



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

SUELLEN ALVES FREIRE

EFEITO INIBITÓRIO DO COLOSTRO HUMANO SOBRE BIOFILME DE
Escherichia coli

FORTALEZA

2014

SUELLEN ALVES FREIRE

EFEITO INIBITÓRIO DO COLOSTRO HUMANO SOBRE BIOFILME DE
Escherichia coli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lilia Maria Carneiro Câmara.

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Cibele Barreto Mano de Carvalho.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- F935e Freire, Suellen Alves.
Efeito inibitório do colostro humano sobre biofilme de *Escherichia coli.*/ Suellen Alves Freire.– 2014.
77 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Mestrado em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Microbiologia Humana e Animal.
Orientação: Profa. Dra. Lilia Maria Carneiro Câmara.
Co-Orientação: Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho.
1. Colostro. 2. Biofilmes. 3. *Escherichia coli.* I. Título.

SUELLEN ALVES FREIRE

**EFEITO INIBITÓRIO DO COLOSTRO HUMANO SOBRE BIOFILME DE
*Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Magda Maria Sales Carneiro
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Cibele Barreto Mano de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Lilia Maria Carneiro Câmara (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

*À minha mãe, Gorete Alves e ao meu marido,
Rivanildo Alves.*

AGRADECIMENTO

A Deus, pois Se fez sempre presente, transformando a fraqueza em força e a derrota em vitória. Reconheço que o tempo todo o Senhor me amou e que sem a Sua misericordiosa graça e intervenção nada disso seria possível. Não sou mais a mesma, pois amadureci ao enfrentar os vários obstáculos, mas agora tudo é felicidade, pois atingi o meu objetivo, graças a Suas mãos divinas.

À minha mãe, Maria Gorete Alves Freire, por seu apoio constante, confiando em meus atos, em minhas palavras e até mesmo em meu silêncio e por, em sua renúncia, depositar em mim a esperança de uma vitória.

Ao meu marido, Rivanildo Alves de Araújo, que, apesar das dificuldades, sempre está presente. Seu abraço, seu sorriso, suas palavras, foram extremamente importantes na minha caminhada. Você é para mim um exemplo de esperança, aprendizado e amadurecimento. Amo você!

Ao meu pai, Wellington Freire Melo e às minhas irmãs, Nielen e Kellen Alves, pelo amor, carinho, incentivo e apoio constante.

À minha família à qual devo muitas alegrias.

À minha sogra, Ivonilde Barros, pelo carinho, apoio constante e orações.

Aos meus amigos, por compreenderem quando eu estava ausente e por me receberem com carinho em nossos encontros.

À minha orientadora, Lilia Maria Carneiro Câmara. Obrigada pelos ensinamentos, compromisso, incentivo, dedicação e paciência.

À minha co-orientadora, Cibele Barreto Mano de Carvalho. Obrigada pelas orientações, disponibilidade e acesso ao seu laboratório.

Às minhas amigas do laboratório, Camila, Fabíola, Eliane e Isabel pela amizade, convivência e aprendizados diários.

Aos colegas do laboratório de Bacteriologia Médica, Bruno, Naiara, Olavo, Elvira e especialmente, Cecília, pela disponibilidade, compreensão e ajuda constante.

Ao Prof. Dr. André Coelho, pela disposição a nos ajudar no fracionamento do colostro.

À Dr^a Rosemayre Freire, pela ajuda na realização da Microscopia de Escaneamento Confocal.

À Banca Examinadora pela disponibilidade e orientação imprescindíveis para a realização desse estudo.

Aos Docentes do Programa de Microbiologia Médica, pela oportunidade de aprender com eles os desafiadores caminhos da ciência.

Às mães que participaram do nosso estudo, concedendo o seu valioso leite para realizar os nossos experimentos.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À UFC pela oportunidade de realizar esse mestrado

“Ela acreditava em anjo e, porque acreditava,
eles existiam.” (*Clarice Lispector*)

RESUMO

Há inúmeras evidências epidemiológicas indicando ação protetora do leite humano contra uma série de microrganismos com os quais o bebê entrará em contato na vida pós-natal, principalmente do trato respiratório e intestinal. Dentre os seus vários componentes, a IgA é uma das imunoglobulinas mais importantes e está presente em grande quantidade no colostro. No Brasil, a *Escherichia coli*, bacilo gram-negativo, tem sido apontada como o agente mais isolado em crianças hospitalizadas, e que, frequentemente, não foram amamentadas, acometendo episódios de diarreia graves, sepse e meningite neonatal. Um dos seus principais fatores de virulência é a formação de biofilme, que confere proteção contra a ação de biocidas e de produtos tóxicos. A pesquisa objetivou estudar o efeito *in vitro* do colostro humano puro e diluído e duas frações de proteínas purificadas (IgA1 e demais proteínas do colostro) sobre o biofilme em formação e o formado de *E. coli*. A biomassa foi mensurada por coloração com cristal violeta (CV) 0,4 % e a viabilidade do biofilme por contagem de colônias em placas de ágar. Além disso, utilizou-se microscopia óptica de campo claro por coloração das lâminas com Vermelho Congo-Carbol Fucsina e microscopia de escaneamento confocal utilizando o reagente *LIVE/DEAD*[®] *BacLight* para visualização do biofilme. Observou-se um efeito inibitório dose dependente no biofilme em formação, através do ensaio de biomassa com CV ($p < 0,001$). Este dado correlacionou com os resultados obtidos no ensaio de viabilidade do biofilme por contagem de colônias que também mostrou uma redução do número de células viáveis ($p < 0,01$). Estes resultados foram confirmados por microscopia, onde as menores diluições do colostro e as frações também apresentaram um efeito inibitório, mostrando a formação de grumos semelhantes à aglutinação, com ênfase na ação da IgA1. Dados obtidos pela microscopia de escaneamento confocal mostraram uma diminuição da área total de biofilme e um aumento significativo de bactérias mortas. Quanto à ação sobre o biofilme formado, os dados mostraram diminuição da biomassa também de forma dose dependente, além da diminuição da viabilidade bacteriana. Portanto, o soro do colostro e suas frações purificadas têm efeito inibitório dose-dependente, diminuindo o biofilme em formação e o formado de *E. coli*.

Palavras-chave: Colostro. *Escherichia coli*. Biofilme.

ABSTRACT

There are numerous epidemiological evidence indicating protective effect of human milk against a number of microorganisms with which the baby will come into contact in postnatal life, particularly of the respiratory and intestinal tract. Among its various components, IgA is a major immunoglobulin and is present in large quantities in colostrum. In Brazil, *Escherichia coli*, gram-negative bacillus, has been identified as the most frequently isolated agent in hospitalized children, and often were not breastfed, affecting episodes of severe diarrhea. One of its major virulence factor is the formation of biofilm, which protects against the action of biocides and toxic products. The research aimed to study the *in vitro* effect of pure and diluted human colostrum and two purified protein fractions (IgA1 and other proteins colostrum) on formation and formed *E. coli* biofilm. Biomass was measured by staining with crystal violet (CV) 0.4% and viability of the biofilm by colony count on agar plates. In addition, brightfield optical microscopy was used to stain the slides with Congo Red - Carbol-Fuchsin and confocal scanning microscopy using the reagent LIVE/DEAD BacLight®. There was a dose dependent inhibitory effect on biofilm formation by biomass assay by CV ($p < 0.001$). This data correlated with results of test viability of the biofilm by colony count that also showed a reduction in the number of viable cells ($p < 0.01$). These results were confirmed by microscopy, where the lower dilutions of colostrum and fractions had also an inhibitory effect, showing the formation of clumps similar to the agglutination, with emphasis on the action of IgA1. Data obtained by confocal scanning microscopy showed a decrease in total biofilm area and a significant increase in dead bacteria. With regard to formed biofilm, the data also showed reduced biomass dose-dependent manner, and decrease bacterial viability. Therefore, colostrum serum and their purified fractions have inhibitory effect, decreasing biofilm formation and formed *E. coli*.

Keywords: Colostrum, *Escherichia coli*. Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Efeito dose dependente do colostro humano sobre a formação de biofilme de <i>E. coli</i> (ATCC® 25922™)	47
Figura 2 – Fotos representativas dos ensaios de viabilidade do biofilme em formação por contagem de colônias em Ágar <i>Mac Conckey</i>	48
Figura 3 – Relação entre a biomassa (índice) e a viabilidade por contagem de colônias (Log ₁₀ CFU/mL) do biofilme em formação de <i>E. coli</i> (ATCC® 25922™) na presença de colostro humano em diferentes diluições.....	49
Figura 4 – Comparativo entre a microscopia óptica de campo claro e confocal da formação de biofilme de <i>E. coli</i> (ATCC® 25922™) na presença de colostro humano diluído e frações	51
Figura 5 – Efeito das diluições do colostro humano sobre o biofilme formado de <i>E. coli</i> (ATCC® 25922™)	52
Figura 6 – Fotos representativas dos ensaios de viabilidade do biofilme formado por contagem de colônias em Ágar <i>Mac Conckey</i>	54
Figura 7 – Microscopia óptica de campo claro do biofilme formado de <i>E. coli</i> (ATCC® 25922™) na presença de colostro humano.....	55
Figura 8 – Microscopia de escaneamento confocal do biofilme formado de <i>E. coli</i> (ATCC® 25922™) na presença de colostro humano.....	56
Figura 9 – Purificação da IgA1 de colostro humano por cromatografia de afinidade em colunas de Sepharose-frutalina e análise eletroforética das frações	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito do soro de colostro humano sobre biofilme formado de <i>E. coli</i> (ATCC® 25922™), variando o tempo de incubação do colostro.....	42
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/E	<i>Attaching and Effacing</i>
AD	Adesão Localizada
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BFP	<i>Bundle-forming pilus</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CFU	<i>Colony-forming Unit</i>
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i>
Col	Colostro
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CS	Componente secretor
CV	Cristal Violeta
DAEC	<i>Escherichia coli</i> que adere difusamente
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica
DM	Diabetes mellitus
DO	Densidade Ótica
DOc	Densidade ótica do <i>cut-off</i>
DP	Desvio-padrão
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPEC	<i>Echerichia coli</i> enteropatogênica
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substance</i>
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
F1	Fração rica em IgA1
F2	Fração de proteínas do colostro sem IgA1
GM-CFS	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
gp	Glicoproteína

HAMLET	<i>Human alfa-lactalbumin made lethal to tumor cells</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> type b
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
InPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica intrainestinal
ITU	Infecção do trato urinário
L/D	Razão <i>Live/Dead</i>
LabBmol	Laboratório de Biotecnologia Molecular
LIME	Laboratório de Imunologia Médica
Log	Logarítimo
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Termo-lábil
McF	Mcfarland
M-CFS	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MEAC	Maternidade Escola Assis Chateaubriand
MNEC	<i>Escherichia coli</i> que causa meningite neonatal
Neg	Controle negativo
OPD	Ortofenilendiamina
PAGE	<i>Poliacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pEAF	Plasmídeo <i>EPEC Adherence Factor</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
Pos	Controle positivo
RN	Recém-nascido
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SIgA	<i>Secretory IgA</i>
ST	Termo-estável
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de Toxina Shiga
Stx	Toxina Shiga

TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	<i>T helper</i>
Tir	<i>Translocation intimin receptor</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Papel imunológico do leite materno	18
2.1.1	<i>Componentes do leite materno e suas funções anti-infecciosas</i>	19
2.1.1.1	<i>Elementos celulares</i>	20
2.1.1.2	<i>Fatores humorais específicos</i>	21
2.1.1.3	<i>Fatores inespecíficos</i>	25
2.2	<i>Escherichia coli</i>	29
2.3	Biofilme	32
3	HIPÓTESES	35
4	OBJETIVOS	36
4.1	Objetivo Geral	36
4.2	Objetivos Específicos	36
5	MATERIAIS E MÉTODOS	37
6	RESULTADOS	46
7	DISCUSSÃO	57
8	CONCLUSÃO	63
9	PERSPECTIVAS	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	APÊNDICE A – TCLE	74
	APÊNDICE B – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	75
	ANEXO A – SEPARAÇÃO DE IgA1 A PARTIR DE COLOSTRO HUMANO POR COLUNA DE SEPHAROSE-FRUTALINA	76
	ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	79

1. INTRODUÇÃO

Há inúmeras evidências epidemiológicas e científicas indicando ação protetora do leite humano contra uma série de microrganismos com os quais o bebê entrará em contato na vida pós-natal, principalmente do trato respiratório e intestinal. Sabe-se que o leite materno tenta compensar a imaturidade do sistema imune das mucosas do neonato, fornecendo substâncias capazes de interagir com os microrganismos e prevenir a ativação da defesa pró-inflamatória (HANSON, 2007).

A IgA é a imunoglobulina mais importante neste processo e está presente em grande quantidade no colostro, principalmente em sua forma dimérica secretória (SIgA). Diversos estudos relatam a participação da IgA, neutralizando vírus, bactérias, toxinas e protozoários. Estes estudos evidenciam que a SIgA humana antígeno-específica está envolvida no reconhecimento de proteínas de membrana e polissacarídeos da *Escherichia coli*, inibindo a adesão celular (MANJARREZ-HERNANDEZ *et al.*, 2000; NOGUERA-OBENZA *et al.*, 2003) e que a SIgA não-específica comercializada inibe a formação de biofilme de *Vibrio cholerae*, efeito dependente do seu componente secretor, ressaltando sua contribuição na imunidade inata (MURTHY *et al.*, 2011). Outros relatam a participação de glicoproteínas do leite na inibição da atividade hemaglutinante de lectinas presentes na *Pseudomonas aeruginosa* (LESMAN-MOVSHOVICH *et al.*, 2003) e León-Sicairos *et al.* (2006) mostraram que a lactoferrina, lisozima e SIgA do leite humano tem atividade antimicrobiana contra *Entamoeba histolytica*, ligando-se a membrana e causando dano celular.

Outras proteínas do leite, como a lactoferrina e a lisozima, fazem parte do sistema imune inato e também possuem destaque. A lisozima é responsável pela degradação da parede celular de bactérias gram-negativas e gram-positivas (LÖNNERDAL, 2010) e a lactoferrina é capaz de inibir a adesão celular de patógenos como *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (OCHOA *et al.*, 2003), além de efeito antiviral e ações sobre fungos como *Candida albicans* (HANSON, 2007). Xu *et al.* (2010) relatam ainda que a lactoferrina bovina inibe a formação de biofilme de *P. aeruginosa*.

Diversos estudos realizados em centros urbanos de países em desenvolvimento ainda têm mostrado alta morbidade e mortalidade de crianças menores de um ano de idade por

diarreia grave, e que um dos principais fatores de risco é a falta de amamentação, ao lado da falta de saneamento básico e desnutrição grave (FUCHS; VICTORA, 2002; DE OLIVEIRA; LATORRE, 2010). A *E. coli* tem sido apontada como o agente mais frequentemente isolado em crianças hospitalizadas, principalmente, nos primeiros seis meses de idade, acometendo episódios de diarreia grave (30 a 40% desses casos são atribuídos a EPEC), e de meningite neonatal com altas taxas de letalidade (NATARO; KAPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Um dos principais fatores de virulência de algumas cepas é a formação de biofilme, que confere proteção contra a ação de diversos antimicrobianos, permanecendo como agentes infectantes por um longo tempo (CRÉMET *et al.*, 2013).

A maioria dos estudos analisam a capacidade de proteção de alguns componentes do leite atuando de forma isolada, mas não se deve esquecer que o leite humano é um complexo imune com outros diversos componentes agindo simultaneamente e que a literatura ainda não elucidou os mecanismos de ação do colostro humano sobre biofilme, fator de virulência tão importante que contribui para a persistência de doenças crônicas ou recorrentes (REISNER *et al.*, 2006).

Considerando que componentes do leite humano apresentam efeito protetor contra cepas patogênicas de *E. coli* e que a formação de biofilme está relacionada com aumento da virulência dessa bactéria, sendo poucos os trabalhos na literatura elucidando a ação do colostro sobre o biofilme, foi objetivo dessa pesquisa estudar o efeito do colostro humano sobre biofilme de *E. coli* em formação e formado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Papel imunológico do leite materno

Logo ao deixar o ambiente estéril da vida intrauterina, o recém-nascido está exposto a inúmeros microrganismos, que podem ser inofensivos e posteriormente fazer parte da microbiota ou serem causadores de doenças, levando a altas taxas de morbidade e mortalidade de neonatos, principalmente nos que não são amamentados e que vivem em regiões socioeconômicas mais pobres (ARAÚJO *et al.*, 2005; HANSON, 2007).

O leite materno tem uma complexidade intrínseca, pois todos os seus componentes têm uma razão e uma função a ser desempenhada para promover um equilíbrio imunológico nas mucosas do neonato e protegê-lo de infecções. Os diversos mecanismos de ação destas substâncias vêm sendo desvendados há mais de 50 anos, embora muito ainda esteja obscuro, necessitando de mais pesquisas (JONES *et al.*, 2003).

O fato de que a amamentação é um dos fatores que mais influenciam na diminuição da morbidade e mortalidade infantil já está bem caracterizado, mas ainda assim ocorrem mais de 10 bilhões de mortes infantis em países em desenvolvimento a cada ano, sendo que dois terços podem ser prevenidas. Sabe-se que o aleitamento exclusivo até os seis meses de idade, continuando a amamentação por até um ano, pode prevenir até 13% dessas mortes, um valor muito alto quando comparado à alimentação complementar, à vacinação contra o *Haemophilus influenzae*, à utilização de água limpa e condições de higiene adequadas e à vacinação contra o sarampo, que previne com taxas de 6%, 4%, 3% e 1%, respectivamente. Ou seja, 1,3 milhões de crianças podem ser salvas anualmente por uma conduta tão simples e natural (LABBOK; CLARK; GOLDMAN, 2004)

Neste período neonatal, o sistema imunológico do bebê ainda é muito imaturo, pois os níveis séricos de IgM, IgA, IgG e as proteínas do sistema complemento estão em concentrações baixas no soro e o sistema imune associado às mucosas é pouco eficiente, onde, os fagócitos e os linfócitos T ainda estão em processo de maturação, levando a uma vulnerabilidade às infecções (BARROS *et al.*, 1982; GRASSI; COSTA; VAZ, 2001).

Neste momento, a amamentação é crucial para protegê-lo contra microrganismos potencialmente perigosos, seja com componentes da imunidade inata, ou específica contra

patógenos que a mãe entrou em contato durante a vida. Os componentes bioativos naturais presentes no leite são capazes de resistir à degradação proteolítica, permanecendo intactos ou em grandes fragmentos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (GERMAN; DILLARD; WARD, 2002; LÖNNERDAL, 2010).

O colostro é a secreção láctea das primeiras 48 a 72 horas, que vai sofrer modificações ao longo da amamentação, de forma gradual e progressiva, passando a ser chamado de leite maduro. Diversos componentes do leite materno estão em maior quantidade na fase do colostro, este tem aspecto mais amarelado, devido ao alto teor de beta-caroteno e mais viscoso, devido às altas taxas de células, proteínas, minerais e vitaminas lipossolúveis (A, E e carotenóides), bem como menor teor de lactose, gordura e vitaminas do complexo B (LAURINDO, 1991).

2.1.1 Componentes do leite materno e suas funções anti-infecciosas

As propriedades anti-infecciosas desse complexo imune devem-se tanto aos componentes solúveis quanto aos celulares. A imunidade inata e a específica são igualmente importantes, cujos componentes solúveis específicos são as imunoglobulinas da classe IgA, IgM, IgG, IgD e IgE; e os componentes solúveis inespecíficos incluem lisozima, lactoferrina, fator bífido, α -lactoalbumina, mucina, complemento, citocinas, entre outras substâncias.

Os macrófagos, monócitos, linfócitos T e B, eosinófilos, neutrófilos, granulócitos e células epiteliais são os componentes celulares cuja concentração é alta no colostro e diminui no leite maduro. As interações entre os diversos fatores de defesa específicos e inespecíficos, humorais e celulares atuam em conjunto e ainda interagem diretamente com os fatores de defesa do próprio bebê, promovendo um equilíbrio entre ações pró e anti-inflamatórias, homeostasia da microbiota e estimulação da maturação da imunidade (GRASSI; COSTA; VAZ, 2001).

2.1.1.1 Elementos celulares

O leite materno difere de outras secreções do corpo pela presença de leucócitos viáveis. Estes apresentam uma sobrevivência pequena e permanecem vivos por apenas algumas horas em temperatura ambiente. A concentração de leucócitos é máxima no colostro (1553 células/mm³) e declina rapidamente no primeiro mês de lactação (78 células/mm³) (BARROS *et al.*, 1982).

Os neutrófilos, macrófagos e linfócitos encontram-se no colostro na proporção de 18 a 23%, 59 a 63% e 7% a 13%, respectivamente (CÂMARA, 1992). As células do leite humano, principalmente as fagocitárias (macrófagos e neutrófilos) são capazes de conferir proteção ao lactente, respondendo a estímulos quimiotáticos e fagocitando bactérias e fungos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Os macrófagos possuem papel central na imunidade inata e são células efetoras importantes para a eliminação de microrganismos, pois estes possuem a capacidade de serem estimulados em maior extensão por mecanismos independentes da opsonização, por meio da ligação de lectinas a carboidratos presentes nos microrganismos; uma vantagem já que, no intestino do neonato, há pequena concentração de IgG e de proteínas do complemento que poderiam servir como opsoninas (SCHROTEN *et al.*, 2000).

Os neutrófilos estão presentes em grandes quantidades no colostro e reduzem drasticamente no leite maduro, enquanto que os linfócitos, apesar de comparativamente em quantidades menores, aparecem como células constitutivas do leite materno durante toda a lactação (BARROS *et al.*, 1982).

Oitenta por cento desses linfócitos são do tipo T, com uma razão de CD4:CD8 de 2:1, capazes de produzir citocinas e, conseqüentemente, organizar uma resposta imunológica mais efetiva, modulando outros componentes imunológicos, como os fagócitos e células B ou agindo diretamente em células infectadas (OGRA, 1988, apud CÂMARA, 1992).

Os linfócitos B, originalmente estimulados nos outros sítios de mucosa (trato respiratório e/ou gastrointestinal) da mãe, migram para a lâmina própria da glândula mamária, processo denominado de ligação bronco-mamária e entero-mamária (LABBOK; CLARK; GOLDMAN, 2004). Por meio de moléculas de adesão, os linfócitos B interagem

especificamente com estruturas presentes na membrana das células endoteliais especializadas das vênulas pós-capilares que irrigam a lâmina própria do tecido mamário, onde se diferenciarão em plasmócitos produtores de SIgA. Assim, há a produção de anticorpos, específicos contra microrganismos nunca “vistos” pelo sistema imune do bebê, mas reconhecidos pela mãe (GRASSI; COSTA; VAZ, 2001; HANSON, 2007; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Estudo recente de Sacha *et al.* (2014) analisou a presença de células B e anticorpos, do colostro e do sangue, específicos contra o envelope de HIV-1 em lactantes africanas infectadas por este vírus. Altas taxas de células B produtoras de anticorpos específicos para estes antígenos foram observadas no colostro, além de uma maior concentração de anticorpos específicos contra a gp120 no colostro em relação ao sangue dessas parturientes (44% versus 16%, respectivamente).

2.1.1.2 Fatores humorais específicos

A IgA é uma das imunoglobulinas mais importantes presentes no leite materno. A concentração de IgA é máxima no colostro, variando de 11 a 41 mg/mL no primeiro dia, e caindo significativamente no leite maduro, variando de 0,5 a 1,3 mg/mL no 15º dia e permanecendo nessas concentrações pelos próximos 12 meses (ARAÚJO *et al.*, 2005).

É encontrada em duas formas isotípicas, IgA1 e IgA2. A IgA sérica é encontrada predominantemente como IgA1 monomérica (pesando cerca de 160 kDa). Nas secreções exócrinas, a maior parte da IgA produzida é dimérica (pesando cerca de 385 kDa) e a proporção entre as duas isoformas difere em alguns sítios de mucosa. À medida que “descemos” pelo tubo digestório ocorre um aumento da síntese de IgA2, pois é um isotipo resistente a proteases bacterianas. A IgA dimérica, além das duas moléculas de IgA, possui a cadeia J (com peso molecular de 15 kDa), que forma pontes dissulfeto com as regiões Fc das cadeias pesadas e estabiliza os complexos multiméricos, além de auxiliar na ligação do componente secretor (com peso molecular de 80 kDa) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

A IgA secretada no leite é transportada através das células epiteliais por um receptor Fc específico, denominado de poli-Ig. A cadeia J da SIgA liga-se a esse receptor e então este complexo é endocitado pela célula epitelial e transportado até a superfície luminal, onde o poli-Ig é proteoliticamente clivado. Um domínio extracelular do receptor fica ligado a IgA e este passa a ser chamado de Componente Secretor (CS) (PERRIER; SPRENGER; CORTHÉSY, 2006).

No colostro, 96% da IgA presente no leite é dimérica e a razão entre IgA1/IgA2 é cerca de 60:40 (KERR, 1990). A alta densidade de células produtoras de IgA nas glândulas mamárias faz com que a IgA seja a principal classe de imunoglobulina no leite humano e que a maior parte da IgA secretória (SIgA) seja produzida localmente, e não transportada do plasma. Nas mamas, os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos produtores de IgA, principalmente em sua forma dimérica que é mais resistente à degradação enzimática no lúmen intestinal (LABBOK; CLARK; GOLDMAN, 2004). Propriedade conferida também pela ligação com o componente secretor que bloqueia a ligação peptídica da tripsina e pepsina à estrutura de IgA. (LINDH, 1975, apud LABBOK; CLARK; GOLDMAN, 2004).

A SIgA possui um importante papel no sistema imune das mucosas prevenindo infecções respiratórias e entéricas, de grande importância nos primeiros meses de vida, onde sua presença nas mucosas promove a imobilização dos patógenos, impede a adesão à superfície epitelial e neutraliza as toxinas, bem como outros fatores de virulência, prevenindo, por exemplo, a translocação bacteriana para outros sítios (CORTHÉSY, 2013).

Vários estudos demonstraram a participação da IgA reconhecendo e atuando sobre bactérias, como *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae*, *E. coli*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Clostridium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *V. cholerae*, *Mycoplasma pneumoniae* e contra os vírus da Polio, *Influenzae*, Vírus Sincicial Respiratório, *Rotavirus*, entre outros (PABST, 2012). Alguns desses importantes estudos estão descritos a seguir pela sua ordem cronológica, demonstrando uma evolução das pesquisas em relação ao papel da SIgA.

Câmara *et al.* (1995) evidenciou, através de testes de *Western blot*, que a IgA do leite materno é capaz de reconhecer proteínas de membrana de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), observando um efeito inibitório do fenômeno de Adesão Localizada (AL) às células HeLa em cultura.

Posteriormente, Delneri *et al.* (1997) evidenciaram altas taxas de IgA anti-EPEC no colostro de mães de parto prematuro e a termo e que o colostro desses dois grupos inibiu a adesão de EPEC em células HEp-2 e foram capazes de reconhecer adesinas da bactéria, como a intimina. Com isso puderam mostrar que o leite de mães com filhos prematuros e de baixo peso são tão eficientes quanto ao daquelas mães que tiveram partos a termo.

Manjarrez-Hernandez *et al.* (2000), procurando estratégias para imunização, utilizaram SIgA de leite humano para detecção de antígenos proteicos em EPEC. A imunoglobulina foi capaz de reconhecer proteínas de superfície, como a intimina e outras duas proteínas desconhecidas por eles, de 70 e 80kDa, além de uma proteína secretada (EspC). Todas estas moléculas estavam presentes em sorogrupos de EPEC encontradas em isolados clínicos de crianças com diarreia grave.

Noguera-Obenza *et al.* (2003) observaram a presença de SIgA em amostras de leite materno de mães dos EUA, reconhecendo antígenos de superfície da *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (lipopolissacarídeos, EspA, EspB, intimina e Toxina Shiga). SIgA específica para EspA foi a mais encontrada, sugerindo a utilização deste antígeno para realizar estratégias de imunização.

Palmeira *et al.* (2005) investigaram a presença de IgA no leite materno de brasileiras contra antígenos da *E. coli* produtora de Toxina Shiga (STEC). Todas as amostras de leite inibiram a adesão dessas bactérias a células HEp-2 e amostras de SIgA reagiram contra antígenos proteicos e lipopolissacarídeos (LPS) desta bactéria.

Corrêa *et al.* (2006) observaram que a IgA também reage contra os fatores de colonização I e II da *E. coli* enterotoxigênica e amostras de colostro humano são capazes de impedir sua adesão a células Caco-2 em cultura, o que não acontece com amostras de colostro sem IgA.

Segundo León-Sicairos *et al.* (2006), a IgA também apresenta efeito sobre parasitas, como os trofozoítos da *Entamoeba histolytica*, produzindo arredondamento celular, rompimento lipídico, danos à membrana e morte.

Outros estudos trazem a SIgA como componente chave, atuando na promoção do crescimento de bactérias não-patogênicas e favorecendo a formação da flora bacteriana. Segundo Bollinger *et al.* (2006), carboidratos presentes no componente secretor da SIgA pode

favorecer a formação de um biofilme fino de cepa comensal (menos virulenta) de *E. coli* K-12, esta pode competir por espaço e nutrientes e diminuir o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas.

Já Murthy *et al.* (2011) referem um papel importante da manose encontrada no componente secretor da SIgA na inibição da colonização por *Vibrio cholerae in vivo* (em camundongos) e da formação de biofilme *in vitro*, o que não ocorreu quando utilizaram as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM do soro humano, sugerindo um papel importante do componente secretor da SIgA.

Alvarez *et al.* (2013) também demonstraram que a SIgA purificada de colostro reage contra antígenos do *Mycobacterium tuberculosis*. Descreveram uma ação profilática da administração intranasal de 1 mg de SIgA em modelos experimentais com ratos 2 h antes da inoculação do *M. tuberculosis*, sendo capaz de protegê-los da infecção pulmonar, diminuindo a carga bacteriana e os efeitos citopáticos.

Diante de todos estes estudos, percebe-se que a administração passiva de SIgA específica ou não-específica tem mostrado amplo poder de proteção contra infecções gastrointestinais e respiratórias e notáveis propriedades anti-inflamatórias nas mucosas, pois ao neutralizar os antígenos, estes complexos imunes, através da fagocitose por células dendríticas residentes nas placas de Peyer, são apresentados a células T virgens, com concomitante produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, TGF- β , IL-6 e IL-10 e indução de uma resposta imune tipo Th2 (CORTHÉSY, 2013).

A IgG é outra imunoglobulina encontrada no leite materno e sua concentração no colostro humano é cerca de 0,5 mg/mL, sendo significativamente menor no leite maduro 0,04 mg/mL (BARROS, 1977, apud BARROS *et al.*, 1982). A IgG pode ativar o sistema complemento, participar da citotoxicidade anticorpo dependente e facilitar a fagocitose. Essas atividades pró-inflamatórias podem trazer algumas desvantagens para o sistema imune do bebê ao estimular a ativação de leucócitos, podendo levar a quebra da homeostase local e a lesão na mucosa. A IgG pode neutralizar vírus, protozoários, bactérias e toxinas bacterianas, só que em menores proporções quando comparado a IgA, já que está em menor quantidade (HANSON, 2007).

As células B produzem quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4). A IgG4 tem efeito anti-inflamatório e menor capacidade de ativar o complemento, ao contrário

das outras subclasses (AGARWAL *et al.*, 2011). A IgG pode ser produzida localmente nas glândulas mamárias ou transmitida através da placenta para proteger o feto no útero. Estes anticorpos transplacentários são importantes, pois podem reagir contra antígenos polissacarídicos do *Haemophilus influenzae* type b (Hib) e *Streptococcus pneumoniae*, e contra LPS e antígenos proteicos de *E. coli* O16, O6, O111, O157 (PALMEIRA *et al.*, 2009).

A IgM é a segunda imunoglobulina mais presente no leite humano. Também forma complexos multiméricos ligados pela cadeia J, podendo ser secretada como pentâmeros ou hexâmeros (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Sua concentração é mais alta no colostro do que no leite maduro assim como as outras imunoglobulinas, cerca de 1mg/mL e 0,1mg/mL, respectivamente. É produzido pelas células B após estimulação antigênica e é um forte ativador de complemento. Promove a neutralização de vírus e bactérias. Esses anticorpos, embora em pequena quantidade, podem ser muito importantes na proteção inicial dos recém-nascidos (AGARWAL *et al.*, 2011).

A participação da IgD e IgE não está bem esclarecida. A IgD é uma imunoglobulina que age principalmente como receptor para antígenos do linfócito B e não possui forma secretora. A IgE parece atuar, ligando-se a antígenos no lúmen intestinal, causando um processo inflamatório e aumentando a permeabilidade dos vasos para a saída de outras células imunes (XANTHOU, 1998, apud GRASSI; COSTA; VAZ, 2001)

2.1.1.3 Fatores inespecíficos

Várias substâncias que compõe o leite humano participam da imunidade inata, que é tão importante quanto à imunidade adaptativa na proteção do neonato, agindo rapidamente contra infecções. São vários os constituintes proteicos, lipídicos e carboidratos.

Quanto aos componentes proteicos, podemos destacar a lactoferrina, uma das maiores proteínas do leite, que é uma glicoproteína de 80 kDa quelante de ferro, mineral essencial para o metabolismo bacteriano, promovendo assim uma ação bacteriostática. Outro mecanismo de ação que tem sido bastante relatado é a ligação da lactoferrina ao LPS bacteriano, levando a alteração da permeabilidade da membrana celular, facilitando a ação bactericida da lisozima presente no leite (XU *et al.*, 2010).

A lactoferrina encontra-se em maior quantidade (<90%) na forma apo-lactoferrina (ferro-insaturado) no leite, com a qual se observa maior efeito bacteriostático e bactericida. Encontra-se na concentração de 5 a 7 mg/mL no colostro, caindo para 1 a 3 mg/mL no leite maduro. Promove o crescimento de bifidobactérias, e é capaz de inibir o desenvolvimento de patógenos como *V. cholerae*, *H. influenzae* e EPEC. Além disso, tem efeito antiviral contra o vírus da hepatite C, Citomegalovírus, vírus da Herpes simples, Rotavírus, Adenovírus e ações sobre fungos como *C. albicans*. A lactoferrina, direta ou indiretamente, é capaz de reduzir os riscos de infecções causadas por bactérias, vírus e possivelmente fungos, sem levar a um efeito inflamatório (SINGH *et al.*, 2002; LÖNNERDAL, 2010).

Em estudos recentes com crianças jovens acometidas com diarreia aguda, mostraram que a solução de reidratação oral associada com lactoferrina e com lisozima, significativamente reduzem a duração, volume e recorrência de diarreia, evitando a desidratação intensa e a mortalidade infantil (ZAVALETA *et al.*, 2008).

Outro importante constituinte proteico é a lisozima que pesa cerca de 15 kDa e está presente na concentração de aproximadamente 0,39 mg/mL no leite humano (GRASSI; COSTA; VAZ, 2001), 300 vezes maior do que no leite bovino. Durante a infância há uma baixa produção dessa proteína, que deve ser compensada pela amamentação. É responsável pela clivagem do peptidoglicano e pela degradação da parede celular de bactérias patogênicas (LABBOK; CLARK; GOLDMAN, 2004).

O componente secretor também pode estar presente na sua forma livre em grande quantidade no leite (até 25 µM) e possuem propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas, neutralizando patógenos e protegendo as células da mucosa (PERRIER; SPRENGER; CORTHÉSY, 2006). Estas ações são promovidas pelos resíduos de carboidratos que representam mais que 20% da sua massa molecular e estão distribuídos em 7 sítios de N-glicosilação desse polipeptídeo. O componente secretor livre ou associado a IgA é capaz de ligar-se a lectinas presentes na membrana da *E. coli* e *Helicobacter pylori*, impedindo sua adesão às células epiteliais por meio de interações não-específicas com estes microrganismos (CORTHÉSY, 2013).

A alfa-lactoalbumina é uma das proteínas que está em maior quantidade no leite, compreendendo cerca de 25 a 30% das proteínas totais, estudos *in vitro* têm mostrado ação probiótica, estimulando o crescimento de uma microflora benéfica no trato gastrointestinal

(LÖNNERDAL; LIEN, 2003). Outros estudos descrevem um complexo de alfa-lactoalbumina e ácido oleico, chamado de HAMLET (*Human alfa-lactalbumin made lethal to tumor cells*), que tem demonstrado efeito letal por apoptose de várias linhagens de células tumorais (PETTERSSON; MOSSBERG; SVANBORG, 2006), bem como sobre *S. pneumoniae* resistentes, facilitando a ação de antibióticos (HAKANSSON *et al.*, 2011; MARKS; CLEMENTI; HAKANSSON, 2012).

Além disso, o leite humano possui uma substância chamada fator bífido, que também promove o crescimento de bacilos Gram-negativos anaeróbios, como os *Lactobacillus bifidus*. Esses microrganismos fermentam açúcares, produzindo ácido lático e ácido acético, o que leva a acidificação do meio intestinal e impede o desenvolvimento de bactérias patogênicas. Assim, a flora intestinal de crianças que não recebem aleitamento materno está repleta de *E. coli*, com alguns *Streptococcus faecalis*, em contraste com a de bebês amamentados, repleta de *Lactobacillus*, protegendo o trato intestinal até que o sistema imune de mucosa do lactente esteja maduro (BODE, 2012).

Várias frações do sistema complemento têm sido detectadas no leite. O componente C3 alcança concentrações próximas às do soro do adulto normal. A ativação da via clássica pouco acontece, pois a IgA, que está em maior quantidade em relação as outras imunoglobulinas, não é capaz de ativar esta via, mas a ativação da via alternativa está bastante presente e pode ter ação imune, onde o C3 ativado é potencialmente importante por sua capacidade opsonizante (C3b) e propriedades quimiotáticas (C3a), promovendo proteção contra infecções entéricas e respiratórias (GRASSI; COSTA; VAZ, 2001).

Proteínas glicosiladas também estão presentes no leite materno, como as mucinas. A Mucina-1 é a mais abundante e está presente principalmente ligada aos glóbulos de gordura do leite (LABBOK; CLARK; GOLDMAN, 2004). Podem formar uma barreira física viscosa que impede a adesão dos microrganismos às células da mucosa, pois estas se ligam a proteínas presentes nas bactérias patogênicas, como adesinas de *E. coli* (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Quanto à ação de carboidratos do leite materno, os oligossacarídeos agem como receptores análogos, impedindo a ligação de patógenos, como o *Helicobacter pylori*, nas mucosas, pois a estrutura química desses componentes liga-se por competição às adesinas ou às toxinas produzidas por *V. cholerae*, *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter jejuni*,

Salmonella sp., *Streptococcus pneumoniae* e *H. influenzae* (LABBOK; CLARK; GOLDMAN, 2004; BODE, 2012). A lactose, um dissacarídeo de glicose e galactose, está presente no colostro em uma concentração de 53 mg/mL, aumentando no leite maduro para 70 mg/mL. Os monossacarídeos glicose e galactose estão em quantidades mínimas no leite, 0,14 e 0,12 mg/mL, respectivamente (LAURINDO, 1991).

Quanto à composição lipídica, o leite possui uma quantidade notável de complexos lipídicos, particularmente fosfolipídios (GERMAN; DILLARD; WARD, 2002). A concentração lipídica no colostro é de 18 a 29 mg/mL, enquanto que no leite maduro apresenta-se em maior quantidade, 29 a 36 mg/mL (LAURINDO, 1991). Os produtos lipídicos exibem uma diversificada atividade de defesa contra agressões externas, como a destruição de envelopes virais, prevenindo a infecção por coronavírus, por exemplo, no trato intestinal. Alguns ácidos graxos e monoglicerídeos também agem como barreira protetora contra parasitas intestinais, como a *Giardia lamblia*. Duas vitaminas lipídicas também exercem atividade de defesa: o alfa-tocoferol e o beta-caroteno que possuem ação antioxidante e anti-inflamatória nas mucosas (GERMAN; DILLARD; WARD, 2002; HANSON, 2007; LÖNNERDAL, 2010).

Substâncias bioativas, incluindo hormônios, fatores de crescimento e fatores imunológicos como as citocinas, também têm sido identificadas no leite. As citocinas são polipeptídios pluripotentes que produzem uma cascata de efeitos que contribuem para o desenvolvimento e funções do sistema imune. As citocinas presentes no leite podem potencialmente interagir com as mucosas intestinal e respiratória, desencadeando ações anti-inflamatórias e imunomodulatórias e tentando promover a manutenção da homeostasia do sistema imune. Algumas são relativamente resistentes aos processos digestivos, como a IL-1 e a IL-8 (GAROFALO, 2010). Citocinas como a IL-10 e TGF- β têm um papel anti-inflamatório, enquanto que TNF- α , IL-1 β e IL-6 são agentes pró-inflamatórios. IFN- γ é um agente promotor da resposta Th1, enquanto que a IL-10 e IL-6 induzem uma resposta Th2. Os fatores estimuladores de colônias como M-CSF e GM-CSF promovem a proliferação, diferenciação e sobrevivência dos macrófagos e granulócitos (LABBOK; CLARK; GOLDMAN, 2004).

2.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*, anaeróbio facultativo e é um dos microrganismos mais versáteis existentes na natureza, pois geralmente faz parte da microbiota intestinal normal de homens e animais desde os primeiros meses de vida, convivendo em uma simbiose com o hospedeiro (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004), mas em contrapartida, algumas cepas podem ser potenciais patógenos causadores de doenças de localização intestinal ou extraintestinal geralmente quando os hospedeiros estão imunocomprometidos ou quando as barreiras gastrointestinais são quebradas (NATARO; KAPER, 1998).

As cepas patogênicas de *E. coli* são divididas baseadas em seus fatores de virulência e localização das infecções. Podem causar doenças intestinais (InPEC) ou extraintestinais (ExPEC). As InPEC são também conhecidas como *E. coli* diarreio gênicas (DEC), divididas em seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC) - sendo a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) um dos seus subtipos, *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC). As ExPEC incluem frequentemente cepas associadas com infecções no trato urinário (UPEC), meningite e sepsse neonatal (MNEC) (VOGELEER *et al.*, 2014).

A *E. coli* está diretamente associada aos casos de diarreia infantil grave até os dois anos de idade (30 a 40 % dos isolados clínicos são atribuídos a EPEC), levando a altas taxas de mortalidade em países em desenvolvimento, como no Brasil (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Notoriamente, as MNEC apresentam alta infectividade em neonatos, causando meningites e sepses, dos quais 15 a 40% dos casos são fatais e muitos sobreviventes apresentam déficits neurológicos graves (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). As UPEC são responsáveis por 70 a 95% dos casos de infecções urinárias (ITU) e são frequentes em pacientes que fazem uso de cateterismo vesical, devido ao desenvolvimento de biofilmes nos cateteres. As ITU por *E. coli* tem uma incidência de um milhão de casos ao ano nos Estados Unidos (GOMES *et al.*, 2014).

Alguns fatores de virulência das cepas patogênicas de *Escherichia coli* devem ser destacados, como o mecanismo de *Attaching and Effacing* (A/E) causado por cepas de EPEC e EHEC que destrói as microvilosidades do epitélio intestinal, tendo como consequência a

formação de estruturas em formato de pedestal e redução da mucosa absortiva. A descoberta deste mecanismo foi crucial para observar a importância da aderência bacteriana na infecção. A expressão do gene *eae* (*E. coli attaching and effacing*) leva a codificação de três fatores determinantes para promover esse tipo de lesão, proteínas do sistema secretor tipo III (EspA, EspB, EspC) que rompem o citoesqueleto das células hospedeiras, a intimina, proteína externa da membrana da bactéria de 94 kDa importante na adesão das bactérias aos enterócitos, e o receptor de translocação de intimina (Tir) que é inserido na membrana da célula hospedeira pela bactéria, servindo como um receptor de intimina e facilitando a sua translocação. Todas estas proteínas são foco de diversos estudos objetivando entender os mecanismos de aderência dessas bactérias e sua infectividade (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Algumas cepas de EPEC também produzem o pilus tipo IV, conhecido como BFP (*Bundle-forming pilus*) que é expresso pelo plasmídio “*EPEC Adherence Factor*” (pEAF), participando da adesão e levando a formação de microcolônias de bactérias, fenômeno caracterizado como adesão localizada (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As toxinas também têm importância clínica, como a toxina Shiga (Stx), semelhante à toxina da *Shigella dysenteriae*, produzida por EHEC que cliva o RNA ribossomal, interrompendo a síntese proteica e levando à morte de células endoteliais e epiteliais, causando gastroenterite e colite hemorrágica (MAKOBÉ *et al.*, 2012). Outras duas enterotoxinas são produzidas pelas cepas de ETEC, as termoestáveis e as termolábeis, que ao serem endocitadas pelas células hospedeiras aumentam a concentração de AMP cíclico, GMP cíclico e Ca^{+} , que leva a secreção de íons para o lúmen e consequente passagem de água, provocando quadros de diarreia osmótica (NATARO; KAPER, 1998).

Sabe-se que várias infecções causadas por *E. coli* estão associadas a formação de biofilme. Este mecanismo é importante para a sobrevivência destas bactérias no ambiente, especialmente em superfícies abióticas, como cateteres vesicais, e bióticas, como no trato gastrointestinal (BOLLINGER *et al.*, 2003; REISNER *et al.*, 2006) ou em ambientes naturais como rios e plantas. A contaminação da carne por EHEC comumente é causada pela formação de biofilmes na superfície de vários equipamentos associados ao abate que levam a persistência das bactérias (VOGELEER *et al.*, 2014).

Vários fatores estão envolvidos neste processo de formação e maturação do biofilme, como a produção de fímbria tipo I, flagelo, celulose, poli-N-acetil-glucosamina e

ácido colânico, estes estão presentes, por exemplo, em cepas comensais como a *E. coli* K-12 que tem sido bastante estudada quanto ao desenvolvimento de biofilme (VOGELEER *et al.*, 2014; NAVES *et al.*, 2008).

Observações *in vitro* e *in vivo*, mostram que o repertório genético expresso por cepas de *E. coli* durante a formação de biofilme pode ser semelhante nessas duas condições, portanto muitos estudos utilizam técnicas *in vitro* para inferir sobre a formação de biofilme por cepas patogênicas *in vivo* (REISNER *et al.*, 2006). Uma cepa que tem sido bastante utilizada em ensaios de formação de biofilme *in vitro* é a *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), que tem o sorotipo O6:H1. Naves *et al.* (2008) utilizou esta e mais três cepas de isolados clínicos para observar a formação de biofilme *in vitro*. Constatou por reação em cadeia da polimerase (PCR) que a cepa padrão possui fatores de virulência como a α -hemolisina (*hlyA*), responsável por lise de células do hospedeiro, pili associado a pielonefrite (*papC*), adesinas fimbriais (*sfa* / *focDE*) e sistema de captação de ferro, *aerobactin* (*iucD*); e que foi uma das cepas que formou melhor biofilme em diversas condições experimentais.

2.3 Biofilme

Em ambientes naturais, grande parte da biomassa bacteriana sobrevive aderida a superfícies, inseridas na estrutura de biofilme. Biofilmes microbianos são definidos como comunidades complexas formadas por microrganismos aderidos a superfícies sólidas ou semi-sólidas envoltas por uma matriz composta de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (DONLAN; COSTERTON, 2002). Esta temática está em alta em diversos estudos, que trabalham na hipótese que a persistência de biofilmes bacterianos no organismo humano é fator crucial para o estabelecimento de infecções crônicas ou recorrentes (REISNER *et al.*, 2006).

Vários fatores estão envolvidos no desenvolvimento de um biofilme: temperatura, quantidade de inóculo, forças hidrodinâmicas, características do substrato, variação de pH, disponibilidade de nutrientes e oxigênio e concentrações dos metabólitos microbianos. Bactérias em biofilmes são chamadas de bactérias sésseis e podem estar aderidas a superfícies bióticas e abióticas. A maior parte da biomassa bacteriana existente na natureza reside como populações de biofilme (NAVES *et al.*, 2008).

O modelo comum para a formação, diferenciação e constituição do biofilme compreendem estágios: 1- As bactérias livres, ou conhecidas como planctônicas, estão dispersas no meio e começam a se aproximar de superfícies sólidas através de sua motilidade ou de fluidos. Durante esta etapa as forças de interação que influenciam a reversibilidade do processo de adesão são as forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas; 2- Ocorre a transição da fase reversível para a fase irreversível da aderência a partir da produção de polímeros extracelulares ou pela produção de adesinas específicas na superfície das bactérias como flagelos e fímbrias, que interagem com a superfície, então se tornam imobilizados ao substrato, iniciando a multiplicação e formação de uma monocamada; 3- Inicia-se o desenvolvimento da arquitetura do biofilme; 4- As bactérias começam a formar grupos conhecidos como microcolônias e as substâncias poliméricas extracelulares servem como uma matriz adesiva e possibilitam o acesso aos nutrientes. Forma-se uma complexa arquitetura, conhecida como biofilme maduro, que permite os nutrientes e oxigênio alcançarem o interior do biofilme e metabólitos excretados difundirem-

se para fora; 5- Ocorre dispersão das bactérias do biofilme para o ambiente ao seu redor e o ciclo se reinicia em outras superfícies (STOODLEY *et al.*, 2002).

A matriz polimérica produzida pelo biofilme consiste numa estrutura complexa, composta de proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e heteropolímeros, como glicoproteínas, fosfolipídios, alginatos, celulose, entre outros. Dez por cento da massa do biofilme é composta de microrganismos, enquanto que a matriz corresponde a 90% (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A matriz é responsável pela estrutura do biofilme e protege as células contra a ação de biocidas e de produtos tóxicos às bactérias. Além dessa proteção, as bactérias que estão crescendo desenvolvem diferenças fenotípicas (através da transferência horizontal de genes), bioquímicas e morfológicas e isso confere diferentes índices de resistência à ação de antibióticos, capacitando os patógenos a permanecer como agentes infectantes por um longo tempo (ITO *et al.*, 2009). Essa matriz heterogênea é composta de 95% de água, cujo formato facilita a absorção de nutrientes e a eliminação de resíduos produzidos pelas bactérias (DONLAN; COSTERTON, 2002; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

Os biofilmes são sistemas biológicos altamente organizados, promovendo atividades coordenadas de interação e comunicação entre as bactérias. *Quorum sensing* é um sistema de comunicação intercelular dessas comunidades baseado na regulação da expressão de novos genes e produção e difusão de pequenas moléculas químicas ou sinalizadoras. É necessária uma densidade bacteriana considerável para a execução dessas mudanças fenotípicas capazes de alterar comportamentos, como bioluminescência e expressão de fatores de virulência. Tais comportamentos são improdutivos quando realizados por uma bactéria singular, mas tornam-se eficazes quando executados simultaneamente por um grupo de bactérias (NAZZARO; FRATIANNI; COPPOLA, 2013).

Os biofilmes representam provavelmente os melhores mecanismos de colonização e fixação na natureza. Diversas espécies bacterianas vêm sendo estudadas e tendo seu biofilme caracterizado (STOODLEY *et al.*, 2002).

Alguns estudos importantes descrevem a participação de componentes do colostro na inibição da formação de biofilme de bactérias. Singh *et al.* (2002) e Xu *et al.* (2010) revelaram a ação da lactoferrina sobre *P. aeruginosa*, onde encontraram atividade bactericida dose-dependente e diminuição da produção de piocianina, elastase (potentes fatores de

virulência) e formação de biofilme. A lactoferrina, além de sequestrar ferro, promoveu uma mudança de conformação na membrana da *P. aeruginosa*, impedindo sua aderência.

Murthy *et al.* (2011) utilizaram modelos *in vivo* e *in vitro* para demonstrar o papel importante do componente secretor presente na SIgA na inibição da colonização de tecido intestinal por *Vibrio cholerae* (em camundongos) e na inibição da formação de biofilme *in vitro* de maneira dose-dependente, protegendo o trato gastrointestinal da adesão desses patógenos.

Poucos são os trabalhos na literatura abordando, sob o ponto de vista do colostro humano, o fenômeno de inibição da formação de biofilme e ação sobre o biofilme formado de *E. coli*, tanto *in vitro* como *in vivo*. Desenvolvemos este estudo com o objetivo de compreender melhor o papel do colostro na proteção contra um importante fator de virulência presente em cepas patogênicas de um gênero bacteriano responsável por gastroenterites em crianças menores de um ano, além de infecções no trato urinário, meningite e sepse neonatal.

3. HIPÓTESES

O colostro humano puro e diluído apresenta um perfil inibitório sobre a formação de biofilme de *E. coli* ATCC 25922, e sobre o biofilme já formado, diminuindo a biomassa e causando um efeito bactericida. Sendo que a IgA tem papel crucial nesses fenômenos, reconhecendo, imobilizando e impedindo a adesão dessas bactérias.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar, *in vitro*, o efeito do colostro humano sobre a formação de biofilme de *E. coli*, bem como sobre o biofilme formado.

4.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do colostro humano em diferentes concentrações frente ao ensaio de biofilme em formação e o formado, *in vitro*, da *E. coli* ATCC 25922, avaliando a biomassa e a viabilidade bacteriana;

Obter duas frações proteicas do colostro humano, uma rica em IgA1 e outra com as demais proteínas;

Analisar a ação das frações do colostro frente ao ensaio de formação de biofilme de *E. coli* ATCC 25922.

5 . MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Tipo de Estudo

Estudo experimental, explicativo com abordagem quantitativa. Os estudos experimentais são caracterizados pela manipulação direta das variáveis em questão, para determinar interação entre elas e explicar o fenômeno pesquisado. Pesquisas explicativas são complexas e caracterizadas pela identificação de fatores que podem ser a causa de fenômenos (GIL, 2007). A análise quantitativa envolve a integração e a síntese de dados narrativos e numéricos, analisados através de procedimentos estatísticos (POLIT; BECK, 2011).

5.2 Locais de execução

A coleta das amostras de colostro humano foi realizada no Serviço de Puerpério da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC), em Fortaleza, Ceará, que é um centro de referência no atendimento humanizado à saúde da mulher e do recém-nascido. As avaliações laboratoriais foram realizadas nos Laboratórios de Imunologia Médica (LIME) e Bacteriologia Médica, vinculados ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica-UFC; e no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol) vinculado ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais-UFC.

5.3 Casuística

Amostras de colostro humano foram obtidas por ordenha manual de cinquenta e sete parturientes saudáveis, em até 24 horas pós-parto, com realização de pré-natal completo, exames sorológicos negativos para HIV, Sífilis, Toxoplasmose e Rubéola, com idade entre dezoito e trinta e oito anos, com filho nascido saudável, a termo e com peso acima de dois quilos, através de parto normal. Todas as mães foram atendidas na MEAC, no período de janeiro a setembro de 2013. O uso de antibióticos em qualquer fase da gestação ou pós-parto foi utilizado como critério de exclusão.

Antes de quaisquer procedimentos, as parturientes foram esclarecidas sobre as condições da pesquisa (objetivos, finalidade, riscos, benefícios), sendo convidadas a participar do estudo e solicitadas a assinar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Apêndice A). Os dados referentes às parturientes e ao bebê foram obtidos do prontuário, do

cartão de pré-natal e de seus relatos, estes foram registrados no instrumento de coleta de dados (Apêndice B).

Foram colhidos no máximo 10 mL de colostro por indivíduo, com realização de antisepsia da mama com Clorexidina degermante a 2% que foi retirada exaustivamente com gaze e água destilada estéril. As coletas foram realizadas por ordenha manual, utilizando luvas estéreis, com gotejamento em frascos estéreis, sendo desprezados os primeiros jatos, pois se sabe que estes podem estar contaminados por bactérias da flora epidérmica ou pela própria composição bacteriana do colostro (JIMÉNEZ *et al.*, 2008). Tanto a pesquisadora quanto a parturiente utilizaram máscara para evitar a contaminação do material. O material foi transportado sob refrigeração em até 20 minutos ao LIME, onde foi realizado o processamento.

5.4 Processamento do colostro humano

Cada amostra foi centrifugada a 15.000 rpm (Centrífuga modelo 2K15, Sigma, EUA), por 15 minutos a 4 °C, reservando-se a fase intermediária (soro) e desprezando-se a gordura e o sedimento celular (Câmara, 1992). O soro (objeto do estudo) foi filtrado em filtro 0,22 µm, aliquotado e estocado a -80 °C. De uma alíquota foi realizado controle de contaminação com semeadura em placas de ágar-sangue e *Brain Heart Infusion* (BHI) caldo (Bacto, BD, EUA).

Após o término de todas as coletas, todas as amostras foram descongeladas, adicionadas ao mesmo recipiente e homogeneizadas, formando um “pool” de soro de colostro humano, este foi dividido em alíquotas de 500 µL, 5 mL e 10 mL e estocadas novamente a -80 °C para posterior utilização nos ensaios.

Além do soro de colostro puro, amostras diluídas também foram testadas; realizaram-se 12 diluições seriadas, na proporção de dois, do soro de colostro com salina estéril.

Duas frações do colostro foram purificadas, uma fração rica em IgA1 (F1) e uma fração com as demais proteínas (sem IgA1) (F2). Estas frações foram obtidas em parceria com o LabBMol-UFC, que padronizou e realizou os ensaios de separação de IgA1 em coluna de Sepharose-Fructalina (Anexo A). A fructalina é uma lectina presente nas sementes de fruta-pão, *Artocarpus incisa* (ABDON *et al.*, 2012), que se liga especificamente a N-acetil

galactosamina presente nas moléculas de IgA1, sem alterar suas ligações químicas (GOMES *et al.*, 2010).

Todos estes procedimentos foram realizados sob condições estéreis (em capela de fluxo) e controle de contaminação foi realizado para todas as amostras de soro de colostro, inclusive para as frações.

5.5 Quantificação de IgA total no colostro humano

A determinação do IgA total do colostro foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) quantitativo. Foram adicionados 100 µL do anticorpo de captura anti-IgA purificado (Sigma, EUA), na concentração de 5 µg/mL, em cada poço da placa de poliestireno de 96 poços, que foi posteriormente coberta com filme plástico, deixada em câmara úmida durante 16 horas a 4 °C e, em seguida, lavada por quatro vezes com tampão de lavagem (PBS pH 7,4 - Tween 20 0,1%). O “pool” de soro de colostro e a IgA-padrão foram diluídos em tampão PBS-NaCl 0,35 M contendo 0,2% de Tween 20. Como padrão, foi utilizada a IgA humana (Sigma, EUA), na concentração de 1 a 6 µg/mL. Em cada poço foram adicionados 100 µL das diferentes concentrações da IgA-padrão ou do “pool” do soro do colostro. A placa foi incubada por 2 horas a 37 °C e posteriormente lavada por três vezes com tampão de lavagem. Em seguida foram acrescentados 100 µL em cada poço do conjugado anti-IgA marcado com peroxidase (Sigma, EUA), diluído 1:5000 em tampão de diluição. A placa foi incubada por 90 minutos a 37 °C e novamente lavada por três vezes com tampão de lavagem, e após foram colocados em cada poço 100 µL do substrato (tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0; H₂O₂ a 30%) e OPD (ortofenilenodiamina – Sigma, EUA) para revelar a reação. A placa foi incubada no escuro em temperatura ambiente, por 30 minutos. Para o bloqueio da revelação, adicionou-se 50 µL de H₂SO₄, 2,5 N em cada poço. A leitura da placa, foi realizada em leitor de ELISA (ELx-800, BioTek Instruments), no comprimento de onda de 492 nm. A concentração de IgA total do “pool” de soro do colostro foi determinada a partir dos valores da curva padrão de IgA humana realizada a cada ensaio e expressas em mg/mL.

5.6 Inóculo bacteriano e condições de cultura

A cepa bacteriana *Escherichia coli* (ATCC[®] 25922[™]) foi utilizada para os ensaios de formação de biofilme. As cepas foram armazenadas em meio estoque BHI/Glicerol 20% a -20 °C. A cada ensaio uma alíquota era descongelada e semeada em Ágar *Difco*[™] *MacConkey* (Difco, BD, EUA), onde crescia em estufa a 37 °C, overnight (18 a 24 horas). Após o

crescimento, a presença de bacilos gram-negativos foi confirmada com a realização de coloração de Gram em lâmina de microscopia. Uma nova cultura era realizada diluindo duas colônias em 3 mL de meio BHI caldo (Bacto, BD, EUA) contendo Glicose 1% (p/v) em tubo estéril, a 37 °C, overnight.

Após, a concentração bacteriana da cultura foi ajustada a 0.5 McFarland (McF) em meio BHI com glicose 1%, utilizando o turbidímetro *DensiCHEK plus* (Biomérieux, EUA), a densidade óptica do meio era verificada e descontada a cada ensaio pelo aparelho. O inóculo bacteriano utilizado nos ensaios de formação de biofilme correspondeu à diluição 1:100 dessa suspensão no mesmo meio (DONELLI *et al.*, 2012), equivalendo a aproximadamente 10^6 CFU/mL de *E. coli*, dado confirmado por contagem de colônias em *Ágar Mac Conckey*.

5.7 Condições do ensaio de formação de biofilme

Para todos os ensaios realizados, o controle negativo (Neg) correspondeu aos poços com meio e colostro (sem bactéria) e o controle positivo (Pos), poços com suspensão bacteriana 10^6 CFU/mL em meio (sem colostro).

Para observar o efeito do soro de colostro e suas frações durante a formação de biofilme por *E. coli*, o soro do colostro puro ou previamente diluído ou suas frações, foram adicionados v/v com a suspensão bacteriana com aproximadamente 10^6 CFU/mL de *E. coli*, em triplicata, incubando-se as placas de cultura por 24 horas a 30 °C, e em seguida as técnicas de mensuração de biofilme foram realizadas (MURTHY *et al.*, 2011).

Quanto aos ensaios observando a ação do soro de colostro após o biofilme formado, deixou-se desenvolver um biofilme maduro de *E. coli* (sem colostro) por 24 horas a 30 °C. Após esse período, os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril e adicionou-se (v/v) do soro puro ou diluído e meio de cultura, incubando por mais 6 horas a 30 °C. Este tempo foi escolhido após testes de padronização, descritos abaixo (item 5.9).

Quatro técnicas de observação do biofilme foram utilizadas: mensuração de biomassa por cristal violeta (CV), ensaio de viabilidade do biofilme por contagem de colônias em ágar, microscopia de campo claro e microscopia de escaneamento confocal.

A depender da técnica de mensuração, variou-se o local de realização das culturas e consequentemente a quantidade da amostra no poço. Para os ensaios de mensuração de biomassa e viabilidade do biofilme por contagem de colônias, 50 µL/poço de suspensão bacteriana com v/v do soro de colostro puro ou diluído, ou suas frações (F1 e F2) foram inoculados em placas de poliestireno de 96 poços estéril (TPP, Suíça, UE).

Para os ensaios de microscopia óptica de campo claro e confocal, 200 µL/poço de suspensão bacteriana v/v com soro puro ou diluído, ou suas frações (F1 e F2) foram adicionados aos poços de lâminas de cultura de vidro com câmara de poliestireno de oito compartimentos (BD Falcon, EUA).

Todos os experimentos foram realizados em condições estéreis e repetidos no mínimo três vezes, em ocasiões diferentes, e todas as variáveis foram observadas no mínimo em triplicata (MURTHY *et al.*, 2011).

5.8 Ensaio de mensuração de biomassa do biofilme

Para a quantificação da biomassa utilizando-se cristal violeta (CV), seguiu-se o método de Murthy *et al.* (2011) com algumas modificações. Na placa de poliestireno de 96 poços, após o término da incubação a 30 °C (24 horas para o biofilme em formação e 24 horas seguidas de mais 6 horas para o biofilme formado), o sobrenadante dos poços foi descartado e procedeu-se lavando, cuidadosamente, duas vezes cada poço com 300 µL de PBS estéril, sendo a placa colocada para secar em estufa a 37 °C por 15 minutos. O biofilme foi quantificado corando-se os poços com 100 µL de CV 0,4% (Merck, EUA) por 20 minutos a 26 °C. O conteúdo foi removido e os poços foram lavados três vezes com 300 µL de PBS estéril e o corante solubilizado com 300 µL de ácido acético a 33% (Merck, EUA). Após 5 minutos em temperatura ambiente, a absorbância dos poços foi mensurada em 570 nm, usando um leitor de placa de ELISA (BioTek, Winooski, EUA). Para comparação dos resultados utilizamos um índice obtido pela razão entre a densidade ótica (DO) de cada poço das variáveis e a DO *cut-off* (DO_c), que foi definida como a média dos resultados de DO do controle negativo adicionado de três desvios-padrões (DP) (DONELI *et al.*, 2012).

5.9 Padronização do tempo de ação do soro do colostro sobre o biofilme formado

O período de ação de 6 horas das amostras de colostro sobre o biofilme formado foi escolhido após ensaios de padronização, já que não há na literatura dados referentes à análise da ação do colostro sobre biofilme formado.

Utilizaram-se três intervalos de tempo, 6, 12 e 24 horas para avaliar a ação do soro do colostro após o biofilme formado, com a mensuração da biomassa realizada por CV. Os resultados dos diferentes tempos podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Efeito do soro de colostro humano sobre biofilme formado de *E. coli* (ATCC[®] 25922TM), variando o tempo de incubação do colostro.

Tempo (h)	Controle Negativo	Bactéria + Col	Controle Positivo	<i>p</i> valor*
6	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,2	3,4 ± 0,9	0,0498
12	0,8 ± 0,1	1,4 ± 0,1	3,7 ± 0,6	0,0495
24	0,8 ± 0,1	1,3 ± 0,2	2,2 ± 0,5	0,0745

Média com variação dos desvios padrões dos índices obtidos nos ensaios de mensuração de biomassa por CV.

N= 4 para cada variável. *- Teste Mann Whitney foi utilizado para observar diferenças entre a variável de suspensão bacteriana com colostro (v/v) e o controle positivo, $p < 0,05$ foi considerado significante.

Quando comparado ao controle positivo, foi constatada uma redução significativa da biomassa do biofilme de *E. coli* na presença do colostro agindo por 6 e 12 horas ($p < 0,05$), mas o tempo de 24 horas não apresentou diferença estatística. Quando comparamos o efeito do soro do colostro nos três diferentes tempos, entre si, a redução da biomassa apresentou-se de forma semelhante, sem diferença estatística entre os resultados (Teste Kruskal-Wallis, $p = 0,1290$).

Em relação ao controle positivo (sem colostro), verificou-se uma quantidade de biomassa semelhante com 6 e 12 horas de incubação, mas uma queda nos valores do índice no tempo de 24 horas, demonstrando talvez um biofilme saturado que começou a regredir por inanição, devendo-se considerar que este cresceu inicialmente por um período de 24 horas, trocou-se o meio e em seguida foi incubado pelos diferentes tempos.

Considerando que, no menor tempo de ação observado, o colostro agiu sobre o biofilme formado de *E. coli* diminuindo a sua biomassa e que nestas mesmas condições o

controle positivo apresentou um biofilme significativo, optou-se pelo período de ação de 6 horas para observar o comportamento do soro de colostro diluído sobre o biofilme formado. Vale ressaltar que este também é o período utilizado por outros estudos para verificar a sensibilidade de antibióticos, como ciprofloxacina e ampicilina, sobre biofilme formado de *E. coli* (GOMES *et al.* 2014).

5.10 Análise da viabilidade do biofilme por contagem de colônias em ágar

Após o término da incubação a 30 °C em placa de poliestireno de 96 poços (tanto para o biofilme em formação, quanto para o formado), o sobrenadante foi descartado e os poços lavados duas vezes com 300 µL de PBS estéril. O biofilme aderido ao fundo da placa foi escarificado com ponteira estéril de forma padronizada para todos os poços (em duas direções: horizontal e vertical), objetivando retirar toda a massa bacteriana.

O material foi diluído com 300 µL de PBS estéril dentro do poço, e essa suspensão foi novamente diluída em 700 µL de PBS estéril em tubo tipo Eppendorf® de 2 mL, homogeneizando bem. Dez microlitros dessa suspensão final foram semeados em placas de Ágar Difco™ Mac Conkey e incubadas em estufa a 37 °C, overnight. A contagem de colônias do biofilme foi expressa em Log₁₀ do número de colônias na placa × 10³ CFU/mL (DAPA *et al.*, 2013).

5.11 Análise do biofilme por Microscopia óptica de campo claro

Seguiu-se a metodologia de Harrison-Balestra *et al.* (2003) para observar o biofilme, com algumas modificações. Após o término da incubação a 30 °C em lâminas de vidro de 8 poços (tanto para o biofilme em formação, quanto para o formado), o sobrenadante foi descartado e os poços lavados duas vezes com 500 µL de PBS estéril. Foram adicionados 400 µL de Cloreto de Cetilpiridínio (Dinâmica, Brasil) por 30 segundos em temperatura ambiente, e em seguida descartado. As lâminas secaram a 30 °C por 30 minutos e então coradas por 15 minutos com 400 µL de uma mistura 2:1 da solução saturada de Vermelho Congo (Vetec, Brasil) e da solução de Tween 80 a 10%. O corante foi retirado com quatro lavagens de água destilada (500 µL/poço), sob agitação. Em seguida, cada compartimento foi corado com 400 µL de solução de Carbol Fucsina a 10 % por 6 minutos. Foram realizadas

quatro lavagens com 500 μL de água destilada, sob agitação. O compartimento de poliestireno da lâmina de cultura de oito poços foi descolado e a lâmina secou a 37 °C por 5 minutos. A solução de Carbol Fucsina cora as bactérias com vermelho/roxo, enquanto que o Vermelho Congo cora a matriz polissacarídica de laranja/rosa. Todas as lâminas foram visualizadas em Microscópio de luz (1000x) acoplado a câmera digital (Olympus, Brasil) onde as imagens foram fotografadas. Os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes, em ocasiões diferentes.

5.12 Análise do biofilme por Microscopia Confocal a Laser (CLSM)

Para observar a viabilidade bacteriana no ensaio de ação do colostro sobre o biofilme em formação e o formado, utilizou-se a microscopia confocal, seguindo a metodologia de Dapa *et al.* (2013). Após a incubação a 30 °C em lâminas de vidro de 8 poços (tanto para o biofilme em formação, quanto para o formado), o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados duas vezes com 500 μL de salina estéril, cuidadosamente. Adicionou-se 400 μL de Paraformaldeído 3,7% (Sigma-Aldrich) por 30 minutos em temperatura ambiente, que em seguida foi retirado e os poços lavados quatro vezes com salina estéril. O biofilme fixado foi corado com o Kit de viabilidade bacteriana *LIVE/DEAD[®] BacLight*, REF L7012 (Molecular Probes, Invitrogen), utilizando-se 3 μL da mistura (v/v) dos corantes SYTO[®] 9 e Iodeto de Propídio (PI) diluídos em 1 mL de água destilada. Cem microlitros desta solução foram adicionados em cada poço, deixando-se agir por 15 minutos em temperatura ambiente, no escuro. Em seguida os poços foram lavados duas vezes com 200 μL de água destilada, sob agitação. O compartimento de poliestireno da lâmina de cultura de oito poços foi descolado e a lâmina montada com lamínula e óleo de montagem (Molecular Probes/ Invitrogen). Visualizou-se em microscópio de escaneamento confocal CLSM FV 1.000 (Olympus) (600x). O SYTO[®] 9 é um corante fluorescente verde capaz de corar ácido nucléico de bactérias tanto com membranas intactas, como danificadas. Em contraste, o PI é um corante fluorescente vermelho capaz de corar somente bactérias com as membranas danificadas, causando uma redução da fluorescência do SYTO[®] 9. Portanto, as bactérias com membranas intactas são coradas de verde e as com membrana danificada são coradas de vermelho. No mínimo quatro fotos foram retiradas de cada poço e então analisadas pelo software FIJI (Image J) permitindo calcular a área total ocupada pelo biofilme e as áreas ocupadas individualmente pelas bactérias vivas e mortas, representadas neste estudo pela

razão LIVE/DEAD (L/D), ou seja, quanto menor a razão, maior o efeito bactericida das amostras de colostro.

5.13 Análise Estatística

Os dados relacionados a cada uma das variáveis foram organizados em planilhas do software *Microsoft Excel*[®] 2007, e posteriormente analisados por meio do pacote estatístico *GraphPad Prism*[®] versão 5.00 para Windows. ANOVA e pós-teste Dunnett foram utilizados para comparação entre três ou mais variáveis com o grupo controle. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

5.14 Aspectos Éticos

O trabalho foi submetido ao comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Ceará, de acordo com a resolução 196/96 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP e foi aprovado em reunião dia 28 de novembro de 2012, n° CAAE 09043512.0.0000.5050 (ANEXO B). Como referido, as parturientes foram consultadas sobre o interesse em participar do estudo e esclarecidas sobre o objetivo, finalidades e procedimentos metodológicos, recebendo a garantia do sigilo conferido às informações e identidades e direito de desistência a qualquer momento.

6. RESULTADOS

A cepa *Escherichia coli* (ATCC[®] 25922[™]), utilizada neste estudo, é reconhecidamente formadora de biofilme, com fatores de virulência relevantes, como descrito anteriormente (NAVES *et al.*, 2008; CRÉMET *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que o soro do colostro na sua concentração pura foi adicionado nos poços (v/v) junto à suspensão bacteriana, portando sua concentração caiu pela metade e foi identificado como Col 1:2, e as diluições seriadas do soro do colostro acompanharam o mesmo raciocínio. A concentração de IgA no “pool” de soro de colostro foi de 12 mg/mL semelhante aos valores identificados na literatura, que mostram uma variação de 11 a 41 mg/mL (ARAÚJO, 2005; AGARWAL *et al.*, 2011), logo, nos ensaios, a concentração dessa imunoglobulina variou de 6 mg/mL (diluição mínima) até 0,0015 mg/mL (diluição máxima). As concentrações proteicas das duas frações purificadas, F1 (IgA1) e F2 (demais proteínas do colostro), foram respectivamente, 12 mg/mL e 10 mg/mL, que caíram pela metade nos ensaios realizados.

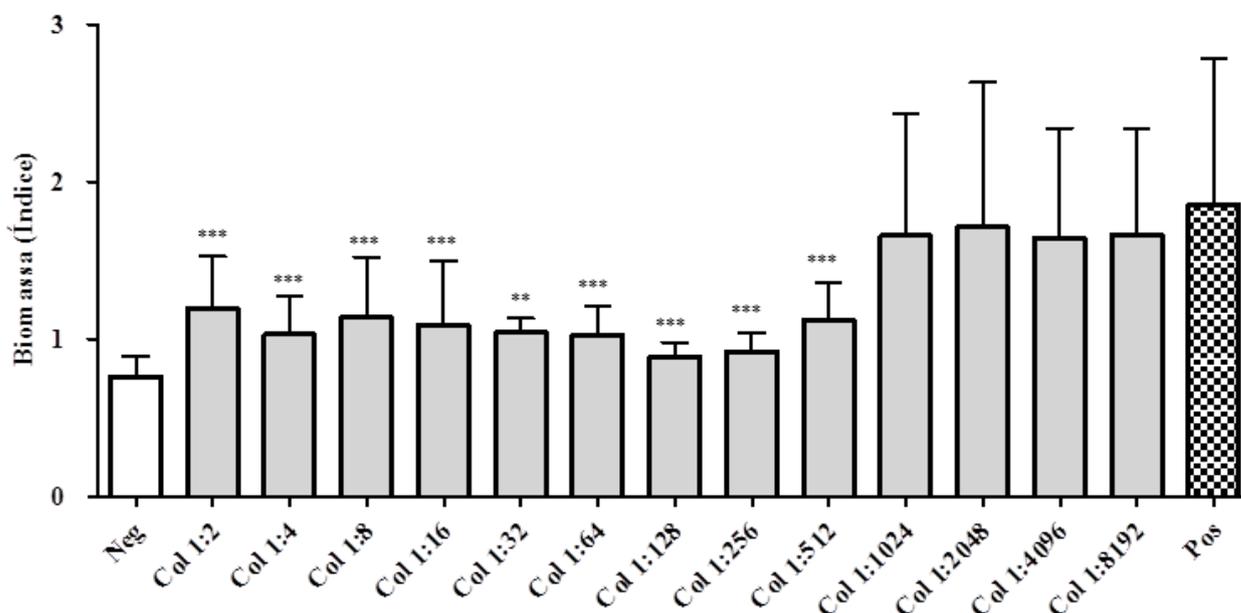
Todas as amostras de soro de colostro e frações foram filtradas e estavam estéreis, diante dos controles microbiológicos realizados. Como esperado, não houve crescimento bacteriano nos poços do controle negativo (meio e colostro) em nenhum experimento.

6.1 Efeito dose-dependente do colostro humano sobre a formação de biofilme de *E coli*.

No ensaio de mensuração de biomassa com cristal violeta, a ação do Col 1:2 durante a formação de biofilme evidenciou inibição significativa, onde a biomassa bacteriana foi reduzida consideravelmente (média e desvio-padrão do índice = 1.2 ± 0.3) em relação ao controle positivo (média e desvio-padrão do índice = 1.8 ± 0.9) ($p < 0,0001$).

O colostro diluído, de forma seriada na proporção de dois, em salina estéril foi adicionado v/v com o meio, até a diluição de 1:8192 (média e desvio-padrão do índice = 1.6 ± 0.6). Observou-se efeito inibitório significativo em relação ao controle positivo até a diluição 1:512 (média e desvio-padrão do índice = 1.1 ± 0.2) ($p < 0,0001$). A figura 1 representa o efeito do colostro e suas diluições sobre a formação do biofilme.

Figura 1 - Efeito dose dependente do colostro humano sobre a formação de biofilme de *E. coli* (ATCC[®] 25922[™]).



Barras = média com variação dos desvios padrões dos índices nos ensaios de mensuração da biomassa *** $p < 0,0001$ e ** $p < 0,001$, ANOVA e pós-teste Dunnett, quando comparados com o controle positivo.

Nas condições do ensaio de biomassa utilizado, as bactérias vivas e mortas são coradas pelo cristal violeta (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008), impossibilitando saber se existe um poder bactericida das diluições observadas. Então, foram realizados ensaios de viabilidade do biofilme por contagem de colônias na presença do colostro diluído 1:2, 1:8, 1:16, 1:64, 1:512, 1:1024 e 1:4096.

As colônias que cresceram nas placas de *Mac Conkey* eram de bacilos gram-negativos, confirmadas por coloração de Gram, descartando qualquer contaminação dos ensaios (Figura 2).

Observou-se o mesmo efeito inibitório dose-dependente do soro do colostro mostrado anteriormente, onde houve diminuição drástica das células viáveis na presença das diluições 1:2 ($5.3 \text{ Log}_{10} \pm 1.5$) a 1:512 ($6.3 \text{ Log}_{10} \pm 1.5$) quando comparado ao controle positivo ($8.4 \text{ Log}_{10} \pm 0.2$) ($p < 0,0001$, $p < 0,01$, respectivamente). A correlação entre os ensaios de biomassa e viabilidade por contagem de colônias pode ser visualizada na Figura 3.

Figura 2 – Fotos representativas dos ensaios de viabilidade do biofilme por contagem de colônias em Ágar *Mac Conckey*. Biofilme em formação de *E. coli* (ATCC[®] 25922[™]) na presença de soro de colostro humano em diferentes diluições.

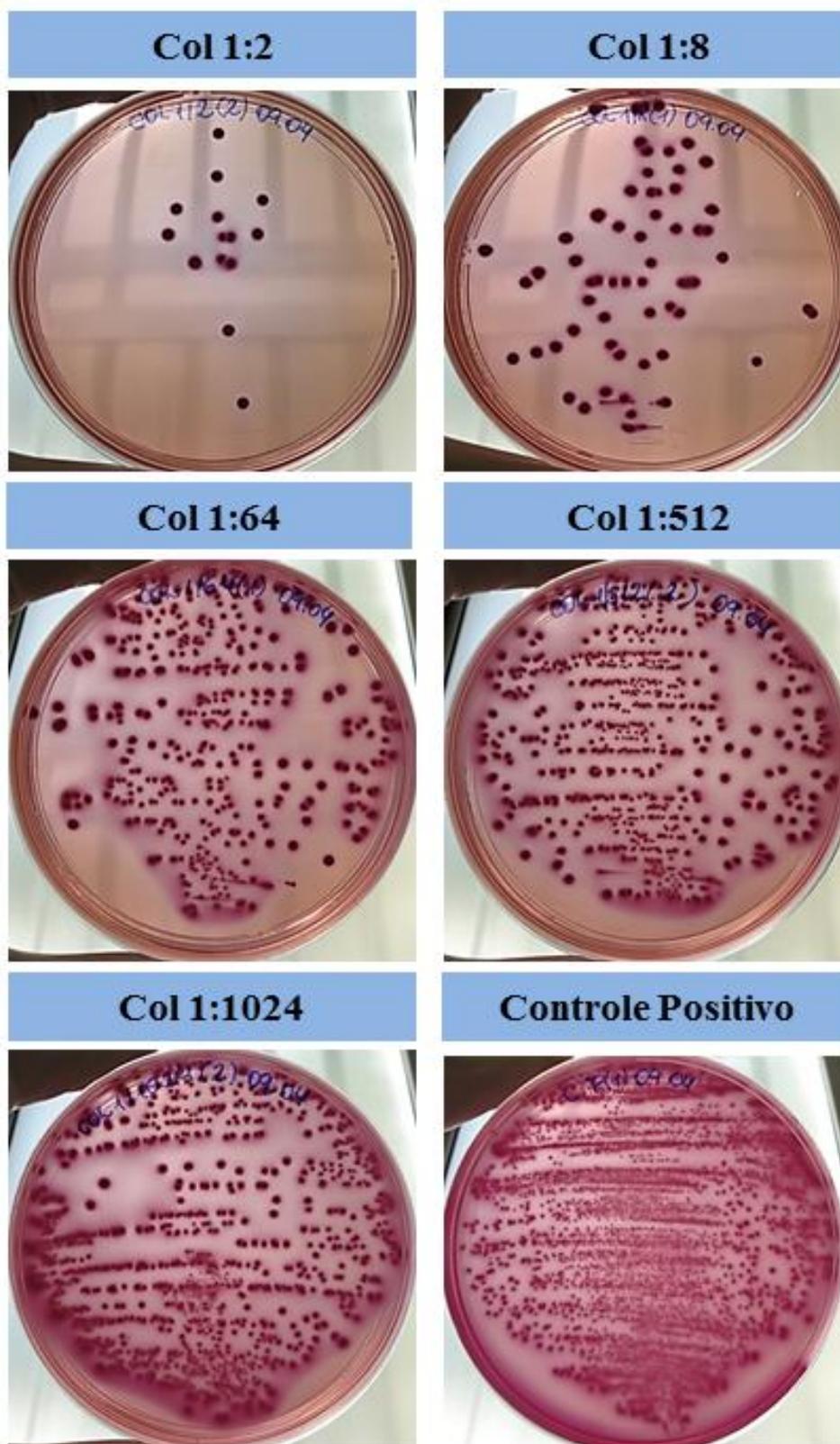
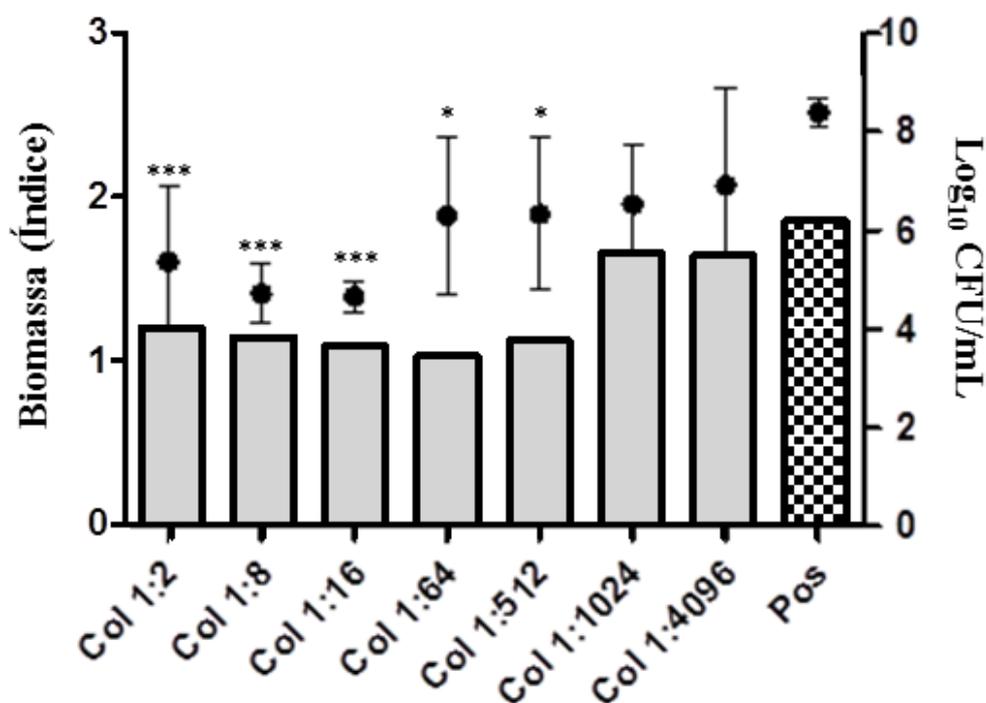


Figura 3 - Relação entre a biomassa (índice) e a viabilidade por contagem de colônias (Log_{10} CFU/mL) do biofilme em formação de *E. coli* (ATCC[®] 25922TM) na presença de colostro humano em diferentes diluições.



Barras = média dos índices dos ensaios de biomassa; Pontos cheios = média com variação do desvio padrão dos valores obtidos com a contagem de colônias, representados em escala logarítmica. *** $p < 0,0001$ e * $p < 0,01$, ANOVA e pós-teste Dunnett, quando comparados com o controle positivo.

À microscopia, foram testadas quatro diluições do colostro (1:2, 1:8, 1:64 e 1:512), além das frações, F1 e F2, sobre o biofilme em formação, representativas do efeito observado nos ensaios de biomassa e de viabilidade bacteriana.

Na microscopia óptica de campo claro, os corantes vermelho congo e carbol fucsina evidenciaram os bacilos (cor vermelho/roxo) e a matriz polissacarídica (laranja/rosa) (Figura 4, controle positivo, à esquerda).

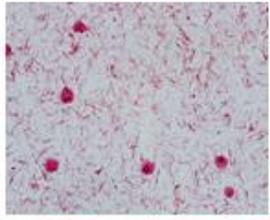
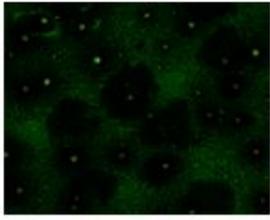
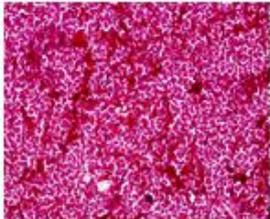
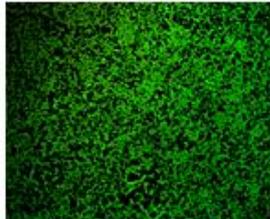
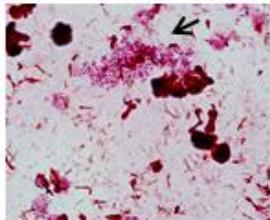
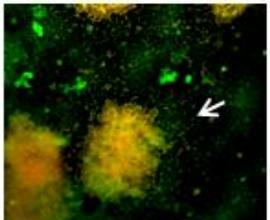
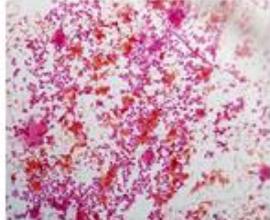
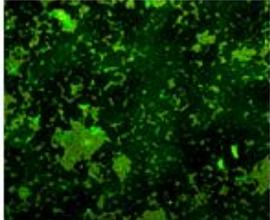
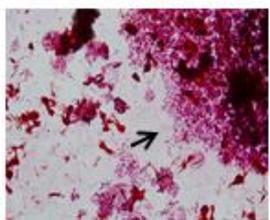
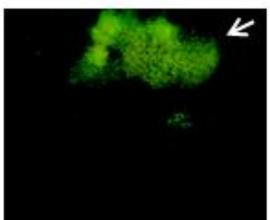
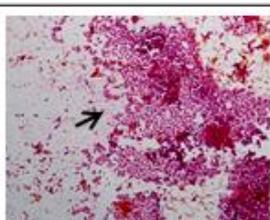
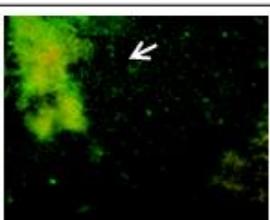
Na microscopia confocal, o reagente *LIVE/DEAD[®] BacLight* evidencia os bacilos vivos com a cor verde e os mortos com vermelho (Figura 4, controle positivo, à direita). Nenhum tipo de contaminação com outros microrganismos foi observado nas lâminas, mas os controles negativos apresentaram uma coloração de fundo nas imagens, talvez devido à interação dos corantes com o meio de cultura.

A Figura 4 mostra um comparativo entre as imagens obtidas pelos dois ensaios de microscopia utilizados com os controles (negativo e positivo), duas diluições do colostro (1:2 e 1:64) e as duas frações proteicas (F1 e F2). As microscopias confirmaram os resultados apresentados anteriormente, onde houve redução considerável do biofilme na presença das quatro diluições e das frações proteicas do soro do colostro quando comparado ao controle positivo. Observou-se também que na presença das diluições menores do soro do colostro, 1:2 (Figura 4) e 1:8 e das frações (Figura 4), apareceu a formação de grumos de bactérias (indicados nas imagens por setas), que desapareceu à medida que o soro do colostro era diluído (1:64 e 1:512), mas ainda assim com efeito inibitório sobre a formação do biofilme.

Dados quantitativos da microscopia confocal (Figura 4) também mostraram redução da área total da biomassa na presença de soro do colostro diluído 1:2 (Área = 12.657 μm), 1:8 (Área = 9.253 μm), 1:64 (Área = 9.149 μm) e 1:512 (Área = 5.191 μm), e suas frações, F1 (Área = 3.209 μm) e F2 (Área = 5.503 μm) quando comparado ao controle positivo (Área = 27.167 μm). Os valores de área do controle negativo, gerados pelo Software devido ao *background*, foram descontados das outras variáveis.

A diminuição da viabilidade bacteriana do biofilme também foi associada, ao se observar uma redução da razão entre bactérias vivas e mortas na presença do colostro diluído: Col 1:2 (Razão = 1,4), 1:8 (Razão = 1,3), 1:64 (Razão = 1,9), 1:512 (Razão = 2,1), e das frações, F1 (Razão = 1,9) e F2 (Razão = 1,6) em relação ao controle positivo (Razão = 3,3), como pode ser vista na coluna Razão L/D da Figura 4. Os grumos observados nas diluições menores apresentaram uma sobreposição das bactérias vivas e mortas, produzindo uma cor alaranjada, que não ficou tão evidente na presença das frações.

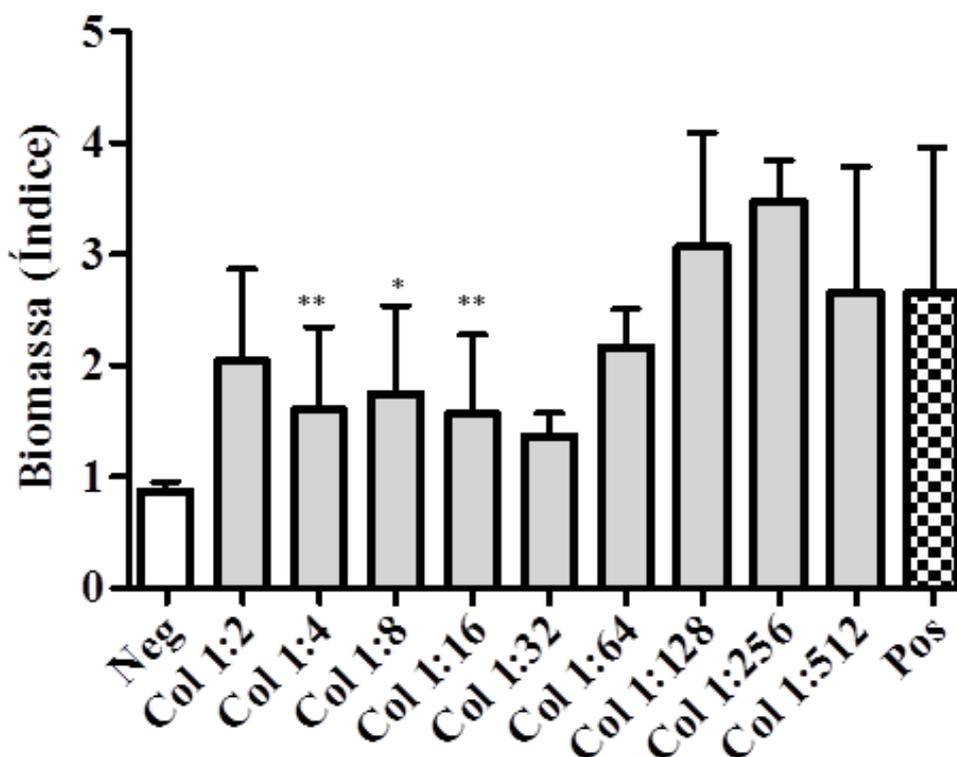
Figura 4 – Comparativo entre a microscopia óptica de campo claro (corante vermelho congo e carbol fucsina/aumento 1000x) e confocal (reagente *LIVE/DEAD*[®] *BacLight*/aumento 600x) da formação de biofilme de *E. coli* (ATCC[®] 25922[™]) na presença de colostro humano diluído e frações. As setas representam grumos bacterianos.

	Vermelho Congo e Carbol Fucsina	Live/Dead	Área total (μm ²)	Razão L/D
Controle Negativo			–	–
Controle Positivo			27.167	3,3
Col 1:2			12.657	1,4
Col 1:64			9.149	1,9
F1			3209	1,9
F2			5503	1,6

6.2 Efeito do colostro humano sobre o biofilme formado de *E. coli*

Noves diluições seriadas do soro do colostro, agindo por 6 horas sobre o biofilme formado, foram testadas pelos ensaios de mensuração de biomassa por cristal violeta e viabilidade por contagem de colônias. Com a primeira técnica, constatou-se um efeito inibitório bem mais discreto quando comparado a sua ação sobre o biofilme em formação, mas ainda assim significativa nas menores diluições, Col 1:4 (média e desvio-padrão do índice = 1.6 ± 0.7), Col 1:8 (média e desvio-padrão do índice = 1.7 ± 0.7) e Col 1:16 (média e desvio-padrão do índice = 1.5 ± 0.7), em relação ao controle positivo (média e desvio-padrão do índice = 2.6 ± 1.2) ($p < 0,001$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). A maior diluição testada foi 1:512 (média e desvio-padrão do índice = 2.6 ± 1.1) que já não apresentou mais efeito sobre o biofilme (Figura 5).

Figura 5 - Efeito das diluições do colostro humano sobre o biofilme formado de *E. coli* (ATCC® 25922™).



Barras = média com variação dos desvios padrões dos índices nos ensaios de mensuração de biomassa. ** $p < 0,001$ e * $p < 0,01$, ANOVA e pós-teste Dunnett

Interessante notar que o soro do colostro diluído 1:2 não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo. Atribuímos este achado ao efeito da formação de grumos (aglutinação?) levando à “retenção” das bactérias na placa, com consequente reação positiva à adição do cristal violeta, tanto que ao diluirmos o colostro observamos uma tendência a um maior efeito do colostro sobre a inibição do biofilme formado, representado pela Figura 5.

Quanto ao ensaio de viabilidade por contagem de colônias do biofilme formado, não foi observada uma redução de unidades formadoras de colônias na presença do colostro, comportando-se igualmente ao controle positivo (Figura 6).

Na microscopia óptica de campo claro, o soro do colostro promoveu uma discreta diminuição da biomassa do biofilme formado, representada pelo Col 1:2 na Figura 7, onde podemos visualizar a formação de agregados de bactérias no lugar de um biofilme contínuo, como no controle positivo.

Na microscopia de escaneamento confocal (Figura 8) foram testadas quatro diluições do colostro sobre o biofilme formado (1:2, 1:8, 1:64 e 1:512). Não houve diferença entre a área total de biofilme, com ou sem colostro, mas foi evidenciado uma diminuição da viabilidade bacteriana pelo soro do colostro, reduzindo a razão entre bactérias vivas e mortas nas diluições Col 1:2 (razão L/D = 1,1), Col 1:8 (razão L/D = 1,2), Col 1:64 (razão L/D = 1,1) e Col 1:512 (razão L/D = 1,4) em relação ao controle positivo (razão L/D = 4,2).

Observou-se também uma tendência à formação de agregados na presença do colostro, com predomínio da cor alaranjada secundária à sobreposição dos padrões verde (vivo) e vermelho (morto), indicando efeito bactericida do soro do colostro sobre o biofilme formado.

Figura 6 – Fotos representativas dos ensaios de viabilidade do biofilme por contagem de colônias em Ágar *Mac Conckey*. Biofilme formado de *E. coli* (ATCC® 25922™) na presença de soro de colostro humano em diferentes diluições agindo por 6 horas.

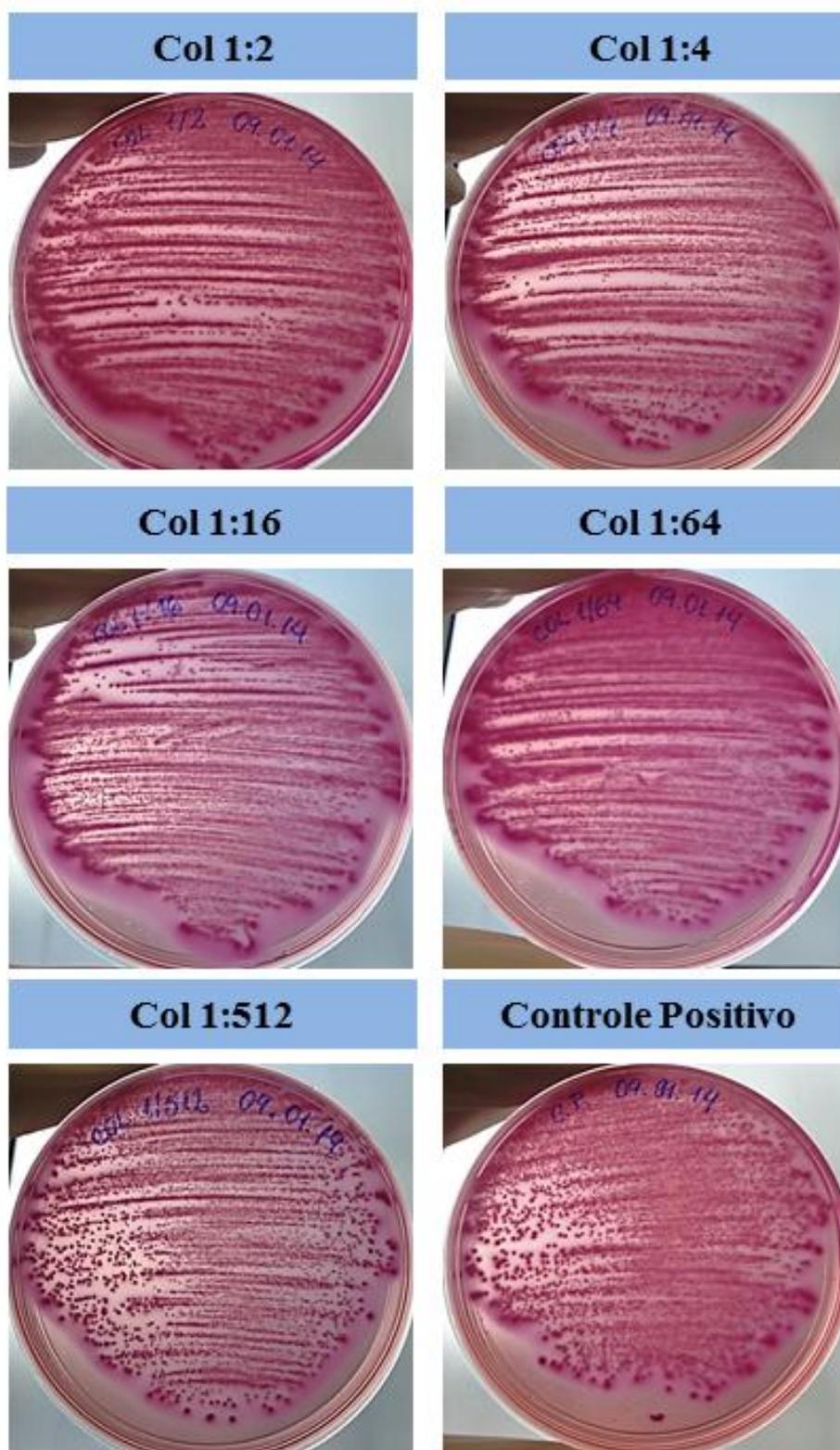


Figura 7 - Microscopia óptica de campo claro (corante vermelho congo e carbol fucsina/aumento 1000x) do biofilme formado de *E. coli* (ATCC[®] 25922[™]) na presença de colostro humano. As setas representam grumos bacterianos.

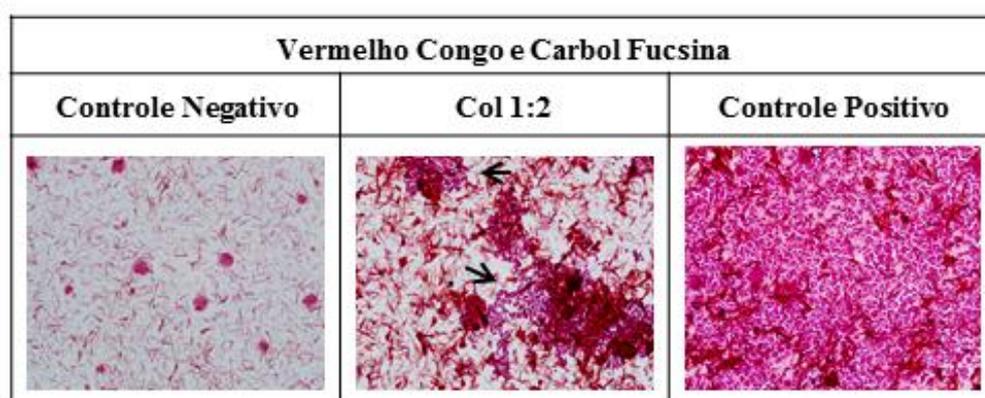
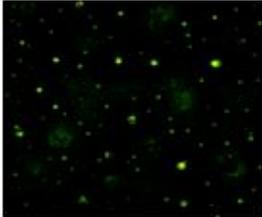
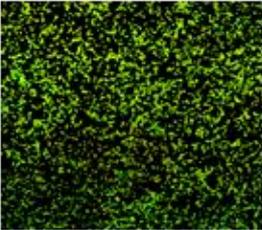
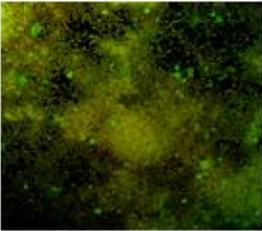
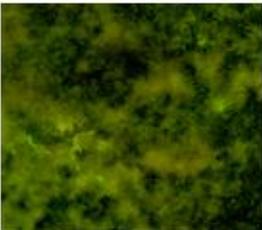
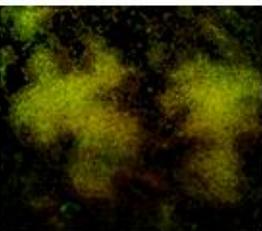
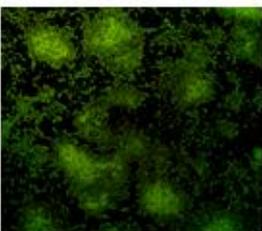


Figura 8 - Microscopia de escaneamento confocal (reagente *LIVE/DEAD*[®] *BacLight*/aumento 600x) do biofilme formado de *E. coli* (ATCC[®] 25922TM) na presença de colostro humano.

	Live/Dead	Área total (μm^2)	Razão L/D
Controle Negativo		--	--
Controle Positivo		11601	4,2
Col 1:2		12285	1,1
Col 1:8		11755	1,2
Col 1:64		10950	1,1
Col 1:512		9917	1,4

7. DISCUSSÃO

A formação de biofilme por *E. coli* é um reconhecido fator de virulência associado à gravidade das lesões causadas por sua infecção (NAVES *et al.*, 2008; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009). Sabe-se que os componentes do leite humano têm efeito protetor contra diversos microrganismos causadores de doenças nos neonatos (AGARWAL *et al.*, 2011), e que a ausência de amamentação está relacionada com o aumento das taxas de mortalidade em menores de seis meses (VICTORA *et al.*, 1987; FUCHS; VICTORA, 2002), cuja faixa etária é acometida por quadros diarreicos, meningite e sepse neonatal causados por *E coli*.

Logo, procuramos com nosso estudo avaliar o efeito do colostro humano sobre biofilme de *E. coli in vitro*, tanto durante sua formação como após ter sido formado. Foi observado que o soro do colostro humano (secreção láctea sem gordura e células) tem efeito inibitório sobre o biofilme de *E. coli*, principalmente em sua formação. Este resultado baseia-se na redução significativa de biomassa e da viabilidade bacteriana na presença de colostro diluído até 512 vezes, caracterizando um efeito dose-dependente.

Diante desses resultados, realizamos experimentos com frações proteicas isoladas do colostro e observamos efeito inibitório mediado por duas frações: uma fração rica em IgA1 e outra rica nos demais componentes proteicos. Com isso concluímos que a inibição do biofilme pode estar associada aos componentes proteicos, mas não descartamos a hipótese da ação de carboidratos (presentes no soro testado), lipídios (que foi retirado durante o processamento das amostras), entre outras moléculas que não foram pesquisadas isoladamente neste estudo.

Diversos componentes proteicos do leite do sistema imune inato e adaptativo podem estar envolvidos neste efeito sobre o biofilme de *E. coli*. A lactoferrina já foi descrita (OCHOA *et al.*, 2003) como responsável pela degradação de proteínas do sistema secretor tipo III da EPEC, impedindo lesões nos enterócitos, como o mecanismo de adesão bacteriana (*attaching and effacing*).

Xu *et al.* (2010) também demonstraram a atividade antimicrobiana da lactoferrina contra *P. aeruginosa*. A bactéria foi incubada com lactoferrina bovina em diferentes

concentrações (1, 5 e 25 $\mu\text{mol l}^{-1}$). Foram realizados ensaios de viabilidade após 1h de incubação por contagem de colônias, além de quantificação de piocianina, atividade de elastase e formação de biofilme. Foi encontrada atividade bactericida dose-dependente e diminuição da produção de piocianina e elastase (potentes fatores de virulência) e diminuição da formação de biofilme. A lactoferrina, além de sequestrar ferro, promoveu uma mudança de conformação na membrana da *P. aeruginosa*, impedindo sua aderência. Mas parece que estes efeitos estão limitados a sua forma apo-lactoferrina, pois em outro estudo, de Singh (2004), a lactoferrina ferro-insaturada preveniu a formação de biofilme de *P. aeruginosa*, o que não aconteceu com a sua forma ferro-saturada, indicando que a habilidade de sequestrar ferro é um mecanismo essencial nesse processo.

O componente secretor (CS), presente no colostro na forma livre ou associado à molécula de IgA, tem sido também bastante estudado por suas propriedades antimicrobianas inespecíficas conferidas pela sua natureza altamente glicosilada. Perrier *et al.* (2006) empregaram modelos *in vitro* para demonstrar a participação do CS livre do colostro na ligação a patógenos e bloqueio da infecção. Foi demonstrado que glicanos do CS, como a galactose, e resíduos de ácido siálico são responsáveis pela ligação à toxina A do *C. difficile* com redução do seu efeito citopático em células CaCo-2, além de ligar-se a adesina intimina da *E. coli* enteropatogênica e inibir sua ligação às células HEp-2.

Portanto, a proteção conferida pela SIgA, não se limita a uma ação antígeno-específica, mas também inespecífica. Murthy *et al.* (2011) observaram um efeito dose-dependente da SIgA comercializada (2 a 0,06 mg/mL de SIgA) inibindo a formação de biofilme de *V. cholerae*, o que não aconteceu com as imunoglobulinas, IgM, IgG e IgA desglicosilada, sugerindo também um papel importante da manose nessa inibição, que está presente no componente secretor da IgA.

Os dados obtidos no nosso estudo, com relação ao efeito dose-dependente do colostro sobre o biofilme em formação, foram semelhantes ao trabalho de Murthy *et al.* (2011), ao considerarmos que nas diluições do soro de colostro onde houve redução da formação de biofilme de *E. coli* (de 1:2 a 1:512) a concentração da IgA variou de 6 a 0,02 mg/mL, ressaltando a participação dessa molécula nesse processo.

A ação antígeno-específica da IgA também é destacada. NOGUERA-OBENZA *et al.* (2003) mostraram que no leite materno existe altas concentrações de SIgA específicas

contra diversos lipopolissacarídios, além de EspA, EspB e intimina presentes na EHEC, protegendo o neonato de doenças enteropatogênicas. Resultados parecidos também foram observados com EPEC (CÂMARA *et al.*, 1995; MANJARREZ-HERNANDEZ *et al.*, 2000), onde SIgA do leite é capaz de reconhecer antígenos responsáveis pela lesão *attaching and effacing* às células epiteliais do intestino e inibir o fenômeno de adesão localizada da EPEC às células em cultura.

Os anticorpos IgA específicos contra antígenos proteicos ou polissacarídicos presentes na membrana e responsáveis pela adesão e infectividade da *E. coli*, provavelmente estavam presentes nas amostras de colostro testadas neste estudo, já que um “pool” de colostro foi adquirido de um grande número de parturientes que possivelmente já entraram em contato alguma vez na vida com estes microrganismos, o que pode ter contribuído para o fenômeno de inibição da formação de biofilme *in vitro*.

Para o efeito dose-dependente do soro de colostro observado, não só a lactoferrina ou a SIgA, mas outros componentes proteicos, que possuem ação antimicrobiana, podem ter atuado, como as imunoglobulinas IgG e IgM, as proteínas do sistema complemento, fator bífido, lisozima, mucina, α -lactoalbumina, além de oligossacarídeos, entre outras moléculas (LABBOK; CLARK; GOLDMAN, 2004).

Diante de todo esse contexto, devemos ressaltar a importância da composição diversificada do colostro, tanto de componentes específicos, como inespecíficos, atuando simultaneamente contra a *E. coli*. Que esse material biológico tem uma imensa capacidade protetora contra estes microrganismos, já é de conhecimento de todos, mas o nosso estudo foi além ao avaliar a ação do colostro sobre o crescimento de biofilme, onde atuou reduzindo drasticamente esse mecanismo de patogenicidade da *E. coli in vitro*.

Ao diluir o colostro até 512 vezes nós também simulamos a ação do leite maduro, onde os componentes estão em menor quantidade. Diante disso podemos inferir que o leite maduro provavelmente também tem ação contra a formação de biofilme, embora outras pesquisas devam ser feitas para confirmar esta suposição.

O nosso estudo associou quatro técnicas para avaliar o desenvolvimento de biofilme bacteriano: a mensuração da biomassa por cristal violeta, a viabilidade do biofilme por contagem de colônias, a microscopia óptica de campo claro com coloração por vermelho congo/carbol fucsina e a microscopia de escaneamento confocal com o reagente *LIVE/DEAD*.

Estas metodologias foram utilizadas para demonstrar a presença bem como a viabilidade bacteriana do biofilme produzido *in vitro* pela cepa *E. coli* (ATCC® 25922™) na presença ou na ausência das amostras de soro de colostro.

No controle positivo (bactéria e meio), observamos um biofilme extenso e contínuo com 100% de viabilidade celular. Ao adicionarmos as amostras estudadas verificamos a formação de grumos de bacilos isolados e delimitados, semelhantes a um efeito de “aglutinação”, que desapareceu à medida que o soro do colostro era diluído, mas mantendo ainda assim um efeito inibitório, levando a crer que anticorpos (principalmente a IgA que está em maior quantidade) tenham participação nessa inibição, aglutinando as bactérias.

No ensaio com cristal violeta, aquele fenômeno se traduziu em valores ligeiramente maiores de biomassa, ao compararmos o colostro diluído 1:2 em relação às demais diluições, até o limite de 1:512, associado a um progressivo desaparecimento da “aglutinação”. Como a avaliação pelo cristal violeta não diferencia as bactérias mortas das vivas, provavelmente os valores ligeiramente maiores observados com a maior concentração dos componentes do colostro foi devido às células mortas e “aderidas” ao local do ensaio pela ligação aos anticorpos.

Alguns trabalhos apontam a SIgA como responsável pelo aumento da formação do biofilme bacteriano, como no trabalho de Bollinger *et al.* (2003) e Orndorff *et al.* (2004) que sugerem que a SIgA humana contribui para a formação de um biofilme fino de uma cepa de *E. coli* comensal (geralmente de baixa virulência) na superfície epitelial do intestino. Esse fenômeno é dependente da presença do pili tipo 1 da *E. coli*, que tem afinidade por resíduos de manose, e da ligação deste a carboidratos presentes no componente secretor, servindo como uma âncora para a adesão às células epiteliais em cultura. Embora utilizando diferentes técnicas e ressaltando o papel protetor da IgA, estariam aqueles autores observando efeito semelhante ao encontrado por nós, aglutinação, e interpretado como sendo uma ação pró-biofilme bacteriano mediada pela IgA?

A fim de estudar a participação de uma fração de IgA isolada, foram obtidas duas frações do colostro a partir de uma coluna Sepharose-Frutalina: uma fração eluída da coluna rica em IgA1, que apresentou o mesmo padrão de eluição e eletroforese de estudos anteriores (ALMOGREN; KERR, 2008), e uma fração, que não se ligou à coluna, rica em IgA2 e demais proteínas do colostro. Partindo do princípio que a IgA total presente no “pool” de soro

de colostro foi quantificada em 12 mg/mL, concordando com estudos anteriores (KERR, 1990; ARAÚJO *et al.*, 2005), concentramos as frações F1 e F2 para que a concentração proteica ficasse semelhante à da IgA total (12 mg/mL e 10 mg/mL, respectivamente).

Estas frações também apresentaram uma redução da biomassa e também observamos a formação de grumos, confirmando a nossa hipótese que a IgA ligada as bactérias podem ser responsáveis por esse efeito, quando se considera a presença isolada de IgA1 na F1.

Como já mencionado, não se pode descartar a ação de outras proteínas do colostro neste fenômeno, pois a F2 também revelou o mesmo padrão, mas com uma maior redução da viabilidade bacteriana em relação a F1, onde a IgA2, a lisozima (MASSCHALCK *et al.*, 2001), a lactoferrina (OCHOA *et al.*, 2003), o sistema complemento pela via alternativa (NIKOLOVA; TOMANA; RUSSELL, 1994), podem ter atuado danificando a membrana celular das bactérias e levando a morte celular. O efeito bactericida apresentado pela F1 pode ter ocorrido de forma indireta, devido à ação da IgA1 e/ou de seu componente secretor, ligando-se a antígenos de superfície, como as proteínas do sistema secretor da *E. coli*, por exemplo, (NOGUERA-OBENZA *et al.*, 2003), com a desestabilização da sua membrana, inviabilidade celular e morte.

Todos os estudos já citados limitaram-se a estudar a ação de componentes do leite humano inibindo a adesão de microrganismos às células hospedeiras ou prevenindo a formação de biofilme. De maneira original, o presente estudo também apresentou achados, quanto à ação do soro do colostro sobre um biofilme de *E. coli* já estruturado e maduro.

Em um tempo de ação de 6 horas, o colostro mostrou efeito inibitório reduzindo a biomassa do biofilme. Este comportamento manteve-se por um período de até 24 horas. Destacamos a ação bactericida observada em várias diluições através da microscopia confocal. Diante desses achados, é razoável dizer que a alimentação de um neonato, acometido por alguma infecção por *E. coli*, com leite materno por no mínimo de 6 em 6 horas poderia protegê-lo, destruindo biofilmes patogênicos que por ventura possam ter se formado causando a progressão da doença. Outra vantagem a ser considerada é que este material difere dos outros antibióticos comercializados pelo fato de que estes podem destruir a flora normal bacteriana, enquanto que o colostro pode favorecê-la (LABBOK; CLARK; GOLDMAN, 2004).

O efeito dose-dependente do colostro sobre o biofilme formado evidenciou resultados significativos somente nas diluições menores do colostro testadas, ou seja, a quantidade mínima exigida dos componentes do colostro para observar a inibição sobre o biofilme formado é maior quando comparado aos dados durante o crescimento do biofilme.

O efeito dos componentes proteicos e da IgA1, exclusivamente, não pode ser observado sobre o biofilme formado devido à quantidade limitada obtida das frações e a dificuldade na purificação.

Os achados deste estudo ressaltam a importância da amamentação de crianças saudáveis ou mesmo hospitalizadas, prevenindo doenças ou atuando sobre infecções estabelecidas. São resultados pioneiros e abrem portas para diversos questionamentos e futuras pesquisas.

8. CONCLUSÃO

O soro do colostro em diferentes concentrações apresenta efeito inibitório sobre o biofilme de *E. coli*, prevenindo o seu crescimento e promovendo uma diminuição da viabilidade do biofilme maduro. Os componentes proteicos, principalmente a IgA, parecem ter uma participação crucial nesses fenômenos.

Estas ações podem ser capazes de reduzir a disseminação sistêmica desses microrganismos e evitar infecções prolongadas em neonatos, diminuindo as hospitalizações por diarreias graves e a mortalidade infantil em menores de seis meses, quando estes forem amamentados adequadamente.

9. PERSPECTIVAS

Percebemos a necessidade de realizar mais estudos a fim de isolar outras frações do colostro, não só proteicas, mas de carboidratos e lipídios, e testá-las sobre o biofilme de *E. coli* ou de outros microrganismos, tentando caracterizar melhor os seus mecanismos de ação sobre esse fator de virulência tão preocupante. A ação sobre o biofilme formado também deve ser melhor caracterizada, testando tempos de ação menores do colostro.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ABDON, A. P. V. *et al.* Gastroprotective potential of frutalin, a d-galactose binding lectin, against ethanol-induced gastric lesions. **Fitoterapia**, v. 83, p. 604–608, 2012.

AGARWAL, S. *et al.* Immune Markers in Breast Milk and Fetal and Maternal Body Fluids: A Systematic Review of Perinatal Concentrations. **J Hum Lact**, v. 27, n. 2, p. 171-186, 2011, doi: 10.1177/0890334410395761.

ALMOGREN, A.; KERR, M. A. Irreversible aggregation of the Fc fragment derived from polymeric but not monomeric serum IgA1—Implications in IgA-mediated disease. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 87–94, 2008.

ALVAREZ, N. *et al.* Passive administration of purified secretory IgA from human colostrum induces protection against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model of progressive pulmonary infection. **BMC Immunology**, v. 14, Suppl. 1, S3, 2013.

ARAÚJO, E. D. *et al.* Evaluation of the Secretory Immunoglobulin A Levels in the Colostrum and Milk of Mothers of Term and Pre-Term Newborns. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 357-362, 2005.

BARROS, M. D. *et al.* Papel do leite materno na defesa do lactente contra infecções. **Pediatria (São Paulo)**, v. 4, p. 88-102, 1982.

BJARNSHOLT, T. *et al.* The *in vivo* biofilm. **Trends in Microbiology**, 2013. doi: 10.1016/j.tim.2013.06.002

BODE, L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. **Glycobiology**, v. 22, n. 9, p. 1147–1162, 2012.

BOLLINGER, R. R. *et al.* Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. **Immunology**, v. 109, p. 580-587, 2003.

BOLLINGER, R. R. Secretory IgA and mucin-mediated biofilm formation by environmental strains of *Escherichia coli*: role of type 1 pili. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 378–387, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p: 248-54, 1976.

CÂMARA, L.M.C. 1992. **O papel do colostro humano na inibição da aderência de *Escherichia coli* enteropatogênica a células Hela: participação da IgA secretória.** Dissertação (Mestrado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

CÂMARA, L. M. C. *et al.* Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence to HeLa cells by human colostrum. Detection of specific sIgA related to EPEC outer-membrane proteins. **Advances In Experimental Medical Biology**, v. 371, p. 673-676, 1995.

CORRÊA, S. *et al.* Human colostrum contains IgA antibodies reactive to colonization factors I and II of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 47, p. 199–206, 2006.

CORTHÉSY, B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. **Frontiers in Immunology**, v. 4, Article 185, p. 1-11, 2013, doi: 10.3389/fimmu.2013.00185.

CRÉMET, L. *et al.* Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, p. 252–255, 2013.

DAPA, T. *et al.* Multiple Factors Modulate Biofilm Formation by the Anaerobic Pathogen *Clostridium difficile*. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 3, p. 545–555, 2013.

DE OLIVEIRA, T. C. R.; LATORRE, M. R. D. O. Trends in hospital admission and infant mortality from diarrhea: Brazil, 1995-2005. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 102-111, 2010.

DELNERI, M. T. *et al.* Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to HEp-2 cells by colostrum and milk from mothers delivering low-birth-weight neonates. **Europien Journal Pediatric**, v. 156, p. 493-498, 1997.

DONELLI, G. *et al.* Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 65, p. 318–325, 2012.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.15, p. 167-193, 2002.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews**, v. 8, p. 623-633, 2010.

FUCHS, S. C.; VICTORA, C. G. Risk and prognostic factors for diarrheal disease in Brazilian infants: a special case-control design application. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 773-782, 2002.

GAROFALO, R. Cytokines in human milk. **The journal of pediatrics**, v. 156, n. 2, 2010.

GERMAN, J. B.; DILLARD, C. J.; WARD, R. E. Bioactive components in milk. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, p. 653-658, 2002.

GIL, A. C. **Como Elaborar Projetos de Pesquisa**. São Paulo: Atlas, 2007.

GOMES, L. C. *et al.* Escherichia coli adhesion, biofilm development and antibiotic susceptibility on biomedical materials. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 00A, 2014. DOI: 10.1002/jbm.a.35277.

GOMES, M. M. *et al.* Recognition of galactose-deficient *O*-glycans in the hinge region of IgA1 by *N*-acetylgalactosamine-specific snail lectins: a comparative binding study. **Biochemistry**, v. 49, n. 27, p. 5671–5682, 2010.

GRASSI, M. S.; COSTA, M. T. Z.; VAZ, F. A. C. Fatores imunológicos do leite humano. **Pediatria (São Paulo)**, v. 23, n. 3, p. 258-63, 2001.

HANSON, L. A. Session 1: Feeding and infant development Breast-feeding and immune function. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 66, n. 3, p. 384–396, 2007, doi:10.1017/S0029665107005654.

HARRISON-BALESTRA, C. A Wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy. **Dermatol. Surg.**, v. 29, n. 6, p. 631–635, 2003.

HAKANSSON, A. P. *et al.* Apoptosis-Like Death in Bacteria Induced by HAMLET, a Human Milk Lipid-Protein Complex. **Plos One**, v. 6, n. 3, e17717, 2011, doi:10.1371/journal.pone.0017717.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1034-1043, 2009.

ITO, A. *et al.* Increased antibiotic resistance of *Escherichia Coli* nature biofilms. **App. Environ. Microbiol.**, v. 75, p.4093-4100, 2009.

JIMÉNEZ, E. *et al.* Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors, **Research in Microbiology**, v. 159, p. 595-601, 2008.

JONES, G. *et al.* How many child deaths can we prevent this year? **Lancet**, v. 362, p. 65–71, 2003.

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

KERR, M. A. The structure and function of human IgA. **Biochem. J.**, v. 271, p. 285-296, 1990.

LABBOK, M. H.; CLARK, D.; GOLDMAN, A. S. Breastfeeding: maintaining an irreplaceable immunological resource. **Nature Reviews**, v. 4, p. 565-572, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAURINDO, V. M. 1991. **Composição nutricional do colostro de mães de recém-nascidos de termo adequados e pequenos para a idade gestacional**. Dissertação (Mestrado em Pediatria). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

LEÓN-SICAIROS, N. Amoebicidal Activity of Milk, Apo-lactoferrin, sIgA and Lysozyme. **Clinical Medicine & Research**, v. 4, n. 2, p. 106-113, 2006.

LESMAN-MOVSHOVICH, E.; LERRER, B.; GILBOA-GARBER N. Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* lectins by human milk glycans. **Can. J. Microbiol.**, v. 49, p. 230-235, 2003, doi: 10.1139/W03-027.

LINDH, E. Increased resistance of immunoglobulin A dimers to proteolytic degradation after binding of secretory component. **J Immunol.**, v. 114, p. 284-286, 1975.

LÖNNERDAL, B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. **The Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 2, Suppl. 1, S26-30, 2010, doi. 10.1016/j.jpeds.2009.11.017.

LÖNNERDAL, B.; LIEN, E. L. Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 9, p. 295-305, 2003.

MAKOBÉ, C. K. *et al.* Molecular characterization of virulence factors in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates from children in Nairobi, Kenya. **J Infect Dev Ctries**, v. 6, n. 8, p. 598-604, 2012.

MANJARREZ-HERNANDEZ, H. A. *et al.* Antigen Detection Enteropathogenic *Escherichia coli* Using Secretory Immunoglobulin A Antibodies Isolated from Human Breast Milk. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 5030–5036, 2000.

MARCH, S. C.; PARIKII, I.; CUATRECASA, P. A. A simplified method for cyanogens bromide activation of agarose for affinity chromatography. **Anal Biochem**, v. 60, p. 149–152, 1974.

MARKS, L. R.; CLEMENTI, E. A.; HAKANSSON, A. P. The Human Milk Protein-Lipid Complex HAMLET Sensitizes Bacterial Pathogens to Traditional Antimicrobial Agents. **Plos One**, v. 7, n. 8, e43514, 2012, doi:10.1371/journal.pone.0043514.

MASSCHALCK, B. *et al.* Inactivation of Gram-Negative Bacteria by Lysozyme, Denatured Lysozyme, and Lysozyme-Derived Peptides under High Hydrostatic Pressure. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 339-344, 2001, doi 10.1128/AEM.67.1.339-344, 2001.

MATHIAS, A.; CORTHÉSY, B. Recognition of Gram-positive Intestinal Bacteria by Hybridoma- and Colostrum-derived Secretory Immunoglobulin A Is Mediated by Carbohydrates. **The journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 19, p.17239–17247, 2011.

MURTHY, A. K. *et al.* Mannose-Containing Oligosaccharides of Non-Specific Human Secretory Immunoglobulin A Mediate Inhibition of *Vibrio cholerae* Biofilm Formation. **Plos One**, v. 6, n. 2, e16847, 2011, doi:10.1371/journal.pone.0016847.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NAVES, P. *et al.* Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microb Pathog.**, v. 45, p. 86-91, 2008.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.. Quorum Sensing and Phytochemicals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 12607-12619, 2013.

NIKOLOVA, E. B.; TOMANA, M.; RUSSELL, M. W. All forms of human IgA antibodies bound to antigen interfere with complement (C3) fixation induced by IgG or by antigen alone. **Scand J Immunol.**, v. 39, p. 275-280, 1994.

NOGUERA-OBENZA, M. *et al.* Human Milk Secretory Antibodies against Attaching and Effacing *Escherichia coli* Antigens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 545-551, 2003.

OCHOA, T. J. *et al.* Lactoferrin impairs type III secretory system function in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5149–5155, 2003.

ORNDORFF, P. E. *et al.* Immunoglobulin-Mediated Agglutination of and Biofilm Formation by *Escherichia coli* K-12 Require the Type 1 Pilus Fiber. **Infection and Immunity**, v 72, n. 4, p. 1929–1938, 2004.

PABST, O. New concepts in the generation and functions of IgA. **Nature Reviews**, v. 12, p. 821-832, 2012.

PALMEIRA, P. *et al.* Colostrum from healthy Brazilian women inhibits adhesion and contains IgA antibodies reactive with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Eur J Pediatr**, v. 164, p. 37–43, 2005.

PALMEIRA, P. *et al.* Transfer of antibodies across the placenta and in breast milk from mothers on intravenous immunoglobulin. *Pediatr Allergy Immunol*, v. 20, p. 528–535, 2009.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72 p. 157–165, 2008.

PERRIER, C.; SPRENGER, N.; CORTHÉSY, B. Glycans on Secretory Component Participate in Innate Protection against Mucosal Pathogens. **The journal of biological chemistry**, v. 281, n. 20, p. 14280–14287, 2006.

PETTERSSON, J.; MOSSBERG, A. K.; SVANBORG, C. alpha-Lactalbumin species variation, HAMLET formation, and tumor cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 260–270, 2006.

POLIT, D. F.; BECK, C. T. **Fundamentos de Pesquisa em Enfermagem**. 7^o ed. Porto Alegre: Artmed, p. 669, 2011.

REISNER, A. *et al.* In Vitro Biofilm Formation of Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Strains: Impact of Environmental and Genetic Factors. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 10, p. 3572–3581, 2006.

SACHA, C. R. *et al.* Restricted isotype, distinct variable gene usage, and high rate of gp120 specificity of HIV-1 envelope-specific B cells in colostrum compared with those in blood of HIV-1-infected, lactating African women. **Nature Mucosal Immunology**, 2014 (somente resumo disponível). doi:10.1038/mi.2014.69.

SCHROTEN, H. *et al.* Opsonophagocytosis versus lectinophagocytosis in human milk macrophages. **Adv Exp Med Biol.**, v. 478, p. 95-107, 2000.

SINGH, P. K. Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. **Biometals**, v. 17, n. 3, p. 267–270, 2004.

SINGH, P. K.; PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P.; WELSH, M. J. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. **Nature**, v. 417, p. 552-555, 2002.

STOODLEY, L. H.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews**, v. 2, p. 95-108, 2004.

STOODLEY, P. *et al.* W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu. Rev Microbiol.**, v. 56, p. 187-209, 2002.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

VICTORA, C. G. *et al.* Evidence for protection by breast-feeding against infant deaths from infectious diseases in Brazil. **The Lancet**, v. 2, p. 319–322, 1987.

VOGELEER, P. *et al.* Life on the out side: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00317.

XU, G. *et al.* Lactoferrin-derived peptides and Lactoferricin chimera inhibit virulence factor production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p.1311–1318, 2010.

XANTHOU, M. Immune protection of human milk. **Biol Neonate**, v. 74, p. 121-133, 1998.

ZAVALETA, N. *et al.* Efficacy of rice-based oral rehydration solution containing recombinant human lactoferrin and lysozyme in Peruvian children with acute diarrhea. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 44, n. 2, p. 258-64, 2007.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Eu, Suellen Alves Freire, sou enfermeira e aluna do mestrado em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, e estou realizando uma pesquisa sobre a participação do colostro e leite humanos na proteção contra o desenvolvimento de bactérias que causam infecções intestinais mais frequentes nas crianças menores de um ano. Gostaria de convidá-la a participar desta pesquisa intitulada: EFEITO INIBITÓRIO DO COLOSTRO HUMANO SOBRE BIOFILME DE *Escherichia coli*. O objetivo deste estudo é descobrir se os componentes do colostro e leite humanos podem inibir o crescimento dessas bactérias. Participando você estará contribuindo para os avanços na área da saúde. Caso deseje participar do estudo, será necessário que assine duas vias deste termo, uma via ficará com você e a outra ficará com o pesquisador. Será colhido por mim 10 ml de leite das mamas com as mãos, realizando uma pressão próximo ao bico do peito e utilizando materiais limpos, isto não trará risco à sua vida e a do bebê, mas poderá ocasionar um desconforto no momento da ordenha, a coleta será realizada entre as mamadas do bebê. As informações referentes ao seu estado de saúde e aos seus exames serão retirados do seu cartão de pré-natal. Seu consentimento poderá ser retirado a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Você não pagará e nem receberá qualquer valor em dinheiro pela participação neste estudo. Os dados referentes à sua identidade serão preservados, não aparecendo em qualquer momento na apresentação dos resultados ou síntese deste trabalho. Os dados obtidos e as amostras coletadas serão utilizados somente para esta pesquisa, não sendo utilizado para nenhum outro fim. Os resultados da pesquisa gerados pelo trabalho serão disponibilizados ao participante e à comunidade. Você terá todas as informações que desejar sobre os resultados parciais da pesquisa através dos responsáveis pelo projeto: Profa Dra Lilia Maria Carneiro Câmara (85-9973-2748 / 3366-8641 / 3023-2084) e Suellen Alves Freire (85-8810-4451). Os pesquisadores serão encontrados no endereço: Rua Coronel Nunes de Melo nº 1315, Bairro Rodolfo Teófilo. Fortaleza-CE. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre sua participação na pesquisa entre em contato com o comitê de Ética em pesquisa da Maternidade Escola Assis Chateaubriand - fone: 3366-8569. Caso você se sinta suficientemente informada a respeito das informações que leu, solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura da parturiente

Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

APÊNDICE B – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

QUESTIONÁRIO

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Prontuário: _____

Nasc. ____/____/____ Idade: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Cidade: _____ Naturalidade: _____ Escolaridade: _____

Nº de filhos: _____ Nº de gestações: _____ Nº de abortos: _____

História de malformação fetal? () Sim () Não

2. GESTAÇÃO ATUAL

Parto normal () Parto cesário ()

Parto a termo () Sim () Não Dia do parto: _____ Hora do parto: _____

Complicações durante a gestação e parto: _____

Uso de ATB () Sim () Não Quando: _____ Qual: _____

Duração: _____

Peso do filho ao nascer: _____ Malformação fetal: () Não () Sim

3. EXAME FÍSICO

Peso anterior a gestação: _____ IMC adequado durante a gestação: () Sim () Não

HAS: () Não () Sim DM: () Sim () Não Anemia: () Não () Sim

Doença auto-imune: () Não () Sim Isoimunização: () Não () Sim

Outras doenças: _____

4. EXAMES LABORATORIAIS

Sorologias para:

Sífilis () Reag () Não-reag. Toxoplasmose () Reag () Não-reag.

HIV () Reag () Não-reag. Hepatite () Reag () Não-reag.

Rubéola () Reagente () Não-reag.

Esquema de vacinação completo () Sim () Não

ANEXO A - SEPARAÇÃO DE IgA1 A PARTIR DE COLOSTRO HUMANO POR COLUNA DE SEPHAROSE-FRUTALINA

Os ensaios a seguir foram padronizados e realizados no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol) da UFC pelo Professor Dr. André Luís Coelho da Silva e equipe. O material biológico obtido foi utilizado nos ensaios de formação de biofilme descritos no capítulo 5 - Materiais e Métodos.

Separação de IgA1 por coluna de Sepharose-frutalina

O processo de imobilização da frutalina foi baseado na metodologia descrita por March *et al.* (1974) com adaptações. As cromatografias foram padronizadas para o uso de colunas com 10 mL de gel. As colunas (suportes com filtros) apropriadas foram obtidas da *BioRad*®. Os parâmetros como: fluxo de eluição das colunas, volume das frações coletadas e temperatura de trabalho também foram padronizados e validados. Foram testadas amostras da frutalina (na concentração de 4 mg/mL de matriz) no processo de imobilização na Sepharose ativada. A lectina liofilizada foi pesada, solubilizada em tampão PBS (fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 com NaCl 0,15 M) e testadas quanto sua bioatividade (por ensaio de hemaglutinação conforme anteriormente descrito). Em seguida, essas amostras foram adicionadas as matrizes ativadas e mantidas sob agitação a 4 °C por 2 min. O tempo utilizado para imobilização da frutalina na matriz de Sepharose foi de 12 h sob refrigeração (10 °C). Após esse período, foi adicionado a matriz imobilizadas, 1 volume de etanolamina 50 mM pH 8,0 para saturar os grupos reativos remanescentes na Sepharose. Na sequência, a matriz imobilizada foi centrifugada por 5 min a 2000 rpm, a 8 °C. O sobrenadante foi removido e alíquotas foram coletadas para a leitura da absorbância a 280 nm. Essa leitura serviu para determinar o percentual de imobilização das frutalina na matriz ativada, através da comparação com as absorbâncias da solução lectínica inicial. Após o processo de imobilização, a matriz imobilizada (10 mL) foi empacotada no suporte cromatográfico (*BioRad*®), lavada com 5 volumes do tampão de equilíbrio (PBS filtrado e desaerado) e mantida na geladeira até a utilização.

As proteínas do colostro foram precipitadas com sulfato de amônio a 60%. Em seguida, os precipitados foram centrifugados (13.000 rpm por 15 min, a 4 °C), ressuspensos no tampão PBS, 0,1 M, pH 7,4 e dialisados contra o mesmo tampão. Essas amostras foram utilizadas para o isolamento da IgA1. A dosagem de proteínas foi realizada conforme o

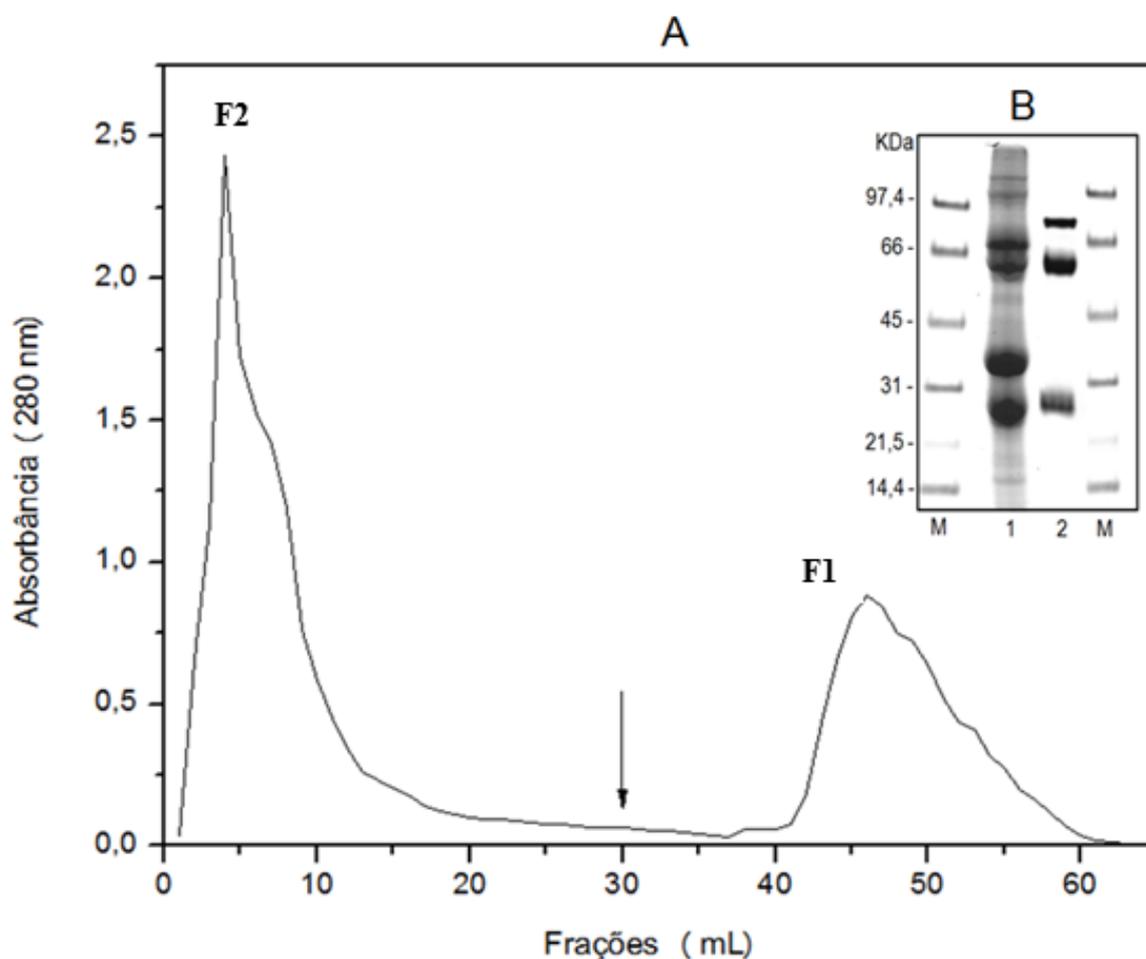
método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

A amostra das proteínas precipitadas do colostro, foram adicionadas à coluna de Sepharose-frutalina, sendo a eluição das proteínas não ligantes feita em tampão PBS, 0,1 M, pH 7,4 – Fração 2 (F2). A IgA1 retida na Sepharose-frutalina, foi eluída com o tampão glicina 0,1M - NaCl 0,15 M, pH 2,6 – Fração 1 (F1). As duas frações F2 (sem IgA1) e F1 (rica em IgA1) foram dialisadas e concentradas por dialofiltração. A concentração proteica das frações foi monitorada pela leitura da absorbância a 280 nm (Figura 9A). A pureza da fração F1 foi avaliada por SDS-PAGE a 12,5%, em condições redutoras (Figura 9B).

Ensaio de eletroforese em gel de poliacríamida

Esse ensaio realizado conforme a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para uso em placas verticais. O gel de aplicação foi preparado de forma a conter 3,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. O gel de separação foi preparado contendo 12,5% de poliacrilamida e 1,0% de SDS e azul de bromofenol (0,01%) como indicador da corrida. As frações proteicas (1 mg/mL) foram diluídas no tampão de amostra contendo SDS a 2% e beta-mercaptoetanol a 1%. As amostras foram aquecidas em banho seco a 100 °C por 5 min. Foram aplicadas alíquotas de 15 µL de amostra em cada poço do gel de poliacrilamida e a corrida foi realizada por cerca de 2 h em corrente fixa (25 mA). As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 a 0,05 %, preparado em uma solução de metanol:ácido acético:água (1:3,5:8, v/v/v).

Figura 9 - Purificação da IgA1 de colostro humano por cromatografia de afinidade em colunas de Sepharose-frutalina e análise eletroforética das frações.



(A) Resultado da cromatografia realizada numa coluna de 10 mL, utilizando um fluxo de 0,5 mL/min e coletando frações de 0,5 mL. A coluna foi equilibrada com tampão PBS e as frações não retidas (F2) foram eluídas com o mesmo tampão. As frações retidas ricas em IgA1 (F1) foram eluídas com o tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15M. A seta indica o início da eluição das frações retidas na matriz Sepharose-frutalina. (B) SDS-PAGE onde M – marcadores moleculares; 1 – Fração proteica do colostro humano resultante da precipitação com sulfato de amônio; 2- Fração retida na matriz Sepharose-frutalina, referente à IgA1 (F1).

ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

MATERNIDADE ESCOLA ASSIS
CHATEAUBRIAND/ MEAC/ UFC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PARTICIPAÇÃO DO COLOSTRO E LEITE HUMANOS E SUAS FRAÇÕES NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME POR CEPAS BACTERIANAS DE *Streptococcus pneumoniae* E *Escherichia coli* enteropatogênica

Pesquisador: Suelen Alves Freire

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 09043512.0.0000.5050

Instituição Proponente: Maternidade Escola Assis Chateaubriand / MEAC/ UFC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 288.281

Data da Relatoria: 29/05/2013

Apresentação do Projeto:

PARTICIPAÇÃO DO COLOSTRO E LEITE HUMANOS E SUAS FRAÇÕES NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO

BIOFILME POR CEPAS BACTERIANAS DE *Streptococcus pneumoniae* E *Escherichia coli*

Objetivo da Pesquisa:

Identificar os componentes do colostro e leite humanos envolvidos no fenômeno de inibição da formação de biofilme pelas bactérias *Streptococcus pneumoniae* (Pneumococo) e *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não existe riscos para a parturiente ou para o bebê, mas pode ocorrer desconforto durante a ordenha manual.

Benefícios:

O estudo irá contribuir para a identificação dos componentes presentes no colostro/leite materno envolvidos no fenômeno de inibição da formação de biofilme pelas bactérias *Streptococcus pneumoniae* (Pneumococo) e *Escherichia coli*

Endereço: Rua Cel Nunes de Melo, s/n
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-270
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8569 Fax: (85)3366-8528 E-mail: meloventura@ufc.br

MATERNIDADE ESCOLA ASSIS
CHATEAUBRIAND/ MEAC/ UFC 

Continuação do Parecer: 200.201

enteropatogênica (EPEC).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

sem comentários

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

sem considerações

Recomendações:

sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pesquisadora já teve o projeto aprovado por este comitê e solicita agora a inclusão de um novo centro de coleta de informações para sua pesquisa.

Projeto aprovado sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

FORTALEZA, 29 de Maio de 2013

Assinado por:
Maria Sidneuma Melo Ventura
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel Nunes de Melo, s/n
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-270
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8569 Fax: (85)3366-8528 E-mail: meloventura@uol.com.br