

Mecanismos de protección mediados por IgA de la leche materna para combatir los tipos de diarrea por *Escherichia Coli*

Dra. Magda M.S. Carneiro-Sampaio
Profesor de Inmunología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad de Sao Paulo, Brasil

Estudios clínicos y epidemiológicos extensivos han mostrado que la leche materna es efectiva en la reducción de la diarrea infantil y otras enfermedades infecciosas (Jason *et al.* 1984, Victora *et al.* 1987, Carlsson & Hanson, 1994). La diarrea infecciosa aguda continúa representando una de las causas más comunes de la morbilidad y mortalidad infantil en países en vías de desarrollo (Blake *et al.*, 1993).

El calostro y la leche contienen los más altos niveles de

IgA de todas las secreciones humanas, llegando a 10 a 15 g/l durante la primer semana de lactancia (Hanson & Brandtzaeg, 1973, Barros & Carneiro-Sampaio, 1984). Una de las funciones protectoras de IgA es proporcionar una barrera inmunológica que protege contra sustancias extrañas. Los anticuerpos IgA pueden impedir la adherencia de bacterias a las células epiteliales humanas, así como la adherencia y penetración de virus (Mazanec *et al.*, 1993). Las oligosacáridos que se encuentran presentes en la leche materna pueden tam-



Fotografía de Sebastião Salgado

E. Coli enteropatogena
- EPEC -



es el principal agente etiológico de la diarrea aguda infantil entre la población que vive en condiciones de pobreza extrema y malas condiciones higiénicas en Brasil

bién participar en la inhibición de la adhesión bacteriana (Craviotto *et al.*, 1991, Kunz & Rudloff, 1993).

Durante los últimos 8 años hemos estudiado los mecanismos de protección mediados por IgA de la leche humana para combatir las infecciones diarreicas del tipo *Escherichia Coli*, con énfasis en la *E. Coli* Enteropatógeno (EPEC), que es el principal agente etiológico de la diarrea infantil aguda en Brasil (Gomes *et al.*, 1991). Algunos de los resultados en este campo se resumen en este artículo.

Las muestras de calostro y leche humana de madres que viven en una área endémica, han mostrado poder inhibir la adhesión de EPEC a las células epiteliales. EPEC causa diarrea acuosa severa sólo al adherirse al epitelio intestinal sin una invasión intestinal o producción de toxinas importantes. En la patogénesis EPEC, existe una adherencia inicial a los microvellosidades de los enterocitos, seguido de una adhesión afectando a las microvellosidades (Knutton *et al.*, 1987, Giron *et al.*, 1991, Law, 1994, Donnenberg *et al.*, 1997). Para causar una lesión de adhesión/eliminación (A/E), EPEC trastorna las rutas de traducción de señales de las células huésped y explota los componentes de membrana/citoesquelético del huésped. Entre los factores EPEC asociados con estos virus se encuentran adhesinas y proteínas señaladoras de células tales como Intimín, BFP (pili formadores de grupos) EspA (proteínas secretadas por EPEC) EspB y EspD. Las adhesinas 94 kDa llamadas intimín, se adhieren a un receptor intimín tras-

ladado por EPEC (Tir) en las células mucosas intestinales.

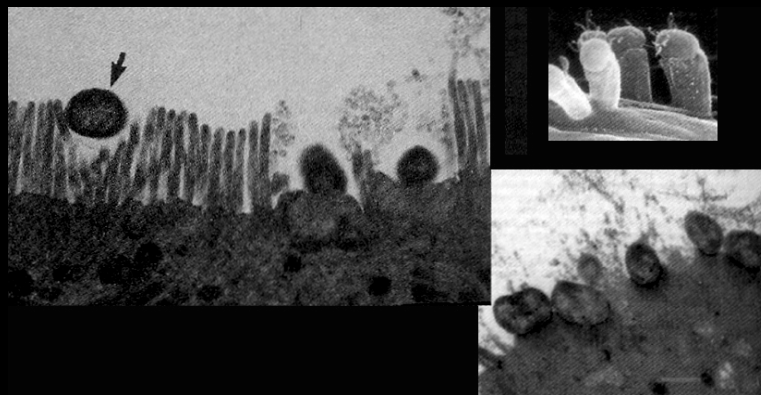
Utilizando un modelo clásico in vitro de la adherencia localizada EPEC a células Hep-2 o HeLa, Silva & Giamaglia (1992), mostraron que el calostro humano en grupo inhibe la adhesión de EPEC en células epiteliales humanas cultivadas (células HeLa y Hep-2).

En un estudio secundario observamos que todo el calostro y las muestras de leche 7, 30 y 60 de 39 madres pudieron inhibir la adherencia in vitro de EPEC 0111:H a las células Hep-2. Estas muestras de calostro y leche se obtuvieron de madres sanas y bien alimentadas provenientes de niveles socioeconómicos bajos (algunas habitando en barrios), quienes habían dado a luz bebés de término completo, normales. Una actividad inhibitoria equivalente se observó en muestras de leche y calostro de madres que habían dado a luz niños de bajo peso al nacer, prematuros y pequeños para su término (Delneri *et al.*, 1997).

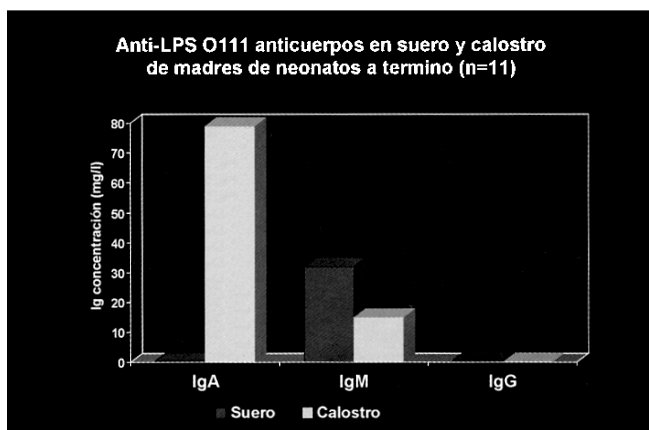
El calostro y la leche humana contienen anticuerpos IgA reactivos a las proteínas asociadas al virus EPEC

Posterior a esta observación inicial, mostramos que la actividad inhibitoria se perdía cuando el calostro se reducía por el IgA (por la técnica de cromatografía de

Patogénesis de EPEC (Enteropathogenic *E. coli*) Infección: fijación y lesión



Adapted from Knutson et al



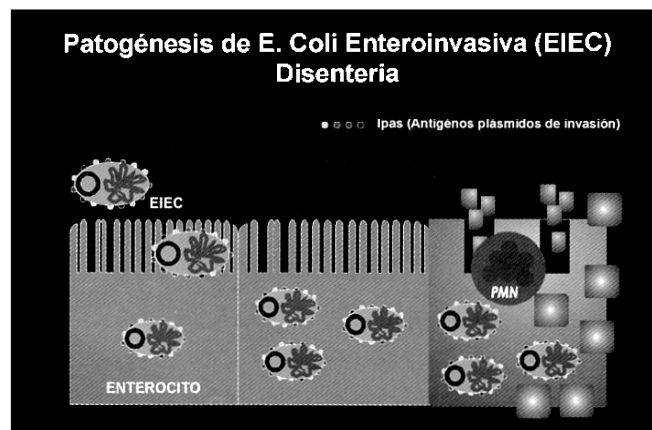
afinidad cefarosa); por otra parte, el eluato enriquecido por IgA resultó ser un inhibidor potente (Cámara *et al.*, 1994). Bajo nuestras condiciones de análisis, la fracción de calostro humano que contenían oligosacáridos no presentaba un efecto de inhibición a la adhesión bacteriana a las células Hep-2.

En los experimentos Western-Blotting (WB) con antígenos EPEC de membrana exterior, detectamos anticuerpos IgA en el calostro reactivos a varias proteínas de la membrana exterior de la EPEC. Todas las muestras de calostro y leche de nuestras pacientes reconocieron una banda kDa 94, consistente con el peso molecular de intimín. En estudios más recientes utilizando mutantes de *E. Coli* o construcciones peT como controles, observamos anticuerpos IgA de calostro reactivos a las proteínas principales asociadas al virus EPEC: Intimín, BfpA, EspA y EspB al igual que anticuerpos anti-Tir (Loureiro *et al.*, 1998, Adu-Bobie *et al.*, 1998, Sanchez *et al.*, 2000).

La persistencia de anticuerpos IgA anti-EPEC en el tracto gastrointestinal neonatal se mostró por la fuerte reactividad hacia intimín en el análisis WB en las heces de un infante de 5 días que se alimentaba al pecho, comparado con el calostro de su madre (Carbonare *et al.*, 1997).

El calostro humano contiene anticuerpos IgA reactivos a *E. Coli* 0111 LPS

Además de anticuerpos reactivos a las proteínas aso-



ciadas con el virus EPEC, también hemos buscado anticuerpos antilipolisacáridos en el calostro. El análisis de pares de madres (calostro y suero) y sus recién nacidos (cordón umbilical), detectamos anticuerpos IgA e IgM en muestras de calostro y en muestras de sangre, detectamos IgM e IgG que reconocen muchas bandas de *E. Coli* 0111 LPS. Anticuerpos IgA de calostro reconocieron diferentes bandas LPS comparado con los anticuerpos IgG de suero de los mismos individuos. Los análisis ELISA revelaron concentraciones más elevadas de anticuerpos antiendotoxina en muestras de calostro comparado con las muestras de suero de las mismas madres. Utilizando análisis WB y de enfoque isoeléctrico, demostrando claramente la transferencia por medio de la placenta de anticuerpos IgG anti LPS. (Nagao *et al.*, 1998 y 1999).

El calostro IgA humano puede inhibir la invasión de *Escherichia Coli* enteroinvasiva (EIEC) en las células Hep-2

Después de demostrar que el calostro humano ayuda a prevenir, *in vitro*, la adherencia de EPEC a las células epiteliales, decidimos investigar si pudiese también, inhibir una invasión celular por EIEC. El riesgo de exposición a EIEC continúa siendo alto en Sao Paulo, especialmente entre los habitantes de los barrios (Toledo & Trabulsi, 1990)

Al igual que *Shigella*, EIEC invade y se multiplica dentro de las células epiteliales y su habilidad para

invadir depende de la presencia de la codificación de una plasmida ~140 mDa para la producción de los polipéptidos de la membrana exterior asociados con el virus, conocidos como antígenos plásmidos de invasión: Ipa A (70 kDa), Ipa B (62 kDa), Ipa C (41 kDa), y Ipa D (37 kDa) (Hale *et al.*, 1985, Pal *et al.*, 1989).

En nuestro estudio, de 77 muestras de calostro reunidas de mujeres viviendo bajo condiciones de mala higiene, 73 (95.9%), pudieron prevenir la invasión de EIEC en células Hep-2 (Carbonare *et al.*, 1995). Los niveles de anticuerpos anti EIEC se midieron por medio de ELISA en estas muestras de calostro y los datos indican una buena relación entre los índices de anticuerpos y la actividad inhibitoria de invasión por bacteria. Además, se mostró que IgA en una columna de afinidad por cromatografía, perdió su efecto inhibitor. Los análisis de WB se llevaron a cabo utilizando extractos antigénicos de una sepa EIEC O29:H invasiva. Probamos muestras de calostro con alta actividad inhibitoria y otras asociadas de baja inhibición. Las proteínas de aproximadamente 78, 62,43 y 38 kDa, consistentes con Ipas A, B, C, y D, respectivamente, se reconocieron claramente por muestras de alta inhibición, mientras que no aparecieron bandas o aparecieron bandas muy ligeras en las manchas incubadas con muestras de baja inhibición. Los anti Ipas de anticuerpos IgA del calostro humano pudieran asociarse a la protección contra la invasión EIEC.

IgA del calostro humano puede inhibir la invasión en células Hep-2 por E. Coli enteroagregada (EAggEC)

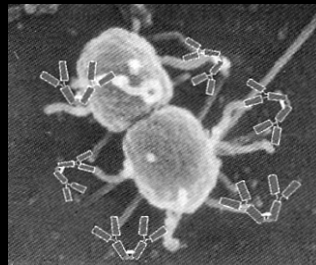
Hace poco tiempo, observamos la actividad inhibitoria *in vitro* del calostro humano de las mismas madres en contra de sepas de *Escherichia Coli* enteroagregada (EAggEC) (Carbonare *et al.*, 1999). Esta inhibición es mediada por anticuerpos IgA reactivos a la proteína de la membrana externa de EAggEC. Las muestras con mayor actividad inhibitoria contienen anticuerpos IgA reactivos a una adhesina de EAggEC llamada funbria adhesina agregativa (AAF-II), mientras que los anticuerpos de la misma especificidad se observaron en muestras de inhibición nula o baja. EAggEC ha sido reconocido como un enteropatógeno importante y común que causa diarrea persistente y la desnutrición en infantes brasileños (Wanke *et al.*, 1991).

El calostro humano inhibe la adhesión a células Hep-2 de la toxina tipo Shiga que produce E. Coli (STEC)

Los resultados preliminares indican que las muestras reunidas de madres viviendo en Sao Paulo presentaron anticuerpos reactivos a componentes de la sepa STEC y que son capaces de inhibir en gran medida, la adhesión de STEC a las células Hep-2, en niveles equivalentes como las de la inhibición observada en sepas EPEC.

Mecanismos principales de la protección mediada por la IgA de la leche humana contra infecciones diarreicas causadas por E. Coli:

1. Inhibición de adherencia e invasión bacteriana en las células apiteliales, al neutralizar las adhesinas, inasinas y proteínas señaladoras de células asociadas con este virus.
2. Reducción en la absorción de LPS
3. Oponización de bacteria ingerida y destruida por los fagocitos mononucleares presentes en el calostro durante la primera semana de lactancia.



ENTEROCITO

Sin embargo, el calostro no neutralizó el efecto citotóxico de STx1 y STx2 en células Vero (Palmeira *et al.*, datos no publicados). Anteriormente, se le llamaba EHEC (E. coli enterohemorrágico) a STEC.

Calostro de una puerpera saludable deficiente en IgA puede inhibir la adhesión de EPEC y la invasión por EIEC en células Hep-2

Entre las madres estudiadas, encontramos una con deficiencia de IgA (suero de IgG normal, IgG subclase y niveles IgM y niveles IgA no detectables). Lo sorprendente es que su calostro inhibía ambas, la adherencia de EPEC y la invasión por EIEC a las células Hep-2 en niveles equivalentes a los de un control normal.

Al medir los niveles de inmunoglobulina en sus muestras de calostro, encontramos concentraciones de IgM mucho más elevadas que las de madres normales. En los análisis WB, sus anticuerpos IgM reconocían las mismas bandas de EPEC y de EIEC como lo hacen los anticuerpos IgA de las muestras de calostro normal.

Ya hemos descrito previamente los altos niveles de IgM en otra puerpera deficiente en IgA, lo cual pudiera representar un fenómeno de compensación por la deficiencia de IgA (Barros *et al.*, 1985).

El IgA del calostro actúa como la opsonina para destruir EPEC por medio de fagocitos mononucleares del calostro

Debido a que el calostro humano contiene grandes cantidades de leucocitos viables, también estudiamos la habilidad de los fagocitos mononucleares para destruir EPEC opsonizados. Aún cuando la función de opsonización de los anticuerpos IgA es todavía controversial en la literatura, demostramos que el IgA purificado proveniente de muestras de calostro, puede opsonizar EPEC al inducir la destrucción de bacterias por fagocitos mononucleares del calostro (Honorio-Franca *et al.*, 1997). Se redujo el efecto opsonizante del calostro deficiente en IgA de manera importante mientras que el mismo calostro deficiente en IgG y en C3, mantuvo su habili-

dad opsonizante. La actividad opsonizante de los anticuerpos IgA se eliminó cuando las células mononucleares fueron incubadas con anterioridad con un anticuerpo monoclonal IgM (My43) contra receptores alfa Fe.

La destrucción de bacterias por medio de fagocitos mononucleares del calostro después de la opsonización por medio de SigA pudiera representar un mecanismo adicional de protección por lactancia materna en contra de infecciones intestinales durante la primer semana de vida. También pudiera actuar como un mecanismo de control en contra de la colonización microbial del intestino neonatal durante el período prenatal.

A partir de estas observaciones, podemos concluir que los mecanismos principales de la protección mediante la IgA de la leche humana, en contra de infecciones causadas diarreicas por E. Coli, son las siguientes:

Estos datos apoyan la relevancia de las prácticas de amamantar para mejorar las condiciones de salud de los infantes, especialmente aquellos viviendo bajo condiciones de mala higiene y salud en los países en vías de desarrollo.

Reconocimientos

Quisiera agradecer a mis colegas: Dra, Solange B. Carbonare, Dra. Aparecida T. Nagao, Dra. Adenilda Honório Franca, Dra. Ivana Loureiro, Dra. Rocelice Fernández, Marcia T. Delneri, Patricia Palmeira, Dra. Sonia Ramos, Dr. Gad Frankel y al Profesor Dr. Luiz R. Trabulsi. Este trabajo ha sido apoyado por FAPESP (Fundación de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo) y por el CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Bibliografía

1. **Jason JM, Nieburg P, Marks JS.** Mortality and infectious diseases associated with infant feeding in developing countries. *Pediatrics* 74 (Suppl): 702-727, 1984.
2. **Victoria CG, Vaughan JP, Lombardi C, Fuchs**

- SM, Gigante LP, Smith PG, Noble LC, Teixeira AMB, Moreira LB, Barros FC.** Evidence for protection by breast-feeding against infant deaths from infectious diseases in Brazil. *Lancet II*: 319-322, 1987.
3. **Carlsson B, Hanson LA.** Immunologic effects of breast-feeding on the infant In: P Ogra, ME Lamm, W Strober, JR McGhee, J Bienestock (eds) *Handbook of Mucosal Immunology*. Academic Press, London, 653-66, 1994.
 4. **Blake PA, Ramos SM, MacDonald L, Rassi V, Gomez TT, Ivey C, Bean NH, Trabulsi LR.** Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrhea in urban Brazilian infants. *J. Infect. Dis.* 167: 627-632, 1993.
 5. **Hanson LA, Brandtzaeg P.** Secretory antibody systems. In: E.R. Stiehm (ed.) *Immunologic Disorders in Infants and Children*, W.B. Saunders Philadelphia, 107-126, 1973.
 6. **Barrus MD, Carneiro-Sampaio MMS.** Milk composition of lowbirth weight infant mothers. *Acta Paediatr. Scand.* 73: 693-5, 1984.
 7. **Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS, Lamm ME.** Three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunology Today* 14: 430-5, 1993.
 8. **Craviotto A, Tello A, Villafan H, Ruiz J, Vedovo S, Nesser JR.** Inhibition of localized adhesion of Enteropathogenic Escherichia coli to Hep-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J. Infect Dis.* 163: 1247-1255, 1991.
 9. **Kunz C, Rudloff S.** Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr* 82: 903-912, 1993.
 10. **Gomes TAT, Rossi V, MacDonald KL, Ramos SRTS, Trabulsi LR, Vieira MAM, Guth BEC, Candeias JAN, Ivey C, Toledo MRF, Blake PA.** Enteropathogens associated with acute diarrhea disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil. *J. Infect Dis.* 164: 331-7, 1991.
 11. **Knutton S, Lloyd DR, McNeish AS.** Adhesion of Enteropathogenic Escherichia coli to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun* 55: 69-77, 1987.
 12. **Donneberg MS, Kaper JB, Finlay B.** Interactions between enteropathogenic Escherichia coli and host epithelial cells. *Trends in Microbiology* 5: 109-114, 1997.
 13. **Girón JA, Ho ASY, Schoolnik GK.** An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli. *Science* 254: 710-3, 1991.
 14. **Law D.** Adhesion and its role in the virulence of Enteropathogenic Escherichia coli. *Clin. Microbial. Rev.* 7: 152-73, 1994.
 15. **Silva MLM, Giampaglia CMS.** Colostrum and human milk inhibit localized adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. *Acta Paediatr. Scand.* 81: 266-7, 1992.
 16. **Cámara LMC, Carbonare SB, Silva MLM, Carneiro-Sampaio MMS.** Inhibition of Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) outer membrane proteins, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152: 307-10, 1994.
 17. **Delneri MT, Carbonare SB, Palmeira P, Silva MLM, Carneiro-Sampaio MMS.** Inhibition of Enteropathogenic Escherichia coli to Hep-2 cells by colostrum and milk from mothers of low-birth-weight infants. *Eur J Pediatr* 156: 493-8, 1997.
 18. **Loureiro L, Frankel G, Adu-Bobie J, Dougan G, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MMS.** Human colostrum contains IgA antibodies reactive to Enteropathogenic Escherichia coli virulence-associated proteins: Intimin, BfpA and EspB. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 27: 166-71, 1998.
 19. **Adu-Bodie J, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MMS, Dougan G, Frankel G.** Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin alpha and beta from Enteropathogenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* 65: 320-6, 1998.
 20. **Sanchez MI, Keller R, Hartland EI, Figueredo DMM, Batchelor M, Martinez MB, Dougan G, Carneiro-Sampaio MMS, Trabulsi LR, Frankel G.** Human colostrum and serum contain antibodies reactive to the intimin-binding region of the Enteropathogenic Escherichia coli. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30: 73-7, 2000.
 21. **Carbonare SB, Silva MLM, Palmeira P, Carneiro-Sampaio MMS.** Human colostrum IgA antibodies react to Enteropathogenic Escherichia coli antigens and their persistence in the faeces of a breast-fed infant. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 15: 53-8, 1997.