UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Transferência de anticorpos reativos com intiminas α , β , γ de
Escherichia coli pela placenta e aleitamento materno:
Determinação quantitativa em soros de recém-nascidos e
soros e colostros de suas mães**

Silvia Patricia Nuñez Vaca

**Dissertação para obtenção
do grau de Mestre**

Orientador

Profa. Dra. Solange Barros Carbonare

SÃO PAULO

2010

Silvia Patricia Nuñez Vaca

Transferência de anticorpos reativos com intiminas α , β , γ de
Escherichia coli pela placenta e aleitamento materno:
Determinação quantitativa em soros de recém-nascidos e
soros e colostros de suas mães

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Solange Barros Carbonare
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*A meus amados filhos
Bruno e Diego
que com amor incondicional
apóiam e incentivam
todos os meus desafios.*

*A minha querida mãe,
meu exemplo de determinação,
que sempre acreditou e estimulou
meu desenvolvimento.*

*A Dra. Solange Barros Carbonare
minha orientadora e amiga,
pela paciência, dedicação e carinho.
Que sempre me deu apoio
e acreditou em nosso trabalho.*

Agradecimentos

A Milene Tino de Franco, pela amizade, orientação e revisão do nosso trabalho.

A Lucy Zapata, minha grande amiga, pela força, incentivo e desprendimento na realização do trabalho.

A Cristiane Carbonare, pela colaboração, e orientação no início da pesquisa.

A Priscila pela ajuda na obtenção das intiminas.

A Thalita, Simone, Amanda e Fernanda pela amizade e ajuda no laboratório.

A Tânia, Marinalva e Neusa, pela ajuda com os materiais do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan.

Ao laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan que gentilmente cederam às bactérias recombinantes.

A Rosana Prisco do Serviço de Estatística do ICB da USP pela análise estatística dos resultados.

Ao Dr. Ricardo Antonio Pereira e Márcia Bernardino Polite pelo apoio e colaboração.

Ao Dr. Jose Mauro Kutner e Dra. Andreza Feitosa Ribeiro pela revisão da documentação apresentada ao Comitê de Ética do HIAE e pelo apoio na pesquisa.

A minhas colegas de trabalho do laboratório de sorologia: Lourdes, Simone, Syomara, Yoneko e Kátia pela colaboração ao separar as amostras de soro das mães e apoio durante este trabalho.

As minhas colegas do laboratório de criopreservação: Deise, Isabel e Kelen pela colaboração ao separar e disponibilizar as amostras de soro de cordão.

As equipes da Maternidade e do Banco de Leite do HIAE pela ajuda na coleta das amostras de colostro.

A minha família e amigos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Intimina é uma adesina de natureza protéica das bactérias diarreio gênicas *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e enterohemorrágica (EHEC), capazes de induzir a lesão “attaching e effacing” em enterócitos. Os principais subtipos de intiminas de EPEC e EHEC prevalentes no Brasil são α , β e γ . Nosso objetivo foi investigar a transferência de anticorpos maternos anti-intiminas aos recém-nascidos de mães saudáveis de São Paulo, Brasil. Foram pesquisados anticorpos SIgA no colostro e IgG no soro de 50 mulheres saudáveis e no soro de cordão umbilical de seus recém-nascidos, por ELISA utilizando como antígeno proteínas recombinantes purificadas das regiões conservadas e variáveis de intiminas α , β e γ . As concentrações de anticorpos no colostro foram superiores quando comparadas com as concentrações do soro para todos os tipos de intiminas. Não se observaram diferenças estatísticas entre as concentrações de anticorpos reativos com as diferentes intiminas nas amostras de colostro. As concentrações de anticorpos reativos com a região conservada da intimina foram significativamente mais elevadas em comparação com as regiões variáveis no soro dos grupos de mães e de recém-nascidos. Houve alta correlação entre todos os anticorpos anti-intiminas nas amostras de colostro. Comparando-se as concentrações de anticorpos séricos, os coeficientes foram maiores entre anti- α e anti- β que entre os outros pares. Nossos resultados confirmam a transferência de anticorpos maternos para o recém-nascido pela placenta e pelo aleitamento materno e reforça o efeito protetor da amamentação contra infecção por EPEC.

**Transference of antibodies reactive with intimins α , β and γ of
Escherichia coli by placenta and breastfeeding:**

**Quantitative determination in the sera of newborns and the
colostrum and sera of their mothers**

ABSTRACT

Intimin is a proteic adhesin of enteropathogenic (EPEC) and enterohemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli*, capable of inducing attachment and effacement lesion in enterocytes. The main subtypes of intimins of EPEC and EHEC prevalent in Brazil are α , β and γ . Our aim is to investigate the transference of maternal anti-intimin antibodies to the newborns of healthy mothers from Sao Paulo, Brazil. IgG and SIgA antibodies were determined in sera and colostrum from 50 healthy women and cord sera from their newborns, by ELISA using as antigens purified recombinant proteins, conserved and variable regions of α , β and γ intimins. The IgA antibody concentrations of colostrum are higher than IgG antibodies in serum for all intimins and there were no statistical differences between them in colostrum samples. The concentrations of antibodies reactive with the conserved region of intimin are significantly higher compared to the variable regions in the sera groups, mothers and newborns. There were high correlation coefficients between all the anti-intimins antibodies in colostrum samples. In the comparison of the seric antibody concentrations, the coefficients were higher between anti- α and anti- β than all the other pairs. Our results confirm the transference of maternal antibodies to the newborns by placenta and breastfeeding and reinforce the high protection effect of breastfeeding against EPEC infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	19
Figura 2.....	20
Figura 3.....	22
Figura 4.....	25
Figura 5.....	28
Figura 6.....	29
Figura 7.....	45
Figura 8.....	45
Figura 9.....	46
Figura 10.....	46
Figura 11.....	57
Figura 12.....	57
Figura 13.....	58
Figura 14.....	58
Figura 15.....	59
Figura 16.....	59
Figura 17.....	60
Figura 18.....	60
Figura 19.....	63
Figura 20.....	64
Figura 21.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	14
Tabela 2.....	15
Tabela 3.....	47
Tabela 4.....	48
Tabela 5.....	49
Tabela 6.....	50
Tabela 7.....	51
Tabela 8.....	53
Tabela 9.....	54
Tabela 10.....	56
Tabela 11.....	62
Tabela 12.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

aa: aminoácido
A/E: lesão “Attaching and Effacing”
a-EPEC: EPEC atípica
BALT: tecido linfóide associado aos brônquios
BCA: “Bicinchoninic Acid”
BFP: “bundle-forming pillus”
cesT: “Tir specific chaperone”
cons: intimina conservada
DAEC: *Escherichia coli* difusamente aderente
DO: Densidade óptica
DP: Desvio padrão
dae: “*E. coli* attaching and effacing”, gene que codifica a intimina
EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa
EAF: plasmídeo de virulência que codifica o BFP
EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasora
ELISA: “enzyme linked immunosorbent assay”, Ensaio imunoenzimático
EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica
esc: “*E. coli* secretion”
esp: “EPEC secreted proteins”, gene que codifica as proteínas secretadas de EPEC
EspA: Proteína secretada do tipo A
EspB: Proteína secretada do tipo B
EspD: Proteína secretada do tipo D
EspF: Proteína secretada do tipo F
EspG: Proteína secretada do tipo G
EspH: Proteína secretada do tipo H
ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica
FcRn: receptor específico para fração Fc de IgG
GALT: tecido linfóide associado ao intestino
HeLa: células de câncer cervical
HEp-2: Célula de cultura proveniente de carcinoma de laringe
HIAE: Hospital Israelita Albert Einstein
Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b
HIV: Vírus da imunodeficiência humana
HTLV I/II: Vírus t-linfotrópico humano I/II
HU: Hospital Universitário
IBD: Domínio de ligação da intimina
IgA: Imunoglobulina A
IgG: Imunoglobulina G
IgM: Imunoglobulina M
Int: Intimina
IPTG: isopropil- β -D-tiogalatopiranosídeo
kDa: Kilo Daltons
LEE: “locus of enterocyte effacement”
Ln: logaritmo natural
LPS: Lipopolissacarídeo
MALT: tecido linfóide associado a mucosa
Mad CAM 1: adressina
map: “mitochondrial associated protein”
NALT: tecido linfóide associado a tecido nasal
N-WASP: “neural Wiscott-Aldrich syndrome protein”

OPD: Orto-feniletileno diamina
PCR: reação de polimerase em cadeia
PBS: Solução salina tamponada com fosfatos
PEG: polietilenoglicol
per: “plasmid-encoded regulator”
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil
RN: recém-nascido
rpm: rotação por minuto
SCUP: sangue de cordão umbilical
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SlgA: IgA secretora
SLT: “Shiga like toxin”
STEC: *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga.
Stx: Shiga toxina
TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido
t-EPEC: EPEC típica
Tir: “translocated intimin receptor”, proteína secretada.
TTSS: “type three secretion system”
ug/ml: micrograma/mililitro
v α : Intimina variável α
v β : Intimina variável β
v γ : Intimina variável γ
WASP: “Wiscott-Aldrich syndrome protein”

SUMÁRIO

Introdução	13
1. Epidemiologia	13
2. <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC)	16
3. Patogênese da EPEC	19
4. Intimina	20
5. Sistema imunológico do feto	22
6. Imunidade passiva	23
7. Aleitamento materno	26
Objetivos	32
Metodologia	33
1. Casuística	33
2. Coleta de amostras	33
3. Obtenção de intiminas recombinantes	34
3.1 Expressão e purificação das intiminas	35
3.2 Análise das amostras de intiminas por SDS-PAGE	38
4. Teste ELISA para determinar a concentração de anticorpos IgG reativos com intiminas no pool e das amostras de soro	38
5. Teste ELISA para determinar a concentração de IgA total no pool de colostro	40
6. Teste ELISA pra determinar a concentração de anticorpos IgA reativo com intiminas nas amostras de colostro	41
7. Determinação de IgG sérica total nas amostras de soro	41
8. Cálculo de transferência de anticorpos e análise estatística	42
9. Análise estatística	42
Resultados	43
1. Característica da população estudada	43
2. Expressão e purificação das intiminas recombinantes	43
3. Concentração de proteínas	47
4. Determinação da concentração de anticorpos anti-intiminas nas amostras de soros e colostro	47
5. Determinação de IgG total	52
6. Análise estatística	54
6.1. Teste de correlação de Spearman	61
Discussão	66
Conclusões	75
Referências Bibliográficas	76
Anexos	85
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	
Características da amostragem (Mães e Recém-nascidos)	
Parecer do Comitê de Ética do instituto de Pesquisa do HIAE e FCF-USP	

INTRODUÇÃO

Epidemiologia

A diarreia é a principal causa de morte entre as crianças menores de cinco anos nas populações de baixa renda nos países em desenvolvimento. O impacto da doença diarreica faz-se notar de forma mais intensa nos períodos mais precoces da vida, em especial no primeiro ano, quando é levado em consideração o número de episódios de diarreia por ano e as taxas de admissão hospitalar (FAGUNDES-NETO & SCALETSKY, 2000).

Os dados de mortalidade em países em desenvolvimento ainda são elevados. Felizmente, o percentual de óbitos por doença diarreica aguda vem declinando progressivamente durante as últimas décadas em todas as regiões brasileiras (tabelas 1 e 2). No entanto, nas regiões Norte e Nordeste, mesmo tendo apresentado grande redução, os valores permanecem em patamares elevados. A redução observada indica possível melhoria das condições de vida e de saneamento, bem como da atenção básica à saúde da criança (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008)

Os agentes etiológicos das diarreias podem ser vírus, bactérias, protozoários ou fungos. Os agentes infecciosos bacterianos mais frequentes nos casos de diarreias são *Escherichia coli*, *Shigella spp*, *Salmonella spp*, *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolítica*. A prevalência desses patógenos pode variar de acordo com a classe socioeconômica, a localização geográfica, o tipo e o local da residência (urbana ou rural), a idade da população estudada e as estações do ano. Nas formas endêmicas de diarreia infantil, o patógeno bacteriano mais comumente associado é a *E. coli*, especialmente a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) (WHO, 2002). No entanto, o rotavírus também figura como um importante agente causador de diarreias infantis. Em alguns países latinoamericanos a infecção por EPEC supera a provocada por rotavírus na população infantil (VIDAL et al., 2007). Em São Paulo, um estudo feito em crianças até 3 anos atendidas na Santa Casa revelou que o rotavírus superou EPEC em número de casos atendidos (TOPOROVSKI, et al. 1999).

Escherichia coli, é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae. *E. coli* coloniza o trato gastrointestinal do recém-nascido nas primeiras 5 horas após o nascimento, onde coexistem de forma saudável com mútuo benefício por toda a vida. Do ponto de vista de suas relações com o homem,

podem-se distinguir dois grandes grupos. O primeiro grupo é chamado de *E. coli* comensal e habita o nosso intestino desde o nascimento até a morte, sendo componente da microbiota do intestino humano e de animais saudáveis. A *E. coli* comensal impede o crescimento de espécies bacterianas nocivas e sintetiza apreciável quantidade de vitaminas (K e do complexo B). Estas linhagens de *E. coli* comensais raramente causam doenças, exceto em hospedeiros imunocomprometidos e quando a barreira entérica é quebrada, por exemplo, em uma peritonite (KAPER et al., 2004)

O segundo grupo, denominado *E. coli* patogênica, pode causar diferentes tipos de infecções e é constituído por diferentes patótipos. Quando a bactéria patogênica alcança a mucosa intestinal, inicia um mecanismo de patogenicidade complexo que tem como resultado a produção de diarreia. As crianças com menos de 2 anos são a população infantil com maior susceptibilidade à infecção e dentre elas a maior prevalência observa-se em lactantes até seis meses.

Tabela 1. Mortalidade por doença diarréica aguda em menores de 5 anos de idade. Número de óbitos por doenças diarréicas por ano e região, no período de 1996 a 2006.

Ano	Região Norte	Região Nordeste	Região Sudeste	Região Sul	Região Centro-Oeste	Total
1996	564	2987	1653	496	348	6048
1997	530	2416	1117	369	294	4726
1998	612	3365	1063	432	278	5750
1999	452	2709	803	300	223	4487
2000	443	1912	726	290	226	3597
2001	414	1766	611	204	204	3199
2002	422	1775	492	177	204	3070
2003	385	1740	467	144	177	2913
2004	380	1416	399	149	184	2528
2005	464	1413	350	107	156	2490
2006	363	1291	348	91	143	2236

Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de informações sobre mortalidade (SIM). DATASUS, 2008.

Tabela 2. Mortalidade proporcional por doença diarreica aguda em menores de 5 anos de idade, no Brasil e grandes regiões, 1990, 1995, 2000 e 2004: nº de óbitos por diarreia/ nº total de óbitos em menores de 5 anos X100

Regiões	1990	1995	2000	2004
Brasil	10,8	8,3	4,5	4
Norte	19	9,2	5	4,9
Nordeste	12,6	13	6,7	6,2
Sudeste	8,2	5,4	2,6	1,9
Sul	9,5	5,8	3,2	2,1
Centro-Oeste	9,7	6,8	4,5	3,9

Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informações sobre mortalidade (SIM), DATASUS, 2008.

A *E. coli* comensal difere evolutivamente da *E. coli* patogênica e não apresenta em seu genoma os gens que codificam os fatores de virulência presentes nos diferentes patótipos (TRABULSI et al., 2002).

Os vários patótipos de *E. coli* são grupos clonais que se caracterizam por compartilharem antígenos O (lipopolissacarídeo, LPS) e H (flagelar) que definem os sorogrupos (apenas o antígeno O) ou sorotipos (antígenos O e H). Existem linhagens de *E. coli* que adquiriram atributos de virulência específicos, conferindo assim a habilidade de adaptar-se a novos nichos e tornando-se capaz de produzir um amplo espectro de doenças. De acordo com os fatores de virulência, estas bactérias podem afetar especificamente o trato intestinal causando diarreia ou outros sítios extra-intestinais, provocando uma infecção do trato urinário, sepse ou meningite (KAPER et al., 2004).

A detecção e caracterização destes fatores de virulência são essenciais para a identificação do patógeno intestinal assim como para o desenvolvimento de medidas preventivas de infecções por qualquer linhagem patogênica. Em geral os fatores de virulência são codificados por genes cromossomais presentes em ilhas de patogenicidade e/ou em plasmídeos presentes nas bactérias patogênicas (LEVINE, 1987; NATARO & KAPER, 1998).

A diversidade patogênica de *E. coli* chega a ser fantástica. A espécie compreende pelo menos seis categorias que causam infecções intestinais por diferentes mecanismos e várias outras associadas com infecções urinárias, meningite e provavelmente outras infecções extra-intestinais. As categorias que causam infecção intestinal são coletivamente chamadas de *E. coli* diarreio gênicas DEC

(*Diarroheagenic E. coli*) e as associadas a infecções extra-intestinais de EXPEC (*Extraintestinal Pathogenic E. coli*).

As DEC são divididas em seis grupos: EPEC (*E. coli* enteropatogênica); EHEC (*E. coli* enterohemorrágica); ETEC (*E. coli* enterotoxigênica); EAEC (*E. coli* enteroagregativa); EIEC (*E. coli* enteroinvasora); DAEC (*E. coli* que adere difusamente). A patogênese das infecções intestinais varia de um grupo para outro (TRABULSI et al., 2005).

***Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)**

EPEC foi o primeiro patótipo de *E. coli* a ser descrito. Os primeiros estudos epidemiológicos relacionando EPEC com diarreia humana foram publicados na Alemanha nas décadas de 1920 a 1930 e confirmadas de maneira definitiva na Inglaterra em 1945 (KAPER et al., 2004).

Atualmente, as EPEC estão entre as bactérias mais estudadas e conhecidas, e são consideradas as maiores causadoras de diarreia infantil em países em desenvolvimento (QUIROGA et al., 2000). Em países industrializados, a frequência desses organismos diminuiu, porém continua a ser um importante causador de diarreia na infância (KAPER et al., 2004).

As EPEC são altamente associadas com diarreia em crianças menores de um ano. Em crianças maiores que um ano a incidência é menor. Infecções em adultos são raras e geralmente associadas a outras condições. O aumento da resistência em crianças mais velhas e em adultos pode ser associado com o desenvolvimento da imunidade (CARBONARE et al. 2003) ou a perda de receptores para algumas adesinas específicas (TRABULSI et al., 2002).

As EPECs são divididas em típicas e atípicas. Entre as décadas de 1940 e 1960, as EPECs típicas eram frequentemente relacionadas a surtos de diarreia nos países desenvolvidos. Hoje são raramente isoladas, havendo prevalência de sorotipos de EPEC atípicas. Estudos epidemiológicos recentes têm demonstrado que o mesmo vem ocorrendo no Brasil, posicionando as EPECs atípicas como patógenos emergentes (TRABULSI et al., 2005).

As características comuns às duas categorias (típicas e atípicas) são a não produção de toxina Shiga (Stx) e ambas serem capazes de causar uma lesão histopatológica no epitélio do intestino denominada lesão A/E (attaching and

effacing). A principal diferença refere-se aos sorotipos e à presença do plasmídeo EAF (EPEC Adherence Factor) somente nas EPEC típicas. As amostras de EPEC típicas se caracterizam pelo padrão de adesão localizada que elas apresentam quando isoladas na presença de células epiteliais. Amostras atípicas apresentam adesão localizada, porém frouxa, em virtude da ausência da fímbria BFP (Bundle-forming pilus) (TRABULSI et al., 2002).

Os principais fatores de virulência das EPEC típicas incluem a fímbria BFP, proteína intimina, um aparelho de secreção de tipo III e várias proteínas secretadas.

O BFP é uma fímbria encontrada em praticamente todas as amostras recém-isoladas, é responsável pela agregação das bactérias, formando microcolônias (fenótipo conhecido como auto-agregação). A intimina é a proteína responsável pela ligação íntima da bactéria à célula hospedeira. O aparelho de secreção tipo III (TTSS) permite a secreção de proteínas pela bactéria para o interior da célula hospedeira (VIDAL et al., 2007).

As EPEC são capazes de formar uma lesão histopatológica no epitélio intestinal, denominada *attaching and effacing* (A/E). A lesão A/E se caracteriza pela adesão íntima da bactéria ao enterócito, o que promove a destruição das microvilosidades intestinais e o rearranjo de proteínas do citoesqueleto, levando à formação de estruturas em forma de pedestais no sítio de adesão da bactéria.

Os mecanismos de formação da lesão A/E têm sido bastante investigados e se mostraram cada vez mais complexos, principalmente devido ao grande número de proteínas envolvidas na formação do pedestal (KAPER et al. 2004).

Estas proteínas são codificadas por genes cromossômicos localizados em uma ilha de patogenicidade de 35kb, denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE), que apresenta cinco operons principais. Os operons LEE1, LEE2 e LEE3 contêm genes *esc* e *sep* que codificam componentes do sistema de secreção tipo III também denominado TTSS (type three secretion system), através do quais várias proteínas são secretadas para o interior da célula hospedeira. LEE4 codifica as proteínas secretadas Esp (*E. coli* secreted proteins), translocadoras (EspA, EspB e EspD) e efetoras (EspF, EspG e Map). O operon LEE5 contém os genes que intermedeiam a íntima ligação da bactéria à célula epitelial, que são os genes *eae* (*E. coli* Attaching and Effacing), que codifica a proteína intimina; o gene *tir*, que codifica o receptor de intimina Tir (translocater intimin receptor) e o gene *cest*, que codifica a chaperonina requerida para secreção do Tir (ELLIOT et al., 1999; GIRARD et al.,

2005; GOOSNEY et al., 2000; JARVIS et al., 1995; Mc DANIEL et al., 1995; Mc DANIEL & KAPER, 1997; ZAPATA, 2009).

A região LEE não está presente em linhagens comensais de *E. coli*, em ETEC, EAEC ou DAEC, mas é encontrada em vários outros patógenos capazes de formar lesão A/E, dentre os quais, EHEC, *Citrobacter rodentium*, amostras diarreio-genicas de *Hafnia alvei* e diversas amostras de *E. coli* associadas a diarreias e outras infecções entéricas, em coelhos, bezerras, porcos, coelhos e cachorros (ALBERT et al., 1992; NATARO & KAPER, 1998; TRABULSI et al., 2002)

Tanto as EPEC como EHEC dependem de plasmídeos que desempenham um papel importante na sua patogenicidade (TZIPORI et al., 1989). As EPEC típicas abrigam o plasmídeo EAF que codifica, entre outros fatores, a fímbria tipo IV denominada BFP (bundle-forming pilus) uma fímbria importante na adesão bacteriana. Além do operon da fímbria BFP, o plasmídeo EAF contém o locus *per* (plasmid-encoded regulator) cujos produtos regulam o *bfp* e a maioria dos genes do LEE. As cepas de EPEC que além de possuir o LEE contém o plasmídeo EAF são denominadas típicas, e aquelas que contêm o LEE e não contêm o plasmídeo EAF são denominadas atípicas (KAPER, 1996; TRABULSI et al., 2002). Na figura 1 há uma representação esquemática do material genético de EPEC e EHEC.

A fímbria BFP está envolvida na formação de microcolonias tridimensionais resultante da interação inter-bacteriana, no estágio inicial da adesão localizada, e atua na subsequente dispersão destas microcolonias (KNUTTON et al., 1999).

(CLARKE et al., 2003; ZAPATA, 2009). Outras proteínas do citoesqueleto como vinculina, cortactina, talina e α -actina são recrutadas para a formação do pedestal (SANGER et al., 1996; BACKERT & SELBACH, 2005). A Figura 2 representa a patogênese da EPEC.

Figura 2. Esquema da patogênese da EPEC. A. Formação do poro entre a bactéria e a célula epitelial do hospedeiro e translocação das Esps. B. Formação do pedestal (VALLANCE & FINLAY, 2000)

Assim, a diarreia causada por EPEC resulta na redução da capacidade de absorção da mucosa intestinal, a qual inevitavelmente leva ao rompimento do balanço eletrolítico e subsequente a diarreia (CLARKE et al., 2003; NOUGAYRÈDE et al., 2003).

Intimina

A intimina é uma proteína de 94kDa, codificada pelo gene *eae*, constituinte da membrana externa das EPEC e EHEC, responsável pela adesão íntima dessas bactérias às células epiteliais do intestino (JERSE et al., 1990; DONNENBERG et al., 1993). Ela é uma adesina muito bem caracterizada, constituída por 939 aminoácidos.

Apresenta duas regiões funcionais carboxi e amino terminais. A porção N-terminal inserida na membrana externa da bactéria (aa 330 a 659) é responsável por mediar a dimerização da intimina e é extremamente conservada entre diferentes amostras (TOUZE et al., 2004).

A porção C-terminal nos últimos 280 aminoácidos (Int280) é considerada variável, definindo os diferentes subtipos de intimina. Esta porção se estende para o meio externo para interagir com a célula hospedeira onde se encontra o sítio de ligação da intimina à célula do hospedeiro, o Tir (FRANKEL et al., 1994).

O papel fundamental da intimina na adesão a célula foi verificado num estudo *in vitro* que mostrou que a presença da intimina é essencial na formação de microcolônias compactas aderidas a células HeLa/HEp-2 como resultado da acumulação de actina característica da lesão A/E (HERNANDES et al., 2008).

Estudos realizados na década de 90 já observaram a presença de diferentes tipos de intiminas, o que foi utilizado para a classificação de EPEC e EHEC em “grupos clonais” (WHITTAN & Mc GRAW., 1996). Cepas de EPEC e EHEC humanas foram analisadas por PCR (“polymerase chain reaction”) o que permitiu a classificação de distintos tipos ou subtipos de intiminas que foram designados como α , β , γ , δ , ϵ (ADU-BOBIE et al., 1998; OSWALD et al., 2000).

Foram descritos muitos outros tipos de intiminas, sempre designados por letras gregas, de sorotipos de *E. coli* de diferentes origens, muitas delas não são freqüentes em amostras isoladas de fezes humanas em casos de diarréias. Em humanos, coelhos, porcos e cães os subtipos mais freqüentes de intiminas são α , β , γ , δ e ϵ (BLANCO et al., 2004; GARRIDO et al., 2006; JORES et al., 2003; OSWALD et al., 2000; TARR & WHITTAM, 2002; ZHANG et al., 2002).

De acordo com estudos realizados em cultura de órgãos, existem diferenças na adesão de bactéria à célula hospedeira dependendo do subtipo de intimina. Enquanto EPECs que expressam a intimina α ou β aderem ao intestino delgado, a EHEC O157:H7 que expressa a intimina γ adere na região terminal do íleo, onde a lesão A/E provocada se restringe ao epitélio associado ao folículo (FAE) (FITZHENRY et al., 2002; PHILLIPS & FRANKEL., 2000).

As EPEC típicas e atípicas apresentam diferenças com relação aos subtipos de intimina. Enquanto a maioria das amostras de EPEC típica apresenta os subtipos α ou β , exceto amostras do sorotipo O86:H84 que apresenta intimina δ , as EPEC

atípicas apresentam os subtipos α , β ou γ intimina. Amostras de EHEC geralmente apresentam intiminas β , γ e ϵ (TRABULSI et al., 2002).

Existe homologia de aproximadamente 80% entre as seqüências de aminoácidos das intiminas α , β , γ , δ e ϵ , considerando a molécula total de intimina, e de 90% quando são consideradas apenas as porções finais das regiões N-terminais da região conservada. Esses dados indicam pequena variação relativa entre as regiões Int280 destas intiminas. A figura 3 representa o complexo intimina-Tir onde cada molécula de intimina compõe-se de cinco domínios funcionais: um domínio N-terminal ancorado na membrana externa da bactéria, incluindo os aminoácidos inseridos na região periplasmática e transmembrânica, e quatro domínios extracelulares denominados D0 (559-657), D1 (658-751), D2 (752-841) e D3 (842-939) este último é o domínio da ligação da intimina com Tir (IBD: “intimin binding domain”) (LUO et al., 2000).

Figura 3. Complexo formado pelo fragmento C-terminal da intimina e o domínio de ligação com Tir. A intimina (verde) tem os domínios D0, D1 e D2 em retângulos e o domínio de ligação ao Tir em oval (D3). O Tir é um dímero (vermelho e azul) na membrana da célula hospedeira. O domínio N-terminal do Tir está ancorado aos componentes do citoesqueleto da célula do hospedeiro, como a actina, que são necessários para a formação da lesão A/E (LOU et al., 2000; ZAPATA., 2009).

Sistema Imunológico do feto

As células do sistema Imunológico humano são derivadas das precursoras do sistema hematopoiético, cuja fonte principal é o saco vitelino até a terceira semana de vida embrionária, seguido pelo fígado fetal com 8 semanas e finalmente, a medula

óssea após 5 meses de gestação. Durante a vida fetal, essas células sofrem o efeito de microambientes especializados tais como a medula óssea e o timo, respondendo aos sinais de estimulação, proliferando-se e diferenciando-se para dar origem ao sistema imunológico inato e específico (MUSSI-PINHATA & REGO, 2005).

Uma importante função do sistema imunológico é prover proteção ao hospedeiro contra invasão de microrganismos. A primeira linha de defesa contra invasores é a barreira física composta pela pele, membranas mucosas que revestem o trato respiratório e gastrointestinal e barreiras químicas representadas por uma variedade de enzimas e outras substâncias que tem ação microbicida direta ou inibem a aderência microbiana às superfícies orgânicas (MUSSI-PINHATA & REGO, 2005).

Qualquer invasor que ultrapasse essa primeira linha de defesa será combatido pelos componentes do sistema imunológico inato e, em seguida, pelo sistema imunológico específico. A imunidade inata e específica funcionam de forma conjunta. A imunidade inata não só faz a primeira defesa contra os micróbios como também desempenha importante papel na indução da resposta específica, e esta, por sua vez, aumenta os mecanismos protetores da imunidade inata (MUSSI-PINHATA & REGO, 2005).

Imunidade Passiva

Os recém-nascidos possuem outro componente da imunidade que age enquanto a maturação de seu próprio sistema está se processando que é a imunidade passivamente adquirida da mãe, por meio da transferência placentária dos anticorpos da classe IgG, dos fatores de proteção presentes no líquido amniótico e, após o nascimento, no colostro e leite humanos. Os anticorpos e outros fatores presentes no leite materno conferem proteção imunológica à criança enquanto seu sistema de defesa amadurece. O recém-nascido dependerá neste período de vida de anticorpos maternos provenientes da passagem transplacentária e daqueles presentes no colostro e leite maternos (MORAES-PINTO et al., 2001)

A imunidade passiva adquirida pelo feto por via transplacentária é fundamental para a adaptação do neonato no meio ambiente extra-uterino. A passagem transplacentária de imunoglobulinas maternas para o feto é uma adaptação específica que ameniza, em parte, as deficiências na produção de anticorpos. Este fenômeno é restrito à IgG, pois das cinco classes de imunoglobulinas, a IgG é a única classe de anticorpos transferidos ativamente pela

mãe (KANE & ACQUAH, 2009). Este transporte é realizado pelo receptor neonatal FcRn, (receptor específico para a fração Fc de IgG) presente no sinciciotrofoblasto e nas células de Hofbauer da placenta. (ROOPENIAN & AKILESH, 2007).

O sinciciotrofoblasto da placenta é o local de troca de nutrientes entre circulação materna e fetal. A transferência eficiente de nutrientes e solutos é essencial para a formação e desenvolvimento normal do feto (KANE & ACQUAH, 2008). O transporte de IgG através da placenta é um processo ativo, seletivo e intracelular, mediado especificamente pelo receptor FcRn.. Em roedores e humanos, a IgG materna se liga pela fração Fc ao receptor FcRn em meio ácido, atravessando a célula epitelial e é liberado num pH fisiológico (ENGLUND, 2007).

Em roedores o FcRn é expresso na superfície dos enterócitos. Logo após o nascimento os roedores ingerem leite materno contendo IgG, a qual se liga ao FcRn em meio ácido do duodeno. Após a ligação, o complexo sofre endocitose e é transportado através do enterócito para liberar o IgG na circulação em pH neutro.

Ao contrario dos roedores, em humanos a IgG materna é transferida durante a gestação através do sinciciotrofoblasto da placenta, que é irrigado pelo sangue materno e a IgG materna é internalizada no endosomo. O FcRn é expresso em vesículas internas do sinciciotrofoblasto e quando o endosomo é acidificado, o FcRn se liga ao IgG materno e ocorre a transição para a circulação fetal onde é liberado em pH fisiológico (Figura 4) (ROOPENIAN & AKILSH, 2007).

Figura 4. Transferência de IgG perinatal mediada por FcRn. :O IgG materno se liga ao receptor neonatal para IgG (FcRn) em meio ácido, atravessa a barreira epitelial por transcitose e é liberado em pH fisiológico. **a** Em roedores, o FcRn é expresso na superfície dos bordos em escova dos enterócitos e o IgG contido no leite materno é internalizado e depois liberado após atravessar o epitélio. **b** Nos humanos, a transferência do IgG materno ocorre no período intrauterino. O IgG materno se liga ao FcRn das células do sincitiotrofoblasto da placenta, é transportado por transcitose nos endossomos acidificados e liberado na circulação fetal em pH fisiológico. (ROOPENIAN & AKILSH.,2007).

A presença de receptores FcRn tem sido demonstrada na placenta humana já nas primeiras 12 semanas de idade gestacional (ENGLUND, 2007). O transporte ativo da IgG pela placenta inicia-se precocemente e aumenta proporcionalmente até o termo gestacional, tendo sido demonstrado que a idade gestacional influencia os níveis de IgG total do cordão umbilical, havendo uma correlação linear entre esses parâmetros. Em torno de 32 semanas de idade gestacional os níveis de anticorpos detectáveis no RN são aproximadamente 400mg/dl, podendo atingir valores superiores a 1.000mg/dl no recém-nascido a termo, sendo às vezes superiores aos níveis maternos (FUJIMURA.,1991).

As quatro subclasses de IgG humanas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) atravessam a placenta. O feto recebe os anticorpos contra antígenos para os quais a mãe foi exposta por meio de colonização, infecção ou vacinação. À medida que o neonato se desenvolve, esses anticorpos são gradualmente substituídos pelos anticorpos produzidos por ele próprio contra antígenos naturais e vacinais (MORAES-PINTO et

al. 2001). Se a mãe possuir pequenas concentrações de anticorpos ou se os anticorpos protetores forem do isotipo IgM, direcionados contra patógenos bacterianos gram-negativos, tais como *E.coli* e *Salmonella SP*, o feto não os recebe, pois a IgM não atravessa a placenta. Os níveis séricos de IgM no RN encontram-se ao redor de 10mg/dl (MORAES-PINTO et al., 2001).

A transferência placentária é mais eficiente para IgG1 e IgG3 e menos eficiente para IgG2. Dessa maneira, há transferência facilitada de anticorpos contra proteínas virais, de subclasse IgG1 (poliovirus). Entretanto, os anticorpos contra bactérias capsuladas (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*), em que há predomínio de IgG2, são transferidos menos eficientemente (ENGLUND., 2007).

Outros estudos relatam que o transporte de IgG ocorre em ordem decrescente para as subclasses IgG1, IgG4, IgG3 e IgG2 (KANE & ACQUAH., 2008).

Os anticorpos adquiridos passivamente da mãe contribuem para diminuir o risco de infecção do RN. Em paralelo ao declínio natural de IgG materno no soro do bebê devido a meia vida das imunoglobulinas (aproximadamente 30 dias) o bebê inicia ativamente a produção de anticorpos IgG contra antígenos a ele expostos. Níveis séricos de IgG em lactantes atingem cerca de 60% dos níveis de adultos até 1 ano de idade, mas a resposta completa de anticorpos para uma gama de antígenos igual a de um adulto não é alcançada até 4 a 5 anos de idade (LAWRENCE & PANE., 2007).

Outras adaptações fundamentais para a defesa passiva do RN são o leite humano e a colonização por microbiota intestinal obtida da mãe (MUSSI-PINHATA & REGO., 2005).

Aleitamento Materno

O aleitamento materno constitui a melhor forma de alimentar o RN, tendo em vista suas propriedades nutricionais, imunológicas e de baixo custo. O leite materno possui componentes protéicos, lipídicos, minerais e vitamínicos em quantidade e qualidade adequadas para o RN/lactante humano. Entre as propriedades imunológicas, o leite humano possui anticorpos, células fagocíticas, lisozimas, lactoferrinas, lipases ativadas e outros, fazendo com que crianças amamentadas ao seio padeçam menos de doenças infecto-contagiosas que constituem uma das

principais causas de morbi/mortalidade infantil nos países em desenvolvimento (LAWRENCE & PANE, 2007).

A Organização Mundial da Saúde, em 1984, publicou o resultado de um estudo multicêntrico realizado em 14 países onde a incidência de diarreia antes dos 6 meses de idade foi 4 a 5 vezes menor nas crianças em aleitamento exclusivo comparada com a de crianças não-amamentadas (CARBONARE et al., 2008).

A porta de entrada da maioria das infecções no ser humano é representada pelas superfícies mucosas, principalmente dos tratores gastrointestinal e respiratório. As superfícies mucosas contam com um sistema de proteção anti-infecciosa muito eficiente onde atuam mecanismos inespecíficos como movimento peristáltico, transporte mucociliar e enzimas, além de mecanismos adaptativos representados principalmente pelo sistema imune de mucosas (MALT, *Mucosal associated lymphoid tissue*). Esse sistema constitui-se de células imunocompetentes que infiltram as mucosas, nódulos linfóides que formam as estruturas de placas de Peyer na mucosa intestinal e seus equivalentes na mucosa brônquica, além de linfonodos regionais, tais como os mesentéricos. O MALT é povoado por células de diversas populações, com as mais variadas funções, inclusive a de produzir anticorpos secretores, com predominância absoluta de IgA secretória (SIgA), que, atravessando o epitélio, vai se incorporar ao muco que recobre todas as superfícies mucosas do organismo. Em cada sítio de mucosa, o tecido linfóide toma formas e nomenclaturas características como nos brônquios (BALT), tecido nasal (NALT) e no intestino (GALT). (CARBONARE et al., 2008).

O leite humano apresenta anticorpos dirigidos a inúmeros microrganismos com os quais a mãe entrou em contato durante toda a sua vida, representando, de certa forma, uma “memória” do seu repertório imunológico. A maior parte destes microrganismos entrou em contato com as superfícies mucosas do aparelho digestório ou respiratório maternos, já que a maior parte dos linfócitos que se encontram na glândula mamária é oriunda do GALT e BALT (BRANDTZAEG et al, 1999; HANSON & TELEMÓ, 1999).

Células imunocompetentes das mucosas são estimuladas a se diferenciar pelos antígenos captados no local, migram pelas vias linfáticas até os linfonodos mesentéricos, entram na circulação sistêmica através do ducto torácico, até alcançar outras mucosas, já como plasmócitos maduros, onde se instalam e são estimuladas à

produção preferencial de IgA. (CARBONARE & CARBONARE, 200). A Figura 5 é um esquema da secreção de IgA nas mucosas e suas principais atividades biológicas

Figura 5. Esquema do mecanismo de secreção da SIgA nas mucosas: captação de antígenos pela célula M, produção de dímeros de IgA pelos plasmócitos da lâmina própria, passagem de IgA pelo epitélio e secreção como IgA secretória, neutralização de antígenos na mucosa. Baseado em CORTHESY 2002 e JOHANSEN & BRANDTZAEG 2004, modificado por CARBONARE & CARBONARE, 2008.

A glândula mamária é um dos sítios de homing de células provenientes de todas as mucosas. A adesina MadCAM 1, que normalmente não é detectada na glândula mamária em repouso, tem sua expressão aumentada durante a gravidez, alcançando um pico na lactação. Essa adesina se localiza nas células endoteliais das vênulas que circundam os lóbulos mamários, possibilitando a interação com os linfócitos circulantes (NISHIMURA, 2003).

Este mecanismo de circulação celular que direciona o trânsito de células na lactação é conhecido como o “elo bronco-entero-mamário”, que integra a glândula mamária ao sistema imune comum de mucosas (Figura 6). Como resultado deste processo, o leite materno apresenta níveis elevados de anticorpos dirigidos aos patógenos causadores de gastroenterites e doenças respiratórias, presentes no ambiente compartilhado por mãe e filho (BRANDTZAEG, 2003).

Figura 6. Esquema do sistema imune comum de mucosas e do elo bronco-entero-mamário. Células imunocompetentes das mucosas são estimuladas a se diferenciar pelos antígenos presentes no local, migram pelas vias linfáticas até os linfonodos mesentéricos, entram na circulação através do ducto torácico até alcançar outras superfícies mucosas, guiadas por moléculas de adesão. Como plasmócitos maduros, instalam-se no tecido mamário, onde são estimuladas à produção preferencial de IgA (CARBONARE & CARNEIRO-SAMPAIO 2006).

Investigações nas últimas décadas têm comprovado o papel protetor do colostro e do leite humano contra as infecções intestinais (CARBONARE & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

Infecções diarreicas causadas por *E. coli* enteropatogênica têm sido reduzidas entre crianças amamentadas. Em São Paulo foram estudadas 500 crianças menores de 12 meses com diarreia aguda, atendidas em uma emergência pediátrica e comparadas com 500 controles para avaliar os fatores de risco e proteção de diarreia aguda. A pesquisa concluiu que o aleitamento materno teve um efeito protetor contra *E. coli* enteropatogênica (TERUYA & COUTINHO., 2002).

Já na década de 80, um trabalho desenvolvido em Pelotas, no Rio Grande do Sul, identificou evidências de que o aleitamento materno exclusivo protege os bebês. Crianças que recebiam outros tipos de leite apresentavam um risco quatro vezes maior de morrer em consequência de diarreia e 1,6 vez maior de morte por

pneumonia, em comparação com as alimentadas apenas no peito (VICTORA et al., 1987).

Amostras de colostro de mulheres brasileiras inibem fortemente a adesão de EPEC a células em cultura (CÂMARA et al., 1994, CARBONARE et al., 1997, DELNERI et al., 1997) e contém anticorpos IgA reativos com os principais fatores de virulência de EPEC, como intimina, EspA, EspB, BFP e Tir (LOUREIRO, et al, 1998; SANCHES et. al, 2000), além de LPS (PALMEIRA et al, 2005).

Palmeira et al., (2005) verificaram que amostras de colostro de mulheres brasileiras residentes na Grande São Paulo, atendidas no serviço de Obstetrícia do Hospital Universitário da USP, apresentaram alta capacidade inibitória da adesão de EPEC e EHEC a células HEp-2 e também apresentaram anticorpos SIgA reativos com Intimina das linhagens de EPEC O111 e EHEC O111 e O157.

Com base nas constatações clínico-epidemiológicas de que os lactantes amamentados ao peito são menos suscetíveis às diarreias infecciosas, incluindo a causada por EPEC, estudos realizados concluíram que o leite materno é um potente inibidor da infecção *in vitro* pela EPEC e que o principal mediador da atividade inibitória encontra-se na fração IgA. Anticorpos secretores reativos com os fatores de virulência destas bactérias são capazes de inibir a adesão bacteriana à mucosa intestinal e com isso impedir a colonização do hospedeiro e, conseqüentemente, interromper a seqüência de eventos que culminaria com a infecção e a diarreia. Este é um mecanismo de proteção conferido pelo leite materno, que deve ocorrer não somente contra gastroenterites causadas por *E. coli* diarreiogênicas, como também nos casos de outras infecções iniciadas pela adesão de microrganismos às superfícies mucosas (CARBONARE & CARNEIRO-SAMPAIO, 2008).

Anticorpos reativos com intiminas e outros fatores de virulência também estão presentes em soros de adultos saudáveis, sugerindo um possível contato prévio com bactérias que apresentam antígenos relacionados. Estes anticorpos podem estar relacionados com uma proteção contra infecções por bactérias diarreiogênicas.

Carbonare et al.,(2003) investigaram a presença de anticorpos no soro e na saliva reativos com as principais proteínas associadas à virulência de EPEC em recém-nascidos e em crianças entre 2 meses e 2 anos de idade. Os resultados demonstraram que todas as crianças com mais de 1 ano apresentaram anticorpos com padrão de reatividade semelhante a dos adultos que moram na mesma área, sugerindo que a aquisição precoce de anticorpos para os fatores de virulência da

EPEC pode estar associada com a redução da susceptibilidade para esta infecção observada após um ano de idade.

Martinez et al., (1999) verificaram a presença de anticorpos reativos com fatores de virulência de EPEC em soros de crianças brasileiras, após infecção por EPEC. Crianças infectadas com EHEC também desenvolvem uma resposta de anticorpos séricos anti-intimina (JENKINS et al, 2000).

Em trabalho anterior realizado em nosso laboratório, ZAPATA-QUINTANILLA et al.,(2009) verificaram a presença de anticorpos reativos com intiminas α , β e γ em soros de adultos saudáveis doadores de sangue e também em amostras de colostro de doadoras saudáveis da Grande São Paulo.

Diante do que foi exposto até aqui, sabemos que os anticorpos anti-intiminas são capazes de inibir a adesão da EPEC nas células do hospedeiro e estão relacionados com a proteção contra infecção por EPEC. Como a bactéria se liga a célula do hospedeiro através da porção variável da intimina, os anticorpos reativos com esta porção da molécula de intimina devem ter um importante potencial protetor.

Portanto pretendemos avaliar a transferência de anticorpos anti-intiminas pela placenta e aleitamento materno, determinando as concentrações de anticorpos reativos com a porção conservada e as porções variáveis das intiminas α , β e γ de *E. coli* em amostras de soro de cordão umbilical de recém nascidos e em soros e colostros de suas mães.

OBJETIVO

Avaliar a transferência de anticorpos anti-intiminas pela placenta e aleitamento materno, determinando as concentrações de anticorpos reativos com a porção conservada e as porções variáveis das intiminas α , β e γ de *Escherichia coli* em amostras de soro de cordão umbilical de recém nascidos e em soros e colostros de suas mães.

Para chegar a este objetivo, foram realizadas as seguintes etapas:

Obter intiminas recombinantes $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e cons. utilizadas nos testes de Elisa para dosagem de anticorpos IgG e IgA específicos reativos com estas intiminas nos soros de recém nascidos e soros e colostros das suas mães.

Determinar as concentrações relativas de anticorpos IgG anti-intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e cons. presentes nas amostras de soros da mãe e recém-nascido e calcular as taxas de transferência.

Determinar as concentrações relativas de anticorpos IgA anti-intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e cons. presentes no colostro.

Comparar os resultados obtidos para cada uma das intiminas nos diferentes grupos de amostras e analisar a correlação entre todos os dados, utilizando testes estatísticos adequados a cada caso.

METODOLOGIA

1. Casuística

As amostras utilizadas no presente projeto foram coletadas na Maternidade do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), que faz parte da Rede de Bancos Públicos de Cordão Umbilical, denominada Rede Cord, criada pelo Ministério da Saúde em setembro de 2004.

Foram incluídas no projeto as mães que concordaram em participar após receberem todas as informações e autorizarem as coletas pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), anexos 4 e 5.

Foram coletados 50 trios de amostras: sangue materno, sangue de cordão umbilical e colostro materno. Os critérios de inclusão das mães e recém nascidos foram os seguintes: idade materna até 36 anos, idade gestacional superior a 35 semanas, peso de nascimento superior a 2.000g, não apresentar sofrimento fetal agudo nem infecção materna durante o trabalho de parto, não apresentar bolsa rota há mais de 18h, e nem temperatura materna acima de 38°C. Sorologia negativa para HIV, hepatite B, hepatite C, HTLV I/II, doença de chagas, sífilis, toxoplasmose e citomegalovírus.

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Pesquisa do HIAE anexos 1 e 2. Submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP anexo 3.

2. Coleta das Amostras

A coleta de sangue de cordão (SCUP) foi feita seguindo um procedimento padronizado pela Rede Cord. Foram coletados sangue de cordão umbilical e das veias da placenta. O sangue coletado foi imediatamente injetado na bolsa de coleta específica contendo anticoagulante e uma pequena alíquota deste sangue foi transferido para um tubo com EDTA para realizar os testes imuno-hematológicos do RN de rotina. Em seguida identificaram-se as amostras de sangue da mãe coletadas antes do parto e amostras de sangue do RN com seus respectivos números referentes à doação, ainda em sala.

As amostras de sangue das mães obtidas na hora do parto foram encaminhadas ao Laboratório de Sorologia e as bolsas contendo o sangue de cordão

dos recém-nascidos, encaminhadas ao Laboratório de Criopreservação de Células Tronco do Banco de Sangue do HIAE. Os soros utilizados na nossa pesquisa foram obtidos nos laboratórios acima citado, estes soros foram centrifugados e mantidos congelados no Laboratório de Sorologia a -20°C .

As amostras de colostro foram coletadas pela pesquisadora, nas primeiras horas após o parto, até no máximo de 72 horas, por expressão manual até se obter um volume mínimo de 2ml por amostra e acondicionadas em tubos plásticos estéreis de 50 ml para facilitar a coleta. Estas amostras foram mantidas congeladas a -20°C no Banco de Leite do HIAE.

Foram utilizados como controles um pool de soro humano formado por alíquotas de 100 amostras de doadores de sangue e um pool de colostro humano formado por alíquotas de 20 amostras que fazem parte da coleção de nosso laboratório. A concentração de IgG total do pool de soro humano foi determinada por nefelometria, no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da USP.

3. Obtenção de Intiminas Recombinantes

As proteínas intiminas foram obtidas a partir de bactérias recombinantes, gentilmente cedidas pelo laboratório de Microbiologia do Instituto Butantan: *E. coli* M15-pFL1 α , M15-pFL1 β , M15-pFL1 γ , que são transformadas com plasmídeo recombinante para a expressão da região variável das intiminas α , β e γ respectivamente e a *E. coli* M15-pFL4 α que expressa a região conservada da intimina α (Lima 2004).

Os procedimentos de extração do DNA genômico das bactérias selvagens, a clonagem das diferentes regiões de intimina e transformação bacteriana foram realizados por Lima (2004). No presente trabalho as porções variáveis da intimina foram denominadas como $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$ e a porção conservada foi denominada cons.

As bactérias recombinantes expressando as regiões variáveis $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$ e conservada (cons), da proteína intimina de *E. coli* foram previamente analisadas por PCR para confirmar a presença do inserto e os produtos da PCR foram seqüenciados. Estes procedimentos estão descritos em Zapata, 2009.

3.1 Expressão e purificação das intiminas

As bactérias recombinantes descritas acima foram incubadas “overnight” em 10 mL de meio LB contendo 25µg/mL de canamicina e 100µg/mL de ampicilina, a 37°C sob agitação. Após o crescimento, 5mL desta cultura foram transferidos para um frasco com 100mL de LB contendo 25µg/mL de canamicina e 100µg/mL de ampicilina, e incubada sob agitação de 350rpm a 37°C, até atingir uma densidade ótica (DO) entre 0,5 a 0,7 em espectrofotômetro com filtro de 600nm. Ao atingir a DO desejada, foi adicionado a este crescimento 1mM de IPTG (isopropil-β-d-tiogalactopiranosideo) e a cultura foi colocada novamente em incubação sob agitação de 350rpm a 37°C durante 5 horas. Após este período, a cultura foi centrifugada a 4.000g numa temperatura de 4°C durante 20 minutos.

O pellet foi ressuspendido em 10mL de solução de lise (NaCl 300mM, NaH₂PO₄ 50mM, Imidazol 10mM, PMSF 1mM, pH 8.0) e estocado a -70°C até o dia seguinte. O pellet ressuspendido em tampão de lise foi descongelado por imersão em água fria e submetido à pressão para o rompimento das células em um “French Pressure”, por 3 a 4 vezes. Após o rompimento das células a amostra foi centrifugada a 10.000g a uma temperatura de 4°C por 30 minutos.

O sobrenadante foi recuperado e para cada 4mL de sobrenadante adicionou-se 1mL da agarose Ni-NTA (Qiagen). Esta mistura foi mantida sob agitação constante (200rpm) durante uma hora em banho de gelo. Após este período, a mistura foi colocada em uma coluna.

Após a sedimentação da agarose, esta foi lavada 2 vezes com tampão de lavagem (NaCl 300mM, NaH₂PO₄ 50mM, Imidazol 20mM, pH 8.0), sendo que o volume de tampão utilizado foi igual a 4 vezes o volume do sedimento. Em seguida a proteína foi eluída pela adição do tampão de eluição (NaCl 300mM, NaH₂PO₄ 50mM, Imidazol 250mM, pH 8.0) em 4 tempos, adicionando 500µL de tampão em cada tempo. A proteína eluída foi acondicionada em tubo tipo “eppendorf” contendo 0,5mM de PMSF e estocada a 4°C.

Em todas as etapas foram coletadas alíquotas para análise das proteínas em corrida de gel SDS-PAGE. Todas estas etapas estão descritas no fluxograma a seguir:

Obtenção de Intimina purificada – Sistema Qiagen pQE30Crescimento da *Escherichia coli* clonada

3.2. Análise das amostras de Intimina por SDS-PAGE

A determinação da concentração das diferentes proteínas purificadas foi realizada pelo método do ácido bicinonínico (BCA, Pierce).

Com o resultado da dosagem de proteína das diferentes intiminas foi calculada a quantidade de proteína utilizada na preparação do antígeno protéico devendo estar numa concentração de 1 µg/mL. A diluição da proteína foi realizada com quantidade suficiente para 100 µL de tampão de amostra contendo 2% de SDS, 6 µL de β-mercaptoetanol e 2 µL de azul de bromofenol. As misturas foram homogeneizadas e posteriormente aquecidas a 100°C por 10 minutos e estocadas a -20°C até o momento de uso.

A eletroforese foi realizada em aparelho Mini Protean II (BioRad). O mini-gel foi preparado com 15% de acrilamida, com pente de 10 ou 15 dentes, segundo método descrito por Carbonare et al., (1995). O padrão de peso molecular (PM) usado foi um kit de calibração para eletroforese de baixo PM contendo: foforilase b (PM=94KDa), albumina bovina (PM=67KDa), ovoalbumina (PM=43KDa), anidrase carbônica (PM=30KDa), inibidor de tripsina (PM=20,1KDa) e α-lactalbumina (PM=14,4KDa) (Pharmacia Biotech). A corrida foi realizada com voltagem constante (100V), até a linha de frente do corante azul de bromofenol chegar ao final do gel. Os géis foram corados com GelCode® Blue Stain Reagent (Pierce).

4. Teste ELISA para determinação da concentração de anticorpos IgG reativos com intiminas no pool e das amostras de soro.

A determinação da concentração relativa de anticorpos anti-intiminas foi baseada na técnica descrita por Fomsgaard (1990).

A finalidade deste ensaio foi a determinação da concentração de anticorpos específicos anti-intiminas, por meio da relação com os níveis de IgG totais do pool de soro utilizado como padrão. A partir da concentração de IgG total do pool de soro previamente determinadas por nefelometria, determinamos a concentração de anti-intiminas v α, v β, v γ e cons no pool do soro.

Esta técnica tem sido utilizada no Laboratório de Imunogenética para outras determinações, sendo portanto já padronizada em várias de suas etapas. O protocolo resume-se em dosar na mesma placa, anticorpos anti-intimina e níveis totais de

imunoglobulinas, utilizando a mesma concentração de anticorpo de captura anti-IgG (Sigma I-1136), mesma concentração de cada intimina purificada, mesmas condições de incubação, concentração do conjugado e mesma solução de substrato.

Metade de uma placa de poliestireno (Costar, USA) foi sensibilizada com cada uma das intiminas purificadas numa concentração de 2,5µg/mL em PBS 7,4 e a outra metade, com anti-IgG a 2,5µg/mL em PBS 7,4 durante 16h a 4°C. As placas foram lavadas por quatro vezes com PBS-Tween 0,1% e foi realizado o bloqueio com leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Br) a 5% em PBS 7,4 por uma hora a temperatura ambiente. Após novas lavagens, o pool foi diluído em tampão de diluição PBS-Tween 0,2% acrescido de 5% de leite em pó desnatado e incubado na placa por duas horas a 37°C. Nesta etapa, as diluições do pool utilizadas nas duas metades das placas não são as mesmas, tendo sido padronizadas previamente: a partir de 1:50.000 na determinação de IgG total e 1:10 na determinação de IgG anti intiminas.

Após incubação, as placas foram lavadas e o conjugado marcado com peroxidase (diluição 1/2.000) foi adicionado diluído no tampão de diluição, deixando-se por duas horas a 37°C. Posteriormente se realizaram novas lavagens e a solução de substrato peróxido de hidrogênio 0,01% em solução de OPD 0,4 mg/mL em tampão citrato-fosfato, pH 5,0 foi colocada. Após 30 minutos de incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50µL de ácido sulfúrico 2,5N. A absorbância foi lida em leitor para microplacas no comprimento de onda de 492nm (Labsystems Multiscan MS, Finland). Os valores foram calculados para cada teste com o programa Excel da Microsoft.

As concentrações de IgG anti-intiminas α , β e γ e cons do pool de soro, foram calculadas empregando-se a curva de regressão linear da DO em função do Log_{10} da concentração conhecida de IgG total. As DOs obtidas para as intiminas foram comparadas com essa curva e o valor da concentração foi determinado pela equação da reta e posteriormente multiplicado pela diluição realizada. Este ensaio foi realizado repetidas vezes com o objetivo de testar a reprodutibilidade e de estabelecer um valor de concentração padrão para nosso pool. O resultado final da concentração de anti-intiminas em µg/mL relativo aos valores totais de IgG do pool de soro foi obtido pelo cálculo da média das várias determinações. Assim, a concentração de cada intimina é relativa e expressa em µg/mL.

Para a determinação individual de anticorpos anti-intiminas nas 100 amostras de soro (50 amostras das mães e 50 amostras de cordão dos seus recém-nascidos), a

sensibilização das placas e todo o procedimento do ensaio de ELISA foi realizado nas mesmas condições do que o ensaio para a determinação de anti-intimina no pool. Em cada placa foi processado o pool em duplicata como referência junto a 18 amostras de soros, sendo 9 soros de mães e 9 soros dos seus respectivos RNs, e uma amostra com concentrações conhecidas, funcionando como controle interno de nosso teste. As diluições do pool e das amostras foram seriadas: a partir de 1:40 para $v\alpha$, a partir de 1:20 para $v\beta$ e $v\gamma$ e a partir de 1:80 para cons. O conjugado anti-IgG foi utilizado na diluição 1:2000 para cada uma das intiminas.

Para obter os resultados em concentração, realizou-se uma curva de regressão linear da concentração conhecida de IgG anti-intiminas no pool de soro, em função das DOs para cada diluição. As DOs obtidas para cada amostra individual, foram comparadas com essa curva e o valor foi posteriormente determinado pela equação da reta e multiplicado pela diluição realizada.

5. Teste ELISA para determinar a concentração de IgA total no pool de colostro

Sensibilizou-se uma placa de poliestireno (Costar, USA) com anti-IgA de captura (I-884) (Sigma, USA) numa concentração de 2.5 μ g/ml em PBS 7,4 durante 16h a 4°C. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween 0,1%.

A placa foi dividida em três partes, numa parte da placa foi adicionado padrão de IgA humana (Sigma, USA) diluído a 1:4000, numa outra parte placa foi adicionado o pool de colostro diluído 1:20.000 e na última parte da placa foi adicionado IgA purificada (Carbonare et al., 2005) diluído 1:40.000, sempre em tampão de diluição PBS-NaCl-Tween 0,2% incubados por duas horas a 37°C. Após incubação, as placas foram lavadas e o conjugado anti-IgA humano marcado com peroxidase (diluição 1:5000) foi adicionado diluído no tampão de diluição, incubando-se por duas horas a 37°C. Posteriormente realizaram-se novas lavagens e a solução de substrato peróxido de hidrogênio 0,01% em solução de OPD 0,4 mg/mL em tampão citrato-fosfato, pH 5,0 foi acrescentada. Após 30 minutos de incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico 2,5N. A absorbância foi lida em leitor para microplacas no comprimento de onda de 492nm (Labsystems Multiscan MS, Finland). Os valores foram calculados com o auxílio do programa Excel da Microsoft.

6. Teste ELISA para determinar a concentração de anticorpos IgA reativos com intiminas nas amostras de colostro.

Realizou-se este ensaio para determinar a concentração de anticorpos específicos anti-intiminas, por meio da relação com os níveis de IgA totais no nosso pool de colostro. A partir da concentração de IgA total do pool de colostro previamente determinadas pelo teste acima descrito, determinamos a concentração de anti-intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e cons no pool do colostro. Dosou-se na mesma placa anticorpos anti-intimina e níveis totais de imunoglobulinas, utilizando a mesma concentração de anticorpo de captura anti-IgA (Sigma USA), mesma concentração de cada intimina purificada, mesmas condições de incubação, concentração do conjugado e mesma solução de substrato.

Para realizar o teste, metade de uma placa de poliestireno (Costar, USA) foi sensibilizada com cada uma das intiminas purificadas a uma concentração de 5,0 μ g/mL em PBS 7,4 e a outra metade, com anti-IgA a 5,0 μ g/mL em PBS 7,4 durante 16h a 4°C. As diluições do pool utilizadas nas duas metades das placas não são as mesmas, tendo sido padronizadas previamente: a partir de 1:10.000 para IgA total e a partir de 1:10 para IgA anti-intiminas. As diluições de pool e das amostras de colostro foram seriadas: a partir de 1:10 para $v\alpha$, $v\gamma$ e cons e a partir de 1:20 para $v\beta$.

7. Determinação de IgG sérica total nas amostras de soros

A determinação das concentrações de IgG total dos soros das mães e dos seus respectivos recém-nascidos foi feita pelo ensaio de imunodifusão radial quantitativa, realizado conforme técnica de Mancini e col. (1965). De acordo com padronização anterior, foi utilizado anticorpo anti-IgG humano (Sigma-USA, I-1136) incorporado na agarose na proporção de 10 μ L / mL de agarose a 1% + polietilenoglicol 6000 a 3% em PBS 7,4.

Após a fusão da agarose/PEG/PBS e estabilização da temperatura em banho a 56°C, foi adicionado o anti-IgG. Um volume de 8 mL de agarose contendo o anticorpo foi espalhado imediatamente em placas de vidro de 8cmX8cm niveladas e mantidas em geladeira. Após a solidificação, procedeu-se a perfuração para a formação dos poços, onde foram aplicados 5 μ L de amostras em diluição apropriada e 5 μ L de IgG padrão de concentração conhecida, em 6 diluições diferentes para obtenção da curva padrão. As placas foram incubadas em câmara úmida em geladeira por 48 horas, coradas com corante de Ponceau e realizada a leitura dos diâmetros dos halos de

precipitação. O cálculo das concentrações das amostras foi feito comparando-se os halos com a curva padrão, usando o programa Excel da Microsoft.

8. Cálculo da transferência de anticorpos

A partir das concentrações de anticorpos determinados pelo ELISA, foi feito o cálculo da porcentagem de transferência de anticorpos do soro da mãe para o RN para todos os tipos de intiminas:

$$\% T = \frac{\text{concentração de anticorpos no soro do RN}}{\text{concentração de anticorpos no soro da mãe}} \times 100$$

9. Análise estatística

Os resultados das determinações de concentrações de anticorpos anti-intiminas e das porcentagens de transferência foram submetidos às seguintes análises: análise descritiva (Box-plot), teste de normalidade, análise de comparações múltiplas (Teste de Bonferroni) análise de variância (Testes de Tukey e Kruskal Wallis), testes de correlação de Pearson e Spearman e distribuição de frequências, tendo sido escolhidos os testes que mais se ajustavam a cada grupo.

RESULTADOS

1. Características da população estudada

As características da amostragem do presente trabalho foram as seguintes: idade das mães: de 22 a 36 anos, com média de 32 anos; idade gestacional dos RN: de 36 a 41 semanas, com média de 38 semanas; peso dos RN: de 2100g a 4500g com média de 3252g, 7 partos vaginais, 42 cesarianas e 1 fórceps. Os dados completos se encontram relacionados na tabela do anexo 6.

A nossa população em estudo tem nível socioeconômico elevado, sendo que a maioria é de mães de primeiro filho, grau de escolaridade superior e morando em regiões nobres da cidade de São Paulo.

2. Expressão e purificação das intiminas recombinantes

Os procedimentos para realizar a expressão e purificação das intiminas foram realizados da mesma forma para cada uma das quatro intiminas utilizadas neste trabalho. As proteínas recombinantes His-intimina foram expressas após a adição de IPTG ao meio de cultura contendo as amostras bacterianas recombinantes em fase log de crescimento. Antes da adição de IPTG, e ao final do período de indução, foram retiradas alíquotas da cultura para controle negativo e confirmação da expressão da proteína por SDS-PAGE.

Posteriormente realizamos a purificação da proteína por cromatografia de afinidade através da interação dos resíduos de 6xHis presentes na região N-Terminal de cada proteína, com o níquel (Ni-NTA) ligado à matriz de Sepharose CL-6B. Ao final de cada fase, foram retiradas alíquotas para análise por SDS-PAGE. No caso das intiminas $v\beta$ (figura 8) e cons (figura 10) observa-se a presença de uma banda forte correspondente a 16,5 kDa e 33,6 kDa respectivamente. No caso das intiminas $v\alpha$ (figura 7) e $v\gamma$ (figura 9) observam-se duas bandas onde uma é correspondente a 16,5 kDa.

Após a eluição da agarose, os tubos “ependorf” contendo o eluato da coluna com a maior quantidade de proteína observada no gel, foram separados para realizar a determinação da concentração de proteína.

As duas bandas observadas para a intimina $v\alpha$ já foram observadas em trabalhos anteriores. No trabalho de mestrado de Lima (2004), verificou-se qual destas duas bandas seria a intimina recombinante $v\alpha$ -6xHis. Um ensaio de “imunoblot” utilizando anticorpo anti-his (Quiagen, EUA) mostrou que as duas bandas foram reconhecidas pelo anti-soro His, indicando que a banda de aproximadamente 20,0 kDa não era uma contaminação. O fato de essa banda indesejada possuir peso molecular um pouco maior, praticamente descarta a possibilidade de que esta proteína seja produto de desnaturação e subsequente polimerização da proteína de 16,5 kDa

Figura 7: SDS-PAGE em gel a 15% de poliacrilamida com preparações protéicas das amostras obtidas do processo de purificação de intimina $v\alpha$:

1 – Padrão de peso molar 2 μ L	7 - 1º produto da eluição clone $v\alpha$
2 – pellet da centrifugação ressuspensionado em tampão de lise antes da passagem pelo French pressure	8 - 2º produto da eluição clone $v\alpha$
3 – pellet clone $v\alpha$ após French pressure	9 - 3º produto da eluição clone $v\alpha$
4 - sobrenadante clone $v\alpha$ após French pressure	10 - 4º produto da eluição clone $v\alpha$ *
5 - produto da sedimentação da agarose Ni-NTA	11 – 1ª lavagem da coluna
6 - lavagens da coluna	12 – 2ª lavagem da coluna
- * intimina $v\alpha$ utilizada nos ensaios

Figura 8: SDS-PAGE em gel a 15% de poliacrilamida com preparações protéicas das amostras obtidas do processo de purificação de intimina $v\beta$:

1 – Padrão de massa molar 2 μ L	7 - 2º produto da eluição clone $v\beta$
2 – pellet clone $v\beta$ após French pressure	8 - 3º produto da eluição clone $v\beta$
3 - sobrenadante clone $v\beta$ após French pressure	9 - 4º produto da eluição clone $v\beta$ *
4 - produto da sedimentação da agarose Ni-NTA	10 – 1ª lavagem da coluna
5 - lavagens da coluna	11 – 2ª lavagem da coluna
6 - 1º produto da eluição clone $v\beta$	
- * intimina $v\beta$ utilizada nos ensaios

Figura 9: SDS-PAGE em gel a 15% de poliacrilamida com preparações protéicas das amostras obtidas do processo de purificação de intimina $v\gamma$:

1 – Padrão de massa molar 2 μ L	8 - lavagens da coluna
2 – Após 5 h de incubação com IPTG	9 - 1º produto da eluição clone $v\gamma$
3 – Sobrenadante após centrifugação	10 - 2º produto da eluição clone $v\gamma$
4 - pellet da centrifugação ressuspensionado em tampão de lise antes da passagem pelo French pressure	11 – 3º produto da eluição clone $v\gamma$
5 - sobrenadante clone $v\gamma$ após French pressure	12 – 4º produto da eluição clone $v\gamma$ *
6 - pellet clone $v\gamma$ após French pressure	13 - 1ª lavagem da coluna
7 - produto da sedimentação da agarose Ni-NTA	14 - 2ª lavagem da coluna

* intimina $v\gamma$ utilizada nos ensaios

Figura 10: SDS-PAGE em gel a 15% de poliacrilamida com preparações protéicas das amostras obtidas do processo de purificação de intimina cons.:

1 – Padrão de massa molar 2 μ L	8 - 1º produto da eluição clone cons.
2 – Após 5 h de incubação com IPTG	9 - 2º produto da eluição clone cons.
3 - pellet da centrifugação ressuspensionado em tampão de lise antes da passagem pelo French pressure	10 – 3º produto da eluição clone cons*
4 - pellet clone cons após French pressure	11 – 4º produto da eluição clone cons.
5 - sobrenadante clone cons. após sonicação	12 - 1ª lavagem da coluna
6 - produto da sedimentação da agarose Ni-NTA	
7 - lavagem da coluna	

* intimina cons utilizada nos ensaios

3. Concentração de proteínas

A concentração de proteínas das alíquotas que apresentavam bandas mais fortes no SDS-PAGE determinada pelo método do ácido bicinconínico, está na tabela 3.

Tabela 3. Concentração de proteínas nas preparações de intiminas

Intimina	Número de tubo	Concentração em mg/ml
v α	10	8,67
v β	9	2,80
v γ	12	3,28
cons	10	4,79

Os valores de concentrações de proteína serão utilizados posteriormente para o cálculo da quantidade de antígeno para a sensibilização de placas de ELISA. Este teste será realizado para determinar a concentração de anticorpos anti-intiminas nas amostras de soro e colostro.

4. Determinação da concentração de anticorpos anti-intiminas nas amostras de soro e de colostro

Os resultados das concentrações de anticorpos anti-intimina v α , v β , v γ e cons de todas as amostras de soros de mães, soros dos seus recém-nascidos e colostros, determinados pela técnica de ELISA, bem como as taxas de transferência de anticorpos estão relacionados nas tabelas 4, 5, 6 e 7. Os valores expressam as concentrações relativas de anticorpos IgG para as amostras de soro e IgA para as amostras de colostro.

Tabela 4. Concentração de anticorpos IgA (colostró) e IgG (soros mãe e RN) anti-intimina α , detectados pelo ELISA (ug/ml) e porcentagem de transferência destes anticorpos.

Amostra	Colostro	Soro Mãe	Soro RN	% Transferência.
1	15,85	2,64	1,66	62,88
2	207,75	1,5	1,17	78,00
3	10,06	2,61	1,83	70,11
4	0,64	1,14	0,69	60,53
5	223,03	4,03	2,66	66,00
6	9,88	2,88	4,96	172,22
7	9,41	0,85	0,99	116,47
8	0,86	2,69	1,36	50,56
9	12,87	1,83	1,01	55,19
10	25,09	6,64	5,37	80,87
11	33,31	1,29	1,47	113,95
12	0,54	0,67	0,52	77,61
13	55,81	3,06	2,95	96,41
14	10,56	3,41	2,06	60,41
15	5,93	1,42	0,63	44,37
16	6,7	0,58	0,41	70,69
17	1,92	2,15	1,23	57,21
18	46,4	2,05	1,5	73,17
19	139,49	5,36	4,36	81,34
20	8,48	0,89	0,47	52,81
21	4,42	0,85	0,6	70,59
22	16,59	1,26	1,28	101,59
23	22,54	0,5	0,24	48,00
24	9,06	1,23	1,06	86,18
25	2,27	1,5	0,54	36,00
26	2,73	9,32	10,89	116,85
27	17,53	1,6	0,49	30,63
28	8,41	4,51	2,55	56,54
29	13,68	3,81	2,88	75,59
30	2,35	2,35	0,95	40,43
31	328,16	2,9	3,73	128,62
32	709,38	1,12	0,71	63,39
33	3,34	1,38	0,89	64,49
34	17	1,91	1,41	73,82
35	0,66	2,1	1,85	88,10
36	25,47	1,91	1,8	94,24
37	7,31	2,47	1,58	63,97
38	38,78	0,6	0,68	113,33
39	583,81	1,35	1,49	110,37
40	415,71	2,62	2,2	83,97
41	4,64	0,83	0,52	62,65
42	11,86	2	2,82	141,00
43	204,76	0,56	0,41	73,21
44	12,42	1,26	1,28	101,59
45	1,86	0,72	0,92	127,78
46	25,89	2,39	1,23	51,46
47	19,12	11,71	9,75	83,26
48	109,35	0,01	0,01	100,00
49	41,13	1,24	0,74	59,68
50	25,89	5,62	2,31	41,10

Tabela 5. Concentração de anticorpos IgA (colostro) e IgG (soros mãe e RN) anti-intimina β , detectados pelo ELISA (ug/ml) e porcentagem de transferência destes anticorpos.

Amostra	Colostro	Soro Mãe	Soro RN	% Transf.
1	21,07	1,62	1,43	88,27
2	494,32	0,68	0,4	58,82
3	17,63	1,86	1,39	74,73
4	2,5	0,1	0,18	180,00
5	676,4	2,49	2,59	104,02
6	15,02	1,2	1,1	91,67
7	35,63	0,2	0,2	100,00
8	4,42	1,36	0,84	61,76
9	38,73	0,99	0,69	69,70
10	29,23	3,2	3	93,75
11	76,82	0,34	0,21	61,76
12	1,54	0,19	0,19	100,00
13	95,43	3,31	1,84	55,59
14	7,49	2,57	1,16	45,14
15	3,16	0,009	0,003	33,33
16	7,63	0,06	0,03	50,00
17	1,78	1,62	0,78	48,15
18	50,3	1	1	100,00
19	257,2	3,16	1,65	52,22
20	17,4	0,46	0,24	52,17
21	2,55	0,19	0,09	47,37
22	38,33	1,01	0,67	66,34
23	23,55	0,12	0,08	66,67
24	13,43	1,53	1,24	81,05
25	4,73	0,19	0,21	110,53
26	6,62	7,44	7,16	96,24
27	39,24	0,69	0,37	53,62
28	6,08	1,41	1,18	83,69
29	14,94	5,01	3,49	69,66
30	5,68	1,92	0,69	35,94
31	317,81	1,82	2,38	130,77
32	1269,31	0,4	0,14	35,00
33	3,4	2,59	1,14	44,02
34	26,33	0,78	0,67	85,90
35	-0,08	1,95	2,25	115,38
36	10,75	1,05	0,68	64,76
37	1,17	0,35	0,14	40,00
38	31,71	0,15	0,06	40,00
39	144,31	0,49	0,37	75,51
40	2325,6	3,35	2,3	68,66
41	1,9	0,52	0,38	73,08
42	63,54	2,31	1,6	69,26
43	244,03	0,62	0,54	87,10
44	23,89	1,3	1,14	87,69
45	5,95	0,63	0,72	114,29
46	47,03	1,17	0,66	56,41
47	61,87	8,48	5,16	60,85
48	243,13	0,11	0,19	172,73
49	30,9	0,91	0,55	60,44
50	92,57	3,86	1,83	47,41

Tabela 6. Concentração de anticorpos IgA (coloostro) e IgG (soros mãe e RN) anti-intimina γ , detectados pelo ELISA (ug/ml) e porcentagem de transferência destes anticorpos.

Amostra	Colostro	Soro Mãe	Soro RN	% Transferência.
1	15,82	1,16	0,81	69,83
2	484,86	2,21	2,38	107,69
3	60,91	1,22	1,11	90,98
4	2,75	0,56	0,24	42,86
5	48,69	2,37	2,19	92,41
6	24,25	0,97	0,88	90,72
7	68,63	0,17	0,2	117,65
8	1,87	0,7	0,49	70,00
9	152,01	2,17	1,3	59,91
10	50,84	1,12	1,07	95,54
11	94,15	0,75	0,6	80,00
12	4,36	0,16	0,21	131,25
13	31,48	0,56	0,78	139,29
14	17,34	1,3	1	76,92
15	34,92	2,03	0,85	41,87
16	23,15	1,48	0,97	65,54
17	7,2	1,78	0,99	55,62
18	16,93	2,35	2,24	95,32
19	157,46	2,48	1,85	74,60
20	8,12	0,71	0,39	54,93
21	13,05	0,71	0,46	64,79
22	46,07	4,88	4,61	94,47
23	46,63	0,74	0,41	55,41
24	31,65	2,85	2,25	78,95
25	7,28	0,9	1,04	115,56
26	2,51	0,83	0,72	86,75
27	27,55	0,87	0,5	57,47
28	6,96	1,75	1,54	88,00
29	55,4	5,85	5,01	85,64
30	6,65	3,77	1,28	33,95
31	639,8	1,22	1,39	113,93
32	257,34	0,44	0,03	6,82
33	18,76	3,15	1,22	38,73
34	73,74	3,96	2,82	71,21
35	2,68	2,61	2,12	81,23
36	95,85	2,2	1,08	49,09
37	38,88	3,16	2,36	74,68
38	36,06	0,3	0,17	56,67
39	326,06	2,08	0,89	42,79
40	719,94	0,83	0,78	93,98
41	5,02	0,18	0,11	61,11
42	79,27	4,05	4,54	112,10
43	49,69	1,89	1,31	69,31
44	25,62	2,13	1,5	70,42
45	6,44	0,83	1,45	174,70
46	21,03	0,36	0,22	61,11
47	26,92	8,55	7,15	83,63
48	83,9	0,34	0,29	85,29
49	52,74	1,96	1,46	74,49
50	83,13	4,03	2,12	52,61

Tabela 7. Concentração de anticorpos IgA (colostro) e IgG (soros mãe e RN) **anti-intimina cons**, detectados pelo ELISA (ug/ml) e porcentagem de transferência destes anticorpos.

Amostra	Colostro	Soro Mãe	Soro RN	% Transf.
1	12,58	9,97	5,82	58,38
2	174,18	4,49	2,3	51,22
3	49,11	12,69	11,05	87,08
4	11,88	1,22	0,17	13,93
5	232,24	4,54	6,53	143,83
6	31,18	5,37	5,94	110,61
7	13,78	7,86	6,65	84,61
8	0,21	5,53	2,6	47,02
9	59,04	6,35	2,45	38,58
10	77,85	12,33	7,64	61,96
11	58,72	2,54	1,91	75,20
12	2,18	2,39	2,07	86,61
13	36,17	5,48	4,76	86,86
14	21,4	2,36	1,41	59,75
15	7,2	2,79	1,61	57,71
16	12,81	1,72	1,79	104,07
17	1,74	5,1	3,4	66,67
18	40,5	5,56	4,05	72,84
19	70,21	11,28	5,26	46,63
20	63,5	5,2	2,49	47,88
21	11,71	4,87	1,91	39,22
22	7,64	2,89	2,88	99,65
23	97,84	3,32	1,8	54,22
24	31,93	5,34	3,46	64,79
25	3,39	2,52	2,84	112,70
26	27,71	5,14	4,41	85,80
27	22,33	2,16	1,22	56,48
28	8,8	4,09	3,32	81,17
29	60,95	8,76	3,61	41,21
30	7,32	3,18	2,34	73,58
31	703,8	3,76	3,74	99,47
32	261,54	8,46	5,79	68,44
33	20,04	4,25	3,12	73,41
34	80,81	13,89	5,24	37,72
35	2,96	5,04	7,36	146,03
36	109,34	9,98	7,89	79,06
37	49,74	6,37	4,67	73,31
38	14,6	5,29	4,08	77,13
39	888,36	6,9	4,77	69,13
40	1112,4	6,81	3,63	53,30
41	37,77	4,89	2,55	52,15
42	59,7	12,09	5,56	45,99
43	345,47	1,67	0,58	34,73
44	28,33	7,12	5,85	82,16
45	4,67	2,65	2,04	76,98
46	26,42	2,61	1,67	63,98
47	16,31	13,56	9,44	69,62
48	68,66	3,43	3,64	106,12
49	50,4	1,03	0,55	53,40
50	137,51	2,15	2,27	105,58

5. Determinação de IgG total

Utilizamos a técnica de Imunodifusão radial quantitativa para determinar as concentrações de IgG total presentes nos soros das mães e seus recém-nascidos.

A sensibilidade analítica da técnica está em torno de 10mg/dl e a metodologia requer uma rigorosa padronização das condições e reagentes, como pureza e concentração do gel de agarose, concentração do anticorpo incorporado ao gel, espessura do gel na placa, uniformidade do tamanho do orifício, além do pH e concentração iônica do meio.

Os resultados obtidos estão relacionados na tabela 8 e resumidos na tabela 9, bem como as porcentagens de transferência de IgG total de mãe para RN.

Tabela 8. Concentração de IgG total nos soros das mães e RNs determinados pela IDRQ (mg/dl) e porcentagem de transferência.

Amostra	Soro Mãe	Soro RN	% Transf.
1	1307,25	834,67	63,85
2	984,22	403,71	41,02
3	1223,50	625,30	51,11
4	1101,62	316,23	28,71
5	984,22	658,95	66,95
6	1182,38	693,10	58,62
7	1223,50	946,09	77,33
8	984,22	433,87	44,08
9	1307,25	374,05	28,61
10	1223,50	834,67	68,22
11	908,45	1182,38	130,15
12	727,74	946,09	130,00
13	1397,35	1351,73	96,74
14	2300,25	1537,08	66,82
15	1371,83	814,17	59,35
16	1397,35	1537,08	110,00
17	1351,73	727,83	53,84
18	1584,62	873,74	55,14
19	1779,53	1128,11	63,39
20	1128,11	645,12	57,19
21	1632,63	904,13	55,38
22	2086,23	1195,73	57,32
23	1335,80	699,86	52,39
24	1408,25	1094,91	77,75
25	996,92	1904,03	190,99
26	1549,35	1635,36	105,55
27	1423,65	623,83	43,82
28	1507,01	820,68	54,46
29	2092,02	960,78	45,93
30	687,67	304,39	44,26
31	1382,64	655,53	47,41
32	1858,15	386,19	20,78
33	1904,03	925,09	48,59
34	1465,11	1107,98	75,62
35	1184,24	1549,35	130,83
36	1812,70	1301,95	71,82
37	2188,26	1135,78	51,90
38	2079,93	1715,88	82,50
39	1079,83	842,34	78,01
40	1135,78	519,34	45,73
41	945,00	605,85	64,11
42	1518,39	1470,22	96,83
43	720,49	628,20	87,19
44	744,28	720,49	96,80
45	562,02	842,34	149,88
46	2079,93	971,39	46,70
47	1665,79	1375,31	82,56
48	998,07	417,68	41,85
49	1107,66	768,36	69,37
50	1251,13	252,86	20,21

Tabela 9. Parâmetros estatísticos das concentrações de IgG total nas amostras de soros de mãe e RN e das porcentagens de transferência de IgG total entre mãe e RN.

Concentrações de IgG sérico (mg/dl) e transferência de IgG entre mãe e RN (%)			
	Conc IgG mãe	Conc IgG RN	Transferência IgG
Média	1357,43	904,00	69,75
Mediana	1321,53	838,50	61,37
Desvio Padrão	421,49	401,94	33,52
Maior Valor	2300,25	1904,03	190,99
Menor Valor	562,02	252,86	20,21

6. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística para avaliar a resposta de anticorpos dos indivíduos estudados, em relação às quatro intiminas. Inicialmente foi feita uma análise descritiva (tabela 10) representada nos gráficos “Box-plot” mostrando valores máximos e mínimos, percentis 25 e 75, mediana e média figuras 12, 14, 16 e 18. A seguir foi feita a análise de variância para comparar os diferentes grupos e a análise da distribuição de freqüências das amostras agrupadas em faixas de títulos de anticorpos ou de porcentagens de transferência e comparação das distribuições de freqüências nos vários grupos de dados. Estes resultados são mostrados nas figuras 11, 13, 15 e 17.

Finalmente, foram realizados os testes de correlação entre as concentrações de anticorpos para os vários tipos de intiminas e os diferentes grupos de dados, bem como das porcentagens de transferências, cujos resultados são mostrados nas tabelas 10 e 11 e figuras 19, 20 e 21.

No caso dos soros das mães, existe uma diferença significativa entre as concentrações de anticorpos IgG reativos com a região conservada da intimina, que é mais alta comparada com as três regiões variáveis. Na comparação dos níveis de anticorpos para as porções variáveis, os níveis de anti- α são mais altos que anti- β , mas não há diferença significativa entre α e γ ou β e γ . Exatamente o mesmo padrão ocorre nos soros dos recém nascidos.

As concentrações de anticorpos IgA no colostro são mais altas que as concentrações de anticorpos IgG nas amostras de soro para todos os subtipos de intiminas. Nas amostras de colostro, a análise de comparações múltiplas de Bonferoni mostrou que a concentração de anticorpos anti-intimina α foi menor que todas as outras, mas não existe diferença significativa entre as concentrações de anticorpos reativos para os demais tipos de intiminas. Devido às altas concentrações de anticorpos IgA nas amostras de colostro e também à grande dispersão dos valores o gráfico de distribuição de frequências foi feito com o log das concentrações para permitir uma melhor visualização das curvas. No gráfico da figura 15, observa-se que as curvas são muito próximas, com um leve desvio de α para a esquerda.

Não houve diferença significativa na comparação das porcentagens de transferência de anticorpos para as diferentes intiminas. O comportamento semelhante é evidenciado pelas curvas superpostas no gráfico da figura 17.

Os valores de porcentagem de transferência de anticorpos reativos com as diferentes intiminas foram muito variáveis (de 6,8 a 180%), mas as médias e medianas se situaram na faixa de 68 a 78%. Este mesmo padrão de taxa de transferência também foi observado nos níveis de IgG total: variação de 20 a 190%, média de 69,75 % e mediana de 61,37 % (Figura 19).

Tabela 10. Parâmetros estatísticos das concentrações de anticorpos anti-intiminas da classe IgG nas amostras de soros de mãe e RN, da classe IgA nas amostras de colostro e das porcentagens de transferência de IgG anti-intimina entre mãe e RN.

Soro Mãe: conc. IgG anti-intimina (µg/mL)				
	vα	vβ	vγ	cons
Média	2,39	1,58	1,87	5,58
Mediana	1,87	1,03	1,39	5,07
Desvio Padrão	2,19	1,75	1,62	3,39
Maior Valor	11,71	8,48	8,55	13,89
Menor Valor	0,01	0,01	0,16	1,03
Soro RN: conc.IgG anti-intimina (µg/mL)				
	vα	vβ	vγ	cons
Média	1,90	1,14	1,43	3,84
Mediana	1,28	0,69	1,06	3,43
Desvio Padrão	2,01	1,34	1,38	2,32
Maior Valor	10,89	7,16	7,15	11,05
Menor Valor	0,01	0,01	0,03	0,17
Colostro: conc. IgA anti-intimina (µg/mL))				
	vα	vβ	vγ	cons
Média	70,21	139,08	83,85	105,50
Mediana	13,28	23,72	33,29	34,05
Desvio Padrão	147,08	380,91	150,70	218,41
Maior Valor	709,38	2325,6	719,94	1112,4
Menor Valor	0,54	0,1	1,87	0,21
Transferência de IgG anti-intimina entre mãe e RN (%)				
	vα	vβ	vγ	cons
Média	78,58	75,23	77,76	71,56
Mediana	73,19	68,96	74,64	69,38
Desvio Padrão	29,14	31,39	29,30	26,51
Maior Valor	172,22	180,00	174,69	146,03
Menor Valor	30,63	33,33	6,82	13,93

Figura 11. Distribuição de amostras de soros de **mães** de acordo com a frequência de concentrações de IgG anti-intiminas α , β , γ e conservada.

Figura 12. Distribuição Box-plot de amostras de soro de **mães** de acordo com a concentração de IgG anti-intiminas α , β , γ e conservada.

Figura 13. Distribuição de amostras de soros de **RN** de acordo com a frequência de concentrações de IgG anti-intiminas α , β , γ e conservada.

Figura 14. Distribuição Box-plot de amostras de soro de **RN** de acordo com a concentração de IgG anti-intiminas α , β , γ e conservada.

Figura 15. Distribuição de amostras de **colostro** de acordo com a frequência de concentrações (log) de IgA anti-intiminas α , β , γ e conservada.

Figura 16. Distribuição Box-plot de amostras de **colostro** de acordo com a concentração de IgA anti-intiminas α , β , γ e conservada.

Figura 17. Distribuição de frequências das porcentagens de transferência de anticorpos IgG anti-intiminas α , β , γ e conservada, entre **mãe e RN**.

Figura 18. Distribuição Box-plot das porcentagens de transferência de anticorpos IgG anti-intiminas α , β , γ e conservada e IgG total, entre **mãe e RN**.

6.1. Teste de correlação de Spearman

Para avaliar dados não paramétricos, utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman. Este coeficiente varia entre -1 e +1. Quanto mais próximo estiver destes extremos, maior será a associação entre as variáveis.

Este coeficiente pode ser zero quando duas variáveis são absolutamente independentes entre si, ou seja, não existe nenhuma relação entre elas. Pode assumir um valor máximo de +1, quando a associação for positiva. Pode também assumir um valor máximo de -1, quando a associação for negativa. Quanto mais próximo de zero for o p , maior a significância da correlação.

Nossos resultados mostraram correlação positiva quando foram comparadas as variáveis (intiminas α , β , γ e conservada) entre grupos (soro de mães e recém-nascidos e colostro). Nos grupos de soro, os coeficientes são mais altos e o valor de p mais baixo ($p=0,0000$) entre os anticorpos IgG anti-intiminas α e β , que entre todos os outros pares. Em amostras de colostro, os coeficientes de correlação são mais altos em todos os pares de dados. A comparação entre soro de mães e recém-nascido resultou em alto coeficiente de correlação e $p=0,0000$ em todos os casos, como esperado.

Na comparação das porcentagens de transferências de anticorpos para as diferentes intiminas, os coeficientes foram positivos, mas em valores mais baixos.

Foram testadas também as correlações entre as porcentagens de transferência de anticorpos e outros parâmetros, como a idade gestacional do RN, a idade de mãe ou o peso do RN, mas não foi observada correlação significativa em nenhum caso.

Tabela 11. Teste de correlação de Spearman entre os anticorpos reativos com diferentes intiminas, em amostras de soros (IgG) e colostro (IgA) e taxas de transferência do soro da mãe para o RN, avaliados em duplas com relação ao tipo de intimina. Valores de coeficientes de correlação e (p) considerando um nível de confiança de 95%.

Anticorpos anti-intiminas	Soro Mãe (IgG)	Soro RN (IgG)	Colostro (IgA)	Transferência (%)
$v\alpha \times v\beta$	0,8219 (0,0000)	0,8303 (0,0000)	0,9187 (0,0000)	0,3943 (0,0058)
$v\alpha \times v\gamma$	0,3986 (0,0053)	0,4804 (0,0008)	0,7950 (0,0000)	0,5166 (0,0003)
$v\alpha \times \text{cons}$	0,3627 (0,0111)	0,6064 (0,0000)	0,8023 (0,0000)	0,2965 (0,0380)
$v\beta \times v\gamma$	0,4723 (0,0009)	0,5210 (0,0003)	0,7605 (0,0000)	0,5559 (0,0001)
$v\beta \times \text{cons}$	0,3775 (0,0082)	0,4860 (0,0007)	0,7240 (0,0000)	0,2511 (0,0788)
$v\gamma \times \text{cons}$	0,2240 (0,1169)	0,2422 (0,0900)	0,7976 (0,0000)	0,3385 (0,0178)

Tabela 12. Teste de correlação de Spearman entre os anticorpos reativos com diferentes intiminas, em amostras de soros de mãe e RN (IgG) e colostro (IgA) avaliados em duplas com relação às amostras analisadas. Valores de coeficientes de correlação e (p) considerando um nível de confiança de 95%.

Intiminas	Soro mãe x colostro	Soro mãe x soro RN	Soro RN x colostro
$v\alpha$	0,10910 (0,4450)	0,88530 (0,0000)	0,2168 (0,1292)
$v\beta$	0,1846 (0,1964)	0,9528 (0,0000)	0,2035 (0,1543)
$v\gamma$	0,2302 (0,1071)	0,9163 (0,0000)	0,2162 (0,1302)
cons	0,2707 (0,0581)	0,8379 (0,0000)	0,2064 (0,1485)

Figura 19. Correlação entre as concentrações de IgG anti-intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e cons presentes nas amostras de **soro de Mães**.

Figura 20. Correlação entre as concentrações de IgG anti-intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e cons presentes nas amostras de **soro de RN**.

Figura 21. Correlação entre as concentrações de IgA anti-intiminas vα, vβ, vγ e cons presentes nas amostras de **colostro**.

DISCUSSÃO

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) é um importante agente causador de diarreia infantil em países em desenvolvimento. Em países industrializados, a frequência desses organismos tem diminuído, porém continua sendo um importante agente causador de diarreia (CLARKE et al., 2003; KAPER et al., 2004; NATARO & KAPER, 1998).

Tanto EPEC como EHEC constituem um risco significativo para saúde pública em diferentes partes do mundo. EPEC e EHEC apresentam uma alta homologia na ilha de potogenicidade cromossomal conhecida como *Locus of enterocyte effacement* (LEE). Ambas colonizam a mucosa intestinal produzindo uma lesão histopatológica característica denominada lesão *attaching and effacing* (A/E) (KAPER et al., 2004; KOGA et al., 2003; KUHNE et al., 2004; TRABULSI et al., 2002).

A intimina é uma adesina envolvida na produção da lesão A/E, sendo um fator de virulência presente tanto em EPEC como em EHEC (ADU-BOBIE et al., 1998; OSWALD et al., 2000; KAPER et al., 2004). A importância da intimina para a completa virulência de EPEC foi demonstrado em estudos de infecção por estes patógenos em voluntários, em animais experimentais e em modelos *in vitro* (LEVINE, et al., 1987; DONNENBERG et al., 1993).

A intimina e seu receptor Tir são as principais proteínas efetoras responsáveis pelo desencadeamento da adesão íntima e lesão A/E. A interação intimina-Tir permite a ancoragem da EPEC na superfície da célula hospedeira, inicia processos de sinalização celular e reorganiza os componentes do citoesqueleto para formar o pedestal (GOOSNEY et al., 2000). Já foram descritos vários subtipos de intimina, cada um deles pode estar relacionado com o tropismo tecidual da bactéria para diferentes regiões no intestino (PHILLIPS & FRANKEL, 2000).

A intimina é considerada por vários autores como altamente imunogênica. Anticorpos anti-intimina foram detectados no leite e colostro de mulheres saudáveis, em soros de crianças e adultos saudáveis e em soros de crianças e adultos após infecção com EPEC ou STEC (GANSHEROFF et al., 1999; MARTINEZ et al., 1999; CARBONARE et al., 2003; PALMEIRA et al., 2005).

Em estudos realizados no Brasil, anticorpos anti-intiminas de colostro humano inibiram a adesão bacteriana a células HEP-2, mostrando um importante mecanismo pelo qual o aleitamento materno protege os lactentes contra infecções por EPEC e EHEC (CARBONARE & CARNEIRO-SAMPAIO., 2006; PALMEIRA et al., 2005). A

presença de anticorpos IgA anti-intiminas foi detectada em amostras de leite de mulheres no México e USA em regiões com menor frequência de diarreia bacteriana (NOGUERA-OBENZA et al., 2003).

O contato com antígenos de EPEC acontece cedo em crianças da cidade de São Paulo e de outras cidades brasileiras e anticorpos anti-intiminas, anti LPS e outros fatores de virulência, estão presentes em crianças com idade entre 1 e 2 anos (PALMEIRA et al., 2005). No entanto, durante o primeiro ano de vida as crianças são vulneráveis a gastroenterites de várias etiologias.

A aquisição precoce de anticorpos reativos com fatores de virulência de EPEC por crianças brasileiras saudáveis morando em áreas endêmicas já foi bem demonstrada e pode estar associada com a redução da susceptibilidade a esta infecção, observada em crianças acima de um ano. Até o final do primeiro ano de vida, esses bebês apresentaram um repertório de anticorpos anti-EPEC séricos e salivares equivalente ao dos adultos normais da mesma população (CARBONARE et al., 2003).

Há muito tempo já se sabe que crianças que recebem aleitamento materno são menos vulneráveis às gastroenterites, em especial as causadas por EPEC (VICTORA et al., 1987). No presente trabalho, foi avaliada a transferência de anticorpos anti-intiminas de mãe para filho, pela passagem transplacentária e pelo colostro.

Em trabalho anterior, foi confirmada por PCR a presença dos insertos das diferentes regiões das intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e a região conservada nas bactérias recombinantes utilizadas como fonte de nosso antígeno (Zapata et al., 2009). Em seguida foi realizado o sequenciamento e análise destas amostras, mostrando em todas elas uma identidade de 98% quando comparadas com as amostras do Genbank, e de mais de 60% quando comparadas entre si.

Na primeira etapa de nosso trabalho, a expressão de intiminas foi alcançada com sucesso pela metodologia descrita, obtendo uma quantidade de proteínas suficiente para todos os ensaios, podendo assim determinar a concentração de anticorpos anti-intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e cons em todas as amostras de soro e colostro, utilizando a técnica de ELISA e o mesmo lote de antígenos.

Anticorpos reativos com as regiões variáveis e conservadas das intiminas α , β e γ foram detectados em quase todas as amostras de colostro e soros de mães e RN. Nossos resultados mostraram que há a transferência de anticorpos anti-intiminas da mãe, tanto pela placenta na vida intrauterina, como também pelo colostro para o RN.

No presente trabalho, nos soros das mães e dos RN, as concentrações de anticorpos IgG reativos com a região conservada são mais elevadas em comparação com as concentrações de anticorpos contra cada uma das três regiões variáveis das intiminas, $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$. Este resultado pode ser explicado levando-se em consideração que a região conservada é comum a todos os subtipos de intimina, de modo que os anticorpos reativos com ela estariam presentes em indivíduos que entraram em contato com qualquer subtipo de intimina das bactérias presentes em nosso meio. Além disso, é possível que um mesmo indivíduo seja exposto repetidas vezes a epítopos semelhantes, propiciando uma resposta secundária, com produção mais elevada de anticorpos. Sendo assim, um maior número de indivíduos apresenta anticorpos reativos com a porção conservada, e em níveis mais altos. Esse fato pode ser facilmente visualizado no gráfico que mostra a distribuição de frequências (Fig . A curva referente aos anticorpos reativos com a porção conservada encontra-se deslocada para a direita em relação às demais.

Resultados semelhantes a estes foram obtidos em trabalho anterior realizado em nosso laboratório (ZAPATA et al., 2009), quando foi feita a pesquisa da concentração de anticorpos reativos com as intiminas α , β , γ e cons. em amostras de soro e colostro de indivíduos adultos saudáveis da Grande de São Paulo. As amostras de soro do trabalho referido acima foram obtidas recentemente de doadores do banco de Sangue do Hospital Albert Einstein. As amostras de colostro fazem parte da coleção do laboratório, e haviam sido coletadas de mães atendidas pelo serviço de Obstetrícia do HU, entre 1990 e 2000. Comparando nossos resultados com os obtidos por ZAPATA e cols., levando-se em consideração as médias e medianas, observam-se valores muito próximos em ambos os trabalhos. A análise de variância mostrou que os anticorpos anti-intimina conservada estão em nível significativamente mais alto que anti- $v\alpha$, que por sua vez está mais alto que $v\beta$ e $v\gamma$, mas não há diferença significativa entre $v\beta$ e $v\gamma$. Este padrão é observado no caso dos soros de doadores do trabalho de ZAPATA e cols. e nos soros de mães e RN no presente trabalho.

Como esperado, observamos altos coeficientes de correlação entre os anticorpos nos soros das mães e dos soros dos RN, nos casos de todos os tipos de intiminas, uma vez que os anticorpos dos RN são provenientes da mãe, transferidos pela placenta.

Além disso, também obtivemos altos coeficientes de correlação entre anticorpos anti- $v\alpha$ x anti- $v\beta$, tanto nos soros das mães como também nos soros dos RN, o que indica que pode haver reação cruzada entre os anticorpos IgG para estas intiminas. As

sequências gênicas das porções variáveis das intiminas apresentam mais de 60% de homologia entre si, o que justificaria a ocorrência de anticorpos capazes de reagir cruzadamente.

As intiminas α , β , γ e δ foram as mais encontradas em bactérias isoladas em São Paulo, Rio de Janeiro e Ribeirão Preto (GOMES et al., 2004). A intimina α é encontrada em linhagens de EPEC típica e atípica. A intimina β está associada tanto a EPEC típicas ou atípicas como também a EHEC, enquanto que a intimina γ é encontrada nas EHEC e nas EPEC atípicas. (TRABULSI et al., 2002; WHITTAM et al., 1996). A presença destas linhagens bacterianas isoladas em nosso meio justifica a ocorrência de anticorpos reativos com estas intiminas em indivíduos da nossa população, uma vez que anticorpos anti- $v\alpha$, anti- $v\beta$ e anti- $v\gamma$ estão presentes nos soros e colostros analisados neste trabalho.

Comparando-se os níveis de anticorpos reativos com as diferentes intiminas dos soros das mães com os soros dos RN, foi observada uma alta correlação entre os dois grupos, mas os valores de concentrações dos RN estão ligeiramente mais baixos que os das mães. O cálculo da porcentagem de transferência resultou em valores muito variáveis, de 6,82 até 180%, mas com médias e medianas na faixa de 68,96 a 78,58%. Estes valores estão na mesma faixa observada para a transferência de IgG total.

O sistema imune do RN é relativamente ineficiente. A transferência placentária de anticorpos IgG é um mecanismo importante de proteção para o RN, pois os anticorpos maternos transmitidos *in útero* podem modificar a gravidade de doenças neonatais (ENGLUND, 2007; PALMEIRA et al., 2007).

A diminuição da susceptibilidade a infecção sistêmica em RN tem sido atribuída à transferência de anticorpos maternos contra antígenos O de *E. coli*. PALMEIRA e cols. (2007) encontraram anticorpos IgG reativos contra EHEC O157:H7 e LPS O157 em sangue de cordão em níveis similares aqueles encontrados nas amostras de soro das respectivas mães, demonstrando uma efetiva transferência placentária.

Em trabalhos anteriores, foi demonstrada a presença de anticorpos reativos com diferentes LPS de *E. coli*, como dos sorotipos O111, O55, O157 e O26 em amostras de soro e colostro de população brasileira saudável (ZAPATA et al., 2006, PALMEIRA et al., 2009). Foi também verificada a transmissão transplacentária de anticorpos IgG reativos com LPS O111, O16 e O6, agente etiológico de sepe

neonatal (NAGAO et al., 1998 e 2001; PONTES et al., 2006) além da transferência de anticorpos anti-LPS O157 (PALMEIRA et al., 2007). Nestes trabalhos, foram observados títulos equivalentes de anticorpos entre mãe e RN, mostrando uma taxa de transferência de em torno de 100%.

CARDOSO (2008) avaliou a produção e transferência materno-infantil de anticorpos séricos e secretores anti-polissacarídeos, em mães vacinadas e não vacinadas pela vacina conjugada anti-Hib, para *Haemophilus influenzae* tipo b. Os níveis de transferência variaram entre 50% até 130% de anticorpos anti-Hib e anti-pneumococos, entre as mães não vacinadas e seus RN, nesta mesma população a transferência de IgG total está acima de 80%. Os anticorpos específicos para polissacarídeos de Hib e de pneumococos são do tipo IgG1 e IgG2.

Cabe salientar que as populações estudadas nos trabalhos acima citados são populações de baixa renda com nível sócio econômico mais baixo, vivendo em condições higiênicas e sociais precárias, em comparação com a população estudada na nossa pesquisa. O presente trabalho foi realizado com amostras coletadas recentemente no Hospital Albert Einstein, de mulheres participantes do programa do banco de células de cordão umbilical. Portanto, esta amostragem representa uma população bem distinta das estudadas nos trabalhos anteriores do ponto de vista sócio-econômico.

Uma possível explicação para os valores mais baixos de transferência de anticorpos IgG na nossa amostragem em relação aos outros trabalhos pode ser esta diferença de nível sócio-econômico, já que não há diferença com relação à idade gestacional entre os grupos. Talvez uma menor exposição antigênica da mãe possa resultar em níveis mais baixos de transferência transplacentária. Outro fator a ser considerado é a idade das mães, que no presente trabalho está na faixa de 22 a 36 anos, com média de 32 anos. Talvez a idade da mãe possa ter alguma influência na taxa de transferência, o que poderá ser objeto de estudos futuros.

No presente trabalho, a maioria dos partos foi por cesariana, provavelmente seguindo agendamento prévio. No entanto, a idade gestacional varia de 37 a 41 semanas, o que não justificaria níveis baixos de transferência de IgG, uma vez que esta transferência ocorre em níveis significativos a partir da 30ª semana e aumenta a partir desta data. Segundo ENGLUND (2007), com 33 semanas os níveis de IgG materno e fetal já devem ser equivalentes e com 40 semanas a concentração fetal é mais alta que a da mãe.

As diferentes subclasses de IgG não são transferidas com a mesma eficiência: a subclasse IgG1 é transferida preferencialmente, seguida de IgG3, sendo que IgG2 é a subclasse de menor taxa de transferência (ENGLUND, 2007). Uma explicação possível para as baixas taxas de transferência dos anticorpos anti-intiminas poderia ser a subclasse predominante. No entanto, como as taxas de transferência de IgG total seguiram no mesmo nível, esta hipótese não deve ser o fator predominante.

No presente trabalho, em geral as concentrações de anticorpos SIgA anti-intiminas presentes nas amostras de colostro foram mais altas que as concentrações dos anticorpos IgG nos soros das mães, sugerindo a importância destes anticorpos na proteção do RN.

Dados epidemiológicos sugerem que o risco de desenvolver diarreia pode ser reduzido entre 14 a 24 vezes em crianças amamentadas. As glândulas mamárias são parte integrante do MALT. Linfócitos ativados e anticorpos presentes no leite são resultados de estímulo antigênico do MALT tanto na mucosa intestinal quanto na respiratória (BRANDTZEG, 2003).

NAGAO e cols. (1998), pesquisando anticorpos anti-LPS em soros de recém-nascidos e em soros e colostros de suas mães, observaram que os anticorpos SIgA presentes no colostro reconhecem bandas de LPS de *E. coli* diferentes daquelas reconhecidas por anticorpos do soro, independente da quantidade de anticorpos. O fato de anticorpos do colostro reconhecerem mais bandas que anticorpos do soro pode ser importante para a proteção do RN.

O colostro e leite humanos protegem contra muitos enteropatógenos. Anticorpos presentes no colostro e leite refletem a exposição imunológica da mãe e podem ser utilizados como ferramenta epidemiológica (NOGUERA-OBENZA et al., 2003). Quanto mais precoce o colostro, maior sua concentração de IgA, daí a importância de estimular com muita ênfase todas as alternativas que facilitam a sucção do RN nos primeiros dias de vida, como o alojamento conjunto e o acompanhamento e orientação da mãe em relação à amamentação (STRIKER et al., 2003).

Muitas bactérias são alvo do SIgA presente no leite humano, incluindo *E.coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Clostridium difficile* e *C. botulinum*, *Klebsiella pneumoniae*, também parasitas como *Giardia*, fungos como *Cândida albicans* (LAWRENCE & PANE., 2007) e agentes virais como o rotavírus (Vieira, 2005).

Vários trabalhos anteriores detectaram anticorpos reativos com fatores de virulência de EPEC e EHEC, como intimina, Tir, EspA, EspB, BFP e LPS O111, LPS O157, em amostras de colostro de mulheres brasileiras (CÂMARA et al., 1994; CARBONARE et al., 1997; LOUREIRO et al., 1998, SANCHES et al., 2000, PALMEIRA et al., 2005).

Em amostras de colostro coletadas no Hospital Universitário da cidade de São Paulo, foram encontrados anticorpos IgA reativos contra frações antigênicas de STEC e EPEC, incluindo LPS. Uma banda de 94KDa compatível com a intimina foi reconhecida por todas as amostras, que também inibiram fortemente a adesão de STEC e EPEC à células de cultura. Estes anticorpos representam um importante fator de proteção para o RN, como já sugerido por outros autores (PALMEIRA et al., 2005).

NOGUERA-OBENZA et al. (2003) comparou a ocorrência de sIgA reativos com antígenos de superfície de EHEC presentes em amostras de leite de mulheres dos USA e do México. Ambos os grupos apresentaram SIgA contra vários LPS de EHEC, além de anti-EspA, anti-EspB, anti-intimina e menos freqüentemente anti-toxina shiga. Apenas anticorpos sIgA anti-EspA foram encontrados no leite de ambas as populações de mulheres, levando os autores a apresentar o EspA como alvo para uma estratégia de imunização em humanos.

No presente trabalho, enquanto que nos soros foram observados níveis mais altos de anticorpos IgG reativos com a porção conservada em comparação com as porções variáveis de intiminas, nos colostros isso não ocorreu. Os níveis de anticorpos IgA reativos com $v\alpha$ foram ligeiramente mais baixos que os outros grupos e não houve diferença significativa entre os níveis de anticorpos reativos com as intiminas $v\beta$, $v\gamma$ e cons.

No trabalho desenvolvido por ZAPATA et al. (2009) observamos níveis equivalentes de anticorpos IgA reativos com as intiminas cons, $v\alpha$ e $v\beta$, sem diferença significativa na análise estatística, porém os níveis de anticorpos IgA anti- $v\gamma$ apresentou valores mais baixos comparados com as outras intiminas. Este resultado pode ser um reflexo decorrente da situação epidemiológica das populações estudadas, lembrando que intiminas $v\gamma$ encontram-se em EPEC atípicas, atualmente surgindo como patógenos emergentes.

Até os anos 90 as EPEC típicas foram a principal causa de diarreia infantil no Brasil, mas agora este fato está se tornando menos frequente. Estudos epidemiológicos recentes relatam presença de EPECs atípicas em 78% dos casos em

ciranças menores de 5 anos (OCHOA et al., 2008). A situação da EHEC e ambas as EPEC, típicas e atípicas, no Brasil, apresenta-se semelhante aos países desenvolvidos onde EPEC típicas são raras e EPECs atípicas e EHECs são relativamente frequentes (FRANZOLIN et al., 2005).

A razão desta queda de EPEC típica ainda não foi estabelecida, mas pode ser uma consequência das novas medidas de saúde pública, tais como um mais eficiente controle de infecções hospitalares, ampliação do abastecimento regular de água em muitas favelas e saneamento básico e talvez uma melhor adesão ao aleitamento materno. De fato, recentemente foi divulgado levantamento em que ficou constatada uma diminuição expressiva no número de óbitos por diarreias.

Nas amostras de colostro, foram também observados altos coeficientes de correlação entre os anticorpos IgA reativos com as diferentes intiminas pareados em qualquer ordem. Não foi observada correlação entre os valores obtidos nos soros e colostros das mães, indicando que as resposta de anticorpos IgG séricos e IgA secretórios são independentes entre si.

Os altos coeficientes de correlação nos níveis de anticorpos IgA no colostro para todos os pares de combinação ($\alpha\alpha \times \alpha\beta$) ($\alpha\alpha \times \alpha\gamma$), ($\alpha\alpha \times \text{cons}$), ($\alpha\beta \times \alpha\gamma$), ($\alpha\beta \times \text{cons}$), ($\alpha\gamma \times \text{cons}$) indica que pode haver uma reação cruzada entre anticorpos SIgA. Este fato pode ser explicado porque, além da homologia existente entre as regiões variáveis das diferentes intiminas, os anticorpos SIgA possuem maior avidéz e menor especificidade em comparação com os anticorpos IgG, que apresentam especificidade mais alta na ligação com o antígeno.

A alta concentração de anticorpos anti-intiminas em amostras de colostro pode estar relacionada com o alto efeito protetor da amamentação contra infecção de EPEC em lactantes. Nossos resultados confirmam que anticorpos reativos maternos contra intiminas são transferidos para o seu recém nascido tanto pela placenta como pelo leite materno.

A presença de anticorpos anti-intiminas em população saudável brasileira é esperada diante da prevalência de EPEC na nossa população. Foram encontrados anticorpos reativos com as porções conservada e variável das intiminas α , β e γ em amostras de soros de adultos saudáveis, doadores de sangue, e também em colostro de mulheres saudáveis. O perfil destes anticorpos pode variar dependendo do local e época da coleta e do nível sócio-econômico da população estudada, uma vez que trabalhos anteriores foram realizados com amostras de colostro da coleção do laboratório, que foram obtidas há alguns anos no serviço de Obstetrícia do HU-USP, e

em sua maioria pertencem à comunidade carente residente próximo à Cidade Universitária. Portanto, representam uma situação epidemiológica diferente da nossa situação atual e também representam um grupo sócio-econômico diferente do estudado neste trabalho.

Os resultados aqui mostrados, associados às observações anteriores levam à conclusão de que pode haver uma proteção contra linhagens diarreiogênicas ou não de *E. coli*, conferida por anticorpos que são transferidos pela placenta e pelo aleitamento materno, e que são reativos com diversos fatores de virulência, como LPS, intiminas e possivelmente outros. O estudo da reatividade dos anticorpos reativos com as porções constante e variáveis das intiminas podem levar a uma melhor compreensão das bases moleculares e imunoquímicas da reatividade e especificidade desses anticorpos na proteção do RN contra infecções por EPEC.

CONCLUSÕES

- A técnica de Elisa mostrou-se adequada para a quantificação de anticorpos IgG e IgA anti-intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e cons.
- As taxas de transferência de anticorpos IgG reativos com as intiminas foram semelhantes entre si e também às da IgG total, mostrando que a especificidade do anticorpo anti-intimina não influi na transferência materno-fetal.
- O perfil dos anticorpos anti-intiminas variou dependendo do local e época da coleta das amostras.
- As taxas de transferência de IgG total e específica, em torno de 70%, foram mais baixas que as obtidas por outros autores, o que pode ter sido uma consequência das características do grupo estudado.
- Os altos coeficientes de correlação entre os anticorpos IgA reativos com as diferentes intiminas nas amostras de colostro apontam para a existência de reações cruzadas entre estes anticorpos.
- No colostro, a concentração de anticorpos para todos os tipos de intiminas foi mais alto que a concentração de anticorpos no soro materno reforçando a importância do aleitamento materno na proteção do RN contra EPEC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C.; GONÇALVES, A.G.; TRABULSI, L.R.; DOUCE, G.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G. Detection of intimins α , β , γ and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.662-668, 1998.
- ADU-BOBIE, J.; TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin α E and intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.66, p.5643-5649, 1998.
- ALBERT, M.J.; FARUQUE, S.M.; ANSARUZZAMAN, M.; ISLAM, M.M.; HAIDER, K.; KABIR, I.; ROBINS-BROWNE, R. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. **Journal of Medical Microbiology**, v.37, suppl.1, p.310-314, 1992.
- BACKERT, S.; SELBACH, M. Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within. **Trends in Microbiology**, v.13, p.476-484, 2005.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, M.P.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae- ξ). **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.645-651, 2004.
- BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. **Vaccine**, v.21, p.3382-3388, 2003.
- BRANDTZAEG, P.; FARSTAD, I.N.; HARALDSEN, G. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. **Immunology Today**, v.20, p.267-277, 1999.
- BUERIS, V.; SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.R.; SANTOS, M.F.; FRANZOLIN, M.R.; MARTINEZ, M.B.; FERRER, S.R.; BARRETO, M.L.; TRABULSI, L.R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.839-844, 2007.
- CÂMARA, L.M.C.; CARBONARE, S.B.; SILVA, M.L.M.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to HeLa cells by human colostrums: detection of specific sIgA related to EPEC outer membrane proteins. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.152, p.307-310, 1994.
- CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v.36, p.289-311, 2005.
- CARBONARE, S.B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. QUINTAL, V.S. Imunologia do leite humano. In: ISSLER, H. **O aleitamento materno no contexto atual: política, práticas e bases científicas**. São Paulo: Sarvier, 2008. p.191-203.

CARBONARE, S.B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Composição do leite humano: aspectos imunológicos. In: DIAS-REGO, J. **Aleitamento materno**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2006. p. 103-120.

CARBONARE, C.B.; CARBONARE, S.B.; CARNEIRO-SAMPAIO M.M.S. Early acquisition of serum and saliva antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) virulence-associated proteins by infant living in na endemic area. **Pediatric Allergy and Immunology**, v.14, p.222–228, 2003.

CARBONARE, S.B.; CARBONARE, C.B. Imunidade de mucosas in: GRUMACH, A.S. **Alergia e Imunologia na criança e no adolescente**. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008. p.405-415.

CARBONARE, S.B.; SILVA, M.L.M.; PALMEIRA, P.; CARNEIRO-SAMPAIO M.M.S. Human colostrum IgA antibodies reacting to enteropathogenic *E.coli* (EPEC) antigens and their persistence in the faeces of breast-infant. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, v.15, p.53–58, 1997.

CARBONARE, S.B.; SILVA, M.L.M.; TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Inhibition of HEp-2 cell invasion by Enteroinvasive *Escherichia coli* by human colostrum: detection of specific IgA related to invasion plasmid antigens. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.108, p.113-118, 1995.

CARDOSO, E.C. **Avaliação da transferência mãe-filho de anticorpos séricos e secretórios dirigidos ao polissacarídeo da cápsula de *Haemophilus influenzae* B**. São Paulo, 2008. 80p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de São Paulo.

CORTHESEY, B. Recombinant immunoglobulin A: powerful tools for fundamental and applied research. **Trends in Biotechnology**, v.20, n.2, p.65-71, 2002.

CORTHESEY, B. Secretory immunoglobulin A: well beyond immune exclusion at mucosal surfaces. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.31, p.174-179, 2009.

CLARKE, S.C.; HAIGH, R.D.; FREESTONE, P.P.E.; WILLIAMS P.H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.365-378, 2003.

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.28-34, 2005.

DELNERI, M.T.; CARBONARE, S.B.; SILVA, M.L.M.; PALMEIRA, P.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to HEp-2 cells by colostrum and milk from mothers delivering low-birth-weight neonates. **European Journal of Pediatrics**, v.156, p.493–498, 1997.

DONNENBERG, M.S.; TZIPORI, S.; MCKEE, M.L.; O'BRIEN, A.D.; ALROY, J.; KAPER, J.B. The role of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. **Journal of Clinical Investigation**, v.92, p.1418–1424, 1993.

ELLIOTT, S.J.; HUTCHESON, S.W.; DUBOIS, M.S.; MELLIES, J.L.; WAINWRIGHT, L.A.; BATCHELOR, M. Identification of cesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.33, p.1176–1189, 1999.

ENGLUND, J.A. The influence of maternal immunization on infant immune response. **Journal of Comparative Pathology**, v.137, p.16-19, 2007.

FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I.C.A. *Escherichia coli* infections and malnutrition. **Lancet**, v.356, suppl., p.S27, 2000.

FITZHENRY, R.J.; REECE, S.; TRABULSI, L.R.; HEUSCHKEL, R.; MURCH, S.; THOMSON, M.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D. Tissue tropism of enteropathogenic *Escherichia coli* strains belonging to the O55 serogroup. **Infection and Immunity**, v.70, p.4362-4368, 2002.

FOMSGAARD, A. Antibodies to lipopolysaccharides: some diagnostic and protective aspect. **APMIS, Supplement**, v.98, p.5–38, 1990.

FRANKEL, G.; CANDY, D.C.A.; EVEREST, P.; DOUGAN, G. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*, *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei*. **Infection and Immunity**, v. 62, p.1835-1842, 1994.

FRANZOLIN, M.R.; BARBOSA, R.C.A.; KELLER, R.; TARDELLI, T.A.G.; BEUTIN, L.; LIMA, M.B.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.4, p.359-363, 2005.

FUJIMURA, M.D. **Níveis séricos das subclasses de imunoglobulina G em crianças normais e nefróticas**. São Paulo, 1991. 159p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo.

GARRIDO, P.; BLANCO, M.; MORENO-PAZ, M.; BRIONES, C.; DAHBI, G.; BLANCO, J.; BLANCO, J.; PARRO, V. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. **Clinical Chemistry**, v.52, p.192-201, 2006.

GANSHEROFF, L.J.; WACHTEL, M.; O'BRIEN, A.D. Decreased adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to HEp-2 cells in the presence of Antibodies that recognize the C-terminal region of Intimin. **Infection and Immunity**, v.67, p.6409-6417, 1999.

GIRARD, F.; BATISSON, I.; FRANKEL, G.M.; HAREL, J.; FAIRBROTHER, J.M. Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and Tir in adherence. **Infection and Immunity**, v.73, p.6005-6016, 2005.

GOMES, T.A.; IRINO, K.; GIRÃO, D.M.; GIRÃO, V.B.; GUTH, B.E.; VAZ, T.M.; MOREIRA, F.C.; CHINARELLI, S.H.; VIEIRA, M.A. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p.1851-1855, 2004.

GOOSNEY, D.L.; DEVINNEY, R.; PFUETZNER, R.A.; FREY, E.A.; STRYNADKA, N.C.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. **Current Biology**, v.10, p.735-738, 2000.

HANSON, L.A.; TELEMO, E. Immunobiology and epidemiology of breastfeeding in relation to prevention of infections from a global perspective. In: OGRA, P.L.; MESTECKY, J.; LAMM, M.E.; STROBER, W.; BIENENSTOCK, J.; MCGHEE J.R., eds. **Mucosal immunology**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1999. p.1501-1510.

HERNANDES, R.T.; SILVA, R.M.; CARNEIRO, S.M.; SALVADOR, F.A.; FERNANDES, M.C.; PADOVAN, A.C.; YAMAMOTO, D.; MORTARA, R.A.; ELIAS, W.P.; SILVA BRIONES, M.R.; GOMES, T.A. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. **Cellular Microbiology**, v.10, p.415-425, 2008.

JARVIS, K.G.; GIRON, J.A.; JERSE, A.E.; MCDANIEL, T.K.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type iii secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.7996-8000, 1995.

JENKIS, C.; CHART, H.; SMITH, H.R.; HARTLAND, E.L.; BATCHELOR, M.; DELAHAY, R.M.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Antibody response of patients infected with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* to protein antigens encoded on the LEE locus. **Journal of Medical Microbiology**, v.49, p.97-101, 2000.

JERSE, A.E.; YU, J.; TALL, B.D.; KAPER, J.B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, p.7839-7843, 1990.

JOHANSEN, F.E.; BRANDTZAEG, P. Transcriptional regulation of the mucosal IgA system. **Trends in Immunology**, v.25, n.3, p.150-157, 2004.

JORES, J.; ZEHEMKE, K.; EICHBERG, J.; RUMER, L.; WIELER, L.H. Description of a novel intimin variant (type zeta) en the bovine O84: Nm verotoxin-producing *Escherichia coli* strain 537/89 and the diagnostic value of intimin typing. **Experimental Biology and Medicine**, v.228, n.4, p.370-379, 2003.

KANE, S.V.; ACQUAH, L.A. Placental transport of immunoglobulins: a clinical review for gastroenterologists who prescribe therapeutic monoclonal antibodies to women during conception and pregnancy. **American Journal of Gastroenterology**, v.104, p.228-233, 2009.

KAPER, J.B. Defining EPEC. **Revista de Microbiologia**, v.27, p.130-133, 1996.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.123-140, 2004.

KOGA, P.C.; MENEZES, C.A.; LIMA, A.F.; NARA, J.M.; MAGALHÃES, C.A.; CIANCIARULLO, A.M.; FERREIRA Jr., J.M.C.; TRABULSI, L.R.; MENDES-LEDESMA, M.R.B.; PIAZZA, R.M. Polyclonal anti-intimin antibody: immunological characterization and its use in EPEC and EHEC diagnosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.5-7, 2003.

KNOTTON, S.; SHAW, R.K.; ANANTHA, R.P.; DONNENBERG, M.S.; ZORGANI, A.A. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. **Molecular Microbiology**, v.33, p.499-509, 1999.

KNUTTON, S.; BALDWIN, T.; WILLIAMS, P.H.; MCNEISH, A.S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.57, p.1290-1298, 1989.

KUHNE, S.A.; HAWES, W.S.; LA RAGIONE R.M.; WOODWARD, M.J.; WHITELAM, G.C.; COUGH K. C. Isolation of recombinant antibodies against EspA and intimin of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.7, p.2966-2976. 2004.

LAWRENCE, R.; PANE, C.A. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v.37, p.7-36, 2007.

LEVINE, M.M. *E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, entero-invasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **Journal of Infectious Diseases**, v.155, p.377-389, 1987.

LIMA, F.A. **Estudo da imunogenicidade de intimina de *Escherichia coli* enteropatogênica**. São Paulo, 2004. 82p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo.

LOUREIRO, I.; FRANKEL, G.; ADU-BOBIE, J.; DOUGAN, G.; TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Human colostrums contains IgA antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins: Intimin, BfpA, EspA and EspB. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.27, p.166-171, 1998.

LUO, Y.; FREY, E.A.; PFUETZNER, R.A.; CREAGH, A.L.; KNOECHEL, D.G.; HAYNES, C.A.; FINLAY, B.B.; STRYNADKA, N.C. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. **Nature**, v.405, p.1073-1077, 2000.

MARTINEZ, M.B.; TADDEI, C.R.; RUIZ-TAGLE, A.; TRABULSI, L.R.; GIRÓN, J.A. Antibody response of children with enteropathogenic *Escherichia coli* infection to the bundle-forming pilus and locus of enterocyte effacement-encoded virulence determinants. **Journal of Infectious Diseases**, v.179, p.269-274, 1999.

McDANIELS, T.K.; KAPER J.B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v.23, p.399-407, 1997.

McDANIELS, T.K.; JARVIS, K.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B.A. Genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.1664-1668, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema único de Saúde. **Sistema de informação sobre mortalidade (SIM), DATASUS**. Ministério da Saúde/SUS, 2008.

MORAES-PINTO, M.I.; IAZZETTI, A.V.; FARHAT, C.K. Transporte transplacentário de anticorpos: implicações na proteção do recém-nascido e em estratégias de imunização. **Revista Paulista de Pediatria**, v.19, p.87-92, 2001.

MUSSI-PINHATA, M.M.; REGO, M.A.C. Particularidades imunológicas do pré-termo extremo: um desafio para a prevenção da sepse hospitalar. **Jornal de Pediatria**, v.81, n.1, supl., p.S59-S68, 2005.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.142-201, 1998.

NAGAO, A.T.; MARTINEZ, C.C.; VIEIRA, V.S.; TAKANO, O.A.; COSTA-CARVALHO, B.T.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Placental transfer of IgG and IgG subclass antibodies anti-purified *E. coli* LPS O16, O6 and O111. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.47, p.609-614, 1998.

NAGAO, A.T.; FRIEDLANDER-DELNERO, D.; ARSLANIAN, C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Elevated levels and different repertoire profile of colostral anti-LPS antibodies may have a significant role in compensating newborn immunity **Scandinavian Journal of Immunology**, v.53, p.602-609, 2001.

NISHIMURA, T. Expression of potential lymphocyte trafficking mediator molecules in the mammary gland. **Veterinary Research**, v.34, p.3-10, 2003.

NOGUEIRA-OBENZA, M.; OCHOA, T.J.; GOMEZ, H.F.; GUERRERO, M.L.; HERRERA-INSUA, I.; MORROW, A.L.; RUIZ-PALACIOS, G.; PICKERING, L.K.; GUZMAN, C.A.; CLEARY, T.G. Human milk secretory antibodies against attaching and effacing *Escherichia coli* antigens. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.5, p.545-551, 2003.

NOUGAYRÈDE, J.P.; FERNANDES, P.J.; DONNENBERG, M.S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cellular Microbiology**, v.5, p.359-372, 2003.

NUÑEZ, S.P.; CARBONARE, C.B.; ZAPATA-QUINTANILLA, L.B.; CARBONARE, S.B. Seric and secretory antibodies reactive with intimins α , β and γ in healthy Brazilian mothers and cord sera of their newborns. **Memórias do Instituto Butantan**, v.65, p.2-47, 2008.

OCHOA, T.J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, n.9, p.852-856, 2008.

OSWALD, E.; SHMIDT, H.; MORABITO, S.; KARCH, H.; MARCHES, O.; CAPRIOLI, A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *E.coli*: characterization of a new intimina variant. **Infection and Immunity**, v.68, p.64-71, 2000.

PALMEIRA, P.; CARBONARE, S.B.; AMARAL, J.A.; TINO-DE-FRANCO, M.; CARMEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Colostrum from healthy Brazilian women inhibits adhesion and contains IgA antibodies reactivity with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **European Journal of Pediatrics**, v.164, p.37-43, 2005.

PALMEIRA, P.; YU, ITO, L.; ARSLANIAN, C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. Passive immunity acquisition of maternal anti-enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 IgG antibodies by the newborn. **European Journal of Pediatrics**, v.166, p.413-419, 2007.

PALMEIRA, P.; CARBONARE, S.B.; GUTH, B.E.C.; CARBONARE, C.B.; PONTES, G.N.; TINO-DE-FRANCO, M.; ZAPATA, L.B.Q.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Acquisition of serum antibodies reactive with enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence-associated factors by healthy Brazilian children and adults. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.28, n.12, p.1089-1094, 2009.

PHILLIPS, A.D.; FRANKEL, G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. **Journal of Infectious Diseases**, v.181, p.1496-1500, 2000.

PHILLIPS, A.D.; NAVABPOUR, S.; HICKS, S. DOUGAN, G.; WALLIS, T.; FRANKEL, G. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. **Gut**, v.47, p.377-381, 2000.

PONTES, G.N.; MASSIRONI, S.G.; ARSLANIAN, C.; FRIEDLANDER-DEL NERO, D.L.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; NAGAO, A.T. Protective activity of the antilipopolysaccharide antibodies from human cord serum. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.47, n.3, p.405-413, 2006.

QUIROGA, M.; OVIEDO, P.; CHINEN, I.; Asymptomatic infections by diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Misiones, Argentina, during the first twenty months of their lives. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.42, n.1, p.9-15, 2000.

SANGER, J.M.; CHANG, R.; ASHTON, F.; KAPER, J.B.; SANGER, J.W. Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v.34, p.279-287, 1996.

ROOPENIAN, D.; AKILESH, S. FcRN: the neonatal Fc receptor comes of age. **Nature Reviews Immunology**, v.7, p.715-725, 2007.

SANCHES, M.A.; KELLER, R.; HARTLAND, E.L.; FIGUEIREDO, D.M.M.; BATCHELOR, M.; MARTINEZ, M.B.; DOUGAN, G.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; FRANKEL, G.; TRABULSI, L.R. Human colostrum and serum contain antibodies reactive to the intimin-binding region of the enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimina receptor. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.30, p.73-77, 2000.

STRIKER, G.A.J.; CASSANOVA, L.D.; NAGAO, A.T. Correlação entre a paridade e a concentração de imunoglobulinas A, G e M no colostro materno. **Einstein**, v.1, p.95-98, 2003.

TARR, C.L.; WHITTAM, T.S. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.479-487, 2002.

TERUYA, K.; COUTINHO, S.B. Sobrevivência infantil e aleitamento materno. In: DIAS-REGO, J. **Aleitamento materno**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002. p.5-19.

TOPOROVSKI, M.S.; MIMICA, I.M.; CHIEFFI, P.P.; PASCHOALOTTI, M.A.; DIAS, A.M.G.; SILVA, C.B. Acute diarrhea in children less than 3 years of age: Enteropathogens isolated in patients' stools, compared with a control group. **Journal of Pediatrics**, v.75, n.2, p.97-104, 1999.

TOUZÉ, T.; HAYWARD, R.D.; ESWARAN, J.; LEONG J.M.; KORONAKIS, V. Self-association of EPEC intimin mediated by the β -barrel-containing anchor domain: role in clustering of the Tir receptor. **Molecular Microbiology**, v.51, p.73–87, 2004.

TRABULSI, L.R.; FRANZOLIN, M.R.; CAMPOS, L.C.; TADDEI, C.R.; BUERIS, V.; PEREIRA-ELIAS, W.; PIAZZA, R.M.F. Infecções Intestinais causadas por *Escherichia coli*. In: VERONESSI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2005. p.981-985.

TRABULSI, L.R.; CARNEIRO SAMPAIO, M. Microbiota ou flora normal do corpo humano. In: Trabulsi, L.R.; ALTERTHUM, F. (Org). **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. v.1, p.101-109.

TRABULSI, T.R.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.508–513, 2002.

TZIPORI, S.; GIBSON, R.; MONTANARO, J. Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factors. **Infection and Immunity**, v.57, p.1142-1150, 1989.

VALLANCE, B.A.; FINLAY, B.B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.16, p.8799-8806, 2000.

VICTORA, C.G.; SMITH, P.G.; VAULGHAN, J.P.; NOBRE, L.C.; LOMBARDI, C.; TEIXEIRA, A.M.B.; FUCHS, S.M.C.; MOREIRA, L.B.; GIGANTE, L.P.; BARROS, F.C. Evidence for protection by breastfeeding against infants deaths from infectious disease in Brazil. **Lancet**, v.2, p.319-321, 1987.

VIDAL, J.E.; CANIZÁLES-ROMAN, A.; GUTIERREZ-JIMENEZ, J.; NAVARRO-GARCIA, F. Patogénese molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. **Salud Pública de México**, v.49, n.5, p.376-386, 2007.

VIEIRA, P.D. **Padronização de metodologia para pesquisa de anticorpos da classe IgA anti-rotavirus no leite e colostro humanos**. São Paulo, 2005. 62p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade São Paulo.

WHITTAM, T.S.; MCGRAW, E.A. Clonal analysis of EPEC serogroups. **Revista de Microbiologia**, v.27, p.7–16, 1996.

WHO. *World health report 2002: reducing risk, promoting healthy life*. Geneva: World health organization, 2002.

YU, J.; KAPER, J.B. Cloning and characterization of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular Microbiology**, v.6, p.411–417, 1992.

ZAPATA-QUINTANILLA, L.B.; PALMEIRA, P.; TINO-DE-FRANCO, M.; AMARAL, J.A.; CARBONARE, C.B.; CARBONARE, S.B. Systemic antibody response to diarrheagenic *Escherichia coli* and LPS O111, O157 and O55 in healthy Brazilian adults. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.64, p.661-667, 2006.

ZAPATA-QUINTANILLA, L.B.; PALMEIRA, P.; TINO-DE-FRANCO, M.; NUÑEZ-VACA, S.P.; CARBONARE, C.B.; VULCANO, A.B.; CARBONARE, S.B. Seric and secretory antibodies reative to α , β and γ intimins of *Escherichia coli* in healthy Brazilian adults. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.57, p.32-39, 2009.

ZHANG, W.L.; KOHLER, B.; OSWALD, E.; BEUTIN, L.; KARCH, H.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; SUERBAUM, S.; SCHMIDT, H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.4486–4492, 2002.

PARECER CONSUBSTANCIADO

Processo CEP/Einstein nº 06/434

CAAE 0053.0.028.028-06

Título: "Detecção de anticorpos anti-intiminas alfa, beta e gama de *Escherichia coli* em soro e colostro de mãe e em soro do cordão do seu recém-nascido",

Pesquisador Responsável: Sílvia Patrícia Nunez

Instituição: Hospital Israelita Albert Einstein

Área temática: Genética Humana

Entrada no CEP/Einstein: 23/06/2006

Nº total de sujeitos de investigação: 100

Patrocinador: Fapesp

Objetivo:

- Verificar a presença de anticorpos reativos com as porções variáveis e constantes das intiminas alfa, beta e gama de *Escherichia coli* em soro e colostro de mãe e em soro do cordão do seu recém-nascido, avaliando entre outros a imunidade naturalmente adquirida e a proteção que o colostro e o leite materno apresentam para o recém-nascido.

Sumário:

Trata-se de uma tese de mestrado do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan sobre os anticorpos anti-intimina presentes no soro e colostro de mães e em soro do cordão do respectivo recém-nascido, devido a capacidade inibitória destes anticorpos na adesão bacteriana, o que os capacita como forte candidato a componente vacinal. A *Escherichia coli* enteropatogênica é o principal agente etiológico de diarreias agudas em crianças até um ano de idade no Brasil.

ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

Comentários:

Cerca de 50 amostras pareadas de 4 ml de soros e colostros serão coletados no HIAE sendo que as amostras de soro materno e do RN estariam armazenadas no Laboratório de Células Tronco do HIAE e as amostra de colostro seriam obtidas pela equipe de nutricionistas do Banco de Leite. As amostras bacterianas são provenientes do Instituto Butantan. O protocolo apresenta a completa descrição da metodologia técnica a ser utilizada e as amostras serão armazenadas por cinco anos no Laboratório do Instituto Butantan de acordo com as normas estabelecidas pela Res. CNS 347.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido CLE é sucinto e está escrito em linguagem acessível, e seu conteúdo contempla o item IV da Res. CNS 196 e V.1 Res. CNS 340.

Diante do exposto, o Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96 manifesta-se por aprovar o protocolo supracitado.

Situação: PROJETO APROVADO

Prof. Dr. José Pinus

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do Hospital Israelita Albert Einstein

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

Ofício CEP/FCF/41/2009

São Paulo, 30 de março de 2009.

Ilmo(a). Sr(a).
Silvia Patrícia Nuñez
Profa. Dra. Solange Barros Carbonare
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 30 de março de 2009, tomou ciência do projeto "Detecção de anticorpos anti-intiminas α , β e γ de 'Escherichia coli' em soro e colostro de mãe e em soro do cordão do seu recém-nascido" (Protocolo CEP nº 502) apresentado por Vossa Senhoria.

No entanto, tendo em vista já ter iniciado a pesquisa, este Comitê não poderá emitir parecer.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Vice-Coordenadora em exercício
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/FCF/USP

ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

São Paulo, 05 de julho de 2006

Processo CEP/Einstein nº 06/434

CAAE 0053.0.028.028-06

Título: "Detecção de anticorpos anti-intiminas alfa, beta e gama de *Escherichia coli* em soro e colostro de mãe e em soro do cordão do seu recém-nascido".

Pesquisador Responsável: Silvia Patricia Nuñez

Ilma. Sra.

Silvia Patricia Nuñez

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein **analisou e aprovou** o projeto de pesquisa supracitado, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Aproveitamos a oportunidade para orientar o pesquisador sobre os seguintes itens:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV. 2d).
- O Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III. 3z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V. 3) que requeiram ação imediata.

ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).
- De acordo com a carta Circular nº 037 CONEP/CNS/MS os projetos de pesquisa na área de Genética Humana, consoantes com a Resolução CNS nº 340, são avaliados pelo CEP Institucional sendo enviado à CONEP somente os casos explicitados no item VI.3 da Resolução citada.
- Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em 05 de janeiro de 2007.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Pinus
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do Hospital Israelita Albert Einstein

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS FR - 97369

Projeto de Pesquisa
Obtenção de anticorpos anti-níveis, gta, beta e gama de *Yersinia coli* em soro e colostro de mãe e em soro de cordão do seu recém-nascido.

Área de Conhecimento 3.00 - Ciências Biológicas - 3.11 - Imunologia	Grupo Grupo 1	Nível
--	------------------	-------

Área(s) Temática(s) Especial(is) Genética Humana	Faixa Níveis Aplic
---	-----------------------

Unidades
Yersinia coli, doméus, anticorpos, infênica

Sujeitos na Pesquisa

NP de Sujeitos no Centro 100	Total Brasil 100	NP de Sujeitos Total 100	Grupos Especiais
Presença NÃO	Medicamentos PIV / AIDS NÃO	Wash-out NÃO	Seu Tratamento Específico NÃO
			Serviço de Material Biológico SIM

Pesquisador Responsável

Pesquisador Responsável Sélio Patrício Rufes	CPF 144.113.689-62	Identidade RNE VCM0005-K
Área de Especialização ANÁLISES CLÍNICAS	Mestr Titulação FARMACÉUTICA BIOQUÍM	Nacionalidade BOLIVIANA
Endereço RUA CERRO CORÁ Nº514 APT 134-B	Bairro ALTO DA LAPA	Cidade SÃO PAULO - SP
Código Postal 05061-100	Telefone 11-37470406 / 11-35213613	Fax 11-37470406
		E-mail shirapru@maraton.br

Termo de Compromisso
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 195/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para as fins previstos no protocolo e publicar os resultados segundo eles for possível ou não.
Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima
Data: 19.1.06.2006
Assinatura

Instituição Onde Será Realizado

Nome Hospital Israelita Albert Einstein	CNPJ 05.795.803/0001-30	Nacional/Internacional Nacional
Unidade/Órgão Laboratório de Células Tronco	Participação Estrangeira NÃO	Projeto Multicêntrico NÃO
Endereço Av Albert Einstein, 627	Bairro Morumbi	Cidade São Paulo - SP
Código Postal 05651-901	Telefone (11) 3747-1233	Fax
		E-mail cep@einstein.br

Termo de Compromisso
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 195/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.
Nome: Amélia de Paula Ribeiro
Assinatura
Data: 15.1.06.06

Vinculada

Nome Instituto Butantan	CNPJ 01.821.344/0001-88
Endereço Av Vital Brasil, 1500	Bairro Butantan
Cidade São Paulo - SP	
Código Postal 05505-900	Telefone (11) 37267962
Fax	E-mail fanco@butantan.gov.br
Responsável <u>Roberto de Almeida</u>	Cargo / Função <u>Coordenador de Laboratório</u>

Patrocinadora

Nome Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP	CNPJ 50.944.053/0001-10
Endereço Rua Pio X, 1500	Bairro Alto da Lapa
Cidade São Paulo - SP	
Código Postal 05469-901	Telefone 3645-2383
Fax (11) 3636-4000	E-mail
Responsável	Cargo / Função

19.1.06.06

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada a participar, como voluntária da pesquisa:

DETECÇÃO DE ANTICORPOS QUE PROTEGEM OS BEBÊS DE DIARRÉIA EM SORO E COLOSTRO DE MÃES E SOROS DE CORDÃO DO SEU RECEM-NASCIDO.

Sua participação é muito importante, mas não é obrigatória, sendo que você poderá desistir a qualquer momento e retirar seu consentimento.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e endereço da pesquisadora principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

NOME DA PESQUISA: Detecção de anticorpos anti-intimina α , β e γ de *Escherichia coli* em soros e colostros das mães e soros de cordão do seu recém-nascido

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Silvia Patricia Nuñez

ENDEREÇO: Av. Dr. Vital Brasil, 1500 Laboratório de Imunogenética-Instituto Butantan.

TELEFONE: 3726-7222 ramal 2146

PESQUISADORES PARTICIPANTES: Profa. Dra. Solange Barros Carbonare – Pesquisador Científico VI

PATROCINADOR: FAPESP

O objetivo desta pesquisa é verificar se a mãe apresenta no seu soro e no seu colostro anticorpos que protegem os bebês de diarreias provocadas pela bactéria *Escherichia coli*, e também se estes anticorpos protetores foram transferidos para o bebê verificando a presença deles no soro do cordão umbilical.

Este estudo será muito importante para se entender melhor como podemos proteger os bebês da diarreia infantil.

Participando da pesquisa você autorizará a coleta do seu colostro (primeiro leite até três dias após o parto) realizada pela equipe de nutricionistas do Banco de Leite. Será feita apenas uma coleta de no máximo 10ml no período entre as mamadas do seu bebê.

Essa coleta não afeta o seu bem estar nem o desenvolvimento do seu filho, ocorrendo qualquer desconforto a coleta poderá ser suspensa.

Não haverá nenhum gasto nem receberá nenhum pagamento com a sua participação.

Ao final da pesquisa será informada dos resultados.

Nem seu nome nem do seu filho serão mencionados garantindo assim a sua privacidade.

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, _____ RG Nº _____,

Declaro que li todas as informações contidas nesse documento, fui devidamente informada dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/ reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, concordando ainda em participar da pesquisa. Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento sem que isso leve a qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

LOCAL E DATA:

NOME E ASSINATURA DA PARTICIPANTE

Nome por extenso

Assinatura

Mae/RN	Idade da Mae	Tipo de parto	Idade Gestacional		Sexo RN	Peso RN
			Semanas	Dias		
1	36	Cesárea	41	0	F	3710
2	31	Cesárea	38	0	F	3200
3	35	Vaginal	38	6	M	3170
4	32	Vaginal	40	2	F	3280
5	34	Cesárea	39	1	M	3555
6	29	Cesárea	37	4	F	3230
7	30	Cesárea	37	0	F	3070
8	29	Vaginal	38	0	F	3350
9	31	Cesárea	39	0	M	3185
10	33	Cesárea	39	0	F	2630
11	35	Cesárea	40	6	M	3960
12	27	Cesárea	38	2	M	2800
13	31	Cesárea	37	5	M	3570
14	35	Cesárea	39	1	F	2950
15	30	Cesárea	39	6	M	3600
16	32	Cesárea	37	0	M	3700
17	36	Cesárea	38	3	F	3260
18	32	Cesárea	39	6	M	3000
19	32	Cesárea	38	3	M	3420
20	33	Cesárea	39	0	F	3450
21	26	Cesárea	39	4	F	3475
22	32	Forceps	39	0	M	3070
23	32	Cesárea	38	1	M	3420
24	34	Vaginal	39	3	F	3550
25	32	Cesárea	39	5	M	3450
26	26	Cesárea	38	6	M	3125
27	32	Cesárea	39	2	F	3160
28	25	Cesárea	38	0	F	2690
29	34	Cesárea	36	0	M	3115
30	27	Cesárea	37	0	F	3350
31	34	Cesárea	37	3	M	3640
32	25	Cesárea	39	1	M	3200
33	34	Cesárea	38	4	M	3320
34	36	Cesárea	40	5	F	4570
35	35	Cesárea	39	0	F	2905
36	33	Cesárea	37	1	M	3245
37	30	Cesárea	38	1	F	3095
38	29	Cesárea	38	0	F	2890
39	22	Vaginal	39	0	M	3275
40	28	Cesárea	39	3	F	3130
41	34	Cesárea	39	6	F	3530
42	32	Cesárea	38	1	M	3520
43	31	Vaginal	38	1	F	2820
44	34	Cesárea	39	6	M	3945
45	33	Cesárea	36	2	F	2170
46	30	Cesárea	39	0	M	3610
47	32	Vaginal	38	0	M	2945
48	32	Cesárea	39	3	F	2640
49	30	Cesárea	38	1	F	3055
50	30	Cesárea	39	5	M	3645

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 2056563/1 - Silvia Patricia Nunez Vaca

Email: spnunez@usp.br
Data de Nascimento: 15/04/1970
Cédula de Identidade: RNE - V046565K - DF
Local de Nascimento:
Nacionalidade:
Graduação: Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 1992
Graduação: FARMACIA-BIOQUIMICA - MODALIDADE ANALISES CLINICAS E TOXICOLOGICAS - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 1992

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 12/07/2007
Início da Contagem de Prazo: 12/07/2007
Data Limite: 12/01/2010
Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Dulcineia Saes Parra Abdalla - 12/07/2007 a 21/08/2007 E.Mail: dspa@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Solange Barros Carbonare - 22/08/2007 até o presente. E.Mail: carbosol@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 12/07/2007
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 23/06/2009
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 12/07/2007
Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2009

Situação Atual: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2009**Impresso em:** 10/01/10 22:04:43

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 2056563/1 - Silvia Patricia Nunez Vaca

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757 - 1/2	Seminários em Análises Clínicas II	06/08/2007	18/11/2007	30	2	75.0	A	N	Concluída
FBC5717 - 4/2	Tópicos Avançados sobre Imunoquímica de Antígenos	20/08/2007	10/09/2007	75	0	0.0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5701 - 4/1	Fatores de Virulência no Diagnóstico das Infecções Bacterianas	22/10/2007	30/11/2007	75	0	0.0	-	N	Matrícula cancelada
BTC5700 - 6/3	Economia de Projetos Biotecnológicos (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	07/03/2008	19/06/2008	75	5	85.0	A	N	Concluída
EDF5841 - 3/3	Filosofia da Educação XXXIX: Epistemologia e Educação (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2008	02/06/2008	120	8	100.0	A	N	Concluída
FBC5793 - 8/2	Seminários em Análises Clínicas	11/03/2008	23/06/2008	30	2	77.0	A	N	Concluída
MIP5715 - 3/3	Hepatites por Vírus (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	05/05/2008	26/05/2008	90	6	100.0	B	N	Concluída
BMI5700 - 6/1	Sorologia	15/10/2008	28/10/2008	60	4	100.0	A	N	Concluída
MIP5730 - 1/3	Biologia Molecular Aplicada ao Banco de Sangue (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	05/05/2009	01/06/2009	60	4	100.0	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de dissertação	
Disciplinas:	25	25	31
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	31

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.