

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**Avaliação da IgA Secretora Total e
Específica contra *Escherichia coli*
enteropatogênica em Colostro de
Mães Eutróficas e Desnutridas**

AUTOR: Fabrício Andrade Martins Esteves

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

CO-ORIENTADORES:

- Profa. Dra. Elizabeth Malagueño de Santana
- Profa. Dra. Maria Laura Campelo de Melo Dias

RECIFE, 2007

Fabício Andrade Martins Esteves

**Avaliação da IgA Secretora Total e
Específica contra *Escherichia coli*
enteropatogênica em Colostro de
Mães Eutróficas e Desnutridas**

Dissertação apresentada
para cumprimento parcial
das exigências para
obtenção do título de Mestre
em Bioquímica pela
Universidade Federal de
Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

Aprovado por: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Lúnior
Profa. Dra. Valdênia Maria de Oliveira Souza
Profa. Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves
Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Data: 03 / 06 / 2008

Esteves, Fabrício Andrade Martins

Avaliação da IgA Secretora total e específica contra *Escherichia coli* enteropatogênica em Colostro de Mães Eutróficas e desnutridas / Fabrício Andrade Martins Esteves. – Recife: O Autor, 2007.

30 folhas: il.: fig.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. 2007. Mestrado em Bioquímica.

Inclui bibliografia e anexos.

1. IgA Secretora. 2.Colostro. 3. *Escherichia coli*. 4. Enteropatogênica. I.Título.

**577.1 CDU (2.ed.)
570 CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2007-123**

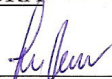
Fabício Andrade Martins Esteves

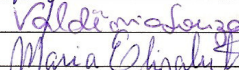
**Avaliação da IgA Secretora Total e
Específica contra *Escherichia coli*
enteropatogênica em Coloostro de
Mães Eutróficas e Desnutridas**

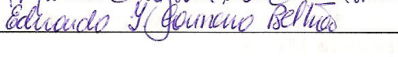
Dissertação apresentada
para cumprimento parcial
das exigências para
obtenção do título de Mestre
em Bioquímica pela
Universidade Federal de
Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

Aprovado por: _____







Data: 03 / 06 / 2008

Sumário

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1.0 - INTRODUÇÃO	10
1.1 - A IMUNOGLOBULINA A SECRETORA (IgAS)	11
1.2 - O SISTEMA IMUNOLÓGICO DAS MUCOSAS E A RELAÇÃO MÃE- LACTENTE	13
1.3 - O COLOSTRO HUMANO	14
1.4 - A <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC)	15
2.0 - OBJETIVOS	17
2.1 - Geral	17
2.2 - Específicos	17
Article: Evaluation of Total and Specific Secretory IgA against Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> in Colostrum of Eutrophic and Undernourished Mothers	18
3.0 - CONCLUSÃO	26
Questionário (ANEXO 1)	27
Termo de Consentimento (ANEXO 2)	28
Aprovação Ética (ANEXO 3)	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

AGRADECIMENTOS

Agradeço sobretudo a Deus pela oportunidade de concluir mais esta etapa de minha vida profissional, concedendo-me forças para empenhar-me em minhas tarefas, saúde para superar os percalços passageiros, paciência para vencer minhas limitações, ouvidos para escutar aqueles que me estimularam e paz para ignorar aqueles que ansiaram por um tropeço.

Agradeço à minha mãe por ter estado ao meu lado e por ter suportado minha impaciência e indelicadezas conseqüentes do cansaço e cobranças rotineiras.

Agradeço à minha noiva, Nayale Lucinda, pelo amor gratuito e despretensioso que tem por mim, pela sinceridade habitual, pelo companheirismo, por estar comprometida com minha felicidade e por lembrar-me sempre que o conhecimento adquirido é uma arma para melhor servir aqueles que estão ao meu lado no dia-a-dia.

À Profa. Elizabeth Malagueño agradeço pela paciência, pela confiança, amizade e por estar sempre presente em minhas conquistas.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, a quem muito admiro não somente por ser um notável pesquisador mas, principalmente pela forma simples de fazer ciência e relacionar-se com seus alunos, ou como ele mesmo prefere dizer, seus amigos. Agradeço imensamente pela confiança em mim depositada!

Agradeço também de forma muito particular, à Profa. Maria Laura Campelo de Melo Dias que me “adotou” neste período de trabalho conjunto, acolhendo minha idéia com imenso entusiasmo. Agradeço não somente pela orientação clínica envolvida neste projeto, mas, sobretudo pelo exemplo de pessoa que é.

Agradeço ao Prof. Etenildo Dantas Cabral pela amizade e pela grande ajuda nas minhas análises estatísticas.

Aos colegas da Imunologia do LIKA, Renata, Narjara, Andrew, Djalma, Conceição, Patrícia, Profa. Silvana, Profa. Mônica, Profa. Vláudia e Profa. Valdênia.

Agradeço aos meus colegas Humberto Bertão, Marcella Silvestre e Fernanda Vidal pela ótima parceria construída.

Agradeço também a Flaviana Laurentino Lopes pela imensa ajuda na coleta das amostras e entrevistas das pacientes.

Ao amigo Marcílio Ângelo, agradeço pela imensa ajuda na redação do artigo em língua inglesa.

Aos funcionários do Laboratório de Saúde Pública da Prefeitura Municipal de Olinda, particularmente nas pessoas de Ana Lúcia, Ana Salustiano, Suelene, Givaneide e Raul agradeço pelo constante suporte e incentivo.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram e proporcionaram a realização deste trabalho.

Avaliação da IgA Secretora Total e Específica contra *Escherichia coli* enteropatogênica em Colostro de Mães Eutróficas e Desnutridas

Aluno: Fabrício Andrade Martins Esteves

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-Orientadores: Profa. Elizabeth Malagueño de Santana, Profa. Maria Laura Campelo de Melo Dias.

RESUMO

Introdução: O colostro humano é de fundamental importância nutricional para o desenvolvimento do recém-nascido além de atuar como uma primeira linha de defesa imunológica contra patógenos presentes no ambiente externo ao útero materno. Dentre as moléculas do colostro humano com propriedades anti-infecciosas, a IgA secretora é o principal e mais abundante anticorpo. Esta imunoglobulina inativa fatores de virulência da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), principal causadora de diarreia em crianças com até 1 ano de idade. **Objetivo:** Determinar e comparar as concentrações de IgA secretora (IgAS) total e anti-EPEC em colostro de mães eutróficas e desnutridas atendidas em um hospital público da cidade do Recife (PE). **Materiais e Métodos:** Foram coletadas amostras de colostro de 15 mães eutróficas e 10 mães desnutridas. O estado nutricional materno foi avaliado segundo variáveis antropométricas (peso, estatura e índice de massa corporal). As concentrações de IgAS total e IgAS anti-EPEC foram determinadas por *enzyme-linked immunoassay* (ELISA). **Resultados:** As concentrações de IgAS total do colostro das mães eutróficas e desnutridas foram $2390,16 \pm 650,06$ µg/ml e $2490,96 \pm 418,06$ µg/ml, respectivamente. Os níveis de IgAS anti-EPEC do colostro das mães eutróficas e desnutridas foram $1668,03 \pm 1199,98$ µg/ml and $1038,79 \pm 573,99$ µg/ml, respectivamente. A comparação entre as concentrações de IgAS total e IgAS anti-EPEC das amostras de colostro de mães eutróficas e desnutridas não apresentou diferença significativa (Teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$). **Conclusão:** O aleitamento materno exclusivo, como forma de combate às infecções por EPEC, deve ser incentivado mesmo diante de uma desnutrição materna.

Palavras-chaves: IgA secretora ; *Escherichia coli* enteropatogênica; colostro

Evaluation of Total and Specific Secretory IgA against Enteropathogenic *Escherichia coli* in Colostrum of Eutrophic and Undernourished Mothers

Aluno: Fabrício Andrade Martins Esteves

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-Orientadores: Profa. Elizabeth Malagueño de Santana, Profa. Maria Laura Campelo de Melo Dias.

ABSTRACT

Introduction: The human colostrum has a fundamental nutritional importance for the development of the newborn as well as it acts as a first line of immunological defense against mucosal pathogens in the external environment to the maternal uterus. Among the anti-infective molecules of the human colostrum, secretory IgA (SIgA) is the main and predominant antibody. It acts inactivating virulence factors of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which is the main cause of diarrhea in children up to one year of age. **Objective:** to determine and to compare the concentrations of total SIgA and anti-EPEC SIgA in colostrum of eutrophic and undernourished mothers assisted at a public hospital situated in Recife (Brazil). **Materials and Methods:** Colostrum samples from 15 eutrophic mothers and 10 undernourished mothers were collected. The maternal nutritional state was evaluated according to anthropometrics variables (weight, height and corporal mass index). The concentrations of total SIgA and SIgA anti-EPEC were estimated by enzyme-linked immunoassay (ELISA). **Results:** The total SIgA concentration of the eutrophic and malnourished mothers were $2390,16 \pm 650,06$ $\mu\text{g/ml}$ and $2490,96 \pm 418,06$ $\mu\text{g/ml}$, respectively. The concentrations of the anti-EPEC SIgA of the eutrophic and malnourished mothers were $1668,03 \pm 1199,98$ $\mu\text{g/ml}$ and $1038,79 \pm 573,99$ $\mu\text{g/ml}$. Evaluating concentrations of total SIgA and anti-EPEC SIgA from colostrum of eutrophic and undernourished mothers did not show any significant difference (Mann-Whitney Test, $p < 0,05$). **Conclusion:** The maternal malnutrition did not affect the SIgA production of the colostrum nor the anti-infectious property of this immunoglobulin against enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). We suggest that the exclusive maternal breastfeeding, as protection to mucosal enteropathogens agents infections, associated with care with the maternal nutritional state from the prenatal period, must be encouraged even at the evidence of a moderate maternal malnutrition.

Key-words: secretory IgA; enteropathogenic *Escherichia coli*; colostrum

1.0 - INTRODUÇÃO

Além de atuar como importante e essencial fonte de nutrientes para o recém-nascido e ser qualitativamente superior a qualquer alternativa nutricional principalmente nos primeiros 6 meses de vida, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1993), o colostro e o leite humano dispõem de uma grande variedade de proteínas e células que atuam como uma primeira linha de defesa imunológica contra patógenos ambientais presentes no ambiente externo ao útero materno, aos quais o recém-nascido estará em imediata exposição após o parto (Brandtze, P.; 2003). Este fato é de fundamental importância uma vez que o sistema imunológico do recém-nascido humano é imaturo e incapaz de responder com eficácia a estímulos antigênicos (Chang, S. J.; 1990). Além de fornecer uma proteção passiva ao neonato (Hanson, L.A. *et al.*; 1994) o colostro e leite materno contém fatores bioativos que estimulam a maturação do sistema gastrointestinal do recém-nascido bem como de seu sistema imune (Morrow, A.L.; 2004). Anticorpos secretores, IgG, lactoferrina, lisozima, ácidos graxos livres, oligossacarídeos e glicoconjugados são exemplos de biomoléculas presentes no leite humano que possuem atividade antimicrobiana e que atuam por diversos mecanismos de proteção contra uma infecção: efeito bactericida (lactoferrina), ação bacteriostática (lactoferrina e lisozima), lise de microorganismos (lisozima), efeito antiviral (lactoferrina e produtos da digestão de lipídeos), inibição de fatores de virulência (IgA secretora) (Hamosh, M.; 1998).

Portanto, além do papel nutricional exercido pelo aleitamento materno, esta prática também auxilia ativamente na prevenção contra a invasão e infecção por microorganismos patogênicos, sendo assim, um componente-chave para políticas de promoção à saúde infantil (Filteau, S. M.; 2000).

Este fato é particularmente importante com relação aos altos índices de mortalidade infantil relacionados a doenças infecciosas observadas nos países em desenvolvimento. Nestes locais, entre crianças com idades inferiores a 5 anos, a diarreia responde anualmente por 22% dentre os mais de 10 milhões de mortes infantis e representa a causa mais comum de mortalidade por distúrbios neonatais (Black R.E. *et al.*; 2003).

Vários estudos têm demonstrado a eficiência da administração do leite humano na proteção contra a diarreia aguda infecciosa provocada por enteropatógenos causadores de diarreia tais como vírus, bactérias e parasitas em recém-nascidos (Morrow, A.L.; 2004).

Dentre as biomoléculas imunoativas recebidas pela criança durante a amamentação e que fornecem proteção passiva ao recém-nascido, ressalta-se a importância da IgA secretora (ou IgA secretória) uma vez que atua impedindo a fixação de microorganismos aos epitélios mucosos (Hanson L.A *et al.*, 1984) e, sendo esta a imunoglobulina presente em maior quantidade nas secreções externas tais como no colostro e leite humano (Underdown, B.J., 1986).

1.1 - A IMUNOGLOBULINA A SECRETORA (IgAS)

O epitélio mucoso reveste uma área de aproximadamente 200 vezes maior do que a pele e, cerca de 90% dos microorganismos causadores de infecções em humanos utilizam estas regiões como porta de entrada (Brandtzege, P.; 2003).

A IgA secretora integra um dos mecanismos de defesa do sistema imunológico das mucosas uma vez que atua impedindo a fixação e inibindo a colonização de microorganismos patógenos que entram em contato com o epitélio mucoso (Brandtzege, P.; 1998).

Segundo Obenza *et al.* (2003), a IgA é secretora é a principal classe de imunoglobulina responsável por prevenir o ataque de enteropatógenos ao epitélio intestinal em lactentes jovens.

Nas secreções externas, tais como na saliva, colostro e leite humano, a forma dimérica é prevalente e abundante estando neste caso, constituída de dois monômeros de IgA unidos entre si por pontes dissulfeto, por uma glicoproteína de 70 kd (componente secretor) e por um polipeptídeo de 15 kd (cadeia J) formando assim, um dímero denominado IgA secretora (IgAS) (Mestecky J.W., 1992; Cleary, T.G.; 2004). A IgA secretora possui uma região da dobradiça glicosilada e rica em prolina. Tal característica confere a esta imunoglobulina a capacidade de transitar no trato gastrointestinal do recém-nascido sem sofrer ataques proteolíticos sendo assim considerada mais resistente às proteinases intestinais do que a IgG (Kelsall B.L., 1996) o que é bastante conveniente quando nos referimos ao processo de amamentação pois o leite materno entra em contato com o trato digestivo da criança e, por meio da IgA secretora, a nutriz fornece imunização passiva ao seu filho.

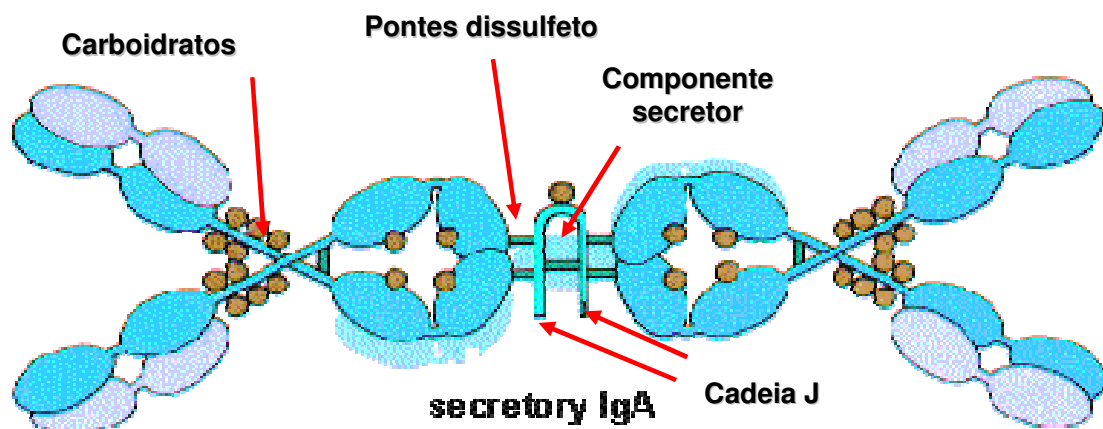


Figura 1: Representação esquemática da Imunoglobulina A Secretora (Mestecky, 1992; Cleary, 2004; Kelsall, 1996)

Hodes *et al.* (1964) e Kenny *et al.* (1967), demonstraram que a IgAS não é detectável nas secreções de recém-nascidos e associaram este fato a uma maior frequência de diarreias em crianças não-amamentadas pelo aleitamento materno do que naquelas que o são. Chernishov P.P. & Slukvin I.I. (1990) encontraram baixos níveis de componente secretor livre em secreções de recém-nascidos associando este fato à imaturidade do sistema imune de mucosas no período neonatal.

Assim sendo, o epitélio mucoso do neonato apresenta-se mais desprotegido e muito susceptível a uma infecção.

1.2 - O SISTEMA IMUNOLÓGICO DAS MUCOSAS E A RELAÇÃO MÃE-LACTENTE

Células T e, principalmente, células B produtoras de IgA secretora presentes nas placas de Peyer dos tecidos linfóides associados ao intestino (GALT) entram em contato com microorganismos e antígenos alimentares quando a mãe alimenta-se (Brandtzaeg, P.; 1999).

Esta exposição antigênica é mediada por células M do epitélio folicular associado às membranas que são células capazes de transportar antígenos presentes no lúmen gastrintestinal materno ao tecido linfóide subjacente à mucosa (Brandtzaeg, P., Baekkevold, E.S., Farstad, I.N.; 1999 & Neutra M.R. et al., 2001). Assim, as células linfóides imaturas encontradas nas placas de Peyer são drenadas por intermédio de vasos linfáticos, para os linfonodos mesentéricos, onde, após uma fase de maturação, alcançam o fluxo linfático chegando à circulação sanguínea via ducto torácico (Zaha, 1986) até colonizarem glândulas exócrinas distantes do local de onde se deu a exposição antigênica, tais como as glândulas mamárias (Hanson L.A et al, 1984). Neste local ocorre produção abundante de IgA secretora que, por sua vez, será ingerida pelo recém-

nascido no momento da amamentação através do leite materno. Assim sendo, a mãe confere proteção passiva ao recém-nascido contra enteropatógenos aos quais está exposta e que entrarão em contato imediato com o neonato.

Este mecanismo de proteção imune conferido ao recém-nascido é de particular importância entre mulheres que vivem sob condições higiênico-sanitárias desfavoráveis uma vez que estas se encontram altamente expostas a uma grande variedade de microorganismos enteropatógenos estando assim sujeitas a contaminação. A este ambiente o recém-nascido também estará exposto aumentando, assim, o risco de ocorrência de diarreia infantil. Este quadro social é frequentemente observado entre os países em desenvolvimento. Por outro lado, esta elevada exposição materna pode aumentar a presença de fatores imunológicos em seu leite, dentre os quais se pode citar a IgA secretora (FILTEAU, S. M.; RICE, A.L.; BALL, J.J. et al., 1999b). Desta forma, podemos observar a presença de IgA secretora contra vários enteropatógenos causadores de diarreia tais como *Vibrio cholerae* (GLASS, R.I.,SVENNNERHOLM, A.M., STOLL, B.J. et al., 1983), *Shighella sp* (AHMED, F.; CLEMENS, J.D.; RAO, M.R., 1992), *Escherichia coli* (CRAVIOTO, A.,1990), *Campylobacter jejuni* (RUI-PALACIOS G.M.; CALVA, J.J.; PICKERING, L.K., 1990) e *Giardia lamblia* (MORROW, A.L.; REVES, REVES R.R.; WEST, M.S. et al., 1992).

1.3 - O COLOSTRO HUMANO

O colostro humano é um fluido viscoso, amarelado e é a secreção inicialmente produzida pelas glândulas mamárias no período de lactação. É secretado, em média, nos primeiros cinco dias após o parto a uma taxa aproximada de 2 a 20 ml/mamada, volume

este suficiente para satisfazer todas as necessidades nutricionais do recém-nascido (VALDÉS, V e cols., 1997).

A partir do 5º dia pós-parto, a secreção mamária aumenta sua fluidez, seu volume, e sua cor varia progressivamente do branco cremoso ao branco azulado. Forma-se assim, o leite de transição que se transforma em leite maduro definitivo no período aproximado de 10 a 15 dias após o parto (Lang, S., 1999).

Observando a composição do colostro humano, que permanece relativamente constante até o 5º dia após o parto, segundo Nascimento e Issler (2003), pode-se afirmar que este é menos rico em lipídios e lactose e cerca de 3 vezes mais rico em proteínas quando comparado ao leite humano maduro que, por sua vez, tem sua composição influenciada por vários fatores tais como grau de nutrição materna, idade e período de lactação. Destaca-se ainda, a alta concentração de imunoglobulina A secretora e lactoferrina, proteínas estas que conferem ao colostro uma importante propriedade de proteção imunológica ao recém-nascido (WORTHINGTON-ROBERTS,B; 1997).

1.4 - A *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é um bacilo gram-negativo, pertencente à família das enterobacteriáceas. Segundo pesquisas feitas por Moraes e colaboradores (1997), as espécies aderentes de *Escherichia coli* foram tidas como principais causadoras de diarreia associada com desnutrição e mortalidade infantil. Em São Paulo, esta bactéria tem sido encontrada em cerca de 30% das crianças com até 1 ano de idade com diarreia aguda endêmica (Trabulsi, L.R., 1999).

A EPEC causa infecção restrita à superfície do intestino sendo o intestino delgado seu alvo preferencial. Esta bactéria adere firmemente ao epitélio intestinal desprotegido, destruindo as vilosidades. A fixação da EPEC ocorre inicialmente através de fímbrias (BFP- bundle forming pill), que alteram o metabolismo celular, e por

moléculas adesinas dentre as quais a intimina é a principal, mediando a aderência da bactéria ao enterócito. Esta ação conjunta resulta em episódios de diarreia aquosa. BFP e intimina são, portanto alguns dos principais fatores de virulência da referida bactéria (Carbonare SB, 1996).

O reservatório da EPEC é principalmente o próprio homem no qual faz parte da microbiota intestinal. Em hospitais e berçários, é transmitida por contato pessoal sendo as crianças que apresentam diarreia a principal fonte de infecção (Trabulsi, L.R., 1999). A água contaminada por alto índice de coliformes fecais em locais desprovidos de condições sanitárias também pode ser um importante veículo de transmissão (Donnenberg, M. S., 1992). Em São Paulo, Moraes *et al.*(1997), analisaram ao acaso 100 mamadeiras de uma clínica infantil. Destas 100, 26 continham *Escherichia coli* sendo que 3 mamadeiras apresentaram *Escherichia coli* aderente e 2 destas continham alta concentração da referida bactéria. Assim, foi demonstrado que a infecção pela *Escherichia coli* pode também ocorrer através de utensílios usados por crianças.

2.0 - OBJETIVOS

2.1 - Geral

- ✓ Avaliar a influência da desnutrição materna sobre a concentração e a qualidade de IgA secretora do colostro humano.

2.2 - Específicos

- ✓ Determinar concentrações de IgA secretora total em colostro de mães nutridas e desnutridas;
- ✓ Determinar concentrações de IgA secretora específica contra *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) em colostro de mães eutróficas e desnutridas;
- ✓ Comparar as concentrações de IgA secretora total do colostro de mães eutróficas e desnutridas;
- ✓ Comparar as concentrações de IgA secretora do colostro contra *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) em mães eutróficas e desnutridas.

Evaluation of Total and Specific Secretory IgA against Enteropathogenic *Escherichia coli* in Colostrum of Eutrophic and Undernourished Mothers

Fabício A. M. Esteves,
Maria Laura C. M. Dias
Luiz B. C. Júnior
Elizabeth Malagueño.

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
Recife, PE
Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami
(LIKA), Recife, PE

Introduction: The human colostrum has a fundamental nutritional importance for the development of the newborn as well as it acts as a first line of immunological defense against mucosal pathogens in the external environment to the maternal uterus. Among the anti-infective molecules of the human colostrum, the secretory IgA (SIgA) is the main and predominant antibody. It acts inactivating virulence factors of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which is the main cause of diarrhea in children up to one year of age. **Objective:** to determine and evaluate the concentrations of total SIgA and anti-EPEC SIgA in colostrum of eutrophic and undernourished mothers assisted at a public hospital situated in Recife (Brazil). **Materials and Methods:** Colostrum samples from 15 eutrophic and 10 undernourished mothers were collected. The maternal nutritional state was evaluated according to anthropometrics variables (weight, height and corporal mass index). Concentrations of total and specific colostrum SIgA were estimated by enzyme-linked immunoassay (ELISA). **Results:** Total SIgA of the eutrophic and undernourished mothers were $2390,16 \pm 650,06$ µg/ml and $2490,96 \pm 418,06$ µg/ml, respectively. Anti-EPEC SIgA concentration of the eutrophic and undernourished mothers were $1668,03 \pm 1199,98$ µg/ml and $1038,79 \pm 573,99$ µg/ml. The comparison between the concentrations of total SIgA and anti-EPEC SIgA from both groups did not show any significant difference (Mann-Whitney Test, $p < 0,05$). **Conclusion:** The maternal malnutrition did not affect the colostrum SIgA nor the anti-infectious property of this immunoglobulin against EPEC. We suggest that the exclusive maternal breast feeding, as protection to mucosal enteropathogens agents infections, associated with care to the maternal nutritional state from the prenatal period, must be encouraged even at the evidence of a moderate maternal malnutrition.

Colostrum and breast milk are an important and essential source of nutrients for the newborn and the best nutritional alternative, mainly in the first 6 months of life, according to the World Organization of the Health [1]. The colostrum and the breast milk have a great variety of proteins and cells which act as a first line of immunological defense against environmental pathogens outside the maternal uterus, to which the newborn will be exposed to after the childbirth [2,3]. Secretory IgA (SIgA) is not detected in newborn secretions and this fact was associated to a larger frequency of diarrheas in non-breastfed children Kenny et al. [4]. Other authors although have found] low levels of free secretory component in newborn secretions and regarded this phenomenon as an immaturity of the immune system of mucous membranes in the neonatal period. Chernishov P.P. & Slukvin I.I. [5].

Through the maternal secretion, the newborn receive secretory antibodies specific to a great variety of enteropathogenic and respiratory microorganisms and potential contamination targets. This protection is particularly important in populations with poor sanitary conditions, where it was possible to detect antibodies against several etiologic enteropathogens such as *Vibrio cholerae* [6], *Shigella sp* [7], *Escherichia coli* [8], *Campylobacter jejuni* [9] and *Giardia lamblia* [10]. In Brasil, according to Morais and collaborators [11], the adherent species of *Escherichia coli* (EPEC) were found to be main cause of diarrhea associated with undernutrition and young children's mortality. In São Paulo, this bacterium has been found in about 30% of the up-to-one-year-old children with endemic acute diarrhea [12].

On the other side, it has been observed that maternal nutrition should reflect in the breast milk protein levels [13]. Recife is placed into a region where malnutrition, dehydration, as a consequence of infectious acute diarrhea, cause a high incidence of infantile mortality [14], so it was worthy to investigate the colostrums SIgA quality of malnourished mothers and their levels of SIgA against EPEC because it was demonstrated that children who are breastfed expel *Escherichia coli* through their feces, but neither present infection nor diarrhea, which leads to the conclusion that the bacterium moves through the gastrointestinal tract without being able to cause any alteration in it [15]. This phenomenon was associated to the presence of specific SIgA against the virulence factors of EPEC [16].

Nowadays, there is. The EPEC is described as the main etiological agent amongst children up to 1 year of age from developing countries who live in places under precarious hygienic-sanitary conditions [17].

Material and Methods

This study was assessed and approved by the Ethics Committee in Researches of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) and registered at the Health National Council of the Brazilian Ministry of Health.

Each research participant agreed in signing a consent form for voluntary engagement in the research protocol.

Methodology:

All the volunteers were mothers of gestational period from 37 to 40 weeks, with ages varying from 18 to 35 years old and that were followed up for at least 6 months of prenatal consultations. The last consultation took place, at least, 15 days before the childbirth.

Pregnants who showed urinary tract infections (UTI), feverish events, mastitis, positive serology for HIV and/or syphilis were not included in the study because these pathologies could stimulate or decrease the SIgA production in mucosal immune system. Mothers presenting hypertensive disease specific of the pregnancy (HDSP), diabetes mellitus or gestational were also excluded such as cardiopates and nephropates. Pregnants were also considered inadequate to participate in the study, since such pathologies can increase the retention of liquids, which in turn may modify the evaluation of maternal corporal mass index (CMI). In addition, overweight and obese mothers were excluded.

During the period of colostrum samples collection, 514 mothers were interviewed. After observation of the inclusion/exclusion factors above described, only 25 out of the 514 interviewees could be included in the study.

Thus, colostrum samples of 25 selected voluntaries were collected: 15 were eutrophic mothers and 10 were mothers with moderate undernutrition.

Evaluation of Mothers' Nutritional State:

The evaluation of the mothers' nutritional state followed the Technical Manual of Prenatal and Puerperal of the Brazilian Ministry of Health [18].

To measure the weight and height of the mothers involved in the study, an anthropometric scale previously adjusted was applied in order to establish the calculation of the pregnant women's *Corporal Mass Indexes* (CMI) which was done at the moment of their arrival to the obstetrics department of the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE).

The CMI measurement was made according to the formula: $CMI = \text{weight (kg)} / \text{height (m}^2\text{)}$. The results indicated whether the pregnant women's CMI were adequated to her gestational age (in weeks) [18] nominated eutrophic mothers or low CMI for the gestational age, nominated undernourished mothers.

Sample Processing

The initial secretion was discarded and afterwards, 6 ml of colostrum were collected by manual expression in conical tubes of 15 ml containing sodium azide 0.01%.

The samples were placed immediately into ice and centrifuged for 2 hours at 2000 g and at 2°C. Three distinct phases were formed after the centrifugation: on the top a lipidic phase of creamy consistence which was discarded; an intermediate aqueous phase rich in proteins which were carefully collected; and at the bottom, a “pellet” with cellular components of human colostrums that was also discarded.

The collected aqueous phase was diluted 1:200 in buffer carbonate-bicarbonate 0.05M pH = 9.2 and 50 µl were incubated in Nunc-Immuno Plates MaxiSorp for 2 hours at 20°C.

Standard SIgA in concentrations from 0.125 µg/ml to 64 µg/ml, was also incubated in order to establish an standard curve, correlating the optical densities obtained to the different SIgA concentrations.

After 2 hours, the content of the plate was washed out with with PBS-Tween 0.01%. Then, the plate was blocked with 100 µl of skimmed milk to 1.5% in PBS 0.01M pH 7.2, for 1 hour. After that, 50 µl of a monoclonal anti-secretory component from human IgA produced in mouse (Sigma®), diluted 1/10000 in PBS 0.01M pH 7.2 was incubated during 1 hour at 37°C. Then, 50 µl of goat IgG anti-mouse IgG Fc specific (Sigma®) conjugated with peroxidase diluted 1/25000 was incubated. Among each step, the plate was washed 3 times with 100 µl of PBS-Tween 0.01% pH 7.2.

Soon after, the reaction was revealed with 50 µl of o-phenylenediamine (3,0 mg/ml of citrate-phosphate added of 0.05% of H₂O₂) in a place protected from environmental luminous incidence and stopped with H₂SO₄ 3N. The reading of the plate was done with a filter of 492 nm.

To quantify the SIgA anti-EPEC in samples of colostrum, the plate was initially sensitized with 50 µl of EPEC's antigenic extract (5.0 µg/ml) composed by 3 different sorotypes: EPEC O119, EPEC O55 and EPEC O111, supplied by the Center of Enteric Diseases of the Oswaldo Cruz Foundation. The antigenic extract was diluted into carbonate-bicarbonate buffer 0.05M pH = 9.2. After washing with PBS-Tween 0.01% ,

the human colostrum diluted 1:200 and the standard concentrations of SIgA, in PBS 0.01M pH 7.2 were incubated on the same plate.

The incubation of the monoclonal anti-secretory component from human IgA produced in mouse (Sigma®), goat IgG anti-mouse IgG Fc specific (Sigma®) and the reading of the reaction followed the same methodology described above to quantify the total SIgA

Results:

The weights values of the eutrophic mothers were significantly higher ($p = 0.004$) when compared with the values obtained in undernourished mothers. Same results were found in the CMI ($p = 0.000$) of these mothers. Considering the height there was not difference between both groups (Table 1).

The samples concentrations of total SIgA ($p = 0.437$) of the eutrophic mothers' colostrums ($\bar{X} = 2390,16 \pm 650,06$) were not statistically higher than the concentration of total SIgA from undernourished mothers ($\bar{X} = 2490,96 \pm 418,06$). The same statistical result was found in the evaluation of the SIgA against EPEC ($p = 0.595$) as Table 2 shows.

Table 1: Mothers' weight, height and CMI - according to nutritional maternal state, Recife, 2006.

	Nutritional Maternal State		<i>*Statistical Analisis</i>
	Eutrophic (n=15)	Malnourished (n=10)	
Maternal Weigh (kg)	$\bar{X} = 69,96$ SD = $\pm 8,01$	$\bar{X} = 58,64$ SD = $\pm 8,76$	U = 22,5 p = 0,004
Maternal height (m)	$\bar{X} = 1,56$ SD = $\pm 0,08$	$\bar{X} = 1,61$ SD = $\pm 0,09$	U = 48,5 p = 0,140
Corporal Mass Index - CMI (kg/m ²)	$\bar{X} = 28,5$ SD = $\pm 2,57$	$\bar{X} = 22,48$ SD = $\pm 2,26$	U = 0,00 p = 0,000

*Mann-Whitney U test, $p < 0,05$; $\bar{X}$ (Mean) SD (Standard Deviation)

Table 2: Total SIgA and specific SIgA against EPEC of eutrophic and undernourished mothers' colostrum. Recife, 2006.

	Maternal Status Nutrition		<i>*Statistical Analisis</i>
	Eutrophic (n=15)	Malnourished (n=10)	
Total SIgA (µg/ml)	$\bar{X} = 2390,16$ SD = ± 650,06	$\bar{X} = 2490,96$ SD = ± 418,06	U = 71,5 p = 0,437
SIgA anti-EPEC (µg /ml)	$\bar{X} = 1668,03$ SD = ± 1199,98	$\bar{X} = 1038,79$ SD = ± 573,99	U = 57,5 p = 0,595

*Mann-Whitney *U* test, $p < 0,05$; $\bar{X}$ (Mean) SD (Standard Deviation)

Discussion:

The importance of the breastfeeding during the neonatal period is unquestionable. It is known that even malnourished mothers are capable to produce enough milk to maintain alive their children [13].

In 1961, Hytten and Thompson [19] questioned whether the maternal malnutrition could influence the milk production. In subsequent works, Venkatachalam and Bailey [18] pointed out that severely undernourished mothers tend to produce less daily milk volume and of less quality.

Although, Stiehm [21] highlights that the levels of SIgA in the human milk found in eutrophic mothers are equivalent to the levels found in malnourished mothers. According to this author, the smallest amount of SIgA received by the malnourished mothers' newborn would occur as a consequence of a smaller daily volume of milk production.

The production of SIgA by mothers from different socioeconomic realities was studied by Cruz et al. [22]. These authors found a small difference in the levels of that immunoglobulin in poor Guatemalan mothers when compared with mothers socially privileged from the same country. This difference became even more evident when poor mothers' milk from Ethiopia was compared with that of mothers from the same population, however, of better socioeconomic conditions [22].

Low concentrations of IgG, IgA and C4 has been reported in the malnourished mothers' colostrum [23].

Chang [24], studying with 10 malnourished Chinese mothers, observed that the total proteins concentrations, IgG, lisozyme, C3 and C4 in the colostrum and mature milk were not affected by mothers' nutritional state. However, the amount of total SIgA, was found to be influenced by the mothers' nutritional state as well as the nursing period, being produced in smaller amounts by the malnourished mothers.

Cruz et al. [22], in a more recent work, affirmed that a moderate malnutrition does not compromise the SIgA levels in the human milk, and that the administration of a supplementary diet for malnourished mothers does not necessarily increase the SIgA production, but it can prevent the decrease of the daily production of it in the milk.

The results obtained in our experiments also indicated that the concentrations of total SIgA in the colostrum samples were not influenced by maternal nutritional state of the participants of this study.

In the present study, the SIgA anti-EPEC concentrations showed slightly lower in the colostrum samples of the undernourished mothers. However, this difference did not have a statistical significance.

The difference in milk protein levels found among several reports of undernourished mothers could be due to the nursing period when the milk was collected [24]. In this study, the colostrums was collected at maximum tree days after delivery. At this time the SIgA production was most elevated. Maybe, following up SIgA levels along the time should demonstrate the effect of nutritional state in milk composition.

Considering that the newborn has an immature immune system in the neonatal period, the maintenance of the total SIgA and SIgAS anti-EPEC concentrations in the colostrums, taking into consideration a moderate degree of maternal malnutrition, is highly relevant, because it is in the initial period of life that the child is immediately exposed to a completely different environment from that of the maternal uterus. The presence of mucosal pathogens microorganisms, such as EPEC, in the external environment increases the risk of a neonatal infection with consequent emergence of diarrhea episodes. This in turn is responsible for a great part of newborns deaths,

especially in developing countries [26]. This risk is particularly higher for undernourished mothers' newborns, as they usually come from places with improper hygienic-sanitary conditions.

Conclusion:

The maternal malnutrition did not affect the SIgA production of the colostrum nor the anti-infectious property of this immunoglobulin against enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). We suggest that the exclusive maternal breastfeeding, as protection to infections by mucosal enteropathogens agents, associated to care for the maternal nutritional state from the prenatal period, must be encouraged even the evidence at the evidence of a moderate maternal malnutrition.

References:

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Breast-feeding: The Technical Basis and Recommendations for Action. Geneva, WHO. 1993.
2. BRANDTZEG, P.; Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine*, v.21, p. 3382-3388, mar. 2003
3. HODES, H.L. *et al.* Proof that colostrum antibody is different from serum antibody. *J. Pediatric*. [S.l.]. v.65, p.1017, 1964.
4. KENNY, J.F. *et al.* Bacterial and viral proantibodies in breast-fed infants. *Pediatrics*. [S.l.]. Segunda edição. p.202, 1967.
5. CHERNISHOV P.P.; SLUKVIN I.I. Mucosal immunity of the mammary gland and immunology of mother/newborn interrelation. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (Warsz). V. 38 (1-2), p. 145-64, 1990.
6. GLASS, R.I.; SVENNERHOLM, A.M.; STOLL, B.J. *et al.* Protection against cholera in breast-fed children by antibodies in breast milk. *The New England Journal of Medicine*. V. 308, p. 1389-92, 1983.
7. AHMED, F.; CLEMENS, J.D.; RAO, M.R. Community-based evaluation of the effect of breast-feeding on the risk of microbiologically confirmed or clinically presumptive shigellosis in Bangladesh children. *Pediatrics*. V. 90, p. 406-11, 1992.
8. CRAVIOTO, A. Presencia de factores específicos em leite materna contra cepas de *Escherichia coli* causantes de diarreia em humanos. *Gaceta Medica de México*. México. v.126, n.1, p.35-46, 1990.
9. RUI-PALACIOS G.M.; CALVA, J.J.; PICKERING, L.K. *et al.* Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk. *Journal of Pediatrics*. V. 116, p. 707-13, 1990)
10. MORROW, A.L.; REVES, R.R.; WEST, M.S. *et al.* Protection against infection with *Giardia lamblia* by breast-feeding in a cohort of Mexican infants. *Journal of Pediatric*. V. 121, p. 363-70, 1992.
11. MORAIS, T.B.; GOMES T.A.; SIGULEM, D.M. Enterocoagulative *Escherichia coli* in infant feeding bottles. *The Lancet*, 389: 1448, 1997.
12. TRABULSI, L.R. & CAMPOS, L.C. *Escherichia*. In: Luiz Rachid Trabulsi. *Microbiologia*. Terceira edição. São Paulo – SP: Editora Atheneu, 1999.
13. HANAFY, M.M.; MORSEY, M.R.; SEDDICK, Y.; HABIB, Y.A., el-LOZY, M. Maternal Nutrition and lactation performance: a study in urban Alexandria. *The Journal of Tropical Pediatrics and Environmental Child Health*. V. 18, Issue 3, p. 187-91, September, 1972.
14. FRANZOLIN, M.R.; ALVES, R.C.B.; KELLER, R. *et al.* Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 100 (4): 359-363, July, 2005.
15. CAMARA, L.M., CARBONARE, S.B., SILVA, M.L.M., *et al.* Inhibition of

- enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to HeLa cells by human colostrum: Detection of specific SIgA related to outer-membrane proteins. International Archives of Allergy and Immunology, Switzerland. v.103, p.307-310, 1994.
16. CRAVIOTO, A. Presencia de factores específicos em leite materna contra cepas de *Escherichia coli* causantes de diarreia em humanos. Gaceta Medica de México. México. v.126, n.1, p.35-46, 1990.
17. CARBONARE C.B., CARBONARE S.B., SAMPAIO M.M.S.C., Early acquisition of serum and saliva antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins by infants living in an endemic area. Pediatric Allergy and Immunology, [S.l.], v.14, p.222, 2003.
18. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005. Pré-Natal e Puerpério – Atenção Qualificada e Humanizada. Manual Técnico, 1ª. Edição. Caderno nº05. p. 40-7. Brasília (DF)/2005.
19. HYTTEN, F.E. AND THOMPSON, A.M. In: Milk: the Mammary Gland and its Secretion. Kon, S.K. and Cowie A.T. (ed.). New York, 1961.
20. VENKATACHALAM, P.S. A study of the diet, nutrition and health of the people of the Chimbu Área (New Guinea Highlands). Department of Public Health Monograph 4. Moresby, New Guinea, 1962a.
21. STIEHM, E.R. Humoral Immunity in malnutrition. Federation Proceedings. V. 39, Issue 13, p. 3093-7, November, 1980.
22. CRUZ, J.R.; CARLSSON, B.; GARCIA, B.; GEBRE MEDHIN, M.; HOFYANDER, Y.; URRITIA J.J.; HANSON, L.A. Studies on human milk III. Secretory IgA quantity and antibody levels against *Escherichia coli* in colostrum and milk from underprivileged and privileged mothers. Pediatric Research. V. 16, Issue 4 Pt 1, p. 272-6, april, 1982.
23. MIRANDA, R.; SARAIVA, N.G.; ACKERMAM, R.; MURPHY, N. *et al.* Effect of maternal nutritional status on immunological substances in human colostrum and milk. The American Journal of Clinical Nutrition. V.37, p. 632-40, 1983.
24. CHANG, S.J.; Antimicrobial proteins of maternal and cord sera and human milk in relation to maternal nutritional status. The American Journal of Clinical Nutrition, v.51, p. 183-7, 1990.
25. MORAIS, T.B.; GOMES T.A.; SIGULEM, D.M. Enteroaggregative *Escherichia coli* in infant feeding bottles. The Lancet, 389: 1448, 1997.

3.0 - CONCLUSÃO:

A desnutrição materna não prejudicou a produção de IgAS no colostro nem a propriedade anti-infecciosa desta imunoglobulina dirigida contra a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). Diante destes resultados, sugerimos que o aleitamento materno exclusivo como forma de combate às infecções por agentes enteropatógenos, associado ao cuidado com o estado nutricional materno desde o período pré-natal, seja incentivado mesmo diante de uma desnutrição materna.

Questionário (ANEXO 1)

Avaliação da IgA Secretora Total e Específica contra *Escherichia coli* enteropatogênica em Colostro de Mães Eutróficas e Desnutridas

I – IDENTIFICAÇÃO:

1. No. ____ Registro: _____ Data: ____/____/____

2. Nome da mãe: _____

3. Procedência (Bairro/Cidade) _____

II – VARIÁVEIS MATERNAS

4. Idade da mãe ____ anos 5. Sabe ler? ☐ Sim ☐ Não

6. Escolaridade da mãe: ☐ nenhuma ☐ 1º. Grau incompleto ☐ 1º. Grau completo

☐ 2º. Grau incompleto ☐ 2º. Grau completo ☐ Superior ☐ Ignorado

7. Profissão: ☐ Do lar ☐ Empregada doméstica ☐ Estudante ☐ outra _____

8. Pessoas por domicílio: _____ 9. Renda familiar _____ salários-mínimos

10. Estadocivil: ☐ Casada ☐ Viúva ☐ Solteira 11. Presença do companheiro: ☐ Sim ☐ Não

12. Gesta: ____ 13. Para: ____ 14. Gestações interrompidas (número): _____

15. Data da última menstruação: ____/____/____ 16. IG _____ 17. DUM = _____

18. Fez Pré-natal? ☐ Sim ☐ Não 19. No. de consultas: _____

Local: _____

20. Peso: _____ Kg 21. Altura: _____ m 22. IMC: _____

23. Estado Nutricional: ☐ Nutrida ☐ Desnutrida

21. Intercorrências na gestação:

III - PARTO E RECÉM-NASCIDO

22. Data nascimento: ____/____/____ 23. Idade na consulta: _____ horas.

24. Sexo: ☐ Masculino ☐ Feminino 25. Capurro: _____ sem. _____ dias

26. Tipo de Parto: ☐ Espontâneo ☐ Fórceps ☐ Cesariano

27. Peso ao nascer: _____ g 28. Comprimento: _____ cm 29. PC: _____ cm

30. Adequação peso/IG: ☐ AIG ☒ PIG ☐ GIG 31. Apgar: _____

32. Diagnósticos no berçário:

IV – COLOSTRO:

33. IgAS Total: _____ µg/ml

34. IgAS anti-EPEC: _____ µg/ml

Termo de Consentimento (ANEXO 2)

1.0 Título:

Avaliação da IgA Secretora Total e Específica contra *Escherichia coli* enteropatogênica em Colostro de Mães Eutróficas e Desnutridas.

2.0 Investigadores e local da pesquisa:

Este trabalho terá a participação de Fabrício Andrade Martins Esteves (aluno do programa de mestrado em bioquímica da UFPE), do Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior (na condição de orientador), da Profa. Dra. Elizabeth Malagueño de Santana e da Profa. Dra. Maria Laura Campelo de Melo Dias.

O estudo será feito com as pacientes rotineiramente atendidas no setor de obstetrícia do Hospital das Clínicas da UFPE.

3.0 Objetivo e descrição do estudo

Este trabalho visa avaliar se a ocorrência de desnutrição materna no período neonatal pode influir na produção de IgA secretora do colostro humano. Para isso, serão coletadas amostras de 6ml de colostro anterior maduro de mães nutridas e de mães desnutridas. O diagnóstico de uma possível desnutrição será clínico e as amostras de colostro coletadas serão analisadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE).

4.0 Duração do estudo:

Este trabalho se desenvolverá no período de 1 (um) ano a partir da data de aprovação do mesmo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

5.0 Riscos e Benefícios

A manipulação da mama das pacientes durante a coleta do colostro pode gerar algum tipo de desconforto para as mesmas. Este ocasional inconveniente, porém, será minimizado uma vez que a coleta será realizada por pessoal técnico devidamente capacitado e do sexo feminino do setor de obstetrícia do Hospital das Clínicas da UFPE.

Todas as mães que apresentarem alguma forma de alteração mamária ou algum grau de desnutrição receberão aconselhamento nutricional ou encaminhamento para tratamento pela Profa. Dra. Maria Laura Campelo de Melo Dias.

6.0 Confidencialidade:

Será garantido o sigilo de todas as informações referentes às pacientes que voluntariamente concordarem em participar deste projeto de pesquisa. Para tal, as pacientes receberão uma numeração de ingresso no estudo e seus nomes não serão citados em nenhum momento.

7.0 Participação voluntária:

As amostras de colostro serão obtidas de mães que concordarem em participar voluntariamente deste estudo após assinarem este termo de compromisso. Em linguagem clara e simples, os objetivos, riscos e benefícios deste estudo serão apresentados às pacientes durante as consultas com a Dra. Maria Laura Campelo de Melo Dias.

A qualquer momento a paciente poderá retirar-se do estudo bastando para isso que entre em contato com o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami pelo telefone (81) 21012515 ou pelo endereço Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária, Recife - PE – Brasil CEP.: 53.670-910.

Assinatura da voluntária

Assinatura do pesquisador

Assinatura da 1ª. testemunha

Assinatura da 2ª. testemunha

Data: ____/____/____



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N. ° 208/2006-CEP/CCS

Recife, 31 de outubro de 2006.

Registro do SISNEP FR – 84507

CAAE –0018.0.172.000-06

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 020/06

Título: “ **IgA secretória total e específica contra um antígeno de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), em colostro de mães nutridas e desnutridas.**”

Pesquisador Responsável: Fabrício Andrade Martins Esteves

Senhor Pesquisador:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou, analisou e aprovou a modificação do título da pesquisa em epígrafe: “**IgA secretória total e específica contra um antígeno de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), em colostro de mães nutridas e desnutridas**”

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório ao final da pesquisa (20/03/07).

Atenciosamente,

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE



José Angelo Rizzo
Vice - Coordenador do CEP/CCS/UFPE

Ao
Mestrando. Fabrício Andrade Martins Esteves
Programa de Mestrado em Bioquímica – CCB/UFPE

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, F.; CLEMENS, J.D.; RAO, M.R. Community-based evaluation of the effect of breast-feeding on the risk of microbiologically confirmed or clinically presumptive shigellosis in Bangladesh children. *Pediatrics*. V. 90, p. 406-11, 1992.

BLACK R. E.; MORRIS, S.S.; BRYCE, J.; Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet*. V. 361, p. 2226-34. June, 28/2003.

BRANDTZAEG, P.; BAEKKEVOLD E.S. & FARSTAD I.N.; Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunology Today*. V. 20, p. 141-51, 1999

BRANDTZAEG, P.; Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutritional Review*. V. 56, S5-S18, 1998.

BRANDTZEG, P.; Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine*, v.21, p. 3382-3388, mar. 2003

CARBONARE, S.B.; PALMEIRA, P.; SILVA, M.L.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.. Effect of microwave radiation, pasteurization and lyophilizations on the ability of human milk to inhibit *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells. *The Journal of Diarrhoeal Disease Research*. Vol.14(2). p.90-4. Jun/1996.

CHANG, S.J.; Antimicrobial proteins of maternal and cord sera and human milk in relation to maternal nutritional status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.51, p. 183-7, 1990.

CHERNISHOV P.P.; SLUKVIN I.I. Mucosal immunity of the mammary gland and immunology of mother/newborn interrelation. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)*. V. 38 (1-2), p. 145-64, 1990.

CLEARY, T.G.; Human milk protective mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. V. 554. p. 145-54, 2004

CRAVIOTO, A. Presencia de factores específicos em leite materno contra cepas de *Escherichia coli* causantes de diarreia em humanos. *Gaceta Medica de México*. México. v.126, n.1, p.35-46, 1990.

Donnenberg, M. S., Kaper, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, [S.I.], v.60, p. 3953-3961, 1992.

FILTEAU, S. M.; RICE, A.L.; BALL, J.J. *et al.* Breast milk immune factors in Bangladeshi women supplemented postpartum with retinol or β -carotene. *American Journal of Clinical Nutrition*. V. 69, p. 953-58, 1999b.

FILTEAU, S. M.; Role of breast-feeding in managing malnutrition and infectious disease. *Proceedings of the Nutrition Society*. V. 59, p. 565-572, February 2000.

GLASS, R.I.,SVENNNERHOLM, A.M., STOLL, B.J. *et al.* Protection against cholera in breast-fed children by antibodies in breast milk. The New England Journal of Medicine. V. 308, p. 1389-92, 1983.

HAMOSH, M.; Protective function of proteins and lipids in human milk. Biology of the Neonate: Fetal and Neonatal Research. V.74, Issue 2, p. 163-76, 1998.

HANSON, L.A.; HANH-ZORIC, M., *et al.*; Breast feeding: overview and breast milk immunology. Acta Paediatrica Japonica; Overseas edition. V.36, Issue 5. p. 557-61. 1994.

HANSON, LA *et al.* The immune response of the mammary gland and its significance for the neonate. Ann. Allergy, [S.L.], v.53, n.6, p.576-582, December/1984.

HODES, H.L. *et al.* Proof that colostrum antibody is different from serum antibody. J. Pediatric. [S.I.], v.65, p.1017, 1964.

KELSALL B.L., STROBER W.; Host defenses at mucosal defenses. Clinical Immunology Principles and Practice. Rich R. [S.I.]. Mosby, 1996.

KENNY, J.F. *et al.* Bacterial and viral proantibodies in breast-fed infants. Pediatrics. [S.I.]. Segunda edição. p.202, 1967.

LANG, S. Noções básicas sobre aleitamento materno. in: aleitamento do lactente: cuidados especiais. 1a. edição. São Paulo, SP. Santos Livraria Editora, 1999.

MESTECKY J.W. *et al.* Transporte seletivo de IgA (aspectos celulares e moleculares). Clínica Pediátrica da América do Norte, Rio de Janeiro - RJ: Interlivros, v.1, p. 459-489, 1992.

Morais, T.B.; Gomes T.A.; Sigulem, D.M. Enteroaggregative *Escherichia coli* in infant feeding bottles. The Lancet, 389: 1448, 1997.

MORROW, A.L.; RANGEL, J.M. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. Seminars in Pediatric Infectious Diseases, v.15, issue 4, p. 221-228, out. 2004.

MORROW, A.L.; REVES, REVES R.R.; WEST, M.S. *et al.* Protection against infection with *Giardia lamblia* by breast-feeding in a cohort of Mexican infants. Journal of Pediatric. V. 121, p. 363-70, 1992.

NASCIMENTO, M.B.R., ISSLER H. Feeding materno: fazendo a diferença no desenvolvimento, saúde e nutrição dos recém-nascidos de termo e pré-termo. Rev. Hosp. Clin., 2003; 58: 49-60.

NEUTRA, M.R.; MANTIS, N.J.; KRAEHENBUHL, J.P.; Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. Nature Immunology. V. 2, p. 1004-9, 2001.

OBENZA, M.N.; OCHOA, T.J.; GOMEZ, H.F. *et al.* Human milk secretory antibodies against attaching and effacing *Escherichia coli* antigens. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 9 (5), p.545-551, May, 2003.

RUI-PALACIOS G.M.; CALVA, J.J.; PICKERING, L.K. *et al.* Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk. *Journal of Pediatrics*. V. 116, p. 707-13, 1990)

TRABULSI, L.R. & CAMPOS, L.C. *Escherichia*. In: Luiz Rachid Trabulsi. *Microbiologia*. Terceira edição. São Paulo – SP:Editora Atheneu, 1999.

UNDERDOWN, B.J *et al.*. Immunoglobulin A: Strategic Defense Initiative at the Mucosal Surface. In: Paul W. E.. *Annual Review of Immunology*. 1a. Edição. Palo Alto, Califórnia-USA: Annual Reviews Inc., 1986.

VALDÉS, V; PÉREZ SANCHEZ, A & WILLIAMS, SR. Manejo clínico da lactação. Rio de Janeiro : Revinter. 1997. p.128.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Breast-feeding: The Technical Basis and Recommendations for Action. Geneva, WHO. 1993.

WORTHINGTON-ROBERTS,B & WILLIAMS, SR. Nutrition in pregnancy and lactation. 6a. edition. New York:WCB Mc Graw Hill, p. 513, 1997.

ZAHA, M.M. Purificação de IgA secretora (IgAS) de colostro humano e padronização de imunodifusão radial para a obtenção de valores “críticos” mínimos de IgAS na saliva de crianças brasileiras em diferentes grupos etários. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Porto Alegre, v.18, n.3, p.67-86, 1986.