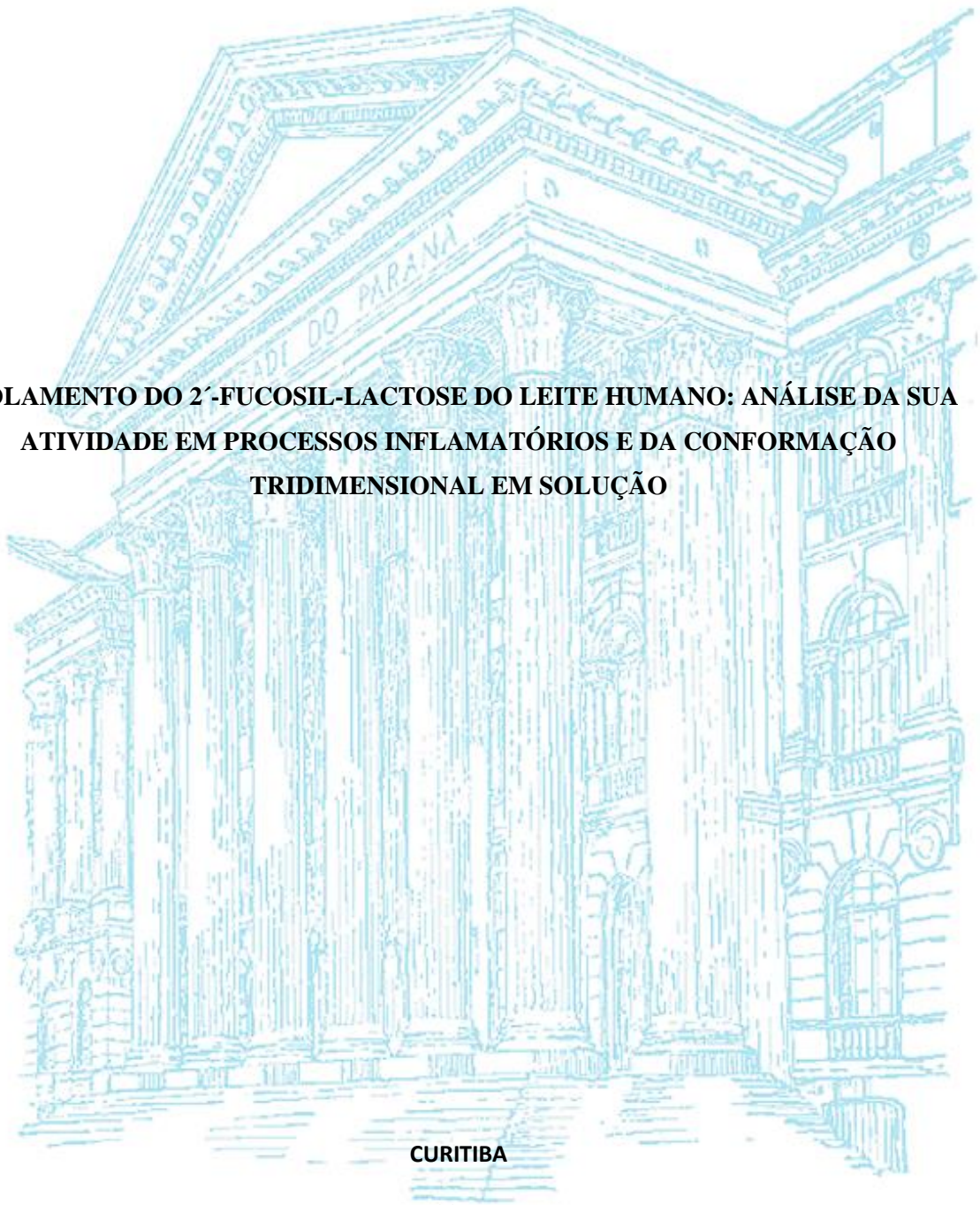


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BERNARDO FREIRE STARLING SOARES

**ISOLAMENTO DO 2'-FUCOSIL-LACTOSE DO LEITE HUMANO: ANÁLISE DA SUA
ATIVIDADE EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E DA CONFORMAÇÃO
TRIDIMENSIONAL EM SOLUÇÃO**



CURITIBA

2017

BERNARDO FREIRE STARLING SOARES

ISOLAMENTO DO 2'-FUCOSIL-LACTOSE DO LEITE HUMANO: ANÁLISE DA SUA
ATIVIDADE EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E DA CONFORMAÇÃO
TRIDIMENSIONAL EM SOLUÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Matrícula no curso: 04/2015

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

Co-orientador: Dr. Arquimedes Paixão de Santana Filho

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Soares, Bernardo Freire Staring

Isolamento do 2-fucosil-lactose do leite humano análise da sua
atividade em processos inflamatórios e da conformação tridimensional em
solução / Bernardo Freire Staring Soares – Curitiba, 2017
83 f il , 30cm

Orientador Guilherme Lanzi Sassaki

Coorientador Arquimedes Paixão de Santana Filho

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

1 Oligossacarídeos 2 Leite humano I Título II Sassaki, Guilherme
Lanzi III Santana Filho, Arquimedes Paixão de IV Universidade Federal
do Paraná Setor de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica

CDD (20 ed) 574 19247815



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROVINCIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a seleção da Dissertação de Mestrado de **BERNARDO FREIRE STARLING SOARES** intitulada: **ISOLAMENTO DO 2^o PICO NIL-LACTOSE DO LEITE HUMANO: ANÁLISE DA SUA ATIVIDADE EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E DA CONFORMAÇÃO TRIDIMENSIONAL EM SOLUÇÃO**. Após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

CURITIBA, 29 de Março de 2017.


GUILHERME LANZI SASSARI
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


ANDERSSON BARBON
Avaliador Externo (UFPR)


TIVALES RICARDO CIPRIANI
Avaliador Interno (UFPR)

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

Co-orientador: Dr. Arquimedes Paixão de Santana Filho

**Dedico este trabalho a todos que
estiveram juntos nesta jornada!**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. De forma especial ao Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica – UFPR pela oportunidade e suporte durante a jornada. Ao Prof. e Orientador Dr. Guilherme L. Sasaki pelos ensinamentos, contribuindo para o meu crescimento científico e pessoal, sempre mostrando que algo diferente pode ser feito. Ao Co-Orientador Dr. Arquimedes Paixão de Santana Filho, pela disponibilidade em me orientar, e por toda paciência e suporte, não só comigo mas com todos do nosso Programa. Ao Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani, pelo acompanhamento, avaliações e ideias para o trabalho, participando da banca interna durante o Mestrado, além de integrar a banca de avaliação deste trabalho e me mostrar, durante sua disciplina, o verdadeiro espírito da docência. Ao pesquisador Prof. Dr. Anderson Barison do Departamento de Química – UFPR por integrar a banca de avaliação deste trabalho e estar sempre presente no Laboratório de RMN nos passando um pouco de sua experiência. Aos profs Dr. Lauro Mera de Souza, Dr. Marcelo Muler, Dr. Wanderson Duarte da Rocha, Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti, Dr. Claudio da Cunha, Dra. Rose Adele Monteiro, Dra. Maria Eliane Merlin Rocha, Dra. Lucimara Mach C. Cordeiro, Dra. Glaucia R. Martinez, Dr. David Alexander Mitchell, Dr. Marcello Iacamoni, que ao me passarem um pouco de seus conhecimentos durante as aulas das disciplinas do programa, ou mesmo em conversas de corredores, me apresentaram novas e diferentes visões intelectuais e que acabaram contribuindo de alguma forma para este trabalho. O prof. Dr. Francisco Santos por ajudar na minimização de estruturas moleculares utilizadas em estudos de comparação. Aos meus pais que sempre me apoiaram. À toda minha família, por toda torcida e incentivo. Aos amigos que conquistei dentro do Programa, Alexandre Kimura, Rosane Bagatin, Rafael Klostehoff, Kahlile Abboud, Daniel Riter, Adriana Cordeiro, Iglesias Bezerra, Juliane Carlotto, Adamara Machado, Gabriel, Thaisa Moro, Yony Román, Valquíria Casanova, Geórgia Erdmann, Ana Flávia de Oliveira, Liana Inara, Alexandro Nogueira, Ester Mazepa, Camila Tamiello, Luis Paulo Alves, Cícero Silvano, Marco Aurélio Oliveira, Ana Helena Gracher, Anelis Marin, Melina Seyfried, Maritza Todo Bom, Caroline Kukulj, Helyn Barddal, Fhernanda Smiderle, Pedro Chaves, Helen Abreu, Elori Mieko, Fernando Diego Kaziuk, André Oliveira, Lucas Giovanni, Jonathan Duarte, Victor Stoco. A todos os amigos de BH. E a todos os demais amigos e colega do Grupo de Química de Carboidratos-UFPR. Além disto, gostaria de agradecer a todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR. À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

NOTA EXPLICATIVA

Esta tese é apresentada em formato alternativo, inserindo-se o artigo desenvolvido no decorrer do Mestrado, de acordo com as normas do Programa de Pós Graduação em Ciências – Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná.

RESUMO

Oligossacarídeos do leite humano (HMOs) apresentam alta homologia com a superfície celular, já que sua biossíntese é feita a partir de mecanismos semelhantes ao da produção de glicolípídeos e glicoproteínas presentes nas células epiteliais. Conhecidas funções dos HMOs já foram relacionadas, dentre elas as principais são: 1- sua capacidade em promover o crescimento da microbiota do neonato 2- competir com a mucosa intestinal pela ligação bacteriana 3- promover a defesa do hospedeiro. No presente trabalho, foi avaliada a atividade anti-inflamatória do 2'-FL (2'- fucosil-lactose) e realizados ensaios de *Docking* e determinação da conformação absoluta em solução por RMN (ressonância magnética nuclear) desta molécula além do isolamento de outras frações oligossacarídicas. Para o isolamento dos oligossacarídeos foi, primeiramente, realizado um processo de deslipidificação através de centrifugação a 12.000 rpm na temperatura de 4 °C. Feito isso, o material foi submetido à precipitação etanólica (2:1, v/v) para a remoção de proteínas, onde o sobrenadante foi então coletado e liofilizado, sendo então submetido ao processo de fracionamento através de cromatografia líquida, em uma coluna de 30 × 4 cm (70 mL) utilizando como fase estacionária carvão ativado-150 *mesh* e celite 545 (1:1). Como fase móvel, um gradiente contínuo de H₂O:EtOH, variando de 100:0 até 40:60 foi utilizado. Após esta etapa, visando diminuir o conteúdo de lactose, as amostras contendo HMOs foram submetidas à cromatografia em coluna de sílica. Neste primeiro processo foi obtida uma quantidade significativa de 2'-FL, porém para a purificação do LDFT foi ainda realizada fracionamento por cromatografia líquida de troca iônica DEAE-Sepharose (Dietilaminoetil Sepharose) utilizando H₂O inicialmente e depois uma solução de H₂O:Íon amônio como fase móvel. Os oligossacarídeos então isolados foram avaliados quanto a sua capacidade pró e anti-inflamatória, através da análise de suas capacidades em estimular receptores TLR (receptores do tipo *Toll like*). Quando comparado com o tratamento com LPS (Lipopolissacarídeo) (controle positivo) o 2'-FL na concentração de 0,02 mg/mL diminuiu o processo inflamatório 26,26%; 0,2 mg/mL em 24,18%; 2 mg/mL em 31,63%. Mostrando assim a capacidade anti-inflamatória deste HMO. Além disto, a partir da caracterização estrutural e estudos conformacionais por RMN verificou-se uma estrutura semelhante a anzol para o 2'-FL. Ensaios de *Docking* foram realizados, onde foram encontrados possíveis sítios de ligação, comprovando assim a possibilidade de interação entre receptores TLR (receptor do tipo *Toll 4*) e 2'-FL.

Palavras-chave: Oligossacarídeos do leite humano, TLR, atividade biológica, RMN, *Docking*.

ABSTRACT

Human milk oligosaccharides (HMOs) bare high homology to cellular surface in part because their biosynthesis occurs with great similarity to glycolipids and glycoproteins production mechanisms. Evidences present three major functions to these oligosaccharides; 1- prebiotic action for infant gut; 2- pathogen anti-adhesive barrier; 3- immunomodulatory activity. In the presented work were evaluated the anti-inflammatory activity of 2'-FL (2 fucosyllactose) and undertaken Docking and conformation NMR assays. The first step of the isolation process was deslipidification through centrifugation process at 12.000 rpm at 4 °C. After that, the material was subjected to an ethanolic precipitation (2:1, v/v) aiming the protein removal where the supernatant was collected and freeze-dried. The next step was the utilization of a 30 X 4 cm (70 mL) column of activated-charcoal 150 mesh and celite 545 (1:1) seeking to obtain different fractions. A continuum gradient of H₂O:EtOH was used varying from 100:0 to 40:60 as mobile phase. In this stage, a great quantity of 2'-FL was obtained but to achieve the LDFT fraction purification a further step was necessary. Willing to obtain LDFT, an ionic DEAE Sepharose (GE Healthcare) column was utilized with an initial water elution and later a water solution with a 2% content of amonium ion. 2'-FL was then evaluated to its pro and anti-inflammatory capacity through the magnitude of activation of NF-κB by QUANTI-Blue measurement. When compared to the LPS treatment (positive control) 2'-FL at 0.02 mg/mL lessen the inflammatory activity by 26.26%; 0.2 mg/mL by 24.18%; 2 mg/mL by 31.63%. This result shows the anti-inflammatory capacity of this HMO. Besides this, Docking and conformational NMR assay proved the interaction between TLR4 (*Toll like* receptor 4) and 2'-FL and present a fish hook like structure for 2'-FL.

Key words: Human Milk Oligosaccharides, TLR, NMR, Docking, Biological activity.

LISTA FIGURAS

Dissertação

Figura 1. Comparação da composição do leite bovino e leite humano.....	17
Figura 2. Estruturas principais dos oligossacarídeos do leite humano.....	20
Figura 3. Biossíntese da fucose.....	23
Figura 4. Principais ações dos oligossacarídeos do leite.....	26
Figura 5. Estrutura 2'-FL.....	29
Figura 6. Mecanismo proposto para modulação da inflamação através da ação do 2'-FL.....	29

Artigo

Figure 1. (a) ¹ H NMR spectra of the fractions obtained after the chromatographic procedure.(b) Gradient profile.....	42
Figure 2. ¹ H-NMR spectra.....	43
Figure 3. Detailed 2'-FL ¹ H spectra and the integration peaks.....	43
Figure 4. NMR spectra regions	43
Figure 5. MS spectra.....	44
Figure 6. Neutral tetra/tri oligosaccharides fraction 2D edited-HSQC NMR spectra.....	44
Figure. 7. Graph of MTT assay after 24 h.....	46
Figure. 8. Graph of MTT assay after 48 h.....	46
Figure 9. Percent inhibition values represented here are a reflection of treatments with 2'-FL..	47
Figure 10. Affinity bindings and distance from best mode Docking	47
Figure 11. Fish hook like structure for 2'-FL in solution (NMR experimental model).....	48
Figure 12. Example of TLR4-2'-FL binding.....	48

LISTA TABELAS

Dissertação

Tabela 1. Concentrações de HMOs neutros em diferentes estágios de amamentação..... 20

Tabela 2. Estrutura e concentração dos principais HMOs fucosilados..... 24

Artigo

Table 1. ^1H , ^{13}C and OH NMR assignments of 2'-FL 44

Table 2. Comparison between all structure distances..... 45

Table 3. Selected Intraglycosidic Proton–Proton Distances for 2'-FL..... 45

Table 4. Selected Interglycosidic Proton–Proton Distances for 2'-FL..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E TERMOS

2'-FL (2'- fucosillactose)

3'- SL (3'-sialillactose)

6'- SL (6'-sialillactose)

CD14 (cluster de diferenciação14)

CD40L (ligante do cluster de diferenciação 40)

Células do intestino delgado isoladas de porco (BBMV)

Cromatografia aniônica de alta resolução com detecção de pulso amperométrico (HPAEC-PAD)

DC (células dendríticas)

DEAE-Sepharose (Dietilaminoetil Sepharose)

D-galactose (Gal)

D-glucose (Glc)

DINUCLEOTÍDEO adenina niconitinamida fosfato (NADPH)

Fator de transformação do crescimento β (TGF- β)

GC (cromatografia gasosa)

GDP (guanosina difosfato)

GDP-ceto-6-desoximanose 3,5-epimerase, 4-redutase (proteína FX)

GDP-fucose (guanosina difosfato fucose)

GDP-manose 4,6-desidratase (GMD)

HPLC (cromatografia líquida de alta performance)

HPLTC (cromatografia de camada delgada de alta performance)

IEC's (células epiteliais intestinais)

Interleucina 1 β (IL-1 β)

Interleucina 6 (IL6)

Interleucina 8 (IL8)

Ionização em pressão atmosférica (API)

Ionização por eletrospray (ESI)

kDa quilodalton

LDFT (lactodifucotetraose)

L-fucose (Fuc)

LNFP 1 (lacto-Nfucopentaose tipo 1)

LNFP 2 (lacto-Nfucopentaose tipo 2)

LPS (Lipopolissacarídeo)

MALDI-MS (espectrometria de massa através de ionização e dessorção a laser assistida por matriz)

MD2 (proteína acessória),

MLN (linfonodo mesentérico)

MS (espectroscopia de massa)

MW massa molecular

N-acetilgalactosamina (GalNAc)

N-acetilglucosamina (GlcNAc)

N-acetilneuramínico (Neu5Ac)

NF- κ B (fator nuclear kappa b)

N-glicolilneuramínico (Neu5Gc)

Oligossacarídeos leite humano (HMOs)

Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs)

Padrões por receptores (PPRs)

RANTES (regulador da atividade normal de célula T expressa e secretada)

receptores do tipo *Toll*-like (TLRs)

Receptores TLR (receptores do tipo *Toll like*)

RMN (ressonância magnética nuclear)

sCD40L (ligante solúvel ao CD40)

SOCS2 (supressor da sinalização por citocinas)

TCA (tricloroacético)

TFiLNO (Trifucosil (1,2-1,2-1,3)-iso-lacto-N-octoase)

Th1 (linfócito T auxiliar tipo 1)

Th17 (linfócito T auxiliar tipo 17)

TIR (*Toll*-IL-1 receptor)

TLC (cromatografia em camada delgada)

TLR3 (receptor do tipo *Toll* 3)

TLR4 (receptor do tipo *Toll* 4)

TLR5 (receptor do tipo *Toll* 5)

TMSP (2,2,3,3-tetradeuterium-3-trimetilsililpropionato)

UDP-galactose (uridina difosfato galactose)

Unidades arbitrárias (abu)

α (1,2)-fucosiltransferase (FUT2)

α (1,3/4)-fucosiltransferase (FUT3)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. LEITE HUMANO.....	16
2.2. OLIGOSSACARÍDEOS DO LEITE HUMANO (HMOs).....	18
2.3. VIAS DE BIOSÍNTESE DA FUCOSE.....	20
2.4. BIOSÍNTESE DE HMOs FUCOSILADOS.....	23
2.5. ATIVIDADES ATRIBUÍDAS AOS HMOs.....	24
2.6. ABSORÇÃO DE HMOs.....	26
2.7. PROPRIEDADES PRÓ/ANTI-INFLAMATÓRIO 2'FL E LDFT.....	27
2.8. ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE HMOs.....	30
2.8.1. ISOLAMENTO.....	30
2.8.2. SEPARAÇÃO DOS DIFERENTES COMPONENTES OLIGOSSACARÍDEOS.....	32
2.8.3. ANÁLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS ISOLADOS.....	33
2.8.4. ANÁLISE DA CONFORMAÇÃO TRIDIMENSIONAL DE OLIGOSSACARÍDEOS EM SOLUÇÃO.....	34
3. JUSTIFICATIVA.....	35
4. OBJETIVOS.....	36
4.1. OBJETIVO GERAL.....	36
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL E METODOLOGIA.....	37
6. ARTIGO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXOS.....	60

1. INTRODUÇÃO

O leite é, para o mamífero recém-nascido, sua fonte fundamental de nutrientes. Cada espécie possui um leite que é especialmente desenvolvido para suprir todas as necessidades de sua prole, sendo assim um alimento completo e específico para cada espécie (EMMETT; ROGERS, 1997). O conteúdo de carboidratos do leite, considerado no passado principalmente do ponto de vista energético, por se apresentar como o principal alimento dos mamíferos nos primeiros momentos da vida, vem atualmente sendo colocado em debate pelo seu possível papel como alimento funcional de defesa do neonato (HUESO et al., 2005).

Apesar das imunoglobulinas serem vistas como o principal fator de defesa presente no leite, o mesmo contém outros fatores antimicrobianos que protegem o neonato contra as infecções mais comuns, sendo assim crucial para a sua sobrevivência enquanto o seu sistema imune ainda está em desenvolvimento. O aleitamento materno tem como principais funções: fortalecer a imunidade, manter o crescimento e desenvolvimento normais, melhorar o processo digestivo, além de favorecer o vínculo mãe-filho e facilitar o desenvolvimento emocional, cognitivo e do sistema nervoso (HUESO et al., 2005).

Contendo quantidade diferenciada de oligossacarídeos (12 a 14 g/L) o leite humano possui em sua composição representantes desta classe tanto na forma neutra (90%) quanto na forma sialilada (10%) (KUNZ et al., 1999). D-glucose (Glc), D-galactose (Gal), L-fucose (Fuc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc) e ácido siálico podem compor oligossacarídeos encontrados no leite (EGGE; 1993). O ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) se apresenta como o ácido siálico predominante entre os oligossacarídeos do leite, apesar de ocasionalmente, o ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) (VEH et al., 1981) e ácido 4-, 7-, ou 8-O-acetil-N-acetilneuramínico (MESSER, 1974) serem também encontrados em leite de diferentes espécies.

A lactose é alongada através da incorporação enzimática de GlcNAc a um resíduo de Gal em ligações $\beta 1 \rightarrow 3$ ou $\beta 1 \rightarrow 6$. Após a incorporação deste resíduo, Gal também pode ser ligada por ligações $\beta 1 \rightarrow 3$ ou $\beta 1 \rightarrow 4$ aos resíduos de GlcNAc. Ligações posteriores de Fuc, conectadas por ligações $\alpha 1 \rightarrow 2$, $\alpha 1 \rightarrow 3$, ou $\alpha 1 \rightarrow 4$, e/ou ácido siálico em ligações $\alpha 2 \rightarrow 3$ ou $\alpha 2 \rightarrow 6$ em posições terminais, completam o processo de síntese de oligossacarídeos. O grau de polimerização destes monômeros variam de 3 (monofucosilactoses ou monosialilactoses) a 13 (penta-fucosialilactose-N-octoses) (STAHL et al., 1994). A proporção entre os oligossacarídeos fucosilados, sialilados

e não-sialilados neutros no leite humano é apresentada como 35-50%, 12-14%, 42-55%, respectivamente (KUNZ; RUDLOFF, 1993; TOTTEN et al., 2012).

HMOs são abundantemente encontrados no leite humano e estudos recentes demonstram não serem digeríveis pelos humanos, gerando assim evidências que sugerem pelo menos três principais funções destes carboidratos (COPPA et al., 2001; RUDLLOF et al., 1996). Primeiramente, eles promovem o crescimento da microbiota, geralmente dominada por bifidobactérias. Segundo, HMOs (principalmente suas estruturas fucosiladas) imitam as glicanas da superfície das células hospedeiras funcionando assim como receptores solúveis análogos que competem com a mucosa intestinal pela ligação bacteriana, prevenindo assim a adesão do patógeno e sua possível translocação. Em terceiro, glicanas do leite auxiliam na defesa do hospedeiro a partir da modulação da imunidade, mimetizando a barreira intestinal (SMILOWITZ et al., 2014).

A amamentação é associada com a diminuição do risco de doenças inflamatórias infecciosas. 2'-FL, sendo o principal trissacarídeo componente do leite humano, tem a capacidade de isoladamente inibir a sinalização pró-inflamatória induzida pelo pili tipo 1 da bactéria *Escherichia coli* ou por LPS (Lipopolissacarídeo) a partir da supressão da expressão de CD14 (cluster de diferenciação 14) em IEC's (células epiteliais intestinais) (HE et al., 2014). O LPS para efetuar sua ação deverá ativar um receptor que na verdade é um complexo formado pela proteína ligante de LPS, MD2 (proteína acessória), CD14 e TLR4 (receptor do tipo *Toll* 4) (LU, et al., 2008), sendo assim essencial para o reconhecimento e ligação do LPS, que irá induzir uma cascata inflamatória (SHIMAZU; 1999). Já o 3'-SL (3'-sialillactose) demonstrou estimular diretamente DC (células dendríticas) de MLN (linfonodo mesentérico), ocasionando assim inflamação dependente de TH1 (linfócito T auxiliar tipo 1) e TH17 (linfócito T auxiliar tipo 17) através da geração de citocinas que estimulam esta diferenciação a partir de linfócitos T do tipo virgem (KURAKEVICH et al., 2013).

A resolução de importantes problemas em bioquímica envolve a necessidade da obtenção de dados estruturais precisos sobre a estrutura tridimensional completa de biomoléculas como proteínas, polissacarídeos, glicoproteínas, lipoproteínas e, em alguns casos, glicolipídeos. Para a elucidação completa das estruturas tridimensionais refinadas de macromoléculas são necessários dados experimentais que forneçam uma resolução próxima à da resolução atômica, dados estes que são fornecidos quase que exclusivamente por duas técnicas físico-químicas: Cristalografia por difração de raio X e espectroscopia de RMN (SNYDER et al., 2005). O estudo da estrutura tridimensional refinada de macromoléculas em solução por meio de técnicas de espectroscopia

de RMN fornece resultados mais aproximados no que concerne ao comportamento dessas macromoléculas no ambiente intra e extracelular. A técnica de espectroscopia de RMN não depende da obtenção de cristais das macromoléculas, assim a aquisição dos dados pode ser realizada em condições fisiológicas similares às do ambiente funcional da macromolécula (JUNG e LEE, 2004; KOVACS et al., 2005).

Assim, este trabalho tem como objetivo descrever técnicas para isolamento de oligossacarídeos do leite humano de forma a possibilitar a avaliação de suas atividades pró/anti-inflamatórias, caracterizar a estrutura tridimensional destes HMOs, em especial do 2'-FL, em solução a partir de técnicas de RMN e apresentar ensaios de *Docking* que demonstrem a interação 2'FL-TLR.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. LEITE HUMANO

Considerado como pioneiro na área de estudo de carboidratos do leite está o trabalho conduzido Polonvski e Lespagonol em 1930. Estes autores isolaram um oligossacarídeo redutor levorotatório, que os mesmos nomearam de gynolactose. A partir deste trabalho, vários laboratórios ao longo do mundo têm direcionado seus esforços em descrever oligossacarídeos provenientes do leite de vários tipos de mamíferos. (HUESO et al., 2005).

O leite é definido como uma secreção de pH neutro proveniente da glândula mamária de mamíferos, sendo uma emulsão de gorduras em água, estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas em uma solução de sais, vitaminas, peptídeos, lactose, oligossacarídeos, caseínas e outras proteínas. Além disto, contém, também, enzimas, anticorpos, hormônios, pigmentos, células, gases e nitrogênio (ABREU, 2008). Para o mamífero recém-nascido é sua fonte fundamental de nutrientes e o de cada espécie é especificamente desenvolvido para suprir todas as necessidades de sua prole, sendo assim um alimento completo e específico para cada espécie (EMMETT; ROGERS, 1997). Contém diferentes fatores antimicrobianos que protegem o neonato contra infecções sendo assim crucial para a sua sobrevivência enquanto está em fase inicial de desenvolvimento. O principal fator transferido para o leite são as imunoglobulinas, oriundas de sua mãe, entretanto outros fatores cooperam conjuntamente na defesa do neonato, incluindo

proteínas (lactoferrina e lisozimas), glicolípídeos e carboidratos (NEWBURG, 1996). Sendo assim, o aleitamento materno fortalece a imunidade, mantém o crescimento e desenvolvimento normais, melhora o processo digestivo no sistema gastrointestinal, favorece o vínculo mãe-filho e facilita o desenvolvimento emocional, cognitivo e do sistema nervoso (HUESO et al., 2005).

Já o conteúdo de carboidratos do leite, apesar de ter sido considerado no passado principalmente pelo ponto de vista energético, vem atualmente sendo colocado em debate pelo seu possível papel como alimento funcional de defesa do neonato (HUESO et al., 2005). Tanto que bebês que receberam amamentação apresentam menor risco de doenças infecciosas e inflamatórias, já que além dos nutrientes, o leite humano contém moléculas que modulam sua maturação imunológica e o desenvolvimento de sua mucosa intestinal. Além disso, a concentração de lactose parece apresentar relação com o desenvolvimento do sistema nervoso central (NEWBURG, 2015). Sendo o principal constituinte, na maioria dos mamíferos placentários, o dissacarídeo lactose apresenta concentração variável no leite de acordo com a espécie de mamífero. O conteúdo de lactose no leite humano varia de 62 a 67 g/L enquanto o leite bovino apresenta 45 a 50 g/L (Figura 1), enquanto nos elefantes 25 a 30 g/L (HUESO et al., 2005; KUNZ, 1999). Diferentes mamíferos apresentam características distintas na composição de seus leites, por exemplo, o leite de marsupiais não contém lactose livre, mas sim sacarídeos derivados de 3' galactosil-lactose, já o leite de monotremos (mamíferos cujo desenvolvimento embrionário ocorre em ovos) contém baixo conteúdo de lactose e altas concentrações de oligossacarídeos. Os equídeos, por sua vez, secretam somente de 8% lactose, com o restante da composição possuindo 50% de sialilactose, 26% fucosilactose, e 13% de difucosilactose, enquanto o leite do onitorrinco apresenta alta concentração de difucosilactose (HUESO et al., 2005).

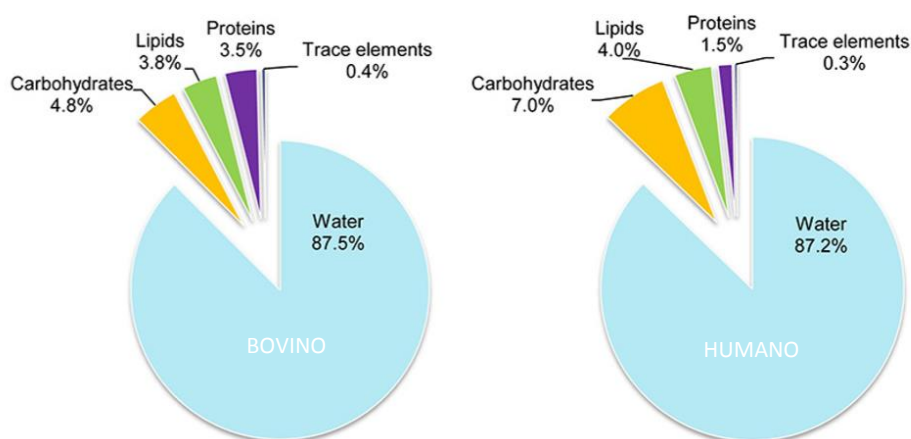


Figura 1- Comparação da composição do leite bovino e leite humano. FONTE: HENNET, 2014.

2.2. OLIGOSSACARÍDEOS DO LEITE HUMANO (HMOs)

O leite humano é único em seu conteúdo de oligossacarídeos (12 a 14 g/L), incluindo tanto neutros (90%) quanto sialilados (10%) na sua composição, sendo comparável somente, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, ao do elefante asiático. Os oligossacarídeos se apresentam como o terceiro componente sólido mais presente no leite humano, ficando atrás somente da lactose e da gordura, e apresenta uma concentração maior até mesmo que a de proteínas, sendo seu conteúdo quase o dobro no colostro (22 a 24g/L) (NEWBURG, 1996; KUNZ et al., 1999).

Denominados como HMOs, estes são abundantemente encontrados no leite humano e são indigeríveis pelos humanos (SMILOWITZ et al., 2014). Estes sacarídeos presentes no leite são principalmente derivados da lactose, quase todos contendo este dissacarídeo em seu terminal redutor (NEWBURG, 1996).

Mais de 100 diferentes tipos de oligossacarídeos ácidos e neutros já foram descritos (EGGE, 1993). Porém, estudos mais recentes utilizando MALDI-MS (espectrometria de massa através de ionização e desorção por laser assistida por matriz) apresentam a possibilidade de que os oligossacarídeos naturalmente encontrados no leite humano possam envolver aproximadamente 900 estruturas moleculares diferentes (STHAL, 1994).

Presentes no leite em sua forma livre, os oligossacarídeos estão presentes nas glicoproteínas e glicolípídeos dos eritrócitos, em tecidos e nos fluidos biológicos - como na saliva, no plasma e nas secreções. Estes apresentam relação com os carboidratos que contem antígenos do grupo sanguíneo de Lewis e do sistema secretor, que são sintetizados por fucosiltransferases em um processo parcialmente determinado geneticamente (EGGE, 1993). Várias glicosiltransferases adicionam uma diversidade de sacarídeos à estrutura da lactose para assim produzirem oligossacarídeos complexos. Estas glicosiltransferases, ou outras enzimas com função semelhante, são citadas como sendo as principais responsáveis pela síntese de glicolípídeos e glicoproteínas nas células epiteliais, sendo assim determinantes para a homologia entre a superfície celular e os oligossacarídeos do leite (NEWBURG, 1997). Estas enzimas parecem ser ativadas com o passar da lactação, já que a excreção de oligossacarídeos se mostra diferente quando se compara o período da gravidez com o período da amamentação (HALLGREN et al., 1977).

D-glucose (Glc), D-galactose (Gal), L-fucose (Fuc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc) (ocasionalmente), e ácidos siálicos podem ser encontrados nos

oligossacarídeos do leite (EGGE, 1993). O ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) se apresenta como o ácido siálico predominante entre os oligossacarídeos do leite, apesar de ocasionalmente, o ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) (VEH et al., 1981) e ácido 4-, 7-, ou 8-O-acetil-N-acetilneuramínico, serem também encontrados (MESSER, 1974).

Os oligossacarídeos são produzidos nos seios da nutriz, nas células que compõem as glândulas mamárias, dentro do Complexo de Golgi. O passo inicial é a síntese da lactose, sendo este processo regulado pela alfa-lactalbumina, que regula a atividade da enzima galactosiltransferase. A partir da reação entre uma UDP-galactose (uridina difosfato galactose) e uma glucose se forma então uma molécula de lactose. A lactose serve, assim, como um precursor para outras transferases (galactosil, N-acetilglucosaminil, fucosil e sialil) adicionarem monossacarídeos, e formar então os oligossacarídeos. Em baixas concentrações de alfa-lactalbumina a enzima galactosiltransferase apresenta baixa capacidade de usar a D-glucose como aceptor. Já com a presença de alfa-lactalbumina no meio, a reação inicial é estimulada e a glucose é assim ligada a galactose, formando assim a lactose. Além disto, a produção de lactose e oligossacarídeos apresenta relação inversa com o tempo de lactação, com a alta produção de oligossacarídeos ocorrendo predominantemente no início da lactação (Tabela 1) (BECKER, 2003).

A lactose pode ser enzimaticamente alongada através da incorporação de GlcNAc a um resíduo de Gal em ligações do tipo $\beta 1 \rightarrow 3$ ou $\beta 1 \rightarrow 6$, e após isto poderão ser adicionadas outras Gal a estas estruturas principais em ligações do tipo $\beta 1 \rightarrow 3$ ou $\beta 1 \rightarrow 4$ (Figura 2). Outro tipo de variação estrutural ocorre a partir de ligações posteriores de Fuc, conectadas por ligações $\alpha 1 \rightarrow 2$, $\alpha 1 \rightarrow 3$ ou $\alpha 1 \rightarrow 4$, e/ou ácido siálico em ligações $\alpha 2 \rightarrow 3$ ou $\alpha 2 \rightarrow 6$ em posições terminais, completando o processo de síntese de oligossacarídeos (Figura 2) (KUNZ; RUDLOFF, 1993; TOTTEN et al., 2012). O grau de polimerização destes monômeros varia de 3 (monofucosilactoses ou monosialilactoses) a 13 (pentafucosilacto-N-octaoses) (STAHL, et al., 1994). A proporção entre os oligossacarídeos fucosilados, sialilados e não-sialilados neutros no leite humano é apresentada como sendo de 35-50%, 12-14%, 42-55%, respectivamente (TOTTEN et al., 2012).

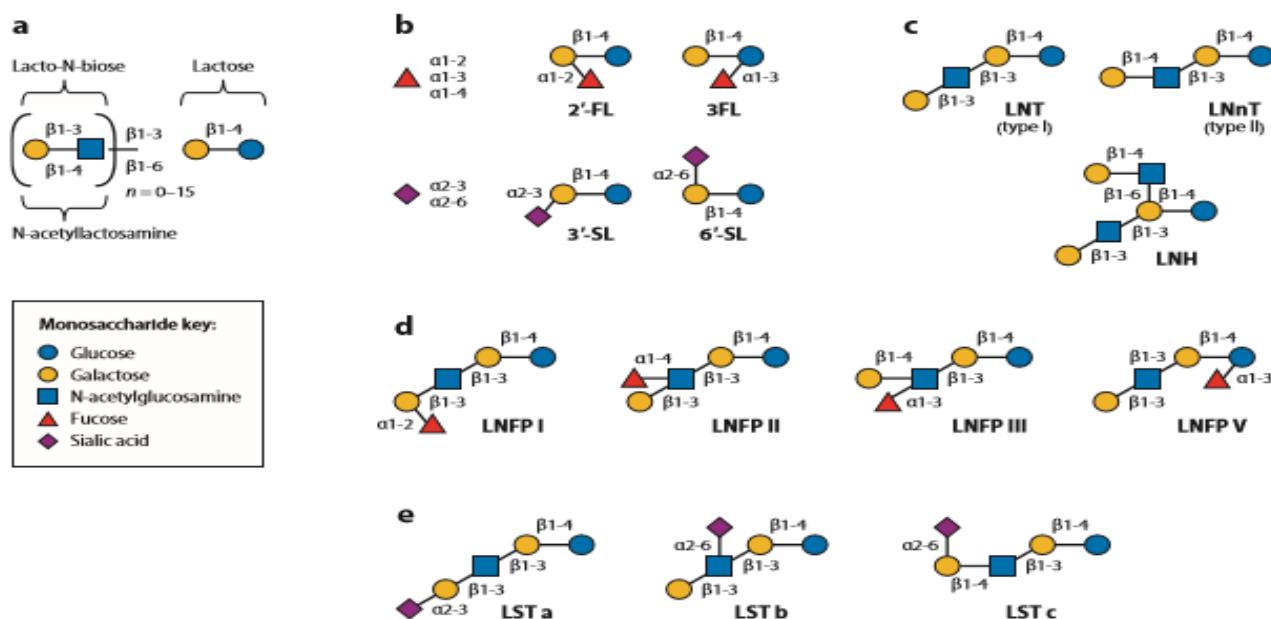


Figura 2. Estruturas dos principais oligossacarídeos do leite humano. FONTE: SMILOWITZ 2014

Days	2'-FL	3-FL	LDFT	LNT	LNnT	LNFP I	LNFP II	LNFP III	LNDFH I	LNDFH II
	<i>g/l</i>									
3	4.13	0.24	0.49	0.55	0.35	2.00	0.14	0.34	1.12	0.10
8	3.37	0.26	0.33	1.10	0.40	2.25	0.23	0.34	1.30	0.17
15	3.04	0.38	0.48	1.07	0.20	1.64	0.29	0.37	1.46	0.23
22	3.02	0.44	0.36	1.12	0.23	1.72	0.30	0.37	1.55	0.26
30	2.96	0.42	0.39	1.00	0.16	1.48	0.24	0.37	1.36	0.24
60	2.82	0.56	0.38	0.71	0.16	1.06	0.18	0.40	1.02	0.19
90	2.59	0.67	0.48	0.61	0.14	0.94	0.17	0.44	1.05	0.17
Mean (secretors)	3.13	0.42	0.41	0.87	0.23	1.58	0.22	0.38	1.28	0.20
Mean (non-secretors)	ND	1.79	ND	1.18	0.08	ND	1.25	0.38	ND	0.45
Mean (Lewis negatives)	4.57	0.15	0.17	0.85	0.23	3.18	ND	0.31	ND	ND

Tabela 1. Concentrações de HMOs neutros em diferentes estágios de amamentação. FONTE: SMILOWITZ 2014

2.3 VIAS DE BIOSÍNTESE DE FUCOSE

L-fucose (6-desoxi-L-galactose) é um monossacarídeo distinto dos principais açúcares de 6 carbonos, já que além de não apresentar hidroxila na posição 6 (C-6) ainda possui a configuração L como sua forma mais comum. Este sacarídeo também é comumente encontrado como componente de N- e O- glicanos e glicolídeos produzidos pelas células de mamíferos, apesar de

estarem presente em quantidades mínimas na dieta dos seres humanos (MOLONEY; HALTIWANGER, 1999).

Modificações específicas em porções terminais de glicanos podem conferir funções únicas aos oligossacarídeos. Entre estas modificações, uma que ocorre com relativa frequência, a fucosilação, tem sido apresentada como importante em uma ampla variedade de processos biológicos (STAUDACHER et al., 1999). Interações proteínas-carboidratos podem estar envolvidas na regulação do reconhecimento da zona pelúcida pelo espermatozoide, onde o epítopo tetrassacarídeo $\text{Fuca}1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3(\text{Fuca}1,4)\text{GlcNAc}$ está presente (SINOWATZ, 1998; LUCAS, 1994). Glicanas fucosiladas também apresentam função na adesão celular mediada por selectinas. Vários estudos indicam que carboidratos $\alpha 1 \rightarrow 3$ -fucosilados e suas variações sulfatadas ou sialiladas funcionam como ligantes para as selectinas (LOWE, 1994). Células neoplásicas, por exemplo, geralmente apresentam modificações no padrão de glicosilação de proteínas, exibindo diferenças em relação aos padrões de ramificação e, na maioria das vezes, também de composição oligossacarídica distintos das células não-tumorigênicas (MURAMATSU, 1993). Por ser importante em processos de adesão e processos patológicos, onde eventos de reconhecimento, invasões virais, bacterianas e de parasitas apresentam relação com estes sacarídeos, atualmente tem se dado grande importância a esta área de estudo (LITINSKI, 1998).

Todas as fucosiltransferases utilizam GDP-fucose (guanósina difosfato fucose) para a construção de oligossacarídeos fucosilados (BECKER, 2003). Esta forma ativada pelo nucleotídeo GDP (guanósina difosfato), onde o GDP se apresenta como um bom grupo de saída, torna a reação a favor da síntese do produto (DAVIES, 2001). Duas vias de síntese já foram descritas para a síntese da GDP-fucose no citosol para praticamente todas as células de mamíferos. Estas são descritas como via “de novo” e via de salvamento (TONETTI et al., 1998). A via “de novo” transforma GDP-manose (guanósina difosfato manose) em GDP-fucose através de três reações enzimáticas realizadas por duas proteínas, a GDP-manose 4,6-desidratase (GMD) e GDP-ceto-6-desoximanose 3,5-epimerase, 4-redutase, também conhecidas como proteína FX. (TONETTI et al., 1996). Já a via de salvamento sintetiza GDP-fucose através de fucose livre derivada de fonte extracelular ou lisossomal. Estudos quantitativos em células da linhagem HeLa indicam que mais de 90% da síntese de GDP-fucose é derivada da via “*de novo*”, mesmo em células em que a fucose radiomarcada foi adicionada ao meio (BECKER 2003).

A via “de novo” para biosíntese de GDP-fucose foi proposta há aproximadamente 40 anos atrás por Victor Ginsburg, o qual em seu trabalho pioneiro demonstrou que a GDP-manose era convertida a GDP-fucose a partir de um ceto intermediário, o GDP-4-ceto-6-desoximanose

(GINSBURG, 1960). A primeira reação na via “de novo” é feita pela GMD, que converte GDP-manose a GDP-4-ceto-6-desoximanose através da oxidação do grupamento hidroxila no carbono 4 do anel de manose, acompanhada da redução de outro grupamento hidroxila em C6. GDP-4-ceto-6-desoximanose produzida pela GMD é, então, convertida a GDP-fucose por uma enzima com dupla funcionalidade, tanto de epimerase quanto de redutase, a proteína FX. Na primeira reação o grupamento hidroxila em C3 e o grupamento C5 da manose são epimerizados para assim gerar GDP-4-ceto-6-desoxigalactose. A atividade redutase da proteína FX então cataliza a transferência de um hidreto do dinucleotídeo de adenina niconitínica fosfato (NADPH) para o C4, gerando assim GDP-fucose (BECKER 2003) (Figura 3).

A nível de regulação, a molécula de GDP-fucose se mostra como um importante inibidor para a GMD, assim demonstrando um modelo de feedback clássico pelo produto final da via. Além disto, transcritos de GMD são expressos na maioria, senão em todos os tecidos humanos, apesar de haver diferenças consideráveis nos níveis de transcrição (SULLIVAN et al., 1998)

A via do salvamento, tida como uma via alternativa para a síntese de GDP-fucose, foi primeiro demonstrada por estudos onde a fucose, previamente marcada radiologicamente, foi administrada a ratos e adicionadas ao meio de cultura de células HeLa, onde nos experimentos ficou claro que a fucose é diretamente incorporada nas glicoproteínas e apresenta baixa conversão para outros tipos de sacarídeos, indicando assim que a fucose pode ser diretamente “ativada” a GDP-fucose por uma via independente da GDP-manose (COFFEY et al., 1964; KAUFMAN; GINSBURG, 1968). Com isso ficou demonstrado que a fucose livre é transportada através da membrana para o citosol, apesar de pouco se saber sobre seu sistema de transporte, que aparenta ser específico para fucose e mediado por difusão facilitada (WIESE et al., 1994). Outros estudos mostram que a fucose poderia competir com outros compostos de baixo peso molecular, como glicídeos e polióis, por mecanismos de transporte, por exemplo, o mio-inositol (YOREK et al., 1993). Além disto, a fucose livre pode ser derivada do catabolismo de glicoproteínas e glicolipídeos pelas fucosidases nos lisossomas e seu efluxo parece ocorrer por um mecanismo de difusão facilitada onde múltiplos açúcares neutros também são transportados (JHONSON; ALHADEFF, 1991; MICHALSKI; KLEIN; 1999). Este transporte parece ser mediado por mais de um mecanismo, já que após a utilização de cytochalasin B – um inibidor do efluxo de monossacarídeos lisossomal – a fucose teve uma inibição relativamente menor que a glucose (JONAS et al., 1990). A partir de algumas destas formas de entrada da fucose no citosol, este monossacarídeo é então convertido à GDP-fucose em uma via de duas etapas, primeiramente sofrendo ação da enzima fucose quinase e posteriormente da GDP-fucose pirofosforilase que

catalisa a condensação reversível de fucose-1-fosfato ao produto, GDP-fucose (BECKER 2003). (Figura 3).

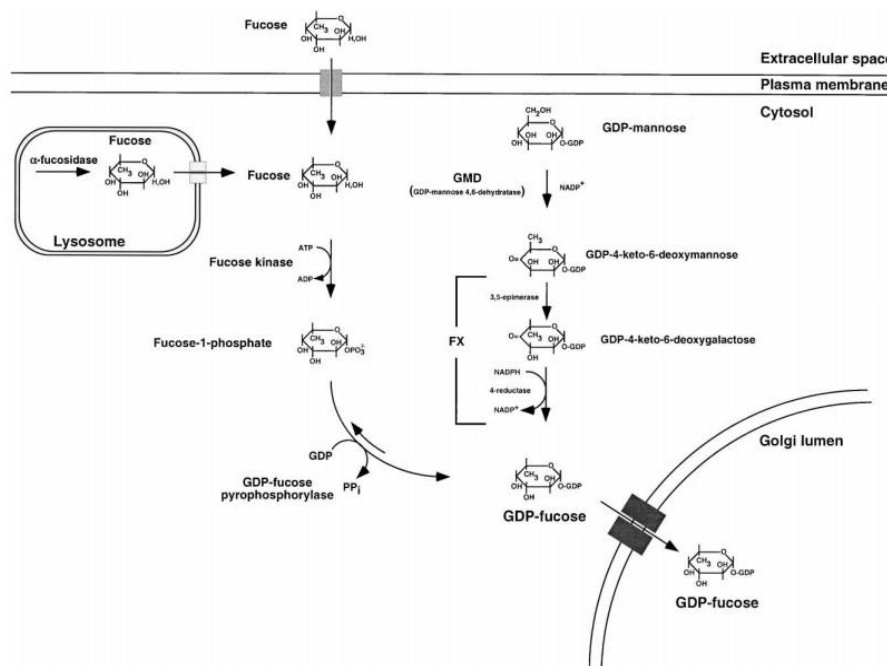


Figura 3. Biossíntese da fucose. FONTE: BECKER, 2013

2.4 BIOSÍNTESE DE HMOs FUCOSILADOS

A partir dos processos de síntese de lactose e da moeda de fucose, já descritos anteriormente, a GDP-fucose presente no citosol, a partir de ambas as vias biossintéticas, deve entrar no Complexo de Golgi onde irá servir assim como substrato para síntese de glicoconjugados fucosilados (BECKER, 2003). A entrada de GDP-fucose pelo Complexo de Golgi é realizada através de transporte específico que é acoplado a um sistema do tipo antiporte de GMP ao citosol (CAPASSO; HIRSCHBERG, 1984). HMOs fucosilados são formados a partir da ligação de resíduos de fucose na posição $\alpha(1\rightarrow2)$ a Gal terminais e/ou na posição $\alpha(1\rightarrow3)$ no terminal redutor da glucose. Oligossacarídeos fucosilados representam a maior parte do total de HMOs, pelo menos em mulheres com o loci secretor ativo (*SE* gene codificando $\alpha(1\rightarrow2)$ -fucosiltransferase *FUT2* e *LE* gene codificando a $\alpha(1\rightarrow3/4)$ -fucosiltransferase *FUT3*). Em contraste, mulheres consideradas não secretoras, assim não contendo a enzima *FUT2* em forma funcional, não apresentam $\alpha(1\rightarrow2)$ - HMOs fucosilados. Já o leite de mulheres *LE*-negativas não apresentam HMOs com ligações específicas em $\alpha(1\rightarrow4)$, por exemplo, o LNFP-II (lacto-N-fucopentaose tipo 2) (BECKER, 2003) (Tabela 1).

Variações geográficas no conteúdo de oligossacarídeos do leite humano têm sido descritas. Por exemplo, a presença do trissacarídeo 2`FL (2-fucosillactose) foi encontrado em 100% do leite de mulheres de origem Sueca e Mexicana. Enquanto, somente 46% das mulheres Filipinas apresentaram este oligossacarídeo em seu leite. Isto claramente demonstra a influência da variação genética na síntese dos HMOs (HENNET et al., 2014).

2.5 ATIVIDADES ATRIBUÍDAS AOS HMO's

Abundantemente encontrados no leite humano e indigeríveis pelos humanos os HMOs (SMILOWITZ et al., 2014) apresentam diversas e distintas ações no corpo humano. Sendo assim, vários autores não os consideram como fonte energética, já que não são digeridos nem por enzimas presentes no leite nem por enzimas presentes na mucosa intestinal, e por isto não são considerados nutricionalmente disponíveis (McVEAGH, 1997). Estes resultados foram confirmados por Gnoth e colaboradores (2000) e Engfer e colaboradores (2000), que mostraram que os oligossacarídeos do leite humano não são, ou são apenas minimamente digeridos pela amilase salivar humana, enzimas pancreáticas - tanto porcinas quanto humanas - e por preparações designadas como borda em escova (buscando mimetizar o intestino humano).

Evidências sugerem pelo menos três principais funções destes açúcares: primeiramente, eles promovem o crescimento da microbiota, geralmente dominada por bifidobactérias; segundo, HMOs (principalmente as estruturas fucosiladas) imitam as glicanas de superfície das células hospedeiras funcionando assim como receptores solúveis análogos que competem contra a mucosa intestinal pela ligação bacteriana, prevenindo assim a adesão do patógeno e sua possível translocação; em terceiro, as glicanas do leite promovem a defesa do hospedeiro a partir da modulação da imunidade (SMILOWITZ, et al., 2014) (Figura 4).

1. **AÇÃO PREBIÓTICA:** oligossacarídeos do leite humano são fontes de energia e de carbono preferencialmente utilizadas por bactérias benéficas, como as bifidobactérias, as quais irão utilizar estes compostos para então produzir ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta que irão diminuir o pH do estomago, tornando-o menos favorável ao crescimento de patógenos. O crescimento predominante e a colonização pelas bifidobactérias permite que elas concorram com os patógenos pela limitada disponibilidade de nutrientes no intestino. Esta é tida como a função nutricional mais atribuída aos HMOs. Além disto, estas bactérias benéficas ocupam os sítios de ligação

epitelial e fazem o que os tornam menos disponíveis para a ligação de patógenos (GERMAN 2008; BODE, 2015).

2. FUNÇÃO ANTI-ADESIVA MICROBIANA: HMOs mimetizam a estrutura de glicanos presentes na superfície do epitélio do trato gastrointestinal e servem assim, como receptores solúveis para bactérias patogênicas, diminuindo desta forma sua possibilidade de ligação e consequente colonização da parede do trato gastrointestinal. Além desta função, onde os HMOs diminuem o risco de infecções virais, bacterianas, e por protozoários, eles podem servir como inibidores da liberação de toxinas liberadas por bactérias patogênicas (BODE, 2012; BODE, 2015).

3. AÇÃO IMUNOMODULADORA: Evidências têm demonstrado que HMOs podem modular respostas de células imunes e epiteliais. Vários estudos têm mostrado atividade imunomoduladora de diversos tipos destes oligossacarídeos em diferentes tipos de células e situações patológicas. Por exemplo, alguns destes HMOs podem influenciar diretamente as funções do epitélio intestinal e reduzir excessivas ativações e infiltrações de leucócitos nas mucosas, fato este que pode diminuir a probabilidade de que ocorram doenças inflamatórias (BODE, 2012; BODE, 2015).

Além destas três funções, a função de prover nutrientes para o cérebro também tem sido descrita. Alguns HMOs, principalmente os sialilados, poderiam estar também envolvidos na síntese dos gangliosídeos – ao prover a moeda de ácido siálico para a síntese destes glicolipídeos. Além de disponibiliza-lo para a síntese de glicoproteínas, que apresenta importante função para o desenvolvimento do cérebro e funções cognitivas das crianças (BODE, 2015).

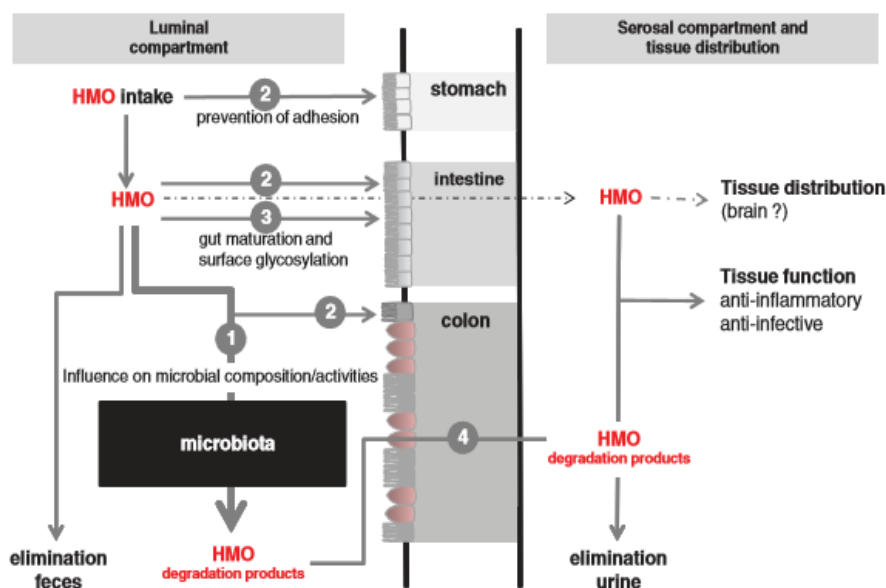


Figura 4. Principais ações dos oligossacarídeos do leite. FONTE: KUNZ, 2014.

O estudo dos HMOs e a relevância dos mesmos para a saúde humana têm sido visto como um campo com grandes possibilidades, já que recentes avanços tanto em instrumentação quanto em técnicas analíticas têm permitido pesquisadores estudarem um maior número de situações e variações amostrais em processo de amamentação. Além disto, detecções e quantificações mais apuradas de componentes majoritários e minoritários do leite humano têm mostrado grande evolução (BODE, 2015).

2.6. ABSORÇÃO DE HMOs

Um pré-requisito para que algumas das ações fisiológicas destes oligossacarídeos ocorram é que estes permaneçam indigeridos até o intestino delgado, para que assim sejam absorvidos e exerçam as atividades descritas acima. (GNOTH et al., 2000). Pensando nisto, o raciocínio parte do princípio que um forte indicativo seria a detecção de HMOs nas fezes e na urina. Assim estudos como os de Coppa e colaboradores (2001) e Rudloff e colaboradores (1996), vieram comprovar que a excreção urinária destes oligossacarídeos realmente ocorre. No trabalho de Rudloff, o autor e seus colaboradores concluem que como a síntese dos oligossacarídeos derivados de lactose é exclusiva da glândula mamária, o aparecimento destas moléculas na urina de 9 bebês, em processo de amamentação, seria um indicador da absorção intestinal deste grupo de sacarídeos. Já Gnoth e colaboradores, em seu estudo inovador em 2010, discutem que apesar do trato alimentar do neonato apresentar várias glicosidases - como amilase, maltase, sacarase - o mesmo é tido como

incapaz de quebrar ligações entre carboidratos contendo fucose, ácido N-acetil-neuramínico e N-acetilglucosamina, porém que pouco se conhecia sobre o comportamento destas moléculas em baixos pHs. Com isto, neste estudo a fração oligossacarídica foi analisada a partir da metodologia de cromatografia aniônica de exclusão de alta resolução com detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD) assim como por TLC (cromatografia em camada delgada), após ter sido incubada a 37 °C durante 2 horas com amilase salivar humana, amilase pancreática porcina e células do intestino delgado isoladas de porco (BBMV). Além disto, para verificar a interferência do baixo pH encontrado no TGI, as soluções contendo HMOs foram ajustadas ao pH de 2,5. A partir da análise do conteúdo final destas soluções contendo oligossacarídeos do leite humano, os autores concluem que menos de 5% dos oligossacarídeos são digeridos no trato intestinal.

Estudos mais atuais confirmam a presença de HMOs no plasma de bebês amamentados. Goehring e colaboradores em 2014 demonstraram que concentrações mensuráveis (1,66mg/L) no caso do 2'FL são detectáveis no plasma destas crianças, demonstrando também forte correlação com as concentrações ingeridas através do leite humano.

2.7 PROPRIEDADES PRÓ/ANTI-INFLAMATÓRIAS DO 2'-FL E LDFT

A mucosa intestinal serve como forma de proteção contra infecções oriundas de patógenos e contra processos autoimunes, sendo estes, respectivamente, processos induzidos por epítomos exógenos e endógenos (MANNICK; UDALL, 1996; BAILEY et al., 2005). Em estudos *in vivo* onde a colite intestinal é induzida experimentalmente, células epiteliais liberam citocinas como IL-1 β (Interleucina 1 β), IL6 (Interleucina 6), IL8 (Interleucina 8), TGF- β (Fator de transformação do crescimento β). A produção de versões próinflamatórias de citocinas, como a quimioatratadora IL-8, a partir de células epiteliais podem causar maiores efeitos em macrófagos e neutrófilos. Além disto, variações no balanço das citocinas podem levar ao estímulo de macrófagos, ocasionando assim em uma maior produção de citocinas inflamatórias as quais irão influenciar uma resposta dos linfócitos T. A secreção de citocinas próinflamatórias em resposta ao lipopolissacarídeo derivado da parede bacteriana de bactérias gram negativas ou por componentes dietéticos são fatores já conhecidos no desenvolvimento e progressão de inflamação intestinal. (MORENO; SANZ, 2014).

Também já é conhecida a capacidade dos HMOs em modular a atividade inflamatória a partir de seu envolvimento com as vias deste processo. Oligossacarídeos presentes no colostro modulam a atividade dos receptores: *Toll-like receptor 3* (TLR3), *Toll-like receptor 5* (TLR5) e interleucina 1 β (IL-1 β), sinalizações estas mediadas por receptores que reconhecem padrões moleculares

associados a patógenos (PAMPs). Este tipo de reconhecimento pelos PAMPs realizado através do reconhecimento de padrões por receptores (PPRs), incluem os receptores do tipo *Toll-like* (TLRs) e receptores do tipo *nod-like*, um mecanismo primário no qual células epiteliais intestinais interagem com a microbiota. Ao interagir com ligantes microespecíficos, os PPRs iniciam vias de transdução de sinais, as quais levam a ativação, posteriormente, de fatores de transcrição nucleares que modulam o controle da expressão gênica de genes específicos na transcrição de citocinas e quimiocinas próinflamatórias relacionadas ao sistema imune inato e adaptativo. A membrana externa de bactérias gram negativas contem lipopolisacarídeos (LPS), um glicolípido PAMP, que gera uma forte e imediata resposta próinflamatória em células de mamíferos. O receptor de LPS é um complexo que compreende diferentes proteínas: proteína de ligação a LPS, MD2, CD14 e TLR4. Após o reconhecimento do LPS, o receptor do *Toll-like* 4 oligomeriza e recruta proteínas TIR (*Toll-IL-1 receptor*) domains, como o MyD88 (gene de resposta primária a diferenciação mielóide), promovendo assim cascatas que induzem a ativação de NF- κ B e sua consequente translocação para o núcleo, o que irá assim levar a expressão de citocinas. Esta resposta primária à invasão de patógenos bloqueia a circulação de patógenos dentro do corpo e ajuda na limpeza de organismos microbianos. Além disto, a excessiva indução da inflamação pelo LPS é componente principal de situações patológicas derivadas de infecções (HE et al., 2016).

O 2'-FL (Figura 5), como mostrado He e colaboradores em 2016, possui a capacidade de atenuar a via inflamatória. A elevação da expressão de IL-8 ocasionada por LPS derivada de *E. coli* é inibida por este trissacarídeo. O 2'-FL atenua a expressão de CD14, "bloqueando" a liberação de IL-8. A especificidade desta inibição é ilustrada a partir da inabilidade de outros HMOs, como o 6'-SL (6'-sialilactose), LNFP 1 (lacto-Nfucopentaose tipo 1), TFiLNO (Trifucosil (1,2-1,2-1,3)-iso-lacto-N-octose), 3'-SL (3'-sialilactose), e mesmo o 3-FL, um isômero posicional do 2'-FL, em apresentarem capacidade anti-inflamatória similar em suas concentrações fisiológicas. Esses resultados se mostram consistentes com a modulação da expressão de CD14 pelo 2'-FL em células IEC (linhagem de células epiteliais intestinais). Neste artigo, a capacidade de inibição da inflamação foi confirmada em ensaios utilizando o modelo de ratos infectados AIEC (*E. coli* invasão aderente). O tratamento de IECs com 2'-FL leva ao aumento da expressão de SOCS2 (supressor da sinalização por citocinas) e a fosforilação de STAT3. Além disto, atenua tanto a transcrição quanto a tradução do CD14 associado a células, levando assim a um bloqueio da resposta inflamatória típica, assim modulando a indução de IL-8 gerada por LPS, já que CD14 participa de forma central no reconhecimento por LPS. Juntos, LPS, TLR4 e CD14 formam um complexo triplo para ativação desta via. Esta capacidade de inibição mostrada pelo

2'-FL só se mostra válida para o aumento de IL-8 ocasionado por infecção. (Figura 6) (HE et al., 2016).

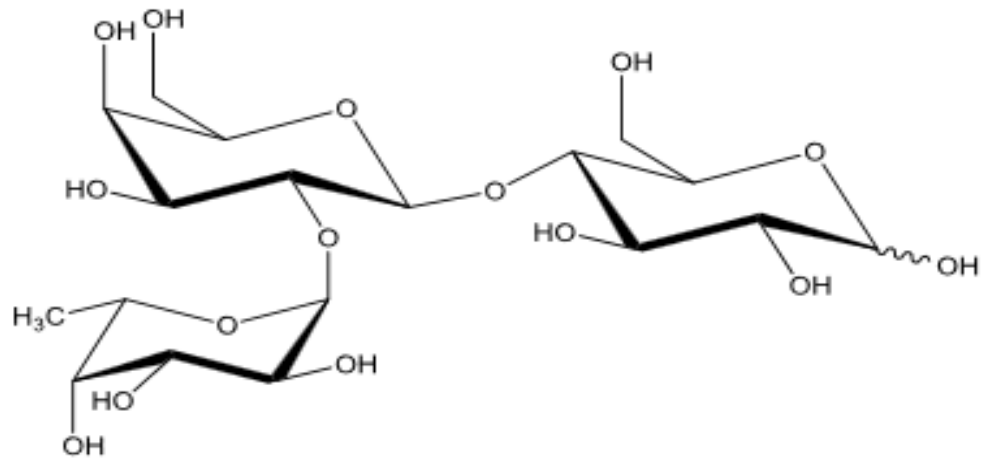


Figura 5. Estrutura 2'-FL. FONTE: KJÆRULFF, 2016

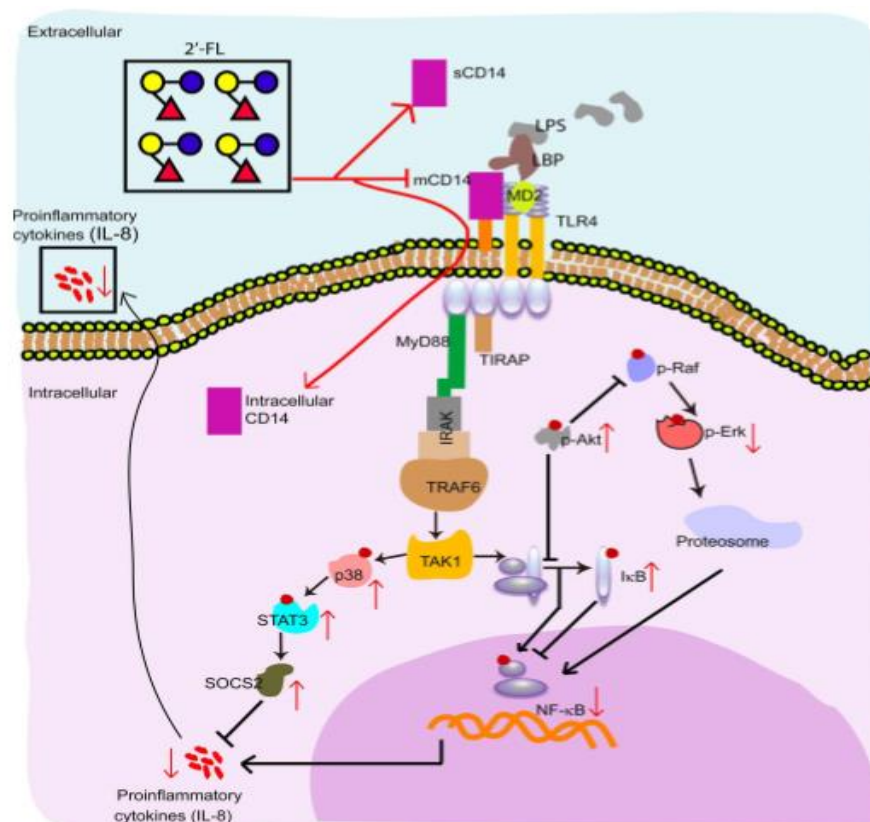


Figura 6. Mecanismo proposto para modulação da inflamação através da ação do 2'-FL. FONTE: HE, 2016

Sendo assim, He e seu grupo de pesquisa em 2016 concluem que HMOs podem representar uma nova categoria de agentes profiláticos e terapêuticos e apresentam o 2'-FL como um candidato inicial para testes clínicos que busquem bloquear a inflamação mediada por LPS.

Em outro estudo marcante na história dos HMOs, Newburg e colaboradores em 2016, mostraram que dentro de vários oligossacarídeos do leite humano testados, somente o LDFT apresentou redução do sCD40L (ligante solúvel ao CD40) em uma resposta dose dependente. O sCD40L está presente na circulação, em linfócitos T e nas plaquetas. Nas plaquetas, moléculas de CD40L (ligante do cluster de diferenciação 40) estocadas são externalizadas após ativação destas células. As plaquetas também expressam CD40, o qual pode interagir com CD40L expresso pelas próprias plaquetas e induzirem a liberação de sCD40L, seu ligante solúvel, além disto está liberação pode levar esta forma solúvel a interagir com outras moléculas que expressam CD40, incluindo neutrófilos e células endoteliais promovendo assim inflamação vascular (NEWBURG, 2016).

Além disto, o LDFT apresentou uma redução substancial de RANTES (regulador da atividade normal de célula T expressa e secretada) liberados pelas plaquetas (NEWBURG, 2016). RANTES é uma molécula anti-inflamatória que possui potente atividade de quimiocina, promovendo assim a migração leucocitária e tem quantidade significativa liberada por plaquetas em sua forma ativada. Quando células T positivas para CD40L levam a ativação plaquetária mediada por CD40, a liberação resultante de RANTES pelas plaquetas pode promover subsequente amplificação imune. RANTES derivada das plaquetas também induzem adesão leucocitária na superfície endotelial através da via CD40-CD40L (DANESE et al. 2015).

A liberação de sCD40L ocasionada pela ativação das plaquetas pode induzir a secreção de RANTES em uma cascata autoinflamatória, onde a inibição de pelo menos um, mas provavelmente os dois, aspectos deste processo é feita pelo LDFT. Além desta etapa, o LDFT mostrou capacidade, de forma dose dependente, de diminuir a adesão plaquetária mediada por colágeno (NEWBURG et al., 2016).

2.8. ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE HMOs

2.8.1 ISOLAMENTO

A etapa inicial comumente utilizada para obtenção de oligossacarídeos do leite humano é a eliminação de lipídeos e proteínas da amostra. Alguns autores propõem utilização de tratamento

térmico prévio, levando as amostras de leite à 70 °C por 30 minutos, com o objetivo de eliminar possíveis vírus contaminantes presentes. Porém, tratamentos deste tipo devem ser evitados visando preservar a integridade destes oligossacarídeos. A gordura é facilmente eliminada por centrifugação em baixa temperatura e posterior filtração de lipídeos sólidos onde as condições de centrifugação variam consideravelmente de autor para autor. Apesar de Kobota, um dos primeiros pesquisadores a trabalhar com técnicas de isolamento de HMOs, utilizar 15 minutos de centrifugação em $100 \times g$ à 2°C ao isolar tais carboidratos de 1 litro de leite (KOBOTA, 1972), a literatura mostra que outros pesquisadores geralmente utilizam velocidades mais altas entre 2000-15.000 $\times g$ e tempos mais longos de centrifugação. Já as proteínas podem ser precipitadas utilizando etanol 66% ou por acetona previamente gelada. Ácido tricloroacético (TCA) aquoso na concentração de 24% (v/v) também pode ser utilizado, como demonstrado por Nesser e colaboradores (1991), porém com posterior centrifugação durante 15 minutos. Um dos métodos mais utilizados para eliminação de proteínas é a ultrafiltração, onde o leite previamente deslipidificado é filtrado através de membranas, que podem variar em tamanho. Além disto, alguns autores têm optado por método de única etapa, o qual tanto deslipidifica como retira a proteína. Este método pode ser feito através de centrifugação através de um sistema de separação em membrana de 10.000 Da por 2 h a 15-18°C. Como alguns peptídeos podem apresentar massa molecular muito baixa, muitas vezes próximas das massas dos oligossacarídeos, à cromatografia de papel tem sido apresentada como um método para filtração destes peptídeos e também de sais. Para a separação em glicoproteínas, peptídeos e HMOs o método de gel filtração (Superdex 200) por cromatografia líquida pode ser usado, e oligossacarídeos de baixa massa molecular (10 kDa) podem ser extraídos. Outras colunas como a Sephadex G-25 também são muito utilizadas para a eliminação de resíduos de proteínas e peptídeos (HUESO et al, 2005).

Quando técnicas de HPLC (cromatografia líquida de alta desempenho) são utilizadas para identificação de frações contendo oligossacarídeos, alguns autores utilizam “micrométodo”, no qual baixíssimas concentrações de leite (1 mL) são misturadas diretamente ao solvente acetonitrila antes de qualquer processo anterior e assim injetado diretamente (HUESO et al., 2005).

A presença de altas concentrações de lactose pode se tornar um obstáculo para a purificação da fração oligossacarídica. Apesar de uma grande quantidade de lactose precipitar junto com as proteínas, muitas vezes outras etapas de purificação são necessárias para prevenir interferência deste dissacarídeo nos métodos analíticos (HUESO et al., 2005). Repetidas cristalizações da lactose podem ser obtidas por rotaevaporador e assim descartadas, chegando assim a 10% do

volume inicial de lactose (EGGE et al., 1983). Esta metodologia pode ser explicada a partir de conceitos bioquímicos básicos, onde a diferença de solubilidade dos isômeros (estes apresentam equilíbrio em solução de 62,7% na forma beta e 37,3% na forma alfa a 20 °C), 7g e 50g por 100g de água em 20 °C, respectivamente, irá levar a cristalização da forma alfa da lactose quando se diminuir o volume total do leite já deslipidificado e desproteinado. (FOX et al., 2015). Membranas de acetato de celulose para nanofiltração também têm sido utilizadas buscando separar a lactose dos trissacarídeos que acabam co-eluindo. Quando utilizada à cromatografia por gel permeação visando a separação de diferentes frações de oligossacarídeos, a lactose pode ser separada em uma destas frações. O uso deste método tem sido altamente descrito na literatura, onde as principais fases estacionárias utilizadas têm sido: Bio-Gel P4,48 Bio-Gel P2, Toyopearl HW 40 (S), Sephadex G-25. Outra possibilidade é a eluição em coluna de carvão (cromatografia por adsorção). Já como tratamento enzimático, a utilização de β -galactosidase (37°C, em agitador durante a noite) tem sido utilizada, o que leva a hidrólise da lactose e consequentemente gera uma solução, após ultrafiltração para retirada da enzima, de glucose, galactose, e dos oligossacarídeos. (HUESO et al, 2005).

2.8.2 SEPARAÇÃO DOS DIFERENTES COMPONENTES OLIGOSSACARÍDICOS

Apesar de a utilização da cromatografia em papel ser historicamente muito utilizada na área de carboidratos, a técnica de cromatografia de troca iônica apresenta a capacidade de separar oligossacarídeos neutros de ácidos e, por isto, vem sendo altamente utilizada para a separação de HMOs. Dowex 1-X4 em forma de acetato, Dowex 1-X2 em forma de acetato, AG 1-X2 em forma de acetato, DEAE Sephadex A25, ou troca iônica FPLC (Resource Q,9) se apresentam como fases estacionárias que já demonstraram êxito para este objetivo. DEAE-celulose e cromatografia de gel permeação também têm sido utilizadas quando o objetivo é separar misturas que contenham oligossacarídeos contendo ácido siálico, porém esta última tem sido mais utilizada quando se objetivo separar HMOs neutros de diferentes tamanhos através de eluição com água destilada (HUESO et al., 2005). Já o uso de Fractogel TSK HW 40 (S) gera cinco frações de fucosiloligossacarídeos (monofucosillactoses, difucosillactose, lacto-N-tetraoses, monofucosillacto-N-tetraoses, e difucosillacto-N-tetraoses), uma grande fração oligossacarídica neutra e uma fração restante de lactose através da eluição com água. Outra fração com sialiloligossacarídeos com pequena interferência de moléculas não oligossacarídicas pode ser obtida a partir da eluição com 25mM de acetato de amônia (THURL et al., 1993; STHAL et al., 1994). Um pouco menos frequente, técnicas de gel permeação também podem ser utilizadas para

isolamento de frações ácidas distintas. Além disto, Fractogel TSK HW 50 (S) também tem sido utilizada com este objetivo (HUESO et al., 2005).

Utilização posterior de Biogel P4, após o isolamento de oligossacarídeos neutros, pode ser utilizada com o objetivo de separar estes oligossacarídeos sem carga por tamanho. Durante todo o processo, cromatografia em camada delgada se apresenta como uma técnica prática e eficaz para a monitoração do conteúdo oligossacarídico e avaliação da composição das frações contendo carboidratos. Placas de HPTLC feitas de sílica também podem se apresentar como uma ferramenta útil quando utilizado como solventes: butanol-ácido acético-água (2.5:1:1, por volume) ou butanol-etanol-água-ácido acético-piridina (5:50:15:1.5:5, por volume). As placas devem ser coradas com orcinol para a detecção de carboidratos. Além disto, ensaios com orcinol-ácido sulfúrico e fenol-sulfúrico são excelentes metodologias para a estimativa da quantidade total de oligossacarídeos. Ainda, ensaios com resorcinol são recomendados quando se está trabalhando com oligossacarídeos ácidos (HUESO et al., 2005).

2.8.3 ANÁLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS ISOLADOS

Quando análises em GC (cromatografia gasosa) são utilizadas, metanólise e trifluoracetilação são processos prévios necessários, onde a partir do conhecimento da massa molecular dos principais monossacarídeos (fucose, galactose, glucose, etc) obtidos a partir da análise em GC permite a identificação de mono-, di-, tri-, e outros substitutos oligossacarídicos. Quando se busca efetuar a análise por HPLC, há uma variedade de sistemas de colunas e solventes possíveis. A combinação de fase reversa e fase normal tem sido amplamente utilizada a partir da comparação dos tempos de retenção de padrões derivatizados (através de aminação redutora com 2-aminoacridona). Vários oligossacarídeos podem ser identificados desta maneira, porém alguns oligossacarídeos sialilados maiores requerem estudos em MS (espectroscopia de massa) mais detalhados. Mais recentemente, HPAEC-PAD, utilizando Dionex LC, tem sido desenvolvida como uma potente ferramenta na pesquisa em carboidratos e também sido vastamente utilizada para análise de oligossacarídeos (HUESO, 2005).

A utilização de lectinas imobilizadas tem sido comum para isolamento de glicoconjugados, e tem sido utilizada como um método simples e muito sensível para o fracionamento de vários oligossacarídeos (KOBOTA, 1994). Incubação de oligossacarídeos com anticorpos monoclonais

que realizam a estrutura de seus ligantes também tem sido uma prática muito utilizada (HUESO, 2005).

Para elucidação da configuração estrutural dos HMOs são necessárias informações sobre o tipo e número de resíduos de açúcar, suas sequências, o sítio e o tipo de ligação anomérica, a conformação dos anéis destes açúcares e o padrão de ramificações. Sendo assim, a utilização de diferentes técnicas, como RMN, têm levado a caracterização de muitos destes oligossacarídeos. (HUESO, 2005). A multiplicidade de possibilidades de ligações entre unidades monoméricas adiciona uma profunda complexidade estrutural aos carboidratos, já que os mesmos deverão estar ligados entre o grupamento hidroxila anomérico de um monossacarídeo e uma hidroxila de outro sacarídeo, gerando assim para aldohexoses um total de quatro ligações possíveis (excluindo as ligações entre a hidroxila anomérica e o carbono, que somente poderão levar a formação de dissacarídeos). Em contraste com os aminoácidos que só apresentam duas opções para a formação da ligação peptídica, os carboidratos podem formar estruturas altamente ramificadas. A determinação destas ligações é o objetivo primário de estudos por RMN de carboidratos obtido de forma natural (BUBB, 2006).

2.8.4. ANÁLISE DA CONFORMAÇÃO TRIDIMENSIONAL DE OLIGOSSACARÍDEOS EM SOLUÇÃO

A compreensão das propriedades, mecanismos de ação ou interação com macromoléculas de moléculas orgânicas é extremamente dependente da elucidação de sua estrutura tridimensional em solução. Isso é ainda mais importante quando essas moléculas correspondem a classe dos glicídeos, em especial oligossacarídeos onde, embora o seu menor tamanho possa indicar uma menor complexidade na elucidação do comportamento tridimensional da estrutura, a possibilidade da existência de comportamentos distintos no que se refere a mobilidade em diferentes partes da molécula é um fator recorrente (KOLMER, et al., 2015)

Quanto maior a quantidade de informação disponível, mais acurada será a determinação estrutural. Assim, em se tratando não apenas de determinação da configuração de dada molécula, mas também de sua conformação em solução, estratégias de determinação estrutural que utilizam RMN se baseiam principalmente em 3 abordagens: a determinação dos ângulos diédricos através das constantes de acoplamento escalares por meio da equação de Karplus (KARPLUS, 1959) as informações angulares fornecidas por dados de experimentos de acoplamento residual dipolar (TROPP, 1980) e as distancias internucleares fornecidas por experimentos de NOE (Nuclear

Overhauser Enhancement). Abordagem utilizando estes três fatores são geralmente suficientes para a determinação da conformação tridimensional em solução de moléculas orgânicas consideradas de tamanho pequeno para a escala de RMN e que não apresentam muita flexibilidade em solução. Infelizmente, em se tratando de carboidratos, principalmente mono e oligossacarídeos, embora a questão do tamanho molecular médio possa, na maioria das vezes, ser relativizada, a existência de comportamentos diferentes no que se refere a flexibilidade e dinâmica molecular é recorrente. Transpor estas dificuldades requer o uso de estratégias envolvendo a realização de experimentos de NOE os quais irão indicar o grau de flexibilidade da molécula estudada em solução, e como essa flexibilidade, em escala de tempo, está relacionada ao tempo de correlação, que é o tempo que a molécula leva para dar um giro sobre seu próprio meio, sendo assim determinado tanto pela solução em que a molécula se encontra quanto pelo seu peso molecular médio. Os dados experimentais provenientes irão fornecer medidas de RMN referentes as “médias” conformacionais existentes, possibilitando uma determinação mais acurada das distâncias intermoleculares (KOLMER, et al., 2015).

3.JUSTIFICATIVA

Estudos anteriores demonstraram o papel pró/anti-inflamatório de vários oligossacarídeos encontrados no leite humano, dentre eles o 2 fucosillactose. Porém, pouco se sabe sobre a sua estrutura tridimensional e sua interação com os receptores TLR - mediadores de resposta inflamatória. Já no caso do oligossacarídeo lactodifucotetraose, que apresenta potencial para agir na modulação da inflamação, poucos estudos apresentam metodologias simples para seu isolamento. Sendo assim, se justifica e é proposto um estudo que visa demonstrar a eficácia de método para isolamento de oligossacarídeos do leite humano, elucidar o mecanismo de interação entre HMOs e receptores TLR por meio de técnicas de *Docking* e determinar a estrutura tridimensional de HMOs em solução. Além disto avaliar a atividade pró/anti-inflamatória deste HMOs também se mostra necessário, pois apesar de já descritas as interações de lipopolissacarídeos e lipopeptídeos a receptores TLR, nenhum estudo ainda demonstrou as possíveis formas de ligação entre 2'-FL- TLR a partir de sua estrutura tridimensional mais provável.

4.OBJETIVOS

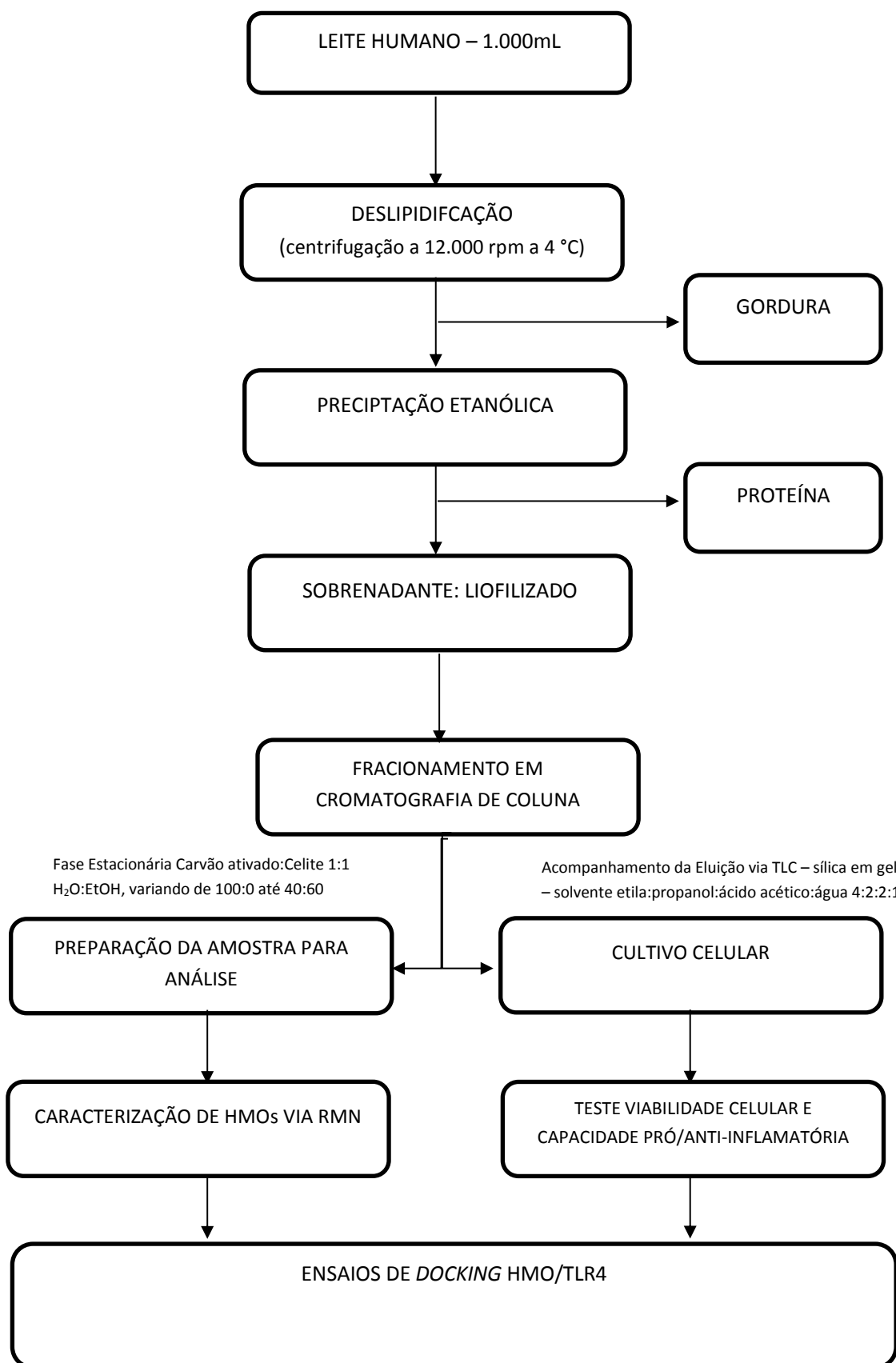
4.1. OBJETIVO GERAL

O presente projeto possui como objetivo principal o isolamento e caracterização de HMOs, e a elucidação do mecanismo envolvido na interação entre HMOs isolados que interajam com receptores do tipo TLR. Os oligossacarídeos que apresentarem capacidade de se ligar aos receptores TLR serão selecionados e, em seguida, estratégias de elucidação da estrutura do complexo ligante-receptor serão propostas, por meio de análises de RMN que possibilitem a determinação da estrutura tridimensional dos HMOs em solução e ensaios de *Docking* entre oligossacarídeos e receptores.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar oligossacarídeos presentes no leite humano validando assim a simples metodologia que utiliza a técnica de cromatográfica em coluna.
- Avaliar atividade pró/anti-inflamatória do oligossacarídeo do leite humano 2-fucosillactose por meio de ensaios *in vitro*.
- Avaliar a ligação do oligossacarídeo do leite humano 2'-fucosil-lactose ao receptor mediador da inflamação TLR4, a partir de ensaios de *Docking*.
- Determinar a conformação absoluta do 2'-FL através de estudos específicos utilizando técnicas de RMN.

5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL E METODOLOGIA



6. ARTIGO

Isolation, characterization and 3D structure definition of the anti-inflammatory human milk oligosaccharide, 2'-fucosyl-lactose.

Bernardo F. Starling, Arquimedes P. Santana Filho, Guilherme L. Sasaki*

Since the publication of the pioneers works with milk carbohydrates from Polonvski and Lespagonol at 1930 multiples laboratories throughout the world have directed their efforts to obtain pure fractions of human milk oligosaccharides (HMOs). Important physiological actions have recently been associated to these molecules and the search for isolation and identification methods have widely increased. In addition, the need to understanding the behaviour of these HMOs in solution becomes an important aspect. 2'-FL (2'-fucosyl-lactose) and a neutral tetra/tri oligosaccharides fraction were obtained from human milk through a simple continuum gradient based charcoal chromatography and ammonium ion exchange liquid chromatography method. NMR (nuclear magnetic resonance) and MS (mass spectrometry) identification were performed validating the method and several NMR studies allowed defining the 3D fish hook – like structure of 2'-FL. Besides that, cell viability and antiinflammatory assays were made proving the potential beneficial activity of 2'-FL. Docking assay proved the possible interaction between TLR4 (*Toll like receptor 4*) and 2'-FL.

1.Introduction

Milk is the newborn's fundamental nutrients source¹. The human milk is unique in its oligosaccharides content². Human Milk Oligosaccharides (HMOs) are the third most solid component found in human milk (12 a 13g/L), after lactose and fat³. 90% of its content is neutral and 10% is sialylated². Although milk has been considered an energy source for newborns, the role of milk carbohydrates as a functional food is now been highly discussed⁴. Eventhough some carbohydrates like polysaccharides are hard to demonstrated their absorption by the enterocytes, HMOs have been described as indigestible saccharides⁵ that can act in the body after digestion^{6,7}. Evidences present four major functions for these oligosaccharides; 1- prebiotic action for infant gut; 2- pathogen anti-adhesive barrier; 3- immunomodulatory activity; 4- brain development function (especially sialylated structures). These novel actions have increased the search for better methods to isolate and to understand how these molecules behave in different situations⁸. Different techniques have been developed aiming to facilitate the isolation process.

Lactose is the main component of human milk and its high content tend to be an obstacle for the isolation of the oligosaccharide fraction⁶. The most common methods described following this purpose are: repeated crystallization in a rotary evaporator⁹, nanofiltration cellulose acetate membranes, gel permeation chromatography, exclusion chromatography columns, charcoal column (adsorption chromatography) and treatment with β -galactosidase (aiming lactose hydrolysis)⁴. The subsequent step usually is ionic exchange chromatography or gel permeation objectifying to obtain pure oligosaccharides⁵. In contrast to amino acids that form peptide bonds that are generally linear or rarely cyclic, the identification and analyses of carbohydrates is more complex since they may be linked between the anomeric hydroxyl group of a monosaccharide and a hydroxyl of the carbon atoms from another monosaccharide¹⁰.

Here, we report a chromatographic method validated by ESI-MS and NMR (nuclear magnetic resonance) and the isolation and characterization of two oligosaccharides fractions present in human milk, 2'-FL (2'-fucosyl-lactose) and neutral tetra/tri oligosaccharides consisting of LDFT (Lacto-difucosyl-tetraose) and LNnT (lactoNneotetraose). Furthermore, aiming to understand how 2'-FL behave in solution, and to obtain information regarding its biological activity, a 3D structure analysis by detailed NMR studies and several *in vitro* and Docking studies have been performed.

2. Experimental

2.1 Milk Samples

Milk samples were obtained from different Brazilian lactating mothers following the described hygiene regulations proposed by the national milk bank. Health tests were analysed for inclusion criteria and all lactating were accepted. All steps of the study were based on the research model approved by the Brazilian Ethic Committee (register number: CAAE 56168316.0.0000.0102).

2.2. Isolation Procedure

Firstly, 1000 mL of milk samples were subjected to deslipidification through centrifugation at 12,000 rpm at 4 °C. After that, the material was subjected to an ethanolic precipitation (2:1, v/v) for protein removal¹¹ yielding the SHMO (supernatant human milk oligosaccharides) fraction. The SHMO was freeze-dried and after that eluted through a 30 x 4 cm (70 mL) column of activated-charcoal 150 mesh and celite 545 (1:1) (Synth). A continuum gradient of H₂O:EtOH was applied, varying from 100:0 to 40:60 as mobile phase. Fractions of 10 mL (EHMO) were collected and submitted to a nitrogen evaporation and then freeze-dried. These fractions were subjected to a new chromatographic procedure, in order to obtain a better separation. Willing to obtain LDFT, chromatography on an ionic DEAE Sepharose (GE Healthcare) column was performed, being initially eluted with water and after with a water solution with 2% content of ammonium ion (Adapted from GNOTH, 2000)⁵. All the isolation processes were accompanied by TLC (thin layer chromatography), performed with silica-gel 60G (Merck) developed with 4:2:2:1 ethyl acetate:propanol:acetic acid:water solvent. For band visualization, the carbohydrate specific reagent orcinol-H₂SO₄ was used^{12, 13}.

2.2 NMR Spectroscopy

NMR was performed using a Bruker 400 MHz or 600 MHz AVANCE III NMR spectrometer (Bruker GmbH, Silberstreifen, Germany) with a 5 mm inverse Z gradient probe or TCI cryoprobe. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of 2'-FL (2'-fucosyl-lactose) and neutral tetra/tri oligosaccharides fraction were obtained after dissolving the samples in D₂O or in H₂O-DMSO(60:40) depending on the experimental study. The chemical shifts of signals were measured relative to TMS standard at different temperatures. 1D ¹H-NMR was performed, using 8 scans to give a signal/noise (S/N) ratio of at least 1000/1 (90 pulse, relaxation delay ¼ 4.0 s, number of time domain points ¼ 65536, and acquisition time ¼ 5.1 s). In general, experiments were carried out without tube rotation with the HOD signal at a medium width varying from 2– 3.5 Hz. 2D NMR experiments were performed using editedHSQC (hsqcedetgp), TOCSY (mLevphpr.2), COSY (cosygpprqf), HMBC (hmbcgpndqf) and NOESY (noesyohor) pulse sequences, recorded for quadrature detection in the indirect dimension and acquired using 16 scans per series of 2k x 256 data points, with zero filling in F1 (1024) prior to Fourier transformation.

2.3. ESI-MS Experiments

Aiming to confirm the presence of the novel HMO LDFT in the neutral tetra/tri oligosaccharides fraction, mass spectra (MS) were acquired in a negative and positive mode by full scan using a LTQ-Orbitrap-XL (Thermo-Scientific) equipment. For the positive mode the MS analyses were performed using a spray voltage of 4.49 kV, a capillary voltage of 49 V, a tube lens voltage of 205 V, an auxiliary gas (nitrogen) flow rate of 0 arb, a sheath gas (nitrogen) flow rate of 8 arb and capillary temperature of 300 °C for desolvation. The spectra were recorded in the range of m/z 200–1100 for MS resolution of the Orbitrap mass analyser at 30,000 units. For the negative mode analyses a spray voltage of 3.2 kV, a capillary voltage of -46 V, a tube lens voltage of -200 V were used. All the spectra were processed and analysed by Thermo Xcalibur version 1.0.0.42.

2.4. Cells Culture

RAW-Blue™ Cells were cultivated in a DMEM medium culture containing 4.5g/L glucose, 10% (v/v) of bovine inactivated serum, 50 U/mL de penicillin, 50 µg/mL de streptomycin, 100 µg/mL de normocin and 2 mM de glutamine. The cells were placed at 37 °C in a containing 5% CO₂. The medium was replaced twice in a week and the cells replicated until reach 70-80% confluence.

2.5 MTT Assay

Viability after treatment with 2'-FL was determined using MTT assay. Cells grown treated with 20uL LPS were taken as positive control. An aliquot of 190 µl from the culture was transferred to wells in 96 well plates in triplicates. The different doses of 2'-FL (0.02 mg/mL , 0.2 mg/mL and 2 mg/mL) were added and the plate was incubated at 37 °C for 24h or 48h. After that, 20 µl of the MTT (Sigma, USA) solution in PBS (5 mg/mL, pH 7.0) was then added to each well. Plates were incubated at 37 °C for 3 h. Following incubation 50 µl of a lysis buffer (20% sodium dodecyl sulfate in 50% N, N-dimethylformamide; pH 4.7) was added to the wells and the plates were further incubated at 37 °C for overnight. Finally, the mixture in the wells was mixed by pipetting and absorbance at 570 nm was measured using microplate reader (EPOCH).

2.6. QUANTI-Blue Stimulation Assay

After previous analysis aiming to identify possible endotoxin contamination¹⁴, 0.02 mg/mL , 0.2 mg/mL and 2 mg/mL of 2'-FL were solubilized in 20 µL water and placed in 96 well plate with 180 µL of RAW-Blue™ cells suspension containing 140.000 cells/mL per well and 20 µL of LPS. The plates were incubated for 24 h at 37 °C temperature and 5% de CO₂. 50µL supernatant were collected and added to 96 wells containing 150µL of QUANTI-Blue and the plates were again incubated for 3 hours. The subsequent results were read using a microplate reader (EPOCH) at wavelength of 620-655 nm.

2.7. Estimation of Intra- and Interproton Distances

Experimental distances were obtained by selective one-dimensional (1D) and 2D NOESY experiments conducted with mixing times between 100 and 1.000 ms (253 K – H₂O:DMSO-d₆) and used to construct the kinetic NOEs. Selected distances were estimated on the basis of the (two-spin model approximation) time-dependent NOE measurements extrapolated to short mixing times, considering the initial buildup enhancement up to 400 ms. The extrapolated NOEs signals were converted to proton distances considering the Gal distance (H1–H3) as a reference (2.57 Å).

2.8. 2D NOESY Spectral *in silico* Simulation (multispin model relaxation)

The 2D NOESY simulation was undertaken assuming isotropic motion with a single correlation time τ_c estimated to be 250 ps. The τ_c parameter was adjusted by trial and error until the NOE kinetic enhancement from 0 to 1.000 ms mixing time reproduced qualitatively the corresponding experimental values. The software for 2D NOESY simulation was MSpin (MestreNova).

2.8. 2'-FL Molecular Minimization

The starting geometries of 2'-FL were generated using the carbohydrate biomolecule builder¹⁵ following the primary structure and the glycosidic constraints, the structure were minimized by Gaussian09¹⁶. The B3LYP exchange-correlation potential functional was employed for calculating the orbital energies and aug-cc-pvdz basis set was used as correlation consistent basis^{17, 18}. For the solvation, PCM (Polarizable Continuum Model) method that creates a solute cavity via a set of overlapping spheres, in this case water and vacuum dielectric constant¹⁹ was used.

2.9. Comparison of Different 2'-FL Structural Conformers Results to the Experimental Data

To compare 2'-FL structures with the experimental data rmsdexp values were used, for example, the estimated inter-residue proton-proton distances using the two-spin model approximation used: H5 β Glc-H5 Fuc, CH3 Fuc-H2 Gal, OH2 Fuc-OH3 Gal, H6 Gal-OH3 β Glc. In the equation, Dexp,i is the experimental inter-residue proton-proton distance and Dcc,i is the corresponding distance for a comparative conformation. The number of inter-residue proton-proton distances compared is n.

$$\text{eq.1: } \text{rmsd}_{\text{exp}} = \sqrt{n-1 \sum_i (\text{D}_{\text{exp},i} - \text{D}_{\text{cc},i})^2}$$

2.10. Molecular Docking

Docking programs measure the binding affinity of a ligand for a molecular target to determine the interaction energy of the resulting complex and visualization softwares present the model of the intermolecular interaction²⁰. The 3D predicted structures of TLR4 (id: 3FXI) was obtained as a pdb format from RCSB protein data bank (www.rcsb.org). Three 2'-FL 3D structure was used: 2'-FL minimized in H₂O (created as described by the item "2.9. Molecular Minimization"), a pdb of 2'-FL (crystal structure) and the experimental model (NMR predicted structure). The oligosaccharide-receptor interaction was created using AutoDock Vina (Discovery Studio 2.5).

3. Results and Discussion

3.1. Isolation Methods

Differently from previous studies that use water and just one ethanol concentration as eluent for charcoal chromatography, here we prove that the gradient method is efficient to obtain different HMO's fractions (Figure 1a and 1b). When analysed by ¹H and HSQC (Figure 2, 3 and 6) NMR spectra, isolation methods of 2'-FL and LDFT/LNnT as described above proved to be a suitable method. EHMO (eluted human milk oligosaccharides) (Figure 2a) present great quantities of lactose indicated by the large peak at 5.21 ppm in the ¹H NMR spectra representing H1- α Glc-Lac. After the activated charcoal-celite column procedure, the 2'-FL fraction (Figure 1 b) was obtained with an 80.7% (1:1.2386 – fucose to lactose proportion) purity degree estimated by integrations of the correspondent signals (Figure 3). The DEAE Sepharose column-2% ammonium procedure showed to be able to isolate neutral tetra/tri oligosaccharides, as shown in Figure 2c, indicated by the Fuc H-1-F2 (5.28ppm) and Fuc H-1- F3 (5.39/5.45 ppm) from LDFT, by Fuc H-1- F (5.30 ppm) from 2'-FL, and LNnT (5.20 ppm) (d, 3.8 ³J_{HH} [Hz] – data not shown) on ¹H spectrum. Besides this, the lack of a double doublet seen as a triplet signal of sialic acid at ¹H NMR spectra at 1.72 ppm (Figure 4) from H3 show the capacity of DEAE Sepharose column - 2% ammonium procedure to retain charged oligosaccharides. These data were based on data from Leeuwen et al. (2014)²¹ and Kjærulff et al. (2014)²².

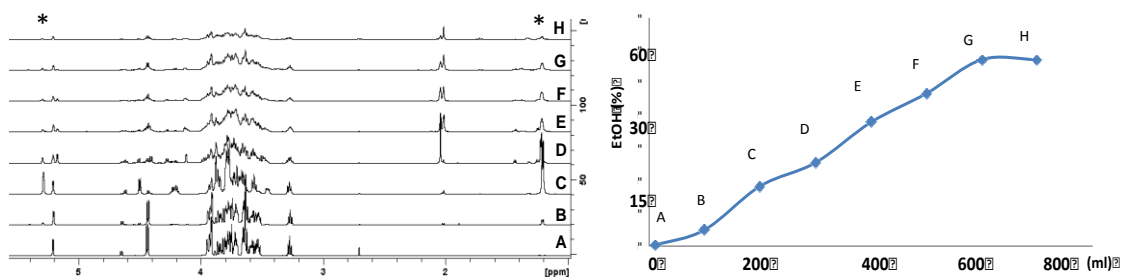


Figure 1. (a) ¹H NMR spectra of the fractions obtained after the chromatographic procedure. (b) Gradient profile. The letters at both graphics are correspondent. * at right represent the 5.28 H1-Fuc 2'-FL. * at left represent the 1.21 CH₃-Fuc 2'-FL

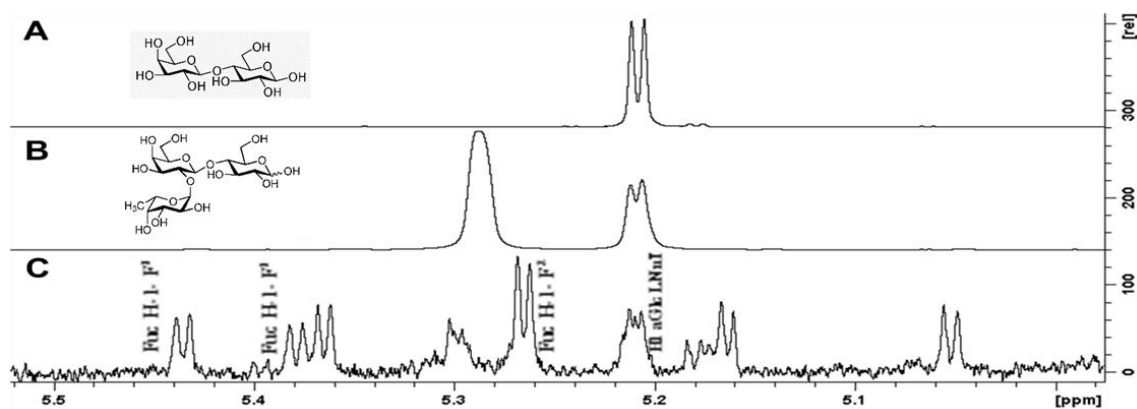


Figure 2. ¹H-NMR spectra (A) EHMO fraction, (B) 2'-FL, (C) LDFT. Chemical shifts reference: TMSP ($\delta=0.00$ ppm). Lactose identification (A) H1- α Glc-Lac (5.21 ppm), H1- β Glc-Lac (4.63 ppm); 2'-FL identification (B) H1-Fuc-2'-FL (5.30 ppm); Neutral tetra/tri oligosaccharides identification (C), LDFT peaks: Fuc H1 from 2'-FL (5.28 ppm) and Fuc H1 from 3-FL (5.39 and 5.45 ppm), 2'-FL peak Fuc H1 (5.30 ppm), LNnT (d, $3.8^3 J_{HH}$ [Hz] at 5.20 ppm).

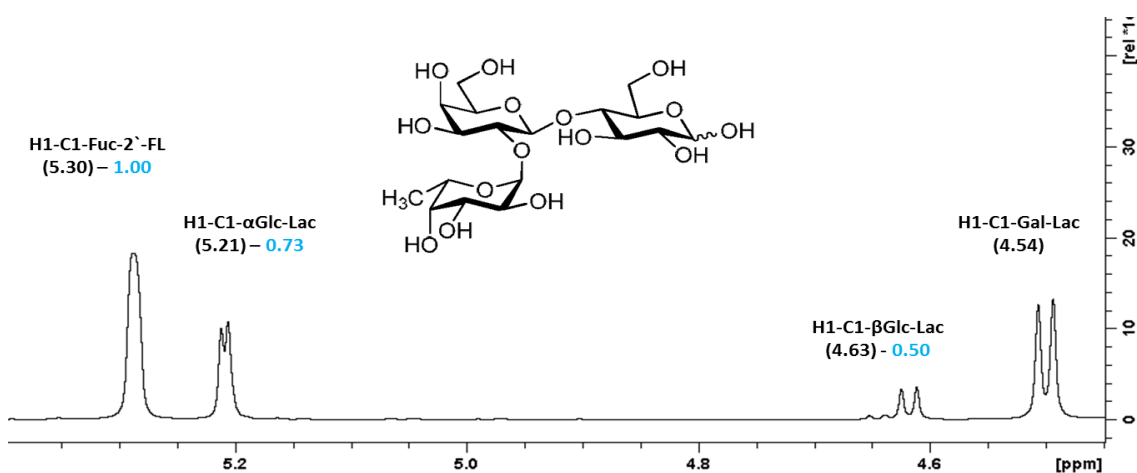


Figure 3. Detailed 2'-FL ¹H NMR spectra and the integration peaks. H1-Fuc-2'-FL at 5.30 ppm was used to create the proportion relation to lactose content, based on the two isomeric possible forms represented by the H1- α Glc-Lac at 5.21 ppm and H1- β Glc-Lac at 4.63 ppm.

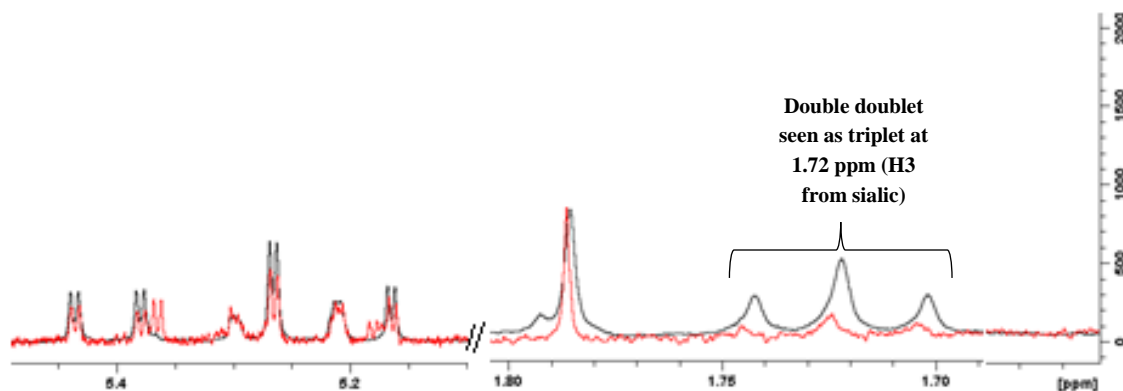


Figure 4. NMR spectra regions. Black line represent the tetra/tri oligosaccharides fraction before DEAE Sepharose column- 2% ammonium procedure. Red line represent the neutral tetra/tri oligosaccharides fraction.

3.2. Mass Spectrometry identification of Neutral tetra/tri oligosaccharides.

Identification of the HMOs from the neutral tetra/tri fraction were performed with an LTQ-Orbitrap-XL mass spectra (Figure 5) and HSQC experiment data. A neutral tetrasaccharide at m/z 657.3 confirmed the greater proportion of LDFT. A m/z 730.4 peak was firstly identified as a N-acetylated tetrasaccharide and later confirmed as LNnt by the distinct signals from β -GlcNAc-C-3 (71.8ppm) and from β -GlcNAc-C-4 (77.2ppm) in relation to its isomer LNT. At m/z 511.3 a neutral fucosylated trisaccharide was related that and confirmed as 2'-FL since this neutral tetra/tri oligosaccharides fraction was derived from a 2'-FL fraction and the H from C1 α Fuc of this molecule is present at 5.21 ppm in the ^1H spectrum.

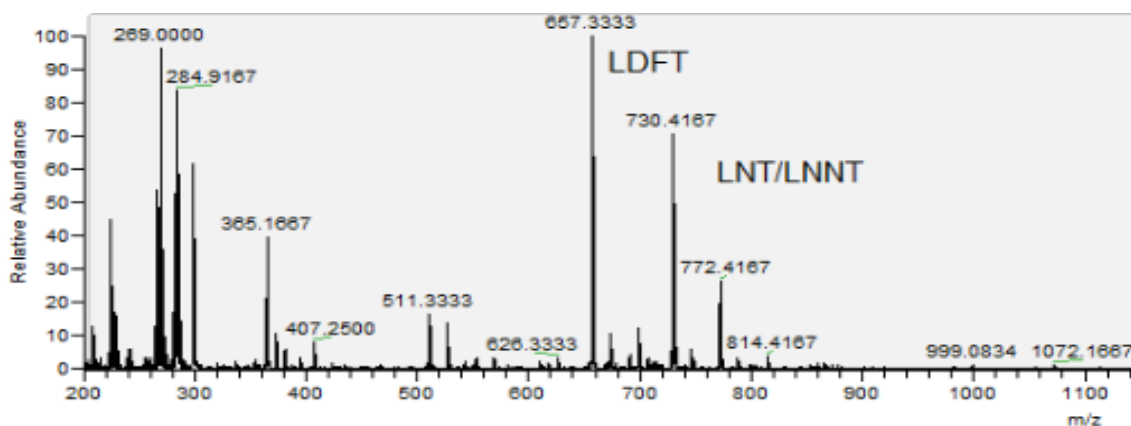


Figure 5. MS spectra. LDFT (m/z 657.3). At this stage both LNT or LNNT could be the signal presented at m/z 730.4.

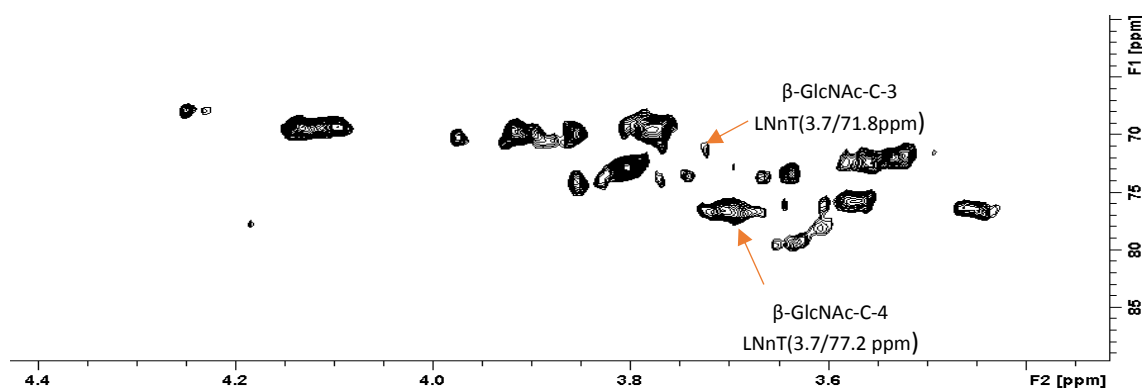


Figure 6. Neutral tetra/tri oligosaccharides fraction 2D edited-HSQC NMR spectra.

3.3. 2'-FL characterization

NMR characterization of 2'-FL (Table 1) were conducted using homonuclear (COSY, TOCSY, and NOESY) and heteronuclear (edited HSQC) experiments. Allowing the complete assignment of the hydrogen and carbon signals.

2'FL												
Signals	α -Glc			β -Glc			β -Gal			α -Fuc		
	^1H	^{13}C	OH	^1H	^{13}C	OH	^1H	^{13}C	OH	^1H	^{13}C	OH
-												
1	5.02	88.39	6.90	4.41	95.5	7.67	4.34	99.61	-	5.10	98.96	-
2	3.35	70.81	5.81	3.06	73.59	6.24	3.49	74.16	-	3.57	67.30	5.58
3	3.35	74.08	5.63	3.35	74.03	5.93	3.66	73.08	5.77	3.57	69.10	5.71
4	3.58	71.12	-	3.42	71.98	-	3.68	68.25	5.74	3.59	71.08	5.62
5	3.68	69.68	-	3.24	74.71	-	3.53	71.17	-	4.05	66.20	-
6a	3.60	59.37	5.81	3.58	59.46	5.97	3.51	60.08	6.10	1.047	15.34	-
6b	3.74	59.37	5.81	3.76	59.46	5.97	3.589	60.08	6.10	-	-	-

Table 1. ^1H , ^{13}C and OH NMR assignments of 2'-FL (δ values in ppm at 253K).

3.4. 2'-FL Structure Model and NMR Experimental Data Comparison

The intra- and interresidue proton-proton distances were measured by NOESY. To compare the molecular minimization and an internet downloaded pdb structures to the experimental NMR data, an rmsdexp was derived from all experimentally estimated intra and inter-residue proton-proton distances (see eq. 1 and Table 2) and the corresponding distances for each conformer. A small rmsdexp value correspond to a more closely conformer to the NMR data.

CONFORMERS	H2Gal-H1Gal (Å)	H5βGLC-H5FUC (Å)	CH3Fuc-H2Gal (Å)	OH2Fuc-OH3Gal (Å)	H2βGlc-OH6Glc (Å)	H1βGlc-OH1βGlc (Å)	H2βGLC-H3βGLC (Å)	H6Gal-OH3βGlc (Å)
NMR/PDB								
RESIDUAL SQUARE		0.73	0.02	0.02				0.19
INTRA RMSD					0.49			
RESIDUAL SQUARE	0.01				0.04	0.07	0.03	
INTER RMSD					0.19			
RESIDUAL SQUARE	0.01	0.73	0.02	0.02	0.04	0.07	0.03	0.19
TOTAL RMSD					0.37			
NMR/2 FL H2O								
RESIDUAL SQUARE		0.00	0.15	0.02				0.00
INTRA RMSD					0.21			
RESIDUAL SQUARE	0.02				0.03	0.07	0.05	
INTER RMSD					0.20			
RESIDUAL SQUARE	0.02	0.00	0.15	0.02	0.03	0.07	0.05	0.00
TOTAL RMSD					0.21			
NMR/2 FL VACUUM								
RESIDUAL SQUARE		0.01	0.10	0.02				0.02
INTRA RMSD					0.19			
RESIDUAL SQUARE	0.02				0.01	0.07	0.05	
INTER RMSD					0.19			
RESIDUAL SQUARE	0.01	0.01	0.10	0.02	0.01	0.07	0.05	0.02
TOTAL RMSD					0.19			
NMR/2 FL MSPIN								
RESIDUAL SQUARE		0.00	0.11	0.02				0.00
INTRA RMSD					0.18			
RESIDUAL SQUARE	0.03				0.04	0.08	0.07	
INTER RMSD					0.23			
RESIDUAL SQUARE	0.03	0.00	0.11	0.02	0.04	0.08	0.07	0.00
TOTAL RMSD					0.21			

Table 2. Comparison between all structure distances.

The rmsd distance values prove that the 2'-FL structure in solution obtained by NMR is reliable when compared to the software MSpin and that the structure of this oligosaccharide in solution resembles the both minimized models, 2'-FL Vacuum and 2'-FL H₂O. Intra-residue proton–proton distances were obtained from H2 Gal-H3 Gal, H2 βGlc-OH6 βGlc, H1 βGlc-OH1 βGlc and H2 βGlc-H3 βGlc and compared with the distances obtained from the other structures (presented in table 3). The average values were determined from 50 to 400 ms. This interval was chosen aiming to minimize delay and spin diffusion generating more reliable data. Inter-residue proton–proton distances from H5 βGLC-H 5Fuc, CH3 Fuc-H2 Gal, OH2 Fuc-OH3 Gal, H6 Gal-OH3 βGlc distances allowed a comparison of the experimental NMR data to the others structures (Table 4). 2'-FL exhibited NOE OH2 Fuc-OH3 Gal, H6 Gal-OH3 βGlc and CH3 Fuc-H2 Gal contacts, providing distances of 2.38, 4.28 and 5.04 Å, respectively. The contacts between these residues observed in the NOESY spectra can be considered the experimental proof of a bent conformation of the fucose and glucose towards the galactose ring. The H5 βGLC-H 5Fuc contact by 3.23 Å allowed more structure analysis. From this information, can be examined that besides the approximation of these others hexoses to the galactose moiety these two rings comes each other. The torsional angles φ (H1-C1-O4-C4) Fuc2-1Gal of -31.9° and Gal4-1Glc of -166.7°, ψ (C1-O4-C4-H4) Fuc2-1Gal of 50.3° and Gal4-1Glc of -151.3°, θ (C1-O4-C4) Fuc2-1Gal of 126.4° and Gal4-1Glc of 145.8° measured of the 2'-FL NMR experimental model molecule gives more strength to this assumption (Figure 11)

STRUCTURE	H2Gal-H1Gal (Å)	H2βGlc-OH6Glc (Å)	H1βGlc-OH1βGlc (Å)	H2βGLC-H3βGLC (Å)
2'FL H2O	3.07	3.97	2.48	3.06
2'FL NMR	3.20	4.14	2.74	3.29
2'FL PDB	3.12	3.93	2.47	3.12
2'FL VACUUM	3.07	4.06	2.47	3.06
2'FL H2O MSPIN	3.04	3.93	2.46	3.04

Table 3. Selected Intraglycosidic Proton–Proton Distances (angstroms) for 2'-FL Derived from NOE Measurements and all other structures.

STRUCTURE	H5bGlc-H5Fuc (Å)	CH3Fuc-H2Gal (Å)	OH2Fuc-OH3Gal (Å)	H6Gal-OH3bGlc (Å)
2'FL H2O	3.28	5.42	2.24	4.3
2'FL NMR	3.23	5.04	2.38	4.28
2'FL PDB	2.37	4.91	2.51	4.72
2'FL VACUM	3.14	5.35	2.24	4.43
2'FL H2O MSPIN	3.27	5.36	2.23	4.23

Table 4. Selected Interglycosidic Proton–Proton Distances (angstroms) for 2'-FL. Derived from NOE Measurements and all other structures.

3.5. MTT Cell viability assay

No cytotoxicity was observed when RAW-Blue™ cells were exposed to 2'-FL (2; 0.2 and 0.02mg/mL).for 24 h and 48h (Figure 7 and Figure 8). Hence, the possibility that anti-inflammatory effects were caused by the cytotoxicity was excluded.

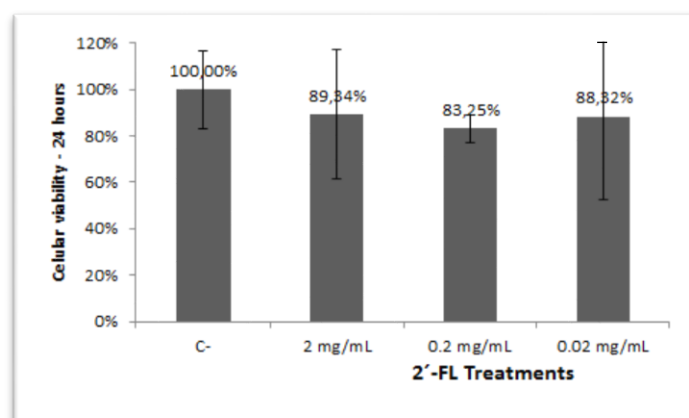


Figure 7. Graph of MTT assay after 24 h showing the rate of cell viability after exposure to different concentrations of 2'-FL (2; 0.2 and 0.02mg/mL).

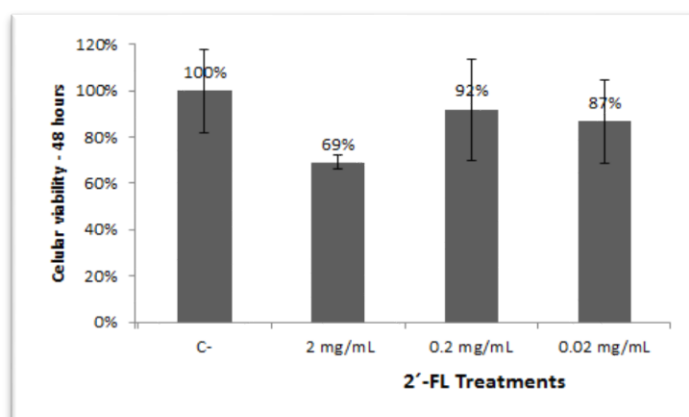


Figure 8. Graph of MTT assay after 48 h showing the rate of cell viability after exposure to different concentrations of 2'-FL (2; 0.2 and 0.02mg/mL).

3.6. QUANTI-Blue Assay

To determine the efficacy of the anti-inflammatory effect of 2'-FL (Figure 9) different concentrations of 2'-FL was added and a partial dose-dependent relationship was observed with the concentration, which means that if less SEAP was secreted by the cells, hence less colour produced in the presence of the QUANTI-Blue substrate. The positive and negative controls behaved as expected presenting the higher and lower peaks at the optical density graphic (no shown). When compared to the LPS treatment (positive control) 2'-FL at 0.02 mg/mL lessen the inflammatory activity by 26.26%; 0.2 mg/mL by 24.18%; 2 mg/mL by 31.63%.

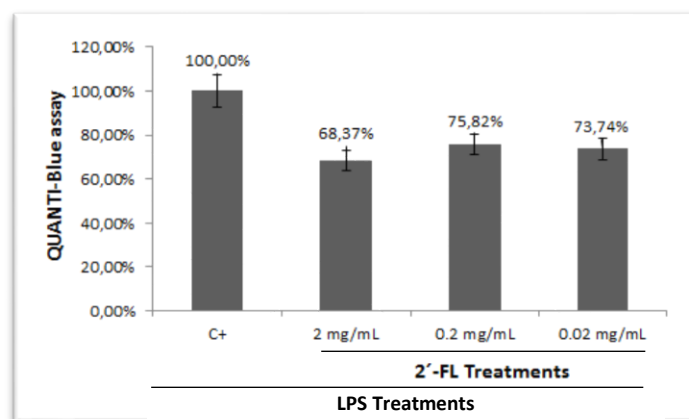


Figure 9. Percent inhibition values represented here are a reflection of treatments with 2'-FL (2, 0.2 and 0.02mg/mL). 100% is the positive control (C+) which was used as a referral point for the inhibition process.

3.7. Docking Assay

As described in the “2.10. Molecular Docking”, initial bind Dockings using AutoDock Vina to study the molecular structure of 2'-FL minimized and the TLR4 from 2'-FL minimized in H₂O (created as described by the item “2.9. Molecular Minimization”), a pdb of 2'-FL (crystal structure) and the experimental model (NMR predicted structure) was proceed. The software returned different binding affinity for possibles distincts binding sites (Different colours in Figure 10). Since thermodynamic potential, demonstrated as Gibbs free energy (kcal/mol), is considered in this binding process and an equilibrium state and complex stability is more achieve as the value is more negative²³ the 2'-FL minimized in H₂O presenting the most affinity structure with TLR4, followed by a pdb of 2'-FL (crystal structure) and the experimental model (NMR predicted structure) (Figure 12). Since some studies present the quenching activity of 2'-FL – possible without binding to the receptor – more studies are necessary to demonstrated if the action of this oligosaccharide is through the binding with the TLR4 or by another mechanism.

2'-FL H2O				2'-FL NMR				2'-FL PDB					
MODE	AFFINITY	DIST. FROM BEST MODE		MODE	AFFINITY	DIST. FROM BEST MODE		MODE	AFFINITY	DIST. FROM BEST MODE			
	(Kcal/mol)	R.M.S.D	L.B.	R.M.S.D	L.B.	R.M.S.D	L.B.		(Kcal/mol)	R.M.S.D	L.B.	R.M.S.D	L.B.
1	-7.8	0.000	0.000	1	-7.3	0.000	0.000	1	-7.0	0.000	0.000		
2	-7.6	1.726	4.975	2	-7.2	6.789	11.028	2	-6.6	17.635	21.174		
3	-7.5	85.999	90.582	3	-7.2	18.606	21.540	3	-6.5	2.095	4.887		
4	-7.4	23.659	27.976	4	-7.2	9.609	13.665	4	-6.2	20.410	24.249		
5	-7.4	86.529	90.250	5	-7.0	6.906	10.917	5	-6.1	2.285	6.701		
6	-7.4	19.695	22.672	6	-6.9	18.667	21.187	6	-6.1	29.286	33.951		
7	-7.4	47.956	52.753	7	-6.9	1.583	5.329	7	-6.1	2.263	7.077		
8	-7.3	17.211	21.568	8	-6.8	18.448	21.053	8	-6.0	1.696	2.829		
9	-7.2	22.534	25.911	9	-6.5	19.234	21.919	9	-5.9	15.657	19.211		

Figure 10. Affinity bindings and distance from best mode Docking. Different colours represent different possible binding sites.

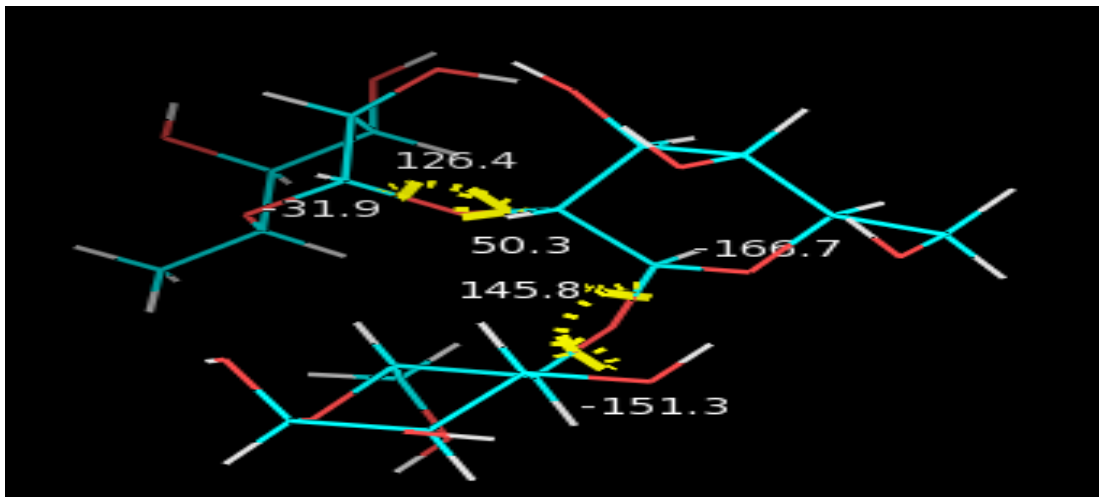


Figure 11. Fish hook like structure for 2'-FL in solution (NMR experimental model).

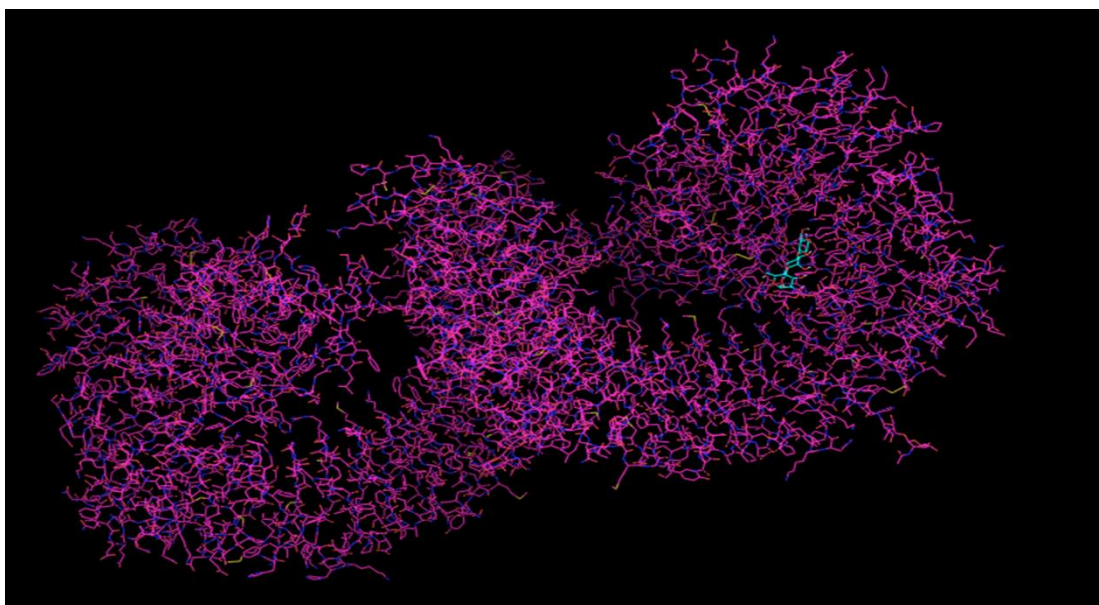


Figure 12. Example of TLR4-2'-FL binding. In this case number 1 mode. Purple representing TLR4 protein. Blue Representing 2'-FL minimized in water.

4. Conclusion

Human Milk Oligosaccharides have been a growing research area since newly distinct associations have been presented with its actions. From this, a demand to obtain these molecules was originated. In this article we present and validate a charcoal-celite-DEAE-sepharose isolation method for obtain this novel type of oligosaccharides from human milk. Since many different techniques have been applied aiming HMO's isolation, the method present here proved to be useful for this propose^{6,14} and DEAE-sepharose column has been extensively used to isolation of proteins since 70 decade¹⁵ but proved to be a convenient method to exclude charged HMOs from a mixture fraction. As NMR and have been classified as the main tools for identification and characterization of HMOs⁴, using different NMR experiments data combining with MS allow us to generate data that would be applicable for other research groups and the industry. Besides that, this study present a probable conformational structure of 2'-FL in solution, its biological action and possible binding sites for this oligosaccharide inside the TLR4 protein.

Overall, application of simple isolation methods and differentiated analytical approaches will turn HMOs as a potential tool for use in human and animal health. This knowledge and data should facilitate this development and possible clinical application of these novel molecules.

1. EMMETT, P. M.; ROGERS, I. S. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. **Early human development**, 49:S7-S28, 1997.
2. KUNZ, C.; RUDLOFF, S.; SCHAD, W.; BRAUN, D. Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. **British Journal of Nutrition**, 82(5):391-399, 1999.
3. NEWBURG, D. S. Oligosaccharides and glycoconjugates in human milk: their role in host defense. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, 1(3):271-283, 1996.
4. HUESO, P.; MARTÍN-SOSA, S.; MARTÍN, M. J. Role of Milk Carbohydrates in Preventing Bacterial Adhesion. **Handbook of Carbohydrate Engineering**. Yarema K.J. (ed.), Taylor & Francis (CRC Press), pp. 141-175, 2005.
5. GNOTH, M. J.; KUNZ, C.; KINNE-SAFFRAN, E.; RUDLOFF, S. Human Milk Oligosaccharides Are Minimally Digested In Vitro. **Nutrient Metabolism**, 130(12):3014-20, 2000.
6. COPPA, G. V.; PIERANI, P.; ZAMPINI, L.; BRUNI, S.; CARLONI, I.; GABRIELLI, O. Characterization of oligosaccharides in milk and feces of breast-fed infants by high-performance anion-exchange chromatography. In: **Bioactive components of human milk**. Springer US, 2001. p. 307-314.
7. RUDLOFF, S.; POHLENTZ, G.; DIEKMANN, L.; EGGE, H.; KUNZ, C. Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. **Acta Paediatrica**, 85:598-603, 1996
8. KUNZ, C.; KUNTZ, S.; RUDLOFF, S. Bioactivity of human milk oligosaccharides. **Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity**, p. 1-20, 2014.
9. EGGE, H.; DELL, A.; von NICOLAI, H. Fucose containing oligosaccharides from human milk, I. Separation and identification of new constituents. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 224:235-253, 1983.
10. BUBB, W. A. NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, 19(1):1-19, 2003.
11. FINKE, B.; STAHL, B.; PFENNINGER, A.; KARAS, M.; DANIEL, H.; SAWATZKI, G. Analysis of high-molecular-weight oligosaccharides from human milk by liquid chromatography and MALDI-MS. **Analytical Chemistry**, 71(17):3755-3762, 1999.
12. SKIPSKI, V. P. Thin-layer chromatography of neutral glycosphingolipids. **Methods in Enzymology**, 35:396-425, 1975.
13. SASSAKI, G. L., SOUZA, L. M., CIPRIANI, T. R., IACOMINI, M. TLC of Carbohydrates. In: **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. Boca Raton, USA, CRC Press.2008. pp 255-276.
14. DE SANTANA, A. P.; NOLETO G. R.; GORIN, P. A. J.; DE SOUZA, L. M.; IACOMINI M.; SASSAKI, G. L. GC-MS detection and quantification of lipopolysaccharides in polysaccharides through 3-O-acetyl fatty acid methyl esters. **Carbohydrate Polymers**, 87 (4):2730-2734, 2012.
15. Woods Group GLYCAM Web. 2005-2012.

16. FRISCH, M.; TRUCKS, G.; SCHLEGEL, H.; SCUSERIA, G.; ROBB, M.; CHEESEMAN, J.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; PETERSSON, G.; NAKATSUJI, H.; LI, X.; CARICATO, M.; MARENICH, A.; BLOINO, J.; JANESKO, B.; GOMPERS, R.; MENNUCCI, B.; HRATCHIAN, H.; ORTIZ, J.; IZMAYLOV, A.; SONNENBERG, J.; WILLIAMS-YOUNG, D.; DING, F.; LIPPARINI, F.; EGIDI, F.; GOINGS, J.; PENG, B.; PETRONE, A.; HENDERSON, T.; RANASINGHE, D.; ZAKRZEWSKI, V.; GAO, J.; REGA, N.; ZHENG, G.; LIANG, W.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; THROSEL, K.; MONTGOMERY, J.; PERALTA, J.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K.; STAROVEROV, V.; KEITH, T.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J.; IYENGAR, S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; MILLAM, J.; KLENE, M.; ADAMO, C.; CAMMI, R.; OCHTERSKI, J.; MARTIN, R.; MOROKUMA, K.; FARKAS, O.; FORESMAN, J.; FOX, D. Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
17. HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review B*, 136, B864, 1964.
17. KOHN, W.; SHAM, L. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects *Physical Review A* 140, A1133, 1965.
17. BECKE, A. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *Journal of Chemical Physics* 98, 5648, 1993.
17. LEE, C.; YANG, R.; PARR, G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B*, 37, 785, 1988.
17. MIEHLICH, B.; SAVIN, A.; STOLL, H.; PREUSS, H. Results obtained with the correlation energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr *Chemical Physics Letters*, 157, 200, 1989.
18. PROVASI, P.; AUCAR, G.; SAUER, S. The effect of lone pairs and electronegativity on the indirect nuclear spin-spin coupling constants in CH₂XCH₂X (X=CH₂, NH, O, S): Ab initio calculations using optimized contracted basis sets. *Journal of Chemical Physics* 115, 1324, 2001.
19. MENNUCCI, T.; CAMMI, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models **Chemical Review** 105, 2999, 2005.
20. CARREGAL, A.P., MACIEL, F.V., CARREGAL, J.B. et al. **J Mol Model**. 23: 111, 2017.
21. van LEEUWEN, S.; SCHOEMAKER, R.; GERWIG, G.; van LEUSEN, E.; DIJKHUIZEN, L.; KAMERLING, J. Rapid milk group classification by ¹H NMR analysis of Le and H epitopes in human milk oligosaccharide donor samples. **Glycobiology**, 2014
22. KJAERULFF, L.; GOTFREDSEN, H. NMR structural studies of oligosaccharides and other natural products. Technical University of Denmark (DTU), 2014.
23. FORLI, S.; HUEY, R.; PIQUE, M.E.; SANNER, M.F.; GOODSSELL, D.S.; OLSON, A.J. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. **Nat. Protoc.** 11, 905–919, 2016.

7.CONCLUSÕES

Após análise dos dados gerados pelos experimentos realizado neste trabalho podemos concluir que:

- O método de isolamento utilizando cromatografia de carvão-celite (1:1) e como fase móvel, um gradiente de H₂O:EtOH, variando de 100:0 até 40:60 seguida por cromatografia líquida de troca iônica DEAE-Sepharose utilizando H₂O+ 2% Amônio como fase móvel provou ser um método eficiente para o isolamento de oligossacarídeos neutros do leite humano.

- O HMO, 2'-FL em solução possui característica conformacionais mais próximas de estruturas minimizadas em vácuo e em H₂O do que de estruturas cristalizadas, como visto pelo valor de rmsd, referentes as distâncias medidas experimentalmente por RMN através de dados de NOE, de 0,19; 0,21; 0,37, respectivamente.

- Em ensaios de viabilidade celular (MTT) e capacidade pró/anti-inflamatória (QUANTI-Blue), 2'-FL apresenta capacidade anti-inflamatória quando comparada ao LPS (controle positivo) de 26.26% (0,02 mg/mL); 24.18% (0,2 mg/mL); 31.63% (2 mg/mL). sem apresentar toxicidade significativa em nenhuma destas concentrações.

- Através de ensaios de *Docking*, o oligossacarídeo 2'-FL apresenta possíveis sítios de ligação com a molécula proteica TLR4, provando assim ser um potencial modulador da capacidade inflamatória em seres humano.

Assim, os resultados apresentam um novo e simples método para isolamento de oligossacarídeos do leite humano além de comprovações da eficiência da molécula 2'-FL em interferir na inflamação mediada por receptores do tipo TLR4. Sendo assim, estes dados e resultados poderão facilitar o desenvolvimento de obtenção e aplicações clínicas destas moléculas contidas naturalmente no leite humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. S. Leite Instável não ácido e propriedades físico-químicas do leite de vaca Jersey. Dissertação de Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- SAUMONNEAU, A.; CHAMPION, E; PELTIER-PAIN, P.; MONAL-GABOR, D; HENDRICKX, J; TRAN, V; HEDEROS, M; DEKANY, G; TELLIER, C. Design of an α -l-transfucosidase for the synthesis of fucosylated HMOs. **Glycobiology**, 26 (3):261-269, 2015.
- BAILEY, M.; HAVERSON, K.; INMAN, C.; HARRIS, C.; JONES, P.; CORFIELD, G.; MILLER, B.; STOKES, C. The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. **Proceedings of the Nutrition Society**, 64:451–457, 2005.
- BALDWIN, A. J.; KAY, L. E. NMR spectroscopy brings invisible protein states into focus. **Nature Chemistry Biology**, 5(11): 808-814, 2009.
- BECKER, D.J.; LOWE, B.J. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. **Glycobiology**, 13 (7):41-53, 2003.
- BLASZCZYK, J.; LU, Z.; LI, Y.; YAN, H.; JI, X. Crystallographic and molecular dynamics simulation analysis of Escherichia coli dihydroneopterin aldolase. **Cell Bioscience**, 4(1):52, 2014.
- BODE, L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. **Glycobiology**, 22(9):1147-62, 2012.
- BODE, L. The functional biology of human milk oligosaccharides. **Early Human Development**, 91 (11): 619-622, 2015.
- BUBB, W. A. NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, 19(1):1-19, 2003.
- CAPASSO, J.M.; HIRSCHBERG, C.B. Mechanisms of glycosylation and sulfation in the Golgi apparatus: evidence for nucleotide sugar/ nucleoside monophosphate and nucleotide sulfate/nucleoside monophosphate antiports in the Golgi apparatus membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 81:7051-7055, 1984.
- CHANG, L.; ADEYEMO, M.; KARAGIANNIDIS, I.;VIDELock, E.J.; BOWE, C.; SHIH,W.; PRESSON, A.P.; YUAN, P.Q.; CHATURVEDI, P.; WARREN, C.D.; ALATAYE, M.; MORROW, A.L.; RUIZ-PALACIOS,G.; PICKERING, K.; NEWBURG, D.L. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. **Glycobiology**, 11:365–367, 2001.

- COFFEY, J.W.; MILLER, O.N.; SELINGER, O.Z. The metabolism of L-fucose in the rat. **Journal of Biological Chemistry**, 239:4011-4017, 1964.
- COPPA, G. V.; PIERANI, P.; ZAMPINI, L.; BRUNI, S.; CARLONI, I.; GABRIELLI, O. Characterization of oligosaccharides in milk and feces of breast-fed infants by high-performance anion-exchange chromatography. In: **Bioactive components of human milk**. Springer US, 2001. p. 307-314.
- DANESE, S.; DE LA MOTTE, C.; REYES, B. M.; SANS, M.; LEVINE A.D.; FIOCCHI, C. Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. **Journal of Immunology**, 172(4):2011–2015, 2004.
- DAVIES, G. J. Sweet secrets of synthesis. **Nature Structural Biology**, 8:98-100, 2001.
- EGGE, H.; DELL, A.; von NICOLAI, H. Fucose containing oligosaccharides from human milk, I. Separation and identification of new constituents. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 224:235–253, 1983.
- EGGE, H. The diversity of oligosaccharides in human milk. **New perspectives in infant nutrition**, p. 12-26, 1993.
- ELIEZER, D.; YAO, J.; JANE DYSON, H.; WRIGHT, P.E. Structural and dynamic characterization of partially folded states of apomyoglobin and implications for protein folding. **Nature Structure Biology**, 5 (2):148-55, 1998.
- EMMETT, P. M.; ROGERS, I. S. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. **Early human development**, 49:S7-S28, 1997.
- ENGFER, M. B.; STAHL, B.; FINKE, B.; SAWATZKI, G.; DANIEL, H. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**, 71:1589–96, 2000.
- ERNEY, R.M.; MALONE, W.T.; SKELDING, M.B.; MARCON, A.A.; KLEMAN-LEYER, K.M.; O'RYAN, M.L.; RUIZ-PALACIOS, G.; HILTY, M.D.; PICKERING, L.K.; PRITEO, P.A. Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 30:181–192, 2000
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, L.H. Second edition, Springer, 28-30. 2015
- FINKE, B.; STAHL, B.; PFENNINGER, A.; KARAS, M.; DANIEL, H.; SAWATZKI, G. Analysis of high-molecular-weight oligosaccharides from human milk by liquid chromatography and MALDI-MS. **Analytical Chemistry**, 71(17):3755-3762, 1999.
- GNOTH, M. J.; KUNZ, C.; KINNE-SAFFRAN, E.; RUDLOFF, S. Human Milk Oligosaccharides Are Minimally Digested In Vitro. **Nutrient Metabolism**, 130(12):3014-20, 2000.
- GINSBURG, V. Formation of guanosine diphosphate L-fucose from guanosine diphosphate mannose. **Journal of Biological Chemistry**, 235:2196-2201, 1960.
- GOBL, C., TJANDRA, N. Application of Solution NMR Spectroscopy to Study Protein Dynamics. **Entropy**, 14(3):581-598, 2012.

GOEHRIN, K. C.; KENNEDY, A. D.; PRIETO, P. A.; BUCK, R. H. Direct Evidence for the Presence of Human Milk Oligosaccharides in the Circulation of Breastfed Infants. **Plos One**, 9(7) 2014.

FUNAKOSHI, T.; YAMASHITA, K.; ICHIKAWA, N.; FUKAI, M.; SUZUKI, T.; GOTO, R.; OURA, T.; KOBAYASHI, N.; KATSURADA, T.; ICHICHA, S.; OZAKI, M.; UMEZAWA, K.; TODO, S. A novel NF- κ B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, ameliorates inflammatory colonic injury in mice. **Journal of Crohn's and Colitis**, 6:215–225, 2012.

GERMAN, J. B.; FREEMAN, S. L.; LEBRILLA, C. B.; MILLS, D. A. Human Milk Oligosaccharides: Evolution, Structures and Bioselectivity as Substrates for Intestinal Bacteria. In: **Personalized Nutrition for the Diverse Needs of Infants and Children**. Karger Publishers, 2008. p. 205-222.

HALLGREN, P.; LINDBERG, B. S.; LUNDBLAD, A. Quantitation of some urinary oligosaccharides during pregnancy and lactation. **Journal of Biological Chemistry**, 252(3): 1034-1040, 1977.

HE, Y.; LIU, S.; LEONE, S.; NEWBURG, D. Human colostrum oligosaccharides modulate major immunologic pathways of immature human intestine. **Mucosal Immunology**, 7:1326–39, 2014.

HE, Y.; LIU, S.; KLING, D.; SERENA, L.; LAWLOR, T.; HUANG, Y.; FEINBERG, S.; HILL, D.; NEWBURG, D. The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose modulates CD14 expression in human enterocytes, thereby attenuating LPS-induced inflammation. **Gut**, 65:33–46, 2016.

HENNET, T.; WEISS, A.; BORSIG, L. Decoding breast milk oligosaccharides. **Swiss Medical Weekly**, 19;144 2014.

HUESO, P.; MARTÍN-SOSA, S.; MARTÍN, M. J. Role of Milk Carbohydrates in Preventing Bacterial Adhesion. **Handbook of Carbohydrate Engineering**. Yarema K.J. (ed.), Taylor & Francis (CRC Press), pp. 141-175, 2005.

JOHNSON, S.W.; ALHADEFF, J.A. Mammalian alpha-L-fucosidases. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**, 99:479-488, 1991.

JONAS, A.J.; CONRAD, P.; JOBE, H. Neutral-sugar transport by rat liver lysosomes. **Biochemistry Journal**, 272:323-326, 1990.

JUNG, J. W.; LEE, W. Structure-based functional discovery of proteins: structural proteomics. **Journal of Biochemistry Molecular Biology**, 37(1):28-34, 2004.

KAUFMAN, R.L.; GINSBURG, V. The metabolism of L-fucose by HeLa cells. **Experimental Cell Research**, 50:127-132, 1968.

KARPLUS, Martin. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. **The Journal of chemical physics**, 30(1):11-15, 1959.

KOBATA, A. Isolation of oligosaccharides from human milk, **Methods Enzymology**, 28:262–271, 1972.

KOBATA, A.; KOCHIBE, N.; ENDO, T.; Affinity chromatography of oligosaccharides on Psthyrella velutina lectin column. **Methods Enzymology**, 247:228–237, 1994.

- KOLMER, A; EDWARDS, J; KUPROV, I; THIELE, C. Conformational analysis of small organic molecules using NOE and RDC data: A discussion of strychnine and α -methylene- γ -butyrolactone. **Journal of Magnetic Resonance**, 261:101-109, 2015.
- KOVACS, H.; MOSKAU, D.; SPRAUL, M. Cryogenically cooled probes - a leap in NMR technology. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, 46(2-3): 131-155, 2005.
- KUNZ, C; RUDLOFF, S. Biological functions of oligosaccharides in human milk. **Acta Paediatrica**, 82(12):903-912, 1993.
- KUNZ, C.; RUDLOFF, S.; SCHAD, W.; BRAUN, D. Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. **British Journal of Nutrition**, 82(5):391-399, 1999.
- KUNZ, C.; RUDLOFF, S.; BAJER, W.; KLEIN, N.; STROBEL, S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. **Annual review of nutrition**, 20(1):699-722, 2000.
- KUNZ, C.; KUNTZ, S.; RUDLOFF, S. Bioactivity of human milk oligosaccharides. **Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity**, p. 1-20, 2014.
- KURAKEVICH, E.; HENNET, T.; HAUSMANN, M.; ROGLER, G.; BORSIG, L. Milk oligosaccharide sialyl(α 2,3)lactose activates intestinal CD11c+ cells through TLR4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 110(43):17444-9, 2013.
- LEBOUDER, E.; REY-NORES J.E.; RUSHMERE, N.K.; GRIGOROV, M.; LAWN, S.D.; AFFOLTER, M.; GRIFFIN, G.E.; FERRARA, P.; SCHIFFRIN, E.J.; MORGAN, B.P.; LABÉTA, M.O. Soluble forms of *Toll*-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. **Journal of Immunology**, 171(12): 6680-9, 2003.
- LISTINSKY, J.J.; SIEGAL, G.P.; LISTINSKY, C.M. α -L-fucose - a potentially critical molecule in pathologic processes including neoplasia. **American Journal of Clinical Pathology**, 110:425-440, 1998.
- LOWE, J.B. Carbohydrate recognition in cell-cell interaction. In: **Molecular Glycobiology**, Oxford University Press, Oxford, 1994, pp. 163-205.
- LU, Y.; YEH, W.; OHASHI, P. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, 42(2)145-151, 2008.
- LUCAS, H.; BERCEGAY, S.; LePENDU, J.; JEAN, M.; MIRELLE, S.; BARRIERE, P. A fucose-containing epitope potentially involved in gamete interaction on the human zona pellucida. **Human Reproduction**, 9:1532-1538, 1994.
- MANNICK, E.; UDALL, J.N. Neonatal gastrointestinal mucosal immunity. **Clinics in Perinatology**, 23:287-304 (1996).
- McVEAGH, P.; MILLER, B. Human milk oligosaccharides: only the breast. **Journal of Paediatrics and Child Health**, 33:281-286, 1997.
- MESSER, M. Identification of N-acetyl-4-O-acetylneuraminylactose in echidna milk. **Biochemistry Journal**, 139:415-420, 1974.
- MICHALSKI, J.C.; KLEIN, A. Glycoprotein lysosomal storage disorders: alpha- and beta-mannosidosis, fucosidosis and alphaN-acetylgalactosaminidase deficiency. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1455:69-84, 1999.

- MOK, Y. K.; KAY, C.M.; KAY, L.E.; FORMAN-KAY, J. NOE data demonstrating a compact unfolded state for an SH3 domain under non-denaturing conditions. **Journal of Molecular Biology**, 289(3):619-38, 1999.
- MOLONEY, D.J.; HALTIWANGER, R.S. The O-linked fucose glycosylation pathway: identification and characterization of a uridine diphosphoglucose: fucose-beta1,3-glycosyltransferase activity from Chinese hamster ovary cells. **Glycobiology**, 9:679-687, 1999.
- MORENO, F. J.; SANZ, M.L. Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity. IN: **Human Oligosaccharides and their functions in gastrointestinal tract**. John Wiley & Sons. 2014.
- MURAMATSU, T. Carbohydrate signals in metastasis and prognosis of human carcinomas. **Glycobiology**, 3:294-296, 1993.
- NEWBURG, D. S. Oligosaccharides and glycoconjugates in human milk: their role in host defense. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, 1(3):271-283, 1996.
- NEWBURG, D. S. Do the binding properties of oligosaccharides in milk protect human infants from gastrointestinal bacteria? **The Journal of nutrition**, 127(5):980S-984S, 1997.
- NEWBURG, D. S.; KO J.S.; LEONE, S.; NANTHAKUMAR, N.N. Human Milk Oligosaccharides and Synthetic Galactosyloligosaccharides Contain 3', 4', and 6'-Galactosyllactose and Attenuate Inflammation in Human T84, NCM-460, and H4 Cells and Intestinal Tissue Ex Vivo. **The Journal of Nutrition**, 146(2):358-67, 2015.
- NEWBURG, D.; TANRITANIR, A.; CHAKRABART, S. Lactodifucotetraose, a human milk oligosaccharide, attenuates platelet function and inflammatory cytokine release. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, 42:46-55, 2016.
- NEESER, J. R.; GOLLIARD, M.; DEL VEDOVO, S. Quantitative determination of complex carbohydrates in bovine milk and in milk-based infant formulas. **Journal of Dairy Science**, 74:2860-2871, 1991.
- RUDLOFF, S.; POHLENTZ, G.; DIEKMANN, L.; EGGE, H.; KUNZ, C. Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. **Acta Paediatrica**, 85:598-603, 1996.
- SASSAKI, G. L., SOUZA, L. M., CIPRIANI, T. R., IACOMINI, M. TLC of Carbohydrates. In: **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. Boca Raton, USA, CRC Press. 2008. pp 255-276.
- SASSAKI, G. L.; RITER, D.S.; SANTTANA, A.P.; GUERRINI, M.; LIMA, M.A.; COSENTINO, C.; SOUZA, L.M, CIPRIANI, T.R.; RUDD, T.R.; NADER, H.B.; YATES, E.A.; GORIN, P.A.; TORRI, G.; IACOMINI, M. A robust method to quantify low molecular weight contaminants in heparin: detection of tris(2-n-butoxyethyl) phosphate. **Analyst**, 136(11): 2330-8, 2011.
- SASSAKI, G. L.; ELLI, S.; RUDD, T.; MACCHI, E.; YATES, E.; NAGGI, A.; SHRIVER, Z.; RAMAN, R.; SASISEKHARAN, R.; TORRI, G.; GUERRINI, M. Human (alpha2-->6) and avian (alpha2-->3) sialylated receptors of influenza A virus show distinct conformations and dynamics in solution. **Biochemistry**, 52(41): 7217-30, 2013.

SASTRY, M.; XU L.; GEORGIEV I.S.; BEWLEY C.A.; NABEL G.J.; KWONG P.D. Mammalian production of an isotopically enriched outer domain of the HIV-1 gp120 glycoprotein for NMR spectroscopy. **Journal of Biomolecular NMR**, 50(3) 197-207, 2011.

SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; MIYAKE, K.; KIMOTO, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on *Toll*-like receptor 4. **The Journal of experimental medicine**, 189(11):1777-1782, 1999.

SINOWATZ, F.; PLENDL, J.; KOLLE, S. Protein-carbohydrate interactions during fertilization. **Acta Anatomica**, 161:196–205, 1998.

SKIPSKI, V. P. Thin-layer chromatography of neutral glycosphingolipids. **Methods in Enzymology**, 35:396-425, 1975.

SMILOWITZ, J. T.; LEBRILLA, C. B.; MILLS, D.A.; GERMAN, J.B.; FREEMAN, S.L. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. **Annual review of nutrition**, 34:143-69, 2014.

SNYDER, D. A.; CHEN, Y.; DENISSOVA, N.G.; ACTON, T.; ARAMINI, J.M.; CIANO, M.; KARLIN, R.; LIU, J.; MANOR, P.; RAIAN, P.A.; ROSSI, P.; SWAPNA, G.V.;XIAO, R.; ROST, B.; HUNT, J.; MONTELIONE, G.T.. Comparisons of NMR spectral quality and success in crystallization demonstrate that NMR and X-ray crystallography are complementary methods for small protein structure determination. **Journal of the American Chemical Society**, 127(47): 16505-16511, 2005.

STAHL, B.; THURL, S.; ZENG, J.; KARAS, M.; HILLENKAMP, F.;STEUP, M.; SAWATZKI, G. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Analytical biochemistry**, 223(2):218-226, 1994.

STAUDACHER, E.; ALTMANN, F.; WILSON, I.B.; MARZ, L. Fucose in N-glycans: from plant to man. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1473, 216–236, 1999.

SUBRAMANIAN, S.; CAMPBELL, B.J.; RHODES, J.M. Bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 19:475–484, 2006.

SULIVAN, F.X.; KUMAR, R.; KRIZ, R.; STHAL, M.; XU, G.Y.; ROUSE, J.; CHANG, X.J.; BOODHOO, A.; POTVIN, B.; CUMMING, D.A. Molecular cloning of human GDP-mannose 4,6-dehydratase and reconstitution of GDP-fucose biosynthesis in vitro. **Journal Of Biological Chemistry**, 273, 8193-8202, 1998.

TEXTOR, L. C.; COLUSSI, F.; SILVEIRA, R.L.; SERPA, V.; DE MELLO, B.L.; MUNIZ, J.R.; SQUINA, F.M.; PEREIRA, N.; SKAF, M.S.; POLKARPOV, I. Joint X-ray crystallographic and molecular dynamics study of cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum*: deciphering the structural features of cellobiohydrolase catalytic activity. **FEBS Journal**, 280(1):56-69, 2013.

TONETTI, M.; STURLA, L.; BISSO, A.; BENATTI, U.; DE FLORA, A. Synthesis of GDP-L-fucose by the human FX protein. **Journal of Biological Chemistry**, 271:27274-27279, 1996

TONETTI, M.; STURLA, L.; BISSO, A.; ZANARDI, D.; BENATTI, U.; DE FLORA, A. The metabolism of 6-deoxyhexoses in bacterial and animal cells. **Biochimie**, 80, 923-931, 1998.

TOTTEN, S. M.; ZIVKOVIC, A.M.; WU, S.; NGYUEN, U.; FREEMAN, S.L.; RUHAAK, L.R.; DARBOE, M.K.; GERMAN, J.B.; PRENTICE, A.M.; LEBRILLA, C.B. Comprehensive profiles of human milk oligosaccharides yield highly sensitive and specific markers for determining secretor status in lactating mothers. **Journal of proteome research**, 11(12):6124-6133, 2012.

TROPP, J. Dipolar relaxation and nuclear Overhauser effects in nonrigid molecules: the effect of fluctuating internuclear distances. **The Journal of Chemical Physics**, 72(11): 6035-6043, 1980.

THURL, S.; SAWATZKI, G. Variations of neutral oligosaccharides in human milk during lactation: preliminary investigations. In: **New Perspectives in Infant Nutrition**. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 27-31, 1993.

VE, R.W.; MICHALSKI, J.C.; CORFIELD, A.P.; SANDER-WEWER, M.; GIES, D.; SCHAUER, R. New chromatographic system for the rapid analysis and preparation of colostrum sialyloligosaccharides. **Journal of Chromatography A**, 212(3):313-322, 1981.

WIESE, T.J.; DUNLAP, J.A.; YOREK, M.A. L-fucose is accumulated via a specific transport system in eukaryotic cells. **Journal of Biological Chemistry**, 269:22705-22711, 1994.

WLODAWER, A.; MINOR, W.; DAUTER, Z.; JASKOLSKI, M. Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. **Febs Journal**, 275(1):1-21, 2008.

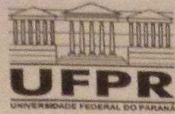
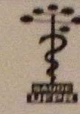
YEE, A.; SAVCHENKO, A.; IGNACHENKO, A.; LUKIN, J.; XU, X.; SKARINA, T.; EVDOKIMOVA, E.; LIU, C.S.; SEMESI, A.; GUIDO, V.; EDWARDS, A.M.; ARROWSMITH, C.H. NMR and X-ray crystallography, complementary tools in structural proteomics of small proteins. **Journal of the American Chemical Society**, 127(47):16512-7, 2005.

YOREK, M.A.; WIESE, T.J.; DAVIDSON, E.P.; DUNLAP, J.A.; STEFANI, M.R.; CONNER, C.E.; LATTIMER, S.A.; KAMIJO, M.; GREENE, D.A.; SIMA, A.A. Reduced motor nerve conduction velocity and Na(†)-K(†)-ATPase activity in rats maintained on L-fucose diet. Reversal by myo-inositol supplementation. **Diabetes**, 42:1401-1406, 1993.

YU, L.; PHILLIPS, R.L.; ZHANG, D.; TEGHAMENT, A.; WEISS, J.P.; GIONANNINI, T.L. NMR studies of hexaacetylated endotoxin bound to wild-type and F126A mutant MD-2 and MD-2.TLR4 ectodomain complexes. **Journal of Biological Chemistry**, 287(20):16346-55, 2012.

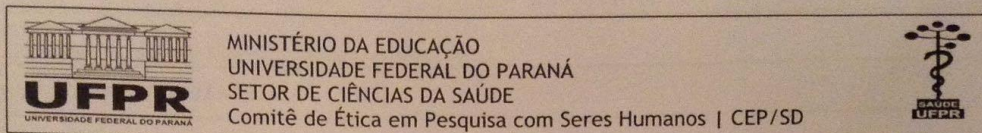
ANEXOS

ANEXO 1 FOLHA DE ROSTO COMITÊ DE ÉTICA

 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos CEP/SD				
Check List Documental				
Identificação dos Pesquisadores				
Pesquisador principal: Guilherme Lanzi Sasaki				
Telefone fixo e celular: (31) 9212-1050				
Email: sassaki@ufpr.br				
Colaboradores: Bernardo Freire Starling Soares e Arquimedes Paixão Santana Filho				
Tipo de Pesquisa				
Graduação: () Especialização: () Mestrado: (X) Doutorado: ()				
Local, unidade ou serviço onde o estudo será realizado: UFPR - Setor de Ciências Bioquímica				
Instituição Coparticipante: -				
Considerações para Apresentação do Projeto				
		sim	não	n/a*
Inseriu o nome dos colaboradores na equipe da pesquisa, se houver?		X		
Inseriu o nome da Instituição Coparticipante, se houver?				X
O termo sujeito foi substituído por participante da pesquisa?		X		
Todos os documentos obrigatórios estão preenchidos e assinados?		X		
Todos os documentos estão em arquivos separados e nomeados de acordo com o conteúdo para a inserção na Plataforma Brasil?		X		
Documentos Obrigatórios				
		sim	não	n/a*
Ofício do pesquisador encaminhando o projeto ao CEP/SD (Modelo 1)		X		
Ofício encaminhando ata de aprovação (Modelo 2)		X		
Ata de aprovação do projeto		X		
Análise de mérito, comprovante de qualificação ou agência de fomento (Modelo 3)		X		
Declaração de concordância do orientador de graduação ou pós-graduação (Modelo 4)		X		
Concordância dos serviços envolvidos (Modelo 5)		X		
Concordância da Instituição Coparticipante (Modelo 6)				X
Concordância do diretor de ensino e pesquisa do HC/UFPR (Modelo 7)				X
Termo de confidencialidade assinado pelo pesquisador principal e demais colaboradores (Modelo 8)		X		
Declaração de tornar públicos os resultados (Modelo 9)		X		
Declaração de uso específico do material e/ou dados coletados assinada pelo pesquisador principal e demais colaboradores (Modelo 10)		X		
Termo de compromisso para o início da pesquisa (Modelo 11)		X		
Termo de guarda de material biológico (Modelo 12)		X		
Termo de compromisso para utilização de dados de arquivos (Modelo 13)				X
2ª Carta Coparticipante (substituída pelo modelo nº 6 em Nov/2015) (Modelo 14)				X

Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE	(Modelo 15)	X		
Termo de assentimento - TALE	(Modelo 16)			X
Dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido	(Modelo 17)			X

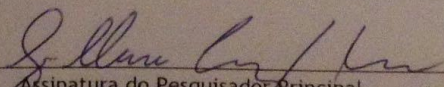
* n/a - não se aplica



Check List do Projeto

Projeto de Pesquisa > incluir as informações na ordem descrita abaixo	sim	não	n/a
1. Objetivo da pesquisa	X		
2. Relevância social	X		
3. Hipóteses a serem testadas*	X		
4. Antecedentes científicos	X		
5. Casuística	X		
6. Material e Metodologia (Descrever como será o processo de consentimento incluindo informações de como e onde o participante será abordado e convidado para participar)	X		
7. Resultados esperados do estudo	X		
8. Análise crítica de riscos e benefícios	X		
9. Duração total da pesquisa e cronograma	X		
10. Critérios para suspender ou encerrar a pesquisa	X		
11. Local onde será realizada a pesquisa	X		
12. Demonstrativo da existência da infra-estrutura	X		
13. Propriedade das informações	X		
14. Informações relativas ao participante da pesquisa e características da população a ser estudada	X		
15. Grupos vulneráveis*	X		
16. Fontes do material de pesquisa	X		
17. Planos para o recrutamento do participante da pesquisa	X		
18. Critérios de inclusão e exclusão	X		
19. Medidas de proteção ou minimização de qualquer risco eventual*	X		
20. Previsão de ressarcimento de gastos aos participantes da pesquisa*	X		
21. Referências bibliográficas	X		
22. Anexos [instrumentos de coleta de dados, protocolos, etc]	X		
23. Qualificação do(s) pesquisador(es)			

Curitiba 06, de Maio de 20 16


Assinatura do Pesquisador Principal

ANEXO 2 – PROJETO DETALHADO COMITÊ DE ÉTICA

***Além disto uma versão detalhada do projeto que se encontra na secretária do Programa da UFPR foi enviada para avaliação.**

ANEXO 3 – TERMO DE CONHECIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO COMITÊ DE ÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Bernardo Freire Starling Soares aluno de pós-graduação e Guilherme Lanzi Sasaki professor orientador – da Universidade Federal do Paraná, convidamos vocês, lactantes com idade entre 20 e 40 anos, saudáveis e de qualquer raça a participar de um estudo intitulado "Avaliação da atividade de oligossacarídeos isolados do leite humano em processos inflamatórios mediados por receptores TLR e descrição do mecanismo de interação por meio de técnicas de espectroscopia de RMN", para, a partir do isolamento de carboidratos específicos do leite humano, testar os seus efeitos na inflamação.

a) O objetivo desta pesquisa é avaliar a atividade anti/pró inflamatória de carboidratos contidos no leite humano.

b) Caso você participe da pesquisa, será necessário que você doe o leite seguindo as seguintes recomendações:

- Preparo do frasco:
 - Escolha um frasco de vidro com tampa plástica, pode ser de café solúvel ou maionese;
 - Retire o rótulo e o papelão que fica sob a tampa e lave com água e sabão, enxaguando bem;
 - Em seguida coloque em uma panela o vidro e a tampa e cubra com água, deixando ferver por 15 minutos (conte o tempo a partir do início da fervura);
 - Escorra a água da panela e coloque o frasco e a tampa para secar de boca para baixo em um pano limpo;
 - Deixe escorrer a água do frasco e da tampa. Não enxugue;
 - Você poderá usar quando estiver seco.

- Como se preparar para retirar o leite humano (ordenhar)

O leite deve ser retirado depois que o bebê mamar ou quando as mamas estiverem muito cheias.

- 1-Escolha um lugar limpo, tranquilo e longe de animais;
- 2-Prenda e cubra os cabelos com uma touca ou lenço;
- 3-Evite conversar durante a retirada do leite ou utilize uma máscara ou fralda cobrindo o nariz e a boca;
- 4-Lave as mãos e antebraços com água e sabão e seque em uma toalha limpa.

- Como retirar o leite humano (ordenhar)?

- Comece fazendo massagem suave e circular nas mamas.
- Massageie as mamas com as polpas dos dedos começando na aréola

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal [rubrica]
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE [rubrica]
 Orientador [rubrica]

(parte escura da mama) e, de forma circular, abrangendo toda mama.
- É ideal que o leite seja retirado de forma manual.

- Primeiro coloque os dedos polegar e indicador no local onde começa a aréola (parte escura da mama);
- Firme os dedos e empurre para trás em direção ao corpo;
- Comprima suavemente um dedo contra o outro, repetindo esse movimento várias vezes até o leite começar a sair;
- Despreze os primeiros jatos ou gotas e inicie a coleta no frasco.

→ Como guardar o leite retirado para doação?

O frasco com o leite retirado deve ser armazenado no congelador ou freezer.

Na próxima vez que for retirar o leite, utilize outro recipiente esterilizado e ao terminar acrescente este leite no frasco que está no freezer ou congelador.

* As amostras biológicas coletadas serão de uso específico para essa pesquisa e serão destruídas ao término do estudo em seis anos.

c) Para tanto você deverá comparecer no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná (UFPR) Centro Politécnico – Jardim das Américas CEP: 81.531-980 Caixa Postal: 19046 Curitiba – Paraná para entregar a sua doação de leite humano o que levará aproximadamente 5 minutos.

d) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado à ordenha (retirada do leite), sendo estes similares aos da amamentação normal, como: dor, mastite (inflamação da mama) e rachaduras dos mamilos.

e) Alguns riscos relacionados ao estudo poderão ser o desconforto no momento de entrega do seu próprio leite e o constrangimento ao relatar o histórico de sua gravidez aos pesquisadores.

f) Os benefícios esperados com essa pesquisa serão obtidos a partir da análise dos resultados, os quais poderão levar ao desenvolvimento de: terapias contra doenças inflamatórias, vacinas para doenças autoimunes e novos estudos que poderão ser realizados a partir destes dados, gerando assim possíveis ganhos para a sociedade, dentre eles o tratamento e/ou cura de algumas doenças. Nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

g) Os pesquisadores Bernardo Freire Starling Soares, Guilherme Lanzi Sassaki e Arquimedes Paixão de Santana Filho Nascimento, responsáveis por este estudo poderão ser localizados no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal [rubrica]
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE [rubrica]
Orientador [rubrica]

J é

(UFPR) Centro Politécnico – Jardim das Américas CEP: 81.531-980 Caixa Postal: 19046 Curitiba – Paraná , ou no telefone (41) 3361-1672, e também via e-mail: bernardo.starling@ufpr.br no horário 08:00 às 18:00 de segunda a sexta-feira, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

h) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

i) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, orientador Guilherme Lanzi Sassaki. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade)

j) O material obtido – amostras biológicas, questionários, imagens e vídeos – será utilizado unicamente para essa pesquisa e será destruído/descartado em rede pública de esgoto ao término do estudo, dentro de seis anos.

k) As despesas necessárias para a realização da pesquisa, transporte e potes de armazenamento não são de sua responsabilidade e você não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação

l) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

m) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

São condições para doação de suas amostras de leite para o estudo:

Apresentar exames do pré ou do pós-natal, com intuito apenas de garantir a padronização do estudo, já que é uma exigência do Ministério da Saúde que irá garantir a qualidade do leite humano a ser doado. Em nosso estudo se mostra importante tendo em vista que contaminações poderão alterar os resultados dos estudos;

Não fumar;

Não tomar medicamentos incompatíveis com a amamentação;

Não usar álcool ou drogas ilícitas.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal [rubrica]
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE [rubrica]
Orientador [rubrica]




Eu, Ana Caroline Quallio Marques, li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, 16 de Outubro de 2016


[Assinatura da Participante Ana Caroline Quallio Marques]


[Assinatura do Pesquisador Bernardo Freire Starling Soares]

Obs.: Os espaços para rubricas são destinados às 1ªs páginas do TCLE – não sendo necessário na última página pois já contém linha de assinatura.

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD Rua Padre Camargo, 285 | térreo |

Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 | cometica.saude@ufpr.br – telefone (041) 3360-7259

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal [rubrica]
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE [rubrica]
Orientador [rubrica]

ANEXO 4 – CRITÉRIOS INCLUSÃO/ECLUSÃO – COMITÊ DE ÉTICA

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO LACTANTES		
NOME: Ana Carolina Queiroz Marques		
IDADE: 33 anos		
TELEFONE: 3339 5502 / 9631 9252		
MARCAR COM X A OPÇÃO	SIM	NÃO
POSSUI EXAMES PRÉ OU PÓS NATAL:	X	
FAZ USO DE FUMO:		X
FAZ USO DE ÁLCOOL NOS ÚLTIMOS 12 MESES:		X
FAZ OU FEZ USO DE DROGAS NOS ÚLTIMOS 12 MESES:		X
UTILIZA ALGUM TIPO DE MEDICAMENTO:		X

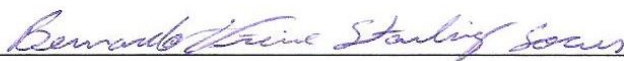
X

ANEXO 5 – TERMO DE GUARDA BIOLÓGICA – COMITÊ DE ÉTICA**TERMO DE GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO**

Nós, Bernardo Freire Starling Soares, Guilherme Lanzi Sassaki, Arquimedes Paixão Santana Filho, pesquisadores envolvidos no projeto intitulado “Avaliação da atividade de oligossacarídeos isolados do leite humano em receptores de membrana do tipo tlr2 e tlr4 e descrição do mecanismo de interação por meio de técnicas de espectroscopia de rnm”, nos comprometemos a zelar pela guarda do material biológico coletado para este estudo, após obtenção do consentimento informado dos participantes de pesquisa.

Outrossim, declaramos que, havendo necessidade de uso das amostras coletadas em outro projeto, o mesmo será submetido à apreciação pelo CEP da Instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP. Uma vez aprovado o projeto, os participantes serão novamente contatados para assinar o novo TCLE, consentindo com o uso das amostras de leite humano para a nova pesquisa. Para os dados associados, quando for o caso, será adotado o mesmo procedimento.

Curitiba, 16 de Dezembro de 2015



Bernardo Freire Starling Soares



Guilherme Lanzi Sassaki

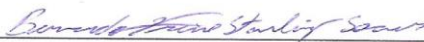


Arquimedes Paixão de Santana Filho

ANEXO 6 - TERMO DE COMPROMISSO INÍCIO PESQUISA – COMITÊ DE ÉTICA**TERMO DE COMPROMISSO PARA INÍCIO DA PESQUISA**

Eu, Bernardo Freire Starling Soares, pesquisador(es) responsável(is) pelo projeto de pesquisa intitulado Avaliação da atividade de oligossacarídeos isolados do leite humano em receptores de membrana do tipo tlr2 e tlr4 e descrição do mecanismo de interação por meio de técnicas de espectroscopia de rmn, comprometemo-nos a dar início a este estudo somente após apreciação e aprovação pelo CEP/SD e registro de aprovado na Plataforma Brasil.

Curitiba, 16 de Dezembro de 2015



Bernardo Freire Starling Soares



Guilherme Lanzi Sasaki



Arquimedes Paixão de Santana Filho

ANEXO 7 – DECLARAÇÃO APROVAÇÃO PROJETO – COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica
 50 anos




DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto de mestrado do aluno **BERNARDO FREIRE STARLING SOARES**, a ser desenvolvido sob a orientação do Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, foi analisado pelo Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR e teve o parecer **FAVORÁVEL** com apreciação na 425ª reunião de colegiado do PPG-Bioquímica – UFPR realizada no dia 09 de dezembro de 2015 as 14h.

Curitiba, 17 de julho de 2016.




 Glaucia Regina Martinez
 Coordenadora do Programa de
 Pós-Graduação em Ciências Bioquímica
 UFPR Matrícula 179744

Centro Politécnico – Caixa Postal 19046 – CEP: 81531-990 Curitiba-PR
pgbioq@ufpr.br - <http://www.pgbioq.ufpr.br/>
 fone (41) 3361-1672

ANEXO 7 – OFÍCIO PESQUISADOR – COMITÊ DE ÉTICA

Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Dept. de Bioquímica e Biol. Molecular



Curitiba, 16 de Dezembro de 2015.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR

Senhor(a) Coordenador(a),

Encaminho à Vossa Senhoria o projeto de pesquisa de minha autoria intitulado "Avaliação da atividade de oligossacarídeos isolados do leite humano em receptores de membrana do tipo tlr2 e tlr4 e descrição do mecanismo de interação por meio de técnicas de espectroscopia de rnm para análise e parecer. Este projeto foi aprovado em reunião departamental pelo colegiado de curso do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica em 12 de Dezembro de 2015 e será realizado no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, no período de Fevereiro de 2016 a Dezembro de 2017. Para a realização deste estudo serão utilizadas amostras de leite humano.

Atenciosamente,

Bernardo Freire Starling Soares – Mestrando em Bioquímica

Guilherme Lanzi Sassaki

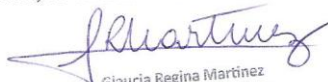
ANEXO 8 – EXTRATO DE ATA – COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica
50 anos



1 EXTRATO DA ATA DA 425ª REUNIÃO PLENÁRIA DO PROGRAMA DE PÓS-
2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS - BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
3 PARANÁ. Aos 09 dias do mês de dezembro do ano de dois mil e quinze às quatorze horas,
4 deu-se início a reunião plenária do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da
5 Universidade Federal do Paraná, sob a presidência da Coordenadora Professora Glauca
6 Regina Martinez e com a presença dos Professores: Emanuel Maltempi de Souza, Sheila
7 Maria Brochado Winnischofer, Maria Eliane Merlin Rocha, David Alexander Mitchell,
8 Marcelo Müller dos Santos, Miguel Daniel Nosedá, Joana Silveira, Sílvia Maria Suter C.
9 Cadena, Nadia Krieger, Guilherme Lanzi Sassaki, Thales Cipriani, Lucimara Cordeiro,
10 Guilhermina Noleto, Leda Chubatsu e as representantes discentes, Vanessa Chicora e Maritza
11 Todo Bom e do Secretário Thiago Vello. Aberta a sessão, iniciou-se a reunião pelas
12 comunicações.... Na sequência, iniciou-se a **Ordem do Dia:.... 2) Apreciação de pareceres**
13 **de projetos e relatórios.** A Plenária homologou os pareceres favoráveis dos projetos dos
14 mestrandos: Bernardo F. Starling Soares (Thales R. Cipriani); Rafael Roberto Klosterhoff
15 (Thales R. Cipriani); Elori Míeko Oikawa (Sheila M. B. Winnischofer).... Nada mais havendo
16 a tratar, eu Glauca Regina Martinez agradeço a presença de todos, declarei encerrada a
17 reunião da qual lavrei a presente ata que após aprovação será assinada por mim e pelos
18 demais presentes. Curitiba, 09 de dezembro de 2015.


Glauca Regina Martinez
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Ciências Bioquímica
Matrícula 179744

ANEXO 9 – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE – COMITÊ DE ÉTICA**TERMO DE CONFIDENCIALIDADE**

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade de oligossacarídeos isolados do leite humano em receptores de membrana do tipo tlr2 e tlr4 e descrição do mecanismo de interação por meio de técnicas de espectroscopia de rmn

Os pesquisadores, abaixo firmados, asseguram que o caráter anônimo das doadoras de amostras de leite humano serão mantidos e que suas identidades serão protegidas.

Os pesquisadores manterão um registro de inclusão dos participantes de maneira sigilosa, contendo códigos, nomes e endereços para uso próprio. Os formulários de **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** assinados pelos participantes serão mantidos pelo pesquisador em confidência estrita, juntos em um único arquivo.

Asseguramos que os participantes receberão uma cópia do **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** que poderá ser solicitada de volta no caso deste não mais desejar participar da pesquisa.²

Curitiba, 16 de Dezembro de 2015



Bernardo Freire Starling SOares



Guilherme Lanzi Sasski



Arquimedes Paixão de Santana Filho

ANEXO 10 – DECLARAÇÃO DE TORNAR PÚBLICO OS RESULTADOS – COMITÊ DE ÉTICA

DECLARAÇÃO DE TORNAR PÚBLICOS OS RESULTADOS

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade de oligossacarídeos isolados do leite humano em receptores de membrana do tipo tlr2 e tlr4 e descrição do mecanismo de interação por meio de técnicas de espectroscopia de rmn

Eu Bernardo Freire Starling Soares, matrícula nº 201500031226, autor da pesquisa Avaliação da atividade de oligossacarídeos isolados do leite humano em receptores de membrana do tipo tlr2 e tlr4 e descrição do mecanismo de interação por meio de técnicas de espectroscopia de rmn a ser realizada no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná no período de Fevereiro de 2016 até Dezembro de 2017, declaro que, de acordo com as práticas editoriais e éticas, serão publicados os resultados da pesquisa em revistas científicas específicas ou apresentados em reuniões científicas, congressos e jornadas, independentemente de os resultados serem favoráveis ou não.

Está garantido o sigilo relativo às propriedades intelectuais e patentes industriais.¹

Curitiba, 16 de Dezembro de 2015



Bernardo Freire Starling Soares

ANEXO 11 – DECLARAÇÃO USO ESPECÍFICO – COMITÊ DE ÉTICA

DECLARAÇÃO DE USO ESPECÍFICO DE MATERIAL E/OU DADOS COLETADOS

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade de oligossacarídeos isolados do leite humano em receptores de membrana do tipo tlr2 e tlr4 e descrição do mecanismo de interação por meio de técnicas de espectroscopia de rnm

Declaro (amos) que os dados coletados serão de uso específico para o desenvolvimento da pesquisa em questão e que as amostras biológicas serão destruídas ou convenientemente descartadas, conforme as normas vigentes.

Declaro (amos) que os dados coletados serão de uso específico para o desenvolvimento da pesquisa em questão. Entretanto, as amostras biológicas obtidas poderão ser armazenadas e reutilizadas em pesquisas complementares, conforme o disposto na Resolução 441/2011 (CNS), Portaria 2201/2011 (MS) e Resolução 40/12 (CEPE–UFPR) – que tratam de Biobanco e Biorrepositório.

Nestes casos é obrigatória a inclusão no projeto de Pesquisa do Modelo 12 abaixo.

Curitiba, 16 de Dezembro de 2015



Bernardo Freire Starling Soares



Guilherme Lanzi Sasaki



Arquimedes Paixão de Santana Filho

ANEXO 12 – TERMO DE GUARDA DE MATERIAL – COMITÊ DE ÉTICA

TERMO DE GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Eu, Bernardo Freire Starling Soares, pesquisadores envolvidos no projeto intitulado Avaliação da atividade de oligossacarídeos isolados do leite humano em receptores de membrana do tipo tlr2 e tlr4 e descrição do mecanismo de interação por meio de técnicas de espectroscopia de rmn, nos comprometemos a zelar pela guarda do material biológico coletado para este estudo, após obtenção do consentimento informado dos participantes de pesquisa.

Outrossim, declaramos que, havendo necessidade de uso das amostras coletadas em outro projeto, o mesmo será submetido à apreciação pelo CEP da Instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP. Uma vez aprovado o projeto, os participantes serão novamente contatados para assinar o novo TCLE, consentindo com o uso das amostras de leite humano para a nova pesquisa. Para os dados associados, quando for o caso, será adotado o mesmo procedimento.

Curitiba, 16 de Dezembro de 2015



Bernardo Freire Starling Soares



Guilherme Lanzi Sasaki



Arquimedes Paixão de Santana Filho

ANEXO 13– AUTORIZAÇÃO DE USO FIGURA 1

Dear Bernardo Starling

Thank you for your e-mail. You may use the figure for your PhD thesis. Must be cited as:
Swiss Med Wkly. 2014;144:w13927

Kind regards

Gisela Wagner
Editorial office SMW

Swiss Medical Weekly
EMH Swiss Medical Publishers Ltd.
Farnsburgerstrasse 8
CH-4132 Muttenz
Switzerland
Phone +41 61 467 85 52
Fax +41 61 467 85 56
office@smw.ch
www.smw.ch
<https://www.facebook.com/SwissMedicalWeekly>
<https://twitter.com/SwissMedWkly>

ANEXO 14– AUTORIZAÇÃO DE USO FIGURA 2

This Agreement between BERNARDO SOARES ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your order details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License number	Reference confirmation email for license number
License date	Jan 04, 2017
Licensed Content Publisher	Oxford University Press
Licensed Content Publication	Glycobiology
Licensed Content Title	Fucose: biosynthesis and biological function in mammals:
Licensed Content Author	Daniel J. Becker, John B. Lowe
Licensed Content Date	Jul 1, 2003
Licensed Content Volume	13
Licensed Content Issue	7
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	Educational Institution/Non-commercial/ Not for-profit
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	Yes
Number of languages	2
Languages	English and Portuguese
Order reference number	
Title of your thesis / dissertation	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE OLIGOSSACARÍDEOS ISOLADOS DO LEITE HUMANO EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS MEDIADOS POR RECEPTORES TLR E DESCRIÇÃO DO MECANISMO DE INTERAÇÃO POR MEIO DE TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA DE RMN.
Expected completion date	Mar 2017
Estimated size(pages)	100
Requestor Location	BERNARDO SOARES RUA MACEIO, 162 - 401 BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS 3031120 Brazil Attn: BERNARDO SOARES
Publisher Tax ID	GB125506730
Billing Type	Invoice
Billing address	BERNARDO SOARES RUA MACEIO, 162 - 401 BELO HORIZONTE, Brazil 3031120 Attn: BERNARDO SOARES
Total	0.00 USD

ANEXO 15 – AUTORIZAÇÃO DE USO FIGURA 3

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jul 18, 2016

This Agreement between Bernardo Starling ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3911980548056
License date	Jul 18, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Wiley oBooks
Licensed Content Title	Bioactivity of Human Milk Oligosaccharides
Licensed Content Author	Clemens Kunz,Sabine Kuntz,Silvia Rudloff
Licensed Content Date	Mar 28, 2014
Licensed Content Pages	20
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1.1
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE OLIGOSSACARÍDEOS ISOLADOS DO LEITE HUMANO EM RECEPTORES DE MEMBRANA DO TIPO TLR2 E TLR4 E DESCRIÇÃO DO MECANISMO DE INTERAÇÃO POR MEIO DE TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA DE RMN
Expected completion date	Apr 2017
Expected size (number of pages)	100
Requestor Location	Bernardo Starling Rua Maceio 152 Apto 401 Cruzeiro Belo Horizonte, Minas Gerais 30310120 Brazil Attn: Bernardo Starling
Publisher Tax ID	EU826007151
Billing Type	Invoice
Billing Address	Bernardo Starling Rua Maceio 152 Apto 401 Cruzeiro Belo Horizonte, Brazil 30310120 Attn: Bernardo Starling
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

ANEXO 16– AUTORIZAÇÃO DE USO FIGURA 4

License Number	4036130774782
License date	Jan 25, 2017
Licensed Content Publisher	BMJ Publishing Group Ltd.
Licensed Content Publication	Gut
Licensed Content Title	The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose modulates CD14 expression in human enterocytes, thereby attenuating LPS-induced inflammation
Licensed Content Author	YingYing He, ShuBai Liu, David E Kling, Serena Leone, Nathan T Lawlor, Yi Huang, Samuel B Feinberg, David R Hill, David S Newburg
Licensed Content Date	Jan 1, 2016
Licensed Content Volume	65
Licensed Content Issue	1
Volume number	65
Issue number	1
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this article
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table/extract
Number of figure/table/extracts	1
Description of figure/table/extracts	Figure 6
Will you be translating?	Yes
Number of languages	2
Languages	English Portuguese
Circulation/distribution	10
Title of your thesis / dissertation	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE OLIGOSSACARÍDEOS ISOLADOS DO LEITE HUMANO EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS MEDIADOS POR RECEPTORES TLR E DESCRIÇÃO DO MECANISMO DE INTERAÇÃO POR MEIO DE TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA DE RMN.
Expected completion date	Mar 2017
Estimated size(pages)	100
Requestor Location	BERNARDO SOARES RUA MACEIO, 162 - 401 BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS 3031120 Brazil Attn: BERNARDO SOARES
Publisher Tax ID	GB674738491
Billing Type	Invoice
Billing address	BERNARDO SOARES RUA MACEIO, 162 - 401 BELO HORIZONTE, Brazil 3031120 Attn: BERNARDO SOARES
Total	0.00 USD

ANEXO 17 – AUTORIZAÇÃO FIGURA 1 E TABELA 1



RightsLink®

[Home](#)[Account Info](#)[Help](#)

Title: Breast Milk Oligosaccharides: Structure-Function Relationships in the Neonate

Author: Jennifer T. Smilowitz, Carlito B. Lebrilla, David A. Mills, et al

Publication: Annual Review of Nutrition

Publisher: Annual Reviews

Date: Jul 17, 2014

Copyright © 2014, Annual Reviews

Logged in as:
BERNARDO SOARES
Account #:
3001097645

[LOGOUT](#)**Permission Not Required**

Material may be republished in a thesis / dissertation without obtaining additional permission from Annual Reviews, providing that the author and the original source of publication are fully acknowledged.

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2017 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) [Terms and Conditions.](#) Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

ANEXO 20 - MATERIAL E MÉTODOS SUPLEMENTAR

OBTENÇÃO DO LEITE HUMANO

Para o isolamento dos oligossacarídeos do leite humano, aproximadamente 1litro de leite humano de uma única doadora foram utilizados. Todo os processos durante o tempo de pesquisa e uso deste material biológico esteve de acordo com modelo aprovado pelo Comitê de Ética- CAAE 56168316.0.0000.0102). A documentação relativa ao processo aprovado pelo Comitê de Ética se apresenta no anexo. A retirada do leite seguiu o obrigatoriamente os seguintes passos:

Preparo do frasco:

- 1- Escolha um frasco de vidro com tampa plástica, pode ser de café solúvel ou maionese;
- 2- Retire o rótulo e o papelão que fica sob a tampa e lave com água e sabão, enxaguando bem;
- 3- Em seguida coloque em uma panela o vidro e a tampa e cubra com água, deixando ferver por 15 minutos (conte o tempo a partir do início da fervura);
- 4- Escorra a água da panela e coloque o frasco e a tampa para secar de boca para baixo em um pano limpo;
- 5- Deixe escorrer a água do frasco e da tampa. Não enxugue;
- 6- Você poderá usar quando estiver seco.

Modo de preparo para retirada do leite humano (ordenhar)

*O leite deve ser retirado depois que o bebê mamar ou quando as mamas estiverem muito cheias.

- 1-Escolha um lugar limpo, tranquilo e longe de animais;
- 2-Prenda e cubra os cabelos com uma touca ou lenço;
- 3-Evite conversar durante a retirada do leite ou utilize uma máscara ou fralda cobrindo o nariz e a boca;
- 4-Lave as mãos e antebraços com água e sabão e seque em uma toalha limpa.

Modo de retirada do leite humano (ordenhar):

- 1- Comece fazendo massagem suave e circular nas mamas.
- 2- Massageie as mamas com as polpas dos dedos começando na aréola (parte escura da mama) e, de forma circular, abrangendo toda mama.
- 3- É ideal que o leite seja retirado de forma manual.

- 4- Primeiro coloque os dedos polegar e indicador no local onde começa a aréola (parte escura da mama);
- 5- Firme os dedos e empurre para trás em direção ao corpo;
- 6- Comprima suavemente um dedo contra o outro, repetindo esse movimento várias vezes até o leite começar a sair;
- 7- Despreze os primeiros jatos ou gotas e inicie a coleta no frasco.

Modo de armazenamento do leite retirado para doação:

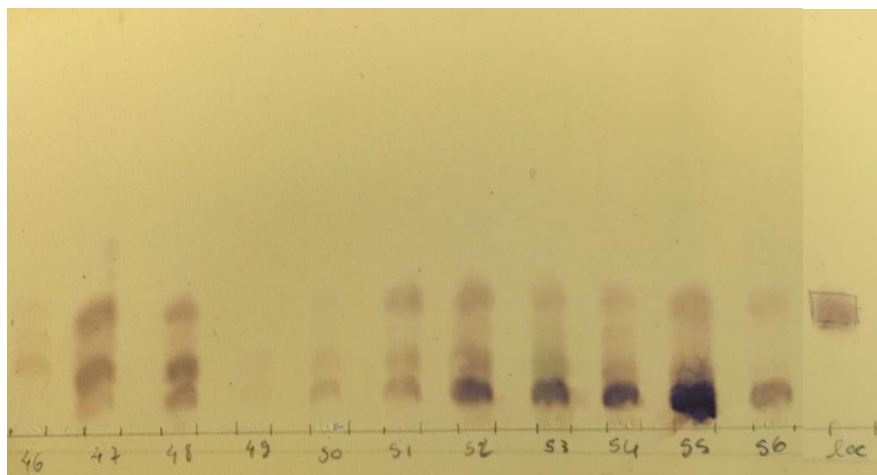
- 1- O frasco com o leite retirado deve ser armazenado no congelador ou freezer.
- 2- Na próxima vez que for retirar o leite, utilize outro recipiente esterilizado e ao terminar acrescente este leite no frasco que está no freezer ou congelador.

ISOLAMENTO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DO LEITE HUMANO.

Após o descongelamento do leite, primeiramente foi realizado um processo de deslipidificação através de centrifugação a 12.000 rpm na temperatura de 4 °C. Feito isso, o material foi submetido à precipitação etanólica (2:1, v/v) para a remoção de proteínas (FINKE et al., 1999). O sobrenadante foi então coletado e liofilizado, sendo então submetido ao processo de fracionamento através por cromatografia líquida, em uma coluna de 30 X 4 cm (70 mL) utilizando como fase estacionária carvão ativado-150 *mesh* e celite 545 (1:1) (ambos da marca Synth). Como fase móvel, um gradiente contínuo de H₂O:EtOH, variando de 100:0 até 40:60 foi utilizado. As frações foram coletadas a cada 10 mL, e então submetidas a evaporação sob fluxo de nitrogênio e depois liofilizadas. Visando uma maior separação dos HMOs da lactose, após análise em RMN, as frações que apresentavam oligossacarídeos passaram por um processo de cromatografia em coluna de sílica (MERCK – 0,063-0,200mm) de 30 X 4 cm (70 mL). Para posterior isolamento do LDFT, um carboidrato que representa somente 0,5% do conteúdo de carboidratos total contido no leite humano, a utilização de uma coluna de 30 X 4 cm (70 mL) de troca iônica de DEAE Sepharose fast flow (GE Healthcare) com eluição inicial em H₂O e depois com solução aquosa contendo 2% do íon amônio, gerando assim 7 frações Adaptado de GNOTH, 2000

O acompanhamento da eluição dos HMOs foi realizado através de análises de cromatografia em camada delgada (TLC), utilizando placas de sílica-gel 60G (Merck), com 8 cm de altura total (7 cm a partir da origem). As corridas cromatográficas foram desenvolvidas com o sistema de solventes acetato de etila:propanol:ácido acético:água na proporção de 4:2:2:1. Para a

visualização das bandas foi utilizado o reagente específico para carboidratos orcinol- H_2SO_4 a 100 °C (SKIPSKI, 1975); SASSAKI et al., 2008). A identificação preliminar foi realizada com o auxílio de padrões de tri, tetra e pentassacarídeos.



TLC demonstrando a presença de diferentes HMOs nas diferentes frações obtidas a partir do gradiente. Padrão de lactose (Lac) demonstra a presença HMOs maiores nas frações do gradiente com maior concentração de etanol.

