



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO SORO SANGUÍNEO DE RATOS  
ADULTOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL**

**ALICE DE ANDRADE BEZERRA**

**Recife  
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO SORO SANGUÍNEO DE RATOS  
ADULTOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL**

**ALICE DE ANDRADE BEZERRA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia.

**Orientador:** Prof<sup>o</sup> José Luiz de Lima Filho

**Co-orientadores:** Prof<sup>a</sup> Célia Maria M. Barbosa de Castro  
Prof<sup>a</sup> Danyelly Bruneska Gondim Martins  
Prof<sup>a</sup> Maria Elizabeth Cavalcante Chaves

**RECIFE  
2011**

**Bezerra, Alice de Andrade**

**Análise proteômica do soro sanguíneo de ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal/ Alice de Andrade Bezerra – Recife: O Autor, 2011.**

**85 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: José Luiz de Lima Filho**

**Co-Orientadores: Célia Maria M. B. Castro**

**Danyelly Brunaska Gondim Martins**

**Maria Elizabeth Cavalcante Chaves**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia, 2011.**

**Inclui bibliografia e anexo**

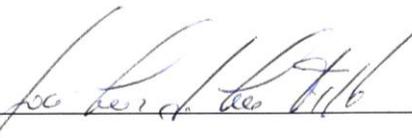
**1. Desnutrição 2. Sangue 3. Sangue I. Título.**

**616.39**

**CDD (22.ed.)**

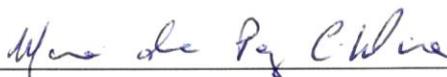
**UFPE/CCB-2011-176**

## BANCA EXAMINADORA



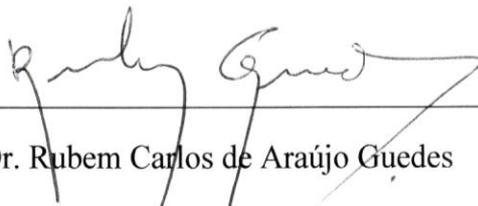
Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho (Orientador)

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami e Departamento de Bioquímica - UFPE



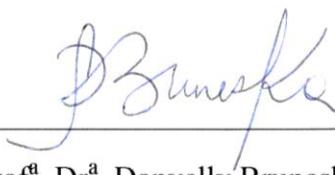
Prof.ª. Dr.ª. Maria da Paz Carvalho da Silva

Departamento de Bioquímica - UFPE



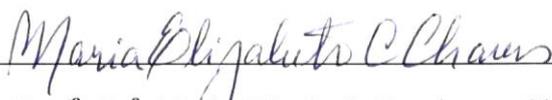
Prof. Dr. Rubem Carlos de Araújo Guedes

Departamento de Nutrição – UFPE



Prof.ª. Dr.ª. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Departamento de Bioquímica – UFPE



Prof.ª. Dr.ª. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves

Departamento de Bioquímica – UFPE

*Aos maiores amores de  
minha vida: meus pais, Elisabeth  
de Andrade e Roberval Bezerra, e  
meu irmão Rodrigo Bezerra (in  
memoriam).*

## AGRADECIMENTOS

*A **Deus**, pela honra de ser filha dos melhores pais do mundo e por ter me concedido, como irmão, uma pessoa linda. Agradeço a presença constante em meu dia-a-dia, sem a qual jamais poderia agir com sabedoria e, principalmente, com perseverança diante das mais variadas situações da vida.*

*Aos meus pais, **Elisabeth de Andrade** e **Roberval Bezerra**, minha razão de viver. A concretização deste trabalho não existiria se eu não os tivesse como exemplo a seguir de perseverança, honestidade e sabedoria. Agradeço todo o amor, ensinamentos, confiança e investimentos que depositaram em mim. Amo-os incondicionalmente!*

*À **Jeane de Azevedo**, uma pessoa ímpar, o amor em pessoa. Agradeço todo carinho, companheirismo, amizade e por estar sempre ao lado de meu pai, nos bons e maus momentos. Serei eternamente grata por sua presença em minha vida!*

*A meus familiares, especialmente aos tios **Anísio Moreira** e **Rejane Bezerra** e ao meu avô **Valdeliro Bezerra**, que sempre me concederam muito apoio em minhas escolhas e, em momentos difíceis, aconselharam-me sabiamente, com muito amor e carinho.*

*Ao meu orientador, **prof<sup>o</sup> José Luiz de Lima Filho**, por ter me aceitado como aluna e confiado em mim. Agradeço todos os momentos de incentivo e apoio, e todas as oportunidades que me foram concedidas para que hoje eu me sinta uma pessoa mais experiente e preparada. Sem este incentivo, teria sido ainda mais difícil chegar até aqui e eu não teria aprendido tanto. Considero-me privilegiada em ter recebido suas orientações. Obrigada por tudo.*

*À **prof<sup>a</sup> Célia M<sup>a</sup> Machado Barbosa de Castro**, minha eterna orientadora. Agradeço todo apoio e confiança que sempre foram depositados em mim. Todo este tempo que trabalhamos juntas foi essencial para meu amadurecimento profissional e pessoal. Por isso, sou eternamente grata e desejo verdadeiramente que nossos laços profissionais e de amizade estendam-se por muitos anos. Com muito carinho, obrigada.*

*À **prof<sup>a</sup> Maria Elizabeth Cavalcante Chaves** por ter me guiado e concedido sua atenção durante a execução de grande parte do mestrado. Sinto-me honrada em ter iniciado as atividades experimentais do trabalho sob sua orientação. Se hoje sou uma profissional melhor, é porque consegui aprender com seu exemplo de competência e profissionalismo. Sou eternamente grata a todo apoio que recebi. Muito obrigada.*

À **profª Danyelly Brunaska Gondim Martins**, uma pessoa genial, que surgiu num momento crucial do desenvolvimento de meu trabalho. Agradeço verdadeiramente o apoio, a confiança, as palavras de incentivo, os ensinamentos, temas e “lemas”. Esses poucos meses que estamos trabalhando juntas fizeram-me reunir grande admiração, respeito e carinho. Sinceramente, meu sentimento de gratidão é tão forte que não consigo expressá-lo como deveria por palavras...

Aos professores **Débora Nepomuceno** (Depto. Nutrição – UFPE), **Giovani Rota Bertani** (LIKA-UFPE), **Paloma Lys de Medeiros** (Depto. de Histologia - UFPE) e **Eliete Cavalcanti da Silva** (Depto. de Histologia - UFPE) por ter concedido a infra-estrutura de seus laboratórios para realização de parte dos experimentos.

Às amigas e companheiras, de hoje e sempre, **Natália Morais** e **Thacianna Barreto**. Mais uma vez, vocês estiveram ao meu lado, compartilhando experiências, comemorações, momentos de sorrisos e lágrimas ao longo desta jornada de dois anos. Por muitas vezes, vocês me ajudaram a recomeçar. Obrigada por tudo e que venha o doutorado!

Às amigas de anos, **Manuelle Nunes**, **Marcelly Lira** e **Paula Gabriela**. Por mais que a as diferentes ocupações nos mantenham separadas fisicamente, o forte sentimento de amizade as mantém sempre presentes em meu dia-a-dia, nos meus pensamentos. Simplesmente, agradeço a existência de vocês em minha vida.

Aos grandes amigos **Belany Carvalho**, **Emmanuel Pontual**, **Hernando Neto**, **Isla Bastos** e **Lídia Lins**, meus companheiros de estrada desde a graduação. Vocês são pessoas essenciais para que eu chegasse até aqui, pois sempre me ajudaram e torceram por mim. Com vocês, eu sou mais forte. Amo vocês e obrigada pela amizade.

Aos meus queridos amigos e companheiros, alunos de iniciação científica da Microbiologia – LIKA, **Guilherme Oliveira** e **Renata Raele**. Agradeço toda dedicação com a qual vocês desempenharam suas atividades durante o decorrer do mestrado. A participação de vocês foi essencial para que este trabalho fosse realizado. Tenham certeza de que podem contar com minha amizade e apoio. Torço muito pela felicidade de vocês. Meus sinceros agradecimentos.

À amiga **Juliana Melo**, por todo companheirismo, paciência, ajuda na execução dos experimentos, amizade e “caronas”. Desejo que nossa amizade se fortaleça ainda mais ao longo dos anos.

À **Suzan Diniz**, que se tornou uma amiga, por todos os momentos de alegrias e aperreios compartilhados. Torço muito por sua felicidade e de toda família. Desejo que nossa amizade também se fortaleça com o passar do tempo.

À amiga **Maiara Severo** que, apesar da distância, sempre está presente no meu dia-a-dia em meus pensamentos. Desde a iniciação científica, tem me ajudado muito e torcido pelo meu sucesso.

A todos os amigos e colegas do laboratório de Microbiologia Clínica do LIKA, especialmente **Thales Henrique Sales, Thays Miranda, André Galvão, Rodrigo Fragoso, Simone Fraga, Flávia Regina Araújo, Fátima Diniz, Guilherme Magalhães** por todo apoio, amizade e companheirismo que tenho recebido de vocês.

A **Pedro Cruz**, uma pessoa especial que tem me acompanhado desde o início do mestrado. Agradeço todos os bons momentos de descontração em que pudemos parar para conversar, desabafar e compartilhar experiências do dia-a-dia. Obrigada por sua agradável companhia.

À **Marcela Outtes**, por ter surgido no meu caminho num momento muito importante do mestrado. Agradeço, com toda sinceridade e carinho, tudo o que você tem feito para me ajudar. A defesa desta dissertação só está se realizando porque tive apoio e atenção de pessoas verdadeiras e queridas como você. Minha eterna gratidão.

A toda equipe do grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática (ProspecMol) e do laboratório de Biologia Molecular do LIKA, especialmente **Monique Ferraz, Marek Ekert, Eriton, Kleiton Borges, Aíla Lima, Talitha Mey e Érik Amazonas** por todo companheirismo e ajuda.

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia do LIKA, principalmente **Roberto Afonso e Roberto Motta**. Agradeço toda a ajuda e amizade.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica do LIKA, em especial **Adriana Andrade, Natália Lima, Gabriela Ayres e Humberto Bertão**. Obrigada por me ajudarem nos momentos em que mais precisei.

Aos amigos do curso de especialização em Biologia Molecular – UPE: **Albérico Queiroz, Eduardo e Carlos Alberto**. Foi muito bom conhecê-los e conviver com vocês ao longo do curso. Obrigada por todo apoio e amizade.

Aos amigos **Luiz Felipe, Rafael Padilha, Paulo e Edson**. Meus dias tornam-se mais felizes sempre que os encontro. Obrigada pela confiança e amizade.

*A todos os funcionários do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE, principalmente **Eliete, Sr. Otaviano, Maria Helena, “Verinha”, Moisés, Ilma, Conceição e Paulina.***

*Aos que fazem o Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – UFPE, em especial **Adenilda Eugênia de Lima** por todo apoio a mim concedido durante a realização do mestrado.*

*A todos os funcionários do Departamento de Nutrição - UFPE, principalmente ao médico veterinário **Ediones França** por ter concedido os animais utilizados na pesquisa.*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** pela concessão da bolsa de estudos.*

*A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.*

*Obrigada!*

*“Se fiz descobertas  
valiosas, foi mais por ter  
paciência do que qualquer  
outro talento.”*

**Isaac Newton**

## RESUMO

Estímulos atuantes durante períodos fetal e neonatal desencadeiam modificações fisiológicas e metabólicas permanentes no indivíduo, fenômeno bastante estudado em Nutrição através de manipulação nutricional. Para pesquisa de alterações biomoleculares, o soro sanguíneo é fonte potencial de biomarcadores protéicos. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da desnutrição protéica neonatal sobre o perfil proteômico do soro sanguíneo de ratos adultos. Foram utilizados 8 ratos Wistar, machos, adultos, que foram divididos em 2 grupos, de acordo com a dieta disponibilizada do 1º ao 21º dia de vida (período de lactação): grupo nutrido (GN), formado por filhotes cujas mães receberam dieta com 17 % de caseína e grupo desnutrido (GD), no qual as mães alimentaram-se de dieta com 8 % de caseína. No período de reposição nutricional, a partir do desmame (22º dia), os filhotes passaram a receber dieta padrão normoprotéica. Os animais foram pesados diariamente durante aleitamento e, posteriormente, em dias alternados. Na idade adulta, a partir do 90º dia de vida, os animais foram anestesiados e submetidos à punção cardíaca para coleta de sangue (4mL). Após coagulação, este foi centrifugado, a camada de soro coletada e acondicionada a -20°C. Alíquotas foram inicialmente diluídas (1:10) para análise eletroforética monodimensional pela tecnologia *lab-on-a-chip*, utilizando os kits Agilent Protein 80 e 230. Para análise bidimensional, proteínas presentes em 50 µL de soro foram precipitadas em acetona, ressolubilizadas em solução (200 µL) contendo uréia (7 M), tiouréia (2 M) e CHAPS (2 %), sendo 100 µL da solução de proteínas reservados para 1ª dimensão (fitas de 13 cm, pH 3-10). A 2ª dimensão foi realizada em géis de poliacrilamida (10 %) que foram corados com Azul de Coomassie. Os *spots* detectados foram analisados em *software* específico. Para análise dos dados, utilizaram-se os testes t-Student e Mann-Whitney, considerando-se  $p \leq 0,05$ . Animais GD apresentaram valores de peso corporal menores do que GN a partir do 5º dia de vida (GN:  $12,55 \pm 3,35$ g e GD:  $10,41 \pm 2,03$ g,  $p=0,0262$ ), condição que permaneceu até o 90º dia ( $p < 0,0007$ ). Além disso, na idade adulta, apresentaram menor quantidade de faixas de pesos moleculares detectadas e aumento de concentração de proteínas de peso 32,92 a 32,34 kDa (GN: 6,3 ng/µL e GD: 7,45 ng/µL,  $p=0,041$ ) no perfil monodimensional. Na análise bidimensional, observaram-se alterações aparentes nos tipos e intensidade de alguns *spots*. A desnutrição protéica neonatal ocasionou déficit permanente de peso corporal até 90º dia de vida e, no animal adulto, provocou modificações nos perfis proteômicos das amostras de soro analisadas. Em decorrência da administração de uma dieta hipoprotéica durante período crítico de desenvolvimento, modificações no proteoma podem ser correlacionadas a alterações metabólicas que, potencialmente, estejam associadas ao desenvolvimento de patologias no indivíduo adulto.

**Palavras-chaves:** Desnutrição neonatal; soro sanguíneo; perfil proteômico; eletroforese bidimensional; tecnologia *lab-on-a-chip*.

## ABSTRACT

Stimuli acting during fetal and neonatal periods bring about physiologic and metabolic changes to individuals, phenomenon widely studied in Nutrition by means of nutritional manipulations. For researches on biomolecular changes, the serum is considered a potential source of biomarkers. This study aimed to evaluate the effects of neonatal protein malnutrition on serum proteomic profile of adult rats. A total of 8 adult, male, Wistar rats was used and they were divided into 2 groups according to the diet received from the 1<sup>st</sup> to 2<sup>nd</sup> day of life (the lactation period): nourished (NG), consisting of pups whose mothers were fed with 17 % casein-diet and malnourished (MG) in which the mothers received a 8 % casein-diet. During nutritional replacement period, from the weaning (22<sup>nd</sup> day), pups were fed with a normoproteic diet. The animals were daily weighed during lactation and, later, in alternate days. In the adult life, from the 90 day, they were anesthetized and undergoing cardiac puncture for blood collection (4 mL). After clotting, the blood was centrifuged, the serum layer collected and stored at -20 °C. Aliquots were initially diluted (1:10) for monodimensional electrophoretic analysis through lab-on-a-chip technology using the Agilent Protein 80 and 230 kits. For bidimensional analysis, proteins that were present in 50 µL of serum were precipitated in acetone and solubilize in 200 µL of solution containing urea (7 M), thiourea (2 M), CHAPS (2 %). 100 µL of this protein solution were reserved for the 1<sup>st</sup> dimension (13 cm strips, pH 3-10). The 2<sup>nd</sup> dimension was performed on polyacrylamide gels (10 %) that were stained with Coomassie Blue. The detected spots were analyzed using specific software. Student-t test and Mann-Whitney test were used for data analysis ( $p \leq 0.05$ ). MG animals showed body weight values lower than the NG ones from the 5<sup>th</sup> day of life (NG:  $12.55 \pm 3.35$  g and MG:  $10.41 \pm 2.03$  g,  $p = 0.0262$ ), condition that remained until day 90 ( $p < 0.0007$ ). Furthermore, in adulthood, MG animals had lower amounts of detected molecular weight ranges and increased 32.92 to 32.34 kDa protein concentration (NG: 6.3 ng/µL and MG: 7.45 ng/µL,  $p = 0.041$ ) in monodimensional profile. Apparent changes in the types and intensities of some spots were observed in bidimensional analysis. Therefore, neonatal malnutrition caused permanent loss of body weights until the 90<sup>th</sup> day of life, and in the adult animal, it caused changes in the proteomic profiles of the analyzed serum samples. In consequence of low protein diet intake during this critical period of development, changes in proteome may be correlated to metabolic changes potentially associated to the emergence of pathologies in adulthood.

**Keywords:** Neonatal malnutrition; blood serum; proteomic profile; bidimensional electrophoresis; lab-on-a-chip technology.

**LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

<b>Figura 1</b>	Número de pessoas desnutridas no mundo 1969 a 2010. Fonte: FAO, 2010.	5
<b>Figura 2</b>	Origem fetal/neonatal de doenças que acometem o indivíduo adulto e respostas adaptativas para assegurar a sobrevivência imediata. Fonte: Langley-Evans, 2009 (modificada).	9
<b>Figura 3</b>	Visão geral dos mecanismos epigenéticos de regulação gênica e seus efeitos sobre fenômenos biológicos. Fonte: Nakao, 2001 (modificada).	11
<b>Figura 4</b>	Ferramentas ômicas na nutrição e saúde. Genômica, proteômica e metabolômica integradas na Ciência da Nutrição e na promoção de saúde. Fonte: Fialho; Moreno; Ong, 2008.	12
<b>Figura 5</b>	Constituição protéica global do plasma/soro. Fonte: Jacobs et al., 2005 (modificada).	14
<b>Figura 6</b>	A) Princípio de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz. B) Esquema de um espectrômetro de massas por MALDI-TOF. Fonte: Bonk & Humeny, 2001 (modificada).	18
<b>Figura 7</b>	Formas de visualização dos resultados obtidos no Bioanalyzer 2100 após separação eletroforética de proteínas: A) Resultado da corrida de 10 amostras em formato de gel; B) Resultado da corrida de uma das amostras em formato de eletroferograma.	21

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

- Figura 1** Sobreposição dos eletroferogramas gerados no Agilent Bioanalyzer 2100 referente ao perfil proteico de amostras de soro individuais: A) ratos nutridos (n=4); B) ratos desnutridos (n=4). [FU]: unidades de fluorescência; [s]: tempo de migração em segundos. 44
- Figura 2** Eletroferogramas referentes às amostras de soro em *pool*: A) grupo nutrido (n=4); B) grupo desnutridos (n=4); C) sobreposição dos perfis de *pool* de animais nutridos (linha vermelha) e desnutridos (linha azul). Os números acima de cada pico indicam os pesos moleculares em kDa. LM: marcador interno inferior; PS: pico do sistema; UM: marcador interno superior. [FU]: unidades de fluorescência; [s]: tempo de migração em segundos. 45
- Figura 3** Eletroferograma das amostras de ratos do grupo desnutrido analisadas no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) utilizando 4 µl da amostra processada do soro no chip Protein chip 230. A faixa evidenciada corresponde às proteínas na faixa de 85,22 – 109,23 kDa. A seta em azul evidencia o pico referente à faixa 96,12 - 96,62 kDa detectada pelo *software* em todos os animais estudados. 48
- Figura 4** Eletroferograma das amostras de soro de ratos do grupo nutrido analisadas no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) utilizando 4 µl da amostra processada do soro no chip Protein chip 230. A faixa evidenciada corresponde às proteínas na faixa de 85,22 – 109,23 kDa. A seta em azul evidencia o pico referente à faixa 96,12 - 96,62 kDa detectada pelo *software* apenas no rato 2. 49
- Figura 5** Perfis proteômicos bidimensionais de amostras de pool de soro. A) Pool de ratos desnutridos (PD); B) Pool de ratos nutridos (PN). As setas indicam os principais spots de proteínas encontrados no gel. As áreas delineadas demonstram grupo de spots que apresentam diferença de intensidade. Marcadores de peso molecular: 10 a 225 kDa. Faixa de pI: pH 3 a 10. 52
- Figura 6** Perfis proteômicos bidimensionais de amostras individuais de soro de ratos. A) Rato desnutrido 1 (D1); B) Rato nutrido 4 (N4). As setas indicam os spots de proteínas que apresentam expressão diferencial entre ambos animais. Marcadores de peso molecular: 10 a 225 kDa. Faixa de pI: pH 3 a 10. 53
- Figura 7** Espectro de peptide mass fingerprinting obtido por MALDI-TOF MS para o spot número 1 da amostra de pool de ratos desnutridos (PD\_1). m/z: massa sobre carga. Faixa de detecção: 1.000 a 3.000 m/z. Intensity: intensidade do sinal. 54
- Figura 8** Espectro de peptide mass fingerprinting obtido por MALDI-TOF MS para o spot número 2 da amostra de pool de ratos desnutridos (PD\_2). m/z: massa sobre carga. Faixa de detecção: 1.000 a 3.000 m/z. 55

Intensity: intensidade do sinal.

- Figura 9** Espectro de peptide mass fingerprinting obtido por MALDI-TOF MS para o spot número 3 da amostra de pool de ratos desnutridos (PD\_3). m/z: massa sobre carga. Faixa de detecção: 1.000 a 3.000 m/z. Intensity: intensidade do sinal. 56
- Figura 10** Espectro de peptide mass fingerprinting obtido por MALDI-TOF MS para o spot número 2 da amostra de pool de ratos nutridos (PN\_2). m/z: massa sobre carga. Faixa de detecção: 1.000 a 3.000 m/z. Intensity: intensidade do sinal. 57
- Figura 11** Espectro de peptide mass fingerprinting obtido por MALDI-TOF MS para o spot número 1 da amostra individual do rato nutrido 4 (N4\_1). m/z: massa sobre carga. Faixa de detecção: 1.000 a 3.000 m/z. Intensity: intensidade do sinal. 58

**LISTA DE GRÁFICOS DO ARTIGO**

<b>Gráfico 1</b>	Acompanhamento da evolução ponderal dos grupos nutrido (em azul) e desnutrido (em vermelho) durante o período de aleitamento. Teste <i>t</i> de Student, média±desvio padrão. * $p < 0,05$ .	42
<b>Gráfico 2</b>	Acompanhamento da evolução ponderal dos grupos nutrido (em azul) e desnutrido (em vermelho) durante o período pós-desmame. Teste <i>t</i> de Student, média±desvio padrão.* $p < 0,05$ .	43

**LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

<b>Tabela 1</b>	Formulação da dieta AIN-93G para crescimento rápido de roedores quando a caseína é usada como fonte de proteína.	6
<b>Tabela 2</b>	Proteínas séricas de fase aguda negativas e positivas encontradas em humanos.	15
<b>Tabela 3</b>	Isoformas de imunoglobulinas.	15
<b>Tabela 4</b>	Proteínas “não-clássicas” presentes no soro de humanos.	16
<b>Tabela 5</b>	Características da eletroforese realizada pelo sistema <i>lab-on-chip</i> utilizando três diferentes ensaios para análise de proteínas (Agilent Technologies).	21

**LISTA DE TABELAS DO ARTIGO**

<b>Tabela 1</b>	Concentrações médias dos picos comuns aos animais dos grupos nutrido e desnutrido, detectados nas amostras do <i>pool</i> de soro.	46
<b>Tabela 2</b>	Valores dos picos detectados apenas em amostras do <i>pool</i> de animais do grupo nutrido.	47
<b>Tabela 3</b>	Prováveis proteínas correspondentes às faixas de pesos moleculares detectados pelo Bioanalyzer 2100 em amostras de soro de ratos adultos nutridos e desnutridos. Busca realizada no banco de dados TagIdent tool (ExPASy) restrita à espécie <i>Rattus norvegicus</i> .	50

**LISTA DE SIGLAS**

<b>2D DIGE</b>	Eletroforese bidimensional diferencial
<b>2-DE</b>	Eletroforese bidimensional
<b>AIN</b>	<i>American Institute of Nutrition</i>
<b>BFB</b>	<i>Bromophenol blue</i>
<b>CHAPS</b>	<i>Chloroamidopropyl dimethylammonio propane sulfonate</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ExPASy</b>	<i>Expert Protein Analysis System</i> (servidor de proteômica)
<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
<b>GD</b>	Grupo Desnutrido
<b>GN</b>	Grupo Nutrido
<b>IPG</b>	Gradiente de pH imobilizado ( <i>Immobilized pH Gradient</i> )
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade ( <i>Low Density Lipoprotein</i> )
<b>MALDI</b>	Ionização/desorção a laser assistida por matriz
<b>MS</b>	Espectrometria de massa
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PMF</b>	<i>Peptide mass fingerprinting</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
<b>TOF</b>	Tempo de voo ( <i>time-of-flight</i> )

**LISTA DE SÍMBOLOS**

<b>kg</b>	Quilograma
<b>pg</b>	Picograma
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μg</b>	Micrograma
<b>kDa</b>	Quilodálon
<b>min</b>	Minuto
<b>cm</b>	Centímetro
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>g</b>	Gramma
<b>mL</b>	Mililitro
<b>pI</b>	Ponto isoelétrico
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>MW</b>	Peso molecular
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>kV</b>	Quilovolt
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>[FU]</b>	Unidade de fluorescência
<b>[s]</b>	Tempo de migração em segundos

## SUMÁRIO

<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo I - Revisão da literatura</b>	<b>4</b>
<b>1 Desnutrição</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Dieta utilizada no presente estudo</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Programação nutricional do desenvolvimento</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Interação gene-nutriente e desenvolvimento da Nutrigenômica</b>	<b>10</b>
<b>2 Aplicação de técnicas proteômicas para análise de biomarcadores</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Biomarcadores e o soro sanguíneo</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Análise proteômica</b>	<b>16</b>
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>22</b>
<b>Objetivos</b>	<b>29</b>
<b>1 Geral</b>	<b>30</b>
<b>2 Específicos</b>	<b>30</b>
<b>Capítulo II – Artigo</b>	<b>31</b>
<b>Conclusões</b>	<b>71</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>73</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICE A – Planilha para acompanhamento da evolução ponderal de animais do grupo nutrido durante período de aleitamento.</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE B – Planilha para acompanhamento da evolução ponderal de animais do grupo desnutrido durante período de aleitamento.</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICE C - Planilha para acompanhamento da evolução ponderal de animais do grupo nutrido durante período de reposição nutricional.</b>	<b>78</b>
<b>APÊNDICE D – Planilha para acompanhamento da evolução ponderal de animais do grupo desnutrido durante período de reposição nutricional.</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO A – Documento de aprovação do projeto pela comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pernambuco.</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO B- Normas da revista para submissão do artigo.</b>	<b>82</b>

# **Introdução**

As formas de má nutrição, resultantes de déficit ou excesso de nutrientes essenciais e de alto valor biológico, são consideradas um grave problema de saúde pública mundial. A desnutrição caracteriza-se pela falta de elementos nutricionais na dieta como, por exemplo, proteínas, carboidratos e micronutrientes. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), 925 milhões de pessoas no mundo foram acometidas pela desnutrição energético-protéica em 2010, sendo 98 % residentes em países de economia emergente (FAO, 2010).

Muitos estudos têm relacionado processos de desenvolvimento que ocorrem durante estágios iniciais de vida com o estado de saúde na vida adulta do indivíduo, desde a época de Hipócrates, passando por Forsdahl em 1977 e Barker *et al.* nos anos 80. Este último foi o primeiro pesquisador a trabalhar o conceito de origens desenvolvimentistas da saúde e da doença, ao associar o baixo peso ao nascer com a ocorrência de doenças relacionadas à síndrome metabólica no adulto como hipertensão e diabetes tipo II. Dessa forma, a hipótese de Barker foi formulada para indicar que a ação de fatores ambientais, às quais o organismo foi submetido durante período fetal e pós-natal - os estágios iniciais de vida - possivelmente pode programar efeitos tardios sobre diferentes funções corporais.

Neste contexto, o termo “programação metabólica” passou a ser bastante usado, nos últimos 20 anos, para descrever o processo através do qual os fatores ambientais - tais como os nutricionais - atuantes em períodos críticos de desenvolvimento, como suposto por Barker, podem desencadear modificações permanentes na fisiologia e no metabolismo do organismo. A aplicação de ferramentas “ômicas” na área da Nutrição tem permitido estudar as alterações biomoleculares que ocorrem em resposta a fatores nutricionais. Dentre estas, a proteômica pode ser utilizada para obtenção do perfil de proteínas presentes numa amostra biológica, possibilitando o entendimento do estado fisiológico do indivíduo em determinado momento.

Proteínas são consideradas moléculas biomarcadoras, que indicam alterações fisiológicas, podendo indicar a progressão e a predisposição do indivíduo a doenças. Diversas tecnologias têm sido usadas para descoberta de novos biomarcadores protéicos presentes em fluidos biológicos. O soro, por exemplo, é uma das fontes de biomarcadores mais estudadas, sendo constituído por proteínas clássicas (albumina, imunoglobulinas, proteínas de fase aguda) e não-clássicas ou transitórias (provenientes de lise celular ou secretadas), além de várias pequenas moléculas como sais, lipídeos, aminoácidos e açúcares. Em diversas situações, alterações na concentração dessas proteínas podem refletir o estado fisiológico de tecidos e órgãos.

A eletroforese bidimensional (2-DE), embora tenha sido introduzida por Klose e O’Farrel em 1975, ainda é considerada a técnica mais utilizada para separação, uma vez que permite a separação e a visualização de diversas proteínas presentes numa amostra ao mesmo tempo. A

combinação da espectrometria de massas – por exemplo, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-Flight* (MALDI-TOF-MS) - com a eletroforese bidimensional vem sendo rotineiramente empregada para análise de misturas complexas, proporcionando descoberta de novas proteínas ou a identificação das já conhecidas.

Recentemente, um sistema de eletroforese baseada em chip foi desenvolvido para análise de proteínas, RNA e DNA. Esta tecnologia, denominada *lab-on-a-chip*, possui muitas vantagens em relação aos métodos tradicionalmente utilizados para análise de biomoléculas, integrando as etapas de preparação, separação, detecção e análise das amostras em apenas um microchip (Agilent Technologies). Para análise de proteínas, as vantagens de sua utilização são: ampla faixa de detecção de peso molecular (5 a 250 kDa), detecção de até quatro ordens de magnitude, mínimo consumo de amostra – concentração de proteínas de pg/ $\mu$ L a  $\mu$ g/ $\mu$ L – e resultados gerados eletronicamente, sob a forma de gel e de eletroferograma.

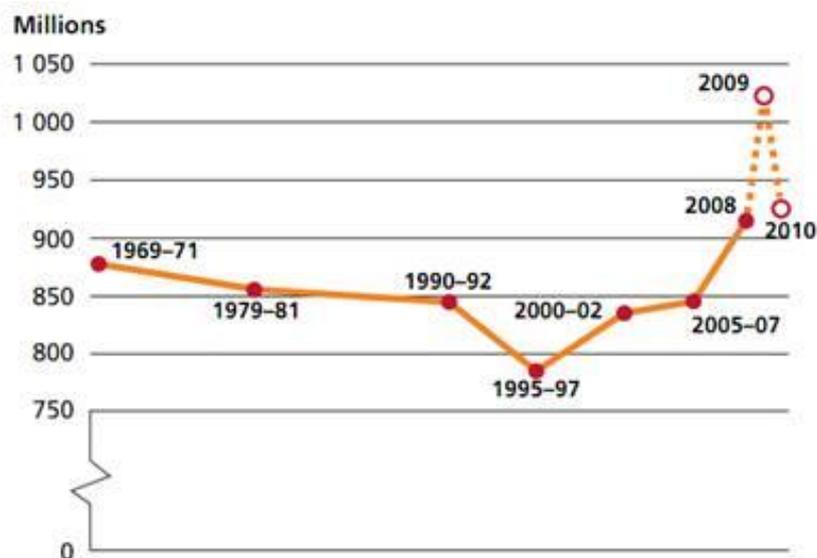
Tendo em vista a importância social e econômica do tema, este estudo objetivou avaliar os efeitos de um modelo de desnutrição protéica neonatal sobre o perfil de proteínas do soro sanguíneo de ratos adultos, através da aplicação de tecnologias de separação eletroforética, como *lab-on-a-chip* e eletroforese bidimensional, e de espectrometria de massas por MALDI-TOF.

# **Capítulo I**

## **Revisão da literatura**

## 1 Desnutrição

Desnutrição é um termo geral que indica a falta de alguns ou todos os elementos nutricionais necessários à saúde humana. De acordo com dados recentes da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o número de pessoas desnutridas no mundo foi de 925 milhões em 2010, maior do que o registrado antes da recente crise econômica de 2008-2009 (Figura 1). Em países de economia emergente, as formas de má nutrição constituem um problema grave de saúde pública, reunindo 98 % de pessoas desnutridas no mundo (FAO, 2010; MEDLINE PLUS, 2011).



**Figura 1:** Número de pessoas desnutridas no mundo 1969 a 2010. Fonte: FAO, 2010.

Entre os principais fatores responsáveis pela desnutrição em países emergentes, destacam-se a pobreza, instabilidade política e socioeconômica, condições sanitárias precárias, costumes alimentares e religiosos, hábitos de amamentação e eficácia dos programas voltados para nutrição. Apesar dos índices decrescentes, a desnutrição não se encontra erradicada na sociedade brasileira e ainda é considerada resultante de processos sociais de exploração, no qual o indivíduo submete-se a uma pauta dietética de baixo valor biológico (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2007).

Existem dois tipos básicos de desnutrição. A primeira e mais importante é a desnutrição energético-protéica que se caracteriza pela baixa ingestão de alimentos ricos em proteína e energia. É o tipo mais letal de desnutrição, sendo referida quando o problema da fome mundial é discutido. O segundo tipo refere-se à deficiência de micronutrientes, como vitaminas e minerais (WORLD HUNGER, 2010).

## 1.1 Dieta utilizada no presente estudo

Em pesquisas que visam entender a função ou efeitos da presença/ausência de determinado nutriente na dieta, é necessário o conhecimento exato da composição da dieta utilizada. No presente estudo, que tem como objetivo avaliar efeitos da desnutrição protéica durante período neonatal em ratos foi utilizada a formulação da dieta desenvolvida pelo *American Institute of Nutrition* em 1993 (AIN-93), designada como substituta da dieta AIN-76 (REEVES *et al.*, 1993a) (Tabela 1).

A dieta AIN-76 foi reformulada para a AIN-93 devido a problemas que foram descobertos ao longo de anos através de pesquisas experimentais. A formulação da nova dieta obedeceu alguns critérios como maior disponibilidade e menor custo dos ingredientes, composição consistente e reproduzível e ampla possibilidade de aplicações. Além disso, essa nova dieta é comercializada em duas versões: AIN-93G utilizada para animais que estão nas fases de crescimento e reprodução e AIN-93M para manutenção do animal na vida adulta (REEVES, 1997).

**Tabela 1:** Formulação da dieta AIN-93G para crescimento rápido de roedores quando a caseína é usada como fonte de proteína

<b>Ingrediente</b>	<b>AIN-93G</b>
	<i>g/Kg de dieta</i>
<b>Amido</b>	397,486
<b>Caseína (&gt;85 % de proteína)</b>	200,00
<b>Amido dextrinizado (90-94 % de tetrassacarídeos)</b>	132,00
<b>Sacarose</b>	100,00
<b>Óleo de soja (sem aditivos)</b>	70,00
<b>Fibra</b>	50,00
<b>Mix mineral (AIN-93G-Mix)</b>	35,00
<b>Mix de vitaminas (AIN-93-VX)</b>	10,00
<b>L-Cistina</b>	3,00
<b>Bitartarato de colina</b>	2,5
<b>tert-Butilhidroquinona (TBHQ), mg</b>	14,00

Fonte: Reeves, 1997 (modificado).

## 1.2 Programação nutricional do desenvolvimento

O conceito de que a saúde na idade adulta pode ser influenciada por processos de desenvolvimento ocorridos em estágios iniciais de vida é conhecido desde a época de Hipócrates. Em 1977, Forsdahl descobriu uma correlação geográfica entre taxas de mortalidade por doenças cardíacas entre os anos 1964-1967 e taxas de mortalidade infantil registradas 70 anos antes. O autor sugeriu que o crescimento da criança em áreas carentes causaria “danos permanentes” devido, provavelmente, a déficits nutricionais que resultariam em “vulnerabilidade em longo prazo” para um estilo de vida adulto de hábitos alimentares afluentes (excesso de alimentos ricos em gorduras) (HANSON; GLUCKMAN, 2007; FALL, 2009).

Nos anos 80, David J.P. Barker foi o primeiro pesquisador a trabalhar o conceito de origens desenvolvimentistas da saúde e da doença, ao sugerir que a nutrição deficiente em estágios iniciais de vida aumenta a susceptibilidade aos efeitos de uma dieta afluente. Estes autores também correlacionaram, posteriormente, a ocorrência de acidentes cerebrovasculares na década de 1970 ao aumento da mortalidade infantil nas seis décadas anteriores durante 1911 a 1914. Os trabalhos de Barker e colaboradores, de maneira geral, associavam o baixo peso ao nascer com a ocorrência de doenças relacionadas à síndrome metabólica no adulto (BARKER; OSMOND, 1986a; BARKER; OSMOND, 1987; GHEORGHE *et al.*, 2010; LIMA, 2011).

Estudos anteriores e muitos outros realizados até os dias atuais, baseados nos trabalhos de Barker e colaboradores, têm indicado que o baixo peso ao nascer não é determinado por variações genéticas, mas pelo ambiente prenatal. Além disso, o peso ao nascer e as taxas de crescimento nos dois ou três anos de vida são fortemente dependentes de influências ambientais e têm sido associados à ocorrência de hipertensão e diabetes tipo II no indivíduo adulto (DOVER, 2009).

A hipótese de Barker, portanto, evidencia que a ação de fatores ambientais, às quais o organismo foi submetido durante período fetal e pós-natal - os estágios iniciais de vida -, podem programar efeitos tardios sobre diferentes funções corporais. Esta condição pode influenciar de forma considerável a suscetibilidade a doenças que acometem o indivíduo na vida adulta, como diabetes tipo II, depressão, doenças cardiovasculares, osteoporose entre outras (KAJANTIE, 2008).

Nos últimos 20 anos, o termo programação (em inglês, *programming*) tem sido usado para descrever o processo através do qual a exposição a estímulos ambientais durante fases críticas do desenvolvimento desencadeia modificações permanentes na fisiologia e no metabolismo do organismo (LUCAS, 1991; LANGLEY-EVANS, 2009). Hipóteses atuais têm proposto que adaptações às condições maternas oferecidas ao filho influenciam a estrutura e função de órgãos e

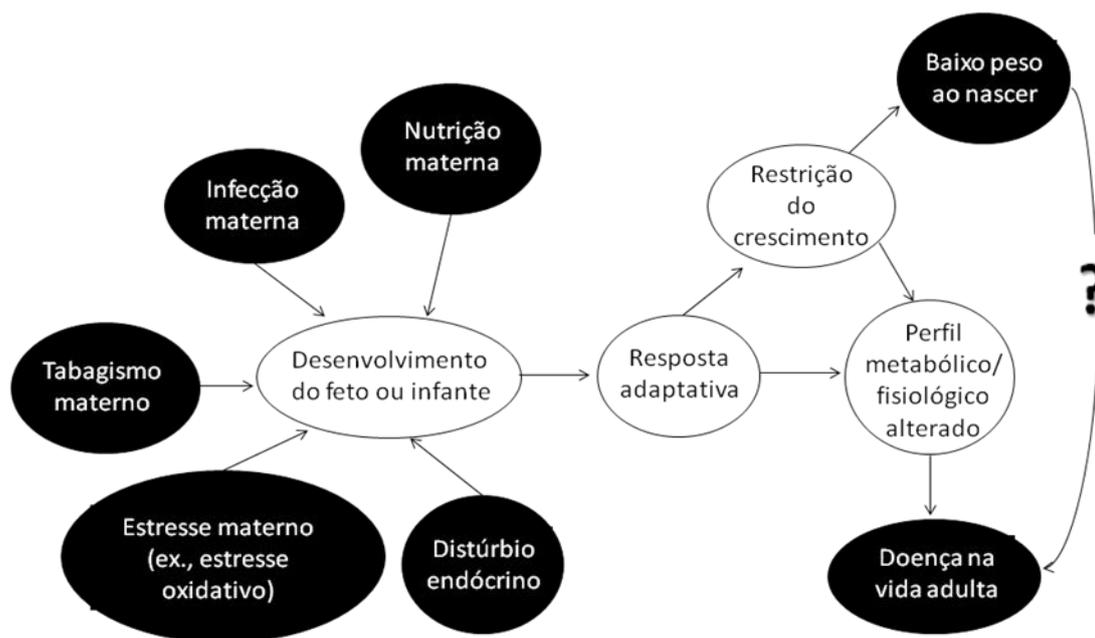
tecidos (SWANSON *et al.*, 2009). Acredita-se que este processo é decorrente da plasticidade presente em linhagens celulares durante os períodos críticos de desenvolvimento, que permitem a programação de sinais intracelulares, interações entre células e vias metabólicas (DOVER, 2009; LANGLEY-EVANS, 2009).

Um dos primeiros estudos que evidenciou este processo foi realizado por Arai e Gorski em 1968. Estes pesquisadores submeteram ratas, nos primeiros dias de vida, a tratamento com testosterona e perceberam que a função reprodutiva delas permaneceu alterada durante toda a vida adulta. Desta forma, perceberam que o contato com este hormônio numa fase crítica de desenvolvimento provocou remodelamento de regiões do hipotálamo que controlam o eixo reprodutivo e a formação do arquétipo feminino, resultando em efeitos androgênicos permanentes (ARAI; GORSKI, 1968).

Em humanos, um exemplo interessante ocorrido na época da Segunda Guerra Mundial demonstrou que a interação com o ambiente durante período pós-natal pode causar mudanças fisiológicas permanentes. Militares japoneses observaram que indivíduos nascidos em lugares de temperaturas mais elevadas eram mais bem adaptados a viver nestas regiões, do que aqueles nascidos em climas frios que apresentaram mais dificuldades para lidar com o calor. Esta observação levou à descoberta de que, logo nos primeiros dias de vida, a temperatura do ambiente determina o número de glândulas sudoríparas do indivíduo, o qual não pode ser alterado ao longo da vida (LANGLEY-EVANS, 2009).

A hipótese da programação é apoiada por vários estudos sobre programação nutricional em animais experimentais. Em ratos, a desnutrição protéica materna durante período de gestação provoca hipertensão arterial, resistência à insulina, arquitetura e função hepática alteradas no animal adulto. Durante lactação, a restrição de proteína na dieta pode programar o indivíduo para o sobrepeso. Em ratas lactantes, a desnutrição está associada à deficiência na produção de leite causada por hipoprolactinemia (FALL, 2009; LIMA *et al.*, 2011).

Em relação à suscetibilidade a doenças na vida adulta do indivíduo, esta pode ser decorrente da atuação de diversos fatores. Dentre estes, os mais estudados atualmente, causadores de mudanças fisiológicas, são toxinas (tabagismo), medicamentos (antidepressivos) e deficiências nutricionais (ácido fólico, proteínas entre outros) (SWANSON *et al.*, 2009). A Figura 2 esquematiza como estímulos ambientais adversos provenientes da mãe são sinalizados para o feto e/ou para o infante. (LANGLEY-EVANS, 2009).



**Figura 2:** Origem fetal/neonatal de doenças que acometem o indivíduo adulto e respostas adaptativas para assegurar a sobrevivência imediata. Fonte: Langley-Evans, 2009 (modificada).

A figura também destaca o papel central desempenhado pelo estado nutricional materno como um determinante do processo de programação. As condições prevalentes durante desenvolvimento fetal podem ser suficientemente severas provocando a morte do feto. Alternativamente, podem permitir que o feto lance mão de respostas adaptativas para assegurar sua sobrevivência imediata. Uma destas respostas pode ser um atraso no crescimento ou respostas específicas em órgãos e tecidos que modificarão a fisiologia, o metabolismo e a função dos mesmos (LANGLEY-EVANS, 2009).

Quando ocorrida nos primeiros anos de vida, a desnutrição pode gerar conseqüências severas para o organismo (BROWN; POLLITT, 1996), mas a intensidade dos efeitos depende do estágio de vida em que foi aplicada (WIDDOWSON; McCANCE, 1963 *apud* Alippi *et al.*, 2002). A subnutrição durante período fetal ou neonatal determina se o crescimento do indivíduo ocorrerá apenas parcialmente ou não (CHOW; LEE, 1964; McCANCE; WIDDOWSON, 1962; WINICK *et al.*, 1968; SASAKI *et al.*, 1982 *apud* ALIPPI *et al.*, 2002). De forma geral, os efeitos da desnutrição são mais intensos e permanentes quanto mais precocemente ocorrer a agressão e mais tarde for iniciada a reabilitação nutricional (GURMINI *et al.*, 2005).

Em seres humanos, o período crítico de desenvolvimento tem início no último trimestre de gestação e dura até os primeiros três ou quatro anos de vida pós-natal (DOBBING, 1968). Em ratos, o período de lactação ou aleitamento, que constitui as primeiras três semanas de vida pós-natal, é uma fase em que os sistemas orgânicos do animal encontram-se altamente vulneráveis a estímulos hostis (DOBBING; SANDS, 1971; MORGANE *et al.*, 1978; ROCHA-DE-MELO *et al.*, 2006) e

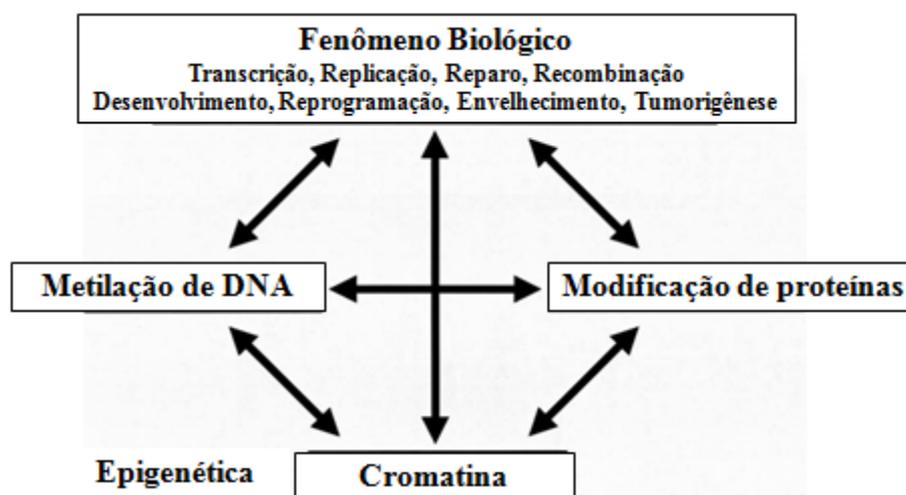
muitos eventos relacionados ao período crítico de desenvolvimento podem ocorrer (BARROS *et al.*, 2006).

Pesquisas recentes têm focado no estudo de como fatores atuantes em estágios iniciais de vida desempenham efeitos no indivíduo mesmo na ausência de sinais e sintomas evidentes para determinada doenças. Neste contexto, acredita-se que o desenvolvimento de doença no adulto é resultante de um longo período de processos patológicos precedentes (CAGAMPANG; POORE; HANSON, 2011).

### **1.3 Interação gene-nutriente e desenvolvimento da Nutrigenômica**

Com o término do sequenciamento do genoma humano, iniciaram-se novos estudos que se voltaram à elucidação das funções dos genes, bem como à caracterização de suas interações com fatores ambientais. Foi neste contexto que surgiu um novo conceito em nutrição, a nutrigenômica. Os estudos de nutrigenômica baseiam-se nas interações gene-nutriente, as quais podem ocorrer de duas formas distintas: 1<sup>a</sup>) refere-se aos nutrientes e compostos dos alimentos que exercem influência sobre o funcionamento do genoma; 2<sup>a</sup>) correspondem às variações no genoma que determinam a maneira pela qual o indivíduo responde à dieta (FIALHO; MORENO; ONG, 2008).

Nutrientes podem desempenhar efeitos moleculares que, dependendo de quais genes sejam afetados, serão benéficos ou não ao organismo. Nesse sentido, bastante interesse tem sido depositado na capacidade que os nutrientes têm de alterar a expressão, uma vez que podem atuar em diferentes alvos moleculares e modificar todas as etapas da expressão gênica (FIALHO; MORENO; ONG, 2008; KUSSMANN; RAYMOND; AFFOLTER, 2006). É sabido que processos epigenéticos – e.g., metilação de DNA e acetilação de histonas - estão envolvidos na diferenciação celular e que os epigenomas são estabelecidos em estágios iniciais do desenvolvimento, determinando a formação de tecidos e órgãos (SWANSON *et al.*, 2009) (Figura 3).



**Figura 3:** Visão geral dos mecanismos epigenéticos de regulação gênica e seus efeitos sobre fenômenos biológicos. Fonte: Nakao, 2001 (modificada).

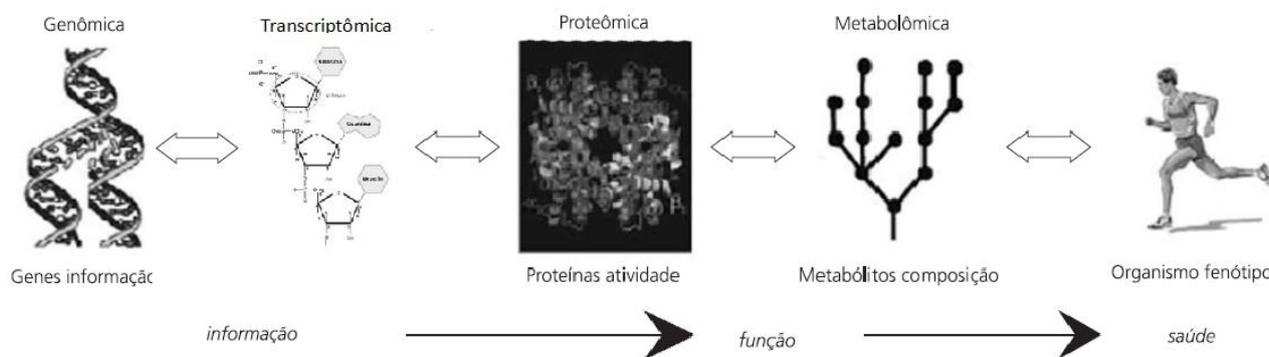
Durante períodos embrionário, fetal e pós-natal, a desnutrição pode modificar irreversivelmente a metilação do DNA. Desta forma, mesmo um breve período de nutrição deficiente pode alterar a expressão gênica por um longo período, podendo comprometer a fisiologia normal e o metabolismo (LANGLEY-EVANS, 2009). Em um dos primeiros estudos acerca do tema, Waterland e Jirtle (2003) demonstraram que fatores nutricionais atuantes durante período fetal são capazes de alterar a expressão de genes. A pesquisa, utilizando camundongos, estudou o *locus* Avy cuja super-expressão determina a cor amarelada da pelagem.

Os autores observaram que a super-expressão deste gene é devida à hipometilação de ilhas CpG, porém quando foram alimentados com ácido fólico, vitamina B12 e outros nutrientes, a taxa de metilação aumentou na ninhada. Este acontecimento resultou em maior quantidade de camundongos com pelagem de cor intermediária nascidos de mães que se alimentaram dos respectivos nutrientes (WATERLAND; JIRTLE, 2003).

Atualmente, diversas pesquisas têm relatado mudanças na expressão gênica devido a agressões nutricionais ocorridas nos períodos prenatal e pós-natal. Por exemplo, é sabido que a expressão gênica do receptor AT2 da angiotensina 2 é modificada em consequência da alimentação do feto com dieta hipoprotéica (McMULLEN; GARDNER; LANGLEY-EVANS, 2004). Estudos de *microarray* têm mostrado alterações na expressão de 102 genes hipotalâmicos e 36 renais devido à restrição protéica na dieta ofertada durante períodos críticos de desenvolvimento (LANGLEY-EVANS *et al.* 2005).

O surgimento da nutrigenômica, portanto, foi favorecido pelo desenvolvimento e aplicação de ferramentas de genômica funcional na área da nutrição, destacando-se a transcritômica, a proteômica e a metabolômica (Figura 4). Estas ferramentas estudam, respectivamente, o conjunto

de transcritos, proteínas e metabólitos que sofrem alterações constantes, em resposta a diferentes fatores ambientais, incluindo a alimentação. Uma maneira de se observar mudanças na expressão gênica é através da obtenção do perfil proteômico, ou seja, do proteoma, de uma amostra biológica específica (FIALHO; MORENO; ONG, 2008).



**Figura 4:** Ferramentas ômicas na nutrição e saúde. Genômica, proteômica e metabolômica integradas na Ciência da Nutrição e na promoção de saúde. Fonte: Fialho; Moreno; Ong, 2008.

## 2 Aplicação de técnicas proteômicas para análise de biomarcadores

A análise proteômica - identificação do conteúdo completo de proteínas de um tecido ou de uma preparação celular em determinado momento fisiológico - requer métodos confiáveis para a identificação de proteínas e de suas modificações. Desta forma, tem se tornado uma ferramenta indispensável para a realização de pesquisas biomédicas. Devido à sua alta sensibilidade e especificidade, constitui o método mais escolhido para identificação de proteínas e peptídeos presentes em amostras biológicas de diversas origens (MELEADY *et al.*, 2008).

### 2.1 Biomarcadores e o soro sanguíneo

Um biomarcador pode ser definido como uma molécula que indica uma alteração fisiológica, podendo fornecer evidências sobre susceptibilidade genética, progressão e predisposição a doenças, assim como resposta a medicamentos. Dessa forma, podem fornecer informações valiosas sobre diagnóstico e prognóstico de doenças, o que pode facilitar a medicina personalizada (ARDEKANI *et al.*, 2002; CARTER *et al.*, 2002; BISCHOFF *et al.*, 2004).

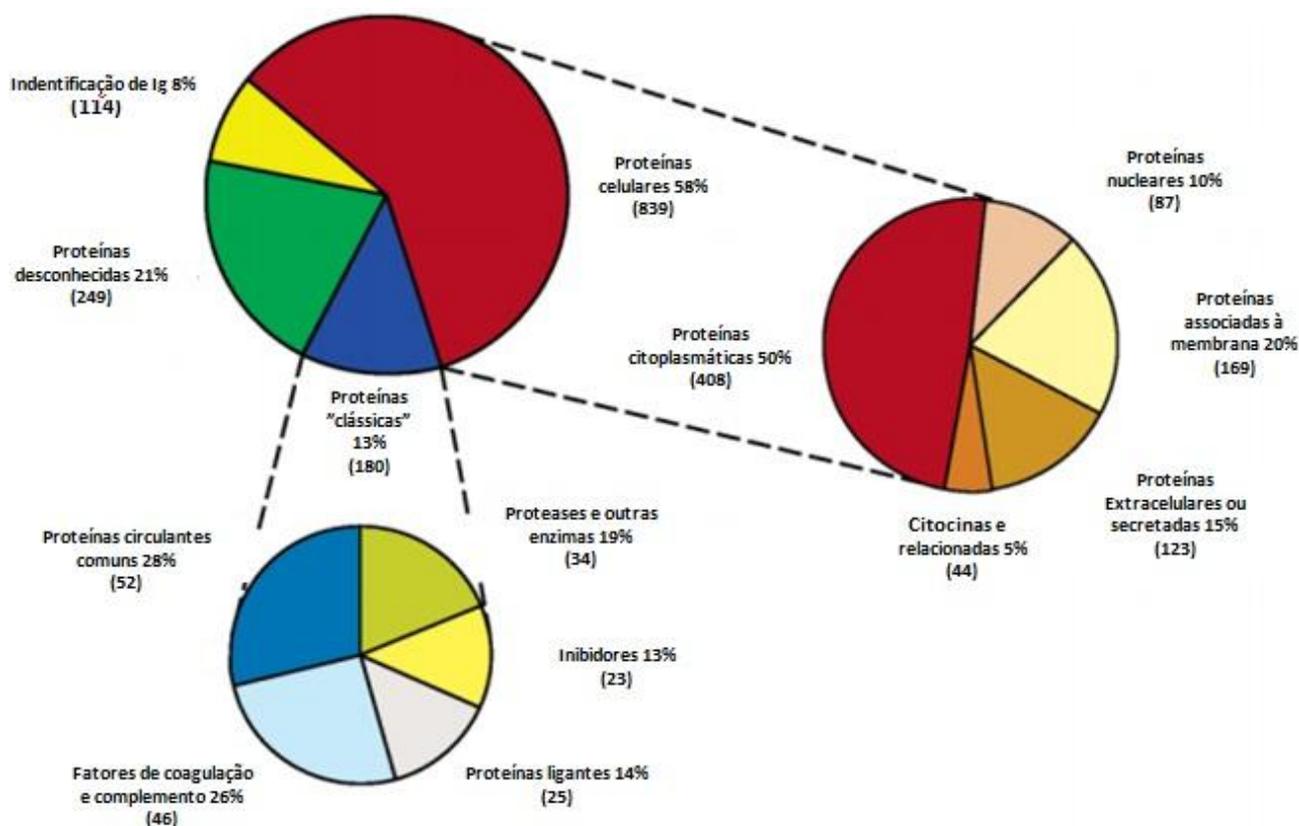
Nos últimos anos, muitas tecnologias têm sido usadas para descoberta de genes e proteínas que funcionem como novos biomarcadores (KOHNA *et al.*, 2007). Atualmente, bastante atenção tem sido destinada aos fluidos biológicos como novas fontes de biomarcadores. Os mais comumente usados são os fluidos cérebro-espinhal, a urina e o sangue (soro e plasma) (GOOD *et*

*al.*, 2007). Além da facilidade de obtenção e utilização de amostras provenientes do sangue em análises bioquímicas, variações protéicas no soro têm sido associadas a diferentes condições fisiológicas e patológicas (HAYNES *et al.*, 1998; ZHONG; TAYLOR; WHITTINGTON, 2010).

Alterações na concentração de proteínas séricas podem refletir o estado fisiológico de tecidos em diversas situações, como doenças, infecções, desnutrição, entre outras (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008). A correlação destas mudanças com o que está ocorrendo nas células e tecidos poderia indicar alvos protéicos úteis para o diagnóstico de doenças e monitoramento de seu tratamento (JACOBS *et al.*, 2005).

O soro é derivado do plasma e não contém fatores de coagulação. Possui cerca de 60-80 mg de proteínas/mL, incluindo combinações residuais e potencialmente detectáveis de todos os sub-proteomas do corpo, além de várias pequenas moléculas como sais, lipídeos, aminoácidos e açúcares (ADKINS *et al.*, 2002; JACOBS *et al.*, 2005). Os principais constituintes protéicos incluem albumina, imunoglobulinas, transferrina, haptoglobina e lipoproteínas. Cerca de 10.000 proteínas estão comumente presentes no soro, porém a maioria delas encontra-se em concentrações relativamente baixas (ADKINS *et al.*, 2002).

O proteoma do plasma/soro pode ser dividido em duas principais categorias: 1) inclui as proteínas consideradas “clássicas” cuja função depende de sua presença no plasma e 2) proteínas transtóricas, provenientes de lise de células ou secretadas cuja função não está diretamente atrelada a sua presença no plasma, o qual é utilizado como uma via de circulação/transporte (JACOBS *et al.*, 2005). A Figura 5 mostra o perfil global de constituição protéica do plasma/soro.



**Figura 5:** Constituição protéica global do plasma/soro de humanos. Fonte: Jacobs *et al.*, 2005 (modificada).

Proteínas de alta abundância – dentre as quais encontram-se as proteínas de fase aguda (GRUYS *et al.*, 2005) - estão classificadas na categoria “clássica”. Estas proteínas são muito bem caracterizadas e muitas têm sido utilizadas como indicadores de diagnóstico de várias condições e/ou doenças, por exemplo: Apo B100 como marcador de níveis de LDL, ferritina e transferrina como indicadores de deficiência de ferro e anemia e níveis elevados de mioglobina para diagnóstico de infarto do miocárdio (RIDKER, 2000; JACOBS *et al.*, 2005).

Proteínas de fase aguda são produzidas pelo fígado em resposta a processos de inflamação. De acordo com alterações em suas concentrações, são classificadas como positivas – quando há aumento - e negativas – quando há diminuição de concentração (Tabela 2). Dentre elas, a albumina é a proteína de maior abundância no soro de humanos. Desempenha a função de transporte e se liga a uma grande variedade de compostos incluindo hormônios, lipoproteínas e aminoácidos (BURTIS; ASHWOOD, 2001).

**Tabela 2:** Proteínas séricas de fase aguda negativas e positivas encontradas em humanos.

PROTEÍNA	MEIA-VIDA	FUNÇÃO	COMENTÁRIOS
Proteína Ligadora de Retinol (PLR)	12 horas	Transporte de vitamina A	Reduzida após disfunção hepatocelular; reduzida com dano tecidual extenso
Pré-Albumina	48 horas	Transporte de hormônios da tireóide e vitamina A (complexada com a PLR)	Reduzida após disfunção hepatocelular; reduzida com dano tecidual extenso
Albumina	15-19 horas	Manutenção da pressão osmótica; transporte de hormônios, ácidos graxos, drogas, bilirrubina, íons metálicos, fosfolípídeos	Aumenta na desidratação. Diminui na inflamação, doenças renais, hepáticas, má nutrição e edemas.
$\alpha$ 1-Antitripsina	4 dias	Inibidor de protease (especialmente elastase)	Aumenta em casos de inflamação aguda
$\alpha$ 1-Glicoproteína Ácida	5 dias	Função obscura; liga-se a drogas e hormônios	Aumenta principalmente na inflamação gastrointestinal.
Haptoglobina	2 dias	Liga-se à hemoglobina para preservação de ferro	Diminui em caso de hemólise. Aumenta com infecções, queimaduras.
$\alpha$ 2-Macroglobulina	5 dias	Inibidor de enzimas proteolíticas em geral	Responde lentamente à inflamação.
Ceruloplasmina	4-5 dias	Oxidante-antioxidante, transporte de cobre	Aumenta na inflamação e necrose tecidual.
Transferrina	7 dias	Transporte de ferro	Aumenta quando as reservas de ferro estão reduzidas. Reduzidas em condições de perda protéica e inflamação.
Fator de Complemento 3 (C3)	2 dias	Fator do sistema de complemento (ação inflamatória, eliminação de antígenos)	Respondem tardiamente à inflamação.
Fator de Complemento 4 (C4)	2 dias	Fator do sistema de complemento (ação inflamatória, eliminação de antígenos)	Respondem tardiamente à inflamação.
Proteína C Reativa (PCR)	13-16 horas	Defesa não-específica de agentes infecciosos; remoção de restos celulares	Respondem rapidamente à inflamação.

Fonte: Burtis; Ashwood; Bruns, 2008; Lazarim, 2009.

Imunoglobulinas também constituem proteínas abundantes no soro, possuem a função imunológica, reconhecendo antígenos no sangue e iniciando sua destruição pelo sistema de defesa. Para reconhecer a enorme variedade de antígenos presentes no sangue, as imunoglobulinas contêm regiões variáveis que são fontes de sequências peptídicas randomizadas (ADKINS *et al.*, 2002; ANDERSON; ANDERSON, 2002). Existem 5 isoformas de imunoglobulinas denominadas A, D, E, G e M com função e concentrações distintas, como mostrado no Tabela 3.

**Tabela 3:** Isoformas de imunoglobulinas.

Imunoglobulina	Função	Concentração (em relação ao total de imunoglobulinas)
A	Neutraliza vírus, enzimas e toxinas e ativa sistema de complemento	10 - 15 %
D	Receptor de superfície para o antígeno	1 %
E	Ativa reação alérgica	Traços
G	Principal anticorpo. Neutraliza vírus, bactérias e fungos.	70 - 75 %
M	Ativa o sistema de complemento e macrófagos	5 - 10 %

Fonte: Burtis; Ashwood; Bruns, 2008; Lazarim, 2009.

A segunda classe de proteínas é a maior e a partir da qual se originam as mais novas identificações proteômicas. Estão incluídos os hormônios, ligantes de receptores e citocinas que utilizam o plasma para transporte, localização e mediação de respostas celulares. Outras originam-se da lise celular devido a danos ou injúrias. Devido ao fluxo existente entre o fluido intersticial e o plasma circulante, também podem ser encontradas proteínas extracelulares, secretadas localmente e de membrana. Proteínas celulares localizadas exclusivamente no tecido vascular e nos componentes celulares circulantes do sangue - eritrócitos, linfócitos, monócitos, plaquetas etc. - podem estar presentes no soro (SCHWEITZER *et al.*, 2002). Adkins *et al.*, em 2002, identificou várias destas proteínas no soro de humanos (Tabela 4).

**Tabela 4:** Proteínas “não-clássicas” presentes no soro de humanos.

<b>Enzimas</b>	Proteína antioxidante 1, arginosuccinase, hexoquinase 3, hidrolase de folato 1, nicotinamida nucleotídeo transidrogenase, fosfodiesterase 5A, fosfoglicerato quinase 1, triacilglicerol lipase, metilmalonil coenzima A mutase, tioredoxina-peróxido dependente redutase
<b>Citocinas e hormônios</b>	Fator natriurético atrial, hormônio de crescimento humano, interleucina 12a, interferon (proteína 27 $\alpha$ -induzível), fator de crescimento de fibroblasto-12, antígeno próstata-específico, fator de crescimento/diferenciação 5
<b>Peptídeos derivados de proteínas canais e receptores</b>	Receptor de quimocina 1 (CX3C), receptor acoplado a proteína G 1, receptor do ácido $\gamma$ -aminobutírico B, receptor de prostaglandina (subtipo EP3), família de carreadores de soluto 5, receptor do fator de necrose tumoral, receptor para interleucina 2, integrina $\alpha$ (4, 8 e E)
<b>Outras proteínas (estruturais, nucleares, etc.)</b>	Queratina (1, 2 e 9), proteína associada a microtubo, syntaxina, elastina, quinase 5 MAP/ERK, colágenos (IV e XI), receptor do fator de crescimento de epiderme

Fonte: Adkins *et al.*, 2002 (modificada).

Em estudo realizado com ratos, Gianazza e colaboradores (1998) encontraram 34 proteínas homólogas as de humanos. Haynes *et al.* (1998) identificaram 56 *spots* principais correspondentes a 22 proteínas no padrão de eletroforese bidimensional de ratos machos adultos. Os autores também descreveram diferenças entre amostras de soro de ratos e humanos no que diz respeito à abundância relativa de proteínas individuais e à variação de parâmetros moleculares para proteínas homólogas.

## 2.2 Análise proteômica

Uma das técnicas utilizadas em análises proteômicas é a eletroforese bidimensional (2-DE), a qual permite separação e visualização de diversas proteínas ao mesmo tempo (ROHNER; STAAB; STOECKLI, 2005). Embora tenha sido introduzida por Klose e O'Farrell em 1975, a 2-DE ainda é considerada a técnica mais utilizada para separação de proteínas. Dessa forma, constitui uma ferramenta poderosa para separação de proteínas provenientes de misturas complexas, como células, tecidos e outras amostras biológicas. Tem sido um método crítico para o desenvolvimento

dos conhecimentos existentes atualmente sobre a complexidade e variedade de proteínas de células e fluidos biológicos (ADKINS *et al.*, 2002; KOSSOWSKA *et al.*, 2009).

Esta técnica permite a separação de proteínas combinando-se duas técnicas diferentes que constituem: 1) primeira dimensão ou focalização isoeétrica e 2) segunda dimensão ou eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). A focalização isoeétrica é o método que separa proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI) – i.e., valor específico de pH no qual a carga líquida da proteína é igual a zero. Proteínas apresentam-se positivamente carregadas quando o pH do meio é menor do que o pI e negativamente carregadas quando em pH acima dos valores de pI (GE HEALTHCARE, 2004).

A segunda dimensão consiste em um método eletroforético que separa polipeptídeos de acordo com o peso molecular (*molecular weights*, MW). O SDS (dodecil sulfato de sódio) é um detergente aniônico que se liga à proteína, formando um complexo negativamente carregado. Uma vez as proteínas submetidas à ação de um agente redutor (por exemplo, ditioneitol - DTT), previamente à formação do complexo, a separação no gel de poliacrilamida dependerá largamente do peso molecular do polipeptídeo. Dessa forma, quanto maior o MW de uma proteína, menor será a distância de migração no gel (GE HEALTHCARE, 2004).

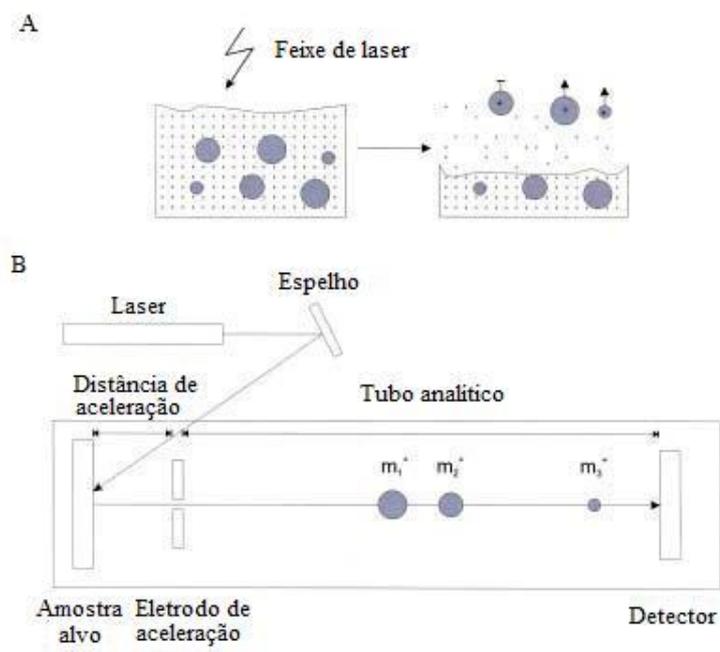
Desde seu surgimento na década de 70, a técnica de 2-DE tem sofrido diversos avanços que possibilitaram melhor resolução e reprodutibilidade dos géis (LIEBOLD; GRAACK; POHL, 2006). Por exemplo, a utilização de corantes fluorescentes neste tipo de método tem crescido bastante após o desenvolvimento da técnica de eletroforese bidimensional diferencial (*Two-dimensional differential gel electrophoresis* – 2D DIGE). Esta aplicação inovadora da 2-DE permite o processamento e comparação de três amostras em um único gel através da marcação das proteínas com três diferentes fluoróforos (Cy2, Cy3 e Cy5), aumentando a reprodutibilidade dos experimentos (CHROMY *et al.*, 2004; MARCUS *et al.*, 2009).

A combinação da espectrometria de massas com outras metodologias de separação, como eletroforese 2-D ou cromatografia líquida, vem sendo utilizada rotineiramente para investigar misturas complexas de proteínas após sua extração (AEBERSOLD; GOODLETT, 2001; JAMESDANIEL; SALVI; COLING, 2009), proporcionando a identificação de proteínas já conhecidas ou a descoberta de novas biomoléculas. Por conta disso, esta combinação de técnicas tem se tornado um padrão para análise e identificação de proteínas de amostras de tecidos, de cultura de células, entre outras (BONK; HUMENY, 2001), apesar de, inevitavelmente, as informações sobre a localização espacial destes componentes no tecido serem perdidas nesta abordagem (MINERVA *et al.*, 2008).

A Espectrometria de Massas por Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz - Tempo-de-Vôo (em inglês MALDI-TOF-MS, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* - Time-

*of-Flight Mass Spectrometry*) vem sendo amplamente utilizada para o esclarecimento de questões bioquímicas e moleculares relacionadas a sistemas biológicos. A utilização desta metodologia é bastante ampla, abrangendo desde estudos genômicos às análises químicas e estruturais de proteínas (BONK; HUMENY, 2001). Utilizando o tempo-de-vôo, polímeros com alto peso molecular (além de 1 MDa) podem ser analisados (NIELEN, 1999; AUBRY *et al.*, 2010).

Em um espectrômetro de massas – aparelho utilizado para medir a massa de átomos e moléculas – o analito percorre as três divisões básicas do aparelho, são elas o ionizador, o analisador e o detector. Na técnica de MALDI, por exemplo, o ionizador consiste em um feixe de laser que vai transferir sua energia às moléculas embebidas em matriz de ácidos orgânicos fracos, transformando o complexo molécula+matriz em gás ionizado. A composição da matriz interfere na ionização do complexo, facilita a desorção e previne a decomposição dos analitos. Após ionização e desorção, as moléculas serão analisadas pelo tempo de vôo. Por terem adquirido carga pós-ionização, são aceleradas em um campo elétrico e ganham uma energia cinética específica. As moléculas ionizadas “voam” por um tubo analítico, podendo-se, dessa forma, determinar com precisão a massa da molécula através da relação entre o tamanho do tubo e o tempo necessário para percorrê-lo. Por último, o detector capta os dados analisados, transferindo-os para o programa computacional do aparelho (Figura 6) (BONK; HUMENY, 2001; SOUZA, 2008).



**Figura 6:** A) Princípio de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz. B) Esquema de um espectrômetro de massas por MALDI-TOF. (Modificada de Bonk & Humeny, 2001).

Entre as técnicas analíticas atuais utilizadas na caracterização de polímeros sintéticos, a espectrometria de massas é de importância crescente (SMITH *et al.*, 1997). Métodos tradicionalmente considerados “clássicos”, como a cromatografia e a espectrometria de massas acoplada à eletroforese em gel de poliacrilamida, demonstram fortes restrições que limitam sua aplicação em análises bioquímicas modernas. Dentre essas restrições, merecem destaque: a) alta margem de erro que compromete a acurácia da técnica na determinação das massas; b) insuficiência ou ineficiência na separação de moléculas com propriedades similares (por exemplo, as isoenzimas); e c) trabalho exaustivo com alto consumo de tempo (BONK; HUMENY, 2001). Além de não possuir tais limitações, a espectrometria de massas por MALDI-TOF permite a obtenção, com simplicidade, de um espectro de massas sem muitas fragmentações, sendo ideal para análise de proteínas e peptídeos (NIELEN, 1999).

O método de identificação de proteínas por *peptide mass fingerprinting* (PMF) baseia-se na utilização uma mistura de peptídeos resultantes da digestão de uma proteína por enzima proteolítica (por exemplo, a tripsina). A digestão proteolítica é altamente específica, característica que possibilita a obtenção de um espectro de massa (em m/z) distinto para diferentes proteínas, sendo frequentemente possível identificar a proteína de interesse a partir desta informação (QUADRONI; JAMES, 2001). Para identificação da proteína a partir da espectrometria de massas, comparam-se os resultados obtidos com bancos de dados (por exemplo, SwissProt e NCBIInr) utilizando softwares de busca, como o Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) (PERKINS *et al.*, 1999).

Um exemplo de aplicação da técnica de MALDI-TOF-MS para análise proteômica de células-tronco, pode ser observado no trabalho realizado por Çelebi e Elçin (2009), no qual foram gerados mapas proteômicos das células-tronco mesenquimais de medula óssea indiferenciadas e submetidas a subcultivos. Dos quase 1000 *spots* detectados no gel de eletroforese 2-D, 106 foram selecionados e identificados por MALDI-TOF-MS. Alguns trabalhos têm empregado a análise proteômica de biomarcadores para obtenção de espectros de massas únicos que possibilitem a identificação de vírus e microrganismos, tais como bactérias, fungos e protistas em nível de espécie e subespécie (MOURA *et al.*, 2008).

Tal abordagem metodológica também tem sido utilizada para analisar a composição proteica de amostras biológicas complexas provenientes de fluidos corporais (soro, plasma ou urina, por exemplo), de tecidos e de células (lisados celulares) e seus compartimentos (MARKLEIN *et al.*, 2009; BAKRY *et al.*, 2011).

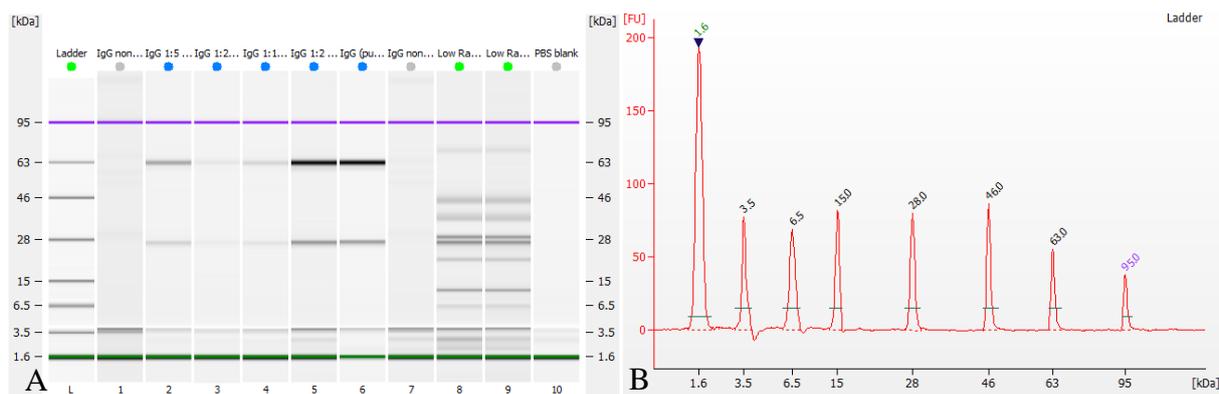
Recentemente, Maltan *et al.* (2009) utilizaram essa metodologia para determinação do perfil proteômico de biomarcadores em linhagem de células-tronco de carcinoma embrionário (TERA2.cl.SP12) indiferenciadas e submetidas, após sete dias de diferenciação, a diferentes tratamentos com ácido retinóico e seus análogos sintéticos. Os lisados celulares correspondentes a

cada amostra foram analisados e, como resultado, os autores obtiveram perfis proteômicos semelhantes aos observados em trabalhos anteriores, relacionados aos efeitos destes compostos sobre o processo de diferenciação da referida linhagem celular.

Apesar da importância incontestável da 2-DE para o desenvolvimento da proteômica, existem algumas desvantagens da técnica no que diz respeito a sua aplicação para busca de biomarcadores. A análise do soro sanguíneo, por exemplo, requer remoção ou separação das proteínas abundantes na amostra (concentração maior que mg/mL), pois sua presença interfere na identificação e quantificação de proteínas menos abundantes (concentração menor que ng/mL). Todavia, a depleção destas proteínas – como albumina e IgG – também remove outras que são potencialmente úteis como biomarcadores (por exemplo, proteína C-reativa, osteopontina entre outras) que estão presentes em concentrações na ordem de 7 a 8 vezes menor do que as mais abundantes no soro (GEORGIU; RICE; BAKER, 2001; ADKINS *et al.*, 2002).

Devido a isso, os limites de detecção dos métodos tradicionalmente utilizados em análises proteômicas tornam-se, muitas vezes, inadequados para permitir a detecção de proteínas pouco abundantes em amostras de soro. A determinação de mudanças nas concentrações, relativas ou absolutas, das proteínas é fundamental para descoberta de biomarcadores válidos (ADKINS *et al.*, 2002).

Recentemente, um sistema de eletroforese baseada em chip foi desenvolvido para análise de proteínas, RNA e DNA (PENG *et al.*, 2008). Esta tecnologia, denominada *lab-on-a-chip*, possui muitas vantagens em relação aos métodos tradicionalmente utilizados para análise de biomoléculas, integrando as etapas de preparação, separação, detecção e análise das amostras em apenas um microchip. Para proteínas, as vantagens de sua utilização são: ampla faixa de detecção de peso molecular (5 a 250 kDa), detecção de até quatro ordens de magnitude, mínimo consumo de amostra – concentração de proteínas de pg/μL a μg/μL – e resultados gerados eletronicamente, sob a forma de gel e de eletroferograma (Figuras 7A e 7B). As amostras podem ser analisadas por três diferentes kits, listados na Tabela 5.



**Figura 7:** Formas de visualização dos resultados obtidos no Bioanalyzer 2100 após separação eletroforética de proteínas: A) Resultado da corrida de 10 amostras em formato de gel; B) Resultado da corrida de uma das amostras em formato de eletroferograma.

**Tabela 5:** Características da eletroforese realizada pelo sistema *lab-on-chip* utilizando três diferentes ensaios para análise de proteínas (Agilent Technologies).

		Características				
		Faixa de peso molecular (MW)	Precisão de dimensionamento	Tempo de preparação da amostra	Tempo de corrida	Resolução
Ensaio*	Kit 80	5-80 kDa	<3 %	~10 min/10 amostras	~30 min	<10 % para proteínas de pesos moleculares maiores
	Kit 230	14-230 kDa		~45min/10amostras		
	Kit 250	10-250 kDa				

\* Kits para detecção de proteínas nas faixas de MW indicadas.

Fonte: Agilent Technologies.

# **Referências bibliográficas**

ADKINS, J.; VARNUM, S.; AUBERRY, K.; MOORE, R.; ANGELL, N.; SMITH, R.; SPRINGER, D.; POUNDS, J. Toward a Human Blood Serum Proteome. Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, p. 947–955, 2002.

AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D. R. Mass spectrometry in proteomics. **Chemical Reviews**, v. 101, p. 269–295, 2001.

ARAI, Y.; GORSKI, R. Critical exposure time for androgenization of the developing hypothalamus in the female rat. **Endocrinology**, v. 82, p. 1010–1014, 1968.

ARDEKANI, A. M.; LIOTTA, L. A.; PETRICOIN, I. I. I. EMANUEL, F. Clinical potential of proteomics in the diagnosis of ovarian cancer. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 2, p. 312-320(9), 2002.

AUBRY, S.; AUSSÉDAT, B.; DELAROCHE, D.; JIAO, C.; BOLBACH, G.; LAVIELLE, S.; CHASSAING, G.; SAGAN, S.; BURLINA, F. MALDI-TOF mass spectrometry: A powerful tool to study the internalization of cell-penetrating peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, p. 2182–2189, 2010.

BAKRY, R.; RAINER, M.; HUCK, C.; BONN, G. Protein Profiling for Cancer Biomarker Discovery using MALDI-MS and IRImaging. **Analytica Chimica Acta**, 2010.

BARKER, D. J.; OSMOND, C. Death rates from stroke in England and Wales predicted from past maternal mortality. **British Medical Journal**, v. 295, p. 83-86, 1987.

BARKER, D. J.; OSMOND, C. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the Second World War. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 40, p. 37-44, 1986a.

BARKER, D.J.; MARTYN, C.N.; OSMOND, C. Growth *in utero* and serum cholesterol concentrations in adult life. **British Medical Journal**, v. 11, p. 1524–1527, 1993.

BARROS, K. M. F. T.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; LOPES-DE-SOUZA, S.; MATOS, R.; DEIRÓ, T.; CABRAL-FILHO, J.; CANON, F. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 9, p. 99-104, 2006.

BISCHOFF, R.; LUIDER, T. M. Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers. **Journal of Chromatography B**, v. 803, p. 27–40, 2004.

BONK, T.; HUMENY, A. MALDI-TOF-MS Analysis of Protein and DNA. **Neuroscientist**, v. 7, p. 6 - 12, 2001.

BROWN, J. L.; POLLITT, E. Malnutrition, poverty and intellectual development. **Scientific American**, v. 2, p. 38-43, 1996.

BURTIS, C.; ASHWOOD, E.; BRUNS, D. **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry**. 6 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2008.

CAGAMPANG, F.; POORE, K.; HANSON, M. Developmental origins of the metabolic syndrome: Body clocks and stress responses. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, p. 214–220, 2011.

CARTER, D.; DOUGLASS, J. F.; CORNELLISON, C. D.; RETTER, M. W.; JOHNSON, J. C.; BENNINGTON, A. A.; FLEMING, T. P.; REED, S. G.; HOUGHTON, R. L.; DIAMOND, D. L.; VEDVICK, T. S. Purification and characterization of the mammaglobin/lipophilin b complex, a promising diagnostic marker for breast cancer. **Biochemistry**, v. 41, p. 6714–6722, 2002.

ÇELEBI, B.;ELÇİN, M. Y. Proteome Analysis of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Subcultures. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 2164–2172, 2009.

CHOW, B. F.; LEE, C. Effect of dietary restriction of pregnant rats on body weight gain of the offspring. **Journal of Nutrition**, v. 82, p. 10–18, 1964 *apud* ALIPPI, R. M. *et al.* Effect of protein-energy malnutrition in early life on the dimensions and bone quality of the adult rat mandible. **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 47-53, 2002.

CHROMY, B.; GONZALES, A.; PERKINS, J.; CHOI, M.; CORZETT, M.; CHANG, B.; CORZETT, C.; MCCUTCHEN-MALONEY, S. Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins. **Journal of Proteome Research**, v. 3, p. 1120-1127, 2004.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. *In*: DAVISON, A.N.; DOBBING, J. (Ed) **Applied Neurochemistry**, p. 287-316, 1968.

DOBBING, J.; SANDS, J. Vulnerability of developing brain: IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. **Biology of the Neonate**, v. 19, p. 363-378, 1971.

DOVER, G. J. The Barker Hypothesis: How Pediatricians Will diagnose and Prevent Common Adult-Onset Diseases. **Transactions of The American Clinical and Climatological Association**, v. 120, 2009.

FALL, C. Maternal nutrition: Effects on health in the next generation. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 130, p. 593-599, 2009.

FIALHO, E.; MORENO, F.; ONG, T. Nutrição no pós-genoma: fundamentos e aplicações de ferramentas ômicas. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 757-766, 2008.

GE HEALTHCARE. **2-D Electrophoresis Principles and Methods**. GE, 2004, 162p.

GEORGIU, H.; RICE, G.; BAKER, M. Proteomic analysis of human plasma: failure of centrifugal ultrafiltration to remove albumin and other high molecular weight proteins. **Proteomics**, v. 1, p. 1503–1506, 2001.

GHEORGHE, C. P.; GOYAL, R.; MITTAL, A.; LONGO, L. D. Gene expression in the placenta: maternal stress and epigenetic responses. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 54, p. 507-523, 2010.

GOOD, D. THONGBOONKERD, V. NOVAK, J. BASCANDS, J. SCHANSTRA, J. COON, J. DOMINICZAK, A. MISCHAK, H. Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 4549-4555, 2007.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.; NIEWOLD, T.; KOOPMANS, S. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University**, v. 6B, p. 1045-1056, 2005.

- GUO, C.; CHEN, P.; YEH, M.; HSIUNG, D.; WANG, C. Cu/Zn ratios are associated with nutritional status, oxidative stress, inflammation, and immune abnormalities in patients on peritoneal dialysis. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 275–280, 2011.
- GURMINI, J. *et al.* Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após lactação. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, p. 271-278, 2005.
- HAENEN, S.; VANOIRBEEK, J.; VOOGHT, V.; MAES, E.; SCHOOF, L.; NEMERY, B.; HOET, P.; CLYNEN, E. Proteome Analysis of Multiple Compartments in a Mouse Model of Chemical-Induced Asthma. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 5868–5876, 2010.
- HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. Biologia e manejo. *In*:\_\_\_\_\_. **Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1993. p. 8-56.
- HAYNES, P.; MILLER, I.; AEBERSOLD, R.; GEMEINER, M.; EBERINI, I.; LOVATI, M.; MANZONI, C.; VIGNATI, M.; GIANAZZA, E. Proteins of rat serum: I. establishing a reference two-dimensional electrophoresis map by immunodetection and microbore high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 19, p. 1484–1492, 1998.
- JACOBS, J.; ADKINS, J.; QIAN, W.; LIU, T.; SHEN, Y.; CAMP, D.; SMITH, R. Utilizing Human Blood Plasma for Proteomic Biomarker Discovery. **Journal of Proteome Research**, v. 4, p. 1073–1085, 2005.
- JAMESDANIEL, S.; SALVI, R.; COLING, D. Auditory proteomics: Methods, accomplishments and challenges. **Brain research**, v. 1277, p. 24-36, 2009.
- KAJANTIE, E. Early-life events. Effects on aging. **Hormones**, v. 7, p. 101-113, 2008.
- KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v. 26, p. 231-243, 1975.
- KOHNA, E.; AZAD, N.; ANNUNZIATA, C.; DHAMOONA, A.; WHITELEYA, G. Proteomics as a tool for biomarker Discovery. **Disease Markers**, v. 23, p. 411-417, 2007.
- KOSSOWSKA, B.; DUDKA, I.; GANCARZ, R.; ANTONOWICZ-JUCHNIEWICZ, J. Proteomic analysis of protein profiles in some pathological stages of the human organism. **Postepy Higieny Medycyny Doswiadczalnej**, v. 63, p. 549-563, 2009.
- KUSSMANN, M.; RAYMOND, F.; AFFOLTER, M. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. **Journal of Biotechnology**, v. 124, p. 758-787, 2006.
- LANGLEY-EVANS, S. Nutritional programming of disease: unraveling the mechanism. **Journal of Anatomy**, v. 36, p.36-51, 2009.
- LANGLEY-EVANS, S.; BELLINGER, L.; MCMULLEN, S. Animal models of programming: early life influences on appetite and feeding behaviour. *Maternal & Child Nutrition*, v. 3, p. 142-148, 2005.
- LANGLEY-EVANS, S.; MCMULLEN, S. Developmental origins of adult disease. **Medical Principles and Practice**, v. 19, p. 87-98, 2010.

- LAZARIM, F. L. **Análise proteômica de soro de ratos em diferentes situações de exercício e uma experiência de pesquisa em ensino**. 2009. 116 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- LIEBOLD, B.; GRAACK, H.; POHL, T. Two dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 6, p. 4688-4703, 2006.
- LIMA, N. S.; DE MOURA, E. G.; PASSOS, M. C. F.; NOGUEIRA NETO, J. F.; REIS, A. M.; OLIVEIRA, E.; LISBOA, P. C. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. **British Journal of Nutrition**, p. 1-9, 2011.
- LUCAS, A.; FEWTRELL, M. S.; COLE, T. J. Fetal origins of adult disease – the hypothesis revisited. **British Medical Journal**, v. 319, p. 245-249, 1999.
- MANN, A.; TIGHE, B. Tear analysis and lens–tear interactions Part I. Protein fingerprinting with microfluidic technology. **Contact Lens & Anterior Eye**, v. 30, p. 163-173, 2007.
- MANN, M.; JENSEN, O. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 255-261, 2003.
- MARCUS, K.; JOPPICH, C.; MAY, C.; PFEIFFER, K.; SITEK, B.; MEYER, H.; STUEHLER, K. High-resolution 2-DE. **Methods in Molecular Biology**, v. 519, p. 221-240, 2009.
- MARKLEIN, G.; JOSTEN, M.; KLANKE, U.; MÜLLER, E.; HORRÉ, R.; MAIER, T.; WENZEL, T.; KOSTRZEWA, T.; BIERBAUM, G.; HOERAUF, A.; SAHL, H. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 2912–2917, 2009.
- McCANCE, R. A.; WIDDOWSON, E. M. Nutrition and growth. **Proceedings of Royal Society**, v. 156, p. 326–337, 1962.
- McMULLEN, S.; GARDNER, D.; LANGLEY-EVANS, S. Prenatal programming of angiotensin II type 2 receptor expression in the rat. **The British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 133-140, 2004.
- MEDLINE PLUS. **Medical Encyclopedia**. Disponível em:  
<<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/encyclopedia.html>>. Acesso em: 14 de fev. 2011.
- MELEADY, P.; HENRY, M.; GAMMELL, P.; DOOLAN, P.; SINACORE, M.; MELVILLE, M.; FRANCUCCIO, L.; LEONARD, M.; CHARLEBOIS, T.; CLYNES, M. Proteomic profiling of CHO cells with enhanced rhBMP-2 productivity following co-expression of PACesol. **Proteomics**, v. 8, p. 2611–2624, 2008.
- MINERVA, L.; CLERENS, S.; BAGGERMAN, G.; ARCKENS, L. Direct profiling and identification of peptide expression differences in the pancreas of control and ob/ob mice by imaging mass spectrometry. **Proteomics**, v. 8, p. 3763–3774, 2008.
- MORGANE, P. J.; MILLER, M.; KEMPER, T.; STERN, W.; FORBES, W.; HALL, R.; BRONZINO, J.; KISSANE, J.; HAWRYLEWICZ, E.; RESNICK, E. The effects of protein

- malnutrition on the development central nervous system in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 2, p. 137-230, 1978.
- MOURA, H.; WOOLFITT, A.; CALVALHO, M.; PAVLOPULOS, A.; TEIXEIRA, L.; SATTEN, G.; BARR, J. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* isolates. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 53, p. 333-342, 2008.
- NAKAO, M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. **Gene**, v. 278, p. 25–31, 2001.
- NIELEN, M. W. F. Maldi time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 18, p. 309 - 344, 1999.
- O'FARREL, P. High resolution two-dimensional gel electrophoresis of proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.
- PENG, Y. PALLANDRE, A. TRAN, N. TAVERNA, M. Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods. **Electrophoresis**, v. 29, p. 157-178, 2008.
- PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequences databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, New York, v. 20, n. 18, p. 6551-6567, 1999.
- QUADRONI, M.; JAMES, P. Enhancing high-throughput proteome analysis: the impact of stable isotope labeling. In: PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. Bios Scientific Publishers Limited, p. 151-169, 2001.
- REEVES, P. Components of AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 838S-841S, 1997.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939–1951, 1993a.
- REMMERS, F.; FODOR, M.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake. **Physiology & Behavior**, v. 95, p. 208–215, 2008.
- RIDKER, P.; HENNEKENS, C.; BURING, J.; RIFAI, N.; ENGL. J. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, p. 836-843, 2000.
- ROCHA-DE-MELO, A. P.; CAVALCANTI, JDE B.; BARROS, A. S.; GUEDES, R. C. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutritional Neuroscience**, v. 9, p. 155-160, 2006.
- ROHNER, T. C.; STAAB, D.; STOECKLI, M. MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 177 – 185, 2005.

- SASAKI, A.; NAKAGAWA, I.; KAJIMOTO, M. Effect of protein malnutrition throughout gestation and lactation on growth, morbidity and life span of rat progenie. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 28, p. 543–555, 1982 *apud* ALIPPI, R. M. *et al.* Effect of protein-energy malnutrition in early life on the dimensions and bone quality of the adult rat mandible. **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 47-53, 2002.
- SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. **PLoS Medicine**, v. 4, p. 806-812, 2007.
- SCHWEITZER, B.; ROBERTS, S.; GRIMWADE, B.; SHAO, W.; WANG, M.; FU, Q.; SHU, Q.; LAROCHE, I.; ZHOU, Z.; TCHERNEV, V. T.; CHRISTIANSEN, J.; VELLECA, M.; KINGSMORE, S. F. Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 359-365, 2002.
- SHEN, Q.; XU, H.; WEI, L.; CHEN, J.; LIU, H. Intrauterine growth restriction and postnatal high-protein diet affect the kidneys in adult rats. **Nutrition**, v. 27, p. 364–371, 2011.
- SWANSON, J.; ENTRINGER, S.; BUSS, C.; WADHWA, P. Developmental Origins of Health and Disease: Environmental Exposures. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 27, p. 391–402, 2009.
- WATERLAND, R.; JIRTLE, R. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, p. 5293–5300, 2003.
- WIDDOWSON, E. M.; MCCANCE, R. A. The effect of finite periods of undernutrition at different ages on the composition and subsequent development of the rat. **Proceedings of Royal Society**, v. 158, p. 329–342, 1963 *apud* ALIPPI, R. M. *et al.* Effect of protein-energy malnutrition in early life on the dimensions and bone quality of the adult rat mandible. **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 47-53, 2002.
- WINICK, M.; FISH, I.; ROSSO, P. Cellular recovery in rat tissues after a brief period of neonatal malnutrition. **Journal of Nutrition**, v. 95, p. 623–626, 1968.
- WORLD HUNGER. **2011 World Hunger and Poverty Facts and Statistics**. Disponível em: <[http://www.worldhunger.org/articles/Learn/world %20hunger %20facts %202002.htm](http://www.worldhunger.org/articles/Learn/world%20hunger%20facts%202002.htm)>. Acesso em: 14 de fev. 2011.
- ZHONG, L.; TAYLOR, D.; WHITTINGTON, R. Proteomic profiling of ovine serum by SELDI-TOF MS: Optimisation, reproducibility and feasibility of biomarker discovery using routinely collected samples. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, p. 47-63, 2010.

# Objetivos

## **1 Geral**

Analisar o perfil proteômico do soro sanguíneo de ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal.

## **2 Específicos**

Para animais do grupo nutrido e desnutrido:

- Avaliar a evolução ponderal como indicador da eficácia do modelo de desnutrição neonatal;
- Obter o perfil proteômico monodimensional do soro sanguíneo;
- Obter o perfil proteômico bidimensional do soro sanguíneo;
- Determinar os espectros de massa de proteínas do soro.

# **Capítulo II**

## **Artigo**



## **Análise proteômica do soro sanguíneo de ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal**

Alice A. Bezerra<sup>a,d</sup>, Guilherme de O. Firmino<sup>d</sup>, Renata A. Rael<sup>d</sup>, Maria E. Chaves<sup>b,d</sup>, Danyelly Brunaska<sup>b,d</sup>, Célia Maria M. B. de Castro<sup>c,d</sup>, José Luiz de L. Filho<sup>b,d</sup>

<sup>a</sup> Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;

<sup>c</sup> Departamento Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;

<sup>d</sup> Laboratório de Imunopatologia de Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil;

*Autor para correspondência: José Luiz de L. Filho. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Fone: (+55) 81- 2126.8000, e-mail: joseluz60@gmail.com*

**Financiamento:** Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

**Palavras-chaves:** Desnutrição neonatal; Soro sanguíneo; Perfil proteômico; Eletroforese bidimensional; Tecnologia *lab-on-a-chip*

## Abstract

During neonatal period some environmental factors are responsible for the development of metabolic diseases in the adult animal. In order to evaluate the effects of neonatal protein malnutrition (NPM), this study aimed to obtain the blood serum proteomic profile of adult rats submitted to NPM. A total of 8 adult, male, Wistar rats were divided into 2 groups according to the diet received during the lactation period: nourished (NG) and malnourished (MG), consisting of pups whose mothers were fed with 17 % and 8 % casein-diet, respectively. Proteomic profile was assessed when the animal reached adulthood. Monodimensional electrophoresis was carried out by lab-on-a-chip technology using the Agilent Protein 80 and 230 kits and bidimensional electrophoresis analysis, occurred at 1<sup>st</sup> (pH 3-10) and 2<sup>nd</sup> dimensions (10 % polyacrylamide gels). MG animals showed body weight values lower than the NG ones from the 5<sup>th</sup> day of life and it remained until adulthood. Adult MD rats had lower amounts of molecular weight ranges detected in monodimensional profile and increased protein concentrations in the range 32.92 - 32.34 kDa. Apparent changes in the types and intensities of some spots were observed in bidimensional analysis. Therefore, NPM caused permanent loss of animal body weights and changes in the serum proteomic profiles of adult rats. These changes can be correlated to the development of metabolic diseases, although later studies are indispensable for the identification of such target proteins.

## 1. Introdução

As formas de má nutrição, resultantes de déficit ou excesso de nutrientes essenciais e de alto valor biológico, são consideradas um grave problema de saúde pública mundial. Dentre elas, a desnutrição caracteriza-se pela falta de elementos nutricionais na dieta como, por exemplo, proteínas, carboidratos e micronutrientes. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), 925 milhões de pessoas no mundo foram acometidas pela desnutrição energético-protéica em 2010, sendo 98 % residentes em países de economia emergente [1].

Evidências têm relatado que estímulos ambientais, durante o início da vida, podem ter um impacto fundamental no desenvolvimento, estrutura, função e tempo de vida de humanos e modelos animais [2]. Estudos epidemiológicos demonstram que a regulação individual do genoma, durante os períodos pré-natal e neonatal, pode ser amplamente modificada pelo ambiente nutricional (quantidade e composição de nutrientes) [3].

Quando estímulos ambientais agem durante fases críticas do desenvolvimento do indivíduo – durante crescimento intra-uterino ou vida pós-natal- são desencadeadas mudanças permanentes na fisiologia e no metabolismo do organismo [4]. Este fenômeno é denominado de programação metabólica [5]. Barker e colaboradores, na década de 80, foram os primeiros a sugerir que a nutrição a qual o indivíduo é submetido em fases críticas de desenvolvimento pode programar efeitos tardios sobre diferentes funções corporais. Esta condição pode influenciar de forma considerável a suscetibilidade a doenças que acometem o indivíduo na vida adulta, como diabetes tipo II, depressão, doenças cardiovasculares, osteoporose entre outras [2].

Apesar dos processos que conduzem a este desenvolvimento desordenado não estarem totalmente elucidados, sugere-se que a programação é um produto de expressão de genes chaves e de modificações epigenéticas, tais como a metilação do DNA ou acetilação das histonas [6,7].

Variações na expressão gênica podem ser observadas através do estudo do perfil proteômico de uma amostra biológica. A proteômica tem sido descrita como uma importante ferramenta para o estudo da expressão diferencial de proteínas, sua função, interações moleculares e estrutura, sendo de grande relevância para a descoberta de moléculas biomarcadoras [8,9]. O biomarcador é uma biomolécula cuja concentração ou característica físico-química indicam alterações fisiológicas, sendo útil para retratar estados de doença, infecção ou desnutrição [10]. A correlação destas mudanças com o que está ocorrendo nas células e tecidos pode indicar alvos protéicos úteis para o diagnóstico de doenças e monitoramento de seu tratamento [11].

Nos últimos anos, várias tecnologias têm sido usadas para a descoberta de genes e proteínas que funcionem como novos biomarcadores [9], sendo os fluidos biológicos, tais como o soro sanguíneo, as principais fontes de novos biomarcadores [12]. O soro é constituído por combinações residuais e potencialmente detectáveis de todos os sub-proteomas do corpo, além de várias pequenas moléculas como sais, lipídeos, aminoácidos e açúcares [11,13]. Os principais constituintes protéicos incluem albumina, imunoglobulinas, transferrina, haptoglobina e lipoproteínas. Cerca de 10.000 proteínas estão comumente presentes, porém a maioria delas encontra-se em concentrações relativamente baixas [13]. Nas últimas décadas, a combinação de técnicas proteômicas, como a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas, tem contribuído essencialmente para a descoberta de novas proteínas biomarcadoras. Recentemente, um sistema de eletroforese baseado em microchip foi desenvolvido para a análise de ácidos nucleicos e proteínas. Essa tecnologia denominada de *lab-on-a-chip* apresenta vantagens em relação a outros sistemas eletroforéticos, tais como utilização de pequeno volume da amostra, reduzido tempo de análise, maior qualidade de resultados e redução do custo do procedimento [14,15].

Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil das proteínas séricas de ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal, para a busca de possíveis biomarcadores que possam ser correlacionados com um possível desenvolvimento de patologias metabólicas no indivíduo adulto.

## **2. Métodos**

### **2.1 Local do estudo**

Esta pesquisa foi realizada nos setores de Microbiologia Clínica, Bioquímica e Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### **2.2 Considerações bioéticas**

Este estudo seguiu as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo iniciado após aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, sob o número de processo 23076.005556/2009-51.

### **2.3 Cuidado e manutenção dos animais em biotério**

Foram utilizados 8 ratos machos adultos, albinos, da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da UFPE. Os animais foram mantidos no biotério do LIKA, em gaiolas de propileno, translúcidas, com 18 cm de altura, a uma temperatura de  $22 \pm 2$  °C (60 % de umidade relativa do ar), em ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas e tiveram livre acesso à água e à ração.

### **2.4 Divisão dos grupos**

Os animais, provenientes do biotério do Departamento de Nutrição – UFPE, foram obtidos ainda recém-nascidos e divididos em dois grupos, totalizando 4 animais por grupo: Grupo Nutrido

(GN) constituído por filhotes que foram amamentados por mães submetidas à dieta normoprotéica (17 % de caseína, AIN-93G) (Rhooster®) durante o período de lactação, e o Grupo Desnutrido (GD) formado por filhotes cujas mães receberam dieta hipoprotéica (8 % de caseína, AIN-93G) durante o mesmo período. No período de reposição nutricional, a partir do 22º dia, os animais de ambos os grupos foram separados de suas mães e passaram a receber dieta padrão do biotério, normoprotéica (LABINA - Purina®).

## **2.5 Acompanhamento da evolução ponderal**

Durante período de aleitamento, do 1º ao 21º dia de vida, os animais foram pesados diariamente, objetivando-se acompanhar a evolução ponderal durante a manipulação nutricional. A partir do 22º dia de vida até o 90º dia - período pós-desmame -, o peso corporal dos animais foi obtido em dias alternados, tendo como finalidade o acompanhamento do crescimento somático durante período de reposição nutricional. As pesagens foram realizadas em balança eletrônica digital (sensibilidade de 0,01 g e capacidade para 1000 g).

## **2.6 Coleta do sangue e separação do soro**

Após anestesia com combinação de cloridratos de xilazina (23 µg/mL) e ketamina (116 µg/mL) na dose de 0,1 mL para cada 100 g de peso do animal, foi realizada toracotomia (Figura 8), posicionando-se o animal em decúbito dorsal sobre superfície plana e estéril e foi realizada a anti-sepsia da região torácica. Exposto o coração, cerca de 3 - 4 mL de sangue foram aspirados por punção cardíaca, utilizando-se seringa de 5 mL e agulha 0,70x25 22G1 (BD Biosciences).

Depois de desacoplar a agulha da extremidade da seringa, o volume sanguíneo coletado foi imediatamente transferido para tubo cônico de 15 mL, delicadamente, para evitar hemólise. Deixou-se coagular o sangue à temperatura ambiente por cerca de 15 a 30 minutos e, em seguida, foi

centrifugado a 1.680 g durante 10 min. A camada de soro separada (aproximadamente, 1,5 mL) foi completamente aspirada e transferida para tubos de 1,5 mL. Todas as amostras foram acondicionadas a -20 °C.

## **2.7 Eletroforese das proteínas pela tecnologia *lab-on-a-chip***

A tecnologia *lab-on-a-chip* foi utilizada neste trabalho para obter a separação eletroforética das proteínas presentes nos soros dos animais nutridos e desnutridos. Como o soro possui abundante quantidade de proteínas de diversos tamanhos, foram utilizados os kits Agilent Protein 80 (que detecta proteínas de 5 a 80 kDa) e o Agilent Protein 230 (para detecção de proteínas entre 14 e 230 kDa). Inicialmente, alíquotas foram diluídas na proporção 1:10 e todos os procedimentos descritos para a análise das amostras procederam-se de acordo com as instruções do fabricante, alterando-se apenas o tempo de desnaturação, que aumentou de 5 para 10 minutos a fim de garantir a completa /total desnaturação das proteínas.

Os resultados da leitura foram obtidos em, aproximadamente, 30 minutos. A fluorescência emitida foi detectada (670 –700 nm) e convertida em eletroferogramas individuais. As unidades de fluorescência (FU), demonstradas na ordenada do gráfico, correspondem à concentração da proteína na amostra. Na abscissa, está listado o tempo de migração em segundos (s).

Para análise dos dados, calculou-se a massa média das proteínas presentes na faixa de MW em dáltons, considerando os desvios padrões da média (intervalo de 1 a 2 %). Para a busca de prováveis proteínas que possuam peso molecular dentro da faixa detectada pelo Agilent Bioanalyzer 2100, foi utilizado o banco de dados da ferramenta TagIdent tool (<http://expasy.org/tools/tagident.html>) do Expert Protein Analysis System (ExPASy), servidor de proteômica desenvolvido pelo Swiss Institute of Bioinformatics. Em seguida, realizou-se a busca no banco de dados para a espécie *Rattus norvegicus* a partir da média das massas das proteínas considerando seu desvio-padrão (1,5 a 2 %).

## 2.8 Eletroforese bidimensional das proteínas do soro

### *Preparação das amostras: precipitação de proteínas e ressolubilização*

Para precipitação das proteínas, 50  $\mu$ L de soro foram transferidos para tubo de 1,5 mL, ao qual adicionou-se 200  $\mu$ L de acetona P.A. A mistura foi homogeneizada e as proteínas deixadas precipitar por, no mínimo, 2 horas a -20 °C. Após este período, foi centrifugado a 5.600 g por 10 minutos. O precipitado foi lavado com 50  $\mu$ L de PBS e, em seguida, adicionou-se mais 200  $\mu$ L de acetona P.A., deixando precipitar por mais 1 hora. As amostras foram novamente centrifugadas (5.600 g por 10 min), o sobrenadante descartado e o precipitado, deixado secar ao ar durante 10 min. As proteínas precipitadas foram ressolubilizadas em 200  $\mu$ L de uma solução contendo 7 M de uréia, 2 M de tiouréia e 2 % de CHAPS.

### *Eletroforese 1ª dimensão: focalização isoelétrica das proteínas*

Para a realização da eletroforese 1ª dimensão, 100  $\mu$ L da solução de proteínas em 7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 2 % de CHAPS foram adicionados a 2,8 mg de DTT, 2 % de IPG buffer, pH 3 - 10 e 1  $\mu$ L de uma solução a 1 % de bromofenol blue (BFB) em 50 mM TRIS e o volume final ajustado para 250  $\mu$ L utilizando solução estoque (7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 2 % de CHAPS). A mistura final de proteínas foi carregada diretamente nos géis de focalização para hidratação das fitas de 13 cm (Immobiline IPG strips – GE Healthcare). A focalização das proteínas ocorreu utilizando o equipamento Multiphor II (GE Healthcare) acoplado a um circulador termostático (GE Healthcare).

### *Eletroforese 2ª dimensão: SDS-PAGE das proteínas focalizadas*

A segunda dimensão foi realizada em géis de poliacrilamida 10 % conforme Laemmli (1970), cujos tamanhos foram de 255 x 196 x 1 mm. O sistema de eletroforese empregado foi o Hoefer SE600 (GE Healthcare).

### *Deteção das proteínas em géis bidimensionais e análise de imagem*

A deteção das proteínas resolvidas em 2D foi realizada pelo corante Azul de Coomassie (PlusOne™ PhastGel R-350) em modo de análise. As imagens dos géis bidimensionais foram captadas em fotodocumentador L-Pix Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia) e digitalizadas. Os géis foram comparados e os *spots* referentes às proteína tiveram seus atributos determinados com o emprego do ImageMaster™ 2D Platinum Software (GE Healthcare).

### *Transferência, isolamento e digestão das proteínas separadas por 2-D*

Os *spots* de proteínas separadas em 2-DE/SDS-PAGE que apresentaram expressão diferenciada ou intensidades aumentadas ou diminuídas em relação ao controle, identificados pelo programa de análise, foram extraídos do gel e transferidos para microtubos de 1,5ml. Foi adicionado um volume de solução descorante contendo (1:1) 25mM de bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) e acetonitrila (ACN) 100 % e os *spots* deixados descolorirem *overnight*.

Depois de retirado o corante, os *plugs* de géis foram desidratados em ACN 100 % durante 30 min e secados em SpeedVac (operado para solventes voláteis). Os *plugs* foram re-hidratados com uma solução de 20µg/ml de tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade - Promega, Madison WI) em 25mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e incubados primeiramente a 4°C por 10 min e, posteriormente, a 37°C durante 16 - 18h. Então, 100µL de solução contendo 50 % de ACN : 5 % de

ácido trifluoroacético (TFA) foram adicionados para promover a extração dos peptídeos durante 1h, com auxílio de vórtex. O sobrenadante foi aspirado, transferido para novo tubo e secado em SpeedVac (operado para solventes voláteis).

### *Identificação de proteínas por espectrometria de massa*

Após digestão *in situ* das proteínas com tripsina e extração dos peptídeos, as amostras foram ressuspendidas em 50 $\mu$ L de solução 50 % ACN : 0,1 % TFA e, em seguida, misturadas 1:1 com uma suspensão da matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidoxi-cinâmico (HCCA) em acetonitrila, contendo 0,1 % de TFA. Um volume de 0,4 $\mu$ L desta mistura foi aplicados nas lâminas alvos do aparelho e deixados secar ao ar por, no mínimo, 1hora. Os espectros de *peptide mass fingerprinting* (PMFs) foram obtidos no MALDI-TOF MS (Ettan MALDI-ToF Pro - GE Healthcare), em modo positivo, usando uma aceleração de 20 kV. Desorção e ionização das amostras foram executadas com um laser de nitrogênio ( $\lambda = 337$  nm), 200 *shots* por espectro.

Os espectros de PMF foram coletados no intervalo de 1000-3000 m/z, através dos métodos de aquisição *Full length protein* e de processamento de espectro *Protein digest, trypsin*. A lista de picos foi gerada utilizando o *software* Ettan MALDI-TOF Pro Evaluation Module (versão 2.0), sendo selecionados os valores de m/z monoisotópicos.

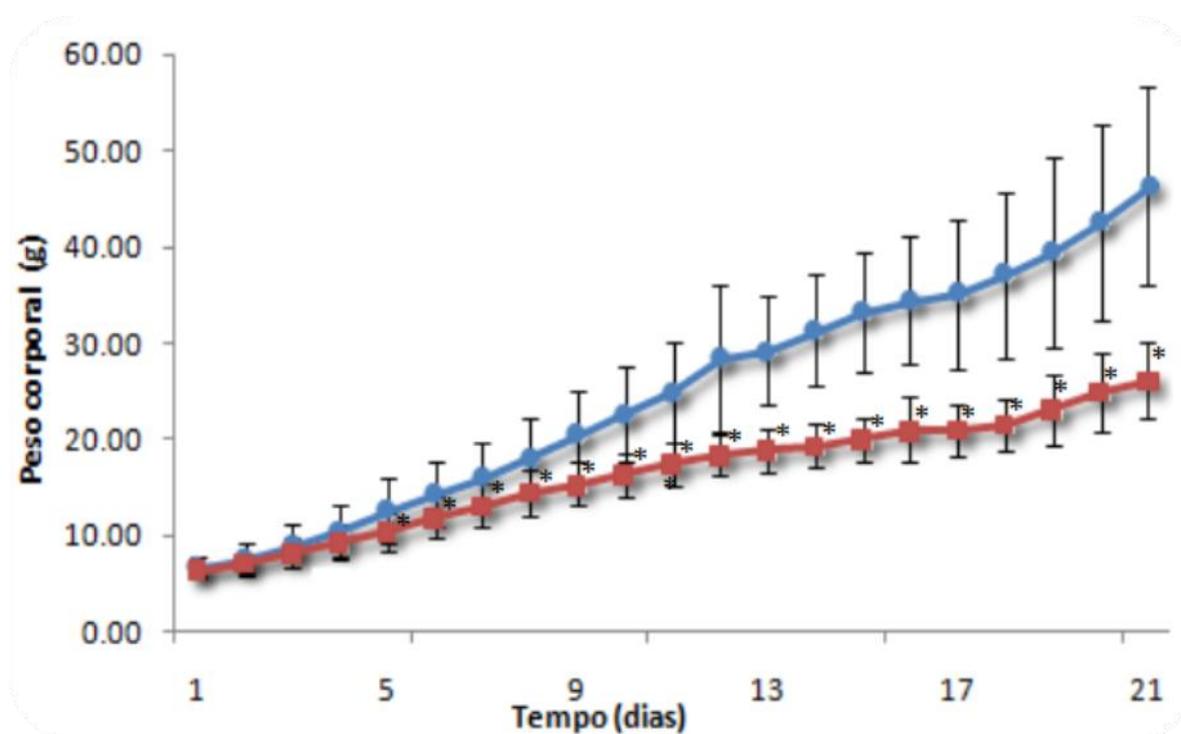
## **2.9 Análise estatística**

Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados possuíam um padrão de distribuição normal. Dados paramétricos e não paramétricos (médias e medianas) foram analisados pelos testes t-Student e Mann-Whitney, respectivamente. O nível de significância considerado foi de 5 %, sendo todas as análises realizadas utilizando-se o *software* Prism 4 para Windows (GraphPad Prism®).

### 3. Resultados

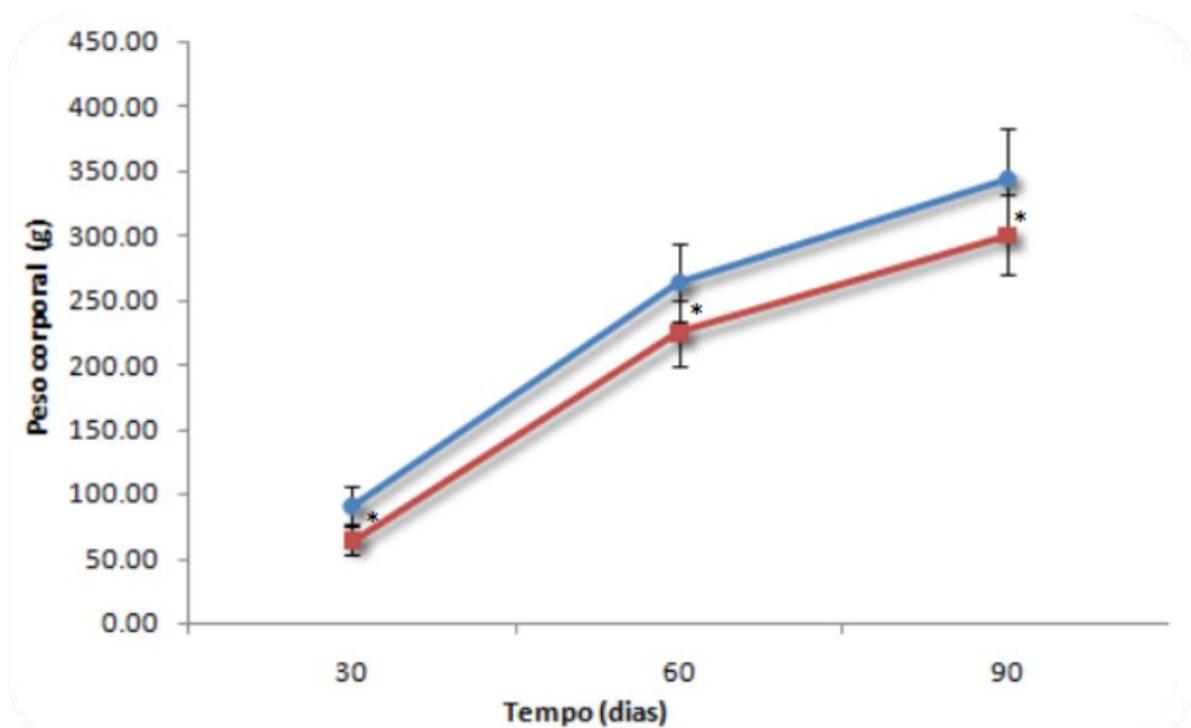
#### 5.1 Evolução ponderal

No período de aleitamento, o peso corporal dos animais do grupo nutrido (GN) foi significativamente maior que o dos animais grupo desnutrido (GD) a partir do quinto dia de vida (GN:  $12,55 \pm 3,35g$  e GD:  $10,41 \pm 2,03g$ ,  $p=0,0262$ ). Esta condição permaneceu até o 21º dia (GN:  $46,31 \pm 10,36g$  e GD:  $26,15 \pm 3,89g$ ,  $p < 0,0001$ ), sendo o peso dos animais nutridos sempre maior que o dos desnutridos (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Acompanhamento da evolução ponderal dos grupos de ratos nutrido (em azul) e desnutrido (em vermelho) durante o período de aleitamento. Teste *t* de Student, média±desvio padrão. \*  $p < 0,05$ .

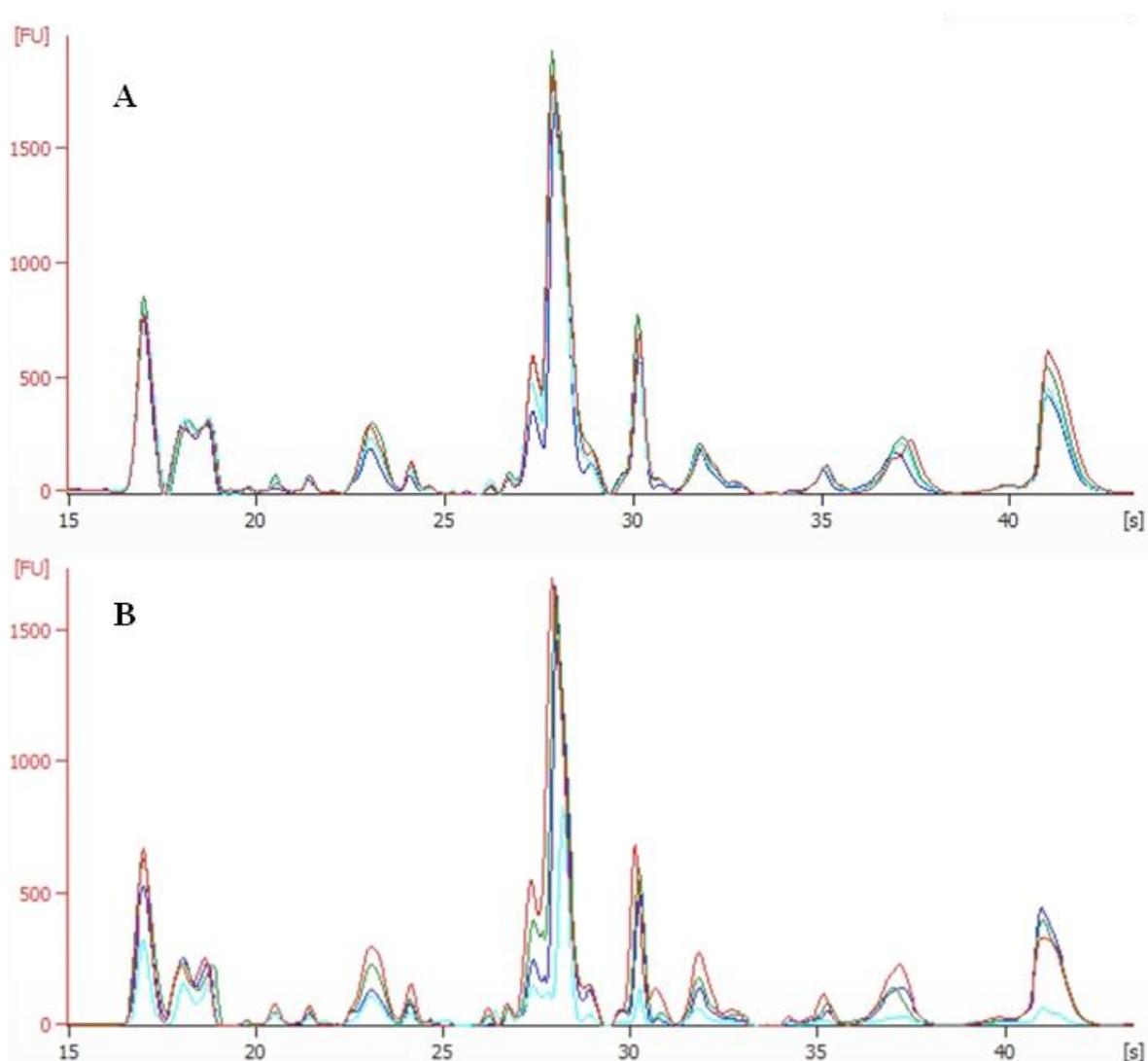
No decorrer do período de reposição nutricional, do 22º até o dia do sacrifício do animal na idade adulta, os pesos dos animais GN mantiveram-se maiores do que os dos animais GD. Do 30º (GN: 90,5337±14,44g e GD: 64,5235±10,72g,  $p < 0,0001$ ) ao 90º (GN: 344,8216±344,82g e GD: 300,9065±30,24g,  $p < 0,0007$ ) dia de vida, a diferença entre os valores permaneceu significativa (Gráfico 2).



**Gráfico 2.** Acompanhamento da evolução ponderal dos grupos nutrido (em azul) e desnutrido (em vermelho) durante o período pós-desmame. Teste *t* de Student, média±desvio padrão.\*  $p < 0,05$

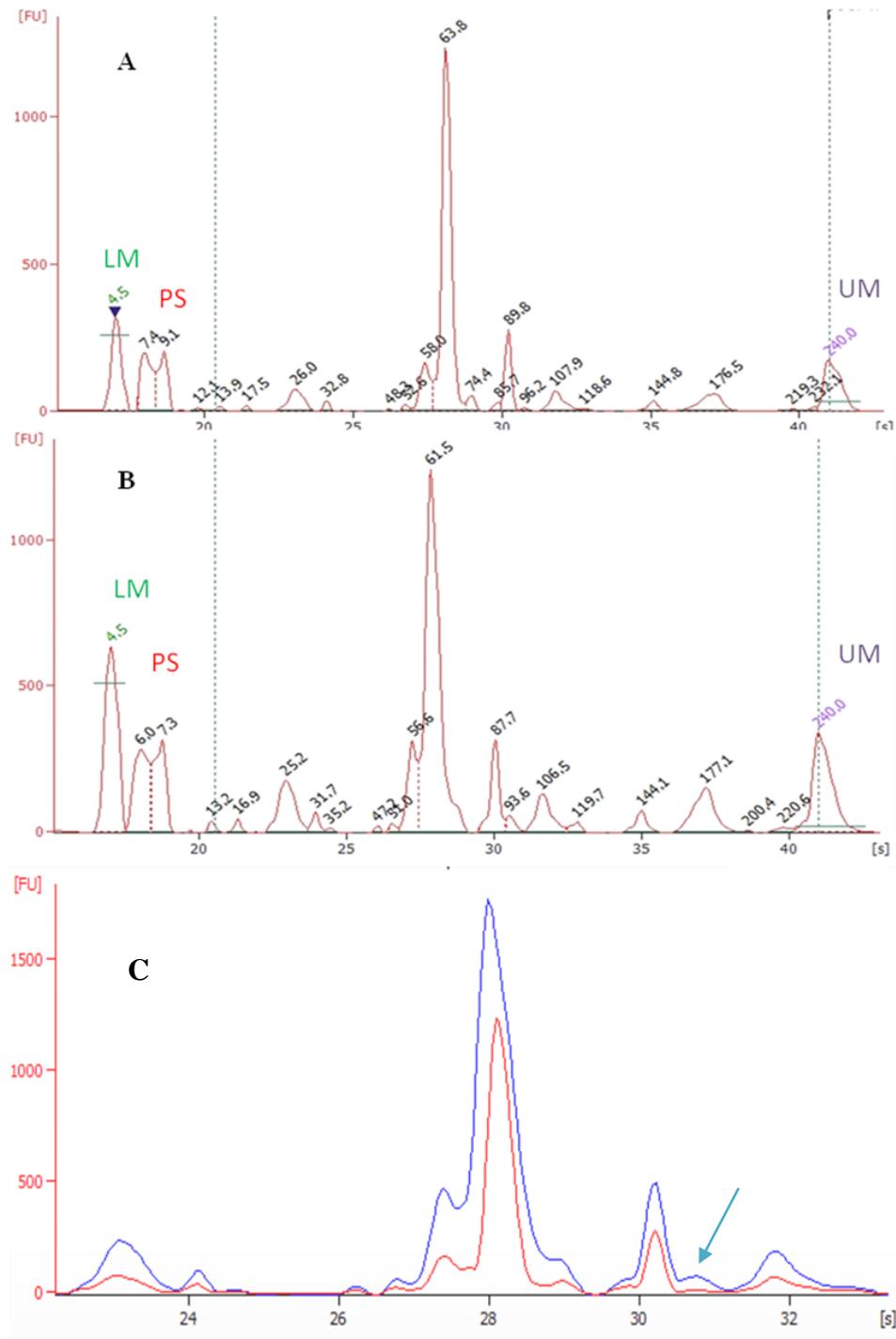
## 5.2 Perfil proteômico monodimensional do soro

Na análise individual das proteínas do soro, através do sistema *lab-on-chip*, foram detectados 23 picos de fluorescência em média para ambos os grupos. O padrão de perfis gerados em todas as amostras - individuais e em *pool* – foi sempre semelhante para todos os animais GN e GD, assim como para todas as repetições do *pool* (Figuras 1e 2). No entanto, animais GD demonstraram maior variação entre as proteínas expressas na intensidade de fluorescência [FU] de alguns picos quando comparado aos GN. As Figuras 1A e 1B mostram a sobreposição dos eletroferogramas correspondentes a todos os animais de GN e de GD, respectivamente.



**Figura 1:** Sobreposição dos eletroferogramas gerados no Agilent Bioanalyzer 2100 referente ao perfil protéico de amostras de soro individuais: A) ratos nutridos (n=4); B) ratos desnutridos (n=4). [FU]: unidades de fluorescência; [s]: tempo de migração em segundos.

A Figura 2 mostra os perfis de eletroferogramas obtidos para amostras de *pool* dos animais GN e GD (Figuras 2A e 2B, respectivamente). Podem-se observar também diferenças na intensidade de fluorescência de alguns picos, alguns deles sendo mais intensos nos animais GD (Figura 2C).



**Figura 2:** Eletroferogramas referentes às amostras de soro em *pool*: A) grupo nutrido (n=4); B) grupo desnutridos (n=4); C) sobreposição dos perfis de *pool* de animais nutridos (linha vermelha) e desnutridos (linha azul). Os números acima de cada pico indicam os pesos moleculares em kDa. LM: marcador interno inferior; PS: pico do sistema; UM: marcador interno superior. [FU]: unidades de fluorescência; [s]: tempo de migração em segundos.

De todas as 6 repetições das amostras em *pool*, foram selecionados os picos comuns para ambos os grupos. Como observado na Tabela 1, foram registradas dezoito faixas de massa moleculares em comum. As respectivas concentrações foram listadas e analisadas estatisticamente. Apenas as medianas das concentrações da faixa de massa molecular 32,92 – 32,34 kDa apresentaram diferença significativa (GN: 6,3 ng/μL e GD: 7,45 ng/μL, p=0,041). A Tabela 2 lista valores de pesos moleculares encontrados apenas em amostras de *pool* de animais nutridos.

**Tabela 1:** Concentrações médias dos picos comuns aos animais dos grupos nutrido e desnutrido, detectados nas amostras do *pool* de soro.

Peso molecular médio±DP (kDa)	Concentração média±DP (mediana) (ng/μL)		Valor de <i>p</i>
	Nutrido	Desnutrido	
13,73±0,15 - 13,88±0,15	2,333±1,069 (2,1)	5,05±3,438 (3,8)	0,229
17,25±0,24 - 17,4±0,32	3,35±0,6626 (3,45)	3,917±1,42 (3,85)	0,397
25,85±0,19 - 25,95±0,13	39,9±2,267 (39,1)	53,82±15,68 (48,35)	0,057
32,65±0,31 - 32,75±0,17	6,183±0,621 (6,3)	8,45±3,047 (7,45)	0,041*
36,20±0,28 - 36,60±0,0	0,4333±0,1155 (0,5)	0,5333±0,5774 (0,2)	0,700
48,40±0,36 - 48,60±0,32	0,7333±0,1155 (0,8)	1,52±1,244 (0,9)	0,143
52,53±0,30 - 52,73±0,34	2,35±0,774 (2,1)	4,433±3,615 (3,0)	0,198
57,88±0,17 - 57,95±0,37	45,92±3,952 (47,1)	51,32±14,93 (45,95)	0,412
63,15±0,82 - 63,33±0,54	273,6±41,34 (255,5)	325,2±158,9 (266,3)	0,937
74,10±0,00 - 74,50±0,17	10,97±1,012 (11,5) <sup>(A)</sup>	9,75±0,7778 (9,75) <sup>(C)</sup>	N,A, <sup>(D)</sup>
85,47±0,25 - 85,75±0,35	4,667±0,2517 (4,7) <sup>(A)</sup>	3,2±0,2828 (3,2) <sup>(C)</sup>	N,A, <sup>(D)</sup>
89,85±0,42 - 90,00±0,28	47,58±1,42 (47,7)	43,05±13,26 (38,55)	0,065
96,20±0,00 - 96,37±0,25	1,7 <sup>(B)</sup>	6,25±0,5508 (6,2)	N,A, <sup>(D)</sup>
108,55±0,25 - 108,58±0,65	23,78±2,271 (24,55)	24,75±4,152 (25,2)	0,628
120,57±1,72 - 121,70±0,28	3,64±1,787 (2,6)	5,05±2,235 (4,7)	0,286
145,53±0,84 - 145,68±0,38	8,067±1,025 (8,1)	8,633±1,61 (8,55)	0,484
176,70±0,65 - 177,28±2,25	29,4±2,328 (28,9)	30,47±2,823 (30,4)	0,492
222,38±1,61 - 222,40±0,94	2,45±0,862 (2,3)	2,333±1,093 (1,85)	0,842

\*: p<0,05, Teste U de Mann-Whitney.

<sup>(A)</sup>: Pico detectado em apenas três repetições

<sup>(B)</sup>: Pico detectado em apenas uma das seis repetições.

<sup>(C)</sup>: Pico detectado em apenas duas repetições

<sup>(D)</sup>: Não analisado.

**Tabela 2:** Valores dos picos detectados apenas em amostras do *pool* de animais do grupo nutrido.

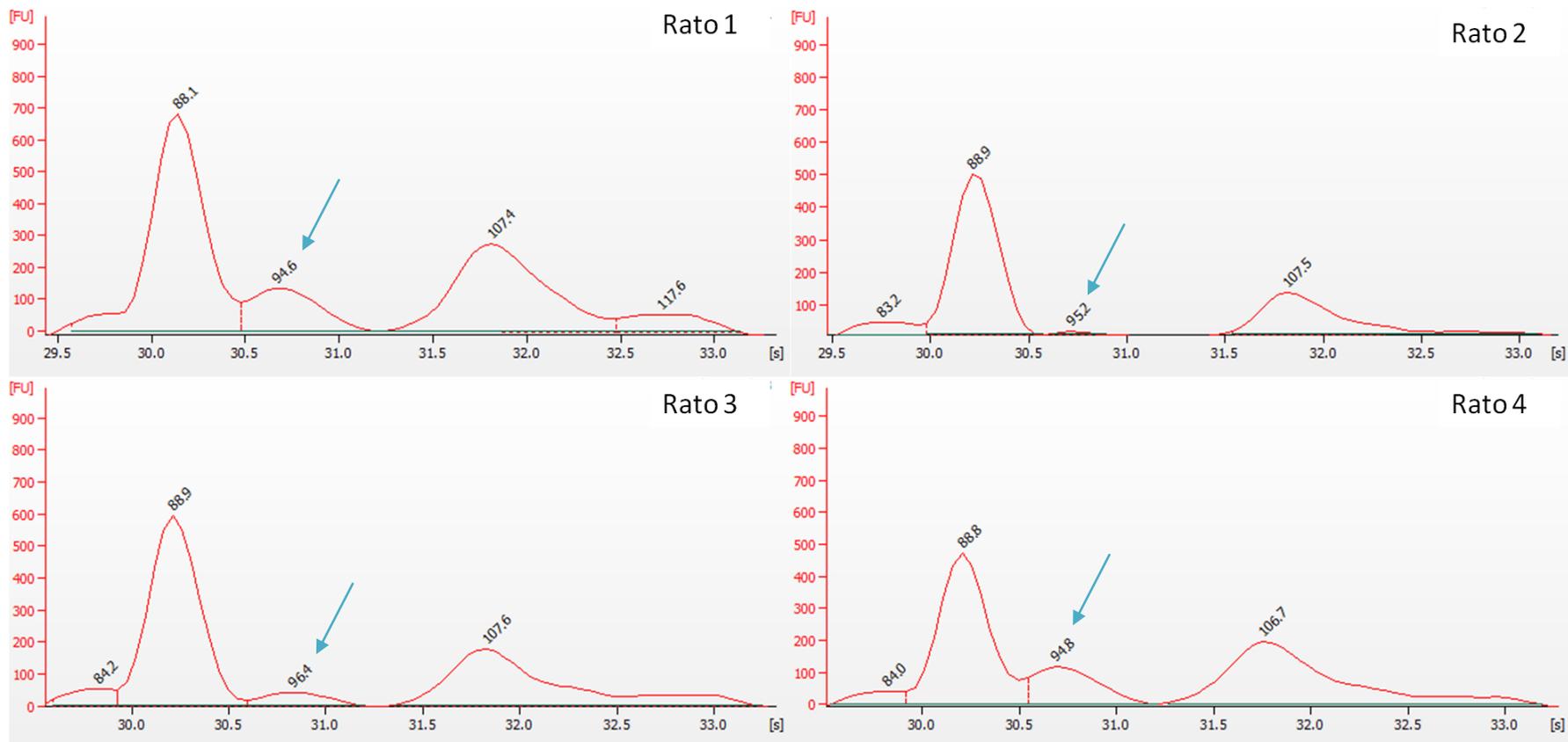
Massa molecular médio±DP (kDa)	Concentração média±DP (mediana) (ng/μL)
212,80 <sup>(A)</sup>	0,20 (0,20)
232,50±0,57 <sup>(B)</sup>	2,25±0,49 (2,25)

<sup>(A)</sup>: Pico detectado em apenas uma das seis repetições.

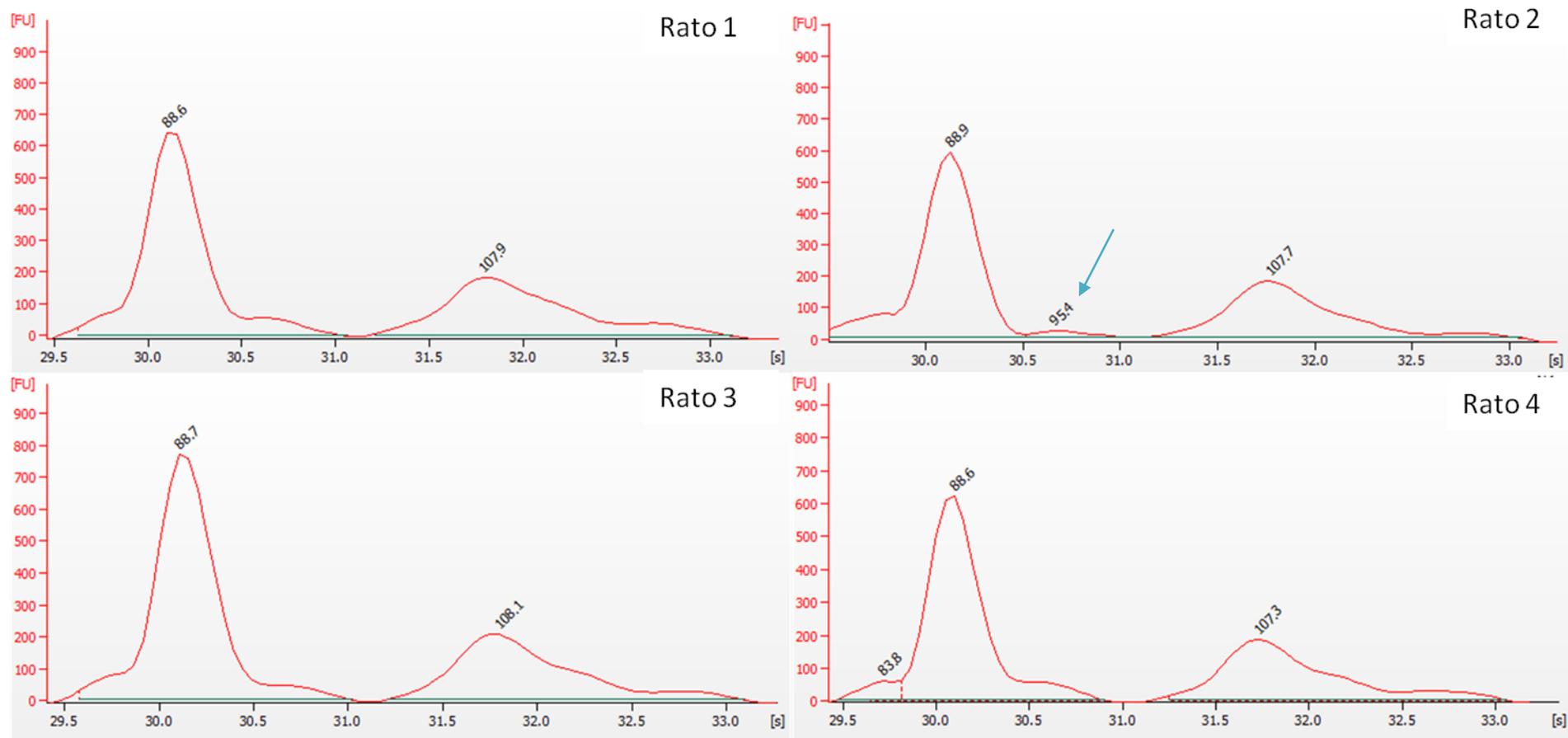
<sup>(B)</sup>: Pico detectado em apenas duas das seis repetições.

Alguns valores de concentrações não puderam ser analisados pelo programa de estatística devido à baixa frequência de repetição com a qual foram detectados. Picos na faixa de peso molecular 96,12 – 96,62 kDa foram detectados em todas as análises individuais e repetições de *pool* dos animais GD (Figura 3).

Por outro lado, a mesma detecção foi identificada pelo *software* em apenas um animal (rato 2, Figura 4) e em uma análise de *pool* em GN. No entanto, é possível observar que o pico de fluorescência está presente em baixíssima intensidade nos ratos 1, 3 e 4, o que levou a não observação deste pico nas amostras em *pool*, que apresentaram com fluorescência de 12 [FU]. Na sobreposição dos eletroferogramas (Figura 2C, seta azul), observa-se visualmente a diferença entre as intensidades deste pico, sendo a intensidade de fluorescência maior em GD do que em GN.



**Figura 3:** Eletroferograma das amostras de ratos do grupo desnutrido analisadas no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) utilizando 4 µl da amostra processada do soro no chip Protein chip 230. A faixa evidenciada corresponde às proteínas na faixa de 85,22 – 109,23 kDa. A seta em azul evidencia o pico referente à faixa 96,12 - 96,62 kDa detectada pelo *software* em todos os animais estudados.



**Figura 4:** Eletroferograma das amostras de soro de ratos do grupo nutrido analisadas no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) utilizando 4  $\mu$ l da amostra processada do soro no chip Protein chip 230. A faixa evidenciada corresponde às proteínas na faixa de 85,22 – 109,23 kDa. A seta em azul evidencia o pico referente à faixa 96,12 - 96,62 kDa detectada pelo *software* apenas no rato 2.

A Tabela 3 apresenta as faixas de proteínas que apresentaram diferenças de concentração nas amostras avaliadas de ratos nutridos e desnutridos, assim como as proteínas que foram evidenciadas apenas em um dos grupos de animais estudados. Na mesma, constam as prováveis proteínas que podem ser encontradas no soro e se encaixam na faixa de peso molecular sinalizada.

**Tabela 3:** Prováveis proteínas correspondentes às faixas de pesos moleculares detectados pelo Bioanalyzer 2100 em amostras de soro de ratos adultos nutridos e desnutridos. Busca realizada no banco de dados TagIdent tool (ExPASy) restrita à espécie *Rattus norvegicus*.

Peso molecular médio±DP (kDa) do Bioanalyzer	Provável proteína	
	Peso molecular esperado (kDa)	Nome
25,85±0,19 - 25,95±0,13	26,0	Cadeia leve da IgG
	26,02	Cadeia leve do fator de coagulação XIIa
	25,86	Subunidade gamma do fator ativador de plaqueta acetilhidrolase IB
	25,90	Isoforma 3 da proteína ligadora do cálcio 1
	25,94	Subunidade 2 da citocromo c oxidase
	25,78	Glutathione S-transferase
	25,93	Quimotripsinogênio
	25,74	Calicreína-9 glandular submandibular
	25,80	Fator de necrose tumoral, forma de membrana
	25,88	Cadeia beta do fator de crescimento de hepatócito
	25,79	Fator D do complemento
32,65±0,31 - 32,75±0,17	32,75	Ativador translacional da citocromo c oxidase 1
	32,59	Heme oxigenase 3
	32,68	Cadeia alfa-1 da tropomiosina
	32,76	Cadeia gama do complemento C4
	32,41	Glicina N-metiltransferase
	32,51	Ciclina-C
	32,43	Ciclina-D3 G1/S-específica
	32,83	Cadeia beta da tropomiosina
	32,74	Cetohecoquinase
	32,62	Cardiolipina sintase
	38,0	$\alpha$ -2-HS-glicoproteína
57,88±0,17 - 57,95±0,37	50,0	Cadeia pesada da IgG
	58,26	Citoromo P450 1A2
	58,17	Carboxilase 1 do fígado
	57,92	Proteína de choque térmico 60 kDa
	57,97	Alfa-cetoglutarato-dioxigenase dependente
	58,09	Proteína dedo de zinco 513
	58,09	Transportador de folato
	57,47	Glicerol quinase
63,15±0,82- 63,33±0,54	62,29	Antígeno CD166
	62,57	Fosfoproteína induzida pelo estresse
	63,74	Cadeia leve da cinesina 1
	63,03	Cadeia pesada A plasmina
	68,0	Albumina
96,20±0,00 - 96,37±0,25	96,419	Heat shock protein 105 kDa
	97,352	Forma hepática da fosforilase do glicogênio
	97,143	Forma muscular da fosforilase do glicogênio
	97,295	Dinamina 1

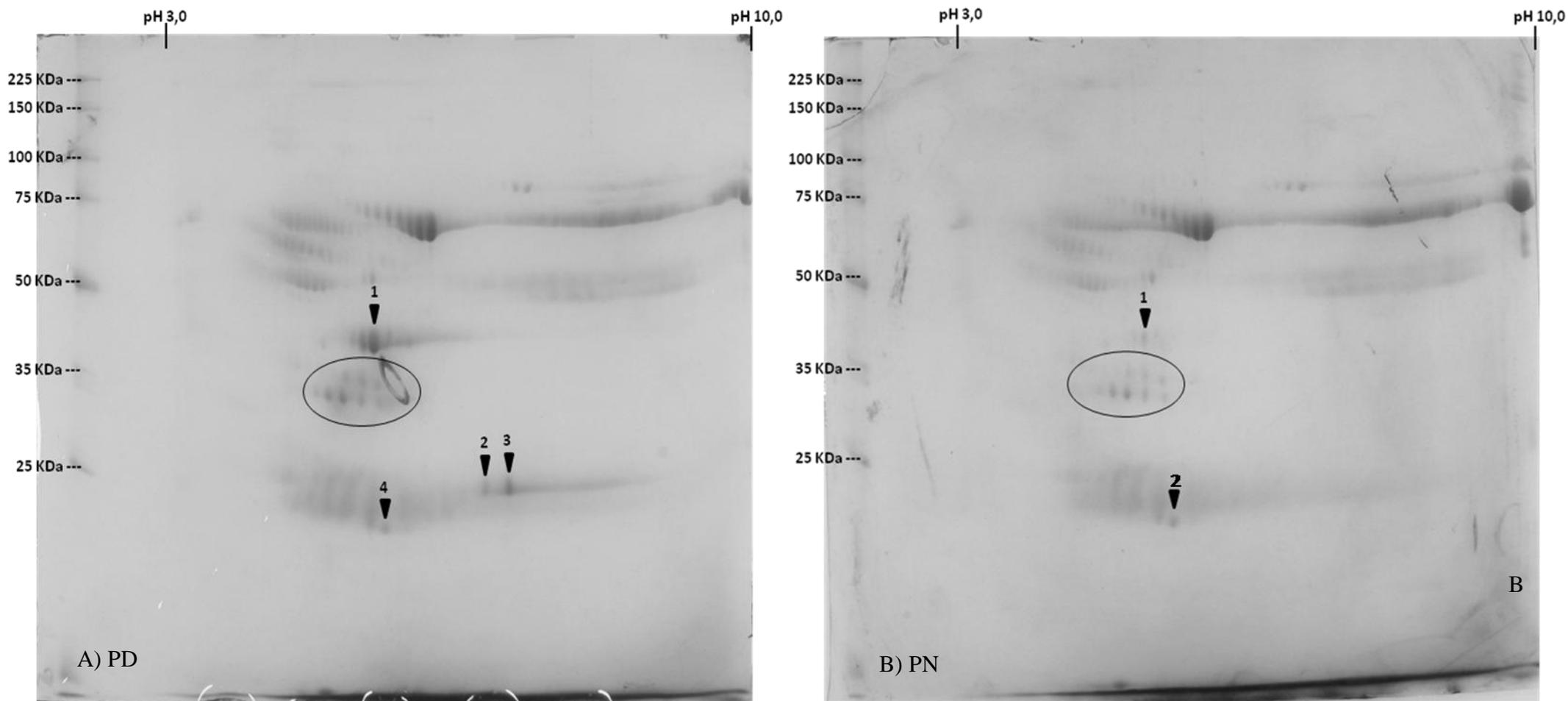
### 5.3 Perfil proteômico bidimensional do soro e espectros de *peptide mass fingerprinting*

A Figura 6 mostra os géis bidimensionais das proteínas presentes nas amostras de *pool* dos animais nutridos e desnutridos utilizados neste estudo. Foram detectados 83 spots para o gel do *pool* desnutrido e 71 para o nutrido. Pode ser observada na Figura 5A a expressão diferencial de algumas proteínas que estão presentes apenas no *pool* dos animais desnutridos (PD), como as indicadas em 2 e 3 (PD\_2 e PD\_3, respectivamente).

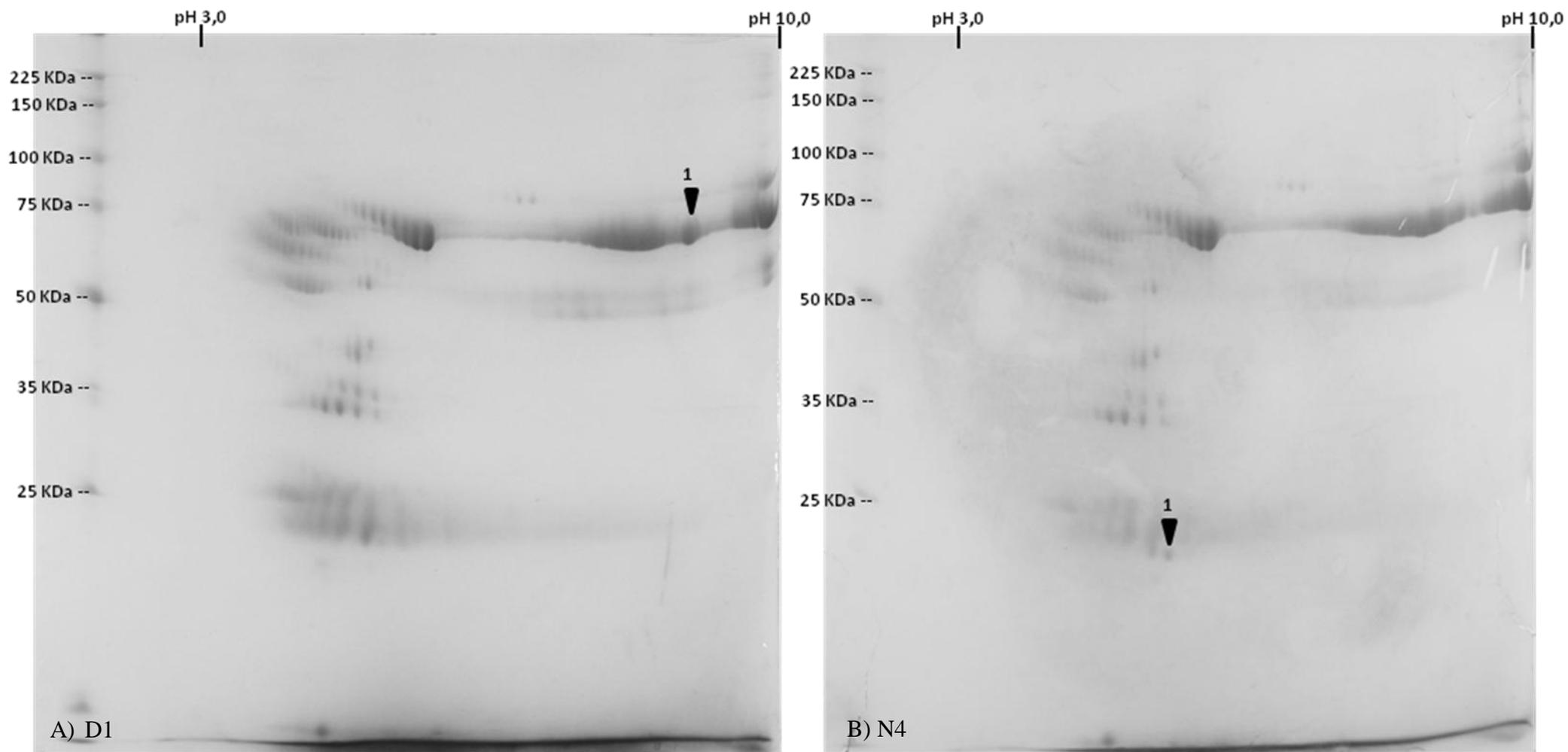
Os *spots* indicados em 1, 4 e na área delimitada no gel do *pool* de animais desnutridos mostraram equivalência (*match*) com os *spots* 1, 2 e os presentes na área delimitada do gel de animais nutridos. Estes indicam visualmente diferenças entre suas intensidades, sendo mais intensos no *pool* dos animais desnutridos.

Para análise individual, foram escolhidos os ratos 1 e 4 dos grupos desnutrido e nutrido, respectivamente, pois estes animais apresentaram perfis monodimensionais mais representativos para pesquisa de diferenças individuais no proteoma do soro. Foram detectados 62 spots para o rato 4 do grupo nutrido e 72 para o rato 1 do grupo desnutrido. A Figura 6 indica os spots D1\_1 e N4\_1, exclusivos de cada animal.

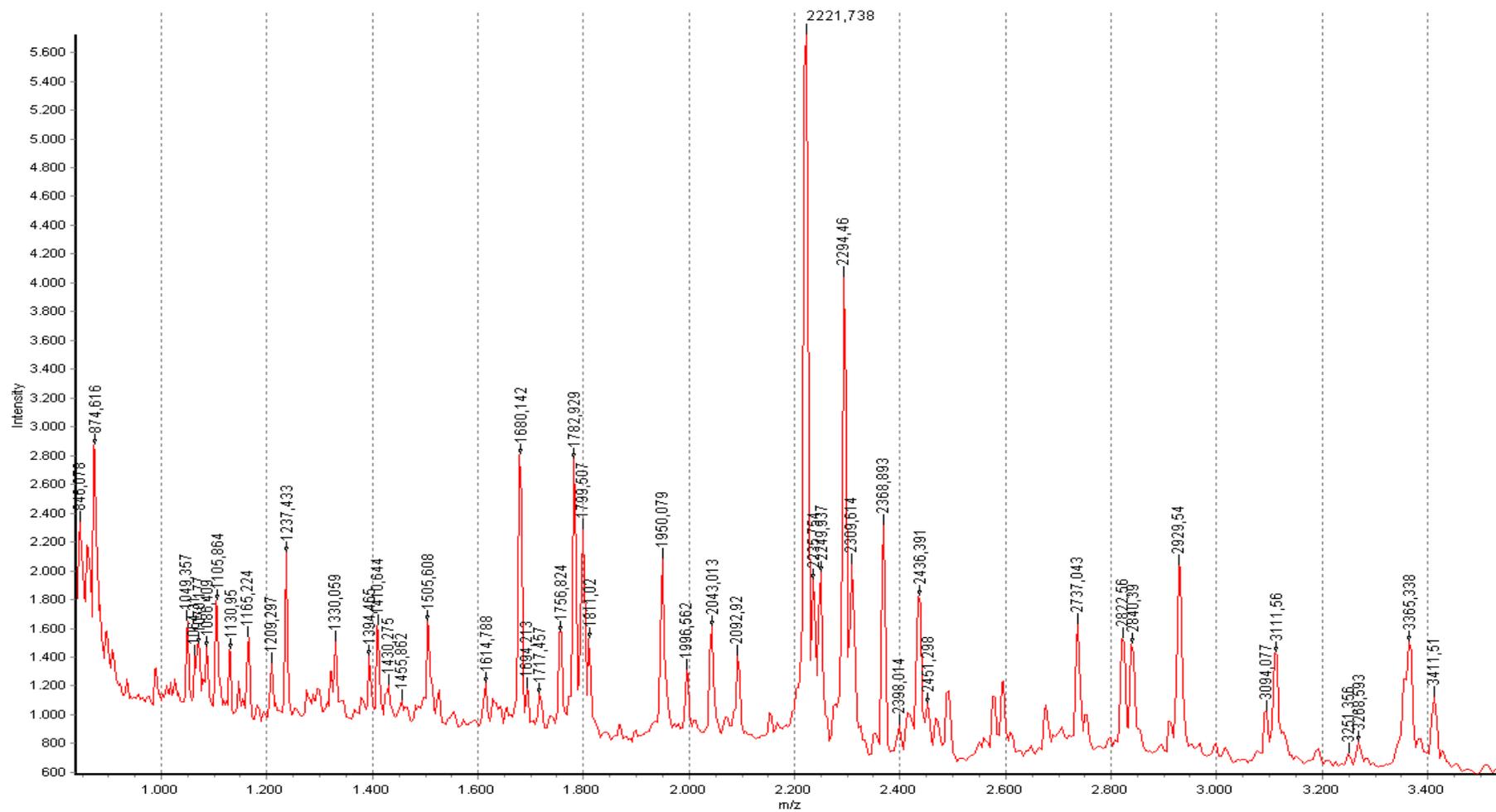
As Figuras 7, 8, 9, 10, e 11 mostram os espectros de PMF dos *spots* mencionados obtidos por MALDI-TOF MS. O intervalo de peso molecular avaliado foi de 1.000 a 3.000 m/z e os valores de intensidade de detecção, que são proporcionais à concentração do peptídeo na amostra, estão indicados no eixo vertical.



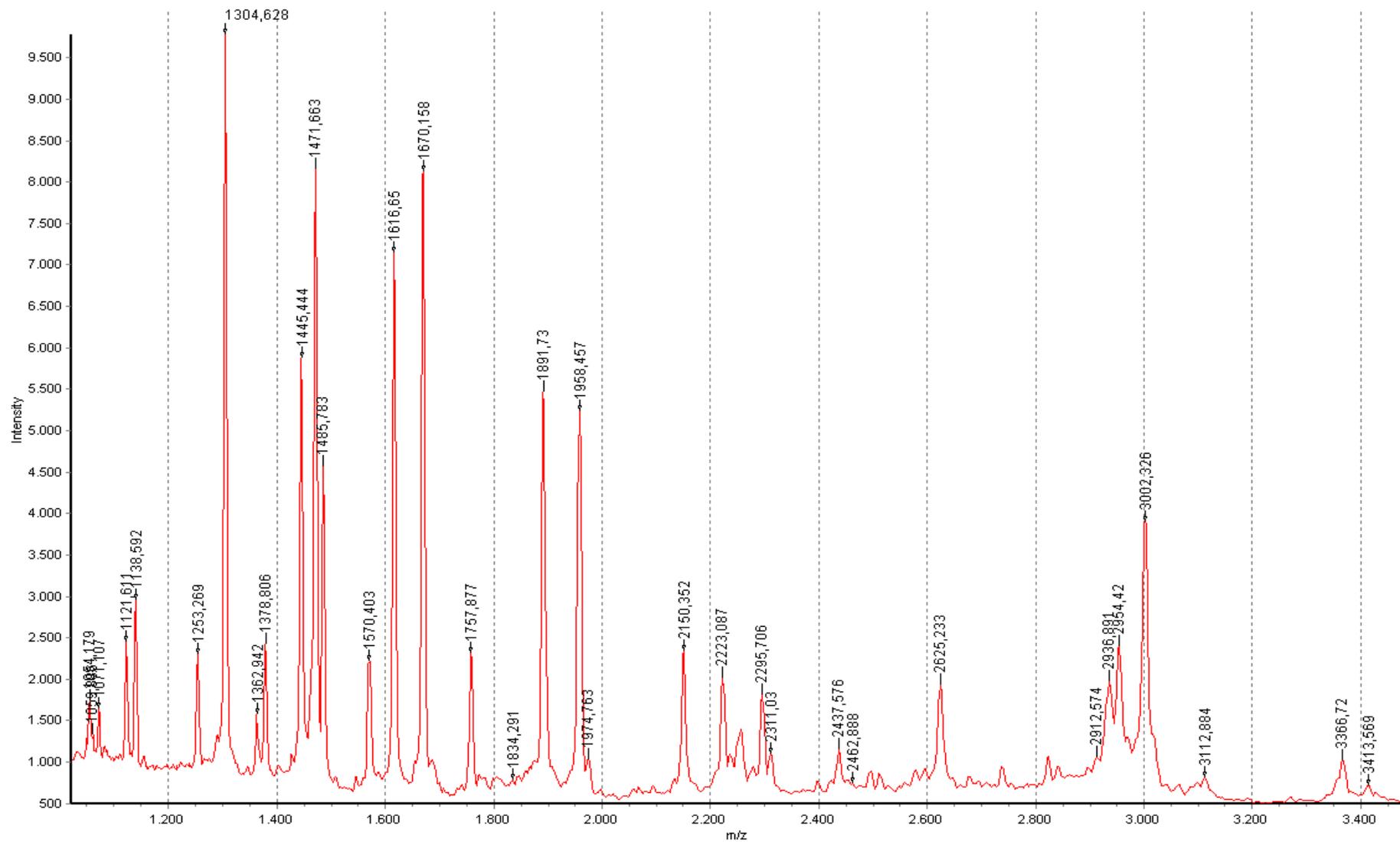
**Figura 5:** Perfis proteômicos bidimensionais de amostras de *pool* de soro. A) *Pool* de ratos desnutridos (PD); B) *Pool* de ratos nutridos (PN). As setas indicam os principais *spots* de proteínas encontrados no gel. As áreas delimitadas demonstram grupo de *spots* que apresentam diferença de intensidade. Marcadores de peso molecular: 10 a 225 KDa. Faixa de pI: pH 3 a 10.



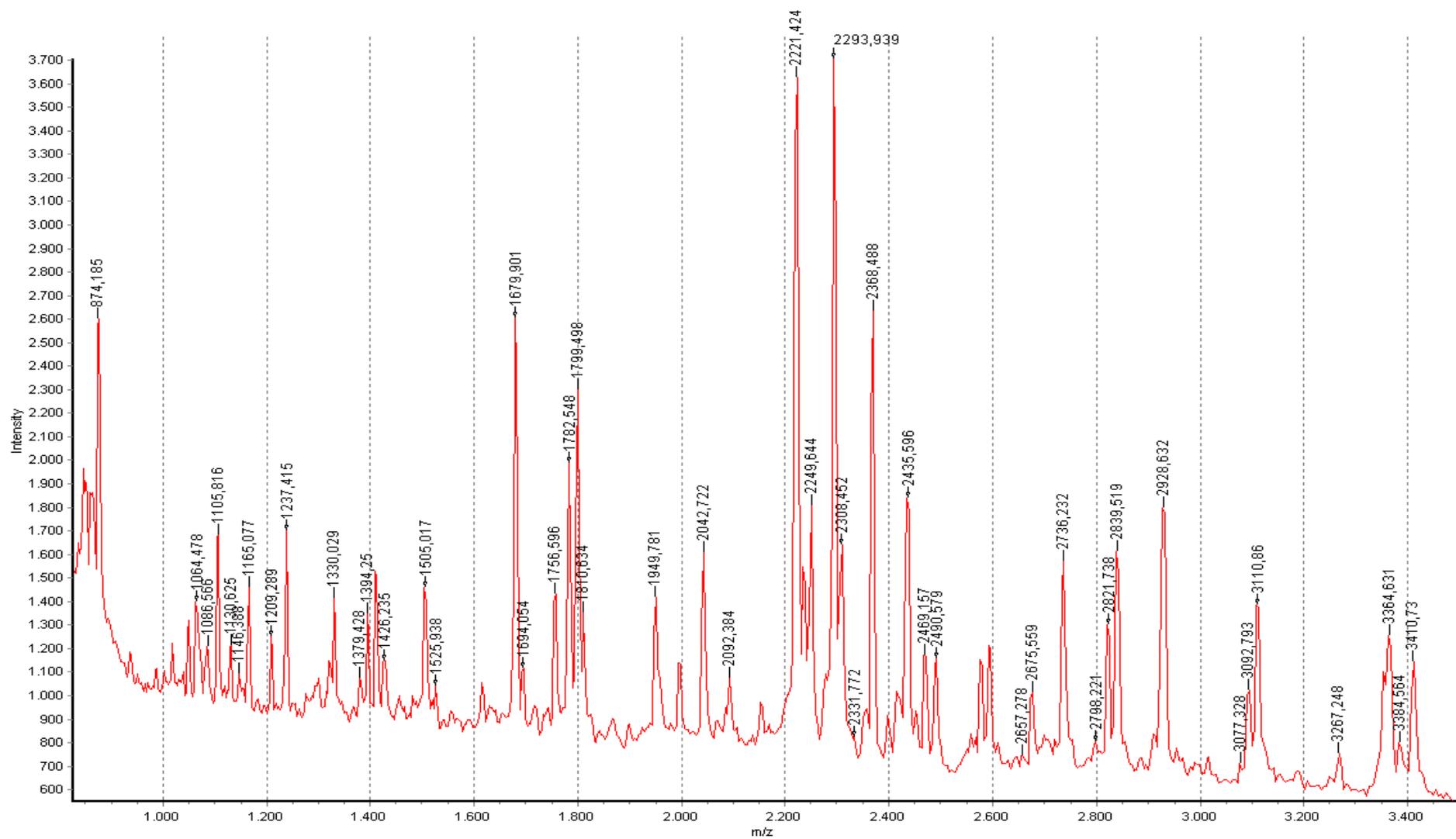
**Figura 6:** Perfis proteômicos bidimensionais de amostras individuais de soro de ratos. A) Rato desnutrido 1 (D1); B) Rato nutrido 4 (N4). As setas indicam os *spots* de proteínas que apresentam expressão diferencial entre ambos animais. Marcadores de peso molecular: 10 a 225 KDa. Faixa de pI: pH 3 a 10.



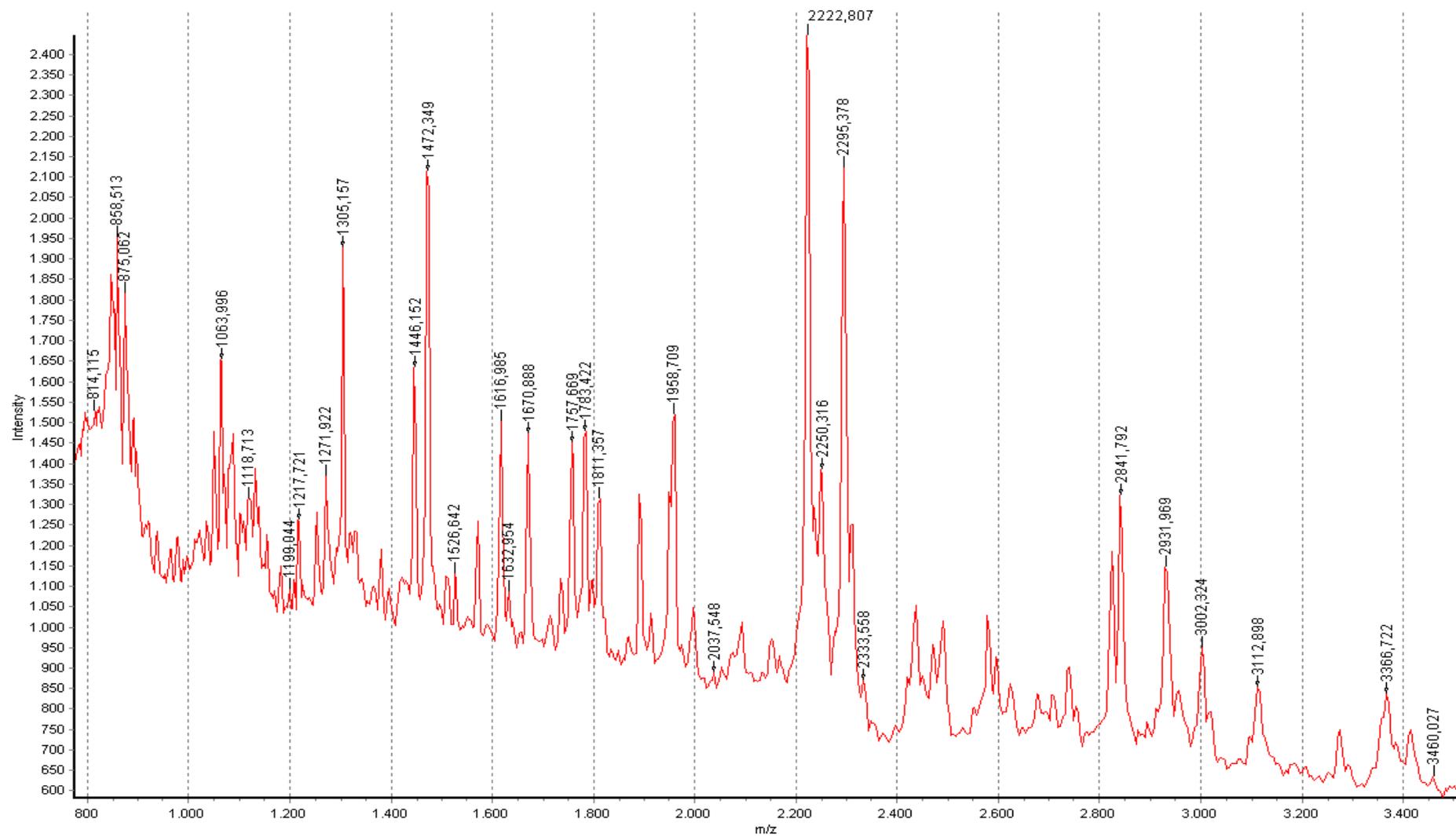
**Figura 7:** Espectro de *peptide mass fingerprinting* obtido por MALDI-TOF MS para o *spot* número 1 da amostra de *pool* de ratos desnutridos (PD\_1). m/z: massa sobre carga. Faixa de detecção: 1.000 a 3.000 m/z. Intensity: intensidade do sinal.



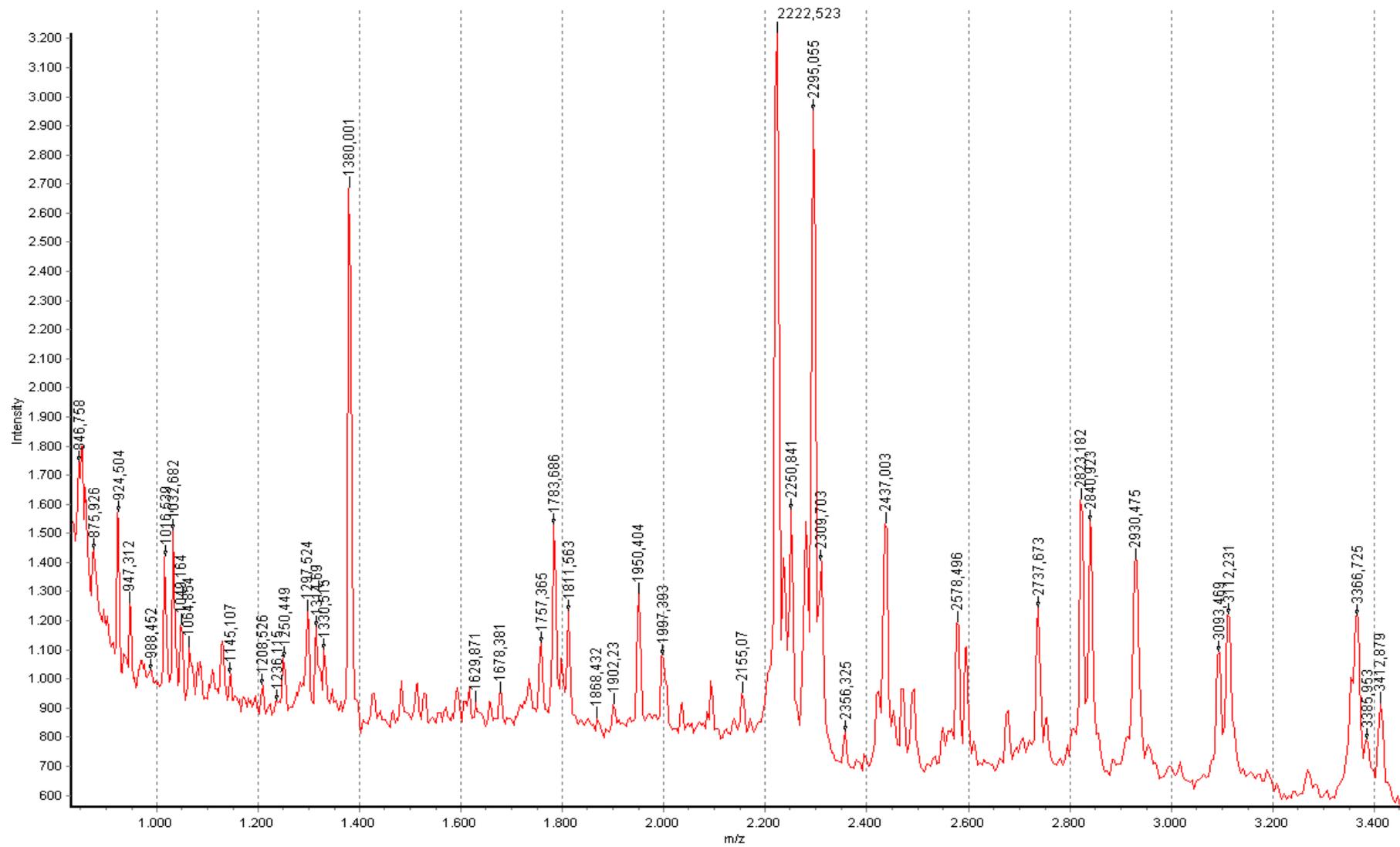
**Figura 8:** Espectro de *peptide mass fingerprinting* obtido por MALDI-TOF MS para o *spot* número 2 da amostra de *pool* de ratos desnutridos (PD\_2). m/z: massa sobre carga. Faixa de detecção: 1.000 a 3.000 m/z. Intensity: intensidade do sinal.



**Figura 9:** Espectro de *peptide mass fingerprinting* obtido por MALDI-TOF MS para o *spot* número 3 da amostra de *pool* de ratos desnutridos (PD\_3). m/z: massa sobre carga. Faixa de detecção: 1.000 a 3.000 m/z. Intensity: intensidade do sinal.



**Figura 10:** Espectro de *peptide mass fingerprinting* obtido por MALDI-TOF MS para o *spot* número 2 da amostra de *pool* de ratos nutridos (PN\_2). m/z: massa sobre carga. Faixa de detecção: 1.000 a 3.000 m/z. Intensity: intensidade do sinal.



**Figura 11:** Espectro de *peptide mass fingerprinting* obtido por MALDI-TOF MS para o *spot* número 1 da amostra individual do rato nutrido 4 (N4\_1). m/z: massa sobre carga. Faixa de detecção: 1.000 a 3.000 m/z. Intensity: intensidade do sinal.

## 4 Discussão

### 4.1 Evolução ponderal

Recentemente, as conseqüências da atuação de estímulos ambientais durante os estágios iniciais de vida do indivíduo têm sido amplamente estudadas por muitos grupos de pesquisa ao redor do mundo, com o objetivo de elucidar os mecanismos que levam a doenças na idade adulta. Existem diferentes maneiras de induzir o processo de programação do desenvolvimento em ratos através de manipulação nutricional. Uma delas seria a restrição neonatal de alimento, por meio do aumento do tamanho da ninhada ou restrição protéica materna durante período de lactação.

O rato (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), há anos, tem sido amplamente empregado em diversos estudos de processos fisiopatológicos, em testes de toxicidade, na produção de vacinas, como também na produção de animais transgênicos [16]. A escolha desses animais como modelo está fundamentada em diversas vantagens. Representam inúmeras características positivas quando comparados a experimentos em humanos. Podem ser destacadas, dentre elas, a resistência, a facilidade de manuseio, disponibilidade, baixos custos de manutenção, reduzida propensão a doenças, semelhanças anatômicas e fisiológicas com a espécie humana e maior aceitação ética e ecológica. Outras vantagens são a padronização genética - quando se tratam de indivíduos isogênicos e consangüíneos - e ambiental, características estas que diminuem a variabilidade da população e da amostra [17].

No presente estudo, os pesos corporais de animais GD mantiveram-se menores do que aqueles do grupo GN durante os primeiros 21 dias de vida pós-natal - período de aleitamento - sendo significativamente diferentes a partir do 5º dia de vida. Esta condição permaneceu até a idade adulta do animal, mesmo após longo período de reposição nutricional, durante o qual os animais passaram a se alimentar de uma dieta balanceada nutricionalmente.

Isto sugere que a deficiência de proteínas na dieta com 8 % de caseína interferiu negativamente no ganho de peso dos animais GD. Em estudos anteriores que induziram restrição

alimentar em período neonatal, os tamanhos corporais destes animais mantiveram-se, durante a vida adulta, permanentemente reduzidos ou normalizados aos níveis controles [18,19]. Estudos sobre desnutrição energético-protéica em ratos têm demonstrado haver diminuição na produção e na quantidade de proteínas do leite em mães lactantes, bem como ocorre redução no tamanho das glândulas mamárias [20] o que em parte, pode explicar os dados relativos ao déficit ponderal de animais GD durante aleitamento.

Também tem sido observado em pesquisas semelhantes que esta condição de restrição alimentar pode reduzir profundamente o crescimento corporal em todas as dimensões, como comprimentos da cauda e do corpo. Além disso, em concordância com este estudo, todos estes parâmetros podem permanecer reduzidos ao longo da vida, mesmo se o animal demonstrar aumento na eficiência alimentar durante período de reposição nutricional, após desmame [21].

Porto (2007), ao utilizar a dieta caseína com baixo teor protéico (8 %) e o mesmo modelo de desnutrição e reabilitação nutricional, verificou redução de ganho de peso no período de aleitamento e que a desnutrição imposta durante essa fase também afetou o peso corporal dos animais na idade adulta [22]. Em estudo realizado por Barros e colaboradores (2006), no qual foi utilizada a Dieta Básica Regional (DBR), hipoprotéica, para induzir desnutrição durante o período neonatal, pôde-se observar diferença significativa entre os pesos corporais dos animais já a partir 2º dia de vida, anterior ao observado no presente trabalho (5º dia) [20]. Nossos dados, no entanto, seguem o mesmo perfil de aumento dos pesos em ratos desnutridos, do 23º ao 89º dia de vida, observando-se valores ainda bastante reduzidos quando comparados aos do grupo nutrido.

Os resultados obtidos na presente pesquisa e nos demais estudos sugerem que a restrição alimentar durante o período de vida neonatal implica em diminuição do peso e, conseqüentemente, das dimensões corporais o que pode levar o animal a permanecer menos desenvolvido na vida adulta. Os efeitos negativos da desnutrição neonatal, portanto, repercutem na vida adulta do indivíduo. Estes achados são úteis para fortalecer o conceito de programação ou plasticidade do desenvolvimento. Quando existem alterações entre condições ambientais às quais o indivíduo – em

período crítico de desenvolvimento – foi submetido e as condições na vida adulta, efeitos de programação do desenvolvimento podem ser nocivos, uma vez que estão associados a incidência de determinadas doenças no adulto (por exemplo, diabetes tipo II, depressão, osteoporose, doenças cardiovasculares, entre outras [2,19]).

#### **4.2 Perfil proteômico monodimensional**

Para estudar os efeitos da desnutrição neonatal sobre as proteínas do soro sanguíneo de ratos adultos, os animais foram divididos em dois grupos a fim de se comparar os achados do grupo experimental em questão (GD) aos do grupo controle (GN). Os picos detectados pelo Bioanalyzer 2100 foram analisados dentro de intervalos de tamanho, uma vez que é esperada uma pequena variação nos tamanhos devido à variabilidade entre os momentos de entrada para cada amostra – i.e., injeção para dentro do chip – que pode influenciar a migração das proteínas. A eficiência da injeção é dependente de vários fatores como correção automática pelos marcadores internos do sistema, concentração de sais, homogeneização e desnaturação das proteínas da amostra [23].

O padrão dos perfis gerados nos eletroferogramas e nas bandas separadas no gel virtual foi semelhante para todos os animais de GN e GD, intra e intergrupo. Contudo, a intensidade de fluorescência - i.e., concentração de proteínas nas amostras – apresentou maior variação entre os animais do grupo desnutrido para a maioria dos picos detectados.

Em todas as amostras de ambos os grupos, nota-se claramente a predominância de determinadas proteínas. O pico mais abundante em todas as análises corresponde à faixa de peso molecular 63,87 – 62,33 kDa e possui intensidades de fluorescência sempre superior à 1000 FU. Acredita-se que esse pico seja referente à albumina que é uma proteína de alta abundância no soro e tem como principal função o transporte de vários compostos, incluindo hormônios, lipoproteínas e aminoácidos [24]. O peso molecular teórico, ou esperado, para albumina de rato é 68,731 kDa, valor maior do que o detectado pelo aparelho. Entretanto, estudos anteriores demonstraram que

padrões purificados de albumina são detectados no Bioanalyzer 2100 na região de peso molecular de 63 kDa [23], evidência esta que corrobora o resultado obtido neste trabalho.

Outros dois picos entre 26,05 - 25,66 kDa e 58,32 - 57,71 kDa foram detectados e, possivelmente, correspondem às cadeias leve e pesada da Imunoglobulina G (IgG) respectivamente. As imunoglobulinas possuem papel crucial no processo de defesa do organismo, reconhecendo antígenos no sangue e iniciando sua destruição. Sob condições redutoras, utilizando-se agentes redutores como o DTT, a molécula de IgG separa-se em suas cadeias leve e pesada devido à redução de pontes dissulfeto que as mantêm unidas [24]. A massa teórica da cadeia leve é de aproximadamente 26 kDa, enquanto que a massa da cadeia pesada é 50 kDa. No trabalho publicado por Mann e Tighe (2007), foram detectadas duas bandas de pesos moleculares em amostras lacrimais, sendo uma de 58 kDa – correspondente à cadeia pesada – e a outra de 26 kDa, relativa à cadeia leve [23].

O grupo desnutrido apresentou maior concentração proteica na faixa de 32,34 a 32,92 kDa (7,45 ng/ $\mu$ L) em relação ao grupo nutrido (6,3 ng/ $\mu$ L). A referida faixa sugere representar a proteína  $\alpha$ -2-HS-glicoproteína. Conforme listado na Tabela 3, a proteína  $\alpha$ -2-HS-glicoproteína, presente no soro de ratos, possui peso molecular teórico de, aproximadamente, 38 kDa [25]. A variação no peso molecular de aproximadamente 6 kDa, detectado pelo Bioanalyzer 2100, pode ocorrer devido às modificações pós-traducionais – por exemplo, fosforilações, glicosilações, acetilações, entre outras [26]. Especificamente, a  $\alpha$ -2-HS-glicoproteína, que pertence à família das fetuínas (por isso, é também denominada fetuína), é sintetizada no fígado e secretada no sangue, sendo alvo de N-glicosilações e fosforilações em resíduos de serina. Esta desempenha papéis importantes em diversos processos biológicos como resposta de fase aguda, resposta celular à insulina, desenvolvimento do córtex cerebral, desenvolvimento de gônadas masculinas, regulação negativa do crescimento celular, regeneração de órgãos, regulação negativa da mineralização óssea, regulação positiva da absorção óssea, entre outras [26]. De maneira geral, quando analisadas no Bioanalyzer, glicoproteínas demonstram valores de pesos moleculares destoantes em relação aos

valores esperados. Essas diferenças ocorrem, provavelmente, devido à ligação de cadeias glicídicas que podem alterar o formato da proteína e, conseqüentemente, a relação carga/massa [27].

Na faixa de peso molecular 96,12 – 96,62 kDa detectada pelo aparelho, os valores de concentrações não puderam ser analisados pelo programa de estatística devido à baixa frequência de repetição com a qual foram registrados. Proteínas nesta faixa de peso molecular foram detectadas em todas as análises individuais e repetições de *pool* dos animais GD. Por outro lado, em amostras de animais GN, apenas foram registradas em um animal (rato 2) e em uma repetição de *pool*. A baixa intensidade de fluorescência deste pico nos ratos nutridos 1, 3 e 4 não permitiu a detecção do mesmo, embora esteja visualmente presente em baixa concentração.

Na faixa de 96,62 – 96,12 kDa encontram-se proteínas “não-clássicas” do soro, destacando-se a presença de proteínas de canais iônicos de potássio, formas hepática e muscular da fosforilase do glicogênio, receptor de glutamato, dinamina e isoformas, serina/treonina quinase D2 e proteínas de choque térmico (*Heat shock protein* 105 kDa). A presença desta última merece destaque, pois é expressa quando ocorrem mudanças na atividade celular – no que diz respeito à expressão gênica, produção de enzimas, secreção, entre outras - como resultado de condições estressantes, tais como variações de temperatura, umidade, carência de aminoácidos, etc. Proteínas de choque térmico podem estar presente no soro, uma vez que o plasma circulante entra em contato com tecidos e órgãos em diferentes estados fisiológicos, podendo conter combinações dos diferentes sub-proteomas do corpo [11].

Na Tabela 3, com exceção da faixa de peso molecular 57,71 – 58,32 kDa, as demais faixas apresentadas demonstraram valores de concentrações (média e mediana) mais elevados para amostras em *pool* de animais desnutridos (Tabela 1). Conforme citado anteriormente, essa tabela destaca a presença de prováveis proteínas que desempenham importantes papéis em vários processos biológicos – tais como controle do ciclo celular, transporte de nutrientes, metabolismo do glicogênio, etc. -, indispensáveis ao crescimento e desenvolvimento do animal [28,29].

Baseando em estudos anteriores [30], a maior concentração protéica em amostras de GD pode indicar maiores níveis de expressão dessas proteínas que podem estar associadas à ocorrência de um mecanismo de crescimento compensatório ou *catch-up growth*. Este ocorre quando animais passam por um período de crescimento lento e, então, são submetidos a condições ambientais favoráveis que permitem sua aceleração [31]. No presente estudo, o crescimento compensatório provavelmente ocorreu em resposta ao estresse nutricional imposto durante o período neonatal de vida.

É importante evidenciar que a identificação das proteínas correspondentes a cada pico detectado pelo Bioanalyzer 2100 não é uma busca direta, principalmente quando são provenientes de amostras biológicas compostas por uma variedade de proteínas e quando o peso molecular (kDa) obtido experimentalmente não se correlaciona precisamente com o peso molecular teórico estabelecido para a proteína [23].

No entanto, um dos aspectos mais importantes no dimensionamento de proteínas é que diferenças entre os pesos moleculares observado e esperado são de ocorrência comum. A determinação da massa da proteína no Bioanalyzer 2100, assim como em géis de SDS-PAGE, depende também das características da proteína, como sequência de aminoácidos, pI, estrutura e presença de cadeias laterais ou de grupos prostéticos [23]. Estas características específicas afetam o perfil de migração de algumas proteínas e, conseqüentemente, causam variações na determinação dos pesos moleculares.

A utilização do equipamento Bioanalyzer 2100 possibilitou a obtenção do perfil proteômico monodimensional das proteínas séricas de ratos. Este sistema permitiu análise rápida, sensível e reprodutível das amostras, produzindo resultados de alta qualidade na forma de eletroferogramas e gel, abrangendo ampla faixa de peso molecular. Apesar disso, foram observadas variações entre os valores de pesos moleculares detectados e teóricos, estabelecidos para as prováveis proteínas presentes nas amostras, que podem ser conseqüência de características do próprio sistema eletroforético ou das proteínas presentes na amostra [27,32].

### 4.3 Perfil proteômico bidimensional e espectrometria de massas

A eletroforese bidimensional foi realizada a partir de amostras cujo volume foi padronizado. Através da coloração com Azul de Coomassie, foi possível observar diferenças na quantidade e intensidade de *spots* presentes nos géis bidimensionais de animais desnutridos em relação aos animais nutridos. De maneira geral, foram detectados mais *spots* nos géis referentes ao grupo desnutrido do que para o grupo nutrido. Amostras em *pool* de GD apresentaram 83 *spots* contra 71 de GN. Em relação às amostras individuais, o rato 1 do grupo desnutrido apresentou 71 *spots*, enquanto que o rato 4 do grupo nutrido mostrou 62 *spots* protéicos no gel bidimensional. Em estudo realizado por Haynes *et al.* (1998), foram identificados 56 *spots* no padrão de eletroforese bidimensional, correspondentes a 22 proteínas presentes no soro de ratos Wistar adultos normais [25].

Algumas proteínas foram verificadas apenas nas amostras de *pool* ou vice-versa. Por exemplo, os *spots* PD\_1 e PD\_2 não estavam presentes no gel do rato desnutrido 1, assim como D1\_1 não foi evidenciado no gel do *pool*. Possivelmente isto ocorreu devido a diferenças individuais entre os proteomas dos animais, de forma que proteínas altamente expressas em apenas um animal apareçam menos concentradas na análise em *pool*.

Visivelmente, percebe-se que os géis correspondentes às amostras de animais GD apresentaram maior intensidade de coloração dos *spots*, sendo esta diretamente proporcional à concentração da proteína na amostra. Em pesquisa realizada por Shen *et al.* (2011), na qual foram avaliados os efeitos da ingestão de alta quantidade de proteína na dieta pós-natal de ratos adultos submetidos à desnutrição intra-uterina, foram encontradas 13 proteínas renais diferencialmente expressas em relação ao grupo controle, envolvidas primariamente no metabolismo, oxidação-redução e regulação de apoptose [33].

Variações na quantidade e intensidade dos *spots* de proteínas detectados podem ocorrer em resposta a condições fisiológicas adversas que, no presente estudo, estão relacionadas à ocorrência

da desnutrição neonatal. Uma vez que as principais proteínas do soro são sintetizadas no fígado, pode-se supor que este seja um órgão-chave de resposta aos efeitos da restrição protéica pós-natal quando observados no indivíduo adulto. Na ocorrência de processos inflamatórios crônicos, por exemplo, o fígado responde a esta condição aumentando a produção de proteínas de fase aguda, como a ceruloplasmina e a proteína C-reativa [34].

Em pesquisa recente desenvolvida por Haenen *et al.* (2010), foram identificadas 40 proteínas diferencialmente expressas no soro de animais afetados por asma quimicamente induzida, sendo muitas delas relacionadas a processos inflamatórios e de estresse oxidativo [35]. Em estudo com pacientes portadores de câncer de próstata, metade das proteínas abundantes diferencialmente expressas, separadas por 2D-DIGE, apresentaram-se *up*-reguladas e foram relacionadas com a diferenciação do tumor. Dentre as menos abundantes, destaca-se a proteína de choque térmico 60 (HSP60), a qual também foi encontrada em maiores níveis de expressão em relação às amostras controles [36].

O perfil proteômico bidimensional das proteínas séricas de ratos foi semelhante aos resultados obtidos no perfil monodimensional. A maior intensidade de fluorescência detectada por tecnologia *lab-on-a-chip* em amostras de ratos desnutridos pode indicar a ocorrência de expressão diferencial entre ambos os grupos ou maior concentração de proteínas que foram expressas mutuamente.

Embora tenham sido detectadas faixas de pesos moleculares exclusivas para amostras em *pool* de animais GN por *lab-on-a-chip* (Tabela 2), os géis obtidos por 2-DE demonstraram haver mais *spots* em amostras de animais GD. É possível que o método de coloração por Azul de Coomassie não tenha sido eficiente para detectar proteínas na faixa de peso 212,80 - 233,07 kDa, uma vez que possuem baixa concentração na amostra, devido à baixa concentração com as quais foram observadas no Bioanalyzer 2100.

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que a desnutrição protéica neonatal provocou redução permanente do peso corporal dos animais e alterações nos perfis proteômicos

monodimensional e bidimensional do soro sanguíneo. Aparentes alterações no tipo e na concentração das proteínas presentes no soro dos animais estudados podem ser correlacionadas com o desenvolvimento de patologias metabólicas, sendo necessários, portanto, estudos adicionais de espectrometria de massas, expressão gênica e análise epigenética para determinação de quais proteínas estão alteradas e para o entendimento dos mecanismos que podem causar estas modificações.

## Lista de referências

- [1] Schaible U, Kaufmann H. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med.* 2007;4:806-12.
- [2] Kajantie, E. Early-life events. Effects on aging. *Hormones.* 2008;7;101-13.
- [3] Guilloteau P, Zabielski R, Hammon H, Metges C. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60;17-35.
- [4] Langley-Evans S. Nutritional programming of disease: unraveling the mechanism. *J Anat.* 2009;215;36-51.
- [5] Langley-Evans S, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract.* 2010;19;87-98.
- [6] Buckley A, Jaquiery A, Harding J. Nutritional programming of adult disease. *Cell Tissue Res.* 2005;322;73-9.
- [7] Langley-Evans S. Developmental programming of health and disease. *Proc Nutr Soc.* 2006;65;97-105.
- [8] Ahram M. An introduction into proteomics and its clinical applications. *Saudi Med J.* 2007;28;499-507.
- [9] Trenčevska O, Aleksovski V, Stojanoski K. Advanced techniques in clinical practice: use of lab-on-a-chip electrophoresis and other methods in protein profiling. *J Med Biochem.* 2009;28;274-8.
- [10] Silberring J, Ciborowski P. Biomarker discovery and clinical proteomics. *Trends Analyt Chem.* 2010;29;128-140.
- [11] Jacobs J, Adkins J, Qian W, Liu T, Shen Y, Camp D, Smith R. Utilizing Human Blood Plasma for Proteomic Biomarker Discovery. *J Prot Res.* 2005;4:1073-85.
- [12] Good D, Thongboonkerd V, Novak J, Bascands J, Schanstra J, Coon J, Dominiczak A, Mischak H. Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. *J Proteome Res.* 2007;6;4549-55.
- [13] Adkins J, Varnum S, Auberry K, Moore R, Angell N, Smith R, Springer D, Pounds J. Toward a Human Blood Serum Proteome. Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1:947-55.

- [14] Kohna E, Azad N, Annunziata C, Dhamoona A, Whiteley G. Proteomics as a tool for biomarker Discovery. *Dis Markers*. 2007;23:411-7.
- [15] Cho W. Proteomics technologies and challenges. *Geno Prot Bioinfo*. 2007;5:77-85.
- [16] Paixão R, Schramm F. Ethics and experimentation: what is debated?. *Cad Saúde Pública*. 1999;15:99-110.
- [17] Harkness J, Wagner J. *Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores*. 3th ed. São Paulo: Roca; 1993.
- [18] Engelbregt M, Van Weissenbruch M, Lips P, Van A, Roos J, Delemarre-van de Waal H. Body composition and bone measurements in intra-uterine growth retarded and early postnatally undernourished male and female rats at the age of 6 months: comparison with puberty. *Bone*. 2004;34:180–6.
- [19] Lopez M, Seoane I, Tovar S, Garcia M, Nogueiras R, Diéguez C, Señarís R. A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. *Diabetologia*. 2005;48:140–8.
- [20] Barros K, Manhães-De-Castro R, Lopes-De-Souza S, Matos R, Deiró T, Cabral-Filho J, Canon F. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci*. 2006;9:99-104.
- [21] Remmers F, Fodor M, Delemarre-van de Waal H. Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake. *Physiol Behav*. 2008;95:208–15.
- [22] Porto S, Viana, M, Da Silva K, Diniz MF, De Castro CM. Neonatal malnutrition and normal microbiota of the oral cavity in rats. *Rev Nutr*. 2007;20:625-32.
- [23] Mann S, Tighe B. Tear analysis and lens–tear interactions Part I. Protein fingerprinting with microfluidic technology. *Cont Lens Anterior Eye*. 2007;30:163-73.
- [24] Burtis C, Ashwood E, Bruns D. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2008.
- [25] Haynes P, Miller I, Aebersold R, Gemeiner M, Eberini I, Lovati M, Manzoni C, Vignati M, Gianazza E. Proteins of rat serum: I. establishing a reference two-dimensional electrophoresis map by immunodetection and microbore high performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry. *Electrophoresis*. 1998;19:1484–92.
- [26] Mann M, Jensen O. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biot*. 2003;21:255-61.
- [27] Kelly L, Barthmaier P. Glycoprotein sizing on the Agilent 2100 bioanalyzer. Santa Clara: Agilent Technologies Application Note; 2003.

- [28] Jain E, Bairoch A, Duvaud S, Phan I, Redaschi N, Suzek E, Martin J, McGarvey P, Gasteiger E. Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:136.
- [29] The UniProt Consortium. Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:D214-9.
- [30] Metcalfe N, Monaghan, P. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends Ecol Evol*. 2001;16:254-60.
- [31] Remmers F, Delemarre-van de Waal H. Developmental Programming of Energy Balance and Its Hypothalamic regulation. *Endocr Rev*. 2011;32:272-311.
- [32] Fischer B, Siedler F. Using the Agilent 2100 bioanalyzer for quality control of protein samples prior to MS-analysis. Santa Clara: Agilent Technologies Application Note; 2004.
- [33] Shen Q, Xu H, Wei I, Chen J, Liu H. Intrauterine growth restriction and postnatal high-protein diet affect the kidneys in adult rats. *Nutr*. 2011;27:364–71.
- [34] Guo C, Chen P, Yeh M, Hsiung D, Wang C. Cu/Zn ratios are associated with nutritional status, oxidative stress, inflammation, and immune abnormalities in patients on peritoneal dialysis. *Clin Biochem*. 2011; 44:275–80.
- [35] Haenen S, Vanoirbeek J, Vooght V, Maes E, Schoofs I, Nemery B, Hoet P, Clynen E. Proteome Analysis of Multiple Compartments in a Mouse Model of Chemical-Induced Asthma. *J Prot Res*. 2010;9:5868–76.
- [36] Skvortsov S, Schafer G, Stasyk T, Fuchsberger C, Bonn G, Klocker H, Huber I. Proteomics Profiling of Microdissected Low- and High-Grade Prostate Tumors Identifies Lamin A as a Discriminatory Biomarker. *J Prot Res*. 2010;in press.

# Conclusões

A desnutrição neonatal provocou redução do peso corporal, a partir do 5º dia de vida pós-natal, persistindo até idade adulta. Adicionalmente, ocorreu uma diminuição na quantidade de faixas de pesos moleculares detectadas e aumento de concentração de proteínas de peso 32,92 a 32,34 kDa no perfil proteômico monodimensional.

Nossos dados indicam que houve aparente alteração no tipo e na concentração das proteínas presentes no soro dos animais estudados, sendo necessários estudos adicionais para determinação de quais proteínas estão alteradas.

A partir deste tipo de estudo é possível correlacionar o potencial da dieta com o desenvolvimento de patologias metabólicas, sendo uma ferramenta moderna para reverter a “programação” recebida na idade neonatal.

# **Perspectivas**

A identificação das proteínas separadas por eletroforese bidimensional através dos espectros de massa devem fornecer indicativos de regulação metabólica relacionada à dieta no período neonatal.

A obtenção do perfil proteômico de órgãos como o fígado em diversos estágios do desenvolvimento deve demonstrar mais claramente como o efeito da dieta neonatal pode interferir na resposta metabólica do animal frente aos estímulos nutricionais posteriores.

Finalmente, estudos relacionados aos mecanismos de silenciamento gênico, tais como a metilação e acetilação, podem esclarecer o mecanismo de “programação” resultante da adequação nutricional no período de desenvolvimento corpóreo.

# APÊNDICE

**APÊNDICE A** – Planilha para acompanhamento da evolução ponderal de animais do grupo nutrido durante período de aleitamento.

**PERÍODO DE ALEITAMENTO**  
**GRUPO NUTRIDO**

Gaiola:  
Data de nasc. mãe:  
Data de nasc. filhotes/dia da semana:  
Data desmame (D)/dia da semana:  
Dieta: CASEÍNA 17%

Data	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º	13º	14º	15º	16º	17º	18º	19º	20º	21º	D	
Animal\Dias																							
DM																							x
DP																							x
PAD																							x
PAE																							x
PPD																							x
PPE																							x

Gaiola:  
Data de nasc. mãe:  
Data de nasc. filhotes/dia da semana:  
Data desmame (D)/dia da semana:  
Dieta: CASEÍNA 17%

Data	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º	13º	14º	15º	16º	17º	18º	19º	20º	21º	D	
Animal\Dias																							
DM																							x
DP																							x
PAD																							x
PAE																							x
PPD																							x
PPE																							x

**APÊNDICE B** – Planilha para acompanhamento da evolução ponderal de animais do grupo desnutrido durante período de aleitamento.

**PERÍODO DE ALEITAMENTO**  
**GRUPO DESNUTRIDO**

Gaiola:  
 Data de nasc. mãe:  
 Data de nasc. filhotes/dia da semana:  
 Data desmame (D)/ dia da semana:  
 Dieta: CASEÍNA 8%

Data	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°	17°	18°	19°	20°	21°	D	
Animal\Dias																							
DM																							x
DP																							x
PAD																							x
PAE																							x
PPD																							x
PPE																							x

Gaiola:  
 Data de nasc. mãe:  
 Data de nasc. filhotes/dia da semana:  
 Data desmame (D)/ dia da semana:  
 Dieta: CASEÍNA 8%

Data	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°	17°	18°	19°	20°	21°	D	
Animal\Dias																							
DM																							x
DP																							x
PAD																							x
PAE																							x
PPD																							x
PPE																							x

**APÊNDICE C** – Planilha para acompanhamento da evolução ponderal de animais do grupo nutrido durante período de reposição nutricional.

**PERÍODO POS-DESMAME**  
**GRUPO NUTRIDO**

Gaiola:  
 Data de nasc. mãe:  
 Data de nasc. fíotes/dia da semana :  
 Data desmame (D)/dia da semana :  
 Dieta: LABINA

Data	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
Animal\Dias	D																				
1	x																				
2	x																				
3	x																				
Data																					
Animal\Dias	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
1																					
2																					
3																					
Data																					
Animal\Dias	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	75	77	78	79	80	81	82	83	84
1																					
2																					
3																					
Data																					
Animal\Dias	85	86	87	88	89	90															
1																					
2																					
3																					

**APÊNDICE D** – Planilha para acompanhamento da evolução ponderal de animais do grupo desnutrido durante período de reposição nutricional.

**PERÍODO PÓS-DESMAME**  
**GRUPO DESNUTRIDO**

Gaiola:  
Data de nasc. mãe:  
Data de nasc. filhotes/dia da semana :  
Data desmame (D)/dia da semana:  
Dieta: LABINA

Data	D	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Animal\Dias	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
1	x																				
2	x																				
3	x																				
Data																					
Animal\Dias	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	75	77	78	79	80	81	82	83	84
1																					
2																					
3																					
Data																					
Animal\Dias	85	86	87	88	89	90															
1																					
2																					
3																					

# **ANEXO**

**ANEXO A** – Documento de aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pernambuco.

**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Ciências Biológicas**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 12 de maio de 2009

Ofício nº 147/09

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE  
Para: **Profº. José Luiz de Lima Filho**  
Departamento de Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - CCB  
Processo nº 23076.005556/2009-51

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado *“Diferenciação / Proliferação de células – Tronco Mesenquimais em osteoblastos de ratos submetidos à desnutrição neonatal .”*

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Observação: Aluna do mestrado: Alice de Andrade Bezerra  
Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição;  
Animal; Ratos albinos Wistar; Sexo: Machos; Idade: 90 dias ;  
Número de animais previsto no protocolo: 32 animais.

  
Prof. Maria Teresa Jansen  
Presidente do CEEA  
UFPE

CCB: Integrar para desenvolver

## The Journal of Nutritional Biochemistry

### Guide for Authors



The editors of *The Journal of Nutritional Biochemistry (JNB)* welcome the submission of original manuscripts on experimental and clinical nutrition as it interfaces with biochemistry, molecular biology, physiology, pharmacology, and toxicology. The scope of the journal includes the broad area of *in vitro* and *in vivo* studies of mechanistic aspects of nutritional sciences. The criteria for acceptance of papers submitted for publication are originality, quality and clarity of the content. Each manuscript is internally reviewed and prioritized before a full external review takes place. All contributions must be based on original, unpublished research and will be peer reviewed. All authors bear responsibility for ensuring the integrity and quality of their reported research. It is the author's responsibility to secure permission to use figures or tables that have been published elsewhere.

Contributions may be classified as original research, review, rapid communication or methodological articles. Most review articles are invited by the editor. Authors interested in submitting a review article should contact the editorial office. Rapid publication of original manuscripts is a goal of the journal. Manuscripts must be written in English. Each manuscript is considered for publication with the understanding that it has not been submitted to any other journal. Upon acceptance for publication, papers are subject to editorial review and revision.

#### Contact Address:

Dr. Bernhard Hennig, Editor-in-Chief  
The Journal of Nutritional Biochemistry  
University of Kentucky  
900 Limestone Street  
Rm. 599 Wethington Health Sciences Building  
Lexington, KY 40536-0200  
E-mail address: JNB@uky.edu  
Fax: 859-257-1811

#### Submission Guidelines

All manuscripts must be submitted via the Elsevier Editorial System (EES) at <http://ees.elsevier.com/jnb/>. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status or journal procedures to the Editorial Office (JNB@uky.edu). All correspondence regarding submitted manuscripts will be through e-mail. Authors who are unable to provide an electronic version or have other circumstances that prevent online submission must contact the Editorial Office prior to submission to discuss alternate options.

A manuscript submission through EES consists of a minimum of three distinct files: a cover letter; 3-5 suggested reviewers; and the manuscript. EES accepts files from a broad range of word processing applications. All three files must be typed in 12-point type, double-spaced with one-inch margins, and all pages should be numbered consecutively. The file should follow the general instructions on style/arrangement, and, in particular, the reference style. The file should use the wrap-around end-of-line feature, i.e., returns at the end of paragraphs only. Place two returns after every element, such as title, headings, and paragraphs.

In addition, Tables and Figures should be included as separate, individual files.

Revised manuscripts should also be accompanied by a file (separate from the cover letter) with responses to reviewers' comments. All files should be labeled with appropriate and descriptive file names (e.g., SmithText.doc, Fig1.eps, Table3.doc). The text, tables and graphics must be submitted as separate files. Complete instructions for electronic artwork submission are accessible via the JNB home page (<http://journals.elsevierhealth.com/periodicals/jnb/>). The web site guides authors through the creation and uploading of the various files. The preferred file format is **Microsoft Word**. Please note that PDF files are not allowed for submission. When the submission files are uploaded, the system automatically generates an electronic (PDF) proof which is then used for review.

### **Cover Letter**

Provide a cover letter indicating the name, mailing address, telephone, fax number, and e-mail address of the corresponding author. The cover letter must state that: all authors listed have contributed to the work, all authors have agreed to submit the manuscript to JNB, no part of the work has been published before, except in abstract form, and all human and animal studies have been reviewed by the appropriate ethics committees. All authors listed in a manuscript submitted to JNB must have contributed substantially to the work, participated in the writing of the manuscript, and seen and approved the submitted version. All individuals who have contributed to the writing of the manuscript must be listed as authors. The editor reserves the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements.

### **Suggested Reviewers**

Provide a list of 3 to 5 suggested reviewers for your manuscript. Please be sure to give complete contact information with the e-mail address being the most important.

### **Manuscript Outline**

The manuscript should include the text, references, and figure/ table legends. Do not include the figures or tables in this file.

#### *Title page*

Please provide the following:

- The first name, middle initial, and the last name of all authors
- The name and address of the corresponding author to whom reprint requests should be sent
- Each author's institutional affiliation(s)
- A running title of up to 50 characters;
- Grants, sponsors, and funding sources
- Up to six key words

#### *Abstract*

- Provide an abstract of a single paragraph with up to 250 words summarizing the hypothesis tested, experimental design, results, and conclusions. Do not cite references and avoid abbreviations.

#### *Text*

- Start the text on a new page. Arrange the text into four parts: Introduction, Methods and Materials, Results, and Discussion.

#### *SI Units*

- All laboratory data should be presented in SI units. See Young, DS. Implementation of SI

units for clinical laboratory data. *J Nutr Biochem* 1990; 1: 599-633.

### References

- References should follow the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals". References should be numbered sequentially in the order of their citation in the text, e.g., [1, 2], and appear at the end of the main text. Style references as follows:

#### *For journal articles:*

Brown M, Evans M, McIntosh M. Linoleic acid partially restores the triglyceride content of conjugated linoleic acid-treated cultures of 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr Biochem*. 2001;12:381-7.

#### *For article or chapter in edited book:*

Hennig B, Toborek M, Boissonneault GA. Lipids inflammatory cytokines, and endothelial cell injury. In: Gershwin ME, German JB, Keen CL, editors. *Nutrition and Immunology: Principles and Practice*. New Jersey: Humana Press Inc.; 2000. pp. 203-20.

#### *For books:*

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000 [chapter 11].

### Illustrations

To properly submit digital artwork, please see "Artwork Instructions" on <http://ees.elsevier.com/jnb/> or <http://authors.elsevier.com> for details on image formats, sizing, naming conventions, preparation, and file delivery of your digital artwork. Digital artwork that does not conform to these instructions will be rejected.

### Supplemental Data

Supplemental data will include parts of the manuscript that are not essential for the hard-copy version of *JNB*, but will be available with the electronic version of the manuscript. This may include microarray data, large or oversize figures and extensive tables. Authors are encouraged to designate material for on-line use only; in communication with the authors, the Editors also reserve the right to suggest and decide what parts of the manuscript can be online-only.

### Revised Manuscripts

Please provide a separate file that clearly addresses the reviewers concerns. In the letter that describes the responses to the reviewers' comments, changes made in the revised manuscript must be clearly identified with page and line numbers. Once a revised manuscript is accepted for publication, a proof is prepared and submitted for final review to the corresponding author. Subsequently, the corrected proof will be published in *JNB* online as an 'article-in-press' available for immediate citation. The authors are solely responsible for the accuracy of their articles. Once a manuscript is selected for inclusion in an issue, the article will be updated with volume, issue, and page information.

### Scientific Correspondence

Letters to the Editor will be considered for publication at the discretion of the editor. Submission of a letter constitutes permission for publication. Letters are subject to editing and abridgement.

## **Reprints**

An order form will be sent to the corresponding author from the publisher at the time your manuscript begins production.

## **Conflict of Interest Policy**

Authors are required to disclose commercial or similar relationships to products or companies mentioned in or related to the subject matter of the article being submitted. Sources of funding for the article should be acknowledged in a footnote on the title page. Affiliations of authors should include corporate appointments relating to or in connection with products or companies mentioned in the article, or otherwise bearing on the subject matter thereof. Other pertinent financial relationships, such as consultancies, stock ownership or other equity interests or patent-licensing arrangements, should be disclosed to the Editor-in-Chief in the cover letter at the time of submission. Such relationships may be disclosed in the Journal at the discretion of the Editor-in-Chief in footnotes appearing on the title page.

## **Copyright**

All manuscripts accepted for publication become the sole property of the Publisher. Before publication authors are requested to assign copyright to Elsevier. As an author, you retain rights for large number of author uses, including use by your employing institute or company. These rights are retained and permitted without the need to obtain specific permission from Elsevier. The copyright transfer form is sent to authors with proofs.

## **Sponsored Articles:**

The Journal of Nutritional Biochemistry offers authors or their institutions the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please [click here](#).

*Updated September 2009*