UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Puericultura e Pediatria

Liara Nogueira Petrechen Nosralla

Níveis e complexidade de IgA contra estreptococos orais em amostras de
coloostro humano.

*Levels and complexity of IgA antibody against oral streptococcal in samples of
human colostrum*

Ribeirão Preto

2016

LIARA NOGUEIRA PETRECHEN NOSRALLA

Níveis e complexidade de IgA contra estreptococos orais em amostras de
coloostro humano.

*Levels and complexity of IgA antibody against oral streptococcal in samples of
human colostrum*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, como parte das exigências do programa
de Pós-Graduação em Saúde da criança e do
adolescente para obtenção de título de mestre.

Área de concentração: Puericultura e Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira
Geraldo Martins.

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Nosralla, Liara Nogueira Petrechen

Níveis e complexidade de IgA contra estreptococos orais em amostras de colostro humano. Ribeirão Preto, 2016.

47 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Pediatria e Puericultura.

Nome: Nosralla, Liara Nogueira Petrechen.

Título: Níveis e complexidade de IgA contra estreptococos orais em amostras de colostro humano.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do
Adolescente

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Regina Maria Nogueira Petrechen e Emir de Haro Petrechen pelo amor, dedicação, exemplo de vida e apoio incondicional ao longo desses vários anos de estudo e trabalho. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu marido, Rudy Nosalla pelo companheirismo de todas as horas, apoio incondicional e compreensão nos momentos que me ausentei do convívio familiar por motivos de estudo e trabalho.

Ao meu filho Ruan, por me fazer feliz todos os dias por ser sua mãe e por compreender a minha ausência em tantos momentos.

Ao meu filho João Vicente, que nasceu durante meu mestrado e veio trazer mais alegria à minha vida

A minha orientadora e amiga, Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins por ter acreditado em mim e no meu trabalho. Por estar sempre me dando a oportunidade de aprender novos ensinamentos e trilhar um novo caminho em minha carreira.

À minha amiga Maria Lúcia Talarico pela paciência em ensinar e companheirismo em compartilhar seus conhecimentos e seu tempo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de São Paulo, por meio do Reitor Prof. Dr. Marco Antônio Zago e vice-reitor Vahan Agopyan.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- FMRP/USP, por meio do Diretor Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior , pela oportunidade cedida.

À Coordenadoria de Pós-Graduação da FMRP/USP, na pessoa do Coordenador Prof. Dr. João Santana da Silva, pela oportunidade na realização do trabalho.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, na pessoa da Profa. Dra. Heloisa Bettiol, e das secretárias, Sandra Eugenio Oliveira, Claudia Mendes, Dulcides Boleta da Silva, Vera Lucia de Andrade Hamanaka pela organização exemplar do curso, disponibilidade e competência.

Ao Prof. Dr. Sergio Pereira da Cunha, coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP/USP pela concessão na aprovação para realização da pesquisa.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação da FMRP/USP do departamento de Puericultura e Pediatria pelas suas experiências e ensinamentos.

À Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, pela amizade, orientação e valiosa ajuda nos momentos iniciais de execução dos experimentos.

À técnica de laboratório, Luciana Rodrigues Roberti pela companhia diária, pelo seu dinamismo e amizade.

Aos meus irmãos, Herla N. P. Vilhena de Moraes e Juliano N. Petrechen por sempre me apoiarem, incentivarem e serem exemplos para mim.

As minha avós queridas, Maria Angela Acerbi Nogueira e Francisca de Haro Petrechen (in memorian) por todo amor e cuidados que sempre me dedicaram.

Aos meus sogros Hélio Nosralla Júnior e Lúcia Helena Soncino Nosralla pelo apoio, generosidade e pela dedicação à sua família.

A todos os meus familiares que sempre apoiaram a minha carreira e me incentivaram a vencer os desafios.

Aos professores da banca examinadora, que prontamente aceitaram participar desta nova etapa da minha carreira.

A todos os funcionários e enfermeiras da MATER de Ribeirão Preto pela presteza e apoio durante a coleta e entrevista com as mães participantes ao estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo incentivo financeiro através da concessão da bolsa de Mestrado.

A todas as mães participantes do projeto, sem as quais os resultados obtidos não seriam possíveis. E à Deus, razão da minha e motivo da minha fé.

RESUMO

Após o nascimento, os recém-nascidos são expostos a vários tipos de micro-organismos, que podem determinar um processo infeccioso devido a sua imaturidade imunológica. Dentro deste processo, a amamentação tem um papel importante pela transferência passiva de imunoglobulina A (IgA). A cavidade oral é a principal porta de entrada destes agentes, especialmente os estreptococos, sendo que alguns colonizam inicialmente como *Streptococcus gordonii* (SGO), *S. sanguinis* (SSA) e *S. mitis* (SMI) e outros podem causar doenças, como *S. mutans* (SM), por ser o principal agente etiológico da cárie dentária. Pouco se sabe sobre a especificidade de IgA do colostro contra antígenos importantes destes estreptococos, o que pode ajudar na investigação dos mecanismos de estimulação antigênica e desenvolvimento da resposta imune de mucosa. Para tanto, foi avaliado no presente estudo, a especificidade e os níveis de IgA três antígenos de virulência de SM: glucan binding protein B (gbpB), glicosiltransferase (GTF) e antígeno I/II (Ag I/II) envolvidos na capacidade destas bactérias de aderir e acumular no biofilme. Além disso, as glicosiltransferases: 153 kDa de SGO e 170 kDa de SSA e IgA1- protease de SMI (220 kDa) em amostras de colostro humano. Um total de 77 amostras de colostro foram analisadas quanto aos níveis de imunoglobulina A, M e G por ELISA. A complexidade da IgA contra as bactérias foram analisadas por Western blot. Os resultados mostraram que a concentração média de IgA foi de 2850,2 ($\pm 2567,2$) mg/100 mL sendo estatisticamente maior ($p < 0.05$) dos níveis de IgM e de IgG (respectivamente $321,8 \pm 90,3$ e $88,3 \pm 51,5$ mg/100 mL). A maioria das amostras tiveram níveis detectáveis de anticorpos IgA para extratos de antígenos de bactérias e seus antígenos de virulência, apresentando um elevado número de bandas reativas. Não houve diferença estatisticamente significativa no número médio de IgA reativas a Ags entre os antígenos ($p > 0.4$). A detecção de gbpB foi significativamente menor do que os outros antígenos de SM ($p < 0.05$). Assim, o leite materno das primeiras horas após o nascimento apresentou níveis significativos de IgA contra importantes antígenos de virulência dos estreptococos orais estudados, que pode sugerir que a amamentação antes da erupção dos dentes pode interferir no processo de instalação e acumulação destes micro-organismos na cavidade oral.

Palavras-chave: Colostro, *Streptococcus mutans*, Imunoglobulina A, Imunidade nas mucosas

ABSTRACT

After birth, newborn babies are exposed to several types of microorganisms that can determine an infectious process due to their immunological immaturity. In this case, the feeding plays an important role by passive transferring of immunoglobulin A (IgA). The oral cavity is the main gateway of these agents, especially streptococci, some initially colonize as *Streptococcus gordonii* (SGO), *S. sanguinis* (SSA) and *S. mitis* (SMI) and others can cause diseases such as *S. mutans* (SM), as the main agent of tooth decay. Little is known about the specific IgA against major antigens of these streptococci which can help in the investigation of antigenic stimulation mechanisms and development of mucosal immune response. Therefore, we evaluated in this study, the specificity and levels of IgA from colostrum against three SM virulence antigens: *glucan binding protein B* (gbpB), glycosyltransferase (GTF) and antigen I/II (Ag I/II) involved in capacity these bacteria to adhere to and accumulate in the biofilm. Also, the glycosyltransferases: 153 kDa-SGO and 170 kDa-SSA and IgA1- protease of SMI (220 kDa). This study involved 77 samples of colostrum that were analyzed for levels of immunoglobulin A, M and G by Elisa. The specificity of IgA against extracts of SM and initial colonizers (SSA, SMI, SGO) were analyzed by the western blot. The mean concentration of IgA was 2850.2 ($\pm$ 2567.2) mg/100ml followed by IgM and IgG (respectively 321.8 $\pm$ 90.3 and 88.3 $\pm$ 51.5), statistically different ($p < 0.05$). Results showed that the majority of samples had detectable levels of IgA antibodies to extracts of bacteria antigens and their virulence antigens. To SM, the GbpB was significantly lower detected than other antigens of SM ($p < 0.05$). High complexities of response to Ags were identified in the samples. There were no significant differences in the mean number of IgA-reactive Ags between the antigens ($p > 0.4$). So, the breast milk from first hours after birth presented significant levels of IgA specific against important virulence antigens of oral streptococci, which can disrupt the installation and accumulation process of these microorganisms in the oral cavity.

Keywords: Colostrum, *Streptococcus mutans*, IgA, Mucosal immunity

1. INTRODUÇÃO

O leite materno, especialmente o colostro, é um biofluido importante que possui vários componentes imunológicos contra bactérias patogênicas (Walker, 2010, Kanwar *et al.*, 2010). Uma vez que o recém-nascido tem uma imaturidade imunológica (Clapp, 2006), o colostro representa a primeira linha de defesa local contra esses desafios antigênicos iniciais. A IgA secretora (IgAs) representam o principal mediador da atividade anti-bacteriana no colostro humano (Pribylova *et al.*, 2012, Ovono Abessolo *et al.*, 2011; Van de Perre, 2003). A segunda maior classe de imunoglobulina é a IgM (Moriarty & Mickleson 1982) seguindo por IgG, que não exceda 3% dos níveis encontrados no sangue (Mc Clelland *et al.* 1978).

A transferência passiva destes anticorpos, de mãe para filho, através do colostro, representa a primeira linha de defesa das membranas mucosas do recém-nascido, o que confere proteção contra várias infecções em idades precoce (Walker, 2010), tais como *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter*, *Shigella* spp (Van de Perre, 2003; Ruiz-Palacios *et al.* 1990; Hayani *et al.* 1992; Walterspiel *et al.*, 1994; Long *et al.*, 1999). Diversos estudos demonstraram a proteção passiva conferida pelo leite materno contra infecções bacterianas através dos processos de ligação e também por ocupação de superfícies mucosas, impedindo a aderência e invasão de uma grande variedade de micro-organismos patogênicos (Hanson, 1998; Van de Perre, 2003). Assim, a função do desenvolvimento imunológico pós-natal e do controle da flora normal e patogênica pode ser influenciada pela amamentação e contribuiu com a vida saudável do recém-nascido (Le-Huërou Luron *et al.*, 2010).

A cavidade oral representa uma entrada importante de vários micro-organismos. Alguns deles podem se tornar residentes e permitir a adesão e a acumulação de outros novos micro-organismos, aumentando a complexidade das comunidades microbianas na

cavidade oral, que pode resultar em doença, tais como, a cárie dentária, em que o *Streptococcus mutans* (SM) é um dos principais patógenos. Algumas das espécies pioneiras da cavidade oral, como a *Streptococcus mitis* (SMI), *Streptococcus gordonii* (SGO) e *Streptococcus sanguinis* (SSA) (Sussman *et al.*, 1986) foram associados a outras doenças como a endocardite bacteriana.

Alguns antígenos (Ags) de virulência dessas espécies foram anteriormente descritos, tais como, 200 kDa de SMI que é uma protease de IgA1 (Poulsen *et al.*, 1998), 170 kDa de SSA e 153 kDa SGO foram descritos como glicosiltransferases (Vacca-Smith *et al.*, 1994; Vacca-Smith *et al.*, 2000). Três principais antígenos associados a células de SM foram demonstrados por estarem envolvidos na capacidade desses micro-organismos a aderir e acumular-se no biofilme. Estes antígenos incluem uma adesina (Ag I/II), glicosiltransferase (GTF) que sintetizam glucanos insolúveis em água a partir de sacarose e a *glucan binding protein B* (GbpB) (Lee *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1996, Yamashita *et al.*, 1993).

Diversos estudos demonstraram a protecção passiva conferida pelo leite materno contra infecções bacterianas através dos processos de ligação e também por ocupação de superfícies mucosas, impedindo a adesão e invasão de uma grande variedade de micro-organismos patogénicos (Hanson, 1998; Van de Perre 2003). Há poucos estudos com foco na influência de anticorpos IgA do colostro na colonização inicial de espécies em bebês. Aqui, analisamos os níveis, frequência e complexidade da resposta de IgA contra espécies de estreptococos em amostras de colostro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância do aleitamento materno

O aleitamento materno é uma prática importante e tem sido abordado segundo os aspectos nutricionais, imunológicos e psicossocial. Por isso a amamentação natural é reconhecida e incentivada pelo governo e pelos profissionais de saúde por trazer muitos benefícios aos recém-nascidos (Neiva *et al.*, 2003). Campanhas para a promoção do aleitamento materno, desenvolvidas por autoridades públicas do SUS (Sistema Único de Saúde), tem sido feitas para o controle da mortalidade infantil (Escuder *et al.*, 2003). Outros órgãos como World Health Organization (WHO, 2001) realizam práticas sociais de grande relevância para a conscientização da população sobre a importância do aleitamento materno exclusivo (AME) por seis meses e a manutenção do aleitamento materno acrescido de alimentos complementares até os dois anos de vida para a saúde infantil. Muitos estudos demonstraram uma redução significativa nas taxas de mortalidade por diarreia infantil em crianças amamentadas ao seio. Um desses estudos, por exemplo, é o de Betrán *et al.* (2001), que comprovou a redução da mortalidade infantil pela prática do AME na América Latina.

A maior suscetibilidade à infecção bacteriana neonatal é explicada, em parte, pela imaturidade imunológica relativa do recém-nascido, que é consequência direta da adaptação imunológica durante o período transitório da vida intra para a extra-uterina (Mussi-Pinhata *et al.*, 2001, Chirico *et al.*, 2008). A ontogenia do sistema imunológico começa mais cedo no embrião e continua durante a vida fetal, mas é completado somente alguns anos após o nascimento (Chirico *et al.*, 2008; Hanson *et al.*, 1990). No entanto, práticas hospitalares, maternas e obstétricas, podem contribuir para a

ocorrência de contaminação bacteriana que podem resultar em infecções gastrointestinais e respiratórias (Manjarrez-Hernandez *et al.*, 2000), bem como a sepse neonatal, com um envolvimento sistêmico (Silva *et al.*, 2013).

Após o nascimento, com a interrupção da transferência de IgG via cordão umbilical, a mãe tem a possibilidade de oferecer ao recém nascido, uma outra forma de proteção passiva, representada pelo aleitamento materno, que possui propriedades protetoras indiscutíveis (Hanson *et al.*, 1998). Comparações entre crianças alimentadas com fórmulas e em aleitamento materno exclusivo mostram que o leite materno reduz os quadros de infecção em bebês, especialmente aqueles que vivem em más condições de higiene (Yoon *et al.*, 1996, Barros, 1982). A gravidade de infecções gastrointestinais e respiratórias é muito menor em lactentes amamentados ao seio do que em crianças alimentadas com mamadeira (Tomicic *et al.*, 2010; Hanson *et al.*, 1998), aumentando assim, as chances de sobrevivência para as crianças no primeiro ano de vida (Glass *et al.*, 1989; Chirico *et al.*, 2013, Hanson *et al.*, 1990). A amamentação, mesmo não exclusiva, diminuiu o risco de sepse neonatal quando comparados com crianças não amamentadas em país em desenvolvimento (Hanson *et al.*, 1998). Crianças que não receberam leite materno ou o receberam parcialmente tiveram 2,23 vezes risco maior de morrer que as em aleitamento exclusivo, durante os 4 primeiros meses de vida e 2,40 e 3,94 vezes maior de morte devido a infecções respiratórias e diarreia respectivamente. (Arifeen, 2001). Prematuros apresentaram índice significativamente menor de enterocolite necrotizante quando recebiam leite materno parcial ou exclusivo (Araújo *et al.*, 2005)

O leite materno e o colostro contêm uma infinidade de componentes da imunidade inata e específica que podem aumentar as condições para uma vida saudável de um bebê (Hanson *et al.*, 1985, 1990). As concentrações de imunoglobulinas são

muito elevadas no colostro, e constituem a maior parte do conteúdo proteico desta secreção, chegando a mais de 90% no primeiro dia de lactação (Araújo *et al.*, 2005; Barros, 1982).

2.2. Imunoglobulina A do leite materno

Por apresentar um sistema imune imaturo, o recém nascido é mais vulnerável às infecções, sendo essencial a proteção conferida pelo aleitamento materno. O leite materno fornece substâncias imunológicas e fatores de crescimento contra a invasão de patógenos, estimulam a maturação epitelial e aumentam a produção de enzimas digestivas (Kunzs *et al.*, 1999)

A IgA é a principal imunoglobulina do leite humano, estando em sua forma secretora (IgAS). A concentração de IgA no colostro varia entre de 1340 mg/100ml (Aosso Abessolo *et al.*, 2011) a 3200 mg/100 ml (Mickleson & Moriarty, 1982), sendo muito maior que a encontrada no leite maduro de 1 mg/ml (Van de Perre, 2003). A produção materna é de aproximadamente 2 a 3 g por dia, sendo que o recém nascido em aleitamento materno exclusivo recebe 0,5 a 1,0 g por dia (Kunzs *et al.* 1999; Xanthou *et al.*, 1998 ; Akre *et al.*, 1994).

A IgAS do colostro não é absorvida pelo trato gastrointestinal, portanto não sofrem alterações em sua reatividade, permanecendo como foi ingerido, por isso é encontrada nas fezes intacta (Carbonare *et al.*, 1997) e é esta característica que possibilita sua atividade de proteção na superfícies das mucosas, inibindo a aderência de células bacterianas nas células epiteliais do neonato e impedindo a colonização de bactérias (Carneiro-Sampaio *et al.*, 1996). Seu papel frente a antígenos bacterianos, é o de aglutinação, impedindo sua aderência às superfícies mucosas, não permitindo que atravessem a barreira epitelial, protegendo o recém-nascido contra a invasão microbiana

e também o de neutralizar as toxinas liberadas pelos patógenos (Hanson, 1998; Hurley *et al.*, 2011; Grassi *et al.*, 2001). Não possui atividade opsônica, mas pode induzir a fagocitose pelos neutrófilos (Grassi *et al.*, 2001; Rupulo, 1998). Apresenta uma limitada ativação do complemento, o que permite agir de uma maneira não inflamatória (Hurley *et al.*, 2011), sem dano tecidual e sem gasto de energia, o que é importante para um organismo que necessita de energia para o seu crescimento e desenvolvimento (Hanson, 1998). Por apresentar resposta local e meia-vida curta, a IgAS nem sempre protege contra a reinfecção (Rupulo, 1998).

A segunda maior classe de imunoglobulina encontrada no leite materno é a IgM que tem níveis muito parecidos com os encontrados em soro humano. Sua ação parece estar envolvida na prevenção contra infecções causadas por enterobactérias (Brandtzaeg, 1975). Sua concentração no colostro varia entre 113 mg/100ml (Mickleson & Moriarty, 1982) a 240 mg/100 ml (Galotti *et al.*, 1975). Apesar de estarem em pequena quantidade no leite materno, podem ser muito importantes na proteção inicial dos recém nascidos expostos a infecção materna. (Wold *et al.*, 2000; Vinagre *et al.* 1999; Hamosh *et al.*, 2001). Outra imunoglobulina, também presente em menor concentração no leite materno, é a IgG que parece ter origem sérica, cuja concentração no leite materno é menor quando comparado com o nível sérico materno (Mc Clelland *et al.*, 1978) variando entre 53 mg/100ml (Mickleson & Moriarty, 1982) a 80 mg/100 ml (Galotti *et al.*, 1975). A IgG pode ativar o sistema complemento e participar da citotoxicidade anticorpo dependente além de apresentar ação contra vírus, protozoários e toxinas bacterianas (Kunzs *et al.*, 1999; Xanthou *et al.*, 1998 ; Akre *et al.* ,1994)

O reconhecimento do espectro de anticorpos IgA antibacterianos oferecidos pelo leite materno é de grande interesse, pois possibilita o entendimento sobre a função destes no desenvolvimento pós-natal e controle de uma flora normal ou patogênica do

trato gastrointestinal. Assim, a amamentação pode proporcionar uma fonte natural de um amplo espectro de anticorpos maternos maduros no lactante e resultando em uma imunização passiva do bebê já que recebe anticorpos contra patógenos ambientais que podem ser infecciosos (Hanson *et al.*, 1998)

2.3. Desafio infeccioso oral no início da vida

A cavidade oral representa uma porta de entrada importante de vários micro-organismos. Alguns destes podem se tornar residentes e outros transitórios permitindo a adesão e a acumulação de outros novos micro-organismos, aumentando a complexidade das comunidades microbianas na cavidade oral. O primeiro grupo de micro-organismos que colonizam e em maior quantidade a cavidade bucal são os estreptococos, constituindo a microbiota comensal.

Estreptococos como *Streptococcus mitis* (SMI) representam a maioria das bactérias que colonizam o inicialmente a cavidade oral (Pearce *et al.*, 1995; Hohwy *et al.*, 2001; Seow *et al.*, 2009). Os estudos de Pearce *et al.* (1995) comprovaram que com apenas um mês de vida, foram encontrados em crianças *S. sanguinis*, *Streptococcus mitis* biovar 1 e *Streptococcus oralis*, sendo que os *S. mitis* biovar 1 e *S. oralis*, foram encontrados em maior parte isolados em suas bocas. Os estudos de Smith *et al.* (1990) também mostraram que os *Streptococcus mitis* representavam a maioria dos estreptococos detectáveis na cavidade oral de crianças de 1 a 5 meses de idade. No entanto, não há evidências destas bactérias em doenças orais. Por outro lado, algumas destas espécies pioneiras, como SMI, SGO e SSA podem estar associadas a endocardite bacteriana (Vacca-Smith *et al.*, 1994).

O surgimento de superfícies dentais não descamativas torna o ambiente oral apto para a colonização de vários estreptococos, como *Streptococcus gordonii* (Tappuni &

Challacombe, 1993) e *Streptococcus sanguinis* (Carlsson *et al.*, 1975). É na erupção do primeiro dente, aproximadamente aos 9 meses de idade, que a colonização inicial por *S. sanguinis* ocorre, durante uma discreta “janela de infectividade” (Caufield *et al.*, 2000).

A capacidade de causar infecção microbiana depende de inúmeros antígenos de virulência presentes nas superfícies desses micro-organismos. O reconhecimento destes antígenos e suas propriedades são ferramentas importantes para se entender o processo de colonização da cavidade bucal. Alguns antígenos de virulência de estreptococos pioneiros da cavidade bucal já foram identificados. O antígeno de 153kDa de *Streptococcus gordonii*, que é uma glicosiltransferase (Gtf), é importante no processo de colonização do endocárdio, nos quadros de endocardite bacteriana, por mediar a aderência desta bactéria ao endotélio humano (Vacca-Smith *et al.*, 1994). Além disso, estudos em modelos animais mostraram que essa Gtf é responsável pela capacidade do SGO persistir no biofilme dentário (Tanzer *et al.*, 2008). Vacca-Smith e colaboradores (2000) purificaram uma Gtf de *Streptococcus sanguinis* com peso molecular de 170 kDa e Poulsen e colaboradores (1998) sequenciaram uma IgA1-protease de *Streptococcus mitis* com 200kDa.

Após a erupção dentária dos molares novas espécies passam a colonizar esta cavidade, como SM (Smith *et al.*, 1998; Caufield *et al.*, 1993) que é o principal agente etiológico da cárie dentária. No entanto, essas espécies podem ser detectadas antes da erupção dentária, em crianças fortemente expostas a SM (Alves *et al.*, 2009). Diferentemente das espécies pioneiras, a aquisição precoce de SM, a partir do contato com adultos infectados, especialmente as mães e pessoas próximas (Torres *et al.*, 1999) pode ser desastroso pois pode determinar uma manifestação precoce da cárie dentária.

Alguns principais antígenos (Ags) associados às células de SM foram mostrados como envolvidos na capacidade desses micro-organismos de se aderir e acumular no

biofilme dentário, promovendo o desenvolvimento de cárie dentária, tais como antígeno I/II (Ag I/II), glicosiltransferase (GTF) e proteína ligante de glucano (GbpB) (Lee *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1996; Yamashita *et al.*, 1993). Vários estudos demonstraram que a indução de anticorpos específicos contra cada um destes antígenos pode conferir proteção contra o desenvolvimento de cáries dentárias em modelos animais (Koga *et al.*, 2002). Estes estudos deram impulsos para a utilização destes antígenos em ensaios clínicos de elaboração de vacinas anti-cárie em adultos e crianças (Childers *et al.*, 1999).

A fase inicial da colonização do SM inicia-se com sua adesão ao dente, um evento que é independente de sacarose e resulta da interação específica de adesinas bacterianas com glicoproteínas salivares que cobrem os dentes. Esse processo de aderência e colonização é intermediado por proteínas, enzimas e complexos enzimáticos (Banas & Vickerman, 2003; Miranda *et al.*, 2001; Islam & Khan, 2007). Dentre as adesinas de SM, destacam-se o receptor de superfície SpaP (também conhecido como Pac ou Antígeno I/II) (Jenkinson & Demuth, 1997). De acordo com Banas e Vickerman (2003), o SM produz pelo menos quatro tipos distintos de proteínas ligantes aos glucanos, GbpA, GbpB, GbpC e GbpD. As Gbps principalmente GbpB são importantes para o acúmulo de SM na presença de sacarose, pois formam uma "ponte" que liga as superfícies celulares destes micro-organismos à matriz celular de glucanos sintetizadas pelas Gtfs. *S. mutans* produz, pelo menos, três GTFs geneticamente distintas: GTFB que sintetiza glucanos insolúveis; GTFC produz uma mistura de glucanos solúveis e insolúveis, enquanto GTFD forma predominantemente glucanos solúveis (Aoki *et al.*, 1986; Hanada & Kuramitsu, 1989).

2.4. Anticorpos do leite materno contra micro-organismos orais

A literatura traz pouca informação a respeito da presença, especificidade e impotência dos anticorpos do leite materno contra estreptococos orais. Estudos de Aldred *et al.* (1986) e Camling *et al.* (1987) demonstraram a presença de IgAS do colostro contra SM e estreptococos pioneiros da cavidade bucal.

A estimulação ativa pela ingestão do SM por gestantes elevou os níveis de IgAS reativos a SM e seus antígenos (Gtf e Ag I/II) nas amostras de saliva, de lágrimas, de colostro e de leite materno destas mulheres (Gregory e Filler, 1987). O mesmo ocorreu em chimpanzés grávidas imunizadas oralmente com SM, em que houve um aumento na concentração de IgAS no colostro (17 vezes maior), tendo resposta positiva a Ag I/II, Gtf e GpbB (Tyler e Coler, 1999), mostrando que a estimulação oral por SM pode determinar a excreção de anticorpos IgAS específicos do tecido mamário. Um estudo com ratas prenhas alimentadas com SM, também mostrou a presença de IgA específico a esta espécie no colostro e no leite. E ainda, que os filhotes contaminados com SM e aleitados por estas mães apresentaram menos cáries que o controle (Michalek e McGhee, 1977).

2. HIPÓTESE

Com base nas relevantes propriedades clínicas e evidências epidemiológicas de que o aleitamento materno apresenta proteção contra infecções bacterianas de neonatos espera-se que amostras de analisadas apresentem elevados níveis de IgAS específico contra as bactérias estreptocócicas orais imunizando passivamente o neonato.

3 . OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi analisar os níveis de complexidade de resposta de anticorpos IgAS presentes no leite materno contra antígenos específicos de espécies bacterianas colonizadores da cavidade oral: *S. mitis*, *S. gordonii*, *S. sanguinis* e *S. mutans*, a fim de verificar a proteção imunológica passiva oferecida pela mãe no início da vida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

Um total de 77 mães foram incluídas neste estudo, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) com direito de interrupção em qualquer momento do estudo. O Comitê de Ética do HC-FMRP/USP de Ribeirão Preto (Anexo 1) aprovou a realização deste estudo. Os critérios de inclusão foram: mães saudáveis e partos a termo realizados na MATER (Centro de referência em saúde da mulher do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto) há menos de 24 horas. Os critérios de não inclusão foram: qualquer intercorrência na gestação ou parto e o uso de medicamentos (corticoides e antibióticos) que interferissem na lactação. Foi realizada uma entrevista com preenchimento do questionário no primeiro dia de internação hospitalar.

4.2. Coleta de amostras

As coletas do colostro foram realizadas no período matutino e encaminhadas para serem processadas e analisadas nos Laboratórios de Pediatria da FMRP/USP. As amostras de colostro foram coletadas por expressão manual em tubos de polipropileno estéreis de 15 mL, nas primeiras 24 horas após o parto, no período matutino. Após a coleta, as amostras maternas foram transportadas em gelo para o laboratório, centrifugado a 1300 xg durante 7 min para remover os componentes lipídicos e armazenadas a -80°C até a realização dos imunoenaios.

4.3. Níveis de imunoglobulinas IgA, IgM e IgG

Placas de 96 poços (Costar, EUA) foram sensibilizadas com uma solução de anticorpo IgG de cabra anti-IgA ou IgM ou IgG humana purificado (Zymed, EUA) na

concentração de 2µg/ml, diluído em tampão I (carbonato-bicarbonato pH 9.6), durante incubação por 2,5 horas a 37°C, seguida de incubação a 4°C durante 14 a 16 horas. A seguir, as placas foram lavadas em Lavador de ELISA (Thermoplate, BR) durante 3 minutos, por 3 vezes, com tampão II (contendo 0,9% cloreto de sódio, 0,05% Tween 20 e 0,02% ázida sódica). Os poços foram então bloqueados com 100µl de tampão III (fosfato de sódio, 1% albumina bovina, pH 7.5), durante 1 hora, sob agitação, em temperatura ambiente.

Após nova série de lavagens com tampão II, 100µl das amostras diluídas 1:20000 em tampão III foram adicionadas por poço em triplicata e as placas foram então incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente e sob agitação. Diluições seriadas de IgA, IgG ou IgM humana purificada (Calbiochem, EUA) nas concentrações de 2,0; 1,0; 0,5; 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0312µg/ml, e de duas amostras de saliva controle de adultos e uma de criança foram aplicadas em duplicata às placas, para determinação de uma curva de concentração de Ig humana e controle de reprodutibilidade dos ensaios.

Após incubação com as amostras e padrão, as placas foram lavadas por 3 vezes durante 3 minutos com tampão II. Adicionaram-se 100µl/poço de solução 1:500 de anticorpos IgG de camundongo anti-IgA/IgG ou IgM humana (Sigma, EUA) e as placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente, sob agitação e, a seguir, lavadas e posteriormente incubadas com 100µl/poço de solução 1:10.000 de anticorpos IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com biotina (Sigma). As placas foram então incubadas por 2 horas em temperatura ambiente, sob agitação e, a seguir, lavadas como descrito anteriormente. Posteriormente solução de estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina (Sigma) diluída a 1:500 em tampão III foi aplicados nos poços e incubados por 18 horas em temperatura ambiente.

Após nova série de lavagens, as reações de ELISA foram reveladas pela incubação com substrato p-nitrofenilfosfato (Zymed), foi diluído em tampão IV (contendo 0.2M carbonato de sódio, 0.2M Bicarbonato de sódio e 0,02% cloreto de magnésio, pH 9.8). Esta reação, com o substrato, foi desenvolvida por 20, 40 e 60 minutos em temperatura ambiente e as absorbâncias (A_{415nm}) medidas em leitor de ELISA (BioRad-EUA). Os valores médios de absorbância dos controles negativos foram descontados dos valores da absorbância das amostras testadas.

4.4. Ensaios para análise da complexidade de resposta de IgA contra antígenos bacterianos

4.4.1. Preparação de antígenos bacterianos

Padrões de reatividade de anticorpos IgAS contra antígenos *S. mutans* (UA159), *S. mitis* (ATCC506), *S. gordonii* (ATCC10558) and *S. sanguinis* (ATCC29667) foram determinados por ensaios de Western blot. Células foram obtidas de 15 mL de material das culturas, após centrifugação a 1.300 xg a 4°C, durante 10 min. Absorbâncias foram ajustadas para $A_{600nm}=1$ e então separadas. Aos precipitados de células acrescentou-se água destilada tampão desnaturante 0,25M Tris HCl pH 6.8 (contendo 8% SDS, 20% de ditiotreitol 1M, 30% de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol) na proporção de células de 1mL de cultura para 15uL de H₂O e 15uL de tampão desnaturante. As suspensões celulares foram então fervidas durante 5 minutos para extração das proteínas e inativação de proteinases. A seguir os extratos foram imediatamente colocados em banho de gelo e congelados a -80° C. Para monitoramento do padrão de antígenos destes extratos, alíquotas dos mesmos foram analisadas em géis de poliacrilamida-SDS corados com Coomassie Blue R 250.

4.4.2. Análise da complexidade de resposta de IgA contra antígenos bacterianos em ensaios de western blot

As proteínas das preparações de antígenos descritas no item 4.4.1 foram separadas por 3 horas a 24 mA/gel em géis duplicata de poliacrilamida-SDS a 6% preparados com auxílio de sistema de mini-géis Mini Protean II (BioRad, CA, USA). Após separação eletroforética das proteínas nos géis duplicata, um destes foi transferido para membrana de nitrocelulose (BioRad, CA, USA) durante 1,5h a 50V constantes, com auxílio de aparato Mini TransBlot (BioRad, CA, USA). O segundo gel foi corado com Coomassie Blue R250 (Sigma, MO, USA) para análise do padrão dos antígenos separados. Padrões de pesos moleculares pré-corados (BioRad, CA, USA) foram incluídos em todos os géis. As membranas de nitrocelulose contendo os antígenos, foram então bloqueadas através da incubação a 4°C “overnight” com tampão de bloqueio TBST (100mM Tris com 10% Tween) pH 7,5 contendo 5% de leite desnatado.

A seguir, as mesmas foram incubadas com amostras de colostro diluídos (1:4.000) no mesmo tampão durante 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação. Como controles negativos, membranas duplicata foram incubadas apenas com TBST mais 5% de leite em pó desnatado. Após 8 lavagens de 10 minutos cada com 80mL de TBST pH 7,5, as membranas foram incubadas por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente, com anticorpo purificado de cabra anti-IgA humana conjugado com peroxidase (Zymed/Invitrogen, CA, USA), diluído 1:4000 em TBST com 5% de leite em pó desnatado. Nova série de 8 lavagens durante 10 minutos cada, foi então realizada.

A seguir, as reações com anticorpo secundário foram reveladas usando-se o sistema quimioluminescente ECL (Amersham, NJ, USA). A detecção das bandas de antígenos reconhecidos por Ig foram detectadas através da exposição de filmes de raios X (Kodak, NY, USA) às membranas durante 5 minutos. Após a revelação dos filmes

sensibilizados, imagens digitais de alta resolução dos mesmos foram capturadas em scanner (BioRad), para evidenciar a presença ou a ausência das bandas, cujo peso molecular foi calculado através de uma equação baseada no peso molecular padrão utilizado. Os géis em duplicata para análise do padrão de antígenos testados foram incubados com solução de 7% ácido acético e 10% metanol, durante 15 minutos e, a seguir, corados por 2 horas com solução de Coomassie Blue filtrado (0,1% Coomassie Blue, 50% metanol e 10% de ácido acético). Após isto, os géis foram novamente incubados com solução descorante (7% de ácido acético e 10% de metanol) durante 18h. Os géis foram então lavados com solução de glicerol a 10% e secados entre folhas de celofane.

4.4. Análises estatísticas.

As comparações das frequências de amostras de colostro com diferentes especificidades de anticorpos IgA foram realizadas pelo teste do qui-quadrado. O número médio de bandas de IgA reativos em extratos de antígenos também foi determinado. Apresentaram distribuição normal. Os valores foram expressos em Média $\pm$ Desvio Padrão, e a comparação entre os grupos foi realizada por meio de ANOVA. A frequência das amostras mais detectadas com seus respectivos pesos moleculares, também foram analisadas e comparadas por meio de ANOVA. As correlações entre as concentrações de IgA específica e padrões de reações de anticorpos entre as amostras foram testadas por análise de correlação de Pearson. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O teste de Normalidade foi o D-Agostini-Pearson e o programa utilizado BioSTAT.

5. RESULTADOS

Os resultados do presente estudo foram publicados na revista *Immunobiology* 220 (2015) 142–146. (Anexo 2).

5.1. Níveis de imunoglobulinas no leite materno

Os resultados mostraram que houve uma grande variação nos níveis de imunoglobulinas em amostras colostro (Figura 1). Houve diferenças estatisticamente significativas entre as imunoglobulinas analisadas ($p < 0.05$). A concentração média de IgA, IgM e IgG foram, respectivamente, 2850,2 (SD: 2567,2), 321,8 (DP: 88,3) e 88,3 (DP:51,5) mg/100 mL. A concentração de IgA é significativamente maior do que outras imunoglobulinas ($p < 0.05$). A análise de correlação mostrou que havia uma correlação positiva entre os níveis de IgM e IgG (Pearson, $p < 0.01$, $r = 0.58$), mas não entre a IgA e IgG (Pearson, $p = 0.97$, $r = -0.005$) e IgA e IgM (Pearson, $p = 0.80$, $r = -0.03$).

Figura 1. Concentração de IgA, IgM e IgG nas amostras de colostro

Não foram encontradas associações entre os níveis de imunoglobulina e racial, idade materna, saúde oral, tipo de dados de nascimento e sócio-econômicos (Pearson,

$p>0.05$). Também não houve diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de imunoglobulina e tipos de parto: cesariana ou vaginal ($p>0.05$).

5.2. Resposta de IgA contra as bactérias e seus antígenos.

O número de crianças com resposta positiva de IgA para SM, SMI, SSA e SGO está mostrado na Figura 2. Exemplos de western-blot das amostras de 4 mães são ilustrados na Figura 3.

Figura 2. Número de amostras com resposta positiva e negativa aos extratos testados *S. mutans* (SM), *S. mitis* (SMI), *S. sanguinis* (SSA) and *S. gordonii* (SGO)

Figura 3. Padrões de especificidade de IgA contra antígenos de *S. mutans* (SM), *S. mitis* (SMI), *S. sanguinis* (SSA) and *S. gordonii* (SGO) em quatro amostras de colostro. O tamanho do peso molecular (kDa) está indicado na esquerda dos imunoblots.

Os resultados mostraram que 62,3 (n=46), 59,7 (n=48), 55,8 (n=42) e 54,5 (n=43) % de amostras de colostro tinham níveis detectáveis de anticorpos IgA com os extratos de SMI, SM, SGO e SSA, respectivamente (Tabela 1, Figura 3). Mas, não houve diferença estatisticamente significativa entre esses antígenos (Qui-quadrado, $p>0.41$, $q>0.2$). Houve correlações positivas entre as frequências de resposta positiva a todos os antígenos (Pearson, $p<0.001$, $r>0.60$).

Tabela 1. Número de amostras com reatividade de IgA positiva e negativa contra os extratos de *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* and *S. gordonii* e seus antígenos avaliados.

Antígenos bacterianos	Número de amostras com resposta:	
	Positiva (%)	Negativa (%)
<i>Streptococcus mutans</i> (n=46)		
Ag I/II	42 (91.3)	4 (8.7)
Gtf	42 (91.3)	4 (8.7)
GbpB	33 (71.7)	13 (28.3)
<i>Streptococcus mitis</i> (n=48)		
Ag 202kDa	48 (100.0)	0 (0.0)
<i>Streptococcus gordonii</i> (n=43)		
Ag of 153 kDa	40 (93.0)	3 (7.0)
<i>Streptococcus sanguinis</i> (n=42)		
Ag of 170 kDa	36 (85.7)	6 (14.3)

Análise de frequência de resposta específica aos antígenos do virulência: 153 kDa da SGO, 170 kDa de SSA, 202 kDa de SMI e 185, 160, 56 kDa de SM estão mostrados na Tabela 1. A maioria das amostras tiveram uma resposta positiva para antígenos avaliados. Para SM, a GbpB foi significativamente menos detectada do que os outros antígenos ($P < 0,05$). Houve diferença estatisticamente significativa na frequência de resposta positiva a 202 kDa Ag de SMI e GbpB de SM ($p < 0.05$). Houve correlação positiva entre a frequência de resposta positiva entre todos os extrato e especificidades destes antígenos de virulência (Pearson, $p < 0.05$, $r > 0.68$).

5.3. Complexidade da resposta a Ags e seus antígenos de virulência

Elevadas complexidades de resposta a antígenos (definido pelo número de bandas de IgA-reactivas) foram identificados nas amostras. A Figura 4 mostra o número de bandas de IgA reactivas das amostras com resposta positiva a SSA, SMI, SGO e SM.

O número de bandas de IgA-reactiva, nas amostras com resposta positiva, observada em extratos de SM, variou de 1 a 32 (média: $8,4 \pm 5,9$), para SMI variou de 1 a 22 (média: $8,6 \pm 5,0$), durante SGO variou de 1 a 28 (média: $8,4 \pm 6,4$), para SSA variou de 1 a 25 (média: $8,7 \pm 6,7$). Não houve diferenças significativas no número médio de Ags IgA-reactivas entre os antígenos ($p>0.4$). O grau de complexidade da resposta aos antígenos foi associada apenas entre a SM e SGO ($p<0.05$, $r=0.32$) e SSA e SGO ($p<0.05$, $r=0.44$).

Figure 4. Número médio de bandas de IgA contra antígenos de *Streptococcus mutans*, (SM), *S. mitis* (SMI), *S. gordonii* (SGO), *S. sanguinis* (SSA) em amostras de colostro.

6. DISCUSSÃO

O leite materno fornece nutrientes essenciais e importantes componentes de proteção imunológica no início da vida. Este biofluido é uma fonte de anticorpos, representadas principalmente por IgA, na sua forma dimérica (Pribylova *et al.*, 2012;. Striker *et al.*, 2004). Os resultados mostraram que a concentração média de IgA encontrada 2850 mg/100 mL foram consistentes com os dados da literatura, que variaram de 1340 mg/100 mL (Ovono Abessolo *et al.*, 2011) a 3200 mg/100mL (Mickleson & Moriarty, 1982). Além disso, os níveis de IgM e IgG, respectivamente 321,8 ($\pm$ 90,3) e 88,3 ($\pm$ 51,5) também foram próximos das concentrações descritas na literatura, 113 mg/100 ml (Mickelson & Moriarty, 1982) para IgM e 53 mg/100 ml (Mickleson & Moriarty, 1982) para IgG.

A colonização oral humana começa a se formar nas primeiras horas de vida através do contato com as pessoas e o meio ambiente. Assim, espécies pioneiras, tais como *S. mitis*, *S. sanguinis* e *S. gordonii*, representam a maioria das bactérias que inicialmente surgem na cavidade oral (Seow *et al.*, 2009) e após a erupção do dente ou na população altamente exposta, o *S. mutans* (Alves *et al.*, 2009). A influência da proteção imunológica própria do neonato e do colostro sobre estas espécies é pouco conhecida, daí a importância do presente estudo. A presença e complexidade da resposta de IgA contra as espécies de estreptococos podem elucidar a função de proteção imunitária passiva oferecido pela mãe para recém nascidos contra a invasão e colonização destas espécies presentes na cavidade oral.

Os resultados do presente estudo corroboram com estudos anteriores que detectaram a presença de bandas IgA reactivas contra antígenos de SM (Aldred *et al.*, 1986; Camling *et al.*, 1987) e SMI (Aldred *et al.*, 1986), permitindo sugerir que o

aleitamento materno pode interferir na colonização e adesão inicial destes estreptococos fortalecendo a hipótese de que o colostro pode contribuir para uma proteção inicial contra a cárie dentária, pois, comunmente, não há uma higienização adequada da cavidade oral após a amamentação.

Não houve grandes diferenças entre as frequências de detecção de resposta IgA reativa contra os antígenos. Mas, uma pequena diferença no percentual de amostras com resposta positiva à SM e SMI, que foi detectado mais do que contra os colonizadores iniciais, SSA e SGO, o que era esperado, uma vez que estes últimos micro-organismos são mais frequentemente encontrados em crianças do que em adultos.

A investigação de antígenos de virulência destas bactérias testadas, como a IgA1-protease (200 kDa) de SMI, as glicosiltransferases: 170 kDa de SSA e 153 kDa SGO e os três principais antígenos associados a células de SM: adesina (Ag I/II), GTF e a GbpB, pode contribuir para a investigação dos mecanismos de estimulação antigênica destas espécies pioneiras na boca e no sistema imune de mucosas, refletindo na sua presença no colostro. Os resultados mostraram que mais de 85%, que apresentaram resposta positiva às bactérias colonizadoras iniciais, apresentaram IgA específico a estas bandas de importância, o que é pouco reportado na literatura. A IgA contra a 202 kDa Ag de SMI que foi encontrada em todas as amostras de colostro positivas, o que também foi detectados por Reinholdt & Killian (1985).

Poucos estudos focam na influência de anticorpos IgA do leite materno sobre a colonização inicial de espécies orais iniciais em desdentados nos primeiros três meses de vida. Reforçando a importância de compreender o seu papel antes da erupção dos dentes. Em humanos, há muita controvérsia sobre o papel protetor do leite humano

contra a cárie porque o leite contém outros componentes, tais como açúcares, que podem contribuir para o desenvolvimento da doença (Ribeiro & Ribeiro, 2004).

A maioria das amostras testadas apresentaram IgA reativas a SM e seus antígenos de virulência como descrito em estudos anteriores que avaliaram o colostro humano e de chimpanzés (Gregory e Filler, 1987; Tyler e Coler, 1999). Houve uma diferença entre a resposta positiva de IgA para antígenos Ag I/II e GTF (que foi encontrada em mais de 90% das amostras) e GbpB (aproximadamente 72% das amostras responderam). Estudos anteriores indicam que a formação precoce de anticorpos IgA salivar contra antígenos de virulência, especialmente contra a GbpB, pode modular a colonização pelo SM em populações de crianças entre 5 a 11 meses altamente expostas a este micro-organismos (Nogueira *et al.*, 2005). No entanto, Borges e colaboradores (2015) mostraram que apenas 6% das salivas crianças recém nascidas apresentam IgA reativo a GbpB (Borges *et al.*, 2005) o que fortalece o papel protetor do colostro contra a colonização de SM.

7. Considerações finais

Diante do exposto, a literatura traz pouca informação a respeito da colonização oral e o papel da resposta imune passiva conferida pelo colostro, principalmente através de IgAS específicas a micro-organismos. A detecção no colostro nas primeiras horas após o parto de níveis de IgA específicas contra antígenos de virulência de bactérias causadoras da cárie nos permite concluir que o colostro pode modular de alguma forma a instalação dessas bactérias na cavidade oral e por consequência a ontogênese da cárie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aldred, M.J., Wade, W.G., Llewelyn, D.R., Walker, D.M., 1986. Class-specific antibodies to *Streptococcus mutans* in human serum, saliva and breast milk. J. Immunol. Methods. 87,103-108.
2. Alves, A.C., Nogueira, R.D., Stipp, R.N., Pampolini, F., Moraes, A.B., Gonçalves, R.B., Höfling, J.F., Li, Y., Mattos-Graner, R.O., 2009. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. J. Med. Microbiol. 58, 476-481.
3. Araújo, E.D.; Gonçalves, A.K.; Cornetta, M.C.; Cunha, H.; Cardoso, M.L.; Moraisand, S.S.; Giraldo, P. Evaluation of the Secretory Immunoglobulin A Levels in the Colostrum and Milk of Mothers of Term and Pre-Term Newborns. The Brazilian Journal of Infectious Diseases; v.9, n. 5, p. 357-362, 2005.
4. Arifeen, S.; Black, R.E.; Antelman, G.; Baqui, A.; Caulfield, L; Becker, S. Exclusive breastfeeding reduces acute respiratory infection and diarrhea deaths among infants in Dhaka Slums. Journal Pediatrics. v.108, n. 4, October , 2001.
5. Barros M.; Kulesza T.; Raíña W.; Carneiro-Sampaio M. Papel do leite materno na defesa do lactante contra infecções. Pediatria (São Paulo), v. 4, n.2, p. 88-102, 1982.
6. Betrán AP, Onís M, Lauer JA, Villar J. Ecological study of effect of breast feeding
7. Camling, E., Köhler, B., 1987. Infection with the bacterium *Streptococcus mutans* and salivary IgA antibodies in mothers and their children. Arch. Oral. Biol. 32, 817-823.
8. Carbonare S.B., Silva M.L.M., Palmeira P., Carneiro-Sampaio, M.M.S. Human colostrum IgA reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* antigens and their persistence in the faeces of a breastfed infant. J Diarrhoeal Dis Res; 15:53-8, 1997.
9. Carlsson, J., Grahnen, H., Jonsson, G. Lactobacilli and streptococci in the mouth of children. Caries Res. 1975; 9: 333-339.
10. Carneiro-Sampaio M.M.S., Silva M.L.M., Carbonare S.B., Palmeira P., Delneri M.T., Honório A.C., ET AL. Breast-feeding protection against enteropathogenic *Escherichia coli*. Rev Microbiol São Paulo, v. 26, p- 151-4, 1996
11. Caufield P.W., Cutter, G.R., Dasanayake, A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. J Dent Res, v. 72, n. 1, p-37-45, 1993.

12. Childers, N. K., Tong, G., Mitchell, S., Kirk, K., Russel, R..W., Michalek, S. M. A controlled clinical study of the effect of nasal immunization with a *Streptococcus mutans* antigen alone or incorporated into liposomes on induction of immune responses. *Infect Immun.* 1999; 67: 618-23.
13. Chirico G, Marzollo R, Cortinovis S, Fonte C, Gasparoni A. Antiinfective properties of human milk. *J Nutr.* 2008;138:1801S–1806S.
14. Clapp, D.W., 2006. Developmental regulation of the immune system. *Semin. Perinatol.* 30, 69-72.
15. Gahnberg, L., Smith, D.J., Taubman, M.A., Ebersole, J.L., 1985. Salivary-IgA antibody to glucosyltransferase of oral microbial origin in children. *Arch. Oral. Biol.* 30, 551-556.
16. Glass, R. I.; Stoll, B.J. The protective effect of human milk against diarrhoea. *Acta Paediatrica, Suppl v. 351*, p, 131-136, 1989
17. GRASSI, M.S.; COSTA, M.T.Z.; VAZ F.A.C. Fatores Imunológicos do Leite Humano. *Pediatria (São Paulo).* v. 23, n. 3, p. 258-263, 2001
18. Gregory, R.L., Filler, S.J., 1987. Protective secretory immunoglobulin A antibodies in humans following oral immunization with *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 55, 2409-2415.
19. Hanson, L.A., 1998. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 81, 523-533.
20. Hayani, K.C., Guerrero, M.L., Morrow, A.L., Gomez, H.F., Winsor, D.K., Ruiz-Palacios, G.M., Cleary, T.G., 1992. Concentration of milk secretory immunoglobulin A against *Shigella* virulence plasmid-associated antigens as a predictor of symptom status in *Shigella*-infected breast-fed infants. *J Pediatr* 121, 852–856.
21. Hohwy J., Reinholdt J., Kilian M. Population dynamics of *Streptococcus mitis* in its natural habitat. *Infect Immun*, v.69, n.10, p- 6055-6063, 2001.
22. Hurley, W.L.; Theil, P.K. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients*, v.3, n. 4; p. 442–474 ; Apr. 2011.
23. Kanwar, J.R., Kanwar, R.K., Sun, X., Punj, V., Matta, H., Morley, S.M., Parratt, A., Puri, M., Sehgal, R., 2010. Molecular and biotechnological advances in milk proteins in relation to human health. *Curr. Protein. Pept. Sci.* 10, 308–338.
24. Koga, T., Oho, T., Shimazaki, Y., Nakano, Y.. Immunization against dental caries. *Vaccine*, v. 20, p- 2027–2044, 2002.

25. Le Huërou-Luron, I., Blat, S., Boudry, G., 2010. Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr. Res. Rev.* 23, 23–36.
 26. Lee, S.F., Progulske-Fox, A., Bleiweis A.S. 1988. Molecular cloning and expression of a *Streptococcus mutans* major surface protein antigen, P1 (I/II), in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 56, 2114–2119.
 27. Li, Y., Wang, W., Caufield, P.W., 2000. The fidelity of *mutans streptococci* transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. *Caries Res.* 34, 123–132.
 28. Long, K., Vasquez-Garibay, E., Mathewson, J., De La Cabada, J., Dupont, H., 1999. The impact of infant feeding patterns on infection and diarrheal disease due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Salud. Publica Mex.* 41, 263–270.
 29. Manjarrez-Hernandez, H.A, Gavilanes-Parra, S., Chavez-Berrocal, E., Navarro-Ocana, A., Cravioto, A. Antigen Detection in Enteropathogenic *Escherichia coli* Using Secretory Immunoglobulin A Antibodies Isolated from Human Breast Milk. *Infect Immun.* v. 68, n.9, p. 5030–5036, 2000.
 30. Mickleson, K.N., Moriarty, K.M., 1982. Immunoglobulin levels in human colostrum and milk. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1, 381–384.
 31. Mussi-Pinhata, M.M., Nascimento, S. D. 2001. Infecções neonatais hospitalares. *J. Pediatría Vol. 77, Supl.1, S83-S93.*
 32. Neiva, F. C. B. et al. Desmame precoce: implicações para o desenvolvimento motor-oral. *Jornal de Pediatria, Rio de Janeiro*, v. 79, n. 1, p. 07-12, 2003.
 33. Nogueira, R.D., Alves, A.C., King, W.F., Goncalves, R.B., Höfling, J.F., Smith, D.J., Mattos-Graner, R.O., 2007. Age-specific salivary immunoglobulin A response to *Streptococcus mutans* GbpB. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 804–807.
 34. Nogueira, R.D., Sesso, M.L., Borges, M.C., Mattos-Graner, R.O., Smith, D.J., Ferriani, V.P., 2012. Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children. *Arch. Oral. Biol.* 57, 647–653.
 35. Nogueira, R.D.; Alves, A.C.; Napimoga, M.H.; Smith, D.J.; Mattos-Graner, R.O. 2005. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect. Immun.* 73, 5675–5684.
- on infant mortality in Latin America. *BMJ.* 2001; 323: 1-5.

36. Ovono Abessolo, F., Essomo Owono Megne-Mbo, M., Ategbo, S., N'negue, M.A., Lendoye, E., 2011. Profile of immunoglobulins A, G, and M during breast milk maturation in a tropical area (Gabon). *Sante* 21, 15-19.
37. Pearce C., Bowden G.H., Evans M., Fitzsimmons S.P., Johnson J., Sheridan M.J., Wientzen R., Cole M.F. Identification of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates. *J Med Microbiol*, v. 42, n. 1, p- 67-72, 1995.
38. Poulsen, K., Reinholdt, J., Jespersgaard, C., Boye, K., Brown, T.A., Hauge, M., Kilian, M.A. 1998. Comprehensive genetic study of streptococcal immunoglobulin A1 proteases: evidence for recombination within and between species. *Infect. Immun.* 66, 181-90.
39. Pribylova, J., Krausova, K., Kocourkova, I., et al. 2012. Colostrum of healthy mothers contains broad spectrum of secretory IgA autoantibodies. *J Clin Immunol* 32, 1372-1380.
40. Reinholdt, J., Kilian, M. 1995. Titration of inhibiting antibodies to bacterial IgA1 proteases in human sera and secretions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 371A, 605-608.
41. Ribeiro, N.M., Ribeiro, M.A. 2004. Breastfeeding and early childhood caries: a critical review. *J. Pediatr.* 80, 199-210.
42. Ruiz-Palacios, G.M., Calva, J.J., Pickering, L.K., Lopez-Vidal, Y., Volkow, P., Pezzarossi, H., West, M.S., 1990. Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk. *J. Pediatr.* 116, 707-713.
43. Rupulo, B.S.; Miraj, G.S.; Kantor Junior, O. Deficiência de IgA. *Jornal de Pediatria*, v.74, n. 6, p. 438-440, 1998.
44. Seow, W.K., Lam, J.H., Tsang, A.K., Holcombe, T., Bird, P.S. 2009. Oral *Streptococcus* species in pre-term and full-term children - a longitudinal study. *Int. J. Paediatr. Dent.* 19, 406-411.
45. SILVA, A.R.A. ; SIMÕES M.L.C.L; WERNECK L.S.; TEIXEIRA C.H. Infecções relacionadas à assistência à saúde por *Staphylococcus* coagulase negativa em unidade de terapia intensiva neonatal. *Revista Brasileira De Terapia Intensiva*, São Paulo , v. 25, n .3, pp. 239-244, 2013.
46. Smith, D. J., Taubman, M. A. 1996. Experimental immunization of rats with a *Streptococcus mutans* 59-kilodalton glucan-binding protein protects against dental caries. *Infect. Immun.* 64, 3069-3073.

47. Smith, D.J., King, W.F., Akita, H., Taubman, M.A. 1998. Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial mutans streptococcal infection. *Oral Microbiol. Immunol.* 13, 278-285.
48. Smith, D.J., Taubman, M.A. Experimental immunization of rats with a *Streptococcus mutans* 59-kilodalton glucan-binding protein protects against dental caries. *Infect. Immun.* v. 64, p- 3069–3073, 1996.
49. Striker, G.A., Casanova, L.D., Nagao, A.T. 2004. Influence of type of delivery on A, G and M immunoglobulin concentration in maternal colostrum. *J. Pediatr. (Rio J)*, 80, 123-128.
50. Sussman, J.I., Baron, E.J., Tenenbaum, M.J., Kaplan, M.H., Greenspan, J., Facklam, R.R., Tyburski, M.B., Goldman, M.A., Kanzer, B.F., Pizzarello, R.A. 1986. Viridans Streptococcal Endocarditis: Clinical, Microbiological, and Echocardiographic Correlations. *J. Infect. Dis.* 154, 597-603.
51. Tappuni, A.R., Challacombe, S.J. Distribution and isolation frequency of eight streptococcal species in saliva from pre dentate and dentate children and adults. *J Dent Res.* 1993; 72: 31-36.
52. Tomicic, S., Johansson, G., Voor, T., Bjorkstén, B., Bottcher, M.F., Jenmalm, M.C. Breast milk cytokine and IgA composition differ in Estonian and Swedish mothers-relationship to microbial pressure and infant allergy. *Pediatr Res* v.68, n.4, p.330-4, 2010.
53. Tyler, B.M., Coler, M.F. 1999. Characterization Of The Mucosal Immune Response In Breast Milk After Peroral Immunization Of Chimpanzees (*Pan troglodytes*) with *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral. Biol.* 44, 871-883.
54. Vacca-Smith, A.M., Jones, C.A., Levine, M. J., Stinson, M.W. 1994. Glucosyltransferase Mediates Adhesion Of *Streptococcus gordonii* To Human Endothelial Cells In Vitro. *Infect. Immun.* 62, 2187-2194.
55. Vacca-Smith, A.M., Ng-Evans, L., Wunder, D., Bowen, W.H. 2000. Studies Concerning The glucosyltransferase Of *Streptococcus sanguis*. *Caries Res.* 34, 295-302.
56. Van de Perre, P. 2003. Transfer Of Antibody Via Mother's Milk. *Vaccine*, 21, 3374-3376.
57. Walker, A. 2010. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr.* 156(2 Suppl):S3-7. doi: 10.1016.

58. Walterspiel, J.N., Morrow, A.L., Guerrero, M.L., Ruiz-Palacios, G.M., Pickering, L.K., 1994. Secretory anti-Giardia lamblia antibodies in human milk: protective effect against diarrhea. Pediatrics. 93, 28–31.
59. Wirth, K.A., Bowden, G.H., Kirchherr, J.L., Richmond, D.A., Sheridan, M.J., Cole, M.F. 2008. Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: evidence that *Streptococcus mitis* biovar 1 colonization induces strain-specific salivary immunoglobulin A antibodies. ISME J. 2, 728-738.
60. Yamashita, Y., Bowen, W.H., Burne, R.A., Kuramitsu, H.K. 1993. Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific- pathogen-free rat model. Infect. Immun. 61, 3811–3817.
61. Yoon P.W., Black R.E., Moulton L.H., Becker S. Effect of not breastfeeding on the risk of diarrheal and respiratory mortality in children under 2 years of age in Metro Cebu, Philippines. American journal of epidemiology. v.143, p.142-148, 1996.

Ribeirão Preto, 16 de março de 2011

Ofício nº 850/2011
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **"INFLUÊNCIA MATERNA NO DESENVOLVIMENTO E NA ATIVIDADE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE MUCOSA CONTRA PATÓGENOS ORAIS NO INÍCIO DA VIDA"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 319ª Reunião Ordinária realizada em 14/03/2011 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 13290/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
RUCHELE DIAS NOGUEIRA
PROFª. DRª. VIRGÍNIA PAES LEME FERRIANI(Supervisora)
Depto. de Puericultura e Pediatria

Contents lists available at ScienceDirect

Immunobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/imbio

Levels and complexity of IgA antibody against oral bacteria in samples of human colostrum

L.N. Petrechen^a, F.H. Zago^b, M.L.T. Sesso^a, B.B. Bertoldo^b, C.B. Silva^b, K.P. Azevedo^b,
S.A. de Lima Pereira^b, V.R. Geraldo-Martins^b, V.P.L. Ferriani^a, R.D. Nogueira^{a,b,*}

^a Department of Pediatrics, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Uberaba University, Uberaba, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2014

Received in revised form 5 August 2014

Accepted 6 August 2014

Available online 14 August 2014

Keywords:

Colostrum

Streptococcus mutans

IgA

Mucosal immunity

ABSTRACT

Streptococcus mutans (SM) have three main virulence antigens: glucan binding protein B (gbpB), glucosyltransferase (Gtf) and antigens I/II (Ag I/II) involved in the capacity of those bacteria to adhere and accumulate in the dental biofilm. Also, the glycosyltransferases 153 kDa of *Streptococcus gordonii* (SGO) and 170 kDa of *Streptococcus sanguinis* (SSA) were important antigens associated with the accumulation of those bacteria. *Streptococcus mitis* (SMI) present IgA1 protease of 202 kDa. We investigated the specificity and levels IgA against those antigens of virulence in samples of human colostrum. This study involved 77 samples of colostrum that were analyzed for levels of immunoglobulin A, M and G by Elisa. The specificity of IgA against extracts of SM and initials colonizers (SSA, SMI, SGO) were analyzed by the Western blot. The mean concentration of IgA was 2850.2 (± 2567.2) mg/100 mL followed by IgM and IgG (respectively 321.8 $\pm$ 90.3 and 88.3 $\pm$ 51.5), statistically different ($p < 0.05$). Results showed that the majority of samples had detectable levels of IgA antibodies to extracts of bacteria antigens and their virulence antigens. To SM, the GbpB was significantly lower detected than others antigens of SM ($p < 0.05$). High complexities of response to Ags were identified in the samples. There were no significant differences in the mean number of IgA-reactive Ags between the antigens ($p > 0.4$). So, the breast milk from first hours after birth presented significant levels of IgA specific against important virulence of antigens those oral streptococci, which can disrupt the installation and accumulation process of these microorganisms in the oral cavity.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Breast milk is an important biofluid that has immune components against several bacteria pathogens (Walker, 2010; Kanwar et al., 2010). The passive transfer of antibodies, from mother to child, is the first line of defense of the mucosal membranes of neonate, conferring protection against infection in initial ages (Walker 2010) preventing tissue adhesion and invasion of a variety of micro-organisms (Van de Perre 2003), such as *Escherichia coli*,

Haemophilus influenzae, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter*, *Shigella* spp. (Van de Perre 2003; Ruiz-Palacios et al., 1990; Hayani et al., 1992; Walterspiel et al., 1994; Long et al. 1999). So, the function of postnatal immune development and the control of normal and pathogenic flora can be influenced by breastfeeding and contributed by the healthy life of newborn (Le-Huërou Luron et al., 2010).

Secretory IgA (SIgA) represent the main mediator of antibacterial activity in human colostrum (Pribylova et al. 2012; Ovono Abessolo et al. 2011; Van de Perre 2003). The second major class of immunoglobulin is the IgM (Mickleson and Moriarty 1982) following by IgG, which does not exceed 3% of the levels found in the blood (Mc Clelland et al. 1978). Once newborn had an immaturity immunological (Clapp 2006), the colostrum represents the first line of local defense against those initial antigenic challenges. Several studies showed the passive protection conferred by breast milk against bacterial infections through the processes of binding and also by occupation of mucosal surfaces, preventing the adhesion and invasion of a large variety of pathogenic microorganisms (Hanson 1998; Van de Perre 2003).

* Corresponding author at: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Puericultura e Pediatria, Av. dos Bandeirantes, 3900, CEP 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel.: +55 16 3602 2902; fax: +55 16 3602 2297.

E-mail addresses: liara@portalnosralla.com.br (L.N. Petrechen), malutase@yahoo.com.br (M.L.T. Sesso), barbarabellochiob@hotmail.com (B.B. Bertoldo), beatriz.camilla@hotmail.com (C.B. Silva), ka-passaglia@hotmail.com (K.P. Azevedo), sanivia.pereira@uniube.br (S.A. de Lima Pereira), vinicius.martins@uniube.br (V.R. Geraldo-Martins), vplferri@fmrp.usp.br (V.P.L. Ferriani), ruchele.nogueira@yahoo.com.br (R.D. Nogueira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.08.009>

0171-2985/© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

The oral cavity represents an important entry of several microorganisms. Some of those can become resident and allowing the adhesion and accumulation of others new microorganisms, increasing the complexity of microbial communities in oral cavity, that can result in disease, such as, tooth decay, in which *Streptococcus mutans* (SM) that is a main pathogen. Some of pioneer species of oral cavity, such as *Streptococcus mitis* (SMI), *Streptococcus gordonii* (SGO) and *Streptococcus sanguinis* (SSA) (Sussman et al. 1986) were associated with other diseases such as bacterial endocarditis.

The identification of major frequently detected bands of reactivity may help in the investigation of the mechanisms of antigen stimulation on the mucosal immune response. The antigens of virulence those species were previously described, such as, 200 kDa of SMI is an IgA1 protease (Poulsen et al. 1998), 153 kDa and 170 kDa of SGO and SSA was described as glucosyltransferases (Vacca-Smith et al. 1994; Vacca-Smith et al. 2000). Three main cell-associated antigens (Ags) of SM have been shown to be involved in the capacity of these microorganisms to adhere and accumulate in the dental biofilm. These antigens include an adhesin (Agl/II), glucosyl-transferases (GTF) which synthesize glucan from sucrose, and glucan-binding protein B (GbpB) (Lee et al. 1988; Smith and Taubman 1996; Yamashita et al. 1993).

Few studies focused in the influence of IgA antibodies from colostrum on the initial colonization of species in oral edentulous children. Here, we analyzed the levels, frequency and complexity of IgA response against streptococcal species in samples of colostrum.

Materials and methods

Study design

A total of 77 mothers were enrolled in this study, under consent for their participation. The Ethical Committee of the Medical School of Ribeirão Preto, SP, Brazil, 13290/2012, approved this study. To be included in the study population, only healthy mothers with less than 24 h after delivery were included. Information on maternal and gestational background was obtained by interviewing the mother. In the first day of hospitalization the mother were interviewed. After delivery samples of colostrum were obtained. Those samples were processed and immunoassays were realized.

Collection of samples

Samples of colostrum were collected by manual expression into sterile polypropylene Falcon Tubes on the 24 h after deliver. After collection, the maternal samples were transported on ice to the laboratory, centrifuged at $1300 \times g$ for 7 min to remove lipids components and stored at -80°C until use.

Concentration of immunoglobulin in the samples

Total levels of IgA, IgM and IgG were determined in capture ELISA assays as previously described (Nogueira et al. 2005).

Colostrum IgA reactivity against streptococcal antigens

Patterns of reactivity of salivary IgA antibody against *S. mutans* (UA159), *S. mitis* (ATCC506), *S. gordonii* (ATCC10558) and *S. sanguinis* (ATCC29667) Ags were determined in Western blot assays. Sixteen micrograms of antigen extracts prepared as previously described (Nogueira et al. 2005) were loaded per lane, separated by sodium dodecyl sulfate – 6% polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to nitrocellulose membranes. After being stained with Red Ponceau (Sigma), membranes were washed and blocked overnight at 4°C (in Tris-buffered saline – Tween, pH 7.5, 5% nonfat milk). Incubations with samples diluted 1:1000 were performed at

Fig. 1. Mean concentration of IgA, IgM and IgG in samples of colostrum.

room temperature for 2 h. As negative controls, membranes were incubated only with blocking buffer, and as positive controls; membranes were incubated with a standard saliva sample obtained from an adult whose pattern of reaction with antigen extracts had been previously measured. The secondary antibody was goat IgG anti-human IgA conjugated with horseradish peroxidase (1:4000 dilutions). Antibody reactions were developed using an ECL system (Amersham Biosciences). For this purpose, immunoblots were incubated with ECL detection solution and then exposed to the same X-ray film for 5 min. The developed X-ray films were scanned in a scanning densitometer (Bio-Rad GS-700 Imaging Densitometer) to analyze patterns of antigen recognition, including the number of reactive bands. A film blank value was subtracted from the value of the reactive band.

Statistical analysis

Associations between concentrations of IgA, IgM and patterns of antibody reactions were tested by Pearson correlation analysis. Comparisons of the frequencies of children with distinct IgA antibody specificities were tested by a chi-square test. The mean number of IgA-reactive bands in Ags extracts was also determined and compared between antigens and tested by ANOVA. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Levels of immunoglobulins in breast milk

The results showed a variation in the levels of immunoglobulins in samples of breast milk (Fig. 1). There were differences statistically significant between immunoglobulins analyzed ($p < 0.05$). The mean concentration of IgA, IgM and IgG were respectively 2850.2 (SD: 2567.2), 321.8 (SD: 88.3) and 88.3 (SD: 51.5) mg/100 mL.

Fig. 3. Patterns of IgA specificities against antigens from *S. mutans* (SM), *S. mitis* (SMI), *S. sanguinis* (SSA) and *S. gordonii* (SGO) in four mothers. Standard molecular sizes (kDa) are indicated in left the immunoblots.

The concentration of IgA is significantly higher than others immunoglobulins ($p < 0.05$). Correlation analysis showed that there was a positive correlation between the levels of IgM and IgG (Pearson, $p < 0.01$, $r = 0.58$), but not between IgA and IgG (Pearson, $p = 0.97$, $r = -0.005$) and IgA and IgM (Pearson, $p = 0.80$, $r = -0.03$).

No associations were found between immunoglobulin levels and racial, maternal age, oral health, type of birth and socio-economical data (Pearson, $p > 0.05$). There were also no differences statistically significant between the immunoglobulin levels and types of delivery: cesarean or vaginal ($p > 0.05$).

Positive IgA response to bacterial and to theirs virulence antigens

The number of children with positive response of IgA to SM, SMI, SSA and SGO was shown in the Fig. 2. Examples of Western blot of 4 samples of mothers are illustrated in the Fig. 3. Results showed that 62.3 ($n = 46$), 59.7 ($n = 48$), 55.8 ($n = 42$) and 54.5 ($n = 43$) % of the samples of colostrum had detectable levels of IgA antibodies to extracts of SMI, SM, SGO and SSA respectively (Table 1, Fig. 3). But, there were no differences statistically significant between those antigens (Qui-square, $p > 0.41$, $q > 0.2$). There were positive correlations between frequencies of positive response to all antigens (Pearson, $p < 0.001$, $r > 0.60$).

Analysis of frequency of specific response to antigens of virulence: 153 kDa of SGO, 170 kDa of SSA, 202 kDa of SMI and 185, 160, 56 kDa of SM were shown in the Table 1. The majority of samples had a positive response to antigens of virulence. To SM, the

GbpB was significantly lower detected than others antigens of SM ($p < 0.05$). There was a difference statistically significant in positive frequency of response to 202 kDa Ag of SMI and GbpB of SM ($p < 0.05$). There was positive correlation between frequency of positive response between all extract and theirs specifics antigens of virulence (Pearson, $p < 0.05$, $r > 0.68$).

Complexity of response to Ags and theirs virulence's antigens

High complexities of response to Ags (defined by the number of IgA-reactive bands) were identified in the samples. Fig. 4 shows the number of IgA-reactive bands of the samples with positive response to SSA, SMI, SGO and SM. The number of IgA-reactive bands, in the samples with positive response, observed for extracts of SM, varied from 1 to 32 (mean: 8.4 ± 5.9), for SMI ranged from 1 to 22 (mean: 8.6 ± 5.0), for SGO ranged from 1 to 28 (mean: 8.4 ± 6.4), for SSA ranged from 1 to 25 (mean: 8.7 ± 6.7). There were no significant differences in the mean number of IgA-reactive Ags between the antigens ($p > 0.4$). The degree of complexity of response to antigens was associated only between SM and SGO ($p < 0.05$, $r = 0.32$) and SSA and SGO ($p < 0.05$, $r = 0.44$).

Discussion

Breast milk provides essential nutrients and important components of immune protection in early life. This biofluid is a source of antibodies, represented mainly by IgA, in its dimeric

Fig. 2. Number of samples with positive and negative response to bacteria extracts.

Table 1
Number of samples with reactive of IgA positive and negative to bacteria antigens of *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *S. sanguinis* and theirs virulence antigens.

Bacteria antigens	Number of children with positive response	
	Positive (%)	Negative (%)
<i>Streptococcus mutans</i>		
Ag I/III	42 (91.3)	4 (8.7)
Ctf	42 (91.3)	4 (8.7)
GbpB	33 (71.7)	13 (28.3)
<i>Streptococcus mitis</i>		
Ag 202 kDa	48 (100.0)	0 (0.0)
<i>Streptococcus gordonii</i>		
Ag of 153 kDa	40 (93.0)	3 (7.0)
<i>Streptococcus sanguinis</i>		
Ag of 170 kDa	36 (85.7)	6 (14.3)

Fig. 4. Mean number of reactive bands of IgA to antigens of *Streptococcus mutans* (SM), *S. mitis* (SMI), *S. gordonii* (SGO), *S. sanguinis* (SSA) in samples of colostrum.

form (Pribylova et al. 2012; Striker et al. 2004). The present study the results showed that mean concentration of IgA found 2850 mg/100 mL that was consistent with literature data, that ranging from 1340 mg/100 mL (Ovono Abessolo et al. 2011) to 3200 mg/100 mL (Mickleson and Moriarty 1982). Also, the levels of IgM and IgG, respectively 321.8 (± 90.3) and 88.3 (± 51.5) also near the concentrations previously described in the literature, 113 mg/100 mL (Mickleson and Moriarty 1982) for IgM and 53 mg/100 mL (Mickleson and Moriarty 1982) for IgG.

The oral cavity is the gateway of numerous microorganisms pathogenic or not from the environmental exposition and contact with people. So, the recognizing of immune components, available into the oral cavity, is the crucial importance to eliminate total or partially this microbial challenge. The human oral colonization begins to form in the first hours of life through contact with people and environment. Thus, there were pioneer species such as *S. mitis*, *S. sanguinis* and *S. gordonii* represent the majority of bacteria that initially colonize the oral cavity (Seow et al. 2009) and after tooth eruption or in population highly exposed, *S. mutans* (Alves et al. 2009) starts to be detected. However, the influence of these colostrum antibodies in the establishment of the oral microbiota is unknown. The presence and complexity of IgA response against those streptococcal species can elucidate the function of passive immune protection offered by mother to newborn against the invasion and colonization of these species in the oral cavity.

The present results corroborate with previous studies that detected the presence of reactive bands against antigens of SM (Aldred et al. 1986; Camling and Köhler 1987) and SMI (Aldred et al. 1986). So, these data allow suggesting there were a great immunological significance of breastfeeding in the control of oral microorganisms because the samples presented detectable levels of IgA specific to streptococcal antigens and against their virulence antigens. So, the hypothesis that breast milk could contribute to an initial protection of the newborn against oral colonization in early life can be true.

There were no major differences between the frequencies of detection of reactive IgA response against the antigens. But, there were a little difference in the percentage of samples with positive response to SM and SMI, that was more detected than against initial colonizers, SSA and SGO, which was expected, since these last microorganisms are most frequently found in young children than adults.

The identification of detected bands can often assist in the investigation of the mechanisms of antigenic stimulation of these pioneer species in the mucosal immune response. The results

showed that the majority of samples presented IgA response to the antigens of virulence (202 kDa of SMI, 170 kDa de SSA, 153 kDa de SGO and 185, 160, 56 kDa of SM) from species tested. There was little information in the literature about the colostrum response to those antigens. The IgA against the 202 kDa Ag of SMI was found in all samples of colostrum, which also can be detected by Reinholdt and Kilian (1995). In salivas, this antigen was detected in children with 6 months of age (Nogueira et al., 2007; Nogueira et al. 2007, 2012; Wirth et al. 2008). Immunoglobulin A antibody levels to Gtf from SSA were detected only in salivas of some children with 3–5 months of age (Gahnberg et al. 1985).

The majority of samples tested presented IgA reactive to SM and their antigens of virulence as described in previous studies in colostrum of human and chimpanzees' pregnancy (Gregory and Filler 1987; Tyler and Coler 1999). There was difference between IgA responses to SM antigens of virulence. The AgI/II and Gtf was found in more than 90% of samples, while approximately 72% of samples responded to GbpB, showing a significant lower response than for others antigens. Interestingly previous evidence suggests that early formation of salivary IgA antibody to GbpB may delay colonization of young children who are being heavily challenged with this cariogenic streptococcus (Nogueira et al. 2005).

Few studies focused in the influence of SIgA antibodies from breast milk on the initial colonization of initial oral species in edentulous in the first three months of life. Reinforcing the importance of understanding their role before the eruption of the teeth. In humans, there is much controversy about the protective role of human milk against caries because the milk contains other components, such as sugars, that can contribute to development of disease (Ribeiro and Ribeiro 2004). Research suggests that breastfeeding, especially prolonged lactation, may be correlated with the fidelity of transmission of SM that extended breastfeeding may contribute to higher rates of caries (Li et al., 2000).

Despite this, taken together, the results show that colostrum had a variety of antibody specificities to antigens of virulence, especially against two proteins, which are central to the accumulation of SM in the oral biofilm. So, the significant variability regarding the immune against oral microorganisms present in milk, which can contribute to modulate the colonization of oral streptococci information.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), proc. 479708/2010-0 and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), proc. 2848/2010.

References

- Aldred, M.J., Wade, W.G., Llewelyn, D.R., Walker, D.M., 1986. Class-specific antibodies to *Streptococcus mutans* in human serum, saliva and breast milk. *J. Immunol. Methods* 87, 103–108.
- Alves, A.C., Nogueira, R.D., Stipp, R.N., Pampolini, F., Moraes, A.B., Gonçalves, R.B., Höfling, J.F., Li, Y., Mattos-Graner, R.O., 2009. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *J. Med. Microbiol.* 58, 476–481.
- Camling, E., Köhler, B., 1987. Infection with the bacterium *Streptococcus mutans* and salivary IgA antibodies in mothers and their children. *Arch. Oral. Biol.* 32, 817–823.
- Clapp, D.W., 2006. Developmental regulation of the immune system. *Semin. Perinatol.* 30, 69–72.
- Gahnberg, L., Smith, D.J., Taubman, M.A., Ebersole, J.L., 1985. Salivary-IgA antibody to glucosyltransferase of oral microbial origin in children. *Arch. Oral. Biol.* 30, 551–556.

- Gregory, R.L., Filler, S.J., 1987. Protective secretory immunoglobulin A antibodies in humans following oral immunization with *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 55, 2409–2415.
- Hanson, L.A., 1998. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 81, 523–533.
- Hayani, K.C., Guerrero, M.L., Morrow, A.L., Gomez, H.F., Winsor, D.K., Ruiz-Palacios, G.M., Cleary, T.G., 1992. Concentration of milk secretory immunoglobulin A against *Shigella* virulence plasmid-associated antigens as a predictor of symptom status in *Shigella*-infected breast-fed infants. *J. Pediatr.* 121, 852–856.
- Kanwar, J.R., Kanwar, R.K., Sun, X., Punj, V., Matta, H., Morley, S.M., Parratt, A., Puri, M., Sehgal, R., 2010. Molecular and biotechnological advances in milk proteins in relation to human health. *Curr. Protein. Pept. Sci.* 10, 308–338.
- Lee, S.F., Progulski-Fox, A., Bleiweis, A.S., 1988. Molecular cloning and expression of a *Streptococcus mutans* major surface protein antigen. P1 (I/II), in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 56, 2114–2119.
- Le Huérou-Luron, I., Blat, S., Boudry, G., 2010. Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr. Res. Rev.* 23, 23–36.
- Li, Y., Wang, W., Caufield, P.W., 2000. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. *Caries Res.* 34, 123–132.
- Long, K., Vasquez-Garibay, E., Mathewson, J., De La Cabada, J., Dupont, H., 1999. The impact of infant feeding patterns on infection and diarrheal disease due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Salud. Publica Mex.* 41, 263–270.
- Mickleson, K.N., Moriarty, K.M., 1982. Immunoglobulin levels in human colostrum and milk. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1, 381–384.
- Nogueira, R.D., Alves, A.C., King, W.F., Goncalves, R.B., Höfling, J.F., Smith, D.J., Mattos-Graner, R.O., 2007. Age-specific salivary immunoglobulin A response to *Streptococcus mutans* GbpB. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 804–807.
- Nogueira, R.D., Sesso, M.L., Borges, M.C., Mattos-Graner, R.O., Smith, D.J., Ferriani, V.P., 2012. Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children. *Arch. Oral. Biol.* 57, 647–653.
- Nogueira, R.D., Alves, A.C., Napimoga, M.H., Smith, D.J., Mattos-Graner, R.O., 2005. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect. Immun.* 73, 5675–5684.
- Ovono Abessolo, F., Essomo Owono Megne-Mbo, M., Ategbro, S., N'negue, M.A., Lendoye, E., 2011. Profile of immunoglobulins A, G, and M during breast milk maturation in a tropical area (Gabon). *Sante* 21, 15–19.
- Poulsen, K., Reinholdt, J., Jespersgaard, C., Boye, K., Brown, T.A., Hauge, M., Kilian, M.A., 1998. Comprehensive genetic study of streptococcal immunoglobulin A1 proteases: evidence for recombination within and between species. *Infect. Immun.* 66, 181–190.
- Pribylova, J., Krausova, K., Kocourkova, I., et al., 2012. Colostrum of healthy mothers contains broad spectrum of secretory IgA autoantibodies. *J. Clin. Immunol.* 32, 1372–1380.
- Reinholdt, J., Kilian, M., 1995. Titration of inhibiting antibodies to bacterial IgA1 proteases in human sera and secretions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 371A, 605–608.
- Ribeiro, N.M., Ribeiro, M.A., 2004. Breastfeeding and early childhood caries: a critical review. *J. Pediatr.* 80, 199–210.
- Ruiz-Palacios, G.M., Calva, J.J., Pickering, L.K., Lopez-Vidal, Y., Volkow, P., Pezzarossi, H., West, M.S., 1990. Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk. *J. Pediatr.* 116, 707–713.
- Seow, W.K., Lam, J.H., Tsang, A.K., Holcombe, T., Bird, P.S., 2009. Oral *Streptococcus* species in pre-term and full-term children – a longitudinal study. *Int. J. Paediatr. Dent.* 19, 406–411.
- Smith, D.J., Taubman, M.A., 1996. Experimental immunization of rats with a *Streptococcus mutans* 59-kilodalton glucan-binding protein protects against dental caries. *Infect. Immun.* 64, 3069–3073.
- Striker, G.A., Casanova, L.D., Nagao, A.T., 2004. Influence of type of delivery on A, G and M immunoglobulin concentration in maternal colostrum. *J. Pediatr. (Rio J)* 80, 123–128.
- Sussman, J.L., Baron, E.J., Tenenbaum, M.J., Kaplan, M.H., Greenspan, J., Facklam, R.R., Tyburski, M.B., Goldman, M.A., Kanzer, B.F., Pizzarello, R.A., 1986. Viridans streptococcal endocarditis: clinical microbiological, and echocardiographic correlations. *J. Infect. Dis.* 154, 597–603.
- Tyler, B.M., Coler, M.F., 1999. Characterization of the mucosal immune response in breast milk after peroral immunization of chimpanzees (*Pan troglodytes*) with *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral. Biol.* 44, 871–883.
- Vacca-Smith, A.M., Jones, C.A., Levine, M.J., Stinson, M.W., 1994. Glucosyltransferase mediates adhesion of *Streptococcus gordonii* to human endothelial cells in vitro. *Infect. Immun.* 62, 2187–2194.
- Vacca-Smith, A.M., Ng-Evans, L., Wunder, D., Bowen, W.H., 2000. Studies concerning the glucosyltransferase of *Streptococcus sanguis*. *Caries Res.* 34, 295–302.
- Van de Perre, P., 2003. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine* 21, 3374–3376.
- Walker, A., 2010. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J. Pediatr.* 156, 3–7.
- Walterspiel, J.N., Morrow, A.L., Guerrero, M.L., Ruiz-Palacios, G.M., Pickering, L.K., 1994. Secretory anti-Giardia lamblia antibodies in human milk: protective effect against diarrhea. *Pediatrics* 93, 28–31.
- Wirth, K.A., Bowden, G.H., Kirchherr, J.L., Richmond, D.A., Sheridan, M.J., Cole, M.F., 2008. Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: evidence that *Streptococcus mitis* biovar 1 colonization induces strain-specific salivary immunoglobulin A antibodies. *ISME J.* 2, 728–738.
- Yamashita, Y., Bowen, W.H., Burne, R.A., Kuramitsu, H.K., 1993. Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect. Immun.* 61, 3811–3817.