



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas

CLÁUDIA CRISTINA DE SOUSA PEREIRA

**Atividade funcional dos fagócitos do colostro humano tratados por
citocina e quimiocinas na presença de *Escherichia Coli*
Enteroinvasiva (EIEC)**

BARRA DO GARÇAS-MT
2016

CLÁUDIA CRISTINA DE SOUSA PEREIRA

**Atividade funcional dos fagócitos do colostro humano tratados por
citocina e quimiocinas na presença de *Escherichia Coli*
enteroinvasiva (EIEC)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal de Mato Grosso Campus Universitário do Araguaia, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Imunologia e Parasitologia.

Orientadora: Prof. Dra. Adenilda Cristina Honório-França
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia

BARRA DO GARÇAS-MT

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

P436a Pereira, Claudia Cristina de Sousa Pereira.

Atividade funcional dos fagócitos do colostro humano tratados por quimiocinas e citocina na presença de *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) / Claudia Cristina de Sousa Pereira Pereira. -- 2016

74 f. ; 30 cm.

Orientador: Adenilda Cristina Honório-França.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas, Barra do Garças, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Colostro. 2. *Escherichia coli* enteroinvasiva. 3. Fagócitos. 4. Quimiocinas. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

CLÁUDIA CRISTINA DE SOUSA PEREIRA

TÍTULO Atividade funcional dos fagócitos do colostro humano tratados por citocina e quimiocinas na presença de *Escherichia Coli* enteroinvasiva (EIEC)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal de Mato Grosso Campus Universitário do Araguaia, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Imunologia e Parasitologia

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a ADENILDA CRISTINA HONÓRIO-FRANÇA

Aprovada em 16 de MAIO de 2016.

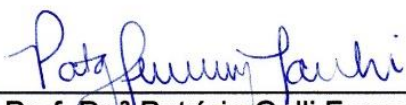
Comissão Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Adenilda Cristina Honório- França
Orientadora



Prof. Dr.^a Ana Paula Barcelos Reinaque
Examinador externo



Prof. Dr.^a Patrícia Gelli Ferres de Marchi
Examinador interno

BARRA DO GARÇAS - MT

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

WAGNER

Chegar até aqui não foi nada fácil e se hoje comemoro uma conquista, esta se deve aqueles que estiveram ao meu lado em todos os momentos; que fizeram de meus sonhos os seus, e de meus objetivos sua própria luta. Quero compartilhá-la com você meu amado esposo, que não poupou esforços para que o sorriso que hoje trago no rosto fosse possível. Foi muitas vezes que usei você como escudo, em que despejei minhas frustrações, mas o seu amor sempre foi maior, arrebatador, e no momento seguinte você estava lá para me reerguer através do seu apoio incondicional. Nos momentos importantes, suportou minha ausência; nos dias de fracasso, respeitou meus sentimentos e enxugou minhas lágrimas. Dizer a você OBRIGADO não deve ser suficiente para expressar meu sentimento de gratidão, pois o amor que sinto por você nessa hora fala mais alto e não há outra forma de agradecer a não ser dizendo agora e sempre que EU TE AMO!

AGRADECIMENTOS

Agradecer não é difícil, o difícil é ser justo nos agradecimentos...

Começarei pelo óbvio, agradecendo a Deus que me abençoa e me fortalece todos os dias, e por me conceber o dom da vida, e permitir que eu o aperfeiçoe da maneira mais bela, com o estudo. Obrigada!

Agradeço em especial ao meu querido filho Lucas Adriano, por ser a fonte de amor e motivação da minha vida.

Aos Meus Pais Ausentes (*In memoriam*):

“Quando eu estiver apresentando esse trabalho, sentirei vocês ao meu lado, sorrindo e felizes. Sentirei as tuas mãos carinhosas afagar meus cabelos e, nesse instante, os abraçarei em silêncio, sorrirei para vocês e deixarei fluir esta emoção em misto de imensa alegria e saudade, e hei de ser fiel aos teus princípios, pois tudo o que me ensinaste é fruto de todo este meu trabalho. Mãe, Pai... Obrigada!”

Aos meus irmãos que sempre me apoiaram e me incentivaram.

Ao meu querido marido por ter permanecido ao meu lado, me incentivando percorrer este caminho, por compartilhar angústias e dúvidas, e por todas as vezes que me ouviu e me aconselhou, seus conselhos, foram fundamentais para que eu pudesse seguir em frente.

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dra. Adenilda Cristina Honório-França, pela oportunidade de aprendizado, que mesmo sem me conhecer abriu as portas do seu laboratório, e me deu a oportunidade de desenvolver este trabalho, só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, onde busco inspirações para me tornar melhor em tudo faço, e que irei fazer daqui para frente. Tenho orgulho em dizer que um dia fui sua orientanda.

Agradeço também ao querido Prof. Dr. Eduardo Luzia França, um exemplo de inteligência, competência e humildade, que trata todos os alunos com carinho e respeito, sempre com uma solução simples para os meus problemas que pareciam ser gigantes.

Quero agradecer à grande amiga Danny Laura Gomes Fagundes, você é parte essencial desse trabalho, a sua contribuição foi fundamental Dany, obrigada por sua ajuda, paciência, e atenção, você é um exemplo de pessoa e de profissional a ser seguida e admirada.

Agradeço as minhas queridas amigas Kelen por toda a ajuda vinda sempre com muita bondade, Fabiana pela sua gentileza, e palavras encorajadoras, a Camila pelo seu alto astral, Rubian por toda a ajuda e conselhos, não só relacionados a este trabalho, mas sobre a vida também, Patrícia pelas contribuições realizadas a esse trabalho durante o exame de qualificação e pela ajuda nos experimentos, obrigada Pati pela atenção, apoio e profissionalismo e a fofura da Alessandra pela imensa ajuda, sempre disposta a ajudar, e pela sua companhia na sala escura do microscópio de fluorescência, e também as meninas que me ajudaram na coleta de leite, e a todas as colegas de laboratório. A ajuda de todas foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Hospital e Maternidade Med-Barra e ao Pronto Socorro Municipal de Barra do Garças por abrirem suas portas para que pudéssemos fazer o primeiro contato com as puérperas.

Agradeço imensamente a todas as voluntárias desta pesquisa, pela generosidade da doação de amostras de leite.

À Universidade Federal de Mato Grosso, a todos os professores e funcionários do Campus Universitário do Araguaia, por todas as contribuições prestadas em benefício da minha formação.

À FAPEMAT /CAPES pelo suporte financeiro e incentivo a pesquisa.

Agradeço à banca examinadora que contribuirá para a qualidade deste trabalho e meu desenvolvimento profissional.

Durante esses dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho, e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a todas as pessoas que possibilitaram a concretização desse trabalho. É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível, MUITO OBRIGADA por tudo!!

ATIVIDADE FUNCIONAL DOS FAGÓCITOS DO COLOSTRO HUMANO TRATADOS POR CITOCINAS E QUIMIOCINAS NA PRESENÇA DE *Escherichia coli* ENTEROINVASIVA (EIEC)

RESUMO

A limitada capacidade de resposta imunológica dos recém-nascidos a vários agentes infecciosos está associada ao estágio de desenvolvimento deste sistema ao nascimento, sendo que nesta fase, a imunidade materna é importante. A resistência à infecção do recém-nascido depende de fatores de proteção contidos no colostro que são altamente direcionados para agentes infecciosos do ambiente materno e provavelmente, são os encontrados pela criança durante suas primeiras semanas de vida. Há vários estudos que relatam que o colostro e leite humanos protegem a criança para uma grande variedade de agentes potencialmente patogênicos, doenças imunológicas e também doenças tumorais, porém os mecanismos de atuação destes fatores ainda são parcialmente compreendidos. O leite materno possui inúmeros fatores imunológicos específicos e não específicos entre eles anticorpos, glicoconjugados, lipídeos, enzimas, citocinas, quimiocinas, entre estas a IL-6, RANTES e MCP-1. Também possui células que desempenham importante papel de proteção para uma variedade de agentes infecciosos, porém é limitado o conhecimento dos mecanismos envolvidos durante as interações de fagócitos e citocinas/quimiocinas, bem como estas células atuam em infecções por *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC). Assim, visando uma maior compreensão dos mecanismos de defesa conferidos pelo leite materno, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade imunomoduladora da citocina IL-6 e das quimiocinas RANTES e MCP-1 em fagócitos do colostro na presença de *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC). Foram coletadas 30 amostras de colostro de mães clinicamente saudáveis, com idade entre 18 e 40 anos, com volume aproximado de 8 ml. Foram avaliadas nas células do colostro a liberação de ânion superóxido, a fagocitose e atividade bactericida. Observou-se neste estudo que na presença de *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) os fagócitos do colostro tratados por IL-6 e pelas quimiocinas (RANTES e MCP-1) apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) na liberação de ânion superóxido, na fagocitose e na atividade bactericida. Os resultados deste trabalho confirmam a importância do ânion superóxido nos mecanismos microbicidas dos fagócitos do colostro associados à esses imunomoduladores. Estes dados permitem sugerir que provavelmente, a atividade funcional dos fagócitos modulada pela IL-6, RANTES e MCP-1 se estenda a outros patógenos, além da *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC).

Palavras-chave: Colostro, *Escherichia coli* enteroinvasiva, Fagócitos, Quimiocinas.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF PHAGOCYTES OF HUMAN COLOSTRUM TREATED WITH CYTOKINES AND CHEMOKINES IN *Escherichia coli* PRESENCE ENTEROINVASIVE (EIEC)

ABSTRACT

The limited ability of immune response of infants to several infectious agents is associated with the development stage of the system at birth, and at this stage the maternal immunity is imported. The resistance of the newborn infection depends on the protective factors contained in colostrum that are highly targeted to infectious agents of the maternal environment and probably are found by children during their first weeks of life. Several studies have reported that human milk and colostrum protect the child to a variety of potentially pathogenic agents, immunological and tumor diseases, but the mechanisms of action of these factors are still partially understood. O breast milk has numerous specific immunological factors and non-specific including antibodies, glycoconjugates, lipids, enzymes, cytokines, chemokines, between these IL6, RANTES and MCP-1. It also features cells that play an important protective role for a variety of infectious agents, but the mechanisms involved in the interaction of phagocytes and chemokines, and these cells work on infections enteroinvasive *Escherichia coli* (EHEC) is partially known. Thus, targeting a greater understanding of defense mechanisms conferred by breast milk, this study aimed to evaluate the immunomodulatory activity of the cytokine IL-6 and RANTES and MCP-1 chemokines in colostrum phagocytes in the presence of *Escherichia coli* enteroinvasive (EIEC). We collected 30 samples of colostrum from clinically healthy mothers, aged 18 and 40, with an approximate volume of 8 ml. It were evaluated in colostrum cells superoxide anion release, phagocytosis and bactericidal activity. It was observed in this study that the colostrum phagocytes in the presence of IL-6, RANTES and MCP-1 present a significant increase ($p < 0.05$) on superoxide anion release, phagocytosis, and bactericidal activity. The results of this study confirmed the importance of superoxide anion in the microbicidal mechanisms of phagocytes colostrum associated with these immunomodulators. These data suggest that probably the functional activity of phagocytes modulated by IL-6, RANTES and MCP-1 extends to other pathogens, as well as enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC).

Keywords: chemokines, colostrum, *Escherichia coli* enteroinvasive, phagocytes

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(O₂)⁻ - Ânion Superóxido

(OH)⁻ - Radical Hidroxila

AM – Aleitamento Materno

C- Cisteína

CONEP- Conselho Nacional de Ética em Pesquisa

DAEC- *Escherichia coli* de adesão difusa

E. coli - *Escherichia coli*

EAggEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

EROs- radicais livres de oxigênio

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

GH - Hormônio do Crescimento

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HC - Colite Hemorrágica

HUS - Síndrome Urêmica Hemolítica

IFN- γ - interferon gama

IgA- Imunoglobulina A

IgE- Imunoglobulina E

IgG- Imunoglobulina G

IgM- Imunoglobulina M

Igs- Imunoglobulinas

IL- Interleucina

L- Ligante

MCP-1- Proteína quimiotática de monócitos-1

MMs – mieloproteinases de matriz

MN - Mononucleares

N- Nitrogênio

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NK: células NK

PBS - Solução salina tamponada

PMN – Polimorfonucleares

R- Receptor

RANTES - Regulada sob Ativação, Expressa e Secretada por células T normais

RN- Recém Nascido

RPM - Rotação por minuto

SIgA- Imunoglobulina secretória

SOD- Superóxido Dismutase

TCLE- Termo de Consentimento Esclarecido

TGF- β - fator de transformação de crescimento beta

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TSB-TrypticSoyBroth – Difco

X- Aminoácido

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Tabela 1** - Concentrações das quimiocinas no sobrenadante de colostro. Os resultados representam as médias e desvio padrão de 30 mães. ...**41**
- Figura 2** - Liberação de ânion superóxido na ausência da bactéria *Escherichia coli* enteroinvasiva. As células MN foram incubadas com a citocina IL-6, e quimiocinas MCP-1 e RANTES. Para os ensaios controle, as células MN foram pré-incubadas com PBS. Os resultados representam à média e o desvio padrão de experimentos com células de 30 indivíduos diferentes. Notas: Cel= Células..... **42**
- Figura 3** - Liberação de ânion superóxido na presença ou da bactéria *Escherichia coli* enteroinvasiva. As células e bactérias foram incubadas com a citocina IL-6, e quimiocinas MCP-1 e RANTES. Para os ensaios controle, as células MN foram pré-incubadas com PBS. Os resultados representam a média e o desvio padrão de experimentos com células de 30 indivíduos diferentes. Notas: Cel= Células; bact = bactéria **43**
- Figura 4** - Índice de fagocitose (%) das células do colostro incubadas com IL-6, MCP-1 e RANTES na presença de EIEC. Os resultados representam a média e desvio padrão de experimentos com células de diferentes amostras de colostro..... **44**
- Figura 5** - Atividade microbicida (%) dos fagócitos do colostro incubados com IL-6, MCP-1 e RANTES na presença de EIEC. Os resultados representam a média e desvio padrão de experimentos com células de diferentes amostras de colostro. **45**

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	16
2 - REVISÃO DE LITERATURA	19
2. 1- Leite Materno	17
2. 2- Citocinas	28
2. 3- Interleucina IL-6	27
2. 4 - Quimiocinas	30
2. 5 - MCP-1 Proteína quimiotática de monócitos- 1 (MCP1)	33
2. 6 - RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted)	33
3 - JUSTIFICATIVA	35
4 - OBJETIVO GERAL	36
4. 1 - Objetivos Específicos	36
5 - MATERIAIS E MÉTODOS	37
5. 1 - Sujeitos e tamanho amostral	37
5. 2 - Obtenção de sobrenadante e células do colostro	38
5. 3 - Quantificação de quimiocinas no colostro humano	37
5. 4 - Linhagem e Culturas de <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)	38
5. 5 - Incubação dos fagócitos do colostro com as citocinas (IL-6), e as quimiocinas (RANTES, MCP-1)	38
5. 6 - Dosagem de ânion superóxido	38
5. 7 - Avaliação da fagocitose e atividade bactericida dos fagócitos do colostro	39
5. 8 - Análise Estatística	40
5. 9 - Aspectos Éticos	40
6 - RESULTADOS	41
6. 1 - Características gerais	41
6. 2 - Quantificação de quimiocinas no colostro humano por CBA	41
6. 3 - Modulação da Atividade Funcional de Fagócitos do Colostro tratados por citocina IL-6 e quimiocinas MCP-1 e RANTES na presença de <i>Escherichia Coli</i>	41
6.3.1 - Liberação de Ânion Superóxido	42

6.3. 2 - Fagocitose	43
6.3. 3 - Atividade Microbica	44
7 - DISCUSSÃO	46
8 - CONCLUSÕES.....	50
9 - REFERÊNCIAS	51
10 - APÊNDICE	74

1 – INTRODUÇÃO

Nos últimos anos diversas pesquisas contribuíram muito para uma melhor compreensão dos benefícios do aleitamento materno tanto para a criança como para a mãe.

O leite materno é de grande importância para a defesa imunológica do recém-nascido, indo muito além do ato de nutrir. Visto que este tem um equilíbrio adequado de nutrientes, fornecidos em estado altamente digerível e biodisponível (LAWRENCE; LAWRENCE, 2005), fornecendo quantidades adequadas de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, células e hormônios (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2009).

A amamentação representa uma integração imunológica entre a mãe e o filho. O sistema imunológico do recém-nascido é imaturo e, portanto, limitado na sua capacidade de responder com eficiência a vários agentes infecciosos. A imunidade materna contribui para o desenvolvimento do sistema imunológico do recém-nascido (TAKAHATA et al., 2003), uma vez que o sistema imunológico do neonato começa ser formado no embrião e se completa alguns anos após o nascimento (LEWIS; WILSON, 2006; GASPARONI et al., 2003).

O colostro funciona como uma imunização passiva, onde a mãe passa proteínas imunoativas para o filho, as quais funcionam protegendo o recém-nascido de uma grande variedade de agentes patogênicos. A resistência à infecção desses recém-nascidos depende dos fatores de proteção contidos no colostro que são altamente direcionados para agentes infecciosos do ambiente materno e provavelmente, são os mesmos encontrados pela criança durante suas primeiras semanas de vida e do desenvolvimento do próprio sistema imunológico (KELLY; COUTTS, 2000; FIELD, 2005).

Há vários estudos que relatam que o colostro e leite humano protegem a criança para uma grande variedade de agentes potencialmente patogênicos, doenças imunológicas e também doenças tumorais (HONORIO-FRANÇA et al., 1997; HONORIO-FRANÇA et al., 2001; FRANÇA-BOTELHO et al., 2006; HANSON, 2007; FRANÇA et al., 2011-a; FRANÇA et al., 2011-b; FRANÇA-BOTELHO et al., 2012; HONORIO-FRANÇA et al., 2016), porém os mecanismos de atuação destes fatores ainda são parcialmente compreendidos. O colostro e leite humano contém uma mistura complexa de componentes imunologicamente ativos como, anticorpos (HANSON, 2007; FRANÇA et al., 2010), citocinas, quimiocinas (GOLDMAN et al.,

1996; KVERKA et al., 2007; MEKI et al., 2003; LÖNNERDAL, 2003; GAROFALO, 2010), lisozima (LÖNNERDAL, 2003; MAREK et al., 2003), probióticos (NEWBURG, 2005), fatores antioxidantes (FRIEL et al., 2008; LINDMARK-MANSSON; AKESSON, 2000), glucanas (NEWBURG, 2005) como lactoaderina (SHAHRIAR et al., 2006; MAREK et al., 2003), lactoferina (BESSLER et al., 2006) e transferrina (GOLDMAN, 1993, GOLDMAN, 2002) entre outros componentes produzidos pelo sistema imunológico materno. Possui também vários hormônios (MIRALLES et al., 2006; LONNERDAL, 2000; ABDULLA et al., 2005; LAMOUNIER et al., 2001; FAGUNDES et al., 2012; HONORIO-FRANÇA et al., 2013). Essas substâncias bioativas têm potencial imunomodulador os quais desempenham um importante papel na saúde da criança proporcionando tanto defesas específicas e não específicas para agentes infecciosos (MUNOZ, 1990; BOTTCHEER, 2000).

O colostro difere da maioria das secreções por conter leucócitos viáveis (1 a 3×10^9 cel/ml durante os primeiros dias de lactação) (ISLAM et al., 2006), com quantidade e atividade comparáveis às leucócitos do sangue (BHASKARAM; REDDY, 1981; HONORIO-FRANÇA, et al., 1997).

Macrófagos do colostro tem atividade fagocitária e receptor de SIgA (ROBINSON et al., 1991; RIVAS et al., 1994; HONORIO-FRANÇA et al., 2001). São capazes de produzir radicais livres do oxigênio (TSUDA et al., 1984; HONORIO-FRANÇA et al., 1997), contém IgA de superfície (FRANÇA et al., 2011-b) e IgA intracitoplasmática (BRANDTZAEG, 2003), também participam da resposta inflamatória através da liberação de citocinas, quimiocinas e fatores que promovem o recrutamento de células para o tecido lesado, ou para o local da inflamação (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

No sítio inflamatório os macrófagos passam por um processo de ativação, tornando-se apto a desempenhar diversas funções complexas, como quimiotaxia, fagocitose, lise de parasitas intracelulares, apresentação de antígenos, entre outros (GORDON, 1995). Imediatamente após o nascimento há várias cepas de bactérias que passam colonizar o trato respiratório e gastrointestinal, constituindo a microbiota normal do recém-nascido. No entanto, quando há um desequilíbrio na microbiota, algumas bactérias podem causar graves doenças intestinais e/ou respiratórias. A diarreia aguda é a segunda causa mais comum de morte entre crianças nos países em desenvolvimento e de nível sócio-econômico baixo (KOSE BERN; GUERRANT,

2003). Entre as bactérias destacam-se a *Escherichia coli* que são classificadas de acordo com as propriedades de virulência: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), e enteroagregativa (EAEC), (NATARO; KAPER, 1998; ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002).

Estudos também relatam que os fagócitos do colostro tem atividade bactericida para EPEC equivalente aos fagócitos do sangue periférico (HONORIO-FRANCA et al., 1997; FRANÇA et al., 2011-a), e sugerem que o mecanismo de fagocitose das células do colostro é dependente da ação de opsoninas. No entanto, em relação aos mecanismos de atividade funcional destas células para EIEC ainda não foram elucidados. Sabe-se que o colostro é capaz de inibir a invasão destas bactérias *in vitro* (CARBONARE et al., 2005).

Assim, neste trabalho foi avaliado a atividade bactericida dos fagócitos do colostro humano para *Escherichia coli* (EIEC) sob a ação imunomoduladora da citocina IL-6 e das quimiocinas MCP-1 e RANTES.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Leite Materno

Vários estudos sobre o aleitamento materno vêm evidenciando que ele atua como um suplemento imunológico importante quando se considera a situação de imaturidade do sistema de defesa do recém-nascido (CARNEIRO-SAMPAIO et al., 1982). Durante este período sensível e delicado para o desenvolvimento do sistema imunológico, o recém-nascido é dependente de proteção exógena e é o leite materno que fará a ligação imunológica entre a mãe e a criança após o nascimento (CHIRICO et al., 2006). O aleitamento materno mantém o elo materno-fetal de proteção após o nascimento, favorecendo a transferência de elementos maternos que modulam o sistema imunológico, fornecendo também uma abundância de mediadores protetores para o intestino do neonato que poderá compensar o estado frágil de limitada resposta imunológica do recém-nascido (NEWBURG, 2005; CHIRICO et al., 2008). Isso torna a criança imunocompetente durante o período sensível para o desenvolvimento de sua própria imunidade (CHIRICO et al., 2008).

Devido à imaturidade da maior parte dos fatores de defesa e a maior permeabilidade intestinal, o recém-nascido (RN) é mais vulnerável às infecções, sendo fundamental a proteção conferida pela amamentação. Esta oferece substâncias imunológicas e fatores de crescimento presentes no colostro e no leite maduro, que protegem a mucosa intestinal da invasão de patógenos, estimulam a maturação epitelial e aumentam a produção de enzimas digestivas, permitindo ao recém-nascido uma boa adaptação fisiológica a vida extra uterina (XANTHOU, 1998; KUNZS et al., 1999; ODDY, 2002). O aleitamento materno proporciona um melhor desenvolvimento emocional, cognitivo, e do sistema nervoso e mantém os níveis de crescimento e desenvolvimento normais (SILVA; MURA, 2007), também favorece o adequado desenvolvimento de estruturas da face, entre outros benefícios, os quais se estendem para a vida adulta com repercussões na qualidade de vida do ser humano (NASCIMENTO; ISSLER, 2003).

O leite materno constitui-se fonte segura de nutrição para o recém-nascido, uma vez que seus benefícios refletem até a idade adulta. Observa-se nesse alimento composição nutricional balanceada com presença de fatores funcionais e moduladores, meios pelos quais as necessidades fisiológicas, imunológicas, de

crescimento e desenvolvimento do lactente são asseguradas (CYRILLO et al., 2009). O leite humano é o alimento ideal a ser oferecido para a criança nos primeiros meses de vida, exercendo efeito protetor com relação ao desenvolvimento de doenças na infância, protegendo-as, sobretudo, de doenças do tubo digestivo e das doenças respiratórias (BOCCOLINI et al., 2011).

A amamentação também representa uma fonte de economia para a família, principalmente nos países em desenvolvimento, onde grande parte da população pertence aos níveis socioeconômicos mais baixos (TAKUSHI et al., 2008).

A abundância de moléculas que o leite materno fornece é essencial para desenvolver de forma aprimorada os tecidos e órgãos do neonato, a presença de fatores de crescimento no leite estimulam os sistemas vitais do bebê. Várias moléculas bioativas que modulam o sistema imunológico estão presentes no leite humano, bem como citocinas, moléculas com atividades antimicrobianas diretas e indiretas que evitam o supercrescimento de micro-organismos possivelmente patogênicos (LÖNNERDAL, 2013). O leite materno é fonte de energia e nutrientes em quantidades adequadas para a nutrição do lactente, possuindo proteínas, lipídios, glicídios e sais minerais, além de vitaminas, linfócitos, imunoglobulinas e fatores de crescimento.

O leite humano apresenta alteração em sua composição durante hora do dia e durante os diferentes períodos de lactação. E recebe três denominações de acordo com o período de lactação: colostro, leite de transição e leite maduro (FRANÇA et al., 2010-b).

O colostro é a secreção produzida pós-parto do primeiro ao sétimo dia (ALMEIDA, 2000) e fornece um maior conteúdo proteico, e grande quantidade de imunoglobulinas. É um líquido transparente, viscoso e levemente amarelado devido à alta concentração de betacaroteno, e altamente rico em células, apresenta maiores concentrações de sódio, potássio e cloro do que o leite maduro (REGO, 2006). Vários estudos relatam o efeito protetor da alimentação do recém-nascido com esse leite, principalmente se ofertado na primeira hora de vida, atuando no combate à mortalidade neonatal (AZAIS-BRAESCO; PASCAL, 2000; EDMOND et al., 2006; MULLANY et al., 2008; BOCCOLINI et al., 2013).

O leite de transição é produzido no período intermediário entre o colostro e o leite maduro do sétimo ao décimo quinto dia após o parto. O teor de proteínas e minerais vai gradativamente sendo reduzido neste período, o teor de carboidratos e

gordura é ligeiramente aumentado até atingir as características do leite maduro (EUCLYDES, 2005). O leite maduro é aquele produzido posteriormente ao 15º dia, sua composição é variável em cada mãe e durante a mamada, mas sempre atendendo as necessidades imunológicas, fisiológicas e nutricionais da criança, (ANDERSON, 1985; PICIANO, 2001).

Em termos de propriedades bioativas, o colostro é consideravelmente diferente do leite maduro, pois contém concentrações elevadas de imunoglobulina secretora. Estas qualidades sugerem que o principal papel do colostro não é apenas nutritivo, mas imunológico, protegendo o bebê enquanto ele deixa o ambiente intrauterino relativamente estéril, para ser exposto a muitos agentes patogênicos ambientais (CASTELLOTE et al., 2011).

Se cada criança fosse amamentada na primeira hora de vida, exclusivamente até os seis meses de idade, seguido de amamentação com a inserção de outros alimentos até dois anos de idade ou mais, cerca de 220.000 vidas seriam salvas a cada ano (WHO, 2001), pois o leite humano além de conter todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento físico da criança, é capaz de reduzir a morbidade e mortalidade das doenças infecciosas (DUIJTS; RAMADHANI; MOLL, 2009).

Houveram consideráveis avanços na compreensão dos diversos constituintes bioativos do leite humano que influenciam o estado imunológico da criança, não só fornecendo proteção, mas também facilitando a tolerância, o desenvolvimento e uma resposta inflamatória adequada (FIELD, 2005). Além disso, o aleitamento materno traz inúmeros benefícios, pois evita mortes infantis através de causas preveníveis, uma vez que protege de infecções (JONES et al., 2003), reduzindo o risco de infecção respiratória (ALBERNAZ MENEZES; CESAR, 2003) e gastrointestinais (HONORIO-FRANÇA et al., 1997), promove melhora na condição da anemia (SPINELLI et al., 2005); evita diarreias (VIEIRA; SILVA; VIEIRA, 2003), diminui o risco de alergias (SAARINEN; KAJOSAARI, 1995), incluindo asma (GDALEVICH; MIMOUNI; MIMOUNI, 2001; VAN ODIJK et al., 2003) e a longo prazo, reduz a incidência de hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes mellitus (OWEN et al., 2006). Dados estes comprovados a partir de um estudo onde os indivíduos amamentados apresentaram pressões sistólica e diastólica mais baixas, níveis menores de colesterol total e risco 37% menor de apresentar diabetes tipo 2 (HORTA et al., 2007).

Pesquisas indicam que a mortalidade infantil pode ser reduzida em quase um terço se o aleitamento materno for exclusivo nos primeiros 6 meses de vida (ARIFEEN

et al., 2001). Um estudo sobre a incidência de doenças e mortalidade da criança, de acordo com o tipo de alimentação, mostrou que as crianças amamentadas ao seio tiveram menor incidência de distúrbios gastrintestinais, de infecções respiratórias e de otites médias; as infecções, quando presentes, foram de evolução mais curta e a taxa de mortalidade muito menor quando comparadas com as alimentadas com leite de vaca, considerando a mesma classe socioeconômica (ROBINSON, 1951). Além destes benefícios, a literatura evidencia que o leite materno reduz a chance de obesidade (BALABAN; SILVA, 2004) e possui efeito positivo na inteligência, pois contribui para o desenvolvimento cognitivo da criança (MORTENSEN et al., 2002). Destaca-se ainda o menor custo financeiro, o estabelecimento do vínculo afetivo entre mãe e filho e melhora a qualidade de vida das famílias (BRASIL, 2009). Uma série de eventos hormonais importantes para a relação mãe/bebê é desencadeada através do contato pele a pele. O toque, o odor e o calor estimulam o nervo vago e isto, por sua vez, faz com que a mãe libere ocitocina, hormônio responsável, entre outras ações, pela saída e ejeção do leite. Esse hormônio faz com que a temperatura das mamas aumente e aqueça o bebê. Por outro lado, a ocitocina reduz a ansiedade materna, aumenta sua tranquilidade e responsividade social (UVNAS-MOBERG, 1998; MERCER et al., 2007).

O leite materno apresenta propriedades únicas para ajudar a promover a proliferação de bactérias comensais no epitélio intestinal, que é um fator chave no desenvolvimento do sistema imunológico (HANSON, 2002). Contém oligossacarídeos nitrogenados que possibilitam a instalação de camada bífida. Essa camada impede, por ação seletiva face a sua elevada competitividade, que novas bactérias e os principais patógenos da diarreia (*E. coli*, dentre outras enterobactérias) colonizem o trato intestinal (COLLINS; GIBSON, 1999; NOVAK et al., 2006). Bebês amamentados exclusivamente apresentam populações superiores de bifidobactérias quando comparados com os alimentados com fórmulas lácteas ou leite de vaca, nos quais predominam enterobactérias, clostrídios e enterococos, sendo o leite materno um modificador potente da microbiota gastrointestinal infantil (LIEPKE et al., 2002; WALKER, 2004). Estudos comprovam a eficácia da amamentação como uma prática que evita a doença diarreica e as mortes a ela relacionadas (ARIFEEN et al., 2001).

As doenças diarreicas representam uma das causas mais importantes de morbimortalidade em crianças menores de cinco anos em todo o mundo, estando

associadas a diversos fatores socioeconômicos, demográficos e culturais, mas, sobretudo à pobreza, desmame precoce, deficiências nutricionais e menor nível de escolaridade materna (SILVA; LIRA; LIMA; 2004; WHO/UNICEF; 2009). A diarreia é, habitualmente, uma infecção causada por bactérias, vírus ou parasitas e integra a segunda causa de mortalidade de crianças (WHO/UNICEF, 2009). Desde as primeiras horas de vida, diversas bactérias passam a colonizar o intestino humano, tornando-se parte da sua microbiota normal (NATARO; KAPER; 1998; TRABULSI et al., 2002). No entanto, quando há um desequilíbrio na microbiota, algumas bactérias podem causar graves doenças intestinais e ou respiratórias.

A bactéria *Escherichia coli* é um membro da família Enterobacteriaceae, gênero *Escherichia*, é um bacilo gram negativo, anaeróbio facultativo, que apresenta cepas móveis ou imóveis. Foi descrita pela primeira vez por Theodore Escherich em 1885, que a denominou de *Bacterium coli commune*, indicando a ocorrência universal desta bactéria no intestino de indivíduos saudáveis (NATARO; KAPER, 1998; RODRIGUEZ-ANGELEZ, 2002; VIDAL et al., 2007). Embora a *Escherichia coli* seja considerada um habitante natural da microbiota intestinal, é também um exemplo de micro-organismo cujo mecanismo patogênico pode levar a perda do equilíbrio da microbiota, visto que algumas cepas desenvolveram a capacidade de colonizar, invadir e produzir toxinas, capaz de causar um amplo espectro de doenças, (CARNEIRO-SAMPAIO et al., 1996). A *Escherichia coli* aparece como uma importante causa de diarreias, infecções urinárias, mastites, septicemias e meningites. Tem sido responsável por causar diarreia seguida de morte em crianças de países em desenvolvimento, assim como colite hemorrágica (HC), síndrome urêmica hemolítica (HUS) em crianças e adultos em países desenvolvidos (DROLET et al., 1994; SUSSMAN, 1997; TRABULSI; CAMPOS, 1999; GUTH et al., 2002; YATSUYANAGI; SAITO; ITO, 2002).

Os mecanismos de patogenicidade das *Escherichia coli* são diversos, ou seja, cada grupo é classificado de acordo com o seu modo de ação, e fatores de virulência produzidos, conforme esse critério, essas bactérias são classificadas em seis principais classes: *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAggEC), *Escherichia coli* entero-hemorrágica (EHEC) e *Escherichia coli* de adesão difusa (DAEC), (NATARO; KAPER, 1998; SCALETSKY et al., 1999; SOUZA et al., 2002). Os mecanismos patogênicos destas bactérias diferem

entre si na forma de dano à célula do hospedeiro. Algumas liberam toxinas, outras causam transformações na superfície de microvilosidades do enterócito e outras invadem o epitélio. No entanto, todas têm uma característica em comum, que é a interação da bactéria à superfície da célula epitelial do hospedeiro (NATARO; KAPER, 1998).

Principalmente em países em desenvolvimento, a *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), é uma das importantes causadoras de Disenteria Bacilar (PACHECO-GIL et al., 2006). A *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) causa várias doenças no homem, sendo bioquímica, genética e patogenicamente semelhante às espécies de *Shigella spp*, a EIEC são cepas que possuem algumas das características bioquímicas de *E. coli* não invasiva, no entanto a EIEC têm a capacidade de causar disenteria utilizando o mesmo mecanismo de invasão da *Shigella*, ambas causam colite inflamatória invasiva. A doença envolve invasão e espalhamento celular, em que genes cromossomais e plasmidiais estão envolvidos (LEVINE, 1987). A EIEC invade os enterócitos e se espalha se para as células adjacentes causando sua morte e destruição. Quando a infecção é severa, causa forte reação inflamatória pela destruição dos tecidos, promovendo diarreia aquosa e/ou sanguinolenta, com a presença de leucócitos e muco (NATARO; KAPER, 1998), febre e cólicas abdominais severa, e mal estar generalizado (NATARO et al., 2007; JONES et al., 2008). Em casos graves, a bactéria pode atacar a mucosa do cólon, invadir as células epiteliais, multiplicando, e causando ulceração do intestino (BAYLIS et al., 2006).

A *Escherichia coli* enteroinvasiva como outros enteropatógenos utiliza as células M (*microfold cells*) como rota de entrada, essas células estão presentes na mucosa intestinal. Após a bactéria atingir o epitélio, é fagocitada por macrófagos residentes e a fagocitose por esses macrófagos é o primeiro passo para a produção da resposta inflamatória para as cepas bacterianas (SANSONETTE et al., 1996).

Existem vários componentes antimicrobianos no colostro, sendo que o agente protetor mais abundante é a imunoglobulina A do tipo secretória (sIgA). Esta proteína não é absorvida na luz intestinal, ou seja, não sofre alterações em sua reatividade onde atua recobrando a superfície da mucosa do trato digestivo do lactente, protegendo-o de penetração de patógenos (CARLSSON; HANSON 1994; CARNEIRO-SAMPAIO et al., 1996). Diante deste contexto, observa-se que todo processo infeccioso depende da adesão das bactérias à superfície das mucosas para

posterior colonização. A Imunoglobulina secretória (sIgA) bloqueia a aderência de bactérias às células do tecido epitelial humano, neutraliza toxinas, previne infecções virais (HANSON, 2007) e atua como opsonina, facilitando a fagocitose de agentes patogênicos (FRANÇA et al., 2011-b). A imunoglobulina sIgA do colostro é capaz de inibir a aderência dos diferentes sorotipos de EPEC (CARBONARE et al., 2005), EAEC (ARAUJO; GIUGLIANO, 2001), ETEC e a invasão da EIEC (CARBONARE et al., 2005). Os anticorpos da classe IgA por sua vez, atuam impedindo a aderência às superfícies mucosas não apenas de micro-organismos, como também de macromoléculas antigênicas (FERNANDES et al., 2001). Há outros isotipos de imunoglobulinas presentes no colostro como a IgG e IgM, porém em menor concentração (BAHNA et al., 1988).

O colostro apresenta um maior conteúdo celular que o leite maduro, e diminui rapidamente ao longo do período de lactação (GOLDBLUM; GOLDMAN, 1994). Diversos trabalhos têm evidenciado que o colostro humano difere da maioria das secreções por conter um grande número de leucócitos viáveis durante os primeiros dias de lactação. As principais populações de células presentes no leite humano são os fagócitos, incluindo macrófagos e neutrófilos, os quais são células efetoras importantes para a eliminação de microrganismos (CRAGO et al., 1979; HONORIO-FRANÇA, et al., 2013). O elevado número destas células no colostro (80% a 90%) indica um relevante papel na secreção. Esses fagócitos do colostro diferem dos fagócitos do sangue periférico, por apresentarem IgA de superfície, (ROBINSON et al., 1991; RIVAS et al., 1994), e IgA intra-citoplasmática (BRANDTZAEG, 2003; THORPE et al., 1986; OZKARAGOZ et al., 1998).

As células do sistema imunológico envolvidas no processo de fagocitose são macrófagos e neutrófilos. Os macrófagos do colostro apresentam capacidade de responder a estímulos quimiotáticos, assim como fagocitose ativa para bactérias e fungos; são também capazes de produzir lactoterrina e lisozima, e desempenham um papel chave na defesa para microrganismo invasores (MOHR; LEU; MABRY, 1970; MURILLO; GOLDMAN, 1970; HO; LAWTON, 1978; ROBINSON et al., 1978; PICKERING et al., 1980; JOHNSON et al., 1980). O segundo tipo de leucócitos mais comuns do leite humano são os neutrófilos, no entanto estes apresentam menor mobilidade, aderência e quimiotaxia se comparados aos neutrófilos presentes no sangue materno (KUNZS et al., 1999; XANTHOU, 1998). Vários trabalhos têm

relatado a fagocitose (HO; LAWTON, 1978) e a capacidade microbicida de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares (HONORIO-FRANÇA, 1998; HONORIO-FRANÇA et al., 2001; HONORIO-FRANÇA et al., 2013).

A fagocitose é um dos principais mecanismos de eliminação de bactérias é importante na defesa contra infecções, envolve uma cadeia de processos moleculares que se inicia com a aderência do micro-organismo à membrana celular (YEAMAN; KERR, 1987; HONORIO-FRANÇA et al., 1997). No entanto, essa interação pode ser potencializada por substâncias imunomoduladoras, fatores hormonais, proteínas do soro e do próprio colostro, como as citocinas, quimiocinas entre outros (HONORIO-FRANÇA et al., 2001, FRANÇA-BOTELHO et al., 2006; FRANÇA et al., 2011-b; FRANÇA et al., 2012; FRANÇA-BOTELHO et al., 2012; MORCELI et al., 2013). Os mecanismos de ação dos macrófagos ocorrem através do englobamento de partículas ou micro-organismos dentro dos fagossomas, processo esse desencadeado após aderência.

A fagocitose se inicia com o englobamento caracterizado pela formação de prolongamentos citoplasmáticos, alteração da forma e distribuição das organelas citoplasmáticas, essas alterações na forma da célula aumentam a área de contato da membrana do fagócito com a do substrato. Durante a aderência, ocorre ativação de receptores de membrana para moléculas de adesão, as células ligam os patógenos via receptores fagocíticas que iniciam os rearranjos do citoesqueleto e o tráfico de membrana que é necessário para a fagocitose ocasionando um rearranjo do citoesqueleto celular (ADEREM; UNDERHILL, 1999). O fagossoma formado rapidamente se desenvolve em organelas microbicidas (AMER; SWANSON, 2002).

Após internalização da partícula ou micro-organismo ocorre à fusão do fagossoma com o lisossoma para formar o fagolisossoma, após essa fusão inicia-se a mobilização dos mecanismos microbicidas dependentes e independentes de oxigênio em que o agente patogênico é morto. A destruição de micro-organismos após a fagocitose pode ser mediada pelo metabolismo oxidativo com produção de metabólitos ativos do oxigênio (JOHNSON et al., 1980; MUNDI et al., 1991; HONORIO-FRANÇA et al., 1997;) ou por liberação de enzimas lisossômicas (SEGAL; SOOTHILL, 1983). No mecanismo dependente de oxigênio ocorre o processo oxidativo com a produção de moléculas reativas do oxigênio, tais como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-) em um

processo denominado “*burst*” oxidativo (explosão respiratória) (ASAD et al., 1994), garantindo a morte do patógeno e consequentemente proteção do hospedeiro (BABIOR, 1999; KAKKAR et al., 1995; HONORIO-FRANCA et al., 2001; FRANCA-BOTELHO et al., 2010; FRANCA et al., 2011-a). Neste fenômeno, o oxigênio molecular (O_2) sofre uma redução enzimática para produzir agentes microbicidas. A reação chave na “explosão respiratória” é a redução do oxigênio a ânion superóxido (O_2^-). O oxigênio molecular O_2 é produzido pelos leucócitos através da NADPH-oxidase, essa enzima catalisa a redução de um elétron do oxigênio. O O_2^- gerado pode ser convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença da superóxido dismutase (SOD). Por isso, essas enzimas são importantes na proteção da célula contra a ação do ânion O_2^- , permitindo sua ação no centro do fagossomo (GLASS et al., 1986; ROOS, 2002).

O papel das espécies reativas de oxigênio gerado durante o metabolismo celular tem sido bastante estudado. E a produção desses potentes oxidantes é essencial para a morte bacteriana e também potencializam as reações inflamatórias (MUNDI et al., 1991; HONORIO-FRANÇA et al., 2001). Esses radicais livres gerados pelo metabolismo oxidativo do oxigênio, estão envolvidos em muitos processos importantes, tais como reações inflamatórias, e peroxidação de lipídeos, proteínas, carboidratos e alterações de DNA (AMES et al., 1993).

A destruição de bactérias pelos fagócitos também pode ocorrer por mecanismos independentes de oxigênio. Muitas bactérias desenvolveram várias maneiras de matar os fagócitos, como a liberação de toxinas (TODAR, 2008). Nos mecanismos independentes de oxigênio ocorre alterações bactericidas de pH nos fagolisossomos (junção da partícula englobada e enzimas lisossômicas no citoplasma do fagócito) e enzimas lisossômicas como: proteases, ácido ribonucleiase, β galactosidase e fosfolipase (PAAPE et al., 1991).

A presença de um número significativo de células e outros componentes solúveis capazes de gerar ou aumentar a produção de metabólitos ativos, sugere que o colostro desempenhe um papel importante na proteção da mucosa do recém-nascido (TSUDA et al., 1984).

Estudos relacionados à *Escherichia coli* sugerem que ocorre morte da bactéria devido aos efeitos de reativos derivados do oxigênio durante o metabolismo oxidativo (ASAD et al., 1994). Em comparação com adultos normais, ocorre uma menor

produção destes metabólitos em crianças de até um ano de idade. Essa menor produção de espécies reativas do oxigênio pode estar relacionada à maior susceptibilidade às infecções por esses micro-organismos (IHARA et al., 1994).

O leite humano apresenta através de seus constituintes a capacidade de modular o sistema imunológico, tanto para imunoestimular, quanto para imunossuprimir (CROSS; GILL, 2000). Sendo considerados como a primeira linha celular que participam da resposta imunológica, os fagócitos podem ser ativados por um grande número de estímulos (HONÓRIO-FRANÇA et al., 2009; DIESNER et al., 2012). As substâncias responsáveis pela imunomodulação são denominadas imunomoduladores, os quais são capazes de alterar o sistema imunológico de um organismo por interferir com as suas funções, podendo exercer efeitos estimulatórios ou inibitórios (MAKARE; BODHANKAR; RANGARI, 2001), têm origem muito variada, podendo ser de origem endógena ou exógena, tais como produtos microbianos, substâncias sintéticas, plantas medicinais (BLECHA, 2001; SCHERER et al., 2011; FRANCA et al., 2014;), anticorpos (FRANÇA et al., 2001, FRANÇA et al., 2011-b), hormônios (FAGUNDES et al., 2012; HONORIO-FRANÇA 2013) citocinas e quimiocinas (FAGUNDES et al., 2013).

Diferentes tipos de agentes imunomoduladores podem ser encontrados no leite humano, como citocinas, quimiocinas, proteínas presentes na fase aquosa do leite entre outros. Estas substâncias imunomoduladoras são produzidas por diversas células do leite humano, após estimulação, e contribuem de forma significativa nos mecanismos de defesa das mucosas nos recém-nascidos (HAWKES; BRYAN; GIBSON, 2000).

2. 2 - Citocinas

Nos últimos anos, várias citocinas e quimiocinas têm sido descobertas no leite humano e suas concentrações têm um papel fundamental na imunogenicidade do leite materno. Entre as citocinas quantificadas no colostro e/ou leite maduro encontram-se: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN- γ , IFN- α , TNF- α , TNF- β , TGF- β , RANTES, MCP-1 (FIELD, 2005; CHIRICO; GASPARONI, 2006, LAWRENCE; PANE, 2007; RADILLO, 2013, MORAIS et al., 2015).

As citocinas e quimiocinas desempenham papéis importantes durante a resposta imune, pois atuam tanto no recrutamento quanto na ativação de células. As

citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa, com funções pleiotrópicas, (diferentes tipos de células secretam a mesma citocina e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células). A ação das citocinas é múltipla pois pode estar envolvida na emissão de diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico (BORDEN, 1992; CAMACHO-ARROYO; LÓPEZ-GRIEGO; MORALES-MONTOR, 2009).

Essas moléculas proteicas atuam em concentrações baixíssimas e agem através da ligação a receptores específicos de membrana celular ativando uma cascata de reações metabólicas, induzindo ou inibindo a transcrição de genes, de acordo com a necessidade da resposta imunológica. A ativação de macrófagos é uma importante função das citocinas e quimiocinas que estão envolvidas na inflamação; e modulação de moléculas de adesão de leucócitos por diferentes citocinas e integrinas (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

As citocinas são mediadores fundamentais, uma vez que estas regulam de forma inespecífica a inflamação, a imunidade e reparo (BAGGIOLINI, 1998). Elas são essenciais para iniciar e determinar qual tipo de resposta imunológica que será desenvolvida (VERNAL; GARCIA-SANZ, 2008). As citocinas foram agrupadas em interleucinas (IL, enumeradas sequencialmente de IL-1 a IL-35), fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal, visto que não é possível classifica-las quanto à célula de origem ou quanto à função biológica (SOMMER; WHITE, 2010; RAEBURN, 2002). As citocinas atuam, em geral, de forma parácrina (atuam sobre outras células próximas), autócrina (atuam diretamente sobre as células que as produzem) ou endócrina (agem à distância) (KRAYCHETE, 2006; STITES; TERR; PARLOW 2000).

2.3 - Interleucina 6 (IL-6)

Interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica multifuncional com atuação tanto na resposta imunológica inata como na adaptativa e desempenha uma gama de funções sobre a imunidade celular e humoral relacionados à inflamação, defesa do hospedeiro e injúria tecidual. A IL-6 é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e por linfócitos T, e atua como uma citocina pró-inflamatória, mas pode também desempenhar atividade anti-inflamatória e ainda responde a estímulos de

vírus e bactérias (BANNERMAN 2009). Nos seres humanos é codificada pelo gene de IL-6 (FERGUSON-SMITH et al., 1988). A IL-6 induz a diferenciação de linfócitos B em células produtoras de anticorpos e a produção de proteínas de fase aguda como Proteína C Reativa (PCR) e fibrinogênio que melhoram a fagocitose (BAUER et al., 1988). Ela atua em conjunto com outras interleucinas para promover a produção de diferentes classes de imunoglobulinas como, por exemplo, a IgA e a IgM (YVAN-CHARVET et al., 2009).

A interleucina IL-6 encontrada no leite humano é produzida por ambos, epitélio da glândula mamaria, bem como por células mononucleares do leite (PALKOWETZ et al., 1994).

2. 4 - Quimiocinas

As quimiocinas fazem parte de uma vasta família especializada de citocinas, de baixo peso molecular (8-12 kDa), com elevada homologia, que funcionam como potentes mediadores ou reguladores da inflamação, pela habilidade de recrutar e ativar uma variedade de células incluindo neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos, fibroblastos e queratinócitos, os quais respondem aos estímulos quimiotático com velocidades distintas (GAROFALO, 2010; BAGGIOLINI, 2001; PHILLIPS et al., 2013; SCHROEDER et al., 2013).

Assim como as citocinas, as quimiocinas são multifuncionais, ambas controlam de forma seletiva e específica a adesão, quimiotaxia e ativação leucocitária, estando envolvidas em outras funções biológicas igualmente importantes, como inflamação, desenvolvimento de linfócitos T e B, na maturação de células dendríticas, na homeostasia e no desenvolvimento orgânico, entre outros. Todo o processo dinâmico de trânsito celular é regulado pelas quimiocinas, pois estas são citocinas quimiotáticas (BAGGIOLINI, 1998; MOSER; LOETSCH, 2001). As quimiocinas estão entre as categorias de substâncias produzidas pelo organismo amplamente implicadas na modulação e controle da resposta imunológica, atraindo e produzindo o comportamento necessário nas células do sistema imunológico do organismo para a produção da resposta inflamatória. (MÉLIK-PARSADANIAN; STÉPHANE, 2008).

As quimiocinas também podem atuar na regulação e na polarização da resposta imunológica, apoptose, angiogênese, mitose, metástase tumoral, cicatrização de feridas e secreção de citocinas, metaloproteinases de matriz (MMPs),

radicais livres, e óxido nítrico (D'AMBROSIO; PANINA-BORDIGNON; SINIGAGLIA, 2003; MAHAD et al., 2005; BANISOR; LEIST; KALMAN, 2005).

As quimiocinas, podem ser classificadas em dois grupos adicionais com base no seu padrão de expressão e função sendo, constitutivas, ou induzidas. As quimiocinas constitutivas são produzidas normalmente em vários tecidos e recrutam leucócitos, principalmente linfócitos, para esses tecidos na ausência de inflamação (CRUVINEL, 2010; CYSTER, 1999) e também controlam a localização e recirculação, além de maturação, diferenciação e ativação de linfócitos e células dendríticas (BAGGIOLINI, 2001). As quimiocinas induzidas (ou inflamatórias) são produzidas por várias células em resposta a estímulos inflamatórios e recruta leucócitos para locais de inflamação (MOSER; LOETSCHER, 2001).

A classificação das quimiocinas é categorizada em quatro famílias, e têm atividades biológicas relativamente diferentes, sua classificação é de acordo com a presença e posição dos resíduos de cisteína, que formam as pontes dissulfeto, responsáveis pela conformação tridimensional em sua estrutura molecular (MARTINÉZ; PANDO, 1999; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; MATSUKAWA et al., 2000; VASQUEZ; XIN; SOONG, 2008). As pontes dissulfeto mantêm as regiões amino terminais unidas, sendo essenciais para sua atividade biológica.

Assim estão definidas em quatro grupos ou subfamílias com base no número e localização dos resíduos de cisteína (C) no terminal N da molécula e são nomeados em: CXC, CC, C e CX₃C, de acordo com a nomenclatura sistemática. Na presença de duas cisteínas adjacentes são quimiocina CC (ou β -quimiocinas), pelo menos 27 membros diferentes dentro deste subgrupo estão presentes nos mamíferos, chamados ligantes CC (CCL1). Se houver um aminoácido que é representado por (X) entre os dois resíduos de cisteínas são CXC (ou α -quimiocinas), a quimiocina C possui apenas um representante, a linfotactina (XCL1) é distinta de todas as outras quimiocinas, pois possui uma única cisteína, e a quimiocina CX₃C, que tem como representante a fractalquina (CX₃CL1), em que a característica estrutural é a presença de duas cisteínas separadas por três aminoácidos (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; ZHANG, 2007). Com a descoberta de novas moléculas a nomenclatura das quimiocinas tornou-se necessária e são definidas baseadas em sua estrutura (CC, CXC, XC e CX₃C) seguida pela letra L (ligante) e pelo número de seu

gene (BAGGIOLINI, 2001; LE et al., 2004; MOSER; WILLIMAN, 2004; JIN; XU; HERELD, 2008).

As quimiocinas desempenham suas atividades biológicas através de seus receptores de alta afinidade, com sete domínios transmembranares acoplados a proteínas G, presentes na superfície celular, os quais são essenciais para atrair leucócitos e coordenar as respostas inflamatórias. Quimiocinas mostram grande redundância na utilização de seus receptores, assim estes receptores podem interagir com mais de uma quimiocina e, esta quimiocina pode acoplar-se a mais de um tipo de receptor (BAGGIOLINI, 2001; WEBER, 2001). A interação das quimiocinas com seus receptores leva à ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular, para orientar o movimento de leucócitos e de outras células para os tecidos ou órgãos-alvo (LAGURI; ARENZANA-SEISDEDOS; LORTAT-JACOB, 2008).

Os receptores de quimiocinas são divididos em diferentes famílias, de acordo com o tipo de quimiocinas a que se ligam (WHITE et al., 1998; BAGGIOLINI, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2003; CHARO; RANSOHOFF, 2006). Sendo definidos como CC, CXC, XC, ou CX₃C, seguidos pela letra R (para receptor) e um número (BAGGIOLINI, 2001). Na família das α quimiocinas (CXC) existem quatro receptores descritos - do CXCR-1 a CXCR-4 e estes se ligam com as quimiocinas CXC. Na família das β quimiocinas (CC) existem oito receptores - CCR-1 a CCR-8 -, os quais interagem com quimiocinas CC (ADAMS; LLOYD, 1997). No grupo CX₃C, somente um tipo de receptor foi identificado em humanos o CX₃CR1 (MURPHY, 2002).

O movimento direcional de leucócitos mediado por quimiocinas é denominado quimiotaxia (GOAZIGO, 2013; LI; RANSOHOFF, 2008). Substâncias exógenas e endógenas podem atuar como fator quimiotático. Entre os agentes exógenos destacam os produtos bacterianos, micro-organismos, produtos de células necróticas, complexo antígeno-anticorpo e citocinas que induzem um número de respostas de leucócitos. As respostas funcionais induzidas pela ativação de leucócitos são: produção de metabólitos do ácido araquidônico, fosfolipídios como uma resposta à ativação da fosfolipase A₂, aumento intracelular de cálcio e outros sinais; degranulação e secreção de enzimas lisossomais e ativação de explosão oxidativa; e secreção de citocinas, na qual amplifica e regula reações inflamatórias. (HALL; ALI, 1998; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004). As quimiocinas e seus receptores possuem

ações fundamentais e desempenham um papel crucial na movimentação das células mononucleares pelo organismo e sua migração para os tecidos, contribuindo para a resposta imunológica adaptativa e/ou patogênese de várias doenças. (ROSENKILDE; SCHWARTZ, 2004).

2. 5 - MCP-1 Proteína Quimiotática de Monócitos- 1 (MCP1)

A MCP-1 proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), também é conhecida como CCL2, é uma citocina pertencente à família de quimiocinas CC. A proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1 / CCL2) é uma das quimiocinas chave que regulam a migração e infiltração de monócitos / macrófagos, esta quimiocina e seus receptores desempenham um papel central no desenvolvimento de respostas inflamatórias e são cruciais para o recrutamento de células do sistema imunológico para os locais de inflamação (DESHMANE et al., 2009; AGARWAL et al., 2011). Os dois receptores de superfície celular que se ligam a CCL2 são CCR2 e CCR4 (CRAIG; LOBERG, 2006).

A MCP-1 é produzida por uma variedade de tipos de células, incluindo as células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais, do músculo liso, células mesangiais, astrócitos, células da microglia e monocítica (BARNA et al., 1994; BROWN et al., 1992; CUSHING et al., 1990), quer constitutivamente ou após a indução pelo stress oxidativo, citocinas ou fatores de crescimento (BEALL et al., 1996).

Esta quimocina induz os monócitos a deixarem a corrente sanguínea em direção ao tecido adjacente, tornando-se macrófagos teciduais. A MCP-1 é um potente agonista para monócitos, células dendríticas, linfócitos T de memória e basófilos (BONE-LARSON et al., 2000; CHARO; RANSOHOFF, 2006).

2. 6 - RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted)

A quimiocina RANTES também chamada de CCL5 é uma proteína monomérica de 8 kDa que pertence à família das quimiocinas CC e atua em receptores CCR1, CCR3 e CCR5 (MURPHY, 2002). A RANTES desempenha um papel importante na resposta imune ao iniciar o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação. É um quimioatraente para células T, monócitos, eosinófilos, basófilos e células

dendríticas, e pode aumentar a citotoxicidade e promover a proliferação de células NK. Relata-se ser produzida por fibroblastos, plaquetas e células T (ROBERTSON, 2002).

3 – JUSTIFICATIVA

O estudo sobre o aleitamento materno vem evidenciando que ele atua como um suplemento imunológico importante quando considerado a situação de imaturidade do sistema de defesa do recém-nascido (CARNEIRO-SAMPAIO et al., 1982). O colostro e o leite maduro contêm grande variedade de fatores nutricionais, componentes solúveis e celulares e componentes imunologicamente ativos envolvidos na proteção anti-infecciosa. Frente aos vários componentes importantes na resposta imunológica encontrados no colostro e leite humano, destacam-se um grupo de citocinas e quimiocinas. As células do colostro desempenham importante papel de proteção para uma variedade de agentes infecciosos, porém não se conhece os mecanismos envolvidos durante as interações de fagócitos, citocinas e quimiocinas presente na secreção durante as infecções por EIEC.

Diante disso, o racional deste trabalho foi que substâncias imunomoduladoras presentes no colostro como citocinas e quimiocinas possam atuar sobre as funções de fagócitos da própria secreção humana e potencializar a ação destas células durante interações com bactérias, visando melhor evidenciar os mecanismos protetores presentes no colostro que são conferidos para a criança durante a amamentação.

4 - OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade funcional dos fagócitos do colostro humano tratados pela citocina IL-6 e quimiocinas RANTES e MCP-1 na presença de *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC).

4.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a ativação celular no colostro, através da liberação do ânion superóxido na presença de citocina IL-6 e quimiocinas RANTES e MCP-1;
- ✓ Verificar a fagocitose dos fagócitos do colostro tratados por citocina IL-6 e quimiocinas RANTES e MCP-1 na presença de EIEC;
- ✓ Determinar a atividade microbicida e o mecanismo de ativação dos fagócitos do colostro, na presença da bactéria e de citocina IL-6 e quimiocinas RANTES e MCP-1;

5 - MATERIAIS E MÉTODOS

5. 1 - Sujeitos e tamanho amostral

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa do Araguaia conforme resolução 466/12. As amostras de colostro foram obtidas de 30 mães saudáveis, com idade entre 18 e 40 anos. As mães receberam de forma clara e compreensiva, informação verbal e escrita sobre o objetivo e relevância do trabalho, e então, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A coleta foi efetuada através de ordenha manual, sempre no período da manhã e no intervalo entre duas mamadas, no período correspondente as primeiras 48 a 72 horas após o parto.

5. 2 - Obtenção de sobrenadante e células do colostro

Foram coletadas amostras de colostro com volume aproximado de 8 mL. O colostro foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm sob refrigeração a 4°C. A centrifugação permite a separação do colostro em três fases nítidas: o "botão" celular, uma porção fluida intermediária e uma camada superior de gordura. A camada superior composta de gordura foi desprezada e o sobrenadante (porção fluida), reservado para a dosagem da quantificação das quimiocinas e citocina e o "botão" celular reservado para as análises da atividade funcional de fagócitos. As células foram ressuspensas em meio de cultura 199 (Gibco) e separadas em gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Pharmacia) por 40 minutos a 1500 rpm, sob temperatura de 4 °C.

A separação com o Ficoll-Paque permite que os fagócitos polimorfonucleares sedimentem no tubo formando um "botão" celular e a formação de um anel rico em células mononucleares na interface entre o meio de cultura e o Ficoll-Paque. O anel celular rico em células mononucleares e o botão celular foram retirados separadamente, sendo lavados duas vezes em meio de cultura 199 (Sigma). As células foram contadas em câmara de Neubauer e as concentrações celulares ajustadas para 2×10^6 células/mL. As células foram utilizadas nos ensaios de atividade funcional de fagócitos (liberação de ânion superóxido, fagocitose, atividade microbicida).

5. 3 - Quantificação de quimiocinas no colostro humano

As concentrações das quimiocinas IL-6, RANTES, MCP-1, presentes no sobrenadante de colostro foram avaliadas pelo Kit “cytometric *bead array*” (CBA, Human Chemokine, BD Biosciences) pelo método de citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). Os dados foram obtidos utilizando o software FCAP Array 3.0 (BD).

Ensaio BD CBA fornecem um método de captura de analitos solúveis ou grupo de analitos com beads de dimensões e fluorescência conhecidas, tornando-se possível detectar analitos usando citometria de fluxo.

5. 4 - Linhagem e Culturas de *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)

Foi utilizada *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) ATCC, sendo esta conservada a -70°C. A cultura estoque foi mantida em ágar semi-sólido em ausência de luz. A partir desta cultura de estoque, 18 horas antes do ensaio, repiques foram feitos em tubos contendo 8 mL de TSB (Tryptic Soy Broth - Difco) e incubados em estufa a 37°C por 18 horas.

Após o crescimento, as bactérias foram lavadas 2 vezes em solução salina tamponada (PBS) e a concentração ajustada para 1×10^7 bactérias por mL, medida com espectrofotômetro (540nm, DO = 0.1).

5. 5 - Incubação dos fagócitos do colostro com a citocina (IL6), e as quimiocinas (RANTES, MCP-1)

Para modular a atividade funcional dos fagócitos estes foram incubados por 30 minutos com os diferentes os moduladores. Para cada ensaio realizado, como controle dos experimentos, os fagócitos MN ($2,0 \times 10^6$ cel / mL) foram incubados por tempo similar, dependendo do tipo de ensaio, em meio 199 ou PBS (Tampão fosfato) na ausência da citocina e quimiocinas. A concentração utilizada de citocinas IL6, MCP-1 de e RANTES foi de 100ng/mL conforme protocolo desenvolvido anteriormente (Fagundes et al, 2013).

5. 6 - Dosagem de ânion superóxido

Para verificar a ativação celular foram realizados ensaio de liberação de ânion superóxido pelos fagócitos do colostro tratados por citocina IL6 e as quimiocinas RANTES e MCP-1 na presença da bactéria EIEC. Foi determinada a liberação de

ânion superóxido utilizando o cromógeno Ferricitocromo C, segundo o método de Pick e Mizel (1981) e adaptado por HONORIO-FRANÇA, (1997). Na presença do ânion superóxido o ferricitocromo C sofre oxidação passando a ferrocitocromo C e a mudança colorimétrica é detectável em espectrofotômetro com filtro de 640nm.

As células foram separadas e a concentração ajustada para 2×10^6 células/mL em tubos plásticos, centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. Após a separação das células, volumes iguais de bactérias e células na presença ou ausência da citocina IL-6 e quimiocinas RANTES, MCP-1, foram incubados em tubos plásticos por 15 min a 37°C sob agitação para ocorrer a fagocitose. A seguir, a suspensão de células e bactérias foi centrifugada a 1500 rpm, o sobrenadante desprezado e retirado o excesso de bactéria extracelular. A suspensão de células e bactéria foi ressuspensa em 0,5 mL de PBS glicosado contendo ferricitocromo C (concentração de 2mg/mL).

Um controle contendo somente células foi realizado paralelamente para verificar a liberação espontânea do ânion superóxido pelas células. As suspensões foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços, com volume de 100µL por poço e deixadas em estufa a 37°C durante 1 hora. A leitura foi feita em espectrofotômetro para placa com filtro de 640 nm. A concentração do ânion superóxido foi calculada através da seguinte relação:

$$\text{Concentração } O_{2(nmol)} = \frac{DO}{6.3} \times 100 \text{ (Pick \& Mizel, 1981).}$$

5. 7 - Avaliação da fagocitose e atividade bactericida dos fagócitos do colostro

O procedimento utilizado para a avaliação da atividade microbica e de fagocitose foi inicialmente descrita por HONORIO-FRANÇA et al., 1997. A fagocitose e a atividade microbica dos fagócitos MN do colostro foram avaliadas pela técnica de laranja de acridina (BELLINATE-PIRES et al. 1989). Volumes iguais de suspensão de bactérias (1×10^7 bactérias/mL) e de suspensão de células (2×10^6 cel/mL - fagócitos mononucleares) foram misturados em tubos plásticos. O volume final, de células e bactérias, foi dependente do rendimento celular das amostras de colostro, não sendo inferior a 0,5 mL. A suspensão de EIEC e células foi submetida à incubação prévia por 30 minutos, sob agitação a 37°C.

Após esse período a fagocitose foi interrompida pela adição de meio de cultura (meio 199) gelado e a suspensão foi centrifugada por 10 min, a 1500 rpm sob refrigeração a 4°C. O "pellet" foi corado com 200 µL de acridina orange (concentração 14,4 mg/mL) por 1 min e após este período, foi ressuspensa em meio 199, centrifugado e lavado mais uma vez. A seguir foram feitas lâminas e a contagem das células realizada com o auxílio de um microscópio de fluorescência (Nikon-Eclipse E200). O índice de fagocitose foi calculado pela contagem do número de células que fagocitaram bactérias em um total de 100 células. Para determinar o índice bactericida, seguiu-se o mesmo protocolo onde as células foram coradas com acridina orange. Bactérias no interior das células coradas em laranja foram contadas como mortas, enquanto que bactérias englobadas pelos fagócitos coradas em verde foram classificadas como vivas. Foram contadas para a amostra, 100 células onde foi observada a presença de bactérias mortas.

5. 8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados em média e desvio padrão. Para análise estatística das variáveis: liberação de ânion superóxido, fagocitose, atividade microbicida, utilizou-se o teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de p foi menor que 0.05 ($p < 0,05$) e analisadas pelo programa BioEstat 5.0.

5. 9 - ASPECTOS ÉTICOS

As considerações éticas foram baseadas no uso do material biológico para fins científicos, com sigilo da identidade da nutriz, livre de coação ou conflito de interesses da instituição ou de pessoas envolvidas no projeto. As nutrizes foram previamente informadas e o material foi coletado sob exposto consentimento em formulário específico (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE) - conforme resolução 466/12 do Conselho Nacional de ética em Pesquisa (CONEP). O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Campus Araguaia-UFMT.

6 – RESULTADOS

6. 1 - Características gerais

Todas as puérperas avaliadas neste estudo tinham idade mínima de 18 anos e máxima de 40 anos, não faziam uso de medicamentos, álcool e tabaco. O tipo de parto predominante foi a cesárea e a média do peso dos recém-nascidos foi de 3435,0 gramas.

6. 2 - Quantificação de quimiocinas no colostro humano por CBA

A concentração de quimiocinas no sobrenadante de colostro estão apresentadas na figura 1. Observa-se que o sobrenadante de colostro apresentou elevadas concentrações de MCP-1. Foi observado nas amostras de colostro as seguintes concentrações de IL-6 de 29,85 pg/mL, RANTES de 42,55 pg/mL, MCP-1 de 1177,42 pg/mL.

Tabela 1 - Concentrações das quimiocinas e citocina no sobrenadante de colostro.

Quimiocinas, citocina	Concentração (pg/ml)
IL6	29,85 ± 2.3
RANTES	42,55 ± 26.6
MCP-1	1177,42 ± 159.5

Os resultados representam as médias e desvio padrão de 30 mães

6. 3 - Modulação da Atividade Funcional de Fagócitos do Colostro tratados por citocina IL-6 e quimiocinas MCP-1 e RANTES na presença e ausência de *Escherichia coli* enteroinvasiva.

6.3. 1 - Liberação de Ânion Superóxido

Na figura 2 estão apresentados os resultados da produção do ânion superóxido pelos fagócitos MN do colostro humano na presença da citocinas IL-6 e quimiocinas MCP-1 e RANTES, na ausência da bactéria. Observou-se aumento na liberação de ânion superóxido pelos fagócitos MN do colostro em todos os grupos incubados com a citocina e as quimiocinas na ausência da bactéria, quando comparados à liberação espontânea. Os fagócitos do colostro humano tratados pela citocina IL-6 apresentaram os maiores níveis de liberação do ânion superóxido.

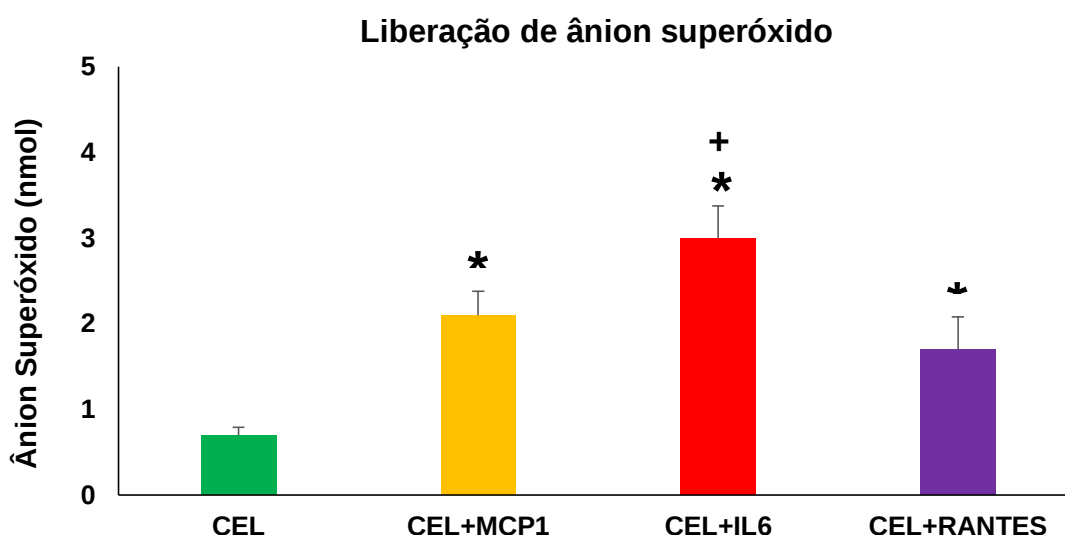


Figura 2 - Liberação de ânion superóxido na ausência da bactéria *Escherichia coli* enteroinvasiva. As células MN foram incubadas com a citocina IL-6, e quimiocinas MCP-1 e RANTES. Para os ensaios controle, as células MN foram pré-incubadas com PBS. Os resultados representam a média e o desvio padrão de experimentos com células de 30 indivíduos diferentes.

*Indica diferença estatísticas entre os grupos experimentais comparados com o grupo controle (ANOVA, $p < 0.05$).

+Indica diferença estatística significativas entre os grupos tratados por citocinas e quimiocinas (ANOVA, $p < 0.05$).

Notas: Cel= Células; bact = bactéria.

Na figura 3 estão apresentados os resultados da produção do ânion superóxido pelos fagócitos MN do colostro humano na presença da citocinas IL-6, e quimiocinas MCP-1 e RANTES incubados com a bactéria EIEC. Observou-se um aumento na liberação de ânion dos fagócitos MN quando estas células foram incubadas com *Escherichia coli* enteroinvasiva com valores superiores aos encontrados quando os fagócitos foram tratados apenas com a citocina e as quimiocinas na ausência da EIEC.

Os fagócitos do colostro humano tratados pela citocina IL-6 na presença de EIEC apresentaram maiores níveis de liberação do ânion superóxido.

Liberação de ânion superóxido

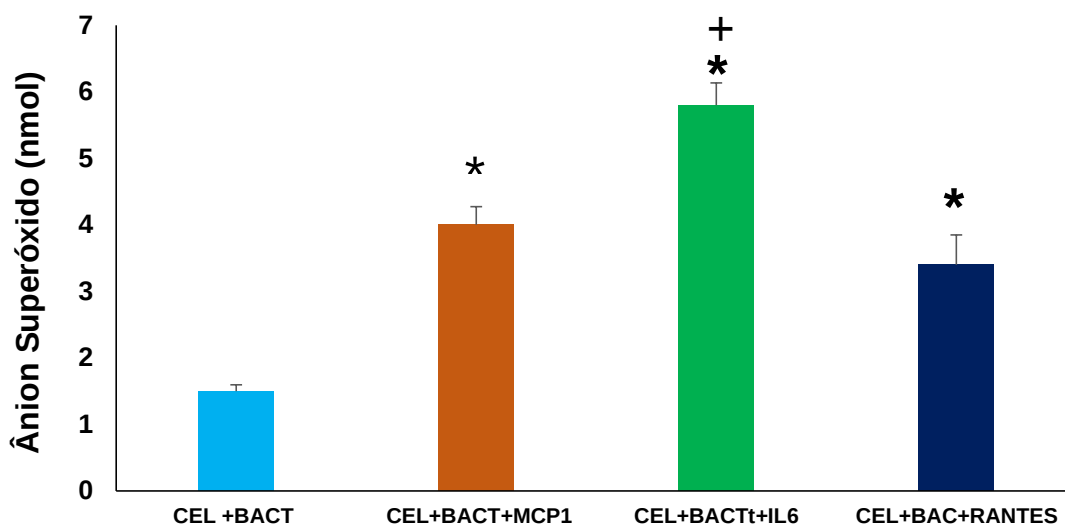


Figura 3 - Liberação de ânion superóxido na presença da bactéria *Escherichia coli* enteroinvasiva. As células e bactérias foram incubadas com a citocina IL6, e quimiocinas MCP-1 e RANTES. Para os ensaios controle, as células MN foram pré-incubadas com PBS. Os resultados representam a média e o desvio padrão de experimentos com células de 30 indivíduos diferentes.

*Indica diferença estatísticas entre os grupos experimentais comparados com o grupo controle (ANOVA, $p < 0.05$).

+ Indica diferença estatística significativas entre os grupos tratados por citocinas e quimiocinas (ANOVA, $p < 0.05$).

Notas: Cel= Células; bact = bactéria.

6.3. 2 - Fagocitose

A fagocitose das células do colostro incubadas com a citocina IL-6 e as quimiocinas MCP-1 e RANTES na presença de EIEC estão apresentadas na figura 4. Houve aumento dos índices de fagocitose em todos os grupos tratados com os imunomoduladores e incubados com a bactéria, quando comparados aos índices observados pelas células não tratadas incubadas com a bactéria. Os maiores índices de fagocitose foram observados em células tratadas pela citocina IL-6 (figura 4).

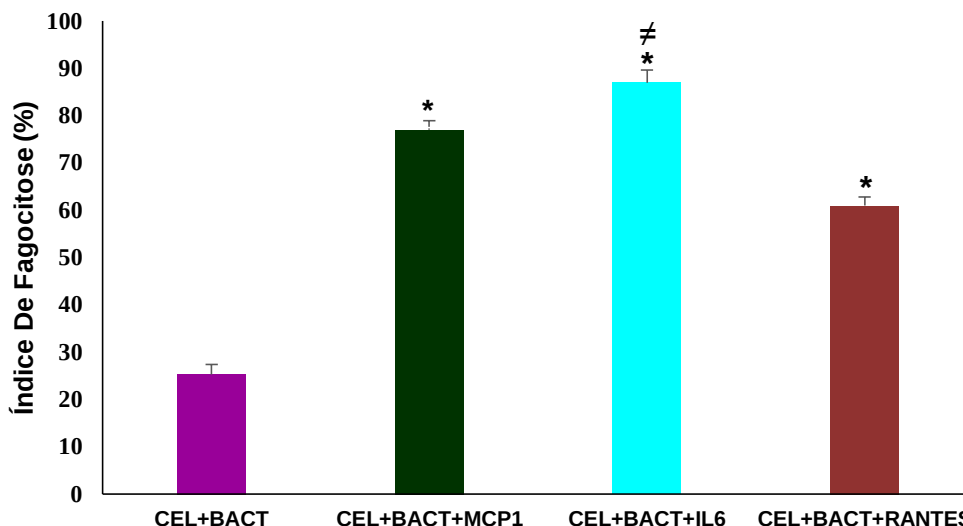


Figura 4 - Índice de fagocitose (%) das células do colostro incubadas com IL6, MCP-1 e RANTES na presença de EIEC. Os resultados representam a média e desvio padrão de experimentos com células de diferentes amostras de colostro.

*Indica diferença estatísticas entre os grupos experimentais comparados com o grupo controle (ANOVA, $p < 0.05$).

≠ Indica diferença estatística significativas entre os grupos tratados por citocinas e quimiocinas (ANOVA, $p < 0.05$).

Notas: Cel= Células; bact = bactéria.

6.3. 3 - Atividade Microbicida

A atividade microbicida dos fagócitos do colostro humano incubadas com IL-6, MCP-1 e RANTES na presença de EIEC está apresentada na figura 5. Observou-se aumento nos índices microbicida entre os grupos tratados com os estímulos quando comparados ao grupo contendo somente célula e bactéria. Os maiores índices microbicidas foram observados quando os fagócitos foram tratados pela citocina IL-6 incubados com a bactéria.

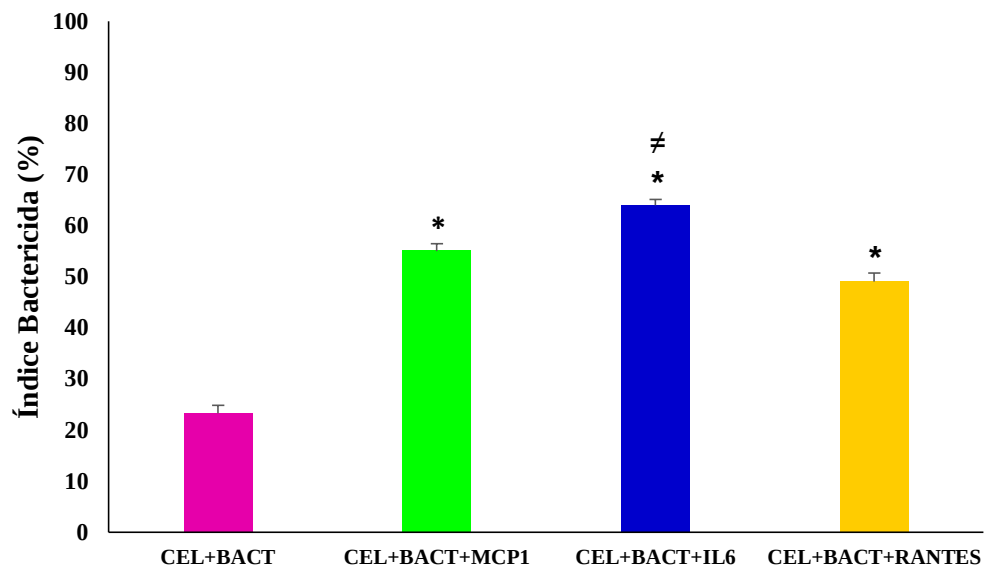


Figura 5 - Atividade microbicida (%) dos fagócitos do colostro incubados com IL-6, MCP-1 e RANTES na presença de EIEC. Os resultados representam a média e desvio padrão de experimentos com células de diferentes amostras de colostro.

*Indica diferença estatísticas entre os grupos experimentais comparados com o grupo controle (ANOVA, $p < 0.05$).

≠ Indica diferença estatística significativas entre os grupos tratados por citocinas e quimiocinas (ANOVA, $p < 0.05$).

Notas: Cel= Células; bact = bactéria.

7 - DISCUSSÃO

O leite materno constitui um dos fatores fundamentais para a promoção da saúde das crianças em todo o mundo, não só como medida para evitar a desnutrição precoce, mas como determinante de proteção contra doenças infecciosas (PAIVA et al., 1998). Vários estudos realizados em diferentes partes do mundo, com diferentes graus de desenvolvimento, sugerem proteção do leite materno para infecções respiratórias, diarreias, alergias e doenças crônicas, portanto, é unânime no meio científico a importância do aleitamento materno, em seus múltiplos aspectos, visto que este é o maior fornecedor de transferência de imunidade passiva, atuando como um importante suporte imunológico (HOWIE et al., 1990; BACHRACH, SCHWARZ; BACHRACH, 2003; REGO, 2004). Neste trabalho foram avaliados os efeitos da IL-6, MCP-1 e RANTES como moduladores da atividade funcional de fagócitos do colostro para *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC).

A diarreia representa um importante problema de saúde pública e continua sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em crianças em todo mundo. A *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) é um importante agente etiológico da diarreia infecciosa que acomete crianças de baixo nível socioeconômico (WHO, 2009). A diarreia causada pela *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) é caracterizada pela invasão e destruição da mucosa intestinal, onde ocorre intensa reação inflamatória, devido a ativação das células epiteliais intestinais (PHALIPON; SANSONETTI, 2007).

A literatura reporta que o aleitamento materno diminui a incidência e/ou a gravidade de diarreia, botulismo, enterocolite necrotizante, como também estimula o desenvolvimento adequado do sistema imunológico do bebê assegurando proteção imunológica a uma série de doenças (GOLDMAN, 1993; HANSON, 1998; HANSON; TELEMO, 1999; BETRÁN et al., 2001; WHO, 2001; RIBEIRO; KUZUHARA, 2007).

Durante o processo infeccioso os macrófagos são ativados e desempenham funções primordiais, como fagocitose para destruição de micro-organismo, apresentação de antígenos, entre outros. Estes mecanismos levam a produção de citocinas pró- inflamatória e quimiocinas, fatores de crescimento e outros mediadores inflamatórios (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

A ativação dos mecanismos oxidativos aumenta a capacidade celular de eliminar a bactéria através do contato célula-bactéria (RAVDIN et al., 1985; FRANÇA

et al., 2010-a). As quimiocinas RANTES e MCP-1 e a citocina IL-6 presentes no sobrenadante de colostro foram quantificadas neste estudo (FIG-1) verificou-se que as quimiocina MCP-1, RANTES e a citocina IL-6 que foram capazes de atuar na ativação celular. Estudos relatam valores encontrados no colostro de IL-6, RANTES, MCP-1 entre outras citocinas e quimiocinas são bastante discrepantes e, acredita-se, que as concentrações destas proteínas presentes no colostro variam de acordo com o tempo de lactação (BOTTCHER; BÖTTCHER; JENMALM; GAROFALO; BJÖRKSTÉN, 2000; TAKAHATA et al., 2003; ZIZKA et al., 2007). Neste estudo observou-se, que os diferentes moduladores estimulam a ativação celular, este aumento foi mais expressivo quando os fagócitos foram incubados com os moduladores e a bactéria EIEC (FIG-2). Maiores níveis de liberação do ânion superóxido foi observado quando os fagócitos MN do colostro foram estimulados com a IL-6 na presença de EIEC (FIG-3). Não houve diferenças significativa na liberação de ânion superóxido pelos fagócitos estimulados com as quimiocinas MCP-1 e RANTES. A literatura reporta que no estresse oxidativo, as células são capazes de gerar grandes quantidades do radical superóxido. A geração de radicais livres tem sido reportada como importante mecanismo de defesa do organismo durante os processos infecciosos, principalmente em infecções intestinais (HONÓRIO-FRANÇA et al., 1997; FRANÇA-BOTELHO et al., 2006; FRANÇA et al., 2011-a).

Estudos relatam que as citocinas auxiliam na maturação do sistema imune de mucosas dos recém-nascidos, diminuindo a probabilidade de causar danos, se eventualmente algum vírus ou bactéria se instalar no organismo imaturo (BERNT; WALKER, 1999). As citocinas funcionam tanto na imunidade inata, contribuindo para os efeitos sistêmicos da inflamação (febre), como na imunidade adquirida, anticorpos, recebidos da mãe pelo colostro, podendo ainda aumentar a produção de IgA (CARBONARE et al., 1997).

Os fagócitos mononucleares do colostro incubados com os moduladores IL-6, RANTES, e MCP-1 na presença de EIEC foram capazes de aumentar a fagocitose e a atividade microbicida de bactérias (FIG-4,5). Este aumento foi mais significativo quando os fagócitos foram incubados com a IL-6 e bactéria (FIG-4,5). Estudos tem relatado que na presença de agentes imunomoduladores a fagocitose e atividade microbicida pode ser estimulada e que a eficiência da atividade microbicida dos fagócitos está relacionada ao estresse oxidativo e formação de espécies reativas do

oxigênio (ROS), sendo este processo fundamental para eliminação de patógenos.(HONÓRIO et al., 1997; FRANÇA et al., 2011-a; FRANÇA et al., 2011-b).

A literatura relata que, células fagocíticas, principalmente neutrófilos e macrófagos, após a invasão do patógeno, são recrutados para o sítio de replicação bacteriana por meio de quimiocinas (IL-8, MCP-1) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL- 6, TNF- α) e que essas células na tentativa de eliminar as bactérias produzem uma variedade de mediadores bioquímicos os quais atuam diretamente nas bactérias (LE-BARILLEC et al., 2005; RAUPACH; KAUFMANN, 2001).

Os neutrófilos e macrófagos são importantes fontes endógenas de espécies reativas do oxigênio (EROs). Estudos mostram que liberação de espécies reativas de oxigênio podem estar associadas ao processo de fagocitose e a atividade microbicida destinada a eliminar patógenos (HONÓRIO-FRANÇA et al., 2008; BOTELHO-FRANÇA et al., 2010). Os macrófagos ativados apresentam um aumento no consumo de oxigênio que dão origem a produção de superóxido e uma variedade de espécies reativas do oxigênio (EROs) (CONNER; GRISHAM, 1996). A geração de EROS tem sido reportada como importante mecanismo de defesa do organismo durante os processos infecciosos principalmente em infecções intestinais (FRANÇA-BOTELHO et al., 2006; BOTELHO-FRANÇA et al., 2011; FRANÇA et al., 2011-a; FRANÇA et al., 2011-b).

As pesquisas fornecem evidências de que o colostro contém grandes concentrações de citocinas pro-inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) entre outras e que a ingestão da citocina IL-6 através do leite materno possa contribuir para o desenvolvimento e diferenciação de células produtoras de imunoglobulina A (SAITO et al., 1991; BÖTTCHER et al., 2003). A literatura relata que a IL-6 induz a formação de reagentes de fase aguda que melhoram fagocitose (AARDEN; KOOTEN, 1992). Estudos comprovam a transferência de inúmeras citocinas e fatores de crescimento via colostro, visto que as mesmas podem adicionar a uma estimulação ativa do sistema imunológico do lactente dependendo da hora da mamada, contribuindo de forma significativa no mecanismo de defesa das mucosas nos recém-nascidos em amamentação (GOLDMAN, 1993).

A presença das quimiocinas MCP-1, RANTES no colostro humano e leite maduro de mães que tiveram bebês a termo ou prematuros sugerem que elas poderiam proteger infecções em crianças amamentadas (SRIVASTAVA et al., 1996). É interessante ressaltar que os elevados níveis de IL-6 foram encontrados no colostro

e leite (MORAIS et al., 2015; FAGUNDES et al., 2013) e neste estudo foi evidenciado que esta citocina foi mais efetiva na modulação da atividade funcional do colostro. Estes dados reforçam que os componentes presentes no colostro atuem conjuntamente na proteção de infecções, em especial, bacterianas.

As citocinas e quimiocinas são uma parte importante da defesa do hospedeiro contra a infecção, estas moléculas exercem um papel crucial na estimulação do movimento das células mononucleares pelo corpo e na migração destas células para os tecidos, contribuindo na resposta imune adaptativa e/ou na patogênese de várias doenças (CHARO; RANSOHOFF, 2006; LAGURI et al., 2008). Considerando o carácter inflamatório da IL-6 e associando com a ativação de fagócitos da própria secreção, é possível que outros componentes anti-inflamatório possam atuar mantendo a característica da secreção que é atuar na proteção sem, no entanto, causar processos inflamatórios.

O papel importante das quimiocinas e citocinas em uma ampla gama de doenças inflamatórias sugere que eles podem ser alvos úteis para intervenção terapêutica. Portanto é possível que este mecanismo de ação dos fagócitos do colostro atue em outros agentes patogênicos que causam diarreia em conjunto com os componentes solúveis presentes no próprio colostro, como as citocinas e quimiocinas e que a atividade funcional destas células pode ser um mecanismo importante de proteção para outras infecções por enterobactérias.

Assim mais estudos devem ser direcionados buscando entender os mecanismos imunomodulares mediados por citocinas e quimiocinas presentes no colostro, responsáveis pela proteção do recém-nascido.

8 – CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo sobre a modulação da atividade funcional de fagócitos do colostro humano tratados com a citocina IL-6 e as quimicinas MCP-1 e RANTES, permitiu as seguintes conclusões:

- ✓ As células do colostro humano tratados com a citocina e as quimicinas apresentaram aumento na liberação do ânion superóxido na presença de EIEC;
- ✓ Houve aumento da fagocitose das células do colostro tratados por citocina e quimiocinas na presença de EIEC;
- ✓ Os maiores índices de fagocitose foram observados em células tratadas com a IL-6;
- ✓ Na atividade microbicida também ocorreu a ativação dos fagócitos do colostro, na presença da bactéria e da citocina e quimiocinas em todos os grupos tratados;
- ✓ Nossos achados colaboram com a hipótese de que a citocina IL-6 e as quimiocinas RANTES e MCP-1 modulam a atividade funcional dos fagócitos MN do colostro humano e que o estudo destes mecanismos de eliminação poderá fornecer subsídios para o desenvolvimento de procedimentos a serem empregados na prevenção das diarreias por EIEC e outras infecções cuja porta de entrada seja a superfície mucosa.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARDEN, L.A.; KOOTEN, C. V. The action of interleukin 6 on lymphoid populations. **Ciba Foundation Symposium**, v.167. p. 68-74, 1992.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Cytokines. **Cellular and Molecular Immunology**. 5th Edition. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science, p. 243-274, 2003.

ABDULLA, E. M.; ZAIDI, F. E.; ZAIDI, A. Immune factors in breast milk: a study and review. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 21. p. 178-186, 2005.

ADAMS, D. H.; LLOYD, A. R. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. **The Lancet**, v. 349. p. 490-495, 1997.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, v.17. p. 593-623, 1999.

AGARWAL, S.; KARMAUS, W.; DAVIS, S.; GANGUR, V. Immune Markers in Breast Milk and Fetal and Maternal Body Fluids: A Systematic Review of Perinatal Concentrations. **Journal of Human Lactation**, v. 27, n. 2, 2011.

ALBERNAZ, E. P.; MENEZES, A.; CESAR, J. A. Fatores de risco associados à hospitalização por bronquiólite aguda no período pós-natal. **Revista Saúde Pública**, [S.l.], v. 37, p. 37, 2003.

ALMEIDA, J. A. G. Human milk. In--- Breastfeeding - A Hybrid Culture in Nature. **Jornal de Pediatria** 1st ed. Rio de Janeiro. Ed. Fiocruz, 2000.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION (ADA). Position of the American Dietetic Association: Promoting and Supporting Breastfeeding. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109. p. 1926–1942, 2009.

AMER, A. O.; SWANSON, M. S. A phagosome of one's own a microbial guide to life in the Macrophage. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n.1, p. 56-61, 2002.

AMES, B. N.; SHINNENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90. p. 7915-7922, 1993.

ANDERSON, G. H. Human milk feeding milk. **Pediatric Clinic North America**, v. 32(2). p. 335-353, 1985.

ARAUJO, N. A.; GIUGLIANO, L. G. Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **BMC Microbiology**, v.1. p. 25, 2001.

ARIFEEN, S.; BLACK, R. E.; ANTELMAN, G.; BAQUI, A.; CAULFIELD, L.; BECKER, S.; Exclusive breastfeeding reduces acute respiratory infection and diarrhea deaths among infants in Dhaka Slums. **Pediatrics**, v. 108, n. 4, p. 1-8, 2001.

ASAD, N. R.; ASAD, L. M. B. O.; ALMEIDA, C. E. B.; LEITÃO, A.C. Lethal interaction between hydrogen peroxide and o-phenanthroline in *Escherichia coli*. Brazilian. **Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n.11, p. 2551-2555, 1994.

ASHIDA, A; MIMURO, H; OGAWA, M; KOBAYASHI, T; SANADA, T; KIM, M; SASAKAWA, C. Cell death and infection: A double-edged sword for host and pathogen survival. **JCB**, vol. 195, n. 6, p. 931-942, 2011

AZAIS-BRAESCO, V.; PASCAL G. Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71. p.1325S---33S, 2000.

BABIOR, B.M. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. **Blood**, v. 64. p. 959, 1984.

BACHRACH, V.R.G.; SCHWARZ, E.; BACHRACH, L.R. Breastfeeding and the risk of hospitalization for respiratory disease in infancy: a metaanalysis. *Arch Pediatr Adolesc Med*, v. 157, n. 3, p. 237–243, 2003.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leucocyte traffic. **Nature**, v.392. p. (6676):565-568, 1998.

BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **Journal of Internal Medicine**, v. 250. p. 91–104, 2001.

BAHNA, S.L.; KELLER, M.D.; HEINER, D.C. IgE and IgD in human colostrum and plasma. **Pediatrics Research**, v. 16. p. 604, 1988.

BAYLIS, C.L.; PENN, C.W.; THIELMAN, N.M.; GUERRANT, R.L.; JENKINS, C.; GILLESPIE, S.H. *Escherichia coli* and *Shigella* spp. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), **Principles and Practice of Clinical Bacteriology** (2nd ed.p. 347-365). England, UK: John Wiley and Sons Ltd, 2006.

BALABAN, G.; SILVA, G.A.P. Efeito protetor do aleitamento materno contra a obesidade infantil. **Jornal de Pediatria**, Rio.Janeiro, v. 80, n. 1, p. 7-16, 2004.

BANNERMAN, D.D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. **Jornal Animal Science**, v. 87, p. 10-25, 2009.

BANISOR, I., LEIST, T.P., KALMAN, B. Involvement of β -chemokines in the development of inflammatory demyelination. **Journal of Neuroinflammation**, v. 2. p. 1-14, 2005.

BARNA, B.P.; PETTAY, J.; BARNETT, G.H.; ZHOU, P.; IWASAKI, K. ESTES, M.L. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. **Journal of Neuroimmunology**, v. 50. p. 101-107, 1994.

BAUER, J.B.; GANTER, U.; GEIGER, T.; JACOBSHAGEN, U.; HIRANO, T.; MATSUDA, T.; KISHIMOTO, T.; ANDUS, T. ACS, G.; GEROK, W.; CILIBERTO, G. Regulation of interleukin-6 expression in cultured human blood monocytes and monocyte-derived macrophages. **Blood**, v. 72(4). p. 1134-40, 1988.

BEALL, C.J.; MAHAJAN, S.; KUHN, D.E.; KOLATTUKUDY, P.E. Site-directed mutagenesis of monocyte chemoattractant protein-1 identifies two regions of the polypeptide essential for biological activity. **Biochemical Journal**, v.15; 313. p. 633–640, 1996.

BELLINATE-PIRES, R.; MELKI, S.E.; COLLETO, G.M.D.D.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Evaluation of fluorochrome assay for assessing the bactericidal activity of neutrophils in human phagocyte dysfunctions. **Journal of Immunological Methods**, v.119. p. 189, 1989.

BERNT, K.M.; WALKER, W.A. Human milk as a carrier of biochemical messages. **Acta Paediatrica Supplement**, v. 430. p. 27-41, 1999.

BESSLER, H.C.; OLIVEIRA, I.R.; GIUGLIANO, L.G. Human milk glycoproteins inhibit the adherence of *Salmonella typhimurium* to He-La cells. **Microbiology. Immunology**, v. 50. p. 877–882, 2006.

BETRÁN, A.P.; ONÍS, M.; LAUER, J.A.; VILLAR, J. Ecological study of effect of breast feeding on infant mortality in Latin America. **British Medical Journal**, v. 323. p. 1-5, 2001.

BHASKARAM, P., REDDY, V. Bactericidal activity of human milk leukocytes. **Acta Paediatrica Scandinavica**, v. 70. p. 87-90, 1981.

BLECHA, F. Immunomodulators for prevention and treatment of infectious diseases in food-producing animals. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.17. p. 621-33, 2001.

BOCCOLINI, C.S.; CARVALHO, M.L.; OLIVEIRA, M.I.; BOCCOLINI, P.D.E. M. Breastfeeding can prevent hospitalization for pneumonia among children under 1 year old. **Jornal de Pediatria**, v. 87. p. 399-404, 2011.

BOCCOLINI, C.S.; CARVALHO M.L.; OLIVEIRA, M.I.; PÉREZ-ESCAMILLA, R. Breastfeeding during the first hour of life and neonatal mortality. **Jornal de Pediatria**, v. 89. p.131---6.9, 2013.

BONE-LARSON, C.L.; SIMPSON, K.J.; COLLETTI, L.M.; LUKACS, N.W.; CHEN, S.C.; LIRA, S.; KUNKEL, S.L.; HOGABOAM, C.M. Chemokines - The role of chemokines in the immunopathology of the liver. **Immunological Reviews**, v. 177. p. 8-20, 2000.

BORDEN, E.C. Interferons: Pleiotropic cellular modulators. **Clinical Immunology Immunopathology**, v. 62. p. 18-24, 1992.

BOTELHO-FRANÇA, A.C.; FRANÇA, J.L.; FRANÇA, E.L. Relationship between oxidative stress production and virulence capacity of *Entamoeba* strains. **Journal of Parasitology**, v. 5. p. 139-147, 2010.

BOTELHO-FRANÇA, A.C.; FRANÇA, J.L.; OLIVEIRA, F.M.S.; FRANÇA, E.L.; HONÓRIO-FRANÇA, A.C.; CALIARI, M.V. AND GOMES, M.A). Melatonin reduces the severity of experimental amoebiasis. **Parasites & Vectors**, v.4. p. 62. 2011.

BOTTCHER, M.F, BÖTTCHER, M.F; JENMALM, M.C; GAROFALO, R.P; BJÖRKSTÉN, B. Cytokines in breast milk from allergic and nonallergic mothers. **Pediatric Research Journal**, 47, p.157-162, 2000.

BÖTTCHER, M.F.; JENMALM, M.C.; BJÖRKSTÉN, B. Cytokine, chemokine and secretory IgA levels in human milk in relation to atopic disease and IgA production in infants. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 14, n.1. p. 35-41, 2003.

BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity-integration between mother and the breast-fed infant. **Vaccine**, v. 21. p. 3382-8, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde da Criança: Nutrição Infantil, aleitamento materno e alimentação complementar. **Caderno de Atenção Básica** n. 23, 2009.

BROWN, Z.; STRIETER, R.M.; NEILD, G.H.; THOMPSON, R.C.; KUNKEL, S.L.; WESTWICK, J. IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. **Kidney International**, v. 42.p. 95–101, 1992.

CAMACHO-ARROYO, I.; LÓPEZ-GRIEGO, L.; MORALES-MONTOR, J. The role of cytokines in the regulation of neurotransmission. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2009.

CARBONARE, S.B.; SILVA, M.L.M.; PALMEIRA, P.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Human colostrum IgA reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* antigens and their persistence in the faeces of a breastfed infant. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, v. 15. p. 53-8, 1997.

CARBONARE, C.B.; CARBONARE, S.B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Secretory immunoglobulin A obtained from pooled human colostrum and milk for oral passive immunization. **Pediatric Allergy and Immunology**, v.16. p. 574-581, 2005.

CARLSSON, B.; HANSON, L.A. Immunologic effects of breastfeeding on the infant. In: OGRA, P.L.; LAMM, M.E.; MCGHEE, J.R.; MESTECKY, J.; STROBER, W.; BIENENSTOCK, J. (EDS). Handbook of Mucosal immunology. **Academic Press**, p. 653-60, 1994.

CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; BARROS, M.D.; KULESZA, T.M.; RAÑNA, W. Papel do leite materno na defesa do lactente contra infecções. **Pediatria**, São Paulo, v. 4. p.88-102, 1982.

CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; SILVA, M.L.; CARBONARE, S.B.; PALMEIRA, P, DELNERI MT, HONÓRIO-FRANÇA AC. Breast-feeding protection against enteropathogenic *Escherichia coli*. **Revista de Microbiologia**, v. 26. p. 151-4, 1996.

CASTELLOTE, C.; CASILLAS, R.; RAMIREZ-SANTANA, C.; PEREZ-CANO, F.J.; CASTELL, M.; MORETONES, M.G. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. **Journal of Nutrition**, v. 141, n.6, p. 1181–1187, 2011.

CHARO, I.F.; RANSOHOFF, R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **New England Journal Medicine**, v. 354. p. 610-621, 2006.

CHIRICO, G.; GASPARONI, A. Immunologic components of human milk. **Haematology Meeting Reports**, v. 2, n. 10, p. 27-30, 2006.

CHIRICO, G.; MARZOLLO, R.; CORTINOVIS, S.; FONTE, C.; GASPARONI, A.; Antiinfective properties of human milk. **Journal of Nutrition**, v. 138. p. 1801S-6, 2008.

COLLINS, M.D.; GIBSON, G.R.; Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbiota ecology of the gut. **American. Journal of Clinical Nutrition**. v. 69, n. 5, p. 1052S-57S, 1999.

CONNER, E.M.; GRISHAM, M.B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. **Nutrition**, v.12, n.4, p. 274-7, 1996.

COSSART, P; SANSONETTI, P.J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 242-8, 2004.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia Estrutural e funcional. 6ª edição. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, p.64, 2000.

CRAGO S.S.; PRINCE S.J.; PRETLOW T.G.; MCGHEE J.R.; MESTECKY J. Human colostral cells. I. Separation and characterization. **Clinical Experimental Immunology**, v. 38. p. 585-597, 1979.

CRAIG, M.J.; LOBERG, R.D. CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) in cancer bone metastases. **Cancer metastasis reviews**, v. 25, n. 4, p. 611-9, 2006.

CROSS, M.L.; GILL, H.S. Immunomodulatory properties of milk. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 1, p. S80- S89, 2000.

CRUVINEL, W.M.; JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J.A. P.; CATELAN, T.T. T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L. E. C.; Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.4, p.434-61, 2010.

CURFS, J.H.; MEIS, J.F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A - A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10. p. 742-780, 1997.

CUSHING, S.D.; BERLINER, J.A.; VALENTE, A.J.; TERRITO, M.C.; NAVAB, M.; PARHAMI, F.; GERRITY, R.; SCHWARTZ, C.J.; FOGELMAN, A.M. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87. p. 5134–5138, 1990.

CYRILLO, D.C.; SARTI, F.M.; FARINA, E.M.Q.; MAZZON, J.A. Duas décadas da Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactentes: há motivos para comemorar? **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 25, n. 2, p. 134-140, 2009.

CYSTER, J.G. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. **Science**, v. 286, n. 5447, p. 2098-2102, 1999.

D'AMBROSIO, D., PANINA-BORDIGNON, P., SINIGAGLIA, F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. **Journal of Immunological Methods**, v 273. p. 301, 2003.

DESHMANE, S.L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B.E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 29, n. 6, 2009.

DIESNER, S.C.; FÖRSTER-WALDL, E.; OLIVERA, A.; POLLAK, A.; JENSEN-JAROLIM E.; UNTERSMEYR, E. Perspectives on immunomodulation early in life. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 23, p. 210-223, 2012.

DUIJTS, L.; RAMADHANI, M. K.; MOLL, H. A. Breastfeeding protects against infectious diseases during infancy in industrialized countries. A systematic review. **Maternal & Child Nutrition**, v. 5, n. 3, p.199-210, 2009.

DROLET R.; FAIRBROTHER J.M.; HAREL J.; HÉLIE P. Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 58. p. 87-92, 1994.

EDMOND, K.M.; ZANDOH, C, QUIGLEY MA, AMENGA-ETEGO S, OWUSU-AGYEI S, KIRKWOOD BR. Delayed breastfeeding initiation increases risk of neonatal mortality. **Pediatrics**; 117(3). p. 380–386, 2006.

EUCLYDES, M.P. **Nutrição do Lactente**. 3. ed. Viçosa/MG: Suprema Gráfica, 2005.

FAGUNDES, D.L.G.; FRANCA, E.L, HARA, C.C.P.; HONORIO-FRANÇA, A.C. Immunomodulatory effects of poly (ethylene glycol) microspheres adsorbed with cortisol on activity of colostrum phagocytes. **International Journal Pharmacology**, v. 8. p. 510-8, 2012.

FAGUNDES, D.L.G.; FRANÇA, E.L.; MORCELI, G.; RUDGE, M.V.C.; CALDERON, I.M.P.; HONORIO-FRANÇA, A.C. The role of cytokines in the functional activity of phagocytes in blood and colostrum of diabetic mothers. **Clinical Developmental Immunology**, p. 1-8, 2013.

FERGUSON-SMITH, A.C.; CHEN, Y.F.; NEWMAN, M.S.; MAY, L.T.; SEHGAL, P.B.; RUDDLE, FH. "Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome. **Genomics**, v. 2 (3). p. 203–208, 1988.

FERNANDES, R.M.; CARBONARE, S.B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.; TRABULSI, L.R. Inhibition of enteroaggregative *Escherichia coli* adhesion to HEp-2 cells by secretory immunoglobulin A from human colostrum. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 20(7). p. 672-8, 2001.

FIELD, C.J. The Immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 1, p. 1-4, 2005.

FRANÇA-BOTELHO, A.C; HONORIO-FRANÇA, A.C.; FRANÇA, E.L.; GOMES, M.A. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by human colostrum leukocytes. **Acta Paediatrica**, v. 4. p. 438-443, 2006.

FRANÇA-BOTELHO A.C.; FRANCA J.L.; FRANCA E.L.; HONORIO-FRANÇA A.C.; BUSATTI H.G.N.O.; GOMES M.A. Relationship between oxidative stress production and virulence capacity of *Entamoeba* strains. **Research Journal of Parasitology (Faisalabad)**, v. 5. p. 139-147, 2010.

FRANÇA, E.L.; NICOMEDE, T.R.; CALDERON, I. M.P.; HONORIO-FRANÇA, A. C. Time-dependent alterations of soluble and cellular components in human milk. **Biological Rhythm Research**, v. 41. p. 333-47, 2010.

FRANÇA, E.L.; BITTENCOURT, R.V.; FUJIMORI, M.; MORAIS, T.C, CALDERON, I.M.P.; HONÓRIO-FRANÇA, A.C. Human colostrum phagocytes eliminate enterotoxigenic *Escherichia coli* opsonized by colostrum supernatant. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, v. 44. p. 1-7, 2011-a.

FRANÇA, E.L.; MORCELI, G.; FAGUNDES, D.L.G.; CALDERON, I.M.P.; HONÓRIO-FRANÇA, A.C. Secretory IgA Fc α receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics. **Acta Pathologica, Microbiology and Immunology Scandinavica**, v. 119. p. 710-719, 2011-b.

FRANÇA, E.L.; HARA, C.C.P.; FAGUNDES, D.L.G.; LIMA, N.A.P.; RATTO, S.H. B; HONORIO-FRANÇA, A.C. Fluctuation in the functional activity of human colostrum phagocytes to *Streptococcus pneumoniae* and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, v. 1, p. 104, 2012.

FRANÇA-BOTELHO, A.C.; FERREIRA, M.C.; FRANÇA, J.L.; FRANÇA, E.L.; HONÓRIO-FRANÇA, A.C. Breastfeeding and its relationship with reduction of breast cancer: a review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13. p. 5327-5332, 2012.

FRANCA, E.L.; RIBEIRO, E.B.; SCHERER, E.F.; CANTARINI, D.G.; PESSOA, R.S.; HONORIO-FRANÇA, A.C. Effects of *Momordica charantia* L. on the blood rheological properties in diabetic patients. **Journal Biomed Biotechnol**; ID 840379, 2014.

FRIEL, J.K.; TSOPMO, A.; DIEHL-JONES, B.; ALUKO, R. Antioxidant properties of human milk fractions. **Faseb Journal**, v. 22. p. 446, 2008.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets: Inflammation & Allergy**, v. 4(3). p. 281-6, 2005.

GAROFALO, R. Cytokines in human milk. **Journal of Pediatrics**, v.156 (2) Suppl, p.S36–40, 2010.

GASPARONI, A.; CIARDELLI, L.; AVANZINI, A.; CASTELLAZZI, A.M.; CARINI, R.; RONDIN, G.; CHIRICO, G. Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer

cell activity in newborns, children and adults. **Biology of the Neonate**, v. 84. p. 297–303, 2003.

GDALEVICH, M.; MIMOUNI, D.; MIMOUNI, M. Breast-feeding and the risk of bronchial asthma in childhood: Asystematicreview with meta-analysis of prospective studies. **The Journal of Pediatrics**, v. 139. p. 261–266, 2001.

GLASS, G.A.; DELISLE, D.M.; DETOGNI, P.; GABIG, T.G.; MAGEE, B.H. The respiratory burst oxidase of human neutrophils. **Journal Biological Chemistry**, v. 264. p. 13247-51, 1986.

GOAZIGO, A.R.-L.; STEENWINCKEL, V.J.; ROSTÈNE, W.; PARSADANIANZ, M.S. Current status of chemokines in the adult CNS. **Progress in Neurobiology**, v. 104. p. 67-92, 2013.

GOLDBLUM, R.M; GOLDMAN, A. S. Immunological components of milk: formation and function. in **Journal Handbook Mucosal Immunology**, Ogra, P.L; Lamm, M.E; McGhee, J.R; Mestecky, J.; Strober, W .; Bienenstock, J. (Eds), Academic Press, 1994.

GOLDMAN, A.S. The immune system of human milk: antimicrobial, anti-inflammatory and immunomodulating properties. **Pediatrics Infectious Diseases Journal**, v.12. p. 664-71, 1993.

GOLDMAN, A.S.; CHHEDA, S.; GAROFALO, R.; SCHMALSTIEG, F.C. Cytokines in human milk: properties and potential effects upon the mammary gland and the neonate. **Journal Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 1, n.3, p. 251-258, 1996.

GOLDMAN, A.S. Evolution of the mammary gland defense system and the ontogeny of the immune system. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 3. p. 277-289, 2002.

GORDON, S. The Macrophage. **BioEssays**, v. 17. p. 977-986, 1995.

GUTH, B.E.C.; RAMOS, S.R.T.S.; CERQUEIRA, A.M.F.; ANDRADE, J.R.C.; GOMES, T.R.C. Phenotypic and genotypic characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Membro do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97. p. 1085- 1089, 2002.

HALL GM, ALI W. The stress response and its modification by regional anaesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, p. 53:10-2, 1998.

HANSON, L.A. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. **Annals of Allergy, Asthma Immunology**, v. 81. p. 523-537, 1998.

HANSON, L.A, TELEMO, E. Immunobiology and epidemiology of breastfeeding in relation to prevention of infections from a global perspective. In: Ogra, P.L, Mestecky, J.; Lamm, M.E.; Strober, W.; Bienenstock, J.; McGhee. **Journal. Mucosal Immunology**, Academic Press, p. 1501-10, 1999.

HANSON, L.A.; KOROTKOVA, M.; HAVERSEN, L.; MATTSBY-BALTZER, I.; HAHN-ZORIC, M.; SILFVERDAL, S.A.; STRANDVIK, B.; TELEMO, E. Breast-feeding, a complex support system for the offspring. **Pediatrics International**, v. 44. p. 347 – 352, 2002.

HANSON, L.A. Feeding and infant development Breast-feeding and immune function. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 66.p. 384-96, 2007.

HAWKES, J.S.; BRYAN, D.L.; GIBSON, R.A. Cytokine production by leukocytes from human milk. **Advances in Experimental Medicine Biology**, v. p. 391-2, 2000.

HO, P.C.; LAWTON, J.W.M. Human colostrum cells: phagocytosis and killing of *E. coli* and *C. albicans*. **The Journal of Pediatrics**, v. 93. p. 910, 1978.

HONORIO-FRANÇA, A.C.; CARVALHO, M.P.; ISAAC, L.; TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. S. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill Enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostrum IgA. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 46. p. 59-66, 1997.

HONORIO-FRANÇA A C. **Atividade microbicida dos fagócitos do colostro humano para *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**. Mecanismo de ativação celular pela IgA do próprio colostro. São Paulo, 177 p. [Tese de Doutorado-Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo]. 1998

HONORIO-FRANÇA, A.C.; LAUNAY, P., CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; MONTEIRO, R.C. Colostral neutrophils express Fc α receptors (CD89) lacking γ chain association and mediate noninflammatory properties of secretory IgA. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69. p. 289-96, 2001.

HONÓRIO-FRANÇA, A.C.; MARINS, C.M.F, BOLDRINI, F; FRANÇA, E.L. Evaluation of hypoglycemic activity and healing of extract from amongst bark of "Quina do Cerrado" (*Strychnos pseudoquina* ST. HILL). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, n.6, 2008.

HONORIO-FRANÇA, A.C.; HARA, C.C.P.; ORMONDE, J.V.S.; NUNES, G.T.; FRANÇA, E.L. Human colostrum melatonin exhibits a day-night variation and modulates the activity of colostrum phagocytes. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 11. p. 153-62, 2013.

HONORIO-FRANÇA, A.C.; NUNES, G.T.; FAGUNDES, D.L.G.; MARCHI, P.G.F.; FERNANDES, R. T.S.; FRANÇA, J.L.; BOTELHO-FRANÇA, A.C.; MORAES, L.C.A.; VAROTTI, F. P.; FRANÇA, E. L. Intracellular calcium is a target of modulation of apoptosis in MCF-7 cells in the presence of IgA adsorbed to polyethylene glycol. **Onco Targets Ther**, v.9, 2016.

HORTA, B.L.; BAHL, R.; MARTINES, J.C.; VICTORA, C.G. Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic reviews and meta-analyses. **World Health Organization**, 2007.

HOWIE, P.W.; FORSYTH, J.S.; OGSTON, S.A.; CLARK, A.; FLOREY, C.D. Protective effect of breastfeeding against infection. **British Medical Journal**, v. 300. p. 11-6, 1990.

IHARA T.; YAMAWAKI K.; FUJIWAKA T.; KITAMURA K.; SAKURAI M.; KAMIYA H. A flow cytometric method for measurement of hydrogen peroxide generation by pediatric polymorphonuclear leukocytes stimulated by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Acta Paediatrica Japonica**, v. 36. p. 244-9, 1994.

ISLAM, S.K.; AHMED, L.; KHAN, M.N.; HUQUE, S.; BEGUM, A.; YUNUS, A.B. Immune components (IgA, IgM, IgG, immune cells) of colostrum of Bangladeshi mothers. **Pediatrics International**, v. 48. p. 543-8, 2006.

KAKKAR R.; KALRA, J.; MANTHA, S.V.; PRASAD, K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.151. p. 113-119, 1995.

KELLY, D.; COUTTS, A.G. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. **Proceeding of Nutrition Society**, v. 59. p. 177-185, 2000.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R.L. The magnitude of global burden of diarrhoeal disease from studies published 1992-2000. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81. p. 197-204, 2003.

KRAYCHETE, D.C.; CALASANS, M.T.A.; VALENTE, C.M.L. Citocinas Pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de reumatologia**, v. 46, n.3, p. 199-206, 2006.

KUNZS, C.; PALMERO, M.R.; KOLETZKO, B.; JENSEN, R. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part II: Lipids, micronutrients and bioactive factors. **Clinical Perinatol**, v. 26. p. 335-60, 1999.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran. Bases Patologicas das doenças. Editora Elsevier. Rio de Janeiro. 2004.

KVERKA, M.; BURIANOVA, J.; LODILONOVA-ZADNICOVA, R.; KOCOURKOVA, I.; CINOVA, J.; TUCKOVA, L.; TLASKALOVA-HOGENOVA, H. Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array. **Clinical Chemistry**, v. 53. p. 955-62, 2007.

JIN, T.; XU, X.; HERELD, D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. **Cytokine**, v. 44, n.1, p. 1-8, 2008.

JOHNSON, D.F; FRANCE, G.L.; MARMER, D.J.; STEELE, R.W. Bactericidal mechanisms of human breast milk leukocytes. **Infection and Immunity**, v. 28. p. 314, 1980.

JONES, G.; STEKETEE, R.W.; BLACK R.E.; BHUTTA, Z.A.; MORRIS, S.S. How many child deaths can we prevent this year? **Lancet**, [S.l.], v. 362, p. 65-71, 2003.

JONES, K. E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J. L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v.451. p. 990-993, 2008.

LAGURI, C.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; LORTAT-JACOB, H. Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines — the CXCL12 example. **Carbohydrate Research**, v. 343. p. 2018–2023, 2008.

LAMOUNIER, J.A.; VIEIRA, G.O, GOVEA, L.C. **Composição do Leite Humano – Fatores Nutricionais**. In Rego JD Ed. Aleitamento Materno. Sao Paulo, Atheneu; p. 47-58, 2001.

LAWRENCE, R.A.; LAWRENCE, R.M. **Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession**. St. Louis, MO: Elsevier Mosby-Year Book, p. 105–170, 2005.

LAWRENCE, R. M.; PANE, C. A. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 37, n. 1, p. 7-36, 2007.

LE-BARILLEC, K.; MAGALHAES, J.G.; CORCUFF, E.; THUIZAT, A.; SANSONETTI P.J.; PHALIPON, A.; DI SANTO, J.P . Roles for T and NK cells in the innate immune response to *Shigella flexneri*. *Journal Immunology*, v. 175. p. 1735-40, 2005.

LE, Y.; ZHOU Y.; IRIBARREN, P.; WANG, J.M. Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 1, n.2, p. 95-104, 2004.

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

LEWIS, D.B.; WILSON, C.B. **Developmental immunology and role of host defenses in fetal and neonatal susceptibility to infection**. In: Remington JS, Klein JO, editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Company, p. 87– 210, 2006.

LI, M.; RANSOHOFF, R.M. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. **Progress in neurobiology**, v. 84, n.2, p. 116-131, 2008.

LIEPKE, C.; ADERMANN, K.; RAID, M.; MAGERT, H.J.; FORSSMANN, W.G.; ZUCHT, H.D. Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 712-718, 2002.

LINDMARK-MANSSON, H.; AKESSON, B. Antioxidative factors in milk. **British Journal of Nutrition**, v. 84. p. 103-110, 2000.

LONNERDAL, B. Breast milk: a truly functional food. **Nutrition**, v. 16. p. 509-11, 2000.

LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77. p. S1537-43, 2003.

LÖNNERDAL, B.; Bioactive proteins in breast milk. **Journal of Paediatric Child Health**, v. 49. p. 1-7, 2013.

MAHAD, D., CALLAHAN, M.K., WILLIAMS, K.A., UBOGU, E.E., KIVISAKK, P., TUCKY, B., KIDD, G., KINGSBURY, G.A., CHANG, A., FOX, R.J., MACK, M., SNIDERMAN, M.B., RAVID, R., STAUGAITIS, S.M., STINS, M.F., RANSOHOFF, R.M. Modulation CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. **Brain**, v. 129, n.1, p. 212-223, 2005.

MAKARE, N.; BODHANKAR. S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal Ethnopharmacol**, v. 78. p. 133-7, 2001.

MAREK, A.; SZLAGATYS. A.; LIBEREK, A.; GÓRA-GĘBKA, M.; SIKORSKA-WIŚNIEWSKA, G.; MAREK, K.; RACZKOWSKA-KOZAK, J.; BAKO, W. Human milk, a multipotent infant's immune system fortifier. **Medical Science Monitor**, v. 9.p. 75-81, 2003.

MARTÍNEZ, C.M.M.; PANDO, R.H. Las quimiocinas, una nueva familia de citocinas en el reclutamiento de células inflamatorias. **Revista de Investigación Clínica**, v. 51, n. 4, p. 255-268, 1999.

MATSUKAWA, A.; HOGABOAM, C.M.; LUKACS, N.W.; LINCOLIN, P.M.; EVANOFF, H.L.; KUNKEL, S.L. Pivotal role of the CC chemokine, macrophage derived chemokine, in the innate immune response. **Journal of Immunology, Boston**, v. 164. p. 5362–5368, 2000.

MEKI, A-R. M.A.; SALEEM, T.H.; AL-GHAZALI, M.H.; SAYED, A.A. Interleukins -6, 8 and 10 and tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptor I in human milk at different periods of lactation. **Nutrition research**, v. 23. p. 845-855, 2003.

MÉLIK-PARSADANIANZ, S; ROSTÈNE, W. "Chemokines and neuromodulation" (em inglês). **Journal of Neuroimmunology**, v. 198, n.1–2, p. 62–8, 2008.

MERCER, J.S.; ERICKSON-OWENS, D.A.; GRAVES, B.; HALEY, M.M. Evidence-based practices for the fetal to newborn transition. **Journal of Midwifery & Womens Health**, v. 52. p. 262-72, 2007.

MIRALLES, O.; SANCHEZ, J.; PALOU, A.; PICO, C. A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. **Obesity**, v. 14. p. 1371-7, 2006.

MOHR, J.A.; LEU, R.; MABRY, W. — Colostral leukocytes. **Journal of Surgical Oncology**, v. 2. p.163, 1970.

MORAIS, T.C.; HONORIO-FRANÇA, A.C.; SILVA, R.R.; FUJIMORI, M.; FAGUNDES, D.L.G.; FRANÇA, E.L. Temporal fluctuations of cytokine concentrations in human milk. **Biological Rhythm Research**, v.46, n.6, 2015.

MORCELI, G.; HONORIO-FRANÇA, A.C.; FAGUNDES, D.L.G.; CALDERON I.M.P, FRANÇA, E.L. Antioxidant effect of melatonin on the functional activity of colostral phagocytes in diabetic women. **PLoS One**, v. 8, n.2, p. 1-8, 2013.

MORTENSEN, E.L.; MICHAELSEN, K.F.; SANDERS, S.A.; REINISCH, J.M. The association between duration of breastfeeding and adult intelligence. **The Journal of the American Medical Association**. [S.l.], v. 287, p. 2365-71, 2002.

MOSER, B.; LOETSCHER, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. **Nature Immunology**, v. 2, n. 2, p. 123-8. Review, 2001.

MOSER, B.; WILLIMAN, K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63. (suppl). p. 84-89, 2004.

MULLANY, L.C.; KATZ, J.; LI Y.M.; KHATRY, S.K.; LECLERQ, S.C.; DARMSTADT, G.L.; Tielsch ,J.M. Breast-feeding patterns, time to initiation, and mortality risk among newborns in southern Nepal. **The of Journal Nutrition**, v. 138, n.3, p. 599–603, 2008.

MUNDI, H.; BJÖRKSTEN B.; SVANBORG C.; OHMAN L.; DAHLGREN C. Extracellular release of reactive oxygen species from human neutrophils upon interactions with *Escherichia coli* strains causing renal scarring. **Infection and Immunology**, v. 59. p. 4168-72, 1991.

MUNOZ, C.; ENDRE, S.; VAN, DER MEER J, SCHLESINGER, L.; AREVALO, M.; DINARELLO, C. Interleukin-1b in human colostrum. **Research Immunology**, v. 141. p. 501-13, 1990.

MURPHY, M.P. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. **Pharmacological Reviews**, v. 54. n.2, p. 227-229, 2002.

MURILLO, G.J.; GOLDMAN, A.S. The cells human colostrum II. Synthesis of IgA and betalC. **Pediatrics Research**, v. 4. p. 71, 1970.

NASCIMENTO, M.B.R.; ISSLER, H. Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 58, n.1, p. 49-60, 2003.

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

NATARO, J.P.; BOPP, C.A.; FIELDS, P.I.; KAPER, J.B.; STROCKBINE, N.A. Escherichia, Shigella and Salmonella. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), **Manual of Clinical Microbiology** (9th ed), p. 670-687. ASM press. 2007.

NEWBURG, D.S. Innate immunity and human milk. **The Journal of Nutrition**, v. 135. p. 1308-12, 2005.

NOVAK, M.; PFEIFFER, T.; LENSKI, R.E.; SAUER, U.; BONHOEFFER, S. Experimental tests for an evolutionary trade-off between growth rate and yield in E. coli. **The American Naturalist**, v. 168, n. 2, p. 242-51, 2006.

ODDY, W.H. The impact of breastmilk on infant and child health. **Breastfeed Review**, v.10, n.3, p. 5-18, 2002.

OWEN, C.G.; MARTIN, R.M.; WHINCUP, P.H.; SMITH, G.D.; COOK, D.G. Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84. p. 1043-1054, 2006.

OZKARAGOZ, F.; RUDLOFF, H.E.; RAJARAMA, R.; MUSTHAHA, A.A.; SCHMALSTIEG, F.C.; GOLDMAN, A.S. The motility of human milk macrophages in collagen gels. **Pediatrics Research**, v. 23. p. 449-52, 1998.

PAAPE, M.J., GUIDRY, A.J., JAIN, N.C.; MILLER, R.H. Leukocyte defence mechanisms in the udder. **Flemish Veterinary Journal**, (Suppl). v. 62. p. 95, 1991.

PACHECO-GIL. L.; OCHOA, T.J.; FLORES-ROMO. L; ESTRADA-GARCIA, T. Enteroinvasive Escherichia coli severe dysentery complicated by rotavirus gastroenteritis. **Journal of Infectious**, v. 53, p. 211-213, 2006.

PAIVA, M.A.S.; REIS, F.J.C.; FISHER, G.B.; ROZOV, T. Pneumonias na criança. I Consenso Brasileiro sobre pneumonias. **Journal of Pneumology**, v. 24. p. 101-8, 1998.

PALKOWETZ, K.H.; ROYER, C.L.; GAROFALO, R.; RUDLOFF, H.E.; SCHMALSTIEG, F.C.; GOLDMAN, A.S. Production of interleukin-6 and interleukin-8 by human mammary gland epithelial cells. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 26. p. 57–64, 1994.

PHALIPON, A.; SANSONETTI, P.J. Shigella's ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? **Immunology and Cell Biology**, v. 85. p. 119-129, 2007.

PHILLIPS, K.L.E., CHIVERTON, N.; MICHAEL, A.L.R.; COLE, A.A.; BREAKWELL, L.M.; HADDOCK, G.; BUNNING, R.A.D.; CROSS, A.K.; LE MAITRE, C.L. The cytokine and chemokine expression profile of nucleus pulposus cells: implications for degeneration and regeneration of the intervertebral disc. **Arthritis Research Therapy**, v.15. p. 213, 2013.

PICCIANO M F. Nutriente composition of human milk. **Pediatric Clinic North America**, v. 48, n. 1, p. 53-67, 2001.

PICKERING, L.K.; CLEARY, T.G.; KOHL S.; GETZ, S. Polymorphonuclear leukocytes of human colostrum. I. Oxidative metabolism and kinetics of killing of radiolabeled *S. aureus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 742. p. 685, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunology Methods**, v. 46. p. 211-26, 1981.

RADILLO, O.; NORCIO, A.; ADDOBBATI, R.; ZAULI, G. Presence of CTAK/CCL27, MCP-3/CCL7 and LIF in human colostrum and breast milk. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 26-28, 2013.

RAEBURN, C.D.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K.A.; ARYA, J.; HARKEN, A.H. Cytokines for surgeons. **The American Journal of Surgery**, v. 183, n.3, p. 268-273, 2002.

RAUPACH, B.; KAUFMANN, S.H. Immune responses to intracellular bacteria. **Current Opinion Immunology**, v. 13. p. 417-28, 2001.

RAVDIN JI, JOHN JE, JOHNSTON LI, INNES DJ, GUERRANT RL. Adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to rat and human colonic mucosa. **Infection and Immunity**, v. 48, n.2, p. 292-7, 1985.

REGO J. D. **Aleitamento Materno**. 1. ed. Atheneu. Rio de Janeiro, 2004.

REGO, J. D. **Aleitamento Materno**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

RIBEIRO, L.C.; KUZUHARA, J.S.W. Lactação. In: Silva SMCS, Mura JD´AP. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, p. 293-318, 2007.

RIVAS, D.; RUESTRA-NORIEGA, J.L.; TORRE-ALONSO, J.C.; RODRIGUEZ, A. AND GUTIÉRREZ, C. Decrease in detectable complement receptor type 1 levels on erythrocytes from patients with psoriatic polyarthritis. **British Journal of Rheumatology**, v. 33, n.7, p. 626-630, 1994.

ROBERTSON, M. The role of chemokines in the biology of natural killer cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71. p. 173-183, 2002.

ROBINSON, J. E.; HARVEY, B. A. M. & SOOTHILL, J. F. Phagocytosis and killing of bacteria and yeast by human milk cells after opsonisation in aqueous phase of milk. **British Medical Journal**, v. 7. p.1.443, 1978.

ROBINSON, J.E.; VOLOVITZ, B.; PASSWELL, J.H. Identification of a secretory IgA receptor on breast-milk macrophages: Evidence for specific activation via receptors. **Pediatric Research**, v. 29. p. 429-34, 1991.

ROBINSON, M. Infant morbidity and mortality. A study of 3.265 infants. **The Lancet**, v. 2. p. 788, 1951.

ROBINS-BROWNE, R.M.; HARTLAND, E.L. Escherichia coli as a cause of diarrhea. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17. p. 467-75, 2002

RODRIGUEZ-ANGELEZ, G; Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli; **Salud Pública de México**, v. 44, n. 5, 2002.

ROOS, D.; WINTERBOURN, C.C. Lethal Weapons. **Science**, v. 296. p. 669-71, 2002

ROSENKILDE, M.M., SCHWARTZ, T.W. The chemokine system: a major regulator of angiogenesis in health and disease. **Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica**, v. 112, n.7-8, p. 481-495, 2004.

SAARINEN, U.M.; KAJOSAARI, M. Breastfeeding as prophylaxis against atopic disease: Prospective follow-up study until 17 years old. **The Lancet**, v. 346. p. 1065–1069, 1995.

SAITO, S.; MARUYAMA, M.; KATO, Y.; MORIYAMA, I.; ICHIJO, M. Detection of IL-6 in human milk and its involvement in IgA production. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 20. p. 267–276, 1991.

SANSONETTI, P.; ARONDEL, J.; CANTEY, J.R.; PRÉVOST, M.C.; HUERRE, M. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. **Infection and immunity**, v. 64, p 2752-64, 1996.

SCALETISKY, I.C.A.; PEDROSO, M.Z.; OLIVA, C.A.G.; CARVALHO, R.L.B.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infection and Immunity**, v. 67. p. 3410-5, 1999.

SCHERER, E.F.; HONORIO-FRANÇA A.C.; HARA, C.C.P.; REINAQUE, A.P. B.; APARECIDA, M.C.; FRANÇA, E.L. Immunomodulatory effects of Poly(ethylene glycol) microspheres adsorbed with nanofractions of *Momordica charantia* L. on diabetic human blood phagocytes. **Science of Advanced Materials**, v.3. p. 687-694, 2011.

SCHROEDER, M.; VIEZENS, L.; SCHAEFER, C.; FRIEDRICHS, B.; ALGENSTAEDT, P.; RÜTHER, W.; WIESNER, L.; HANSEN-ALGENSTAEDT, N. Chemokine profile of disc degeneration with acute or chronic pain. **Journal of Neurosurgery. Spine**, v.18. p. 496–503, 2013.

SEGAL A. W.; SOOTHIL J.F. Phagocytes. In: SOOTHIL, J.F. **Pediatric Immunology**. Blackweel, v. 37, 1983.

SHAHRIAR, F.; NGELEKA, M.; GORDON, J.R.; SIMKO, E. Identification by mass spectroscopy of F4ac-fimbrial-binding proteins in porcine milk and characterization of lactadherin as an inhibitor. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 30. p. 723-34, 2006.

SILVA, G.A.P.; LIRA, P.I.C.; LIMA, M.C. **Fatores de risco para doença diarréica no lactente: um estudo caso-controle**. Cadernos Saúde Pública, v. 20. p. 589-95, 2004.

SILVA, S.M.C.S.; MURA, J.D.P. **Tratado de Alimentacao, Nutricao e Dietoterapia**. 1o.Ed. Sao Paulo: Editora Rocca1, 1122, 2007.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain, em: BEAULIEU, P.; LUSSIER, D.; PORRECA, F.; DICKENSON, A. **Pharmacology of Pain**. 1st Ed, Seattle, IASP Press, p. 279-302, 2010.

SOUZA, E.C.; MARTINEZ, M.B.; TADDE, I C.R.; MUKAI, L.; GILIO, A.E.; RACZ, M.L.; SILVA, L.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Etiologic profile of acute diarrhea in children in the city of São Paulo **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 1, p. 31-38, 2002.

SRIVASTAVA, M.D.; SRIVASTAVA, A.; BROUHARD, B.; SANETO, R.; GROH-WARGO, S.; KUBIT, J. Cytokines in human milk. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 93. p. 263–287, 1996.

SPINELLI, M.G.N.; MARCHIONI, D.M.L.; SOUZA, J.M.P.; SOUZA, S.B.de.; SZARFARC, S.C. Fatores de risco para anemia em crianças de 6 a 12 meses no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 17, n. 2, p. 84-91, 2005.

STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLow, T.G. **Imunologia Médica**. Editora Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro, 9ª edição, 2000.

SUSSMAN, M. **Escherichia coli: mechanisms of virulence**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 639, 1997.

TAKAHATA, Y.; TAKADA, H.; NOUMURA, A.; NAKAYAMA, H.; OHSHIMA, K.; HARA, T. Detection of interferon- γ -inducible chemokines in human milk. **Acta Paediatrica**, v. 92. p. 659-65, 2003.

TAKUSHI, A.S.M.; TANAKA, A.C.D.; GALLO, P.R.; MACHADO, M.A.M.P.; Motivação de gestantes para o aleitamento materno. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 5, p. 491-502, 2008.

THORPE, L.W.; RUDLOFF, H.E.; POWELL, L.C.; GOLDMAN, A.S. Decreased response of human milk leukocytes to chemoattractant peptides. **Pediatric Research**, v. 20. p. 373-7, 1986.

TODAR, K. Mechanisms of Bacterial Pathogenicity: Bacterial Defense Against Phagocytes. **Online TextBook of Bacteriology**, 2008.

TRABULSI, L.R.; CAMPOS L.C. *Escherichian*: TRABULSI, L. S; SOUZA, C.P. (Eds.). **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, cap. 28. p. 215-228. 1999

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

TSUDA, H.; DICKEY, W.D.; GOLDMAN, A.S. Separation of human colostrum macrophages and neutrophils on gelatin and collagen-serum substrate. **Cell Structure and Function**, v.8. p. 367-71, 1984.

UVNAS-MOBERG, K. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interactions and emotions. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23. p. 819-35, 1998.

VAN ODIJK, J.; KULL, I.; BORRES, M.P.; BRANDTZAEG, P.; EDBERG, U.; HANSON,

L.A.; HOST, A.; KUITUNEN, M.; OLSEN, S.F.; SKERFVING, S.; SUNDELL, J.; WILLE, S. Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. **Allergy**, [S.I.], v. 58, p. 833-43, 2003.

VASQUEZ, R.E.; XIN, L.; SOONG, L. Effects of CXCL10 on dendritic cell and CD4+ Tcell functions during *Leishmania amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v.76, n.1, p. 161–169, 2008.

VERNAL, R.; GARCIA-SANZ, J. A. Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 8, n. 4, p. 207-220, 2008.

VIDAL, J.E.; CANIZÁLEZ-ROMÁN, A.; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J.; NAVARROGARCÍA, F.; Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Artículo de Revisión, **Salud Pública de México**, v.49, n. 5, 2007.

VIEIRA, G.O.; SILVA, L.R.; VIEIRA, T.O. Alimentação infantil e morbidade por diarreia. **Jornal de Pediatria**, [S.I.], v.79, p. 449-454, 2003.

WALKER, W.A. The dynamic effects of breastfeeding on intestinal development and host defense. **Advances in Experimental Medicine Biology**, v. 554, p. 155-170. 2004.

WEBER, F. Effects of auto-reactive T cells and cytokines in the pathogenesis of Multiple Sclerosis. **MSJ**, v. 9, n.1, p. 29-35. 2001.

WHITE, J.R.; LEE, J.M.; YOUNG, P.R.; HERTZBERG, R.P.; JUREWICZ, A.J.; CHAIKIN, M.A.; WIDDOWSON, K.; FOLEY, J.J.; MARTIN, L.D.; GRISWOLD, D.E.; SARAU, H.M. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 273, n. 17, p. 10095-10098, 1998.

WHO – World Health Organization. **The optimal duration of exclusive breastfeeding**: a systematic review, 2001.

WHO/UNICEF (The United Nations Children's Fund). **Diarrhoea: why children are still dying and what can be done**, 2009.

XANTHOU, M. Immune protection of human milk. **Biology of the Neonate**, v. 74. p. 121-33, 1998.

ZIZKA, J.K.M.; KVERKA, M.; NOVOTNÁ, O.; STANKOVÁ, I.; LODINOVÁ-ZÁDNÍKOVÁ R.; KOCOURKOVÁ, I.; STERZL, I.; PROKESOVÁ, L. Perinatal period cytokines related to increased risk of future allergy development. **Folia MicrobiologicaJournal (Praha)**, 52, n.5, p. 549-55, 2007.

ZHANG, J.M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45. p. 27-37, 2007.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; ITO, I. A case of hemolytic uremic syndrome associated shiga toxin 2 –producing *Escherichia coli* O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces. **Japanese Journal of Infectious Disease**, v. 55. p. 174-176, 2002.

YEAMAN, G.R.; KERR, M.A. Opsonization of yeast by human serum IgA anti-mannan antibodies and phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 68. p. 200-208, 1987.

YVAN-CHARVET, L.; MASSIÉRA, F.; LAMANDÉ, N.; AILHAUD, G.; TEBOUL, M.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; GASC, J.M.; QUIGNARD-BOULANGÉ, A. Deficiency of angiotensin type 2 receptor rescues obesity but not hypertension induced by overexpression of angiotensinogen in adipose tissue. **Endocrinology**, v. 150. p.1421-8, 2009.

10 – APÊNDICE



Universidade Federal de Mato Grosso Campus Universitário do Araguaia Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Atividade Funcional dos Fagócitos do colostro humano tratados por quimiocinas na presença de *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC).

Pesquisadores e instituições envolvidas: Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório França - Instituto Universitário do Araguaia – Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Claudia Cristina de Sousa Pereira - Instituto Universitário do Araguaia – Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Objetivo principal: Avaliar a atividade funcional dos fagócitos do colostro humano tratados por citocina e quimiocinas na presença de *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC).

Procedimentos: Coleta de leite humano (colostro) excedente, cerca de 8ml, por ordenha manual (retirada manual do leite, através de massagem e expressão das mamas).

Possíveis riscos e desconforto: não há riscos previsíveis, mas poderá haver certo desconforto, resultante da expressão manual das mamas, apesar deste ser realizado com técnica adequada e de maneira cuidadosa.

Benefícios previstos: Para as atuais participantes do estudo: incentivo à amamentação, assistência e orientações sobre a amamentação e melhorar os conhecimentos sobre os mecanismos de defesa imunológica presentes no leite, que são passados aos seus filhos durante a amamentação. Para as gestantes futuras, possibilidade de novos conhecimentos sobre os benefícios do leite materno e do processo de amamentação.

Eu....., fui informada dos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios desta pesquisa, descritos acima. Entendo que terei garantia de confidencialidade, ou seja, que apenas os resultados dos exames realizados com o leite materno serão divulgados e ninguém, além dos pesquisadores, terá acesso aos nomes dos participantes desta pesquisa. Entendo também, que tenho direito de receber, sempre que desejar, outras informações sobre o estudo, entrando em contato com a pesquisadora (Dra. Adenilda). Fui informada ainda, que a minha participação é voluntária e que, se eu preferir não participar ou deixar de participar deste estudo em qualquer momento, isso NÃO influenciará no meu atendimento junto ao Hospital. Compreendendo tudo o que me foi explicado sobre o estudo e, estando de acordo em participar, assino embaixo.

.....
Assinatura do participante (ou do responsável, se menor):

.....
Assinatura do pesquisador principal:

Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório França. Rodovia BR-070, Km 5. Barra do Garças - Mato Grosso. CEP: 78600-000 – Fone 66-3405-7206 adenilda@ufmt.br