a especificação de cálcio em cinco frações de leite obtidas por cromatografia de gel permeação, encontrou este elemento na terceira fração (100 - 500kDa) que, segundo os autores, pode corresponder à soroalbumina.

Como não há dados que corroborem algo a mais, é possível que a ligação de íons de cálcio à soroalbumina no leite materno tenha como objetivo apenas o aumento da biodisponibilidade deste elemento, proporcionando uma melhor absorção pela criança.

5.CONCLUSÃO

As técnicas empregadas para a análise metaloproteômica do leite materno mostraram-se relativamente eficazes. O uso da 2D-PAGE permitiu um bom fracionamento das proteínas, principalmente quando se empregou faixas de pH de 4 a 7 na focalização isoeletrica. A determinação dos íons metálicos nos spots proteicos por FAAS também resultou em dados coerentes, que foram compatíveis com as proteínas identificadas. O maior problema foi em relação à identificação das proteínas por nano-LC/ESI/MS/MS, já que, de dezenas de spots analisados, somente alguns poucos puderam ser identificados corretamente. Em estudos futuros, espera-se que se possa obter um maior número de spots identificados.

Apesar dos problemas relatados, avanços foram feitos no sentido de se conhecer mais a respeito das metaloproteínas do leite materno. Até hoje, a maior parte dos estudos relacionados à ligação de íons metálicos a proteínas do leite foram feitos *in vitro*, o que não permitia se ter uma dimensão real do que realmente acontecia no leite. Neste trabalho, várias associações das quais já se tinha conhecimento, algumas somente por testes *in vitro*, foram confirmadas, e outras foram relatadas pela primeira vez. Esse foi o caso da associação do ferro ao componente secretório transmembrana nas três fases de lactação, o que será importante para futuros estudos sobre a atividade catalítica da sIgA.

Finalmente, estudos quantitativos de determinação de íons metálicos associados a proteínas do leite poderão contribuir muito o entendimento dos seus mecanismos e funções, e, principalmente o papel que elas têm na nutrição e desenvolvimento do recém-nascido. Deve-se lembrar, também, que tudo o que se descobre pode ser aplicado no desenvolvimento de fórmulas infantis mais apropriadas e parecidas com o leite materno, que proporciona absolutamente tudo de que o recém-nascido precisa nos seis primeiros meses de vida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos.** – Brasília: *Anvisa*, 2008, 160 p.

BASSET, J et al. **Fotometria de chama.** In: **Análise inorgânica quantitativa.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois, p. 602-628, 1981.

BATES, J; PRENTICE, A. Breast milk as a source of vitamins, essential minerals and trace elements. **Pharmacology & Therapeutics.**, v.62, n. 1-2, p. 193-220, 1994.

BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, n.5, p. 273-281, 2003.

BERKELMAN, T; STENSTEDT, T. 2-D Electrophoresis: Principles and Methods. Amershan Biosciences, 1998.

BLINDAUER, C.A et al. Structure, properties and engineering of the major zinc binding site on human albumin. **Journal of Biological Chemistry**, v.284, n.34, p.23116-23124, 2009.

BOCCA, B et al. Determination of the total content and binding pattern of elements in human milk by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Talanta**, v.53, n.2, p. 295-303, 2000.

CANDIANO G et al. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v.25, p.1327-1333, 2004.

CANFIELD, L; GIULIANO, A; GRAVER, E. **Carotenoids, Retinoids, and Vitamin K in Human Milk.** In: JENSEN, R. **Hanbook of Milk Composition.** 1.ed. Londres: Academic Press, 1995, p. 693-705.

CASADO, B; AFFOLTER, M; KUSSMANN, M. OMICS-rooted studies of milk proteins, oligosaccharides and lipids. **Journal of Proteomics**, v. 73, n.2, p. 196-208, 2009.

CHIANESE, L et al. Determination of ovine casein heterogeneity using gel electrophoresis and immunochemical techniques. **Journal of Dairy Research**, v.59, n.1, p. 39-47, 1992.

CHOE L. H., LEE K. H. Quantitative and qualitative of infralaboratory two-dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis. **Electrophoresis**, v.24, p.3500-3507, 2003.

COOKBOOK SHIMADZU – **Operation manual: Atomic Absorption Spectrophotometer AA-6800**, Shimadzu, 2000.

CUTLER, P et al. A novel approach to spots detection for two-dimension gel electrophoresis images using pixel value collection. **Proteomics**, v.3, p.392-401, 2003.

DONANGELO, C.M; TRUGO, N.M.F. **Human Milk: Composition and nutritional value**. In: CABALLERO, B. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2. ed. Londres: Academic Press, 2003, p. 3449-3458.

ERAVCI M et al. Improved comparative proteome analysis based on two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, v.7, p.513-523, 2007.

FANALI, G et al. Human serum albumin: from bench to bedside. **Molecular aspects of medicine**, v.33, n.3, p. 209-290, 2012.

FORTUNATO, D et al. Structural proteome of human colostrum fat globule membrane proteins, **Proteomics**, v.3, n.6, p. 897–905, 2003.

FOX, P.F. **Milk: an overview**. In: THOMPSON, A; BOLAND, M; SINGH, H. **Milk Proteins: From Expression to Food**. 1. ed. Londres: Academic Press, 2008. p. 1-54.

GAO, X et al. Temporal Changes in Milk Proteomes Reveal Developing Milk Functions. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 3897–3907, 2012.

GARCIA, J.S.; MAGALHÃES, C.S.; ARRUDA, M.A.Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v.69, n.1, p. 1-15, 2006.

GE HEALTHCARE, Manual do usuário, **ImageMaster 2D Platinum 7.0 Edition AA**, 2007.

GE HEALTHCARE. **2-D Electrophoresis: Principles and Methods**, 2007.

GIROUX E. L., HENKIN R. I. Macromolecular ligands of exchangeable copper, zinc, and cadmium in human serum. **Bioinorganic Chemistry**, v.2, n.2, 125–133, 1973.

GÓMEZ-ARIZ, J.L et al. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metalloproteomics) in biological systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, n.1-2, p. 15-22, 2004.

GORG, A et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH. **Electrophoresis**, v. 21, n.6, p. 1037-1056, 2000.

GÖRG, A; WEISS, W; DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v.4, n.12, p. 3665–3685, 2004.

GRASSI, M.S; ZULINI, M.T; VAZ, F.A.C. Fatores imunológicos do leite humano. **Pediatria (São Paulo)**, v.23, n.3, p.258-263, 2001.

GROSS, J. **Electrospray Ionization**. In: GROSS, J. **Mass Spectrometry: A Textbook**. 2. ed. Springer, 2011, p.560-620.

GROSS, J. **Introduction**. In: GROSS, J. **Mass Spectrometry: A Textbook**. 2. ed. Springer, 2011, p.1-20.

GUERRERA, I.C; KLEINER, O. Application of mass spectrometry in proteomics. **Bioscience Reports**, v.25, n.1-2, p. 71-93, 2005.

HANSEN, M; SANDSTRÖM, B; LÖNNERDAL, B. The effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from high phytate diets assessed in rat pups and Caco-2 cells. **Pediatric Research**, v. 40, p.547–552, 1996.

HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.19, n.1, p. 5-14, 2004.

HOFFMAN, E; STROOBANT, V. **Ion Sources**. In: HOFFMAN, E; Stroobant, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**, 3.ed. John Wiley and Sons, 2007, p. 15-84.

HURREL, R.F et al. Iron absorption as influenced by bovine milk proteins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.49, p. 546-552, 1989.

IVANOVA, E.H. **Atomic Absorption Spectrometry**. In: Townsend, A; Poole, C.F; Worsfold, P.J. **Encyclopedia of Analytical Science**. 2.ed. Academic Press, 2005. p. 149-156.

JENSEN, R.G et al. **Milk lipids**. In: JENSEN, R.G. **Hanbook of Milk Composition**. 1.ed. London: Academic Press, 1995, p. 495-542.

KERR, M.A. The structure and function of human IgA. **Biochemistry Journal**, v. 271, n.2, p. 285-296, 1990.

KLITZKE, C,F. **Técnicas de Ionização**. Disponível em:

<<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=4&codassunto=19&numero=2>>. Acesso em: 5 jun. 2012.

KROENIG, T. A; MUKERJI, P; HARDS, R. G. Analysis of beta-casein and its phosphoforms in human milk. **Nurition Research**, v.18, n.7, p. 1175-1186, 1998.

Laboratório de Proteômica - UNIFESP. Gel Bidimensional. Disponível em: <<http://www.unifesp.br/centros/proteomica/servicos-e-equipamentos>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

LAMMI-KEEFE, C. **Vitamins D and E in Human Milk**. In: JENSEN, R. **Hanbook of Milk Composition**. 1.ed. Londres: Academic Press, 1995, p. 706-717.

LAURINDO, V.M et al. Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional. II – Composição nutricional do leite humano nos diversos estágios da lactação. Vantagens em relação ao leite de vaca. **Pediatria**, São Paulo, v. 14, p. 14-23, 1992.

LOBINSKI, R; MOULIN, C; ORTEGA, R. Imaging and speciation of trace elements in biological environment. **Biochimie**, v.88, n.11, p. 1591-1604, 2006.

LONNERDAL, B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms od action. **The Journal of Pediatrics**, v.156, n.2, 2010, p. 26-30.

LONNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **The American Journal of Clinical Nutritional**, v.77 n.6, p. 1537-543, 2003.

LONNERDAL, B; ADKINS, Y. Developmental changes in breast milk protein composition during lactation. In: Sanderson, I.R; Walker, W.A. **Development of the gastrointestinal tract**. 1.ed. PMPH, p. 227-244, 2000.

LONNERDAL, B; ATKINSON, S. **Nitrogenous components of milk**. In: Atkinson, S; Lonnerdal, B. **Proteins and non-protein nitrogen in human milk**. 1.ed. Boca Raton: CRC Press, 1989, p. 351-368.

LONNERDAL, B; FORSUM, E. Casein content of human milk. **The American Journal of Clinical Nutritional**, v.41, n.1, p. 113-120, 1985.

LONNERDAL, B; FORSUM, E; HAMBRAEUS, L. A longitudinal study of the protein, nitrogen and lactose contents of human milk from Swedish well-nourished mothers. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.29, n.10, p. 1127-1133, 1976.

LONNERDAL, B; HOFFMAN, B; HURLEY, L. S. Zinc and copper binding proteins in human milk. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.36, n.6, p. 1170-1176, 1982.

MAMONE, G et al. Casein phosphoproteome: identification of phosphoproteins by combined mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**. v.24, n.16, p. 2824-2837, 2003.

MANSO, M.A et al. Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products. **International Dairy Journal**, v.15, n.6-9, p.845-855, 2005.

MARSHAL, W.D. **Atomic Absorption, Emission and Fluorescence Spectrometry: Principles and Applications**. In: PARÉ, J.R.J; BÉLANGER, J.M.R. **Instrumental Methods in Food Analysis**. 1^a ed. Elsevier Science, 1997. p. 141-178.

MORENO, F.J et al. Chromatographic characterization of ovine kappa-casein macropeptide. **The Journal of Dairy Research**, v. 67, n.3, p. 349-359, 2000.

MOUNICOU, S; SZPUNAR, J; LOBINSKI, R. Metallomics: the concept and methodology. **Chemical Society Reviews**, v.38, n.4, p.1119–1138, 2009.

MURAKAMI, K; LAGARDE, M; YUKI, Y. Identification of minor proteins of human colostrum and mature milk by two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v.19, n.14, p. 2521-2527, 1998.

O'DONNELLA, R et al. **Milk proteomics**. **International Dairy Journal**, v.14, n.12, p. 1013-1023, 2004.

O'DWYER, D et al. The Proteomics of Colorectal Cancer: Identification of a Protein Signature Associated with Prognosis. **Plos One**, v.6, n.11, p.1-15, 2011.

ONG, S.E; PANDEY, A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. **Biomolecular Engineering**, v.18, n.5, p. 195-205, 2001.

PICCIANO, M.F. **Water-soluble vitamins in human milk**. In: JENSEN, R. **Hanbook of Milk Composition**. 1.ed. Londres: Academic Press, 1995, p. 675-688.

POTH, A.G et al. Analysis of the human casein phosphoproteome by 2-D electrophoresis and MALDI-TOF/TOF MS reveals new phosphoforms. **Journal of Proteome Research**, v.7, n.11, p. 5017-5027, 2008.

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. Manual técnico. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. Disponível em: <<http://www.redeblh.fiocruz.br>>. Acesso em: 10 fev. 2011.

RIORDAN, J. **The biological specificity of human milk**. In: RIORDAN, J. **Breastfeeding and lactation**. 3.ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2005, p. 97-136.

SANCHEZ-POZO, A; LOPEZ, J; PITA, M.L. Changes in the proteome fractions of human milk during lactation. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.30, n.1, p.15-20, 1986.

SANTOS, P.S. **Avaliação dos teores de elementos essenciais no leite materno de mães de recém-nascidos prematuros e a termo e em fórmulas infantis por meio da análise por ativação com nêutrons**. 2009. 105 p. Tese (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

SATO, R; NOGUCHI, T; NAITO, H. Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. **Journal of Nutrition Science and Vitamonology**, v.32, p. 67–76, 1986.

SHI, W; CHANCE, M.R. Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.15, n.1, p. 144-148, 2011.

SHI, W; CHANCE, M.R. Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.15, n.1, p. 144-148, 2011.

SILVA JUNIOR, J.G. Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático. **Interciência**, p. 256-126, 2001.

SILVA, F. **Avaliação de Selênio em spots protéicos de plasma e tecidos muscular e hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por SRXRF após separação por 2DPAGE**. 21 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina. 2009.

SILVESTRE, M.D et al. Copper, iron and zinc determinations in human milk using FAAS with microwave digestion. **Food Chemistry**, v. 68, p. 95-99, 2000.

SKOOG, D.A; HOLLER, F.J; NIEMAN, T.A. **Espectrometria de absorção atômica e de fluorescência atômica**. In: SKOOG, D.A; HOLLER, F.J; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p.194-214.

SZPUNAR, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. **Analyst**, v. 130, n. 4, p. 442-465, 2005.

SZPUNAR, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.378, n.1, p.54-56, 2008.

UNICEF. **Breastfeeding**. Disponível em:

<http://www.unicef.org/nutrition/index_24824.html>. Acesso em: 23 jan. 2012.

URUAKPA, F.O; ISMOND, M.A.H; AKOBUNDU, E.N.T. Colostrum and its benefits: a review. **Nutrition Research**, v.22, p. 755-767, 2002.




WALRAVENS, P.A; HAMBRIDGE, K.M. Growth of infants fed a zinc supplemented formula. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.29, n.1, 1976, p. 114-121.

WHO. **Infant and young child feeding: model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals.** Geneva: World Health Organization, 2009. 99 p.

WOODHOUSE, L.R; LONNERDAL, B. Quantitation of the major whey proteins in human milk and development of a technique to isolate minor whey proteins. **Nutrition Research**, v.8, n.8, p. 853-864, 1988.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

| | | |
|--|---|--|
|  | Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina de Botucatu |  |
| Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br | |  |
| | | Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997 |

Botucatu, 04 de Abril de 2011. Of. 128/11-CEP


Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha
Departamento de Química e Bioquímica do
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezado Dr. Pedro Padilha,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEP 3830-2011**) **"Estudo metaloproteômico de cálcio, ferro e zinco em leite materno coletado de lactantes de Botucatu-SP"**, a ser conduzido por Carla Mariane Costa Pozzi, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração de Maria Giuseppina Greco Tavora e Patrícia Ricci Machado dos Santos, recebeu do relator parecer favorável com sugestão, aprovado em reunião de 04 de abril de 2.011.

O CEP sugere que seja efetuada análise estatística neste projeto para confirmação do "n"

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP **"Relatório Final de Atividades"**.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

7.2 ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidada para participar da pesquisa "Estudo metaloproteômico de cálcio, ferro e zinco em leite materno coletado de lactantes de Botucatu-SP", realizada pela pós-graduanda Carla Marlene Costa Pozzi, sob orientação do Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha.

Você foi selecionada por estar em período de lactação e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

O objetivo deste estudo é avaliar a ligação de metais em proteínas do leite materno e sua participação nesta pesquisa consistirá em fornecer uma amostra de aproximadamente 7 mL de seu leite para análise desses metais e proteínas. O leite será retirado por ordenha, com a ajuda de uma enfermeira, e ficará armazenado a uma temperatura de -80°C até o início dos procedimentos, podendo ser reutilizado em futuras pesquisas. Se esse for o caso, você será contatada para a assinatura de um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A pesquisa prevê a análise de leite nas três fases de lactação (colostro — 1ª ao 6ª dia, leite de transição — 7ª ao 14ª dia e leite maduro — posterior ao 15ª dia) e, por isso, você será contatada para um total de 3 doações. Para cada nova doação, você receberá um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação (as amostras serão referenciadas por códigos).

Carla Marlene Costa Pozzi – End: R. Padre Salustio R. Machado, 323-4. Tel: (14)98701054
e-mail: ca_pozzi@ibb.unicp.br

Pedro de Magalhães Padilha – End: R. Francisco Caricão, 447. Tel: (14)33825728
e-mail: Padilha@ibb.unicp.br

Você receberá um questionário contendo 8 perguntas (duração de aproximadamente 10 minutos) que ficará com os pesquisadores e uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço residencial do pesquisador principal e da pós-graduanda, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. A outra cópia ficará com os pesquisadores.

Assinatura do pesquisador: _____

Carla Mariane Costa Pozzi

Declaro que entendi os objetivos de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Local e data _____/_____/_____/_____

Nome: _____

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNEBP, através do fone: (14) 3811-6343

Carla Mariane Costa Pozzi – End: R. Pedro Salvação R. Machado, 123-4. Tel: (14)98701054

e-mail: ca_pozzi@ibb.uncsp.br

Pedro do Magalhães Padilha – End: R. Francisco Caricó, 447. Tel: (14)38825728

e-mail: Padilha@ibb.uncsp.br

ANEXO III – QUESTIONÁRIO APLICADO ÀS DOADORAS

"Estudo metaloproteômico de cálcio, ferro e zinco em leite materno coletado de lactantes de Botucatu-SP" – **QUESTIONÁRIO PARA AS DOADORAS**

Responsáveis: Carla Mariane Costa Pozzi e Pedro de Magalhães Padilha

1. Data: ____/____/____

2. Nome:

3. Idade:

4. Primeira gestação? Sim Não

5. Há quanto tempo está amamentando? _____

Durante o período gestacional e de lactação, você:

6. Ingeriu bebidas alcoólicas? Sim Não

7. Fumou cigarro? Sim Não

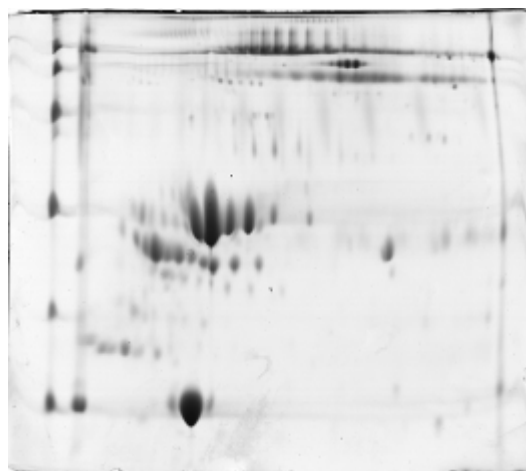
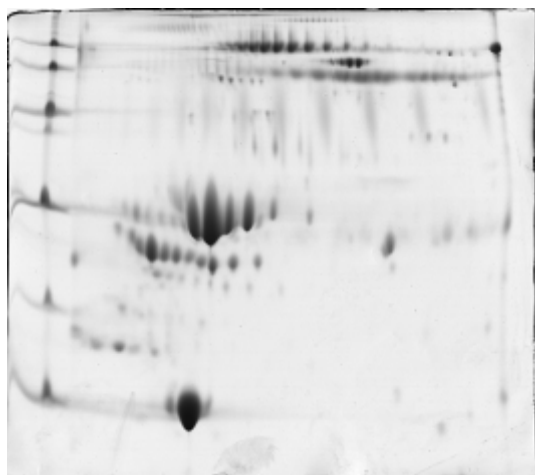
8. Fez uso de medicamentos? Sim Não

Se sim, qual(is)? _____

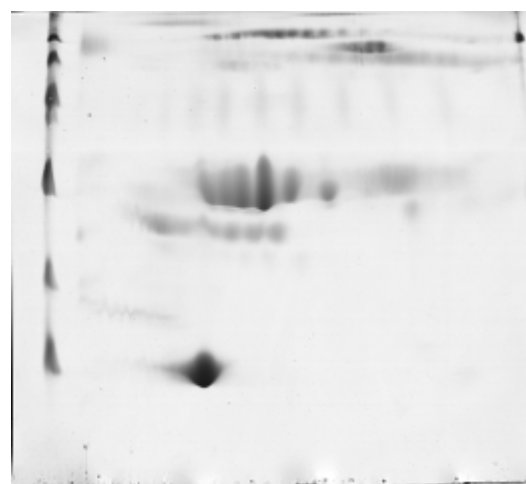
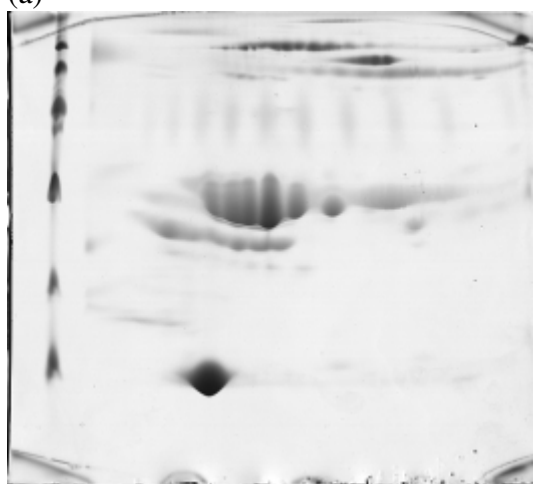
9. Fez uso de produtos químicos (tintura, creme, etc.)? Sim Não

Se sim, qual(is)? _____

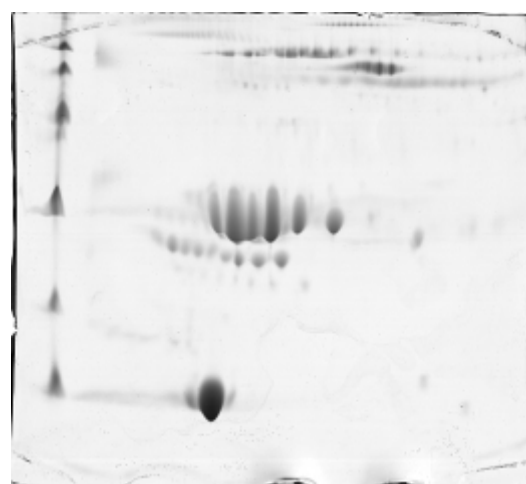
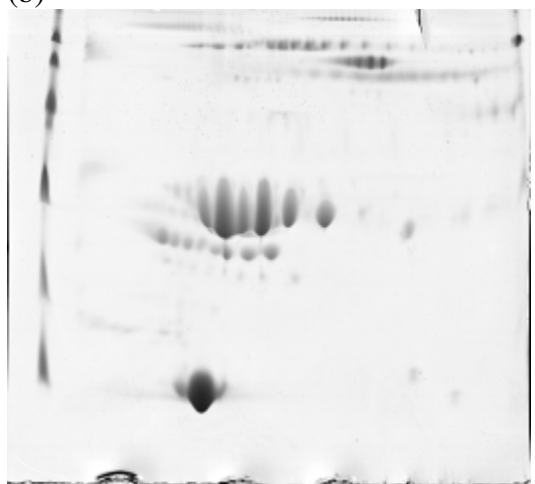
7.4 ANEXO IV – IMAGENS DOS GÉIS EM PH 4-7 DAS LACTANTES A, C, D E E.



(a)

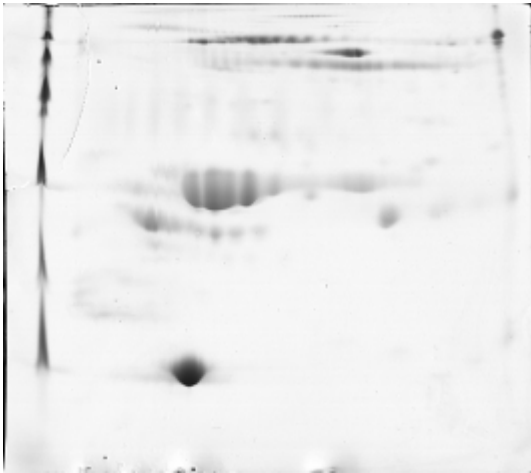


(b)

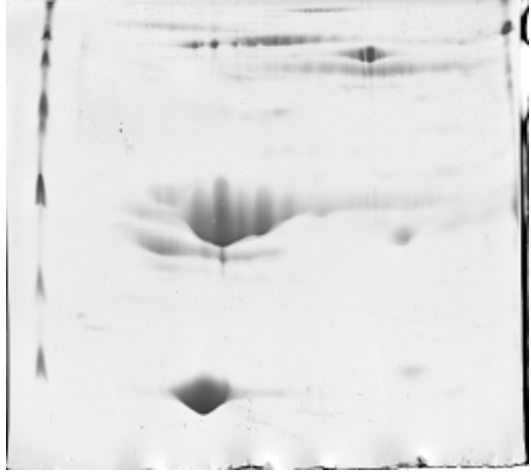
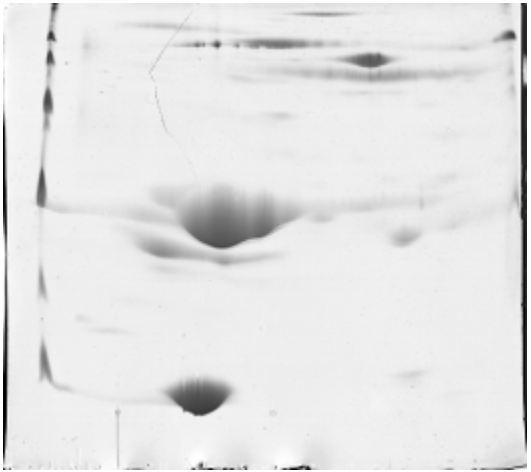


(c)

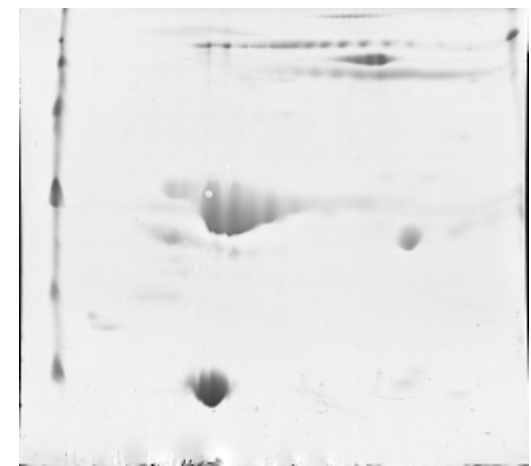
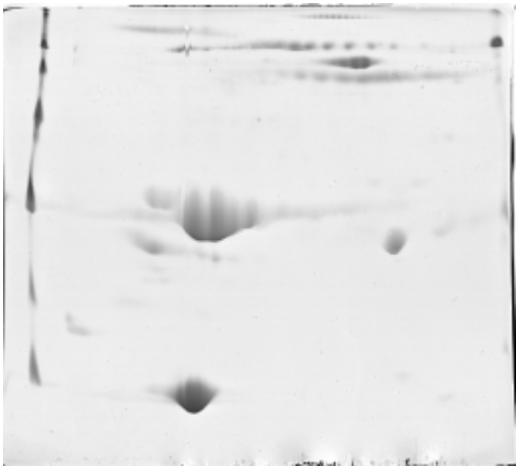
Géis obtidos a partir do colostro em pH 4-7 – replicatas 1 e 2 - (a), leite de transição – replicatas 1 e 2 - (b) e leite maduro – replicatas 1 e 2 - da lactante A



(a)

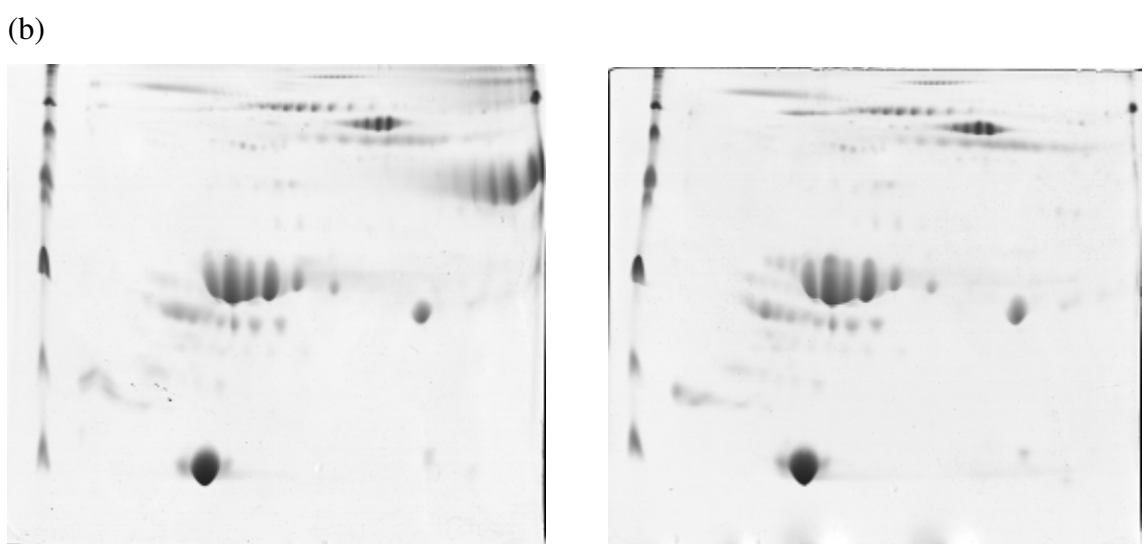
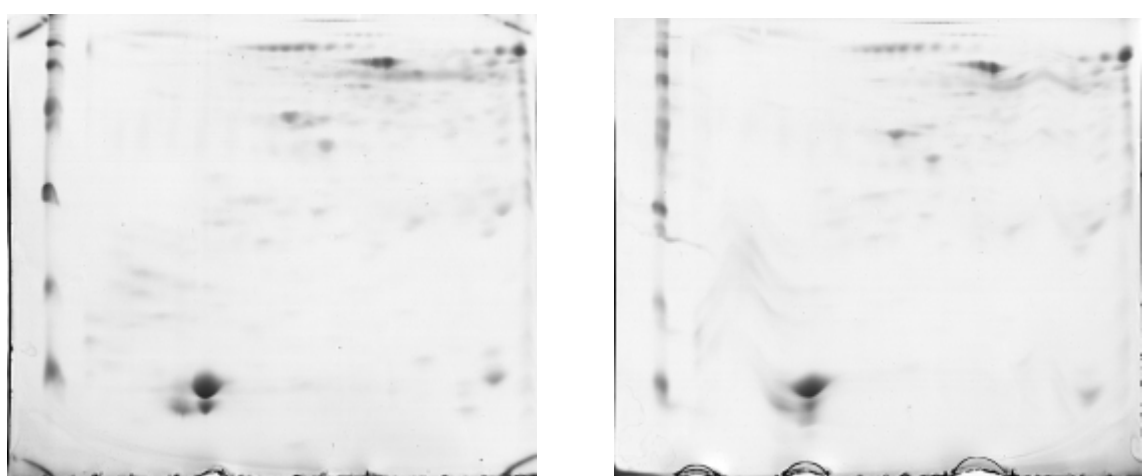
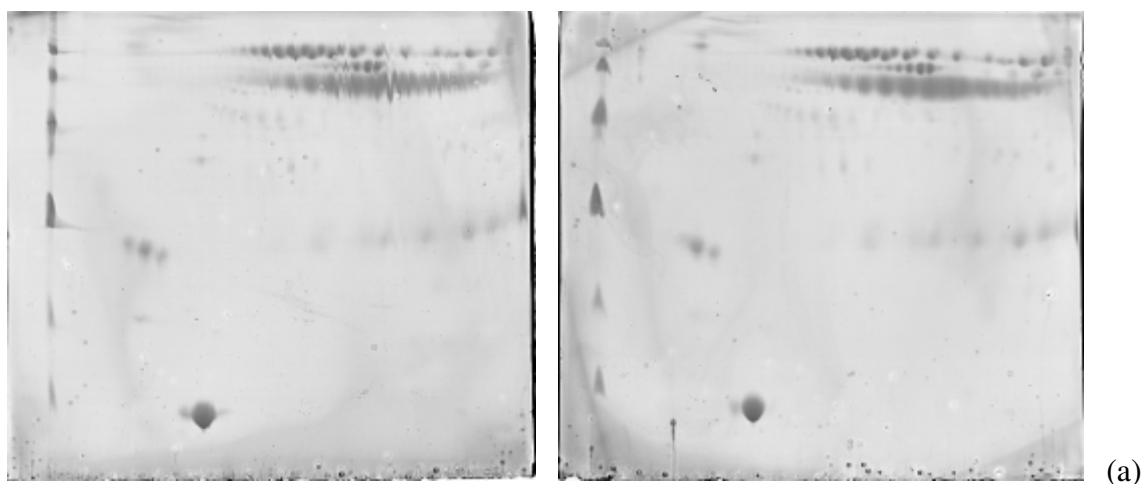


(b)

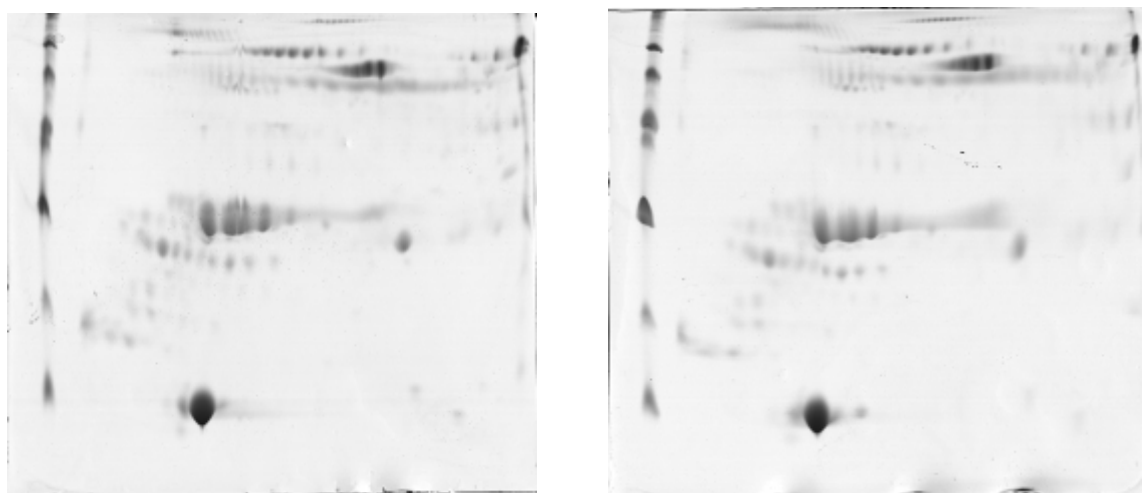
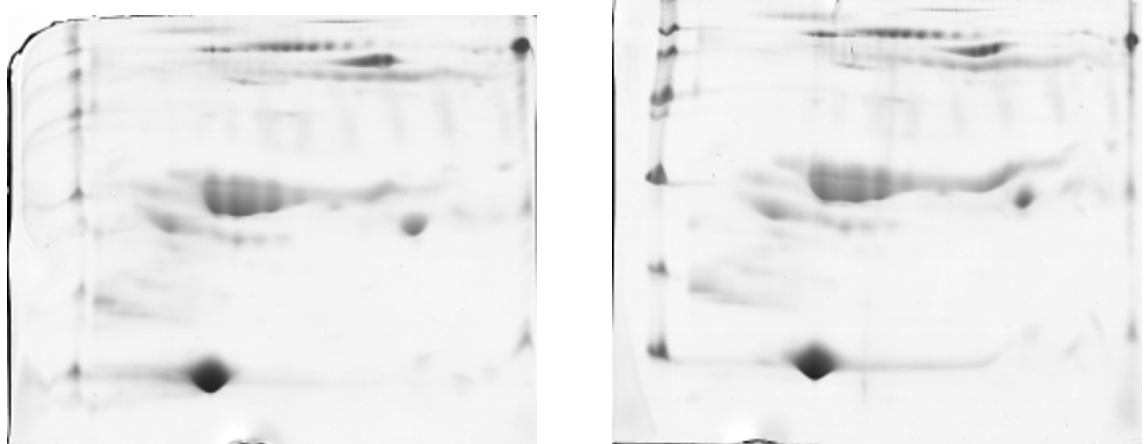
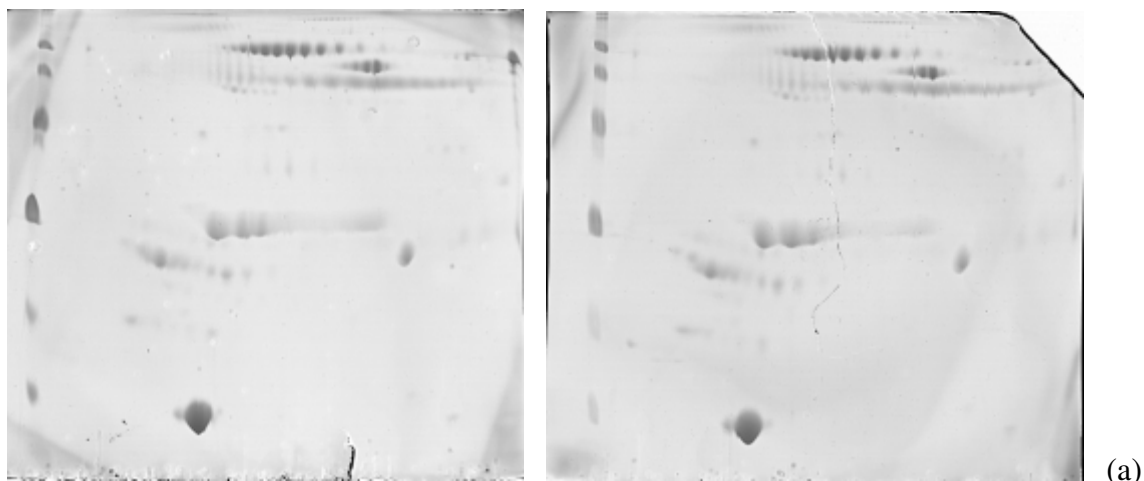


(c)

Géis obtidos a partir do colostro em pH 4-7 – replicatas 1 e 2 - (a), leite de transição – replicatas 1 e 2 - (b) e leite maduro – replicatas 1 e 2 - da lactante C



(c)
 Géis obtidos a partir do colostro em pH 4-7 – replicatas 1 e 2 - (a), leite de transição – replicatas 1 e 2 - (b) e leite maduro – replicatas 1 e 2 - da lactante D



(c)

Géis obtidos a partir do colostro em pH 4-7 – replicatas 1 e 2 - (a), leite de transição – replicatas 1 e 2 - (b) e leite maduro – replicatas 1 e 2 - da lactante E

7.5 ANEXO V – NÚMERO DE SPOTS POR GEL DAS LACTANTES A, C, D e E

| | Lactante A | Lactante C | Lactante D | Lactante E |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <u>Colostro</u> | | | | |
| Nº de spots | | | | |
| 1 | 256 | 206 | 154 | 159 |
| 2 | 260 | 207 | 139 | 151 |
| média | 258 | 206,5 | 146,5 | 155 |
| <u>Transição</u> | | | | |
| Nº de spots | | | | |
| 1 | 200 | 140 | 254 | 244 |
| 2 | 172 | 231 | 205 | 272 |
| Média | 186 | 185,5 | 229,5 | 258 |
| <u>Maduro</u> | | | | |
| Nº de spots | | | | |
| 1 | 216 | 136 | 251 | 239 |
| 2 | 225 | 117 | 238 | 190 |
| média | 220,5 | 126,5 | 244,5 | 214,5 |