



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MARA DE MOURA GONDIM PRATA**

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO E TIPOS DE MORTE  
CELULAR NA LESÃO INDUZIDA PELA *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA E  
SUA MODULAÇÃO POR ALANIL-GLUTAMINA E BETACAROTENO**

**FORTALEZA**

**2013**

MARA DE MOURA GONDIM PRATA

AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO E TIPOS DE MORTE NA  
LESÃO INDUZIDA PELA *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA E SUA  
MODULAÇÃO POR ALANIL-GLUTAMINA E BETACAROTENO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para à obtenção do Título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia

**Orientador:** Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
**Coorientador:** Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

FORTALEZA

2013

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

---

P924a Prata, Mara de Moura Gondim.  
Avaliação dos mecanismos de proliferação e tipos de morte celular na lesão induzida pela Escherichia coli enteroagregativa e sua modulação por alanil-glutamina e betacaroteno. / Mara de Moura Gondim Prata. – 2013.  
118f.: il. color., enc.; 30 cm.

Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.

Co-orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

1. Escherichia coli. 2. Proliferação de Células. 3. Apoptose. 4. Necrose. I. Título.

MARA DE MOURA GONDIM PRATA

AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO E TIPOS DE MORTE NA  
LESÃO INDUZIDA PELA *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA E SUA  
MODULAÇÃO POR ALANIL-GLUTAMINA E BETACAROTENO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina e Fisioterapia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para à obtenção do Título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em: 15/02/2013

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá (orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr<sup>ª</sup>. Ila Fernanda Nunes Lima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Às minhas queridas mãe e irmã, por seu amor e compreensão, que me deram forças para a realização desse curso.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que me iluminou durante esta jornada.

À minha mãe Mirna de Moura Gondim, em quem eu desejo sempre me espelhar, obrigada por minha existência, carinho e força.

À minha irmã Aglais Cristina Gondim Tabosa Freire, por sempre acreditar em mim e estar comigo nos momentos de alegrias e de tristezas.

Quero também agradecer à minha família que me ajudou, de forma especial, sempre me encorajando para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Ao meu namorado Sávio Pinho Nunes, por estar ao meu lado sempre que eu precisei, com muito amor e compreensão, e também por ter ajudado na formação desta dissertação.

Ao professor Alexandre Havt Bindá, por toda a paciência na orientação (principalmente durante meus desvios), amizade, dedicação e incentivo, que tornaram possível esta dissertação.

Ao professor Aldo Ângelo Moreira Lima, agradeço pela oportunidade, por ter me aceito como integrante do seu grupo de laboratório, pelos ensinamentos e pela paciência.

Aos meus companheiros de laboratório, Paloma Cavalcante, Vinícios Alves e Pedro Henrique, obrigado por todo conhecimento, apoio, amizade, paciência, todo suporte experimental e não experimental e companhia nos momentos de cafezinho.

À doutoranda em farmacologia, Josiane da Silva Quetz, obrigada por sempre estar disposta a ajudar, mesmo nos tempos de atribulações, principalmente nos ensaios de citometria, por toda a sua alegria e sabedoria.

À Dra. Ila Fernanda Nunes, por todos os ensinamentos e discussões experimentais, que ajudaram na melhoria deste trabalho.

À Dra. Eunice Bobô de Carvalho pelo seu apoio e conhecimento em cultura de células.

Ao José Amadeus, por sempre dar “seu jeitinho”, para consertar os equipamentos que se quebram no laboratório e realizar serviços gerais, permitindo, assim, que todos os trabalhos sejam concretizados, além da companhia nos momentos de cafezinho.

Às técnicas Terezinha, Luciana França, Charliene Melo, Verônica Silva e Conceição Nogueira, por todo auxílio na organização do laboratório.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os meus amigos e ao pessoal do UPC-IBIMED, que contribuíram de forma direta e indireta, para que este trabalho fosse realizado. Enfim, sem vocês, nada disso seria possível.

“A ciência nunca resolve um problema sem  
criar pelo menos outros dez”

(George Bernard Shaw)



## RESUMO

A *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) está entre os mais importantes agentes associados às doenças diarreicas persistentes (DP) e mostrou-se prevalente em estudos na população infantil em comunidades carentes da cidade de Fortaleza. A EAEC causa lesão e inflamação intestinal levando a DP e, quando associada à desnutrição, pode ocasionar um déficit cognitivo e redução do crescimento infantil. Este estudo analisou *in vitro* (IEC-6 e HEp-2), o papel da alanil-glutamina (AG) e do betacaroteno nos mecanismos de proliferação, apoptose e necrose e em resposta a lesão intestinal induzida por uma cepa EAEC selvagem (LDI001), uma cepa controle EAEC 042 e uma cepa de *E. coli* HS comensal. A cepa LDI001 foi isolada de uma criança desnutrida. Na viabilidade celular houve uma redução significativa ( $p < 0.05$ ) pós-infecção com as EAECs nas concentrações de  $10^5$  UFC/mL nos tempos de 12, 24 e 48 horas. Contudo, a cepa comensal apenas alterou no tempo tardio (48h). As células lesionadas por EAEC diminuíram a transcrição ( $p < 0.05$ ) do mRNA dos genes c-jun e c-fos e, apenas tardiamente (12h), com a cepa comensal. A apoptose celular aumentou ( $p < 0.05$ ) após a infecção com todas as cepas em 24h. Porém, o dano persistiu elevado apenas nas células tratadas com as cepas de EAEC. A cepa 042 aumentou as células necróticas ( $p < 0.05$ ) em todos os tempos, embora a LDI001 causou o dano apenas em 24h. Todas as células infectadas sofreram aumento da transcrição ( $p < 0.05$ ) de caspase 8 em 12h. Houve aumento transcricional ( $p < 0.05$ ) de NF- $\kappa$ B em 12h nas células infectadas. Enquanto os níveis de transcrição de IL-8 foram altos imediatamente ao término da infecção (0h) e houve redução em 12h. A LDI001 causou redução da viabilidade celular vinculada à sua ação apoptótica. A EAEC 042 induziu danos tanto pela apoptose como a necrose celular. A cepa comensal mostrou um perfil diferenciado das outras cepas provavelmente por não apresentar genes de virulência. A suplementação com AG 1mM foi capaz de aumentar a proliferação celular ( $p < 0.05$ ) associado a redução da apoptose e necrose ( $p < 0.05$ ) nas células pós-infectadas nos tempos de 12, 24 e 48h. Contudo, a presença de AG 1mM nas células infectadas não alterou os baixos níveis transcricionais de c-jun e c-fos promovidos pela infecção, e não conseguiu bloquear a transcrição significativa ( $p < 0.05$ ) de caspase 8. Os níveis de transcrição de NF- $\kappa$ B ainda permaneceu aumentado ( $p < 0.05$ ) na presença de AG em células pós-infectadas no tempo de 12h. Percebeu-se a contínua redução temporal da transcrição de IL-8 não estava associada ao tratamento das células infectadas com AG 1mM. A suplementação com AG obteve efeitos positivos na proteção epitelial contra os danos causados pela infecção das cepas tanto nos processos proliferativos quanto na inibição de morte celular. Contudo, a alanil-glutamina não bloqueou a transcrição de caspase 8 podendo sua função antiapoptótica estar relacionada a outra via de ação no presente modelo em estudo. O tratamento com betacaroteno promoveu a reversão do dano na viabilidade celular significativa ( $p < 0.05$ ) apenas em 24h após infecção. Enquanto a presença do betacaroteno em células pós-infectadas com EAEC selvagem causou aumento de apoptose e necrose ( $p < 0.05$ ) em 48h. Células infectadas tratadas com betacaroteno não aumentaram os níveis de c-jun e c-fos e também não conseguiram bloquear a transcrição de caspase 8 e aumentaram ( $p < 0.05$ ) os níveis de caspase 3 no tempo de 12h. O betacaroteno mostrou-se potencialmente lesivo às células causando morte celular, provavelmente, relacionado aos seus efeitos prooxidantes.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli* enteroagregativa. Alanil-glutamina. Betacaroteno. Proliferação. Apoptose. Necrose.

## ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is among the most important agents associated with persistent diarrhea (DP) and was prevalent in studies in children in poor communities in the city of Fortaleza. EAEC cause intestinal injury and inflammation leading to DP and, when combined with malnutrition, can cause a cognitive deficit and infant growth impairment. The current study examined *in vitro* (IEC-6 and HEp-2) intestinal pathophysiology of three strains: EAEC wild type, EAEC 042 (positive control) and non-pathogenic *E.coli* HS as well as the role of alanyl-glutamine (AG) and beta-carotene in the mechanisms of proliferation, apoptosis and necrosis in response to the injury caused by EAEC strains. The wild type strain was isolated from a malnourished child. Intestinal cells viability assay in showed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) after post-infection with EAEC strains at concentrations of  $10^5$ UFC/mL in 12, 24 and 48 hours. However, the *E.coli* HS only changed the intestinal cell viability after 48 hours. EAEC post-infected intestinal cells presented mRNA transcription decrease ( $p < 0.05$ ) of c-jun and c-fos at the period of zero, 6 and 12 hours after infection was terminated, but *E.coli* HS showed this decrease only after 12h of infection. Intestinal cell apoptosis increased after infection by all strains 24h of infection. However, the cell damage remained intense in the cells treated only with EAEC strains. EAEC 042 increased cell necrosis ( $p < 0.05$ ) in all evaluated periods, but the wild type strain caused damage with only at the period of 24h. All infected cells had a mRNA transcription increase of caspase 8 gene ( $p < 0.05$ ) in 12h. NF- $\kappa$ B mRNA transcription increase ( $p < 0.05$ ) was seen in infected cells only in the period of 12h. While transcription levels of IL-8 were extremely high immediately after the infection was interrupted (0h), that was a drastic reduction at 12h after the end of infection. The wild type strain caused a reduction in cell viability linked apoptosis. However, EAEC 042 induced this decrease as also cellular necrosis. *E. coli* HS showed a different infection profile probably because its lack of virulence genes. AG 1mM supplementation was able to enhance cell proliferation ( $p < 0.05$ ) associated with apoptosis and necrosis reduction ( $p < 0.05$ ) in post-infected cells at the periods of 12, 24 and 48h. However, the presence of AG 1mM in infected cells did not affect the mRNA transcription low levels of c-jun and c-fos as seen after EAEC infection, and failed to block caspase 8 mRNA transcription increase ( $p < 0.05$ ). The IL-8 mRNA transcription temporal reduction was not associated with AG treatment in post-infected cells. Supplementation with AG had positive effects on epithelial protection against damage caused by both EAEC strains in proliferation assay and inhibition of cell death. However, since caspase 8 mRNA transcription decrease was not observed after AG treatment, AG anti-apoptosis feature could be probably related to another mechanism. Beta-carotene cell damage reversal on cell viability assay was statistical significant ( $p < 0.05$ ) 24 hours after infection was ended. Beta-carotene caused 48h apoptosis and necrosis ( $p < 0.05$ ) in wild type strain post-infected cells. Infected cells treated with beta-carotene could not block c-jun and c-fos mRNA transcription reduction and also failed to inhibit caspase 8 mRNA transcription, but beta-carotene itself increased levels of caspase 3 at the period of 12h after infection. Beta-carotene was shown to be potentially harmful to intestinal cells causing cell death probably related to its pro-oxidant effects.

**Keywords:** *Escherichia coli* enteroagregativa. Alanyl-glutamine. Beta-carotene. Proliferation. Apoptosis. Necrosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema de estimulação microbiana na mucosa epitelial.....	25
Figura 2 -	Estrutura química da glutamínia.....	27
Figura 3 -	Funções da glutamínia.....	28
Figura 4 -	Estrutura química da alanil-glutamínia.....	29
Figura 5 -	Estrutura química do betacaroteno.....	30
Figura 6 -	Produtos das clivagens centrais e excêntrica de $\beta$ -caroteno.....	31
Figura 7 -	Células IEC-6 vistas em microscópio óptico invertido no aumento de 100x.....	36
Figura 8 -	Células HEP-2 vistas em microscópio óptico invertido no aumento de 100x.....	36
Figura 9 -	Redução do composto tetrazólico (WST-1) á formazan pelas enzimas mitocondriais em células metabolicamente ativas.....	43
Figura 10 -	Representação esquemática da cronologia (linha do tempo) dos procedimentos experimentais utilizados no presente estudo.....	48
Figura 11 -	Padrão de aderência das cepas de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativas coradas com May-Grunwald-Giemsa em células HEP-2.....	51
Figura 12 -	Detecção dos genes de diagnóstico de cepas diarreiogênicas de <i>E. coli</i> .....	52
Figura 13 -	Detecção dos genes de virulência das cepas de EAEC .....	53
Gráfico 1 -	Avaliação da viabilidade celular intestinal no tempo de 24 horas, após 3 horas de infecção com inóculos das cepas de <i>E.coli</i> nas concentrações de $10^3$ - $10^7$ UFC/mL para determinação da melhor concentração bacteriana escolhida.....	54
Gráfico 2 -	Curva tempo-efeito das cepas bacterianas com a concentração de $10^5$ UFC/mL na viabilidade celular intestinal após 12, 24 e 48 horas do término da infecção.....	55
Gráfico 3 -	Curva tempo-efeito das cepas bacterianas sobre a transcrição relativa dos genes c-jun (A) e c-fos (B) avaliados ao término da infecção (0h) e após 6 e 12h.....	57
Gráfico 4 -	Curva tempo-efeito das cepas bacterianas na avaliação do percentual de apoptose de células intestinais após 12, 24 e 48 horas do término da infecção.....	58
Gráfico 5 -	Curva tempo-efeito das cepas bacterianas na avaliação do percentual de necrose de células intestinais após 12, 24 e 48 horas do término da infecção.....	59

Gráfico 6 -	Curva tempo-efeito das cepas bacterianas sobre a transcrição relativa dos genes caspase 8 (A), caspase 9 (B) e caspase 3 (C) avaliados ao término da infecção (0h) e após 6 e 12h.....	60
Gráfico 7 -	Curva tempo-efeito das cepas bacterianas sobre a transcrição relativa dos genes TGF- $\beta$ (A), NF- $\kappa$ B (B) e IL-8 (C) avaliados ao término da infecção (0h) e após 6 e 12h.....	62
Gráfico 8 -	Avaliação da proliferação celular intestinal no tempo de 24 horas nas concentrações de 0,3 a 30 mM de AG.....	63
Gráfico 9 -	Curva tempo-efeito da AG 1mM na avaliação da proliferação das células intestinais por 12, 24 e 48 horas.....	64
Gráfico 10 -	Transcrição relativa dos genes c-jun (A) e c-fos (B) em células IEC-6 suplementadas com AG 1mM avaliados em 6 e 12h.....	65
Gráfico 11 -	Curva tempo-efeito da AG 1mM na avaliação da morte celular por apoptose (A) e necrose (B), em células intestinais nos tempos de 12, 24 e 48 horas.....	66
Gráfico 12 -	Transcrição relativa dos genes de caspase 8 (A), caspase 9 (B) e caspase 3 (C) em células IEC-6 suplementadas com AG 1mM avaliados em 6 e 12h.....	68
Gráfico 13 -	Transcrição relativa dos genes TGF- $\beta$ (A), NF- $\kappa$ B (B) e IL-8 (C) em células IEC-6 suplementadas com AG 1mM avaliados em 6 e 12h.....	70
Gráfico 14 -	Avaliação da proliferação celular intestinal no tempo de 24 horas nas concentrações de 0,3 a 30 $\mu$ M do $\beta$ -caroteno.....	71
Gráfico 15 -	Curva tempo-efeito de $\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M na avaliação da proliferação das células intestinais por 12, 24 e 48 horas.....	72
Gráfico 16 -	Transcrição relativa dos genes c-jun(A) e c-fos (B) em células IEC-6 suplementadas com $\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M avaliados em 6 e 12h.....	73
Gráfico 17 -	Curva tempo-efeito de $\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M na avaliação da morte celular por apoptose (A) e necrose (B), em células intestinais nos tempos de 12, 24 e 48 horas.....	74
Gráfico 18 -	Transcrição relativa dos genes de caspase 8 (A), caspase 9 (B) e caspase 3 (C) em células IEC-6 suplementadas com $\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M avaliados em 6 e 12h.....	75
Gráfico 19 -	Transcrição relativa dos genes TGF- $\beta$ (A), NF- $\kappa$ B (B) e IL-8 (C) em células IEC-6 suplementadas com $\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M avaliados em 6 e 12h.....	77
Gráfico 20 -	Curva tempo-efeito da proliferação celular avaliada após os tempos de 12, 24 e 48h com tratamento de AG 1mM em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC.....	78
Gráfico 21 -	Transcrição relativa dos genes c-jun (A) e c-fos (B) avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de AG 1mM em células IEC-6 ao	

	término da infecção de 3h com EAEC.....	80
Gráfico 22 -	A curva tempo-efeito de apoptose (A) e necrose (B) avaliados após os tempos de 12, 24 e 48h com o tratamento de AG 1mM em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC.....	82
Gráfico 23 -	O tempo-efeito sobre a transcrição relativa dos genes de caspase 8 (A), caspase 9 (B) e caspase 3 (C) avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de AG 1mM em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC.....	84
Gráfico 24 -	O tempo-efeito sobre a transcrição relativa dos genes TGF- $\beta$ (A), NF- $\kappa$ B (B) e IL-8 (C) avaliados após os tempos de 6 e 12h após o tratamento de AG 1mM em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC.....	86
Gráfico 25 -	Curva tempo-efeito da proliferação celular avaliada após os tempos de 12, 24 e 48h com tratamento de $\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC.....	87
Gráfico 26 -	O tempo-efeito sobre a transcrição relativa dos genes c-jun (A) e c-fos (B) avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de $\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC.....	88
Gráfico 27 -	A curva tempo-efeito de apoptose (A) e necrose (B) avaliados após os tempos de 12, 24 e 48h com o tratamento de $\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC.....	90
Gráfico 28 -	Transcrição relativa dos genes caspase 8 (A), caspase 9 (B) e caspase 3 (C) avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de $\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC.....	92
Gráfico 29 -	O tempo-efeito sobre a transcrição relativa dos genes TGF- $\beta$ (A), NF- $\kappa$ B (B) e IL-8 (C) avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de $\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC.....	94
Quadro 1 -	Resultados dos testes do kit API 20E® utilizados para caracterização bioquímica das três cepas de E. coli em estudo.....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Genes de virulência da EAEC.....	22
Tabela 2 -	Genes de diagnóstico relacionados com as <i>Escherichia coli</i> diarréiogênicas, iniciadores utilizados e tamanhos dos produtos obtidos.....	38
Tabela 3 -	Genes de virulência relacionados com <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa, iniciadores utilizados e tamanhos dos produtos obtidos. ....	39
Tabela 4 -	Sequência de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados...	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$	Microlitro
AA	Aderência agregativa
AG	L-Alanil-L-Glutamina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
cDNA	Ácido desoxirubonucléico complementar
DMEM	Meio de <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirubonucléico
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
Gln -	Glutamina negativa
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
h	hora
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolissacarídeo
MEM	Meio de Eagle modificado
min	minuto
mL	Mililitro
mM	milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF- $\kappa\text{B}$	Fator de transcrição nuclear Kappa B
PBS	Tampão fosfato salina ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
TLR5	Receptor toll like 5
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade formadora de colônia
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1</b>	<b>A importância das doenças diarreicas.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>Escherichia coli enteroagregativa (EAEC).....</b>	<b>20</b>
<b>1.3</b>	<b>Proliferação e morte celular do epitélio intestinal.....</b>	<b>23</b>
<b>1.4</b>	<b>A importância dos nutrientes nas doenças diarreicas.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Glutamina e alanil-glutamina.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Betacaroteno.....</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Reagentes e materiais.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Cepas bacterianas.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.2</b>	<b>L-Alanil-L-glutamina e betacaroteno.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Linhagens celulares.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Protocolos experimentais.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Diagnostico bioquímico para identificação de E. coli.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2.2</b>	<b>A extração do DNA das colônias de E.coli.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Diagnostico molecular por multiplex-PCR para identificação da cepa de E. coli enteroagregativa (EAEC).....</b>	<b>37</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Preparação para o inóculo.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Preparação do nutriente.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Conservação, preparação e contagem celular.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Padrão de aderência bacteriano.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.8</b>	<b>Proliferação e viabilidade celular.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.9</b>	<b>Análise de apoptose e necrose por citometria de fluxo.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.10</b>	<b>Avaliação da transcrição gênica.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.10.1</b>	<b>Extração do RNA total.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.10.2</b>	<b>Síntese de cDNA.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.10.3</b>	<b>PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....</b>	<b>46</b>
<b>4.3</b>	<b>Linha do tempo do procedimento experimental.....</b>	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização das cepas E.coli utilizadas.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Avaliação bioquímica cepas E.coli.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Avaliação do padrão de aderência das cepas E.coli.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Caracterização molecular das cepas de E.coli.....</b>	<b>52</b>
<b>5.2</b>	<b>Efeito das cepas EAEC e da E.coli HS na monocamada das células intestinais.....</b>	<b>53</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Viabilidade celular.....</b>	<b>53</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Transcrição de genes relacionados à viabilidade celular.....</b>	<b>56</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Morte celular.....</b>	<b>58</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Transcrição de genes relacionados à apoptose celular.....</b>	<b>59</b>



5.2.5	<i>Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune inata.....</i>	61
5.3	<b>Efeito da L-alanil-L-glutamina (AG) na monocamada das células intestinais.....</b>	63
5.3.1	<i>Proliferação celular.....</i>	63
5.3.2	<i>Transcrição de genes relacionados à proliferação celular.....</i>	64
5.3.3	<i>Morte celular.....</i>	65
5.3.4	<i>Transcrição de genes relacionados à apoptose celular.....</i>	67
5.3.5	<i>Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune inata.....</i>	69
5.4	<b>Efeito do betacaroteno (<math>\beta</math>-caroteno) na monocamada das células intestinais.....</b>	71
5.4.1	<i>Proliferação celular.....</i>	71
5.4.2	<i>Transcrição de genes relacionados à proliferação celular.....</i>	72
5.4.3	<i>Morte celular.....</i>	73
5.4.4	<i>Transcrição de genes relacionados à apoptose celular.....</i>	74
5.4.5	<i>Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune inata.....</i>	76
5.5	<b>Efeitos da suplementação da l-Alanil-l-Glutamina (AG) sobre lesão provocada pela EAEC em monocamada de células epiteliais intestinais.....</b>	78
5.5.1	<i>Proliferação celular.....</i>	78
5.5.2	<i>Transcrição de genes relacionados à proliferação celular.....</i>	79
5.5.3	<i>Morte celular.....</i>	81
5.5.4	<i>Transcrição de genes relacionados à apoptose celular.....</i>	83
5.5.5	<i>Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune inata.....</i>	85
5.6	<b>Efeitos da suplementação de betacaroteno (<math>\beta</math>-caroteno) sobre lesão provocada pela EAEC em monocamada de células epiteliais intestinais.....</b>	87
5.6.1	<i>Proliferação celular.....</i>	87
5.6.2	<i>Transcrição de genes relacionados à proliferação celular.....</i>	87
5.6.3	<i>Morte celular.....</i>	89
5.6.4	<i>Transcrição de genes relacionados à apoptose celular.....</i>	91
5.6.5	<i>Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune inata.....</i>	93
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	95
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	106
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	107
	<b>APÊNDICE.....</b>	117

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A importância das doenças diarreicas

As doenças diarreicas constituem um importante problema de saúde no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. Desde meados do século XX, a partir do advento da terapia de reidratação oral, os índices de mortalidade relativos a essas doenças continuam declinando, não obstante a taxa de morbidade não ter sofrido redução (KOSEK *et al.*, 2003; LAMBERTI; WALKER; BLACK, 2012). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005), as doenças diarreicas, ao lado das doenças respiratórias, representam uma das principais causas de anos de vida saudável perdidos seja por morte prematura, seja por incapacidade (DALY: disability associated life years).

No Brasil, a diarreia foi responsável por 32.704 óbitos de crianças menores de 1 ano de idade em 1980, diminuindo para 1.988 (- 93,4%) em 2005. Contudo, a proporção de mortes por diarreia na região Nordeste (5,1%) ainda é 3 vezes maior quando comparada ao Sudeste (1,8%) entre os anos de 2003 e 2005 (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008; BRASIL, 2009). Em 2008, houve 44 mil óbitos em menores de um ano de idade, enquanto as diarreias foram responsáveis por 1.118 óbitos (equivalente a 2,5%) (BRASIL, 2011).

Em estudo prospectivo coorte realizado na população infantil de uma comunidade pobre de Fortaleza, verificou-se que a desnutrição está associada a um maior risco de doenças diarreicas persistentes (DP) ( $\geq 14$  dias de duração), que representam 8% dos episódios e 34% dos dias de diarreia (LIMA *et al.* 2000). Consequente, mostra a importância do ciclo diarreia-desnutrição infantil que tem sido objeto de relato por diversos estudiosos da matéria, de modo a constatar que o baixo estado nutricional anterior e posterior à infecção está intimamente relacionado à frequência e à duração da diarreia.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2005), a síndrome da diarreia é caracterizada por três ou mais evacuações líquidas por dia. As causas da diarreia são múltiplas podendo ser de cunho infeccioso ou não infeccioso. No curso dessa doença podem ocorrer anormalidades no transporte de água e eletrólitos, diminuição na capacidade absorptiva e falta de regeneração da morfologia da mucosa no trato gastrointestinal inferior. Desta forma, esses eventos causam importantes alterações na homeostasia intestinal (FIELD, 2003). Os resultados do processo diarreico podem apresentar-se como um quadro clínico discreto e

também evoluir para repercussões sistêmicas mais graves como febre, vômitos, desidratação e até o óbito, principalmente na presença de desnutrição (HUANG *et al.* 2006).

As DP apresentam um alto impacto nas taxas de mortalidade e morbidade da população infantil no Brasil assim como em outros países em desenvolvimento, sendo responsáveis por mais de 50% das mortes por diarreias (ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011). Estudos mostram também que 3 a 20% dos episódios de diarreia aguda em crianças menores de cinco anos tornam-se persistentes (ANDRADE; MOREIRA; FAGUNDES-NETO, 2000).

A identificação dos fatores de risco relacionados ao paciente em que o processo diarreico se perpetua é de grande valia. Assim, verificou-se que os agentes enteropatogênicos mais frequentemente diagnosticados em fezes de crianças com DP são subtipos de *Escherichia coli* diarreio gênicas (ECD) e espécies de *Klebsiella* e *Cryptosporidium* (NATARO; KAPER, 1998; BALLESTER; ESCOBAR; GRISI, 2002).

Os subtipos de ECD apresentam características clínicas, patogênicas e epidemiológicas distintas. Entretanto, possuem a capacidade de partilhar plasmídios de virulência entre si. A caracterização dos diferentes subtipos pode ser feita pela identificação dos seus grupos clonais através de técnicas sorológicas que definem os sorogrupos pelos antígenos O (lipopolissacarídeo) e H (flagelar) (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Atualmente as ECD são classificadas em 6 patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica ou produtora de toxina shiga (EHEC/STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPPER, 1998).

A *E. coli* enteroagregativa (EAEC) é um importante patógeno entérico causador de diarreias persistentes em diversas partes do mundo (BHAN *et al.*, 1989; STEINER *et al.*, 1998). Nos últimos anos, a EAEC está sendo cada vez mais associada aos surtos diarreicos, assim como o ocorrido na Europa em 2011, onde aproximadamente 4000 pessoas foram afetadas (incluindo 50 óbitos), após a ingestão de brotos contaminados por uma EAEC que adquiriu genes produtores de toxina shiga a partir de uma cepa de STEC e ainda apresentava enzima beta-lactamase de espectro ampliado (FRANK *et al.*, 2011; WHO, 2011)

## 1.2 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

A EAEC foi descrita pela primeira vez em 1987 e é definida como uma categoria de ECD que adere a monocamada de células epiteliais humanas (HEp-2) em forma de um padrão denominado de adesão enteroagregativa ou na forma de “tijolos empilhados” (“*stacked-brick*”) característica da presença do fenótipo aderente agregador (AA). Além disso, diferente das cepas padrão de *E. coli*, a cepa EAEC não apresenta a capacidade de secretar enterotoxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST) (NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998).

Após sua descoberta, vários estudos epidemiológicos têm associado EAEC com as doenças diarreicas em vários locais, tanto em países em desenvolvimento quanto nos industrializados. Levine *et al.* (1993) isolou cepas de EAEC identificadas em crianças com doenças diarreicas persistentes no Chile. Recentemente EAEC causou surtos de doenças diarreicas na Europa, Inglaterra, Suíça e Japão (FRANK *et al.*, 2011; HUANG *et al.* 2006).

A EAEC tem sido cada vez mais reconhecida como um patótipo de *E. coli* emergente. Essa bactéria é considerada a segunda causa mais comum de diarreia dos viajantes (ADACHI; JIANG; MATHEWSON, 2001), leva à diarreia aguda e persistente em crianças com desnutrição (LIMA *et al.*, 2000; RUTTLER *et al.*, 2002) e em pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (NATARO *et al.*, 2006). Segundo Steiner *et al.* (1998), as crianças portadoras de infecções sintomáticas ou assintomáticas, causadas pelo referido micro-organismo, podem apresentar inflamação intestinal e prejuízos no desenvolvimento físico e cognitivo, com decréscimos de até 8 cm no crescimento e diminuição no rendimento escolar atribuível ao tempo de 12 meses (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; STEINER, SAMIE, GUERRANT, 2006).

A patogênese da infecção causada por EAEC permanece incerta e é bastante dificultada pela diversidade e heterogeneidade deste micro-organismo (ELIAS *et al.* , 2002). Estudos recentes sugerem a ocorrência de três estágios. Inicialmente, ocorreria a aderência da bactéria à mucosa intestinal por meio de fímbrias de aderência agregativa (AAFs) e outros fatores de adesão do micro-organismo, seguido por um aumento na produção de muco pela bactéria juntamente com o depósito de biofilme na superfície dos enterócitos, o que levaria, conseqüentemente, ao último estágio: liberação de citocinas, suscitação de uma resposta inflamatória, toxicidade da mucosa, incluindo a destruição parcial ou total das vilosidades,

vacuolização do citoplasma basal dos enterócitos, destacamento do epitélio e desarranjo da estrutura com extrusão de células epiteliais e secreção intestinal (ANDRADE; FREYMÜLLER; FAGUNDES-NETO, 2010; HARRINGTON *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2006; NATARO, 2005).

As alterações do trato gastrointestinal observadas pela complexa interação da EAEC com o hospedeiro podem ser associadas também à suscetibilidade genética do portador, heterogeneidade dos genes de virulência do micro-organismo citado (Tabela 1) ou a carga microbiana, conduzindo à lesões e inflamação da mucosa intestinal e resultando no processo diarreico (ANDRADE; FREYMÜLLER; FAGUNDES-NETO, 2010).

Várias linhas de estudo sugerem a natureza inflamatória do processo de infecção causado pela EAEC. A interleucina (IL)-8, uma importante quimiocina pró-inflamatória, é responsável pelo recrutamento de neutrófilos para a mucosa intestinal sem lesão, o que facilita a secreção de fluido intestinal. Esta quimiocina é liberada por células epiteliais *in vitro* na presença da cepa 042 (protótipo patogênico de EAEC que causa diarreia em voluntários) devido a presença de flagelina no micro-organismo citado. A flagelina causa liberação de IL-8 se ligando aos receptores *Toll-like 5* (TLR5) das células epiteliais. TLR5 sinaliza para proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) p38 e fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) com objetivo de induzir a transcrição de citocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais e monocíticas. Além disso, a cepa 042 tem mostrado um aumento da regulação de genes como: IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), oncogene relacionado ao crescimento alfa (GRO- $\alpha$ ), GRO- $\gamma$ , molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e IL-1 $\beta$ . (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; STEINER, THIELMAN, GUERRANT, 2010). A avaliação de algumas endemias tem permitido associar alguns fatores de virulência com aumento dos níveis de marcadores inflamatórios e citocinas a nível fecal. Os principais marcadores e citocinas envolvidas são IL-1ra, IL-1 $\beta$ , IL-8, interferon gama (INF $\gamma$ ) e lactoferrina (JIANG *et al.*, 2003; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

A partir da agressão infecciosa inicial, há uma disfunção intestinal o que determina um quadro diarreico agudo que pode persistir por fatores que perpetuam a lesão da mucosa intestinal e/ou que dificultam sua recuperação, como ocorre na presença de EAEC. Superando a infecção, os mecanismos de defesa intestinal são ativados permitindo a recuperação do epitélio intestinal que apresenta uma enorme capacidade de regeneração. Com a finalidade de

Tabela 1 – Genes de virulência da EAEC

Grupo	Gene	Descrição	Fonte
<b>Gene regulador</b>	<i>aggR</i>	Regulador de uma série de genes plasmidiais da EAEC incluindo genes que codificam fatores de adesão agregativa, AAF/I, AAF/II, proteína de dispersina, um aglomerado de genes em uma ilha de patogenicidade no locus <i>PheU</i>	Nataro (1994, 2005); Jenkins <i>et al.</i> (2005); Sheikh <i>et al.</i> (2002)
<b>Fimbrias</b>	<i>aggA</i>	Codifica AAF/I e hemaglutinação de eritrócitos	Nataro <i>et al.</i> (1993, 1994)
	<i>aafA</i>	Codifica AAF/II, que medeia a adesão à mucosa do cólon	Czczulinet <i>et al.</i> (1997)
	<i>aag3C</i>	Codifica AAF/III	Bernieret <i>et al.</i> (2002)
	<i>aag4A</i>	Codifica AAF/IV, também chamada de Hda	Boisen <i>et al.</i> , (2009)
<b>Enterotoxinas</b>	<i>astA</i>	Codifica a toxina termoestável, que apresenta similariedade física e mecânica com a enterotoxina STa <i>E. coli</i>	Menard & Dubreuil (2002); Menard <i>et al.</i> (2004)
	<i>pet</i>	É uma proteína serina protease autotransportadora (SPATE) de classe I, uma toxina que induz a contração do citoesqueleto, perda das fibras de stress de actina e perda do contato focal da célula com sua matriz. Uma vez internalizado, Pet liga-se a $\alpha$ -fodrina, a proteína responsável pela conexão da membrana plasmática com o citoesqueleto, clivando-a em duas partes.	Eslava <i>et al.</i> (1998); Navarro-Garcia; Elias, (2010).
	<i>sat</i>	Causa o estiramento da F-actina do citoesqueleto celular, como as demais SPATES de classe I e induz efeito citotóxico devido clivar a $\alpha$ -fodrina	Boisen <i>et al.</i> , (2009); Moal <i>et al.</i> , (2011)
<b>OMPs</b>	<i>OMP</i>	Fornece a capacidade de aderência da EAEC e hemaglutinação dos eritrócitos	Suzart <i>et al.</i> (1999); Monteiro-Neto <i>et al.</i> (2003)
<b>Transportador de dispersina</b>	<i>aatA</i>	Codifica a proteína ABC responsável pelo transporte da proteína dispersina para fora da membrana externa	Nishiet <i>et al.</i> (2003); Iwashita <i>et al.</i> (2006)
<b>Secretor de proteínas</b>	<i>aap</i>	Codifica a proteína secretada de 10 kDa chamada de dispersina, e esta é responsável pela "dispersão" da EAEC através da mucosa intestinal. Dispersina é imunogênica em humanos desafiados com EAEC.	Nataro <i>et al.</i> (1995); Sheikh <i>et al.</i> (2002)
	<i>pic</i>	Codifica uma SPATE de 109 kDa que catalisa a degradação de gelatina. A proteína Pic tem mucinase ativa e é capaz de causar hemaglutinação de eritrócitos.	Henderson <i>et al.</i> (1999); Behrens <i>et al.</i> (2002)
<b>Yersiniabactin</b>	<i>irp2</i>	Codifica o sistema que medeia a absorção ferro pelos sideróforos da yersiniabactin que desempenham um papel no transporte e regulação do ferro.	Schubert <i>et al.</i> (1998);
<b>Lectina</b>	<i>Lectina</i>	Um complexo carboidrato que mostra a reatividade cruzada para ligar se a subunidade da toxina da cólera, e induz alterações morfológicas nas células HEp-2	Basu <i>et al.</i> (2004)

Fonte: Adaptado e ampliado de HUANG *et al.*, 2006

evitar a difusão de fatores deletérios, é essencial a manutenção estrutural e funcional da barreira intestinal (BALLESTER; ESCOBAR; GRISI, 2002; GOKE; PODOLSKY, 1996). Os processos naturais dinâmicos envolvidos na renovação celular intestinal, como proliferação, migração, diferenciação, alteração na barreira funcional do intestino, apoptose e necrose, relacionam-se diretamente ao estado nutricional e à presença de nutrientes específicos na dieta do indivíduo (RUEMMELE *et al.*, 1999; ZIEGLER *et al.*, 2003).

### **1.3 Proliferação e morte celular do epitélio intestinal**

O epitélio intestinal constitui uma barreira física que protege as camadas assépticas intestinais de micro-organismos e substâncias imunogênicas presentes no lúmen. Esse epitélio consiste em uma camada de células epiteliais polarizadas e interconectadas separadas por uma membrana basal do tecido conjuntivo e da lâmina própria, onde se encontram vários tipos celulares (ASQUITH; POWRIE, 2010).

Normalmente, a manutenção do epitélio intestinal envolve um processo dinâmico com renovação celular completa ocorrendo entre 48 e 96 horas, período necessário para que as células-tronco intestinais localizadas na base das criptas sofram diferenciação, proliferação e migração ao longo do eixo das vilosidades da cripta. No fim desta jornada, as células epiteliais entram em apoptose (ASQUITH; POWRIE, 2010). Danos e prejuízos à mucosa epitelial no decurso de várias doenças podem causar desequilíbrio na homeostase do hospedeiro resultando em uma maior penetração e absorção de fatores tóxicos e imunogênicos, ocasionando inflamação e uma resposta imune descontrolada (DIGNASS, 2001).

O Ciclo de divisão celular é realizada em 4 fases. Na fase M (M=mitose), a cromátide condensa nos cromossomos, e duas cromátides individuais, que compõem o cromossomo, são segregadas a cada célula filha. Na fase  $G_1$  (Gap 1) a célula também poderá avançar em direção à síntese de DNA para um outro ciclo de divisão ou sair do ciclo celular reversivelmente ( $G_0$ ) ou irreversivelmente levando à diferenciação. Durante a fase  $G_1$  a célula é particularmente susceptível ao controle da progressão do ciclo celular por inúmeros pontos de restrição, que determinam se a célula irá reentrar no ciclo, se retirar dele, ou retirar e diferenciar.  $G_1$  é seguida pela fase S (Síntese de DNA), no qual o DNA se replica. S por sua vez é seguida da fase  $G_2$  na qual a célula se prepara para entrar em mitose. A célula na fase  $G_2$  determina a integridade do DNA e se irá parar para seguir o reparo do DNA ou entrar em

apoptose se o reparo for impossível. Apoptose (ou “morte celular programada”) é regulado pelo processo fisiológico pelo qual a célula pode ser removida a partir da população (FRESHNEY, 2010).

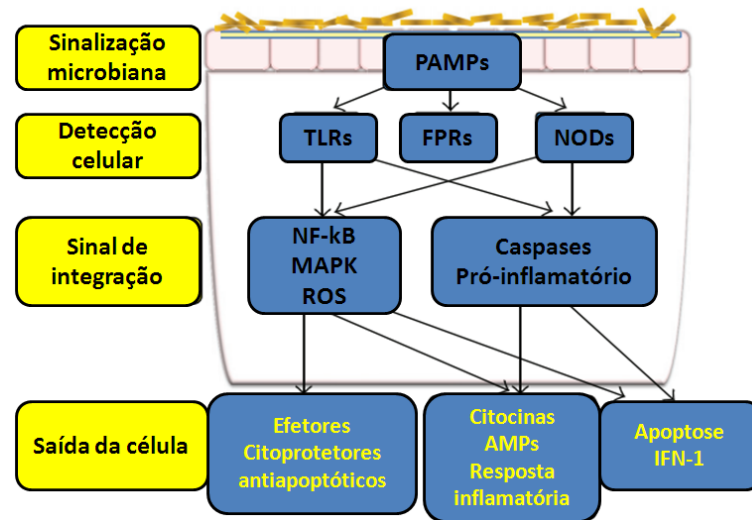
Vários mecanismos moleculares estão envolvidos na regulação da proliferação até a morte celular, principalmente durante injúrias (Figura 1). MAPK desempenha um papel importante no complexo de programas celulares como diferenciação, proliferação, desenvolvimento, transformação e apoptose. O sinal de MAPK caracteriza três vias importantes: quinase regulada por sinal extracelular (ERK) ou (conhecida como MAPK), quinase *C-jun N-terminal*/proteína quinase ativada por estresse (JNK/SAPK) e p38 MAPK (ZHANG; LIU, 2002). Estas vias atuam em protooncogenes *c-jun* e *c-fos* com capacidade de codificar proteínas que formam um complexo regulatório da transcrição de promotores da proteína ativadora (AP)-1, este fator transcricional complexo medeia uma variedade de processos celulares incluindo crescimento, proliferação, transformação e apoptose. Na maior parte dos processos, *c-Jun* é um regulador positivo de proliferação celular (HALAZONETIS *et al.*, 1988; SHAULIAN; KARIN, 2002).

Estudos têm demonstrado que o bloqueio específico de NF- $\kappa$ B induz fortemente o aumento de JNK mediada por AP-1 devido a níveis elevados de espécies reativas de oxigênio. Desta forma, a atividade de JNK/AP-1 está sob o controle de feedback negativo de NF- $\kappa$ B e pode executar a apoptose. Assim, quando o NF- $\kappa$ B não está bloqueado, ele entra no núcleo podendo ativar a transcrição de genes anti-apoptóticos (KRIEHLBER *et al.*, 2005; SHARMA; YOUNG; NEU, 2010).

Outros importantes moduladores que atuam nas células epiteliais intestinais no processo de proliferação incluem o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de transformação do crescimento (TGF)- $\alpha$ , que são potentes estimuladores proliferativos, enquanto TGF- $\beta$  é um inibidor da proliferação e tem um papel importante no contrabalanço da proliferação celular (DIGNASS, 2001). As primeiras respostas genômicas para estimulação do TGF- $\beta$  em diferentes células pode envolver a transdução de sinal nuclear e de amplificação por fatores de *c-jun* de transcrição em conjunto com *c-fos*. A ativação diferencial dos genes *c-jun* pode explicar alguns dos efeitos pleiotrópicos de TGF- $\beta$  (PERTOVAARA *et al.*, 1989).



Figura 1 – Esquema de estimulação microbiana na mucosa epitelial



Legenda: A microbiota comensal ou agentes patogênicos na superfície da mucosa criam sinais, chamados de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), para estimular os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), incluindo os receptores *toll-like* (TLRs), receptores de formil peptídeo (FPRs), ou receptores de proteínas com domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização (NODs). Sinalização posterior consiste em uma via intrínscada e inter-relacionada, a qual determina a saída de sinalização com base na percepção inicial do organismo alvo. Assim, a interação do micro-organismo e hospedeiro pode gerar uma resposta protetora, inflamatória, ou de morte celular. Fonte: (SHARMA; YOUNG; NEU, 2010).

Na progressão do ciclo celular intestinal, milhões de células são eliminadas do corpo por morte celular e substituída por novas células. A proliferação (mitose) é balanceada pela destruição e, o desbalanceamento a favor de um dos lados, contribui para patogênese de desordens significantes (ULUKAYA; ACILAN; YILMAZ, 2011). Muitas moléculas estão envolvidas com o processo de morte celular, inclusive a via de caspases (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

As caspases (cisteíno-aspartato proteases) pertencem à família das cisteínas proteases (possuem uma cisteína no sítio ativo), que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). As caspases ativam umas às outras desencadeando uma cascata de reações proteolíticas. Existem duas importantes vias das caspases: extrínseca e intrínseca.

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores denominados de "domínio de morte" ou "receptores de morte celular". O reconhecimento de um ligante específico provoca oligomerização e, assim, ativação desses receptores. Logo após ocorre a

ligação por proteínas adaptadoras específicas (FADD/TRADD) para seus receptores que conduzem à ativação de caspase 8, a qual irá executar a ativação de caspase 3 ou BID (proteína pró-apoptótica) causando a morte celular (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007, ULUKAYA; ACILAN; YILMAZ, 2011).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes convergindo principalmente para a mitocôndria. Quando os sinais de morte alcançam a mitocôndria, ocorre um aumento da permeabilização da mitocôndria causando a ruptura da membrana e consequentemente liberação de moléculas pró-apoptóticas, como o citocromo c, para o citosol. Este, quando presente no citosol, forma um complexo com o fator ativador da apoptose 1 (APAF-1) e a caspase 9, formando o apoptossomo, causando liberação de caspase 9, a qual irá ativar caspase 3, que consequentemente levará à morte celular (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007, ULUKAYA; ACILAN; YILMAZ, 2011).

#### **1.4 A importância dos nutrientes nas doenças diarreicas**

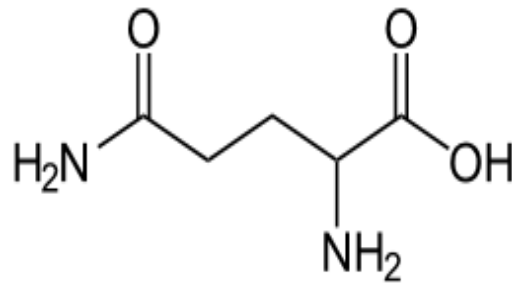
A progressão da diarreia infecciosa resulta em modificações da morfologia e funções intestinais, estas alterações estão implicadas no próprio agravamento da infecção e da sua persistência à medida que predispõe o indivíduo à desnutrição. A má condição nutricional prejudica as funções imunológicas e dificulta a erradicação do patógeno pelo organismo afetado. Estas alterações nutricionais são decorrentes da má absorção por redução da superfície e função intestinal. Há atrofia vilosa e hiperplasia das criptas, perda da borda em escova e redução das enzimas intracelulares e digestivas (BALLESTAR; ESCOBAR; GRISI, 2002).

A deficiência de micronutrientes e vitaminas promove a manutenção da diarreia, já que estes participam de funções imunológicas e reparadoras do epitélio mucoso intestinal. Nutrientes específicos com efeitos imunológicos e farmacológicos, quando consumidos em quantidades acima da necessidade diária, são referidos como nutrientes com capacidade de imuno-reforço ou imunonutrientes. A suplementação com esses nutrientes são essenciais principalmente em pacientes com imunodeficiência, como nos casos de doenças diarreicas que se perpetuam associadas à desnutrição. Alguns nutrientes já são reconhecidos por suas propriedades de alteração da imunidade como arginina, glutamina, betacaroteno, omega-3, nucleotídeos, vitamina A e zinco (BALLESTAR; ESCOBAR; GRISI, 2002, KIM, 2011).

### 1.4.1 Glutamina e alanil-glutamina

A glutamina ou L-glutamina é o aminoácido mais comumente encontrado no organismo, correspondendo a 25% dos aminoácidos livres e é classificado como condicionalmente essencial, pois se torna indispensável nas condições de estresse, sendo ativamente transportado e metabolizado em quase todos os tecidos animais (HUANG; SHAO; NEU, 2003). A glutamina possui em sua estrutura química dois átomos de nitrogênio: um no grupo  $\alpha$ -amino; e um no grupo amido (Figura 2) o que a

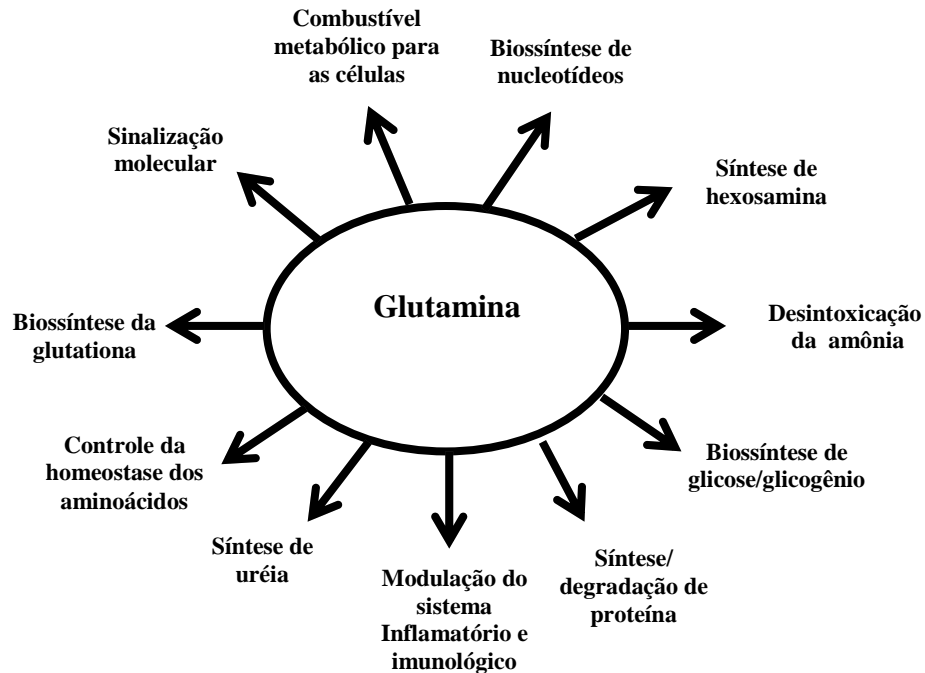
Figura 2 – Estrutura química da glutamina



Fonte: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Glutamina>>

classifica como amino-amido-ácido, e lhe permite desempenhar suas diversas funções (Figura 3) incluindo estimulação da proliferação, diferenciação e proteção direta de células e tecidos de uma lesão ou inflamação, atenuação e preservação da função metabólica e a produção de hexosaminas, que são muito importantes para a formação de glicoproteína, promovendo as junções intercelulares da barreira intestinal, o que evita a translocação bacteriana (HUANG; SHAO; NEU, 2003; KIM; WISCHMEYER, 2012; SOUBA, 1993).

Figura 3 – Funções da glutamina



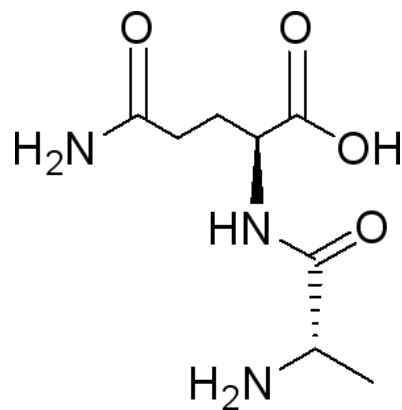
Fonte: Adaptado de HUANG; SHAO; NEU, 2003

Estudos mostram os benefícios da glutamina tanto em ensaios clínicos como em testes *in vitro* principalmente no trato gastrointestinal. Lima *et al.* (2005) realizaram um estudo randomizado duplo-cego em crianças desnutridas com idade entre 2 e 6 meses em um hospital público infantil. O estudo investigou a suplementação com glutamina ou glicina (placebo) com dose diárias de 111mM/L por 10 dias em crianças com e sem diarreia. Foi observado que o grupo suplementado com glutamina apresentou melhora da função de barreira intestinal em comparação com o grupo não suplementado. Larson *et al.* (2007) demonstraram que a privação de glutamina em células do epitélio intestinal de rato (RIE)-1 aumentou a morte celular pela atividade da caspase 3. Contudo, quando novamente adicionada de glutamina essas células ativaram a via ERK, relacionada com a proliferação e a sobrevivência celular e, consequentemente, causaram a restituição do epitélio.

A partir da glutamina foi criado um derivado peptídico, L-alanil-L-glutamina ou alanil-glutamina (AG), de modo a suprir algumas propriedades químicas não desejadas da glutamina como: instabilidade ao calor de esterilização e ao armazenamento prolongado, solubilidade limitada ( $\approx 3\text{g}/100\text{mL}$  a  $20^\circ\text{C}$ ), velocidade de hidrólise dependente da temperatura, pH, e concentração iônica, decomposição gerando ácido piroglutâmico e amônia, o que impediam seu uso rotineiro em situações clínicas (LIMA, 2006).

AG (Figura 4), por sua vez, apresenta alta solubilidade em água e é estável ao calor (25 a 40°C), ao tempo dos procedimentos de preparo, ao armazenamento (validade de até 5 anos) e à administração da solução (ARII; KAI; KOKUBA, 1999). No Brasil a glutamina para administração intravenosa está disponível comercialmente como uma solução límpida e transparente, sob a forma do dipeptídeo alanil-glutamina, que possui estabilidade térmica nas formulações complexas de nutrição parenteral total (SILVA *et al.*, 2010).

Figura 4 – Estrutura química da alanil-glutamina



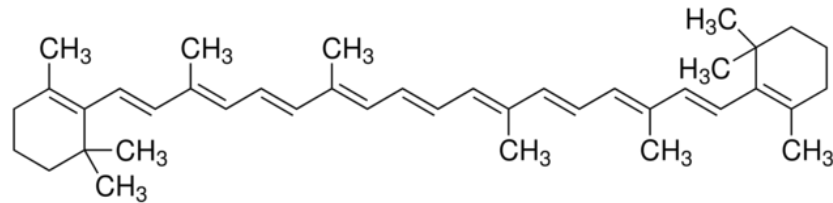
Fonte: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8185?lang=pt&region=BR>>

Esse dipeptídeo sintético é intensamente estudado tanto *in vitro* (BRITO *et al.* 2005; BRAGA-NETO *et al.* 2008), como nos animais (CARNEIRO *et al.*, 2006; SCHEIBE *et al.*, 2009) e na clínica (BUSHEN *et al.* 2004; LIMA *et al.* 2007; STHELE *et al.* 1989), demonstrando sua alta importância no trato gastrointestinal e a necessidade de elucidação de seus mecanismos.

#### 1.4.2 Betacaroteno

Em 1831, o cientista Heinrich Wilhelm Ferdinand Wackenroder descobriu pigmentos amarelo/alaranjados em cenouras, que viriam a ser conhecidos como carotenos (SOURKES, 2009). Dos 600 tipos de carotenoides de fontes naturais caracterizados apenas 10% servem de fonte de vitamina A. O betacaroteno ( $\beta$ -C ou  $\beta$ -caroteno) (Figura 5) é uma substância classificada como carotenóide sendo um hidrocarboneto, oxidável com pigmentação amarela, laranja ou vermelha, lipossolúvel, presente em muitos vegetais (abóbora, cenoura, espinafre) e um precursor importante da síntese de vitamina A (pró-vitamina A) (BENDICH; OLSON, 1989; SOURKES, 2009; STAHL; SIES, 2012).

Figura 5 – Estrutura química do betacaroteno



Fonte: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c4582?lang=pt&region=BR>>

A co-ingestão de alimentos lipídicos facilita a absorção intestinal da vitamina A como também do  $\beta$ -C. A absorção intestinal de carotenoides *in vivo* envolve múltiplas etapas. Inicialmente o  $\beta$ -C é liberado da matriz alimentar para o lúmen, seguido de solubilização em micelas mistas, permitindo a absorção pelas células da mucosa intestinal. Após tal processo, os produtos do  $\beta$ -C serão incorporados aos quilomícrons para serem transportados do plasma para o interior das células (DURING; DAWSON; HARRISON, 2005).

Duas vias têm sido descritas para a clivagem do  $\beta$ -C em retinoides (Vitamina A): central e excêntrica (Figura 6). A principal via é a clivagem central, catalisada por uma enzima citosólica,  $\beta$ -C 15,15'-oxigenase 1 (BCO1), que cliva  $\beta$ -C no centro da dupla ligação (15,15') para produzir retinal, um precursor direto de retinol e do ácido retinóico. A segunda via é a clivagem excêntrica que ocorre em ligações duplas que não sejam no centro da ligação dupla 15,15' de  $\beta$ -C produzindo  $\beta$ -apo-carotenoides com diferentes comprimentos de cadeia (HARRISON, 2012).

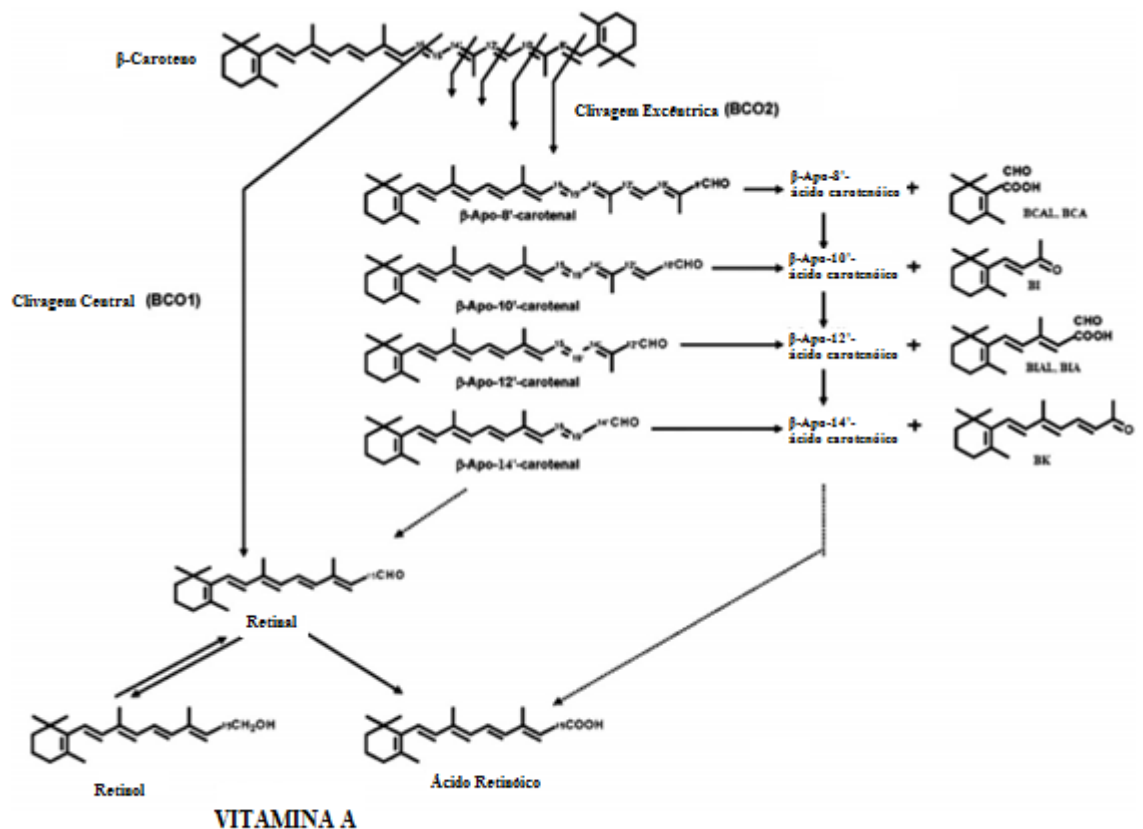
A partir da clivagem  $\beta$ -C nos enterócitos são obtidos vitamina A (retinol) e seus análogos, conhecidos como retinoides, que apresentam importantes funções na modulação de diversos eventos celulares como proliferação, diferenciação e morte (GUDAS; SPORN; ROBERTS, 2004).

O  $\beta$ -C apresenta dois principais produtos de sua metabolização, o retinol e o ácido retinóico (HARRISON, 2012). Pesquisas realizadas com ácido retinóico sugerem que este atua como agente quimioterápico dada sua capacidade de induzir a diferenciação celular, parada do crescimento ou apoptose, ou a combinação destes efeitos, sendo responsável pelos efeitos anti-tumorais em mama, cabeça e pescoço, como mostrado em alguns ensaios clínicos (BIESALSK, 1989; NILES, 2000). Maciel *et al.* (2007) demonstraram em estudo realizado

em células intestinais (IEC-6) na presença de toxina A do *Clostridium difficile* como agente lesivo e com posterior suplementação com retinol, a promoção da proteção contra a lesão causada pela toxina através modulação trófica das células, acarretando na restauração da barreira intestinal.

Apesar de estudos com o ácido retinóico descreverem sua capacidade antiproliferativa (BIESALSK, 1989; ZANOTTO-FILHO, 2009; NILES, 2000 ), e outros trabalhos relatarem os efeitos proliferativos celulares induzidos pelo retinol (BIESALSK, 1989; ZANOTTO-FILHO, 2009; MACIEL *et al.*, 2005), poucos estudos mostram os efeitos do betacaroteno, pois este produz tanto retinol como o ácido retinóico e seu equilíbrio pode interferir no seu mecanismo de ação.

Figura 6 - Produtos das clivagens centrais e excêntricas de  $\beta$ -caroteno



Fonte: HARRISON, 2012.

## 2 JUSTIFICATIVA

As doenças diarreicas ainda constituem um importante problema de saúde pública apesar do decréscimo da mortalidade e não de morbidade. Entre as principais causas de óbitos no primeiro ano de vida está a diarreia associada à desnutrição. A redução sustentada da mortalidade infantil no país resulta de diversas ações, como melhorias no fornecimento de água tratada à população, aumento da cobertura vacinal com introdução de novas vacinas, utilização da terapia de reidratação oral e outros fatores (LAMBERTI; WALKER; BLACK, 2012; GUERRANT *et al.*, 2013). Apesar da implementação de tais medidas, houve 44 mil óbitos em menores de um ano de idade no ano de 2008. No mesmo ano, as diarreias foram responsáveis por 1.118 óbitos. A região Nordeste ainda concentra o maior número de mortes por diarreia, sendo que proporção de mortes nessa região ainda é 3 vezes maior quando comparado ao Sudeste (BRASIL, 2012). Entre os tipos de doenças diarreicas a diarreia persistente apresenta crescimento de sua incidência no Brasil e em outros países, além dos surtos diarreicos no mundo associados principalmente com a *E. coli* enteroagregativa. Em crianças este patógeno acarreta em infecções sintomáticas, ou assintomáticas, além de causar inflamação intestinal (FRANK *et al.*, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011)

. Pode ocasionar prejuízos no desenvolvimento físico e cognitivo infantil, com decréscimos de até 8 cm de crescimento e diminuição de rendimento escolar atribuível ao tempo de 12 meses (NAVARO-GARCIA; ELIAS, 2011; STEINER, SAMIE, GUERRANT, 2006). Compreender os mecanismos patológicos pelos quais as cepas diarreioagênicas atuam representa uma importante forma de controle da incidência das doenças causadas por estas. Por outro lado, dada a grande heterogeneidade das cepas de EAEC é importante verticalizar o estudo destes micro-organismos no âmbito das diversas populações que estas podem afetar. Este estudo avalia a infecção de uma EAEC selvagem encontrada com grande prevalência em uma comunidade de Fortaleza. Dessa forma, o estudo poderá vir contribuir para uma compreensão mais organizada como os diferentes variantes de subtipos de EAEC e as diferentes populações afetadas. Entretanto é necessário também estudar possíveis intervenções na patologia. Este estudo avalia a ação de alguns nutrientes na patogenia de variantes de EAEC podendo vir a contribuir também, em um futuro próximo, como subsídio à terapia nutricional no combate contra desnutrição e doenças diarreicas nos grupos infantis mais acometidos por tais enfermidades, como os encontrados no semiárido brasileiro.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da lesão causada por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) em células intestinais, bem como o efeito da suplementação com alanil-glutamina e betacaroteno.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Verificar o efeito da cepa padrão de EAEC (042), EAEC proveniente da comunidade (cepa selvagem) e de uma *E. coli* não patogênica (HS), no modelo de proliferação de células intestinais *in vitro*.
2. Investigar o tipo de morte celular causada pelas cepas bacterianas.
3. Avaliar os efeitos tempo e dose resposta da alanil-glutamina e do betacaroteno no modelo de proliferação celular *in vitro*.
4. Determinar os efeitos tempo e dose resposta da alanil-glutamina e do betacaroteno nos ensaios de morte celular
5. Determinar o efeito da suplementação com alanil-glutamina e betacaroteno sobre proliferação e morte em células IEC-6 pós-infectadas pelas cepas patogênicas de EAEC.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes e materiais

#### 4.1.1 Cepas bacterianas

Neste estudo foram utilizadas três cepas de *Escherichia coli*: uma cepa enteroagregativa padrão (EAEC 042), uma cepa enteroagregativa selvagem e uma comensal (*E. coli* HS).

A cepa EAEC 042 (O44:H18), isolada de uma criança com diarreia em 1983 na cidade de Lima, Peru, é considerada uma cepa padrão capaz de causar diarreia em voluntários (NATARO *et al.*, 1995). A utilização de tal cepa no presente estudo deve-se ao fato de EAEC 042 possuir uma extensa caracterização bioquímica e funcional estando sua ação patológica demonstrada em diversos modelos experimentais (ANDRADE; FREYMÜLLER; CARVALHO *et al.* 2011; FAGUNDES-NETO, 2010; LIMA *et al.* 2012). A cepa utilizada no atual estudo foi gentilmente cedida pelo pesquisador Dr. James Nataro, da Universidade de Virgínia – USA.

A cepa EAEC selvagem foi isolada em 2012 a partir amostras fecais de uma criança desnutrida em uma comunidade da cidade de Fortaleza, Brasil, através de um estudo de colaboração internacional intitulado *The Interactions of Malnutrition & Enteric Infections: Consequences for Child Health and Development* (MAL-ED). Tal cepa foi identificada como *E. coli* através de testes bioquímicos e caracterizada como enteroagregativa pela realização do padrão ouro de aderência em células HEp-2, conforme visto mais adiante no item 4.2.7. Testes complementares (descritos no item 4.2.3) foram realizados através da reação da polimerase em cadeia (PCR) para identificação dos genes encontrados exclusivamente em cepas de EAEC, o *aaiC* (gene cromossomial) e *aatA* (gene plasmidial), (Tabela 2). Adicionalmente, para melhor caracterizar a cepa, foi verificada a presença ou ausência de cinco genes de virulência, *aap*, *aggR*, *astA*, *pet*, *pic* e *sat*, através da técnica de PCR.

A cepa comensal *E. coli* HS foi originalmente isolada em 1975 a partir das fezes de um pesquisador adulto saudável e compõe a microbiota normal do cólon humano (LEVINE *et al.*, 1978). O fato da *E. coli* HS ser capaz de colonizar o trato gastrointestinal sem causar efeitos adversos detectáveis associada ao fato de ser uma cepa bem caracterizada molecularmente (RASKO *et al.*, 2008) constituíram os principais critérios de escolha para eleição dessa cepa como controle infectado para as cepas patogênicas.

#### 4.1.2 L-Alanil-L-glutamina e betacaroteno

Os ensaios foram analisados com dois tipos de suplementações, betacaroteno e L-alanil-L-glutamina, separadamente um do outro. As soluções foram preparadas em ambiente estéril no interior de uma cabine de segurança biológica do tipo 2A. A AG proveniente da Rexim® Product Line (Evonik industries AG, Alemanha) foi armazenada à temperatura de 4°C. O  $\beta$ -caroteno proveniente da Sigma-Aldrich Chemical (Estados Unidos) foi armazenado em um freezer a temperatura de -20 °C. A solução de  $\beta$ -caroteno solúvel em meio de cultura celular com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) foi preparada ao abrigo de luz para evitar a oxidação e perda de atividade. A alanil-glutamina e o betacaroteno foram testados em cinco concentrações diferentes que variaram, respectivamente, entre as doses de 0,3-30 mM e 0,3-30  $\mu$ M, baseado em experimentos prévios realizados por Carvalho (2011), com o objetivo de definir a melhor concentração para os protocolos experimentais.

#### 4.1.3 Linhagens celulares

Os tipos celulares utilizados no presente estudo foram obtidos a partir da Coleção Americana de Cultura (*American Type Culture Collection-ATCC*, Estados Unidos). Os experimentos foram realizados com duas linhagens celulares: IEC-6, obtida na ATCC sob o número de catálogo CRL-1592 (ATCC, 2012) e HEP-2 sob número de catálogo CCL-23 (ATCC, 2012).

As células IEC-6 são provenientes da cripta do jejuno de rato e constituem uma linhagem celular de cariótipo diploide normal. Quaroni *et al.* (1979) descreveram essas células (Figura 7) como uma linhagem não transformada, aderente, com morfologia epitelióide, e que crescem em monocamadas com características de células não diferenciadas de criptas de intestino delgado, sendo utilizadas em modelos para avaliar parâmetros de recuperação intestinal (CARVALHO *et al.*, 2012; BRAGA-NETO *et al.*, 2008; BRITO *et al.*, 2005, MCCOMARCK *et al.*, 1992). Células IEC-6 nas passagens de 30-35 foram cultivadas em frascos de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> adicionas de meio Dulbecco's *Modified Eagle Medium*- DMEM (GIBCO, Estados Unidos), com acréscimo de 5% de soro fetal bovino inativado (GIBCO, Estados Unidos), 40  $\mu$ g/mL de insulina (SIGMA ALDRICH, Estados Unidos), 50 U/mL de penicilina (GIBCO, Estados Unidos), 50  $\mu$ g/mL de estreptomicina (GIBCO, Estados Unidos) e 1 mM/mL de piruvato de sódio (GIBCO, Estados Unidos).

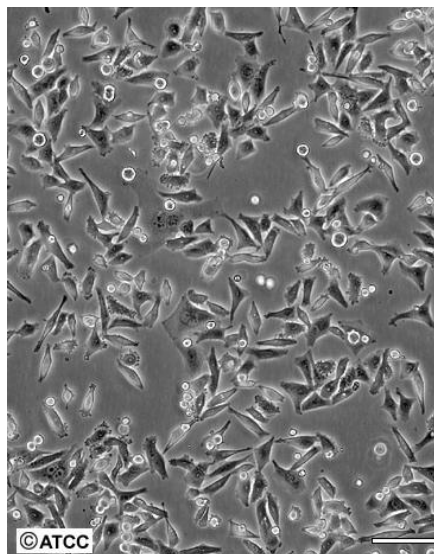
Figura 7 - Células IEC-6 vistas em microscópio óptico invertido com o aumento 100x



Fonte: Carvalho, 2011

Células HEp-2 (Figura 8) são derivadas da contaminação de células HeLa que, por sua vez, provém de adenocarcinoma de cérvix (ATCC, 2012). São comumente empregadas no ensaio de padrão de aderência (CRAVIOTO *et al.*, 1991). Foram utilizadas células nas passagens de 9-12. Sua manutenção foi feita em frascos de 25 cm<sup>2</sup> adicionado de meio *Minimal Essencial Medim* (GIBCO, Estados Unidos), acrescido de 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

Figura 8 - Células HEp-2 vistas em microscópio óptico invertido com o aumento de 100X



Fonte: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch>

## 4.2 Protocolos experimentais

### 4.2.1 Diagnóstico bioquímico para identificação de *E. coli*

A cepa selvagem isolada a partir do estudo foi diagnosticada como *E. coli* através da utilização do kit de identificação de enterobactérias API 20 E (BioMérieux, França). O teste bioquímico também foi realizado para as cepas de EAEC 042 e *E. coli* HS.

### 4.2.2 A extração do DNA das colônias de *E.coli*

A extração do DNA das colônias foi realizada por método de aquecimento. Para tanto, 1-2 colônias isoladas foram incubadas por 20 minutos a 100°C em tubo plástico de 1,5 mL contendo 1 mL de água com 0,5% Triton X-100 (Sigma Aldrich, Estados Unidos) e homogeneizado por 5 segundos. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 RPM e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga estéril e o precipitado descartado. A solução de DNA bacteriano foi armazenada em *freezer* à -20° C e usado para o protocolo de multiplex-PCR.

### 4.2.3 Diagnóstico molecular por multiplex-PCR para identificação da cepa de *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

O diagnóstico molecular de EAEC foi baseado na amplificação de dois genes bacterianos que não apresentam homologia com outras sequências nucleotídicas até então conhecidas (LIMA, 2008). Os dois genes foram o *aaiC*, localizado no DNA cromossômico da bactéria, descrito por Dudley *et al.* (2006). O segundo gene foi o *aatA*, voltado para a amplificação do segmento do DNA plasmidial da EAEC, descrito por Baudry *et al.* (1990).

A técnica de multiplex-PCR foi empregada para detecção dos genes encontrados exclusivamente em EAEC com a finalidade de diferenciá-la dos outros patótipos de *E.coli* (EPEC, EIEC, ETEC e EHEC), como também investigar a presença de alguns dos seus genes de virulência. Os iniciadores da reação para identificação dos subtipos de *E.coli* que estão dispostos na Tabela 2 foram desenvolvidos por pesquisadores do projeto internacional *Malnutrition and Enteric Diseases* (MAL-ED). Os iniciadores para os genes de virulência estão descritos na Tabela 3.

Tabela 2 - Genes de diagnóstico relacionados com as *Escherichia coli* diarreio gênicas, iniciadores utilizados e tamanhos dos produtos obtidos

<i>E. coli</i>	Genes de diagnóstico	Sequência do iniciador (5'→3')	Produto (pb)
EAEC	<i>aatA</i> (proteína integrante do complexo secretor da dispersina)	S: CTGGCGAAAGACTGTATCAT A: CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	650
EAEC	<i>aaiC</i> (proteína que carece do domínio N-terminal)	S: ATTGTCCTCAGGCATTTTAC A: ACGACACCCCTGATAAACAA	215
EPEC/ EHEC	<i>eaeA</i> (codifica a proteína intimina)	S: CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC A: CCCGATCCGTCTCGCCAGTATTCC	881
EPEC	<i>bfpA</i> (proteína formadora de pilus)	S: GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT A: GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT	300
EIEC	<i>IpaH</i> (antígeno plasmidial de invasão)	S: TGGAAAACCTCAGTGCCTGT A: CCAGTCCGTAAATTCATTCT	423
ETEC	<i>eltB</i> (toxina termo-lábil)	S: CACACGGAGCTCCTCAGTC A: CCCCAGCCTAGCTTAGTTT	508
ETEC	<i>estA</i> (toxina termo-estável)	S: GCTAAACCAGTARGGTCTTCAAAA A: CCCGGTACARGCAGGATTATTACAACA	147
EHEC	<i>stx1</i> ( <i>Shiga</i> -toxina 1)	S: CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG A: CACCAGACAATGTAACCGCTG	348
EHEC	<i>Stx2</i> ( <i>Shiga</i> -toxina 2)	S: ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG A: GCGTCATCGTATACACAGGAGC	584

Legenda: (S: senso; A: antisenso). Fonte: projeto internacional MAL-ED.

Tabela 3 – Genes de virulência relacionados com *Escherichia coli* enteroagregativa, iniciadores utilizados e tamanhos dos produtos obtidos

Gene de Virulência	Sequência do iniciador (5'→3')	Produto (pb)	Fonte
<i>aap</i> (proteína dispersina)	S:ATGAAAAAATTAAGTTTGTATCTT A:CGATATTATTTAACCCATTCGG	356	Sheikh <i>et al.</i> , 2002 (S) Desenvolvido por nosso grupo (A)
<i>aggR</i> (proteína reguladora transcricional)	S:GCCTAAAGGATGCCCTGAT A:CAGAATCGTCAGCATCAGCTAC	100	Desenvolvidos por nosso grupo
<i>astA</i> (enterotoxina termo-estável)	S:GCCATCAACACAGTATATCCGA A:GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	112	Desenvolvido por nosso grupo (S) Piva <i>et al.</i> , 2003 (A)
<i>pet</i> (enterotoxina)	S:TGACAGTGGATCAGGCGTGT A:TTCGTGCGCCAAGAATGAC	558	Desenvolvidos por nosso grupo
<i>pic</i> (enterotoxina)	S:TTCAGCCGAAAGACGAAATCG A:TCTGCGCATTTCATACCAACAT	517	Desenvolvidos por nosso grupo
<i>sat</i> (autotransportador de toxina)	S:TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG A:CCATTATCACCAGTAAAACGCACC	931	Desenvolvidos por nosso grupo

Legenda: (S: senso; A: antisenso) Fonte: Adaptado de LIMA (2008)

A reação consistia em 0,5µL de cada iniciador a 20µM, 25 µL do master mix (DNA polimerase, tampão salino, deoxinucleotídeos - dNTPs, cloreto de magnésio e estabilizadores) do kit de multiplex PCR (QIAGEN, Alemanha) e 3µL da amostra de DNA. O volume final (50µL) era obtido após adição de água (livre de RNAase) em volume suficiente. No protocolo do multiplex-PCR foi incluído um passo inicial de desnaturação (95 °C) por 5 minutos, seguido por 35 ciclos com as seguintes etapas: desnaturação (94 °C) por 30 segundos, anelamento (57 °C) por 1 minuto e extensão (72 °C) por 1 minuto e 15 segundos, e por fim uma extensão (72 °C) por 10 minutos.

Os iniciadores de DNA foram desenhados com o auxílio do OligoPerfect™ Designer disponível no site <http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716> e com base nas

sequências dos genes investigados obtidos no sítio eletrônico do National Center for Biotechnology Information (NCBI –<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, marcados com brometo de etídeo e fotodocumentados a partir do programa ChemiDoc XRS (BIO-Rad Laboratories, Estados Unidos). Como a cepa EAEC 042 possui todos genes em estudo com exceção do *sat* a mesma serviu como controle positivo da reação e o controle negativo foi *E. coli* HS. Em relação à identificação do gene *sat* foi utilizado como controle positivo a cepa EAEC 239-1 (LEVIN-MOAL, *et al*, 2009).

#### 4.2.4 Preparação do inóculo

As cepas bacterianas foram conservadas em meio líquido de TSB (*Trypticase Soy Broth*) contendo glicerol 10% (v/v) em tubos criogênicos previamente identificados e armazenados em um *freezer* a -20 °C. Inicialmente, as cepas eram semeadas em placa de ágar MacConkey e incubadas em uma estufa bacteriológica a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  onde permaneciam por 18-24h. Após esse tempo, as colônias eram suspensas em meio DMEM sem suplementações e em seguida realizada a análise espectrofotométrica relacionada com a turbidez da concentração bacteriana. A leitura do espectrofotômetro da suspensão bacteriana era realizada no comprimento de 600 nm com erro médio de  $0,100 \pm 0,10$ . Obteve-se suspensões bacterianas com valores de absorvância de cada cepa equivalentes a  $10^7$  unidade formadora de colônias (UFC) por mL (0,1 para 042 e HS, e 0,3 para a cepa selvagem). Então, a partir dessas suspensões de  $10^7$  UFC/mL de cada cepa foram realizadas quatro diluições das concentrações bacterianas entre  $10^6$ - $10^3$  UFC/mL, que foram previamente submetidos a contagem bacteriana em placa. Todas as células foram infectadas pela concentração bacteriana escolhida como descrito no item 5.2.1 durante um período de 3 horas, tempo necessário para a bactéria aderir sobre as células e reduzir o número da contagem celular de forma significativa (NATARO; STEINER; GUERRANT,1998; SANCHEZ, GARCIA, 2009). Após este período, a monocamada infectada com as bactérias foram lavadas três vezes com tampão fosfato-salino (PBS) e logo após foi adicionado o meio DMEM padrão sem glutamina suplementado com  $200\mu\text{g/mL}$  de gentamicina na presença ou ausência dos nutrientes. A sensibilidade das cepas à gentamicina foi previamente demonstrada pelo método de disco-difusão em Ágar Mueller-Hinton.



#### **4.2.5 Preparação do nutriente**

Os nutrientes, L-alanil-L-glutamina e betacaroteno, foram pesados para concentrações respectivamente de 30mM/mL e 30µM/mL, e foram preparados suas diluições em ambiente estéril dentro da cabine de fluxo laminar do tipo 2A. Todas as soluções foram feitas com meio de cultura sem adição de glutamina para analisar o efeito dos nutrientes na célula e pós-infecção com EAEC. Uma única concentração de cada nutriente foi escolhida para os testes realizados.

#### **4.2.6 Conservação, preparação e contagem celular**

As linhagens celulares conservadas em tubos criogênicos eram armazenadas em câmara de congelamento a -80 °C. Quando necessário, um tubo criogênico contendo a linhagem celular de interesse era retirado e descongelado. Posteriormente, estas eram colocadas em frascos de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> com o meio de cultura de acordo com a necessidade de cada célula e incubadas em uma estufa nas seguintes condições: temperatura de 37 °C, atmosfera de, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>. A manutenção das células era realizada com trocas do meio a cada dois dias até as células atingirem uma confluência de 90-100% para então serem utilizadas nos ensaios. Os procedimentos eram realizados em uma cabine de fluxo laminar do tipo 2A.

Antes da contagem celular, as linhagens usadas aderiam aos frascos até obterem a confluência para os testes. Portanto, para o descolamento da camada celular dos frascos foi utilizada a solução de tripsina-EDTA (Sigma Aldrich, Estados Unidos).

Então, o meio de cultura celular foi removido do frasco e adicionado 0,5-1 mL da solução de tripsina-EDTA (0,05%-0,02%) sob a superfície celular e incubada em uma estufa por 5 a 10 minutos. Após o tempo de ação da tripsina, foi adicionado 5-10 ml de meio que continha 5 % de soro fetal bovino, pois o soro possui alfa 1-anti-tripsina, agindo na neutralização da ação da tripsina.

Em seguida, a suspensão de células foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL estéril e centrifugada a 1500 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e ao precipitado de células foram adicionados em 3 mL de meio de cultura. Após homogeneizado foram retirados 100 µL e adicionados em 900 µL de meio de cultura em tubo estéril de 1,5 mL e homogeneizado. Foi retirado 15 µL da diluição e realizado a contagem em câmara de Neubauer. Nos experimentos foi utilizada a contagem padronizada pelos quatros quadrantes

de câmara relacionando com o fator de diluição da suspensão celular. Assim, a contagem celular da suspensão era ajustada para a concentração ideal de cada experimento.

#### **4.2.7 Padrão de aderência bacteriano**

A análise do padrão de aderência bacteriana foi realizado com base na metodologia descrita por Cravioto *et al.* (1991) com adaptações. As células HEP-2 e IEC-6 foram cultivadas em frasco de 25 cm<sup>2</sup> e utilizadas após atingirem confluência de aproximadamente 90-95%. Então, as células foram tripsinizadas, transferidas para lâminas de vidro contendo 8 poços com 2,5x10<sup>4</sup> células/mL e incubadas por 24 horas. Nataro & Kaper (1998) demonstraram a característica principal da EAEC a presença do fenótipo AA, determinando a capacidade de aderência agregativa em forma de “tijolos empilhados” durante o tempo de incubação de 3 horas a 37 °C. Pelo período descrito anteriormente, as suspensões bacterianas em estudo na concentração de 10<sup>5</sup> UFC/mL foram adicionadas ao meio MEM para as células HEP-2 e DMEM para IEC-6 acrescido de 1% (p/v) de D-manose. Sequencialmente, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS. Em seguida, foram fixadas com metanol a 10% por 30 segundos, coradas com May-Grunwald Giemsa e analisado o padrão de aderência em microscópio óptico.

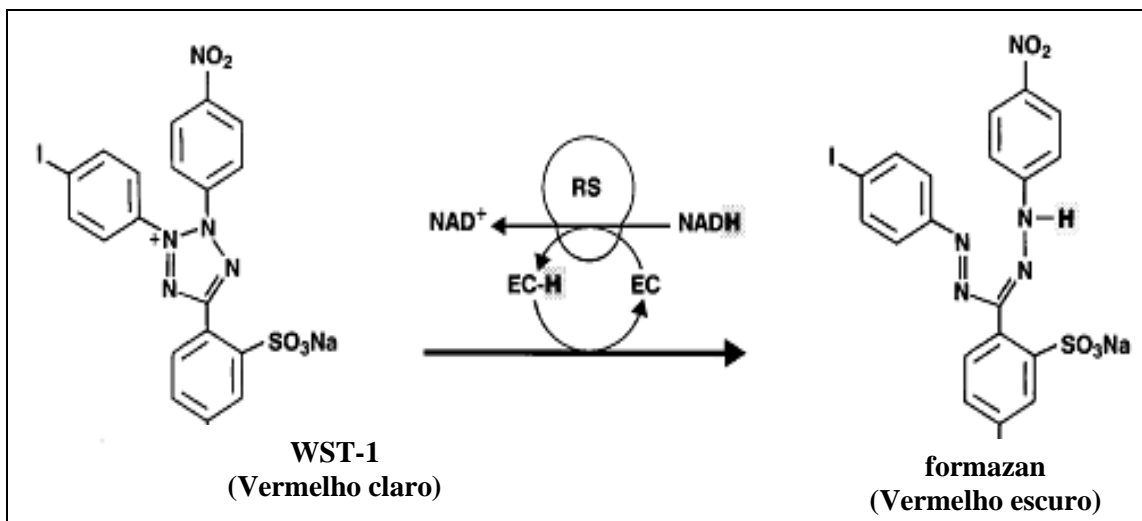
#### **4.2.8 Proliferação e viabilidade celular**

Nos experimentos de proliferação e viabilidade celular foi utilizada a linhagem celular IEC-6, com adaptações da metodologia de Brito *et al.* (2005). As células IEC-6 foram semeadas em placas contendo 96 poços em uma concentração de 2,5x10<sup>5</sup> células/mL e incubadas por 24 horas até atingirem cerca de 70-80% de confluência. As células foram, então, infectadas ou não com 100µL da suspensão das cepas bacterianas de *E. coli* HS, EAEC 042 e selvagem na concentração de 10<sup>5</sup> UFC/mL por 3 horas a 37 °C. Após este período, a suspensão bacteriana foi removida e as células eram lavadas três vezes com 400 µL do tampão PBS. Sequencialmente, as células infectadas foram incubadas com meio celular padrão livre de glutamina adicionado de 200 µg/mL de gentamicina e suplementado ou não com os nutrientes, alanil-glutamina ou betacaroteno. A viabilidade celular foi testada nos tempos de 12, 24 e 48 horas. Para demonstrar que não houve crescimento bacteriano pela efetividade da gentamicina, os sobrenadantes foram removidos e colocados nos frascos de cultura do equipamento Bact Alert ® 3D (Biomérieux, França) que verifica de forma

automatizada a esterilidade das amostras testadas. Para avaliar a proliferação celular foram feitos testes na presença ou ausência dos nutrientes também usando o meio celular padrão livre de glutamina nos mesmos tempos do ensaio de viabilidade.

A proliferação e a viabilidade celular foram realizadas por medida indireta usando o Kit de proliferação celular WST-1 (Roche, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Trata-se de um composto tetrazólico modificado que é reduzido a formazan por células metabolicamente ativas através ação das desidrogenases mitocondriais (NADH) (Figura 9). Assim, a produção de formazan é equivalente à contagem de células viáveis, portanto, uma medida indireta. Foi adicionado 10 $\mu$ L de WST-1 em cada poço, então, a placa foi homogeneizada por 1 minuto e incubada por 2 horas. A leitura da absorbância para quantificação das amostras foi realizada em comprimento de onda de 450nm com referência em 620nm no leitor de microplacas.

Figura 9 - Redução do composto tetrazólico (WST-1) a formazan pelas enzimas mitocondriais em células metabolicamente ativas



Fonte: manual do kit de proliferação celular WST-1 (Roche, Alemanha)

#### 4.2.9 Análise de apoptose e necrose por citometria de fluxo

Para a análise de apoptose e necrose empregou-se a metodologia descrita por Brito *et al.* (2005) com adaptações, utilizando-se da técnica de citometria de fluxo.

Para os experimentos de citometria de fluxo, as células IEC-6 foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL e incubadas por 24 horas até atingirem cerca de 80-95% de confluência. Após esse período, as células foram incubadas ou não com 100µL da suspensão das cepas bacterianas de *E. coli* HS, EAEC 042 e EAEC selvagem na concentração de  $10^5$  UFC/mL por 3 horas a 37 °C. Após a remoção da suspensão bacteriana, as células foram lavadas três vezes com 400 µL do tampão PBS. Em seguida, as mesmas foram incubadas com meio celular padrão livre de glutamina adicionado de 200 µg/mL de gentamicina e suplementado ou não com os nutrientes, L-alanil-L-glutamina ou betacaroteno, durante o tempo de 12, 24 e 48 horas.

Após execução da primeira parte do protocolo, iniciou-se o preparo das células para análise em citometria de fluxo propriamente dita. Para tanto, foi utilizado o *kit RC-ANXF-T100 APOPTOSIS ASSAY* (EXBIO, República Tcheca). Nesse procedimento o sobrenadante de cada grupo (n=3) foi separado em tubo para citometria e mantido em gelo, enquanto as células aderidas eram descoladas com uma solução de 50 µL de tripsina-EDTA e 100 µL de PBS incubando na estufa por 5 minutos. O sobrenadante reservado foi novamente adicionado a cada poço para neutralizar a ação da tripsina e facilitar a remoção das células. Após três lavagens com tampão de ligação (3000 RPM; 5 minutos), repetiu-se a centrifugação e adicionou-se 200 µL de tampão de ligação e 5 µL de anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e 5 µL de PI (iodeto de propídio) sendo incubado por 15-20 minutos no gelo e em ambiente protegido da luz. A suspensão celular foi centrifugada, removido o sobrenadante e adicionados 300 µL de tampão de ligação. Em cada ensaio foram feitas a leitura de pelo menos 10.000 células e os eventos foram adquiridos utilizando o software CellQuest® presente no citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickison, Estados Unidos).

Apoptose é um evento que inclui a translocação da fosfatidilserina (PS) presente na face interna da membrana para o lado externo. Anexina V, proteína de ligação-fosfolipídica dependente de cálcio, tem alta afinidade pelo PS. Então, a anexina marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) apresenta fluorocromos sensíveis que podem ser usados na detecção da exposição das PS usando o citômetro de fluxo. Células que apresentam alta fluorescência no comprimento de onda 515-530 (FL1) são células cuja PS foi marcada com anexina-FITC,

já as células que apresenta fluorescência no comprimento 560-580 (FL2) correspondem à marcação com iodeto de propídio (PI). A marcação positiva para PI indica células necróticas que perderam a integridade da membrana. Porém, a fosfatidilserina, à qual a anexina-FITC se ligou ainda ao interior da membrana celular, não é indicativo de apoptose (PERES; CURI, 2005). Assim, permitindo a distinção entre células apoptóticas e necróticas por citometria de fluxo.

#### **4.2.10 Avaliação da transcrição gênica**

##### *4.2.10.1 Extração do RNA total*

Para análise da transcrição do mRNA as amostras foram preparadas conforme o procedimento descrito item 4.2.9. Os experimentos foram analisados em três tempos. Inicialmente, as células foram recolhidas depois da infecção de 3 horas pelas cepas bacterianas e, após a infecção, nos tempos de 6 e 12 horas com a suplementação ou não do nutrientes alanil-glutamina ou betacaroteno.

Antes da coleta, o sobrenadante de cada grupo (n=3) foi separado em um tubo, e as células aderidas foram tripsinizadas por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se o sobrenadante separado para neutralizar a tripsina. Então, as células foram centrifugadas a 3000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi armazenado em câmara de congelamento a -80 °C até o momento da extração. O processo de extração de RNA foi realizada com o Kit RNeasy Plus Mini (QIAGEN, Hilden, Germany), de acordo com o protocolo do fabricante. Após a finalização do processo de extração, 1µL de RNA total de cada amostra foi dosado com o Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) com a finalidade de verificar a qualidade das amostras e quantificar suas concentrações para fornecer RNA para transcrição em DNA complementar (cDNA).

##### *4.2.10.2 Síntese de cDNA*

A síntese de cDNA foi realizada com o iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo da reação contém 1 µL da enzima transcriptase reversa, 4 µL do tampão 5x iScript Reaction Mix (solução constituída de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), um volume da amostra de RNA uniformizado para 200ng/µL e água livre de nuclease em volume suficiente para completar

20µL. O protocolo padrão do termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, USA) foi 25° C por 5 min., 42° C por 30 min., 85° C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20° C até sua posterior utilização no PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

#### 4.2.10.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Como mostra a Tabela 4, foram avaliados na transcrição do mRNA os genes relacionados com o processo de proliferação celular (FOS e JUN), do sistema apoptótico (caspases 8, 9 e 3) e os envolvidos no processo imune e inflamatório (TGF-β1, NF-κB p65 e IL-8) com o aparelho do iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos). O gene de referência utilizado foi o YWHAZ da fosfolipase A2 (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide*) (CHEN *et al.*, 2007).

Para a reação foi utilizado 10 µL da Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inglaterra), 2 µL de cada iniciador (0,2 µM) e 1 µL de cDNA das amostras completando com água livre de nuclease para um volume final de 20µL. Os iniciadores utilizados e as condições da qPCR estão descritos na Tabela 4. Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de *melting*, realizada para assegurar a especificidade da amplificação e detectar a formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico.

Os valores do *quantification cycle* (C<sub>q</sub> ou C<sub>t</sub>) para os genes testados foram exportados para o Microsoft Excel (Microsoft, Estados Unidos) e os níveis relativos de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia 2-ΔΔCT, qual ΔΔCT = (C<sub>T</sub> gene alvo – C<sub>T</sub> gene referência do grupo tratado) / (C<sub>T</sub> gene alvo – C<sub>T</sub> gene referência do controle), como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 4 – Sequência de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados

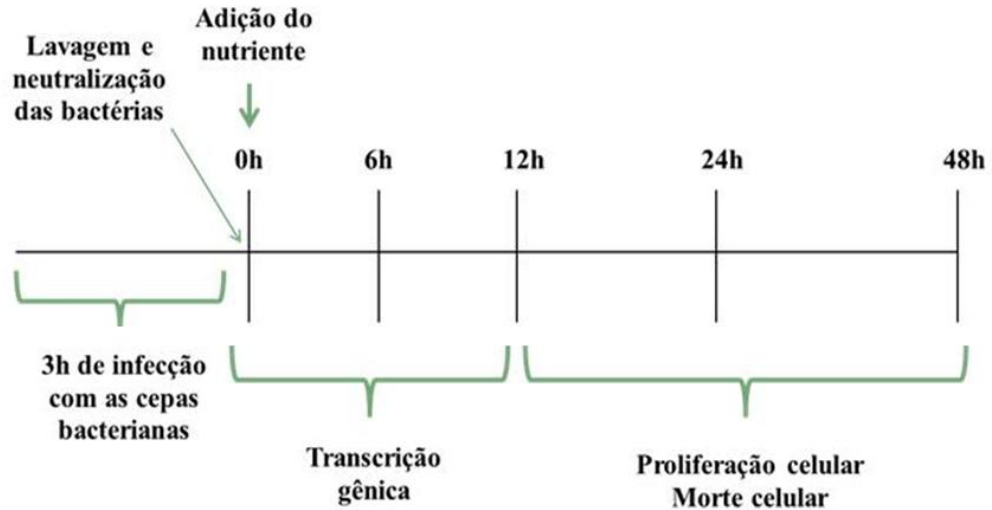
Processo relacionado	Gene	Sequência do iniciador (5'→3')	Produto (pb)	Nº Genbank	Condições de PCR	Fonte
Proliferação	<i>JUN</i>	S:GCTGAGTGTCTGTATGCTGGG A:GGACTTGTGGGTTGCTGGG	119	NM_021835.3	95°C-20'' 60°C-20'' 72°C-45''	QIN; MENG, 2006
	<i>FOS</i>	S:GCCTTCACCCTGCCTCTTC A:GCTCCATGTTGCTAATGTTCTTGA	79	NM_022197.2	95°C-20'' 60°C-20'' 72°C-45''	QIN; MENG, 2006
Morte celular	<i>Caspase 3</i>	S:GCTGGACTGCGGTATTGAG A:CGGGTGCAGTAGAGTAAGC	104	NM_012922.2	95°C-20'' 60°C-20'' 72°C-45''	HUANG <i>et al.</i> , 2011
	<i>Caspase 9</i>	S:AGCCAGATGCTGTCCCATAC A: CAGGAACCGCTCTTCTTGTC	148	NM_031632.1	95°C-20'' 60°C-20'' 72°C-45''	BACKER; HEPPLER, 2006
	<i>Caspase 8</i>	S:CTGGGAAGGATCGACGATTA A:TGGTCACCTCATCCAAAACA	100	NM_022277.1	95°C-20'' 60°C-20'' 72°C-45''	BACKER; HEPPLER, 2006
Resposta imune inata	<i>TGF-β1</i>	S:GGGCTACCATGCCAACTTCTG A:GAGGGCAAGGACCTTGCTGTA	150	NM_021578	95°C-20'' 60°C-20'' 72°C-45''	LIU <i>et al.</i> , 2008
	<i>NF-κB p65</i>	S:ACGATCTGTTTCCCCTCATC A:TGCTTCTCTCCCCAGGAATA	150	AF079314.1	95°C-20'' 58,5°C-20'' 72°C-45''	ZHU <i>et al.</i> , 2008
	<i>IL-8</i>	S:GATGGCGTCTGTCTGGTGAA A:GATGAAACGCATCCACATCG	159	NM_030845.1	95°C-20'' 61°C-20'' 72°C-45''	HUANG <i>et al.</i> , 2011
Referência	<i>YWHAZ</i>	S: GCTACTTGGCTGAGGTTGCT A: TGCTGTGACTGGTCCACAAT	120	NM_013011.3	95°C-20'' 60°C-20'' 72°C-45''	CHEN <i>et al.</i> , 2007

Legenda: (S: senso; A: antisenso). Fonte: Dados do estudo

### 4.3 Linha do tempo do procedimento experimental

As cepas bacterianas foram incubadas com as células durante 3 horas, em seguida as células foram lavadas três vezes com PBS e adicionada gentamicina para neutralizar as bactérias. Logo após, foi suplementado com o nutriente ou não na presença das células e feito às avaliações de transcrição gênica nos tempos de 0, 6 e 12 horas. Em relação aos procedimentos experimentais de morte celular e proliferação, foram analisados os tempos de 12, 24 e 48 horas (Figura 10).

Figura 10 - Representação esquemática da cronologia dos procedimentos experimentais utilizados no presente estudo.



Fonte: dados do estudo.

### 4.4 Análise Estatística

Os testes envolvendo apoptose, necrose, proliferação e viabilidade celular foram analisados por análise de variância (ANOVA) com correção de Bonferroni através do programa *GraphPad Prism 5.0*. O intervalo de confiança foi de 95% e o teste foi considerado estatisticamente significativo quando  $p < 0.05$ .



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das cepas de *E.coli* utilizadas

#### 5.1.1 Avaliação bioquímica cepas *E.coli*

De acordo com as provas bioquímicas realizadas para caracterizar o metabolismo da cepa selvagem verificaram-se diferenças em relação às outras cepas do estudo. A cepa de EAEC padrão (042) e a *E.coli* HS comensal apresentaram características bioquímicas semelhantes, contudo a *E. coli* selvagem reagiu com enzima L-ornitina descaborexilase, oxidou L-sucrose a sacarose e apresentou-se não reativa em relação a L-raminose como mostra o Quadro 1.

Quadro 1 – Resultados dos testes do kit API 20E<sup>®</sup> utilizados para caracterização bioquímica das três cepas de *E. coli* em estudo.

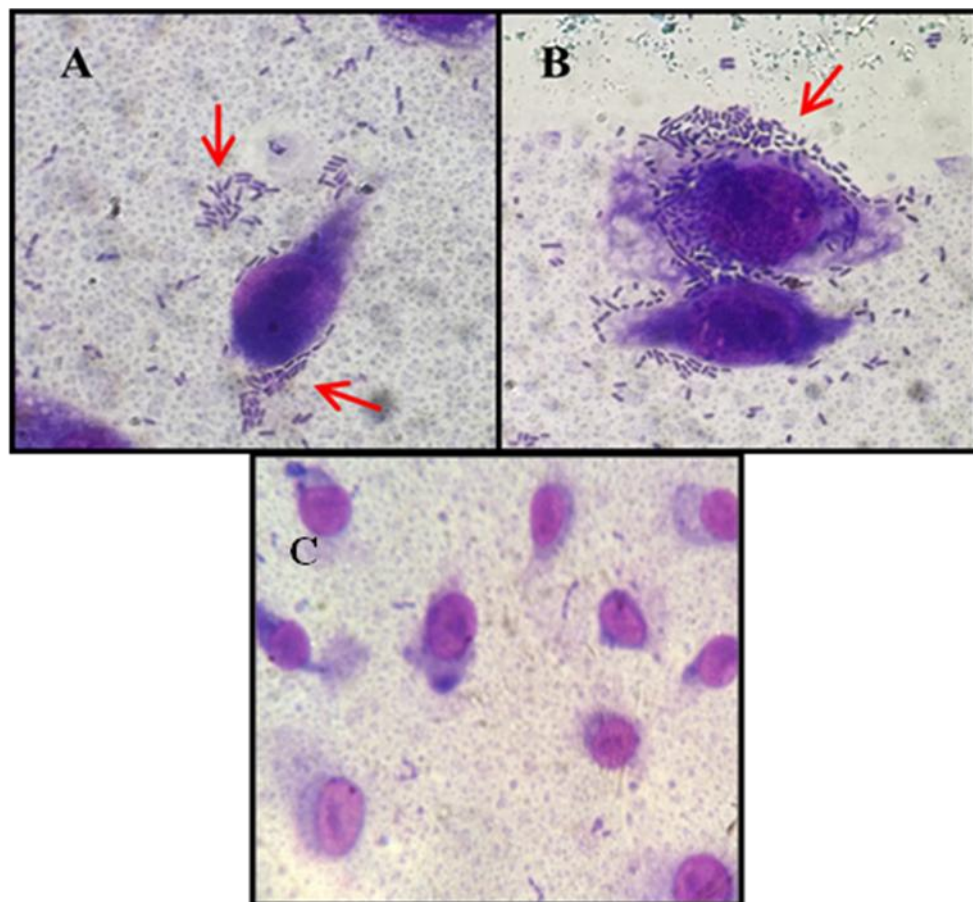
Ingrediente ativo	Reações/Enzimas	Cepas de <i>E. coli</i>		
		EAEC 042	<i>E. coli</i> selvagem	<i>E. coli</i> HS
ONPG <sup>1</sup>	Beta-galactosidase	+	+	+
L-arginina	Arginina dihidrolase	-	-	-
L-lisina	Lisina descarboxilase	+	+	+
L- ornitina	Ornitina descarboxilase	-	+	-
Citrato de trisódio	Utilização de citrato	-	-	-
Tiosulfato de sódio	Produção de H <sub>2</sub> S	-	-	-
Ureia	Urease	-	-	-
L-triptofano	Triptofano desaminase	-	-	-
L-triptofano	Produção de indol	+	+	+
Piruvato de sódio	Produção de acetoína	-	-	-
Gelatina	Gelatinase	-	-	-
D-Glucose	Fermentação/oxidação	+	+	+
D-Manitol	Fermentação/oxidação	+	+	+
Inositol	Fermentação/oxidação	-	-	-
D-sorbitol	Fermentação/oxidação	+	+	+
L-raminose	Fermentação/oxidação	+	-	+
D-sucrose	Fermentação/oxidação	-	+	-
D-melibiose	Fermentação/oxidação	+	+	+
Amigdalina	Fermentação/oxidação	-	-	-
L-arabinose	Fermentação/oxidação	+	+	+

Legenda: (+) positivo e (-) negativo; <sup>1</sup> orto-nitrofenol-beta-galacto-piranosideo; Observação: os quadros hachurados assinalam a diferença no parâmetro avaliado. Fonte: dados do estudo.

### 5.1.2 Avaliação do padrão de aderência das cepas de *E.coli*

O padrão de aderência bacteriano é o diagnóstico “ouro” para confirmação de cepas EAEC em células HEp-2. Então, os resultados obtidos confirmam a cepa *E. coli* selvagem como enteroagregativa da mesma forma que a cepa padrão EAEC 042, enquanto a *E. coli* HS não apresenta o padrão de aderência similar (Figura 11). Como mostra a Figura 11, as setas indicam a agregação de bacilos em diversos pontos da superfície de vidro e nas células em formações semelhantes a “tijolos empilhados”.

Figura 11 - Padrão de aderência das cepas de EAEC coradas com May-Grunwald-Giemsa em células HEp-2

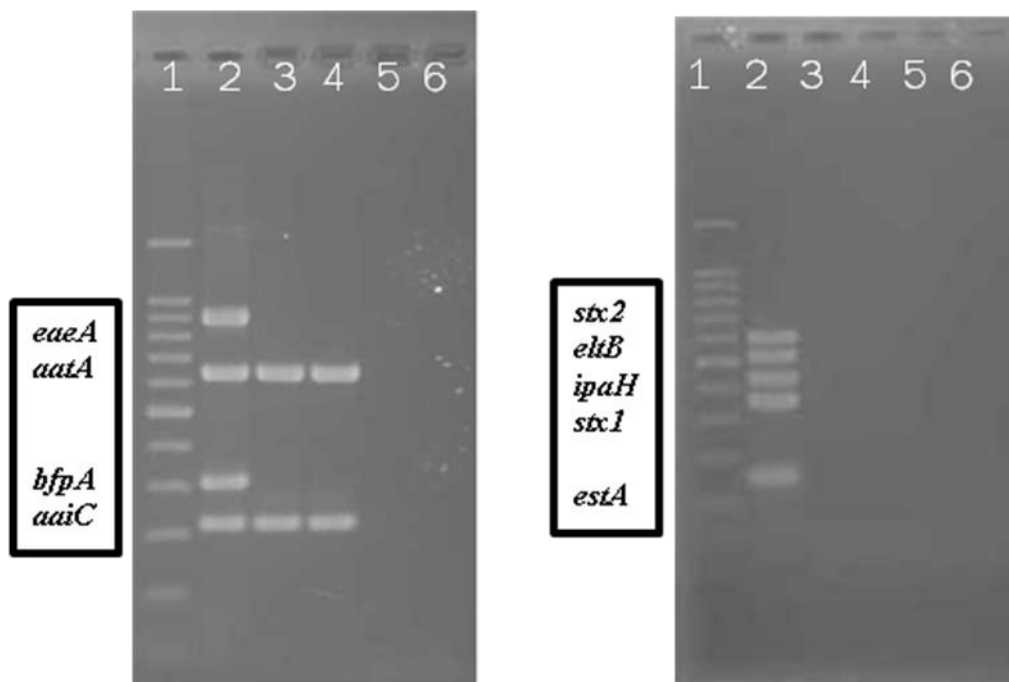


Legenda: As setas vermelhas apontam para os agregados bacterianos. Aumento de 1000X. A –EAEC 042; B – EAEC selvagem; C *E. coli* HS Fonte: dados do estudo.

### 5.1.3 Caracterização molecular das cepas de *E.coli*

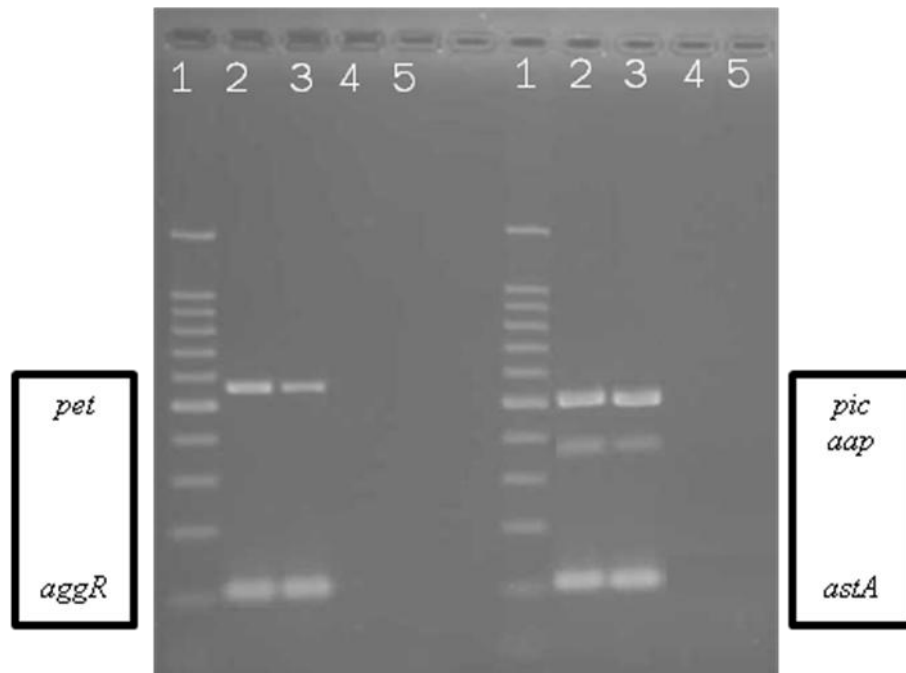
Para o diagnóstico molecular de EAEC foi verificada a presença dos genes *aaiC* e *aatA* (genes descritos Tabela 2) nas cepas de *E. coli* selvagem e EAEC 042. A presença de tais genes caracteriza as duas cepas de EAEC do presente estudo como sendo enteroagregativa. Já a cepa comensal *E. coli* HS não possui nenhum dos genes investigados conforme a figura 12, prova molecular que a cepa HS não possui os genes que a caracterizam como *E. coli* do subtipo enteroagregativa. Como mostra a figura 13, a cepa controle positivo de EAEC 042 e a cepa EAEC selvagem evidenciam a presença dos genes de virulência avaliados, exceto o gene *sat* (genes descritos Tabela 3). Na cepa comensal *E. coli* HS os demais genes de virulência estavam ausentes.

Figura 12 - Detecção dos genes de diagnóstico de cepas diarreio gênicas de *E. coli*



Legenda: As cepas patogênicas utilizadas mostram a presença apenas dos genes de EAEC, *aaiC* e *aatA*. Enquanto que a cepa comensal *E. coli* HS não possui nenhum dos genes investigados. 1- Marcador molecular 100pb; 2- Controle positivo da reação (DNA das cinco cepas diarreio gênicas de *E. coli*); 3- EAEC 042; 4- EAEC selvagem; 5- *E. coli* HS; 6- Controle negativo da reação de PCR.

Figura 13 - Detecção dos genes de virulência das cepas de EAEC



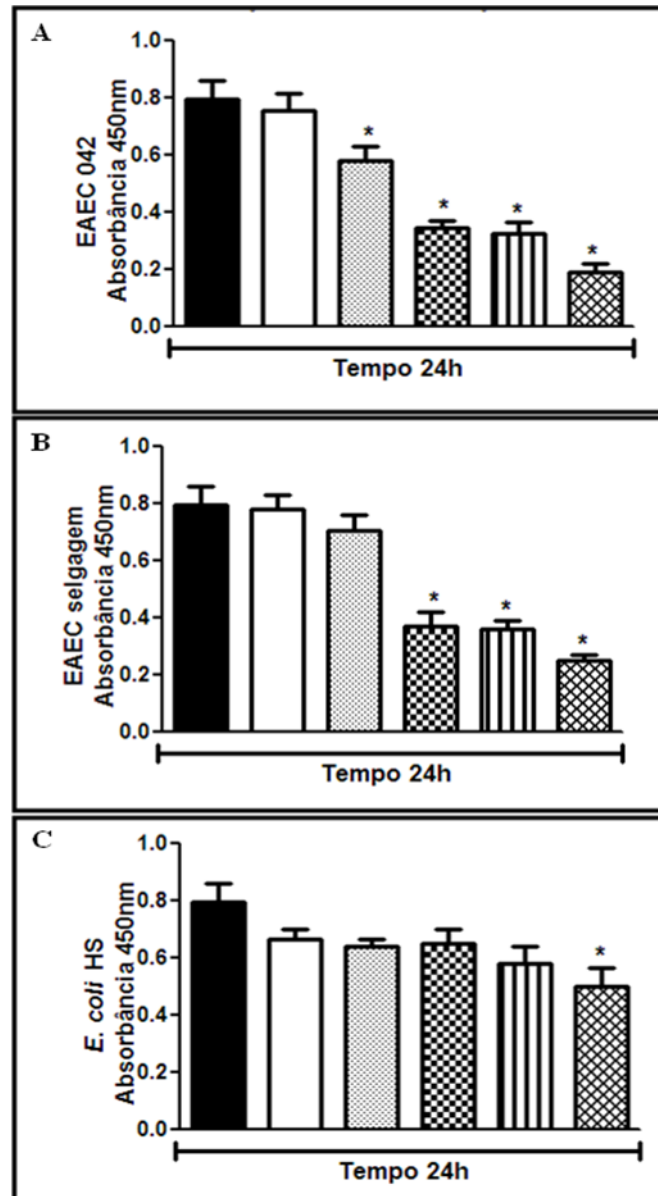
Legenda: A cepa controle positivo de EAEC 042 e da cepa EAEC selvagem apresentaram os mesmos genes em estudo. Na cepa comensal *E. coli* HS os genes de virulência estavam ausentes. 1- Marcador molecular 100pb; 2- Controle positivo da reação (EAEC 042); 3- EAEC selvagem; 4- *E. coli* HS; 5- Controle negativo da reação de PCR.

## 5.2 Efeito de cepas EAEC e da *E.coli* HS na monocamada das células intestinais

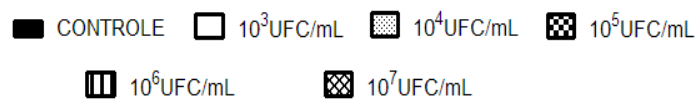
### 5.2.1 Viabilidade celular

O efeito da viabilidade celular foi avaliado, inicialmente no tempo de 24 horas, após a infecção de 3 horas das cepas de *E. coli* para determinar a concentração do inóculo bacteriano a ser escolhido tomando como parâmetro a cepa padrão EAEC 042. A concentração bacteriana  $10^5$  UFC/mL da cepa 042 determinou concentração letal em 50% da população (CL50%) em relação ao grupo controle e por isso foi a concentração eleita para os todos os experimentos. A EAEC selvagem assim como a EAEC 042 demonstraram a capacidade de reduzir a viabilidade celular na concentração de  $10^5$  UFC/mL, contudo a *E. coli* HS, cepa não patogênica, quando utilizada na mesma concentração, não causou dano significativo em relação ao controle, como mostra o Gráfico 1.

Gráfico 1 - Avaliação da viabilidade celular intestinal no tempo de 24 horas, após 3 horas de infecção dos inóculos das cepas de *E.coli* nas concentrações de  $10^3$ - $10^7$  UFC/mL para determinação da concentração bacteriana escolhida



Legenda:



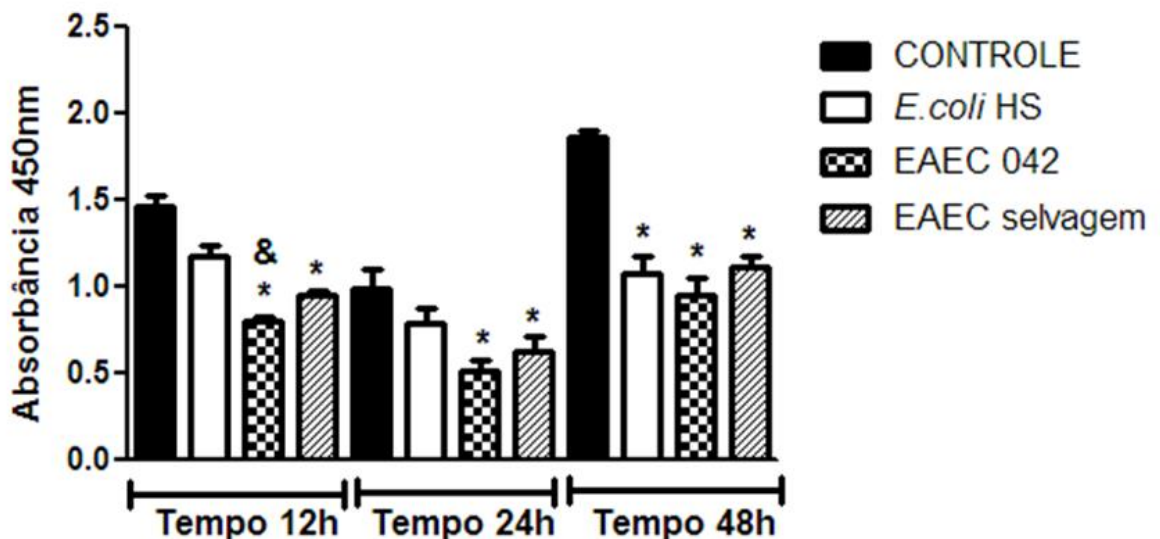
A- EAEC 042; B- EAEC selvagem e C- *E. coli* HS

(\*) Significativo em relação ao grupo controle não-infectado ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni

Uma vez que a concentração bacteriana de  $10^5$  UFC/mL foi eleita como a concentração do inóculo mais adequada, foram realizados ensaios para determinar a curva tempo-efeito das cepas *E. coli* sobre viabilidade celular intestinal após 12, 24 e 48 horas do término da infecção de 3 horas. A redução da viabilidade das células foi verificada tanto na cepa padrão EAEC 042 como na EAEC selvagem ao longo dos períodos citados. Contudo a *E. coli* HS causou danos significativos em relação ao controle a partir de um tempo tardio de 48 horas. EAEC 042 induziu um decréscimo da viabilidade celular significativamente maior quando comparado também à cepa comensal *E. coli* HS no tempo de 12 horas (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Curva tempo-efeito das cepas bacterianas com a concentração de  $10^5$  UFC/mL na viabilidade celular intestinal após 12, 24 e 48 horas do término da infecção.



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo controle não-infectado ( $p < 0,05$ ).

(&) Significativo em relação à cepa comensal *E. coli* HS ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

### 5.2.2 *Transcrição de genes relacionados à viabilidade celular*

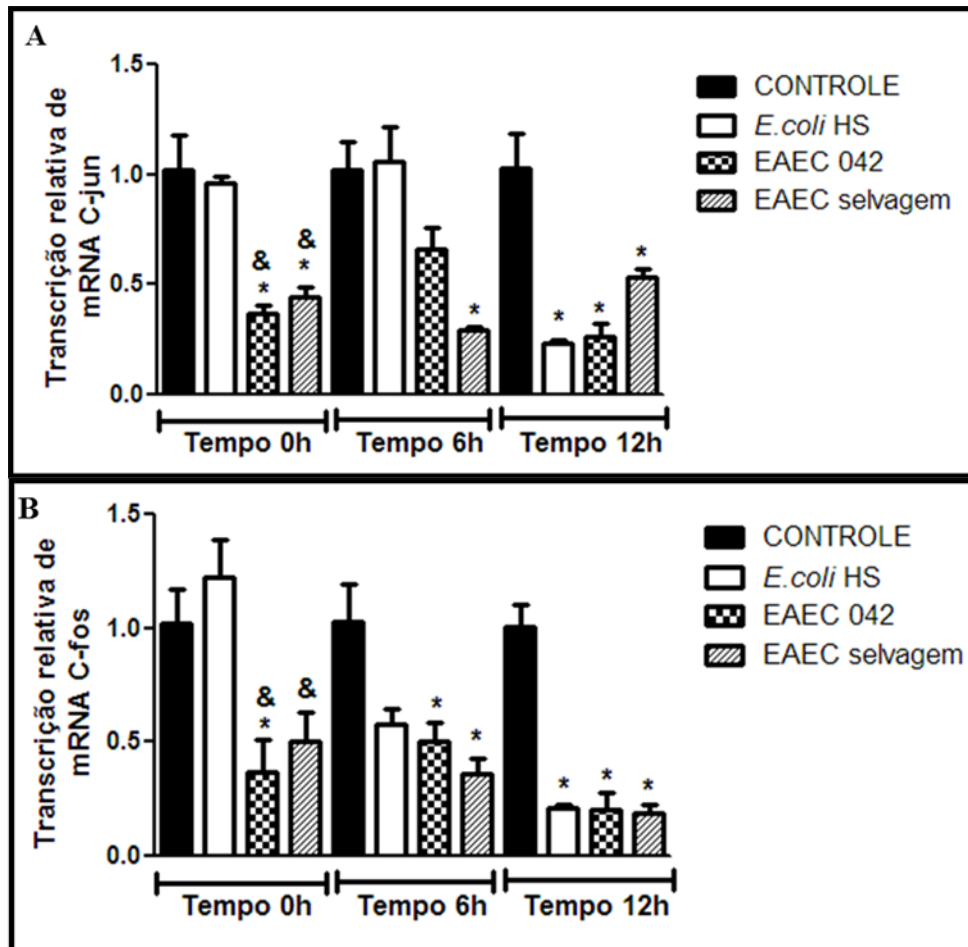
O Gráfico 3 mostra a curva tempo-efeito das cepas bacterianas com a concentração de  $10^5$  UFC/mL em relação aos níveis relativos da transcrição dos genes c-jun e c-fos, associados ao processo de viabilidade celular intestinal no término das 3h de infecção (0h), e nos tempos de 6 e 12 horas após a infecção.

No Gráfico 3A, a cepa EAEC 042 apresenta diminuição de transcrição de c-jun em todos os tempos em relação ao controle, enquanto a EAEC selvagem apresenta também redução de transcrição de c-jun em 0 e 12 horas. A cepa comensal *E.coli* HS só decresceu os níveis de transcrição c-jun em 12 horas. Além disso, foi verificado redução significativa de c-jun no tempo 0h nos grupos EAEC 042 e EAEC selvagem quando comparados com *E.coli* HS.

A transcrição relativa de c-fos, vista no Gráfico 3B, mostra que a EAEC 042 apresenta diminuição de transcrição de c-fos em todos os tempos em relação ao controle, enquanto a EAEC selvagem apresentou também redução de transcrição de c-fos a partir da 6 horas. A *E.coli* HS só decresceu os níveis de transcrição c-fos no tempo de 12 horas. Além disso, foi verificada uma redução significativa de c-jun no tempo 0h nos grupos EAEC 042 e EAEC selvagem quando comparados com *E.coli* HS.



Gráfico 3 - Curva tempo-efeito das cepas bacterianas sobre a transcrição relativa dos genes c-jun (A) e c-fos (B) avaliados ao término da infecção (0h) e após 6 e 12h



Legenda

(\*) Significativo em relação ao grupo controle não-infectado ( $p < 0,05$ ).

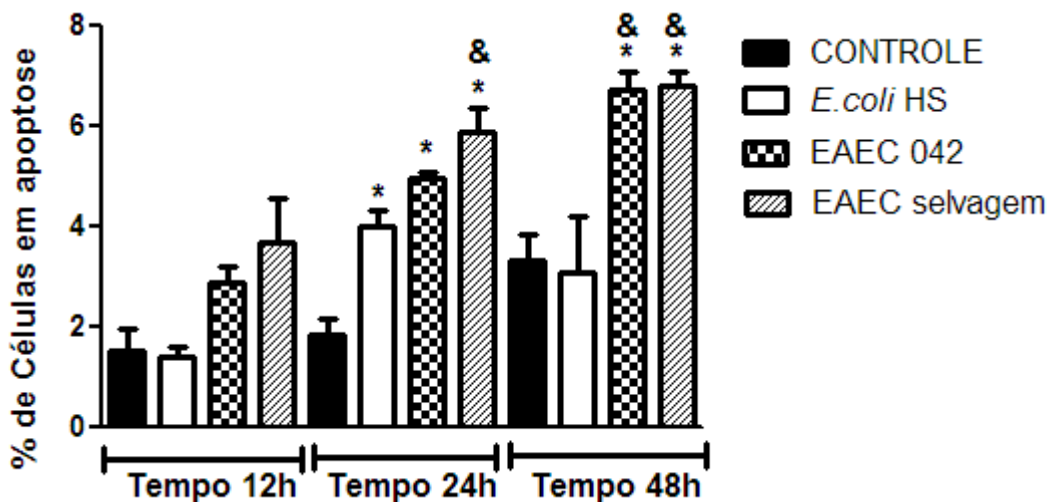
(&) Significativo em relação à cepa comensal *E. coli* HS ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

### 5.2.3 Morte celular

Para avaliar o percentual de apoptose das células intestinais, construímos uma curva tempo-efeito das cepas bacterianas com a concentração de  $10^5$  UFC/mL após 12, 24 e 48 horas do término da infecção (Gráfico 4). O percentual de aumento das células apoptóticas foi verificado tanto na cepa padrão EAEC 042 como na EAEC selvagem a partir do tempo de 12 horas, enquanto a *E. coli* HS gerou danos significativos em relação ao controle apenas no tempo de 12 horas. EAEC 042 induziu um aumento no percentil de apoptose celular significativamente maior quando comparado à cepa comensal *E. coli* HS no tempo de 12 e 48 horas. No caso da EAEC selvagem em relação *E. coli* HS só ocorreu crescimento de células apoptóticas no tempo tardio de 48 horas.

Gráfico 4 - Curva tempo-efeito das cepas bacterianas na avaliação do percentual de apoptose de células intestinais após 12, 24 e 48 horas do término da infecção



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo controle não-infectado ( $p < 0,05$ ).

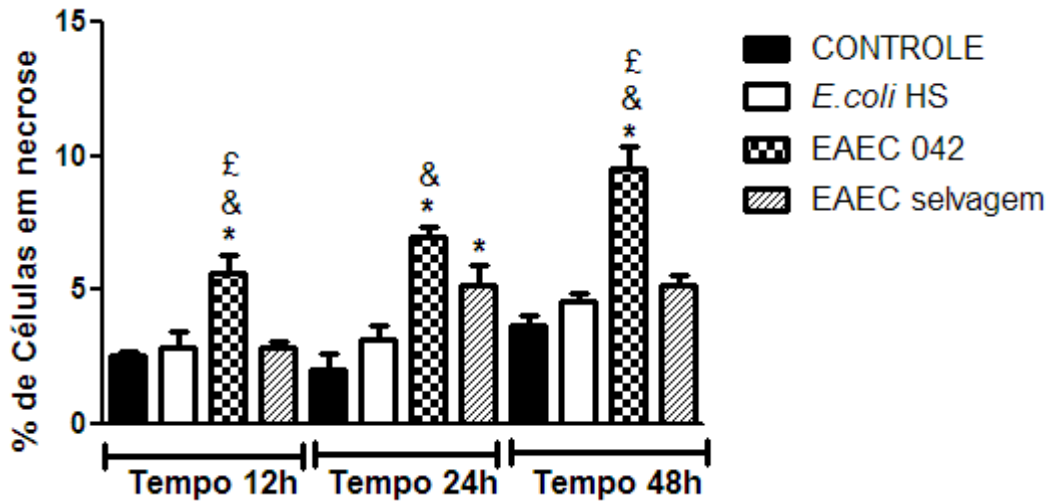
(&) Significativo em relação à cepa comensal *E. coli* HS ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

Um aumento do percentual de células necróticas foi verificado com a cepa padrão EAEC 042 em todos os tempos, enquanto que com a cepa EAEC selvagem esse aumento ocorreu no tempo de 24 horas e manteve-se o dano constante até 48 horas. Em relação à cepa *E. coli* HS, não houve danos significativos. EAEC 042 induziu um aumento do percentil de necrose celular significativamente maior quando comparado à cepa *E. coli* HS em todos os

tempos e também relacionada à EAEC selvagem em 12 e 48 horas, conforme mostra o Gráfico 5.

Gráfico 5 - Curva tempo-efeito das cepas bacterianas na avaliação do percentual de necrose de células intestinais após 12, 24 e 48 horas do término da infecção



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo controle não-infectado ( $p < 0,05$ ).

(&) Significativo em relação à cepa comensal *E. coli* HS ( $p < 0,05$ ).

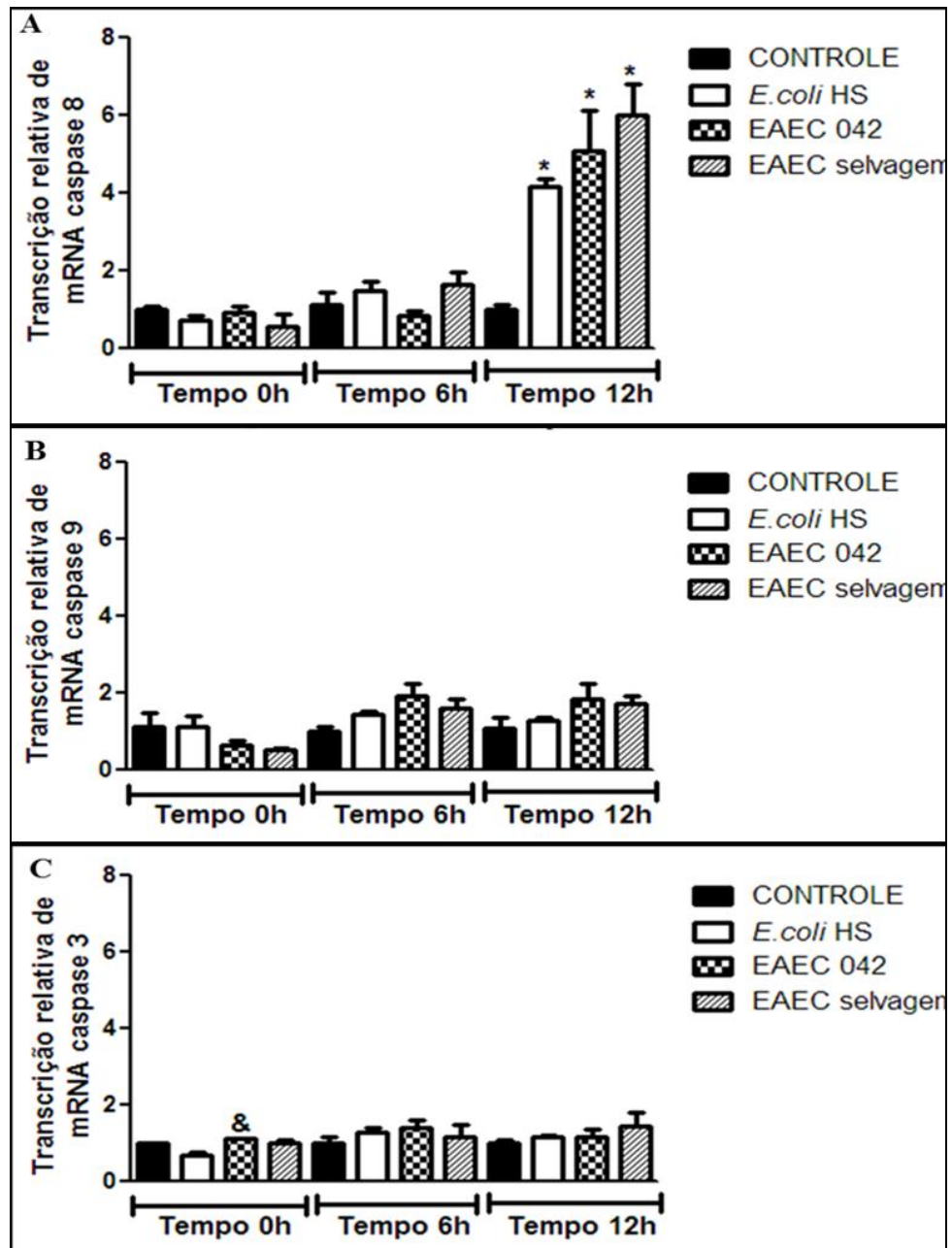
(£) Significativo em relação à EAEC selvagem ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

#### 5.2.4 Transcrição de genes relacionados à apoptose celular

Em relação à curva tempo-efeito das cepas bacterianas sobre os níveis relativos de transcrição dos genes relacionados ao processo de apoptose celular, foram avaliados os genes das caspases 8, 9 e 3, conforme o Gráfico 6 (A, B e C), no término das 3h de infecção (0h), e nos tempos de 6 e 12 horas após a infecção. As principais alterações foram verificadas na transcrição de caspase 8, como mostra o Gráfico 6A onde se verifica aumento dos níveis transcricionais no tempo 12 horas das cepas de *E. coli* em relação ao controle, enquanto em 0 e 6 horas não há modificações de caspase 8. Na avaliação de caspase 9, visto no Gráfico 6B, não houve alterações significativas em nenhum dos tempos analisados. No caso da caspase 3, apenas o grupo EAEC 042 exibiu aumento do nível transcricional em relação à cepa comensal *E. coli* HS na análise realizada ao término da infecção (0h).

Gráfico 6 - Curva tempo-efeito das cepas bacterianas sobre a transcrição relativa dos genes caspase 8 (A), caspase 9 (B) e caspase 3 (C) avaliados ao término da infecção (0h) e após 6 e 12h



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo controle não-infectado ( $p < 0,05$ ).

(&) Significativo em relação à cepa comensal *E. coli* HS ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

### 5.2.5 *Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune inata.*

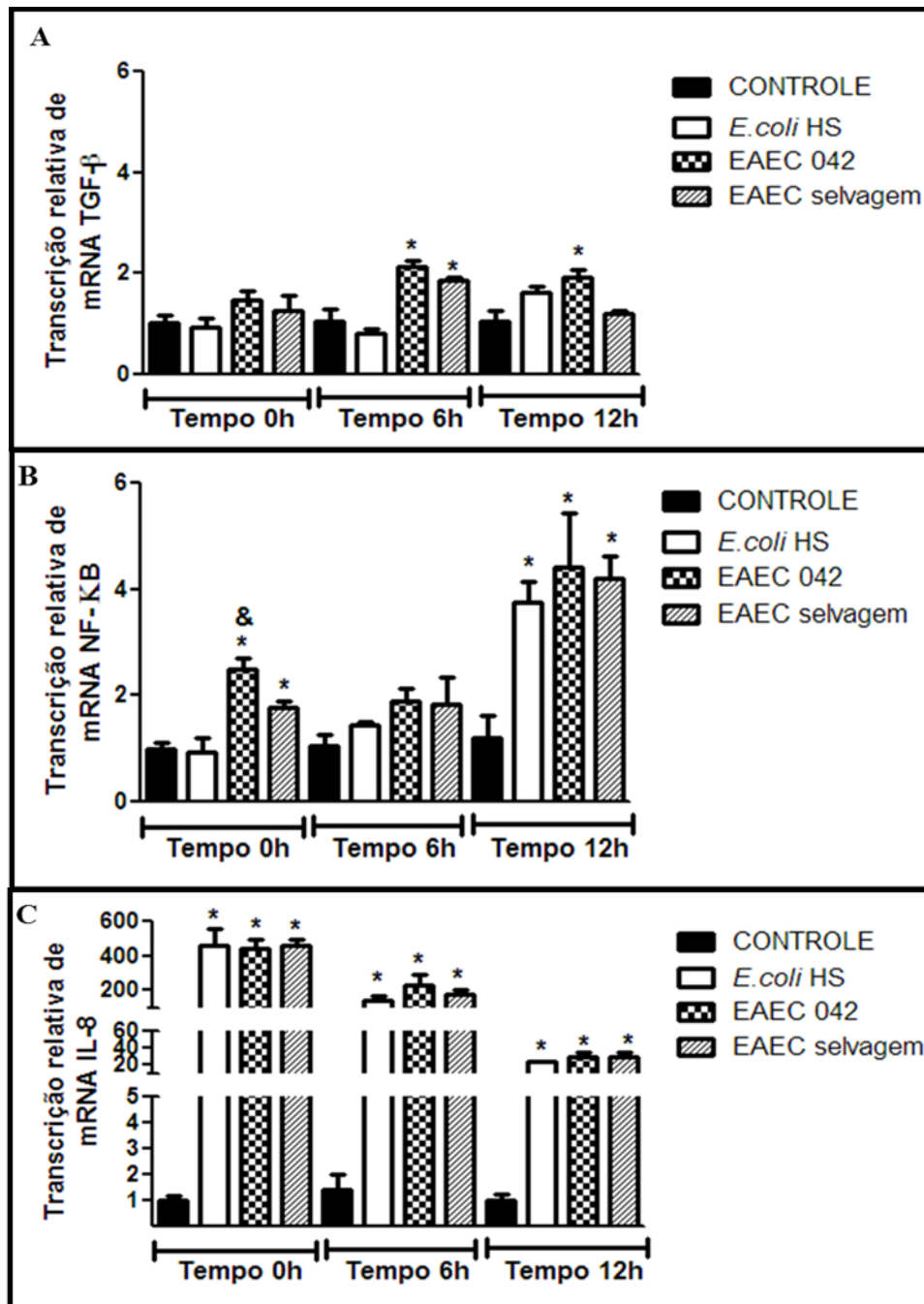
Os genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune, TGF- $\beta$ , NF-kB e IL-8, foram avaliados ao término das 3h infecção (0h), e nos tempos de 6 e 12 horas após a infecção, conforme mostra o Gráfico 7 (A, B e C).

No que diz respeito à transcrição de TGF- $\beta$ , verificou-se diferença significativa no grupo de EAEC 042 quando comparado ao grupo controle no tempo de 6 e 12h. Percebeu-se também a indução do aumento da transcrição do TGF- $\beta$  da EAEC selvagem em relação ao grupo controle apenas no tempo de 6h como mostra o Gráfico 7A.

Conforme mostrado no Gráfico 7B, houve aumento significativo dos níveis de transcrição de NF-kB no grupo EAEC 042 e EAEC selvagem quando comparados ao controle nos tempos de 0 e 12h. Já o grupo *E.coli* HS exibiu aumento da transcrição de NF-kB apenas no tempo de 12h. Além disso, no tempo de 0h é visto um crescimento da transcrição de NF-kB da EAEC 042 em relação à *E.coli* HS.

A transcrição relativa de IL-8, visto no Gráfico 7C, mostrou significativo acréscimo do nível relativo desse gene em todos os grupos infectados em todos os tempos. O Gráfico mostra ainda uma tendência temporal de redução do nível de IL-8.

Gráfico 7- Curva tempo-efeito das cepas bacterianas sobre a transcrição relativa dos genes TGF- $\beta$  (A), NF-kB (B) e IL-8 (C) avaliados ao término da infecção (0h) e após 6 e 12h



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo controle não-infectado ( $p < 0,05$ ).

(&) Significativo em relação à cepa comensal *E. coli* HS ( $p < 0,05$ ).

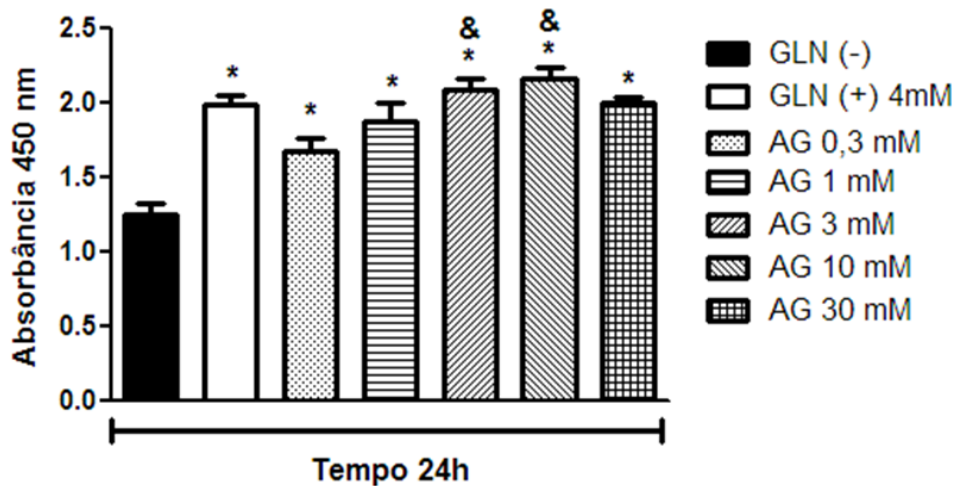
A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

### 5.3 Efeito da L-alanil-L-glutamina (AG) na monocamada das células intestinais

#### 5.3.1 Proliferação celular

O efeito da proliferação celular foi avaliado, inicialmente no tempo de 24 horas, para determinar a concentração a ser escolhido entre 0,3 - 30mM de AG. A concentração de AG 1mM determinou aproximadamente 50% de proliferação celular em relação ao grupo controle, meio sem glutamina (GLN -), como mostra o Gráfico 8. Foi, portanto, a concentração eleita para os experimentos posteriores. Nesse gráfico verifica-se ainda que as concentrações de AG 3 e 10 mM determinaram um aumento significativo da proliferação das células em relação ao grupo AG 0,3mM. No mesmo gráfico é possível verificar que o meio suplementado com a concentração padrão de glutamina (4mM) também causa um aumento significativo da proliferação celular em relação ao meio sem glutamina.

Gráfico 8 - Avaliação da proliferação celular intestinal no tempo de 24 horas nas concentrações de 0,3 – 30mM de AG



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo GLN (-) ( $p < 0,05$ ).

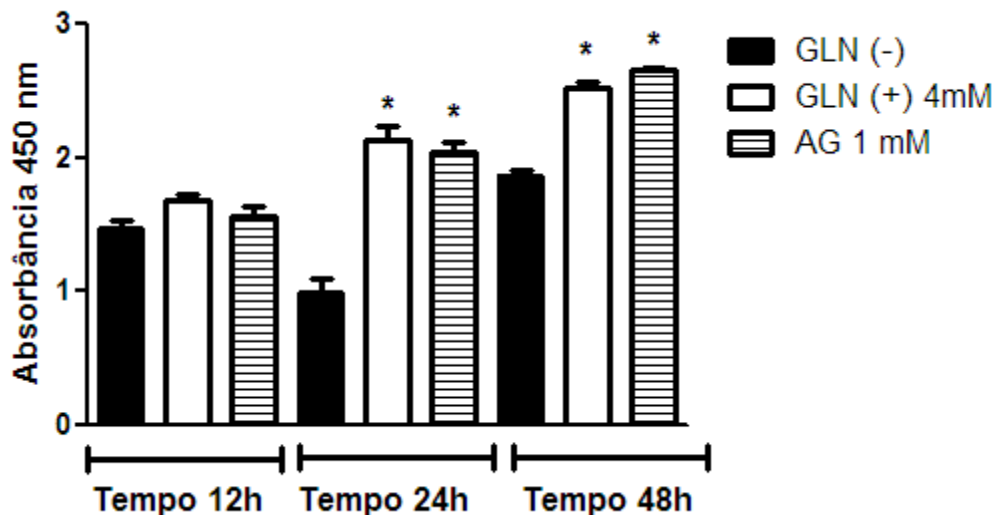
(&) Significativo em relação ao grupo AG 0,3 mM ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

Uma vez que a concentração de AG 1mM foi escolhida para dar continuidade aos estudos subsequentes, foi realizada uma curva tempo-efeito para analisar a proliferação celular intestinal nos tempos de 12, 24 e 48 horas. Conforme mostra o Gráfico 9, verifica-se

que a partir das 12 horas há uma crescente proliferação das células dos grupos de AG 1mM e GLN (+) 4mM.

Gráfico 9 - Curva tempo-efeito da AG 1mM na avaliação da proliferação das células intestinais por 12, 24 e 48 horas



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo GLN (-) ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

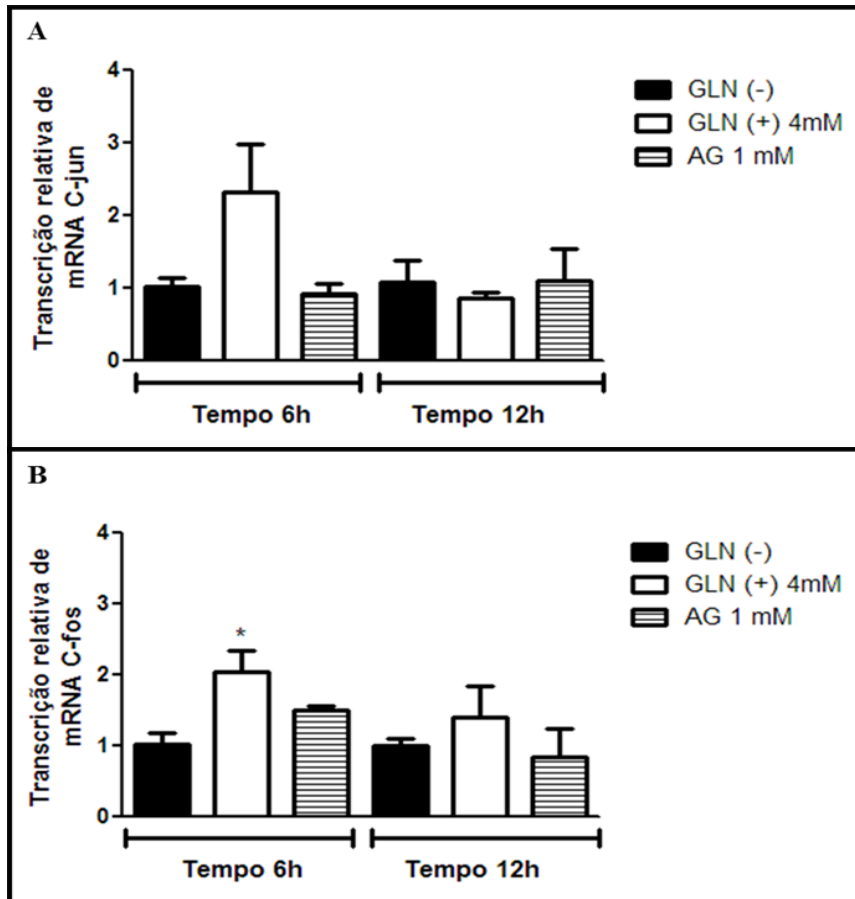
### 5.3.2 Transcrição de genes relacionados à proliferação celular

O efeito da AG 1mM em relação aos níveis relativo da transcrição dos genes associados ao processo de proliferação celular intestinal, *c-jun* e *c-fos*, respectivamente, conforme visto no Gráfico 10 (A e B), foram avaliados em 6 e 12 horas.

No Gráfico 10A, não houve correlação significativa entre os grupos, contudo é possível visualizar um leve aumento da transcrição de *c-jun* do grupo GLN(+) 4mM em relação ao GLN(-). Em respeito ao Gráfico 10B, houve elevação da transcrição de *c-fos* do grupo GLN(+) 4mM quando comparado ao grupo GLN(-).



Gráfico 10 - Transcrição relativa dos genes c-jun (A) e c-fos (B) em células IEC-6 suplementadas com AG 1mM avaliados em 6 e 12h



Legenda:

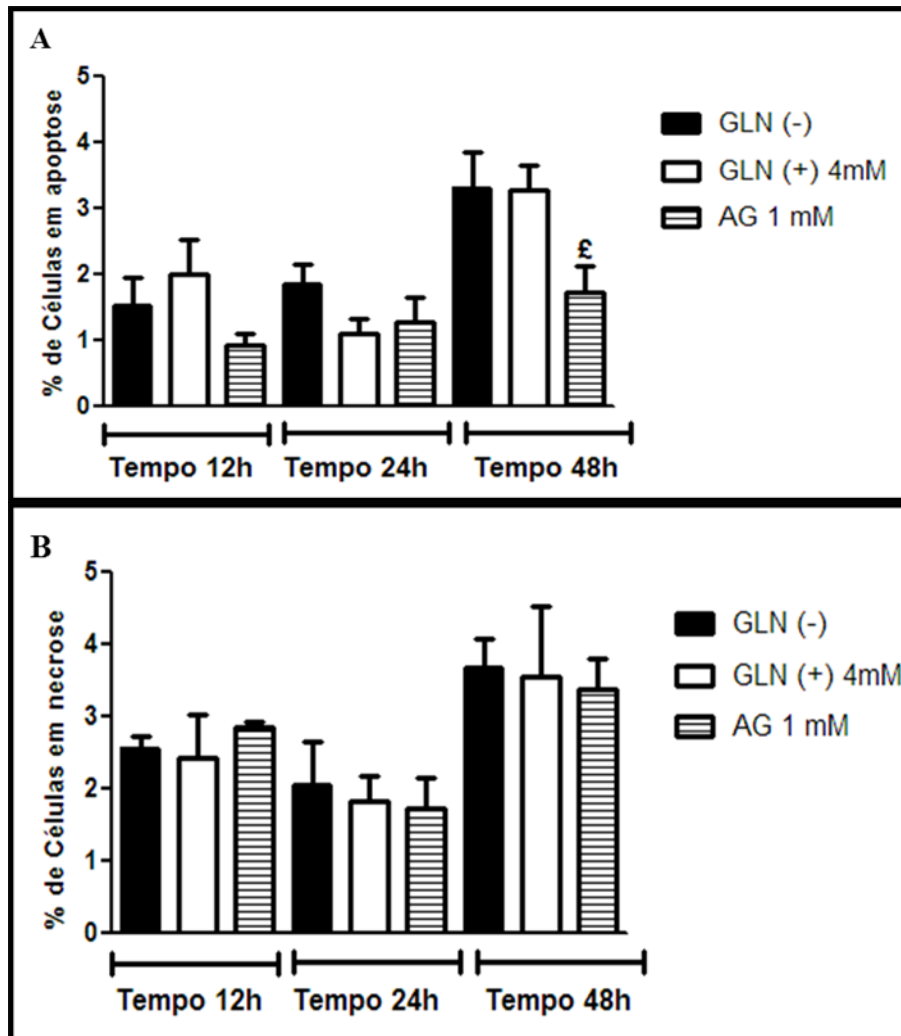
(\*) Significativo em relação ao grupo GLN (-) ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

### 5.3.3 Morte celular

Foi realizada a curva tempo-efeito para quantificar o percentual de morte celular através das medidas de apoptose e necrose, nos tempos de 12, 24 e 48 horas. Conforme mostra o Gráfico 11A, a única correlação significativa encontrada foi uma diminuição do percentual de apoptose do grupo AG 1mM em relação ao grupo GLN (+) em 48 horas. Em relação ao percentual de necrose não houve alterações como visto no Gráfico 11B.

Gráfico 11 – Curva tempo-efeito da AG 1mM na avaliação da morte celular, apoptose (A) e necrose (B), pelo percentual de células intestinais no tempos de 12, 24 e 48 horas



Legenda:

(£) Significativo em relação ao grupo GLN (+) 4mM. (p<0,05).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

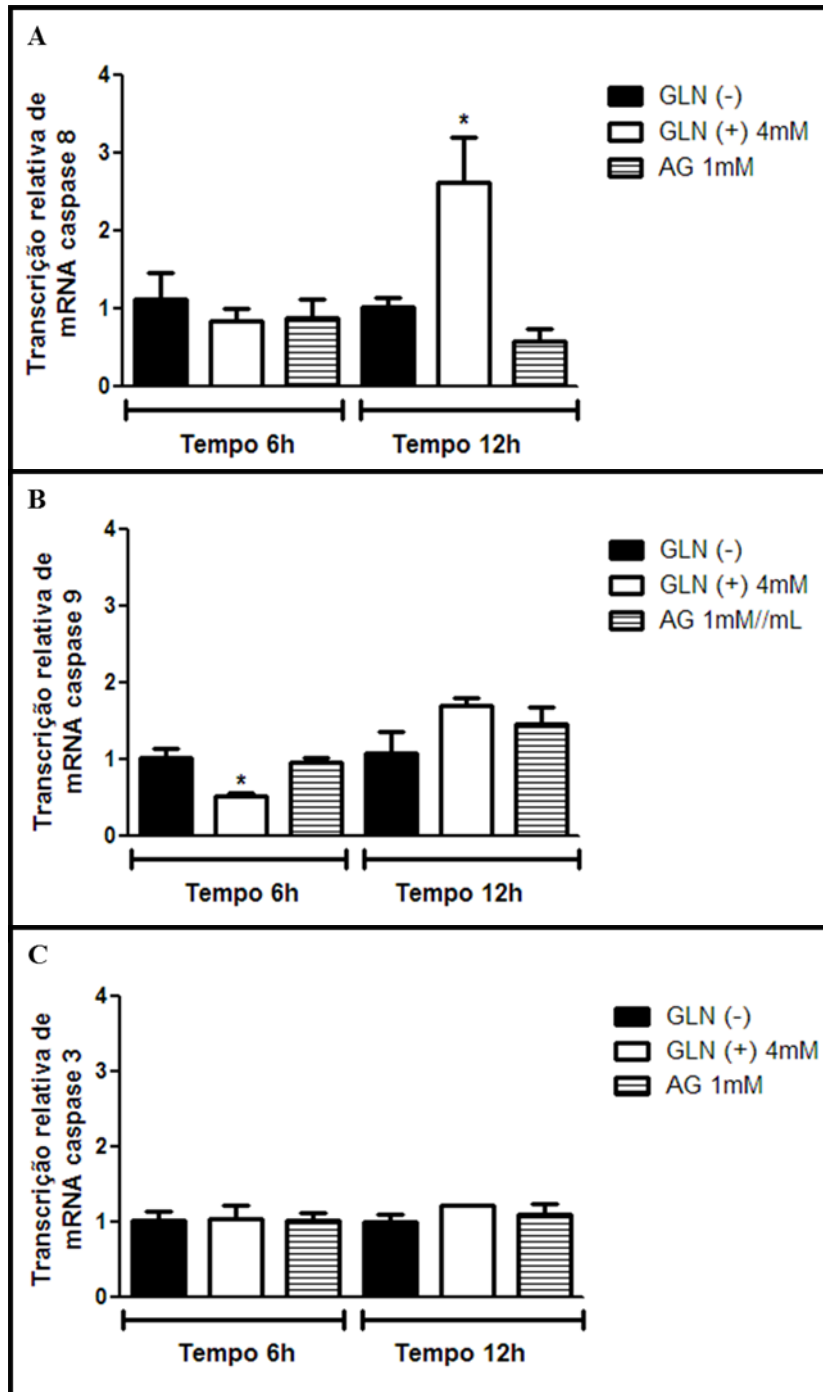
#### **5.3.4 *Transcrição de genes relacionados à apoptose celular***

Em relação ao efeito de AG 1mM na avaliação dos níveis relativo da transcrição dos genes associados ao processo de apoptose celular intestinal, caspase 8,9 e 3, respectivamente, conforme o Gráfico 12 (A, B,C), nos tempos de 6 e 12 horas.

Os resultados obtidos exibiram um aumento do nível transcricional de caspase 8 no grupo GLN(+) 4mM quando comparado ao grupo GLN(-) em 12 horas, como evidenciado no Gráfico 12A. Em relação transcrição de caspase 9, verifica-se uma redução da transcrição desta no grupo GLN(+) 4mM quando comparado ao grupo GLN(-) no tempo de 6h, conforme mostra o Gráfico 12B.

Não foi encontrada qualquer diferença na transcrição de caspase 3 em nenhum dos grupos avaliados conforme mostra o Gráfico 12C.

Gráfico 12 - Transcrição relativa dos genes caspase 8 (A), caspase 9 (B) e caspase 3 (C) em células IEC-6 suplementadas com AG 1mM avaliados em 6 e 12h



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo GLN (-) ( $p < 0,05$ ).

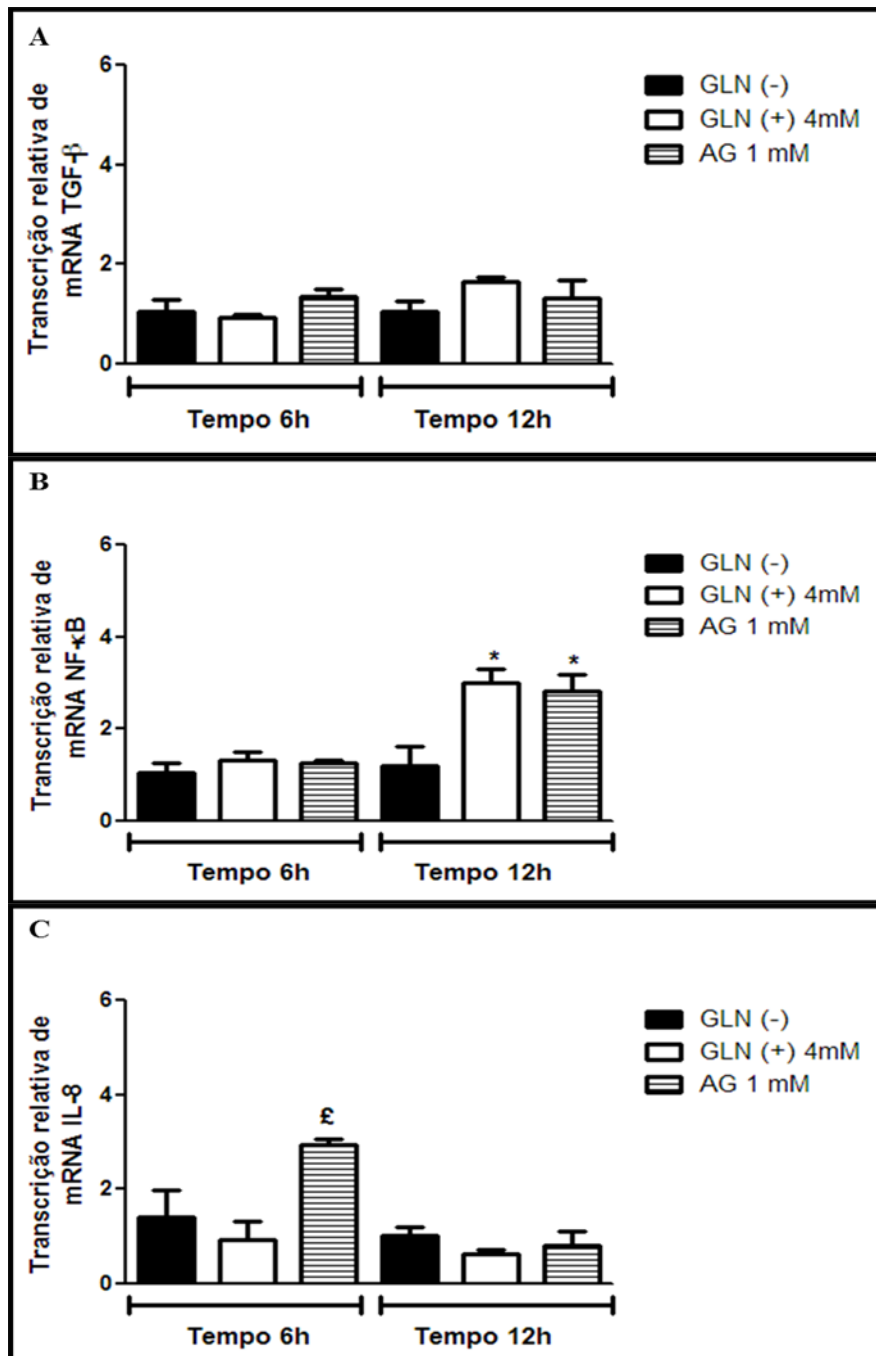
A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

### ***5.3.5 Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune inata.***

Os genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune, TGF- $\beta$ , NF-kB e IL-8, foram avaliados nos tempos de 6 e 12 horas na presença de AG, conforme mostra o Gráfico 13 (A, B e C).

Na avaliação de TGF- $\beta$ , visto no Gráfico 13A, não houve alterações significativas em nenhum dos tempos analisados. O Gráfico 13B mostra um acréscimo significativo dos níveis de transcrição de NF-kB nos grupos GLN (+) 4mM e AG 1mM quando comparados ao controle no tempo de 12h. No caso da IL-8, apenas o grupo AG 1 mM exibiu aumento do nível transcricional em relação à GLN (+) 4mM na análise realizada no tempo de 6h como mostra o Gráfico 13C.

Gráfico 13 - Transcrição relativa dos genes TGF- $\beta$  (A), NF- $\kappa$ B (B) e IL-8 (C) em células IEC-6 suplementadas com AG 1mM avaliados em 6 e 12h



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo GLN (-) ( $p < 0,05$ ).

( $\pounds$ ) Significativo em relação ao grupo GLN (+) 4mM ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

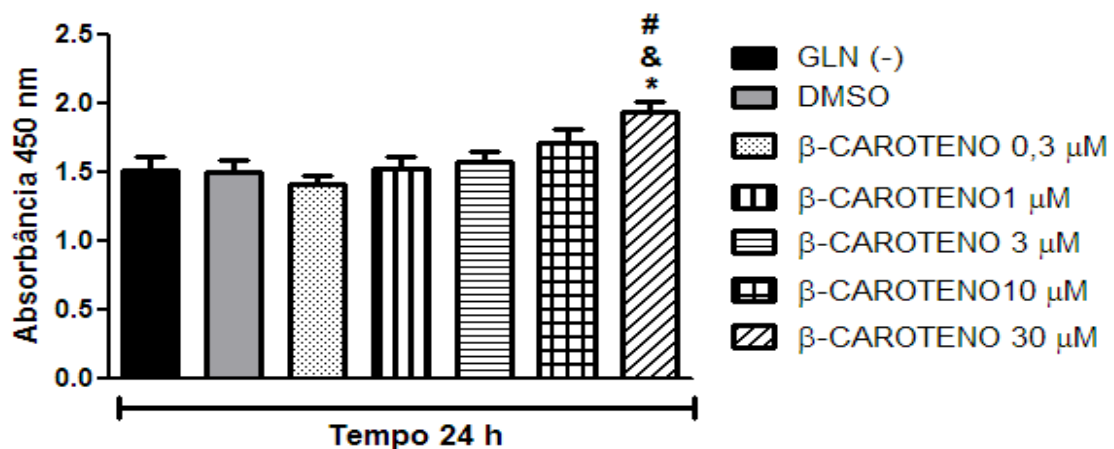
## 5.4 Efeito do betacaroteno ( $\beta$ -caroteno) na monocamada das células intestinais

### 5.4.1 Proliferação celular

O efeito da proliferação celular apresentado no Gráfico 14 serviu para determinar a concentração de  $\beta$ -caroteno a ser utilizada nos experimentos subsequentes mostrados ao longo do presente estudo. No citado gráfico percebe-se que a proliferação celular foi aumentada com a utilização de  $\beta$ -caroteno na concentração de 30  $\mu$ M quando comparada aos grupos GLN (-), DMSO e  $\beta$ -caroteno nas concentrações de 0,3 e 1  $\mu$ M. Apesar de  $\beta$ -caroteno 30  $\mu$ M ter apresentado melhor efeito sobre a proliferação celular, o tratamento estatístico dos dados obtidos através da técnica de regressão linear (informação não mostrada) mostraram que a melhor concentração experimental seria de 8  $\mu$ M. Portanto, o presente estudo passou a adotar a concentração de  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M como a concentração escolhida para ensaios posteriores.

O Gráfico 15 mostra a curva tempo-efeito de  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M na avaliação da proliferação das células intestinais por 12, 24 e 48 horas. Pode-se verificar que não houve acréscimo da proliferação de  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M nos tempos em estudo. Como visto neste gráfico, a única alteração significativa foi o aumento da proliferação celular do meio convencional suplementado de L-glutamina 4mM para manutenção das células (GLN + 4mM) quando comparado ao grupo GLN (-) a partir do tempo de 12h.

Gráfico 14 - Avaliação da proliferação celular intestinal no tempo de 24 horas nas concentrações de 0,3 – 30  $\mu$ M de  $\beta$ -caroteno



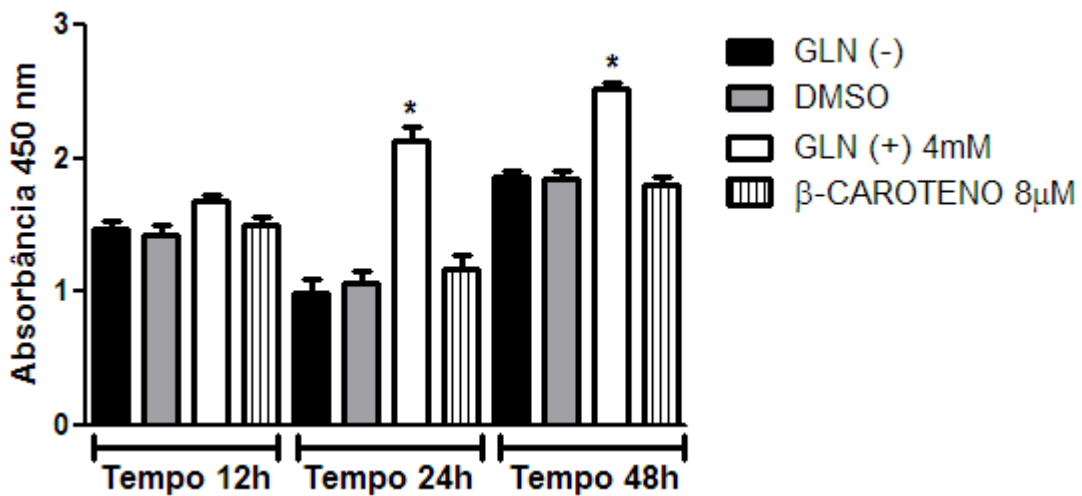
Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo GLN (-) ( $p < 0,05$ )

(&) Significativo em relação ao grupo DMSO ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

Gráfico 15 - Curva tempo-efeito de  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M na avaliação da proliferação das células intestinais por 12, 24 e 48 horas



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo GLN (-) ( $p < 0,05$ ).

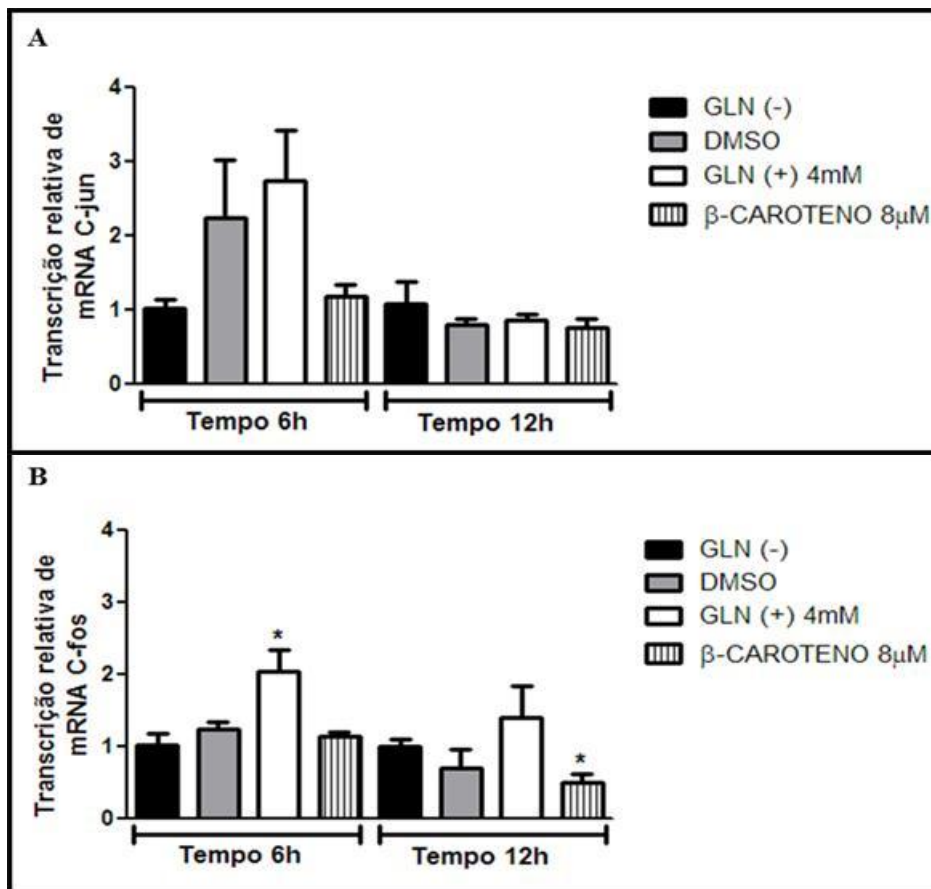
A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

#### 5.4.2 Transcrição de genes relacionados à proliferação celular

Os genes relacionados ao processo de proliferação celular, c-jun e c-fos, foram avaliados em 6 e 12 horas, conforme mostra o Gráfico 16 (A e B). No que diz respeito à transcrição de c-jun não foi verificada diferença significativa entre qualquer um dos grupos avaliados, como mostra o Gráfico 16A. Houve aumento do nível transcricional de c-fos no grupo GLN(+) 4mM quando comparado ao controle GLN (-) em 6h, como visto no Gráfico 16B. Verifica-se também, no mesmo gráfico, uma redução da transcrição de c-fos no grupo  $\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M em relação ao controle GLN (-) quando avaliado em 12h.



Gráfico16 - Transcrição relativa dos genes c-jun (A) e c-fos (B) em células IEC-6 suplementadas com  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M avaliados em 6 e 12h



Legenda:

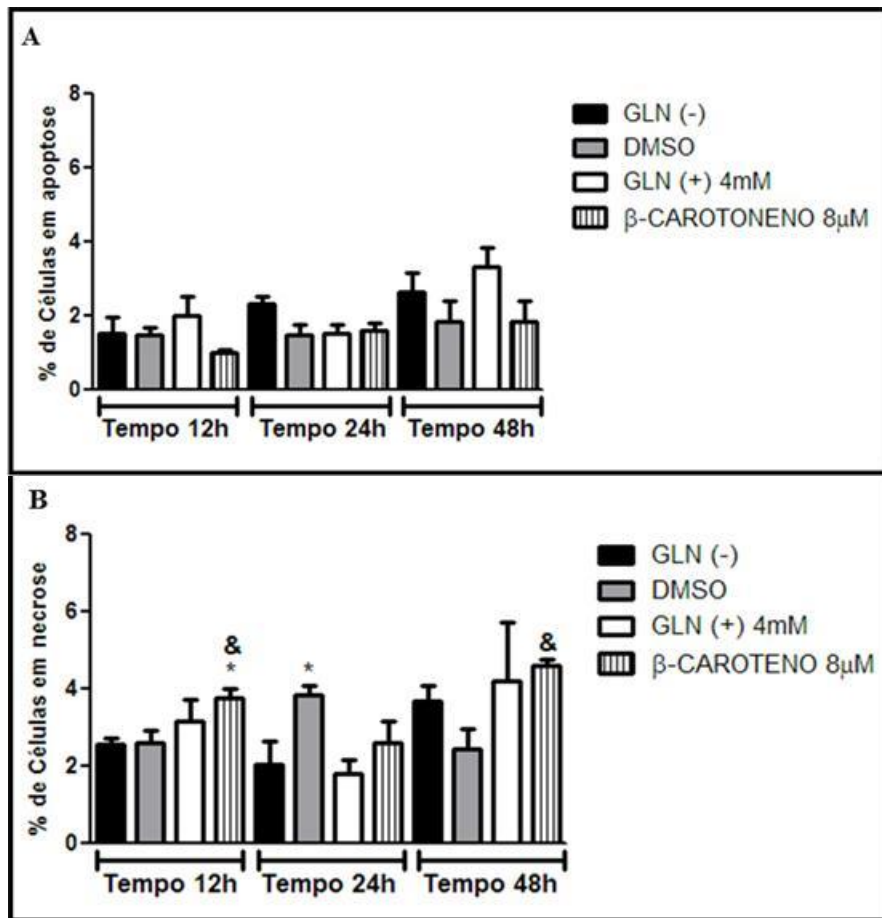
(\*) Significativo em relação ao grupo GLN (-) ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

### 5.4.3 Morte celular

Para avaliar o efeito  $\beta$ -caroteno sobre a morte de células intestinais, uma curva tempo-efeito de  $\beta$ -caroteno na concentração de 8  $\mu$ M foi construída nos tempos de 12, 24 e 48 horas. Como mostra o Gráfico 17A, não foram verificadas diferenças significantes no percentil de apoptose entre os grupos avaliados em nenhum dos tempos. Na necrose, como visto no Gráfico 17B, houve aumento no percentual desse parâmetro no grupo suplementado com  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M quando comparado com o controle GLN (-) apenas no tempo de 12h. Ainda no mesmo gráfico percebeu-se o acréscimo do percentual de necrose de  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M em relação ao grupo DMSO nos tempos de 12 e 48 h. Além disso, é verificado que o grupo DMSO aumentou o percentual de necrose quando comparado ao controle GLN (-).

Gráfico 17 – Curva tempo-efeito de  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M na avaliação da morte celular, apoptose (A) e necrose (B), pelo percentual de células intestinais nos tempos de 12, 24 e 48 horas.



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo GLN (-) ( $p < 0,05$ ).

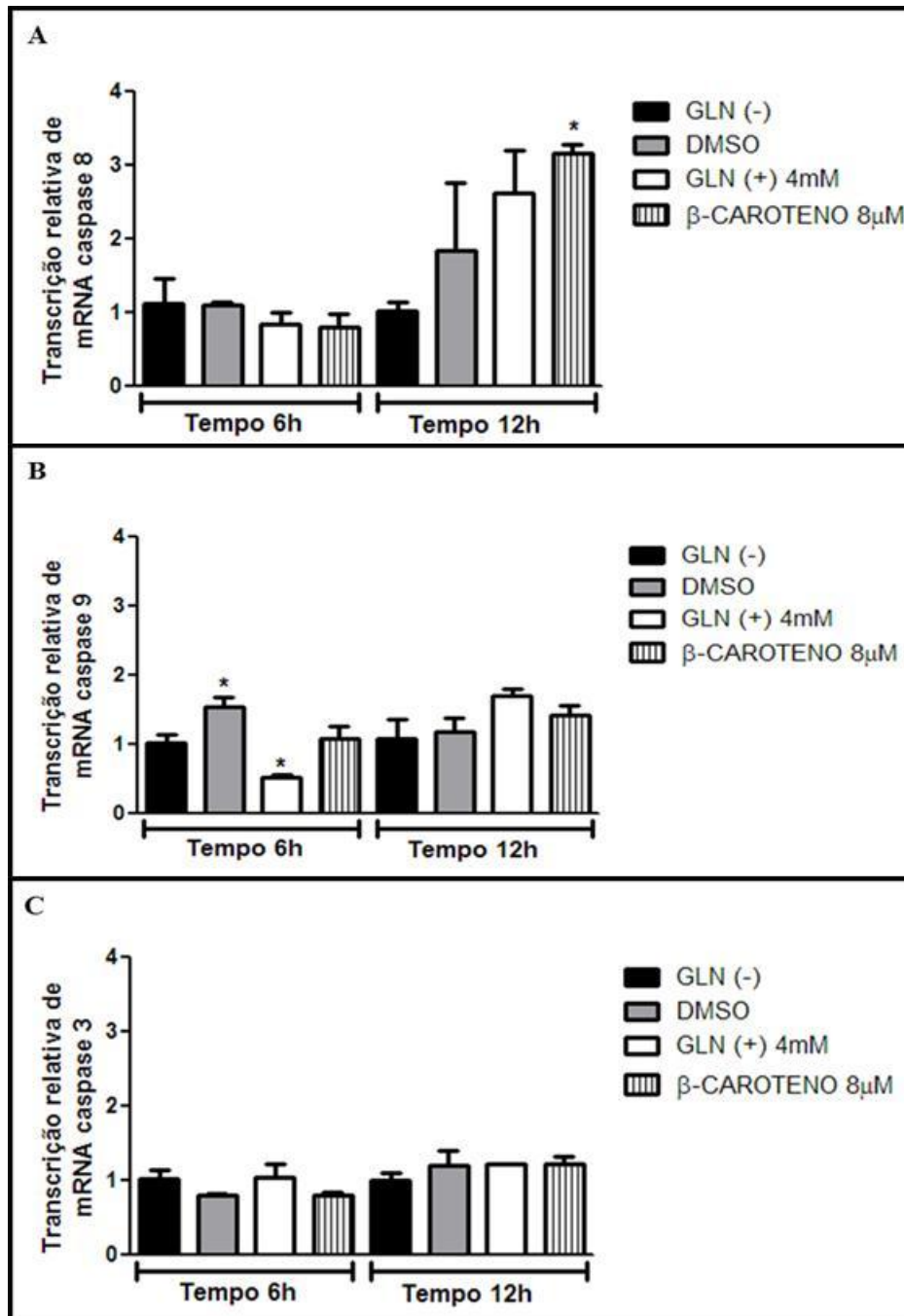
(&) Significativo em relação ao grupo DMSO ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

#### 5.4.4 Transcrição de genes relacionados à apoptose celular

No intuito de avaliar a apoptose celular intestinal foi realizado o tempo-efeito sobre a transcrição relativa dos genes caspase 8, 9 e 3 nos tempos 6 e 12 horas conforme mostra o Gráfico 18 (A, B e C). Nota-se um aumento significativo da transcrição de caspase 8 do grupo de  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M quando comparado ao controle GLN (-) em 12h como visto no Gráfico 18A. No que diz a respeito a transcrição de caspase 9 foi observado um acréscimo do grupo DMSO em relação ao controle GLN (-) apresentando no Gráfico 18B. Neste mesmo Gráfico ainda percebeu-se uma diminuição da transcrição de caspase 9 do grupo GLN (+) 4mM quando comparada com o controle GLN (-). Em relação a transcrição de caspase 3 não houve alterações significantes entre os grupos nos tempos estudado conforme mostra o Gráfico 18C.

Gráfico18 – Transcrição relativa dos genes caspase 8 (A), caspase 9 (B) e caspase 3 (C) em células IEC-6 suplementadas com  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M avaliados em 6 e 12h



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo GLN (-)( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

#### **5.4.5 *Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune inata.***

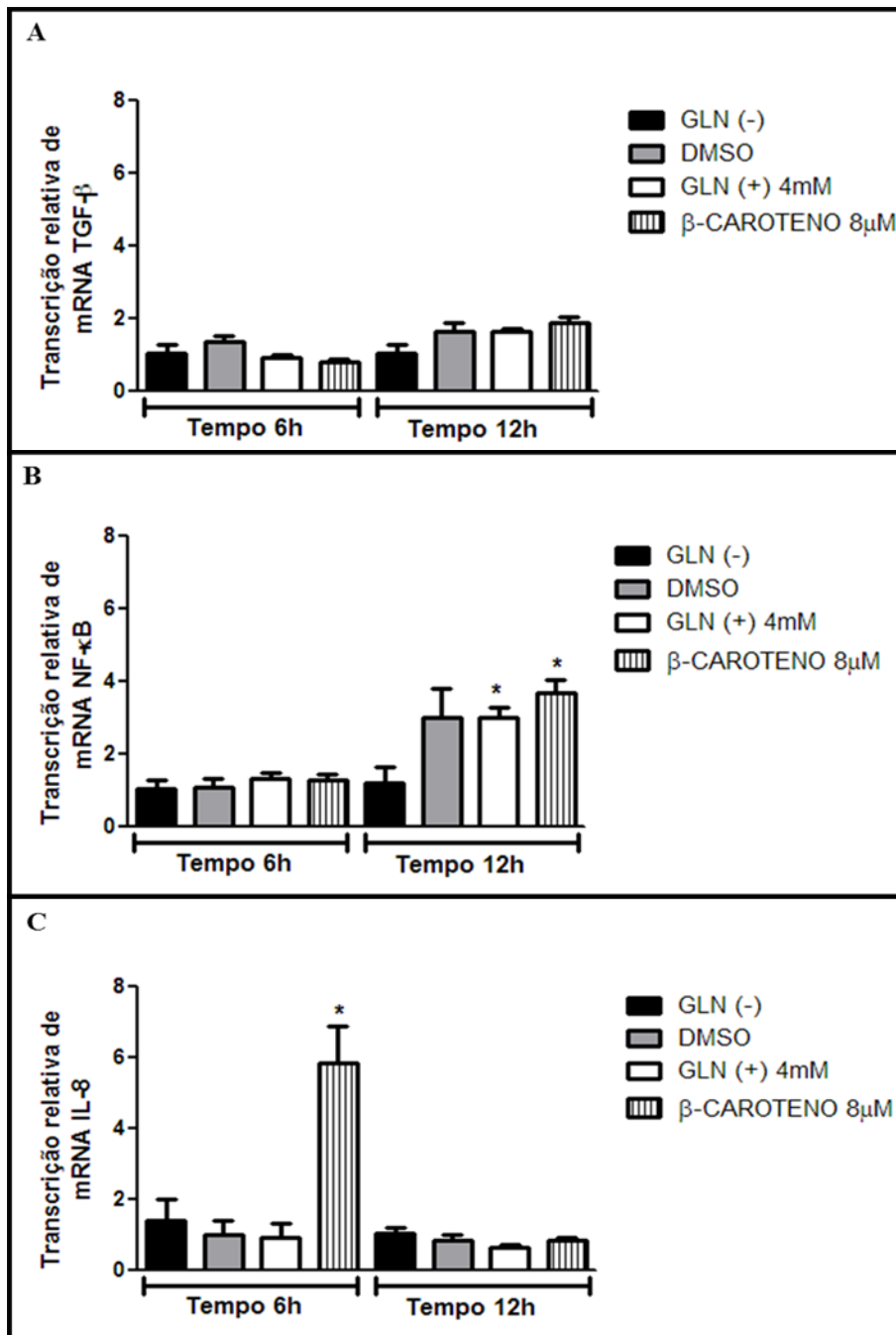
Os genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune, TGF- $\beta$ , NF- $\kappa$ B e IL-8, foram avaliados nos tempos de 6 e 12 horas na presença de  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M, conforme mostra o Gráfico 19 (A, B e C).

A análise sobre a transcrição relativa dos genes TGF- $\beta$ , como visto no Gráfico 19A, revela que não houve alterações significantes entre os grupos nos tempos estudados.

Conforme visto no Gráfico 19B, há aumento significativo da transcrição de NF- $\kappa$ B do grupo  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M quando comparado ao controle GLN (-) no tempo de 12h. Ainda no mesmo gráfico verifica-se um acréscimo da transcrição de NF- $\kappa$ B da GLN (+) em relação ao controle GLN (-) no tempo de 12h.

A transcrição de IL-8 do grupo  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M exibiu grande aumento quando comparado ao controle GLN (-) no tempo de 6h, como mostrado no Gráfico 19C.

Gráfico 19 – Transcrição relativa dos genes TGF- $\beta$  (A), NF- $\kappa$ B (B) e IL-8 (C) em células IEC-6 suplementadas com  $\beta$ -caroteno 8  $\mu$ M avaliados em 6 e 12h



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo GLN (-) ( $p < 0,05$ ).

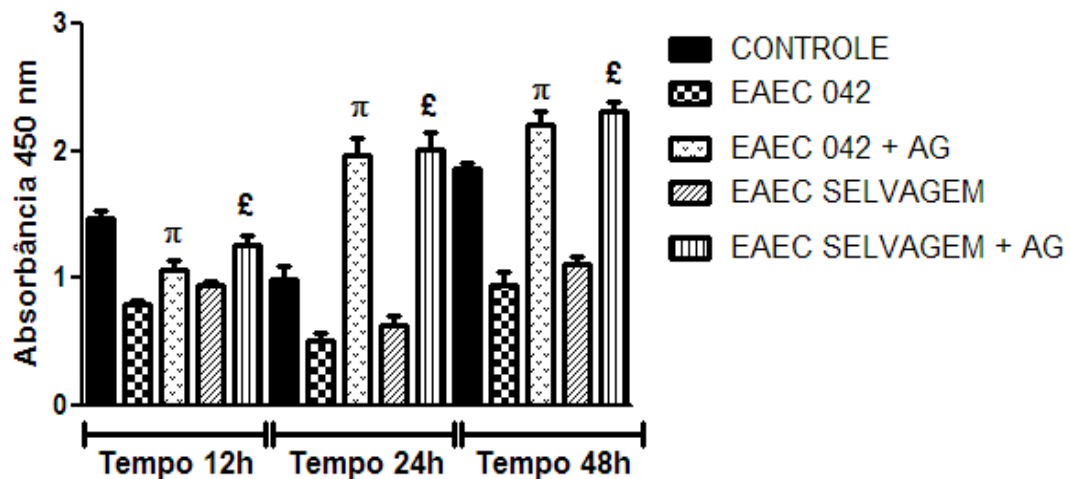
A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

## 5.5 Efeitos da suplementação da l-Alanil-l-Glutamina (AG) sobre lesão provocada pela EAEC em monocamada de células epiteliais intestinais.

### 5.5.1 Proliferação celular

No propósito de observar o efeito de alanil-glutamina na concentração de 1mM sobre a lesão provocada pela EAEC após 3h de infecção foi avaliado a curva tempo e efeito na proliferação celular nos tempos de 12, 24 e 48h como visto no Gráfico 20. Neste gráfico é possível verificar as lesões causadas pelas cepas de EAEC 042 e EAEC selvagem e a reversão das lesões pela AG 1mM em todos os tempos estudados.

Gráfico 20 - Curva tempo-efeito da proliferação celular avaliada após os tempos de 12, 24 e 48h com tratamento de AG 1mM em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC



Legenda:

(π) Significativo em relação á cepa EAEC 042 ( $p < 0,05$ ).

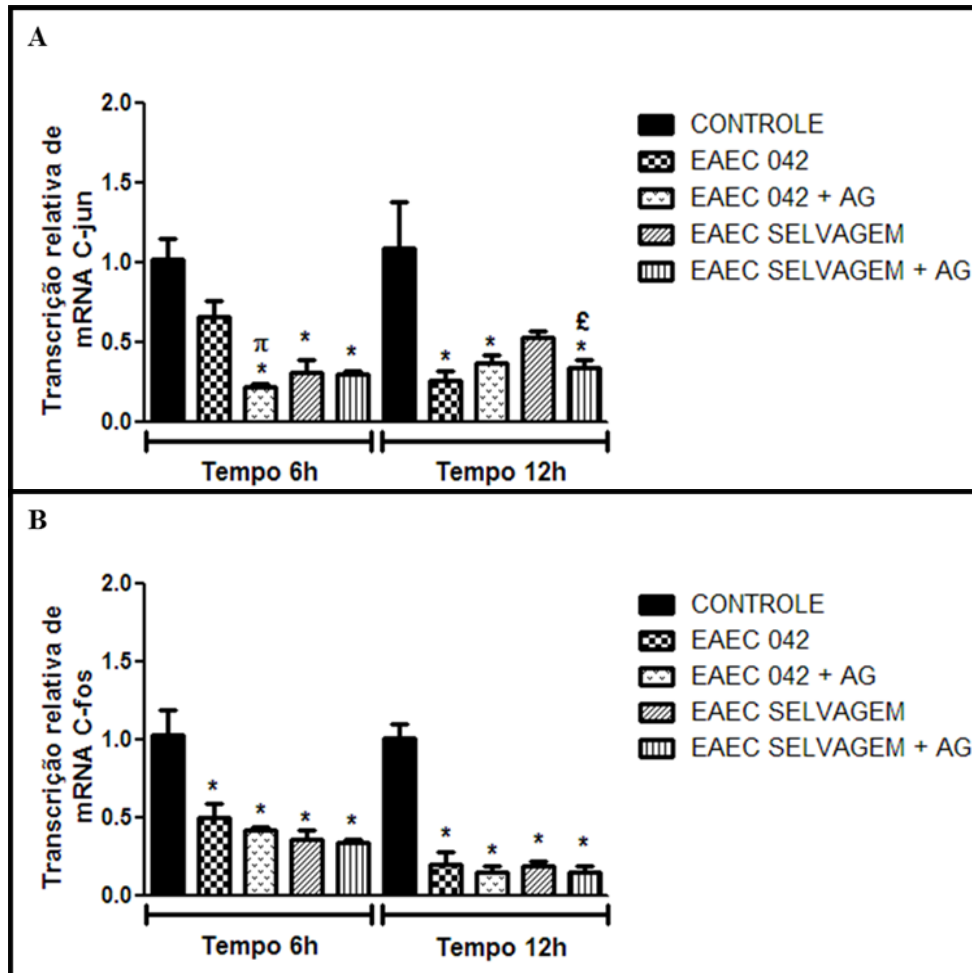
(£) Significativo em relação à cepa EAEC selvagem ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

### **5.5.2 *Transcrição de genes relacionados à proliferação celular***

Para análise dos genes associadas a proliferação celular avaliou-se a transcrição de *c-jun* e *c-fos* conforme o Gráfico 21 (A e B). No que diz respeito à transcrição de *c-jun*, a lesão causada pela cepa 042 só exibiu redução no nível transcricional de tal gene a partir das 12h, não revertendo os níveis de transcrição no grupo tratado com AG. Além disso, o grupo infectado da EAEC selvagem apresentou redução na transcrição de *c-jun* no tempo de 6h em relação ao controle e não foi observado reversão do efeito quando as células infectadas foram tratadas nos tempos de 6h e 12h. A transcrição de *c-fos* mostra-se reduzida em todos os grupos de estudos quando comparados ao controle como apresentado no Gráfico 21 B.

Gráfico 21- Transcrição relativa dos genes c-jun (A) e c-fos (B) avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de AG 1mM em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

( $\pi$ ) Significativo em relação á cepa EAEC 042 ( $p < 0,05$ ).

(£) Significativo em relação à cepa EAEC selvagem ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni



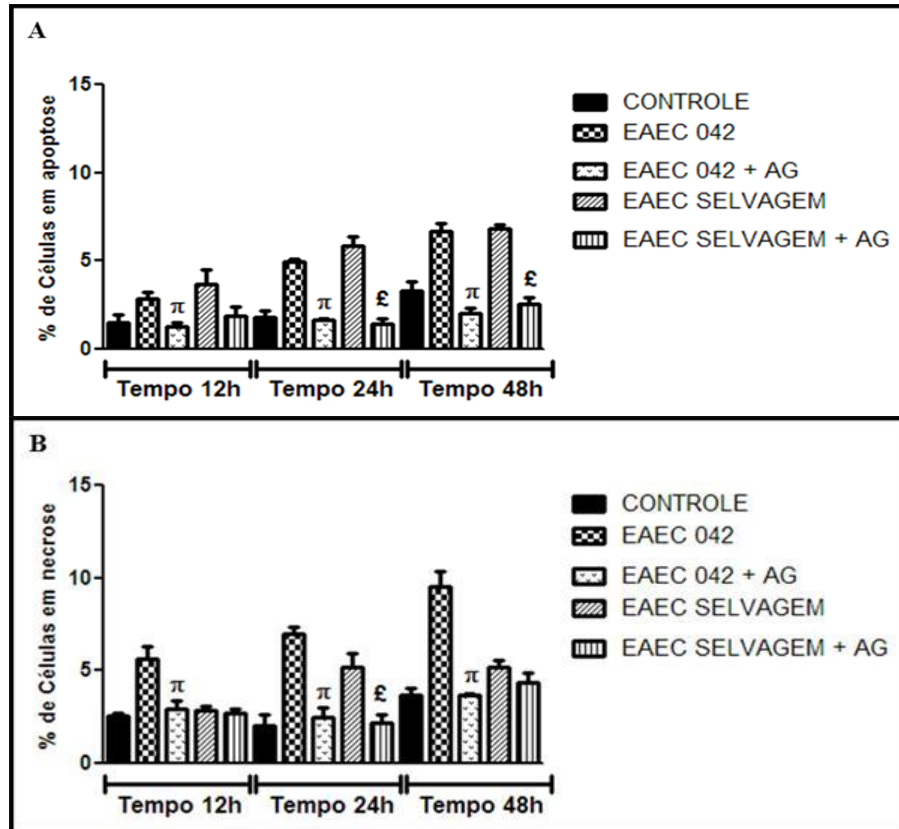
### 5.5.3 *Morte celular*

Para analisar o percentual de apoptose e necrose de células intestinais foi realizada a curva tempo e efeito com o tratamento de AG 1mM em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC após os tempos de 12, 24 e 48h como mostra o Gráfico 22 (A e B).

O percentual de apoptose do grupo infectado da EAEC 042 quando comparado com o grupo tratado foi reduzido significativamente em todos os tempos do estudo como apresentado no Gráfico 22A. Percebe-se também nesse gráfico que o grupo das células infectadas com EAEC selvagem e tratadas com a alanil-glutamina só diminuiu o percentual de apoptose a partir do tempo de 12h.

Como se observa no Gráfico 22 B há uma redução de percentual de necrose do grupo infectado da EAEC 042 em relação ao tratado em todos os tempos em estudo. Contudo, o grupo infectado com EAEC selvagem e tratado reduziu a necrose apenas no tempo de 24 h.

Gráfico 22 - A curva tempo-efeito de apoptose (A) e necrose (B) avaliados após os tempos de 12, 24 e 48h com o tratamento de AG 1mM em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC



Legenda:

( $\pi$ ) Significativo em relação á cepa EAEC 042 ( $p < 0,05$ ).

(£) Significativo em relação à cepa EAEC selvagem ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni

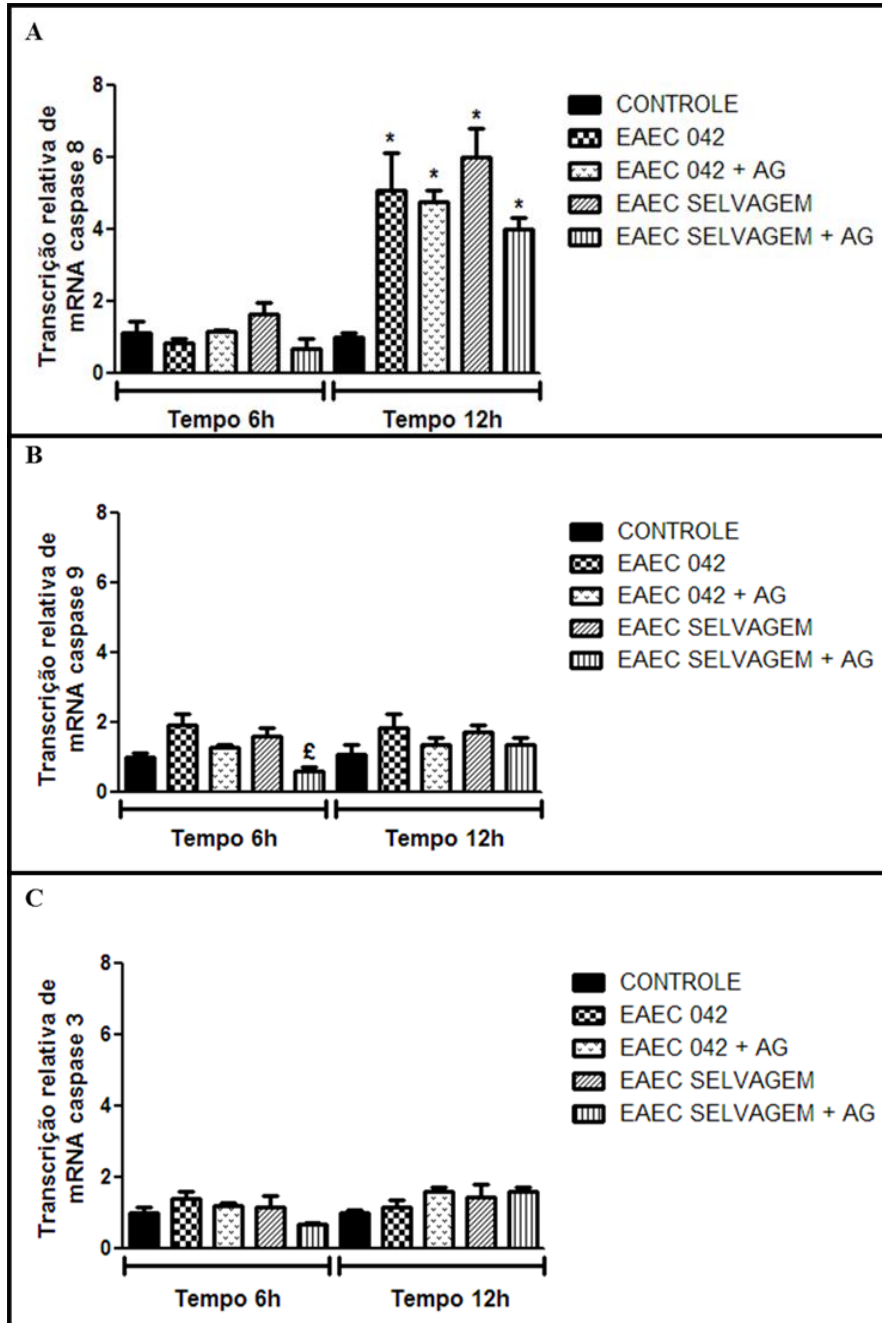
#### **5.5.4 *Transcrição de genes relacionados à apoptose celular***

Os genes relacionados ao processo de morte celular caspase 8 , caspase 9 e caspase 3, foram avaliados nos tempos de 6 e 12 horas na presença de AG 1mM em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC, conforme mostra o Gráfico 23 (A, B e C).

A transcrição relativa de caspase 8 mostrou-se aumentada de forma significativa em todos os grupos quando comparada ao controle no tempo de 12h, como mostra o Gráfico 23 A. Como observado no Gráfico 23B há redução de caspase 9 do grupo infectado com EAEC selvagem em relação ao seu tratado no tempo de 6h.

Não se verificou alterações significativa de caspase 3 entre os grupos avaliados nos tempos estudados, conforme se observa no Gráfico 23C.

Gráfico 23 – O tempo-efeito sobre a transcrição relativa dos genes caspase 8 (A), caspase 9 (B) e caspase 3 (C) avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de AG 1mM em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

(£) Significativo em relação à cepa EAEC selvagem ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.

### ***5.5.5 Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune inata.***

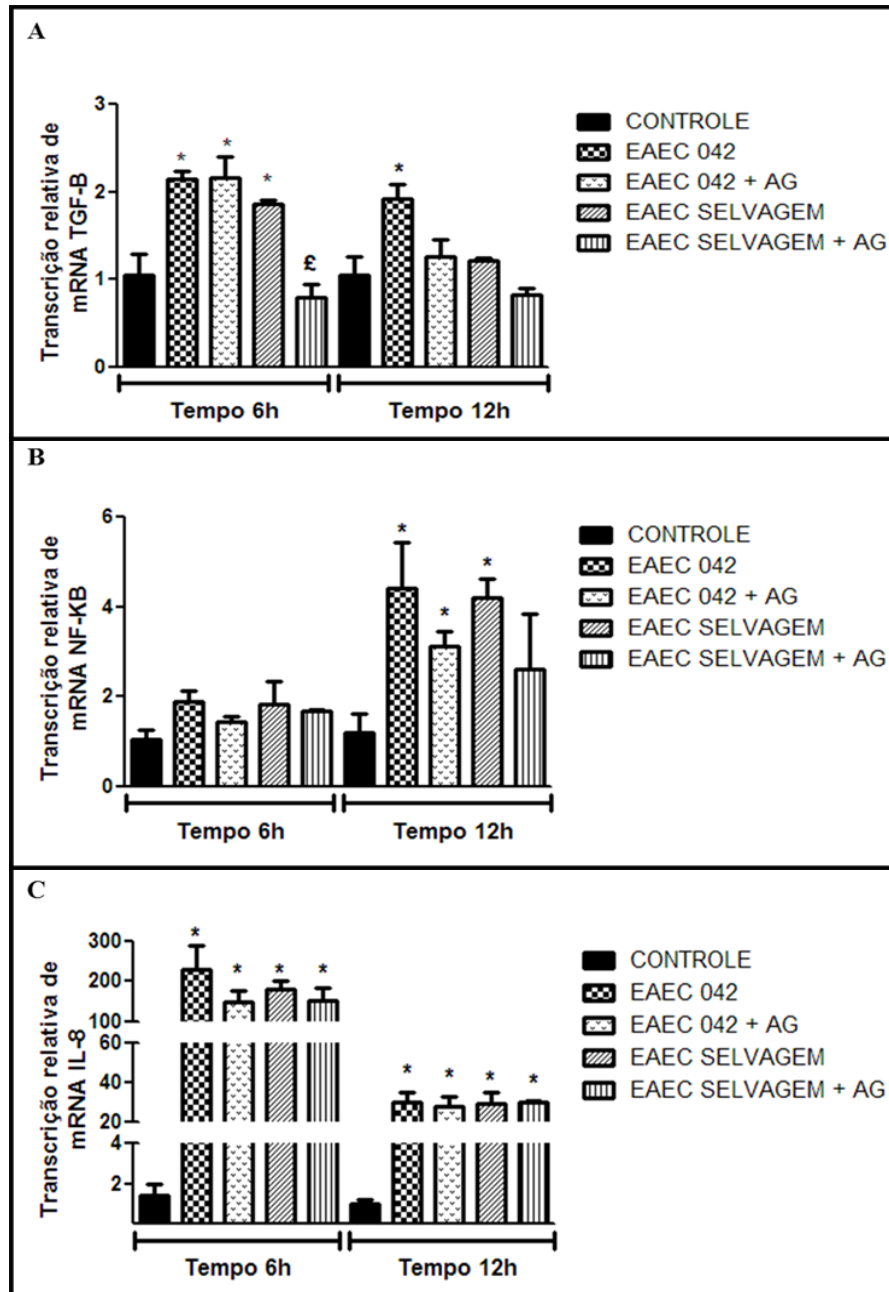
No intuito de analisar a transcrição relativa de genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune foi construída uma curva tempo-efeito com os genes TGF- $\beta$ , NF- $\kappa$ B e IL-8 avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de AG 1mM em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC conforme o Gráfico 24 (A, B e C).

A transcrição relativa de TGF- $\beta$  mostrou-se aumentada tanto no grupo EAEC 042 como no próprio tratado em relação ao controle no tempo de 6h, enquanto no tempo de 12h houve reversão da transcrição em células tratadas com AG pós-infectdas com EAEC 042. Enquanto as células infectadas com EAEC selvagem apresentou redução significativa dos níveis de transcrição de TGF- $\beta$  após serem suplementadas com AG no tempo de 6 h, como visto no Gráfico 24A.

Como se observa no Gráfico 24B houve aumento da transcrição relativa do gene NF- $\kappa$ B do grupo EAEC 042 e o seu tratado quando comparada ao controle no tempo de 12h. Percebe-se também aumento dos níveis de NF- $\kappa$ B do grupo EAEC selvagem em relação ao controle no tempo de 12h.

Na análise da transcrição relativa de IL-8, observa-se uma redução decrescentemente significativa em todos os grupos avaliados quando comparados ao controle de acordo com os tempos estudados como visto no Gráfico 24C.

Gráfico 24 – O tempo-efeito sobre a transcrição relativa dos genes TGF- $\beta$  (A), NF- $\kappa$ B (B) e IL-8 (C) avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de AG 1mM em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

(£) Significativo em relação à cepa EAEC selvagem ( $p < 0,05$ ).

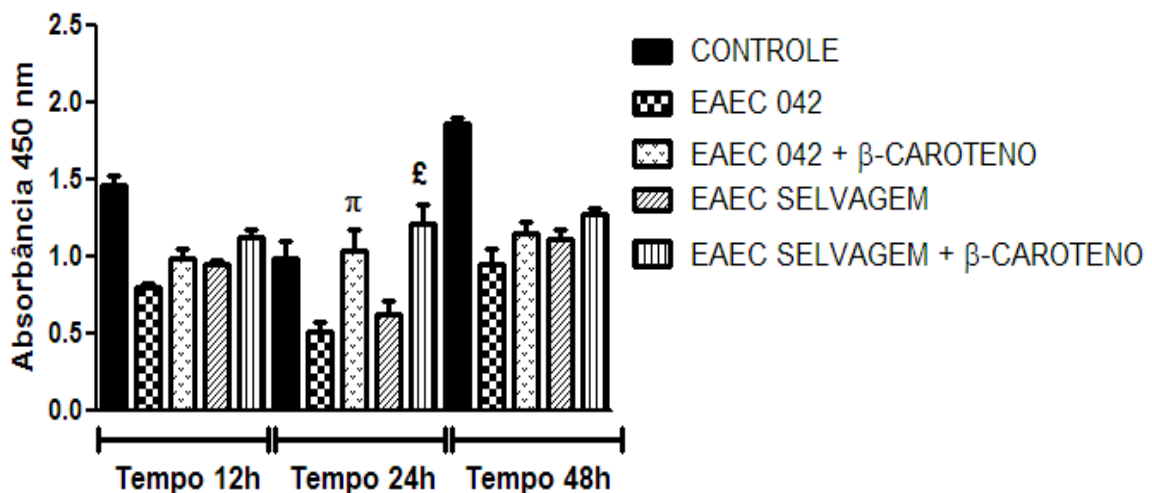
A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni

## 5.6 Efeitos da suplementação do betacaroteno ( $\beta$ -caroteno) sobre lesão provocada pela EAEC em monocamada de células epiteliais intestinais

### 5.6.1 Proliferação celular

Com a finalidade de verificar a ação de  $\beta$ -caroteno na concentração de  $8\mu\text{M}$  sobre a lesão provocada pela EAEC após 3 h de infecção, foi avaliado a curva tempo e efeito na proliferação celular nos tempos de 12, 24 e 48h como visto no Gráfico 25. Neste gráfico é possível verificar as infecções causadas pelas cepas de EAEC 042 e EAEC selvagem e a reversão no tratamento no tempo de 24h.

Gráfico 25 - Curva tempo-efeito da proliferação celular avaliada após os tempos de 12, 24 e 48h com tratamento de  $\beta$ -caroteno  $8\mu\text{M}$  em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC



Legenda:

( $\pi$ ) Significativo em relação à cepa EAEC 042 ( $p < 0,05$ ).

( $\xi$ ) Significativo em relação à cepa EAEC selvagem ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni

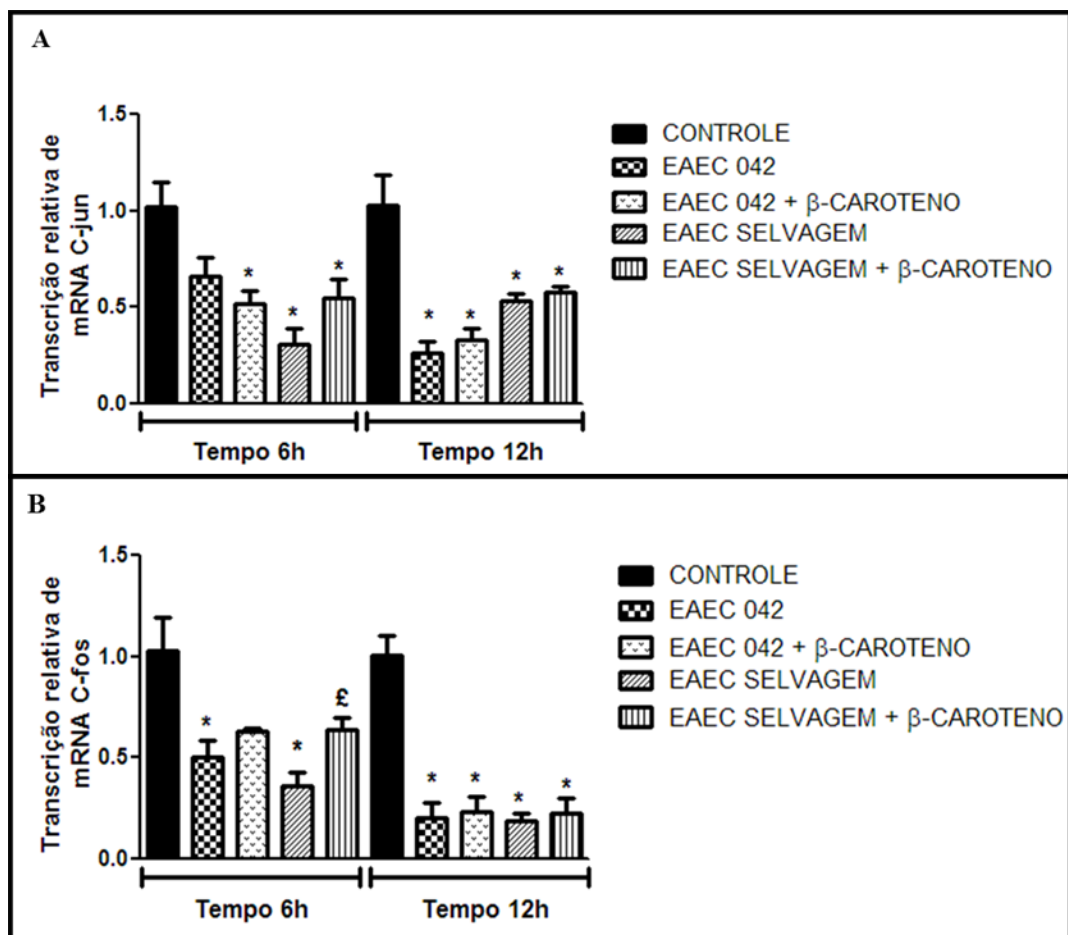
### 5.6.2 Transcrição de genes relacionados à proliferação celular

Foi observado o tempo-efeito sobre a transcrição relativa dos genes c-jun e c-fos avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de  $\beta$ -caroteno  $8\mu\text{M}$  em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC conforme exibe o Gráfico 26 (A e B).

Em relação à transcrição relativa de c-jun, o único grupo que não apresentou redução significativa foi infecção de EAEC 042 no tempo de 6h quando comparado ao controle como mostra o Gráfico 26A.

No Gráfico 26B foi avaliada a transcrição relativa do gene c-fos apresentado diminuição dos grupos de infecção da EAEC em relação ao controle em 6h. Nota-se também o aumento da transcrição relativa de c-fos no grupo tratado de EAEC selvagem em relação a sua infecção no tempo de 6h. Contudo no tempo de 12 h foi observada redução da transcrição relativa de c-fos em todos os grupos em relação ao controle.

Gráfico 26 - O tempo-efeito sobre a transcrição relativa dos genes c-jun (A) e c-fos (B) avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de  $\beta$ -caroteno  $8\mu\text{M}$  em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

(£) Significativo em relação à cepa EAEC selvagem ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni.



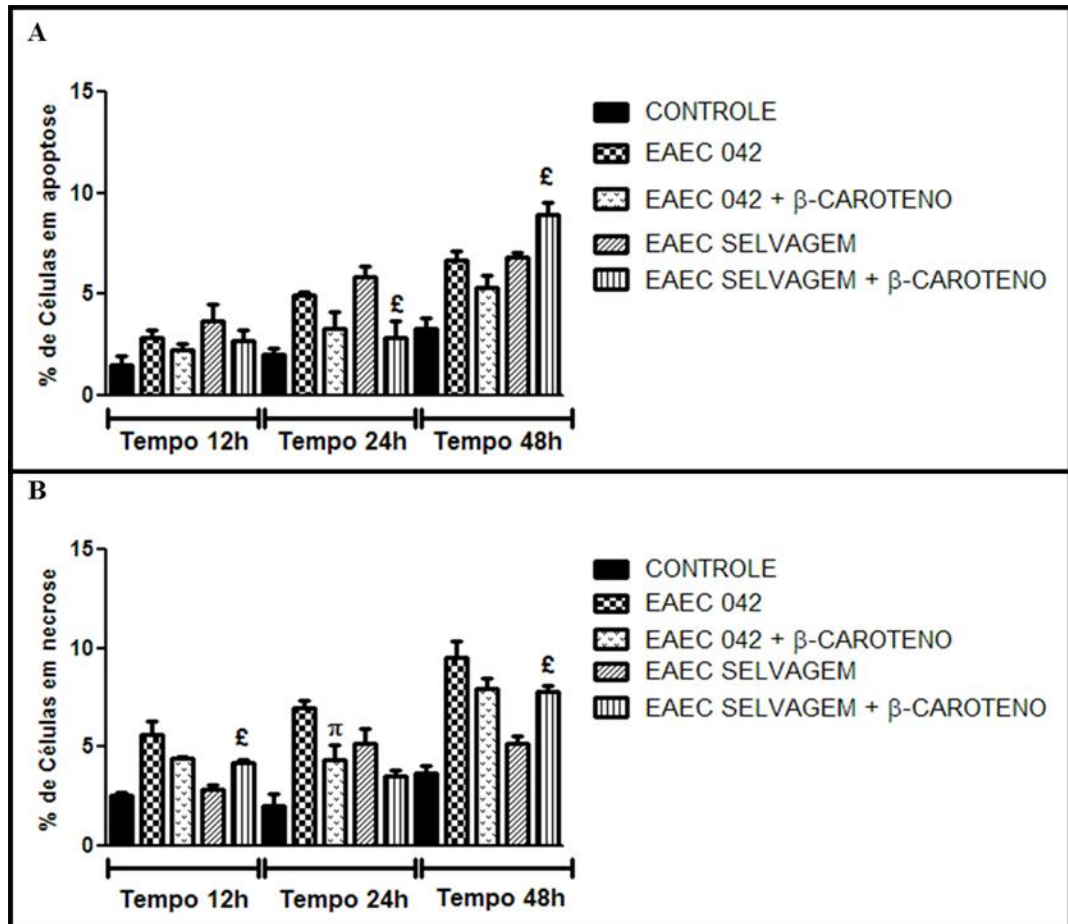
### 5.6.3 *Morte celular*

Para avaliar o percentual de apoptose e necrose de células intestinais foi realizada a curva tempo e efeito com o tratamento de  $\beta$ -caroteno  $8\mu\text{M}$  em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC após os tempos de 12, 24 e 48h conforme visto no Gráfico 27 (A e B).

O percentual de apoptose apresentou diminuição significativa do grupo de infecção da EAEC selvagem em relação ao seu tratado no tempo de 12h. Contudo percebe-se também um acréscimo do percentual das células apoptóticas do grupo de infecção da EAEC selvagem quando comparado ao seu tratado no tempo de 6h como mostra o Gráfico 27 A.

No que diz respeito ao percentual de células necróticas ocorreu uma redução significativa do grupo de infecção da EAEC 042 quando comparada ao próprio tratado em 24h. Em relação ao grupo tratado da EAEC selvagem houve um acréscimo de células necróticas em relação a sua infecção como observado no Gráfico 27B.

Gráfico 27 – A curva tempo-efeito de apoptose (A) e necrose (B) avaliados após os tempos de 12, 24 e 48h com o tratamento de  $\beta$ -caroteno  $8\mu\text{M}$  em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC



Legenda:

( $\pi$ ) Significativo em relação á cepa EAEC 042 ( $p < 0,05$ ).

(£) Significativo em relação à cepa EAEC selvagem ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni

#### ***5.6.4 Transcrição de genes relacionados à apoptose celular***

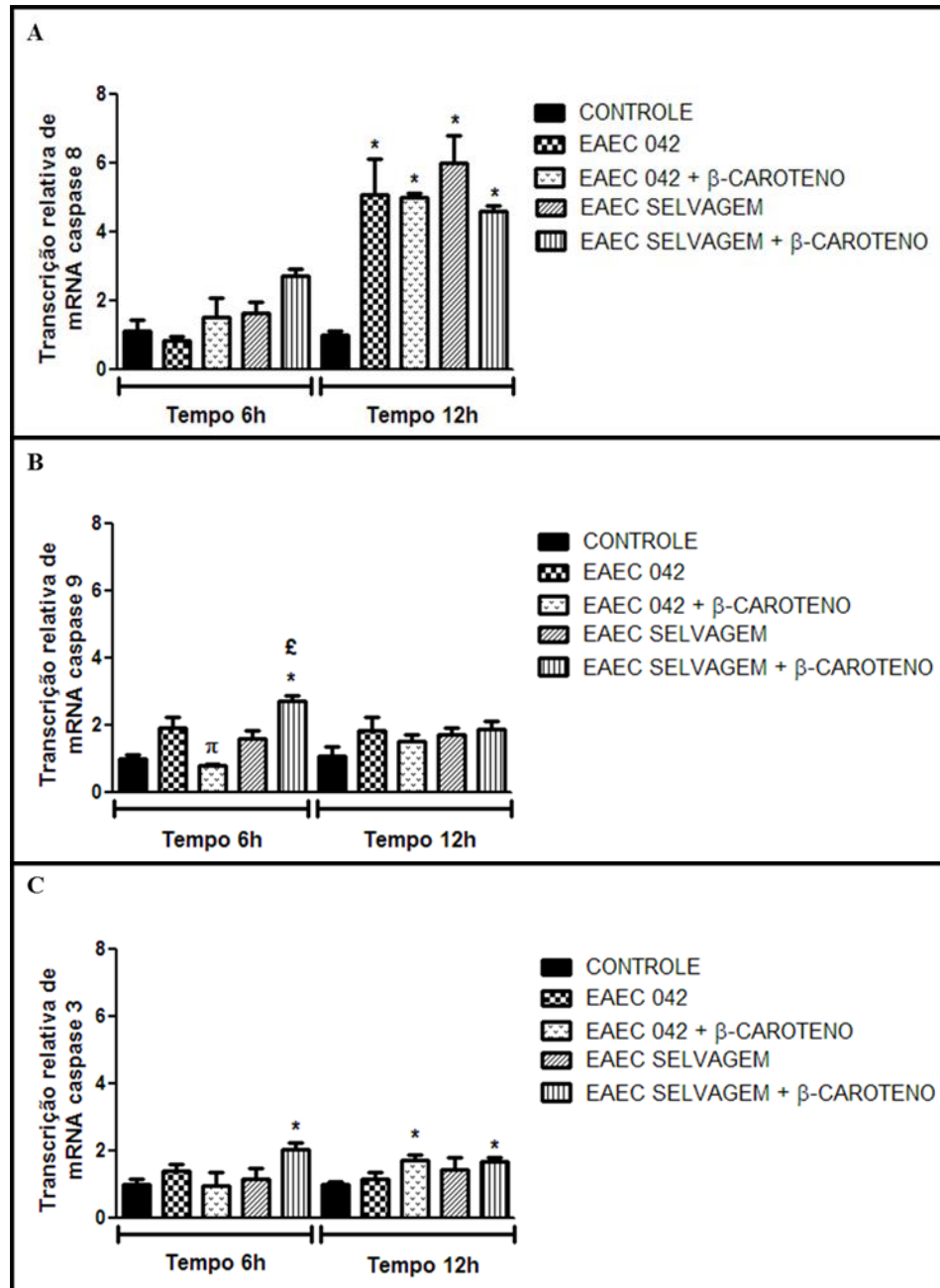
No intuito de avaliar o tempo e efeito sobre a transcrição relativa dos genes caspase 8 , caspase 9 e caspase 3 foi realizado o tratamento de  $\beta$ -caroteno  $8\mu\text{M}$  em células IEC-6 após os tempos de 6 e 12h ao término da infecção de 3h com EAEC como mostra o Gráfico 28 (A, B e C).

Conforme visto no Gráfico 28A todos os grupos avaliados exibiram um acréscimo significativo na transcrição relativa de caspase 8 em relação ao controle no tempo de 12h.

Na análise da transcrição relativa de caspase 9 ocorreu uma diminuição significativa do grupo de infecção da EAEC 042 quando comparado ao seu tratado no tempo de 6h. Contudo no mesmo tempo o grupo tratado da EAEC selvagem exibiu aumento significativo da transcrição relativa de caspase 9 em relação ao controle e ao seu grupo infectado conforme apresentado no Gráfico 28B.

O Gráfico 28C mostra o aumento da transcrição relativa de caspase 3 nos grupos tratados de EAEC selvagem em relação ao controle no tempo de 6 e 12h. Contudo no grupo tratado da EAEC 042 exibiu-se acréscimo significativo desse gene em relação ao controle apenas no tempo de 12h.

Gráfico 28 – Transcrição relativa dos genes caspase 8 (A), caspase 9 (B) e caspase 3 (C) avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de  $\beta$ -caroteno  $8\mu\text{M}$  em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

( $\pi$ ) Significativo em relação à cepa EAEC 042 ( $p < 0,05$ ).

(£) Significativo em relação à cepa EAEC selvagem ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni

### **5.6.5 *Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune inata.***

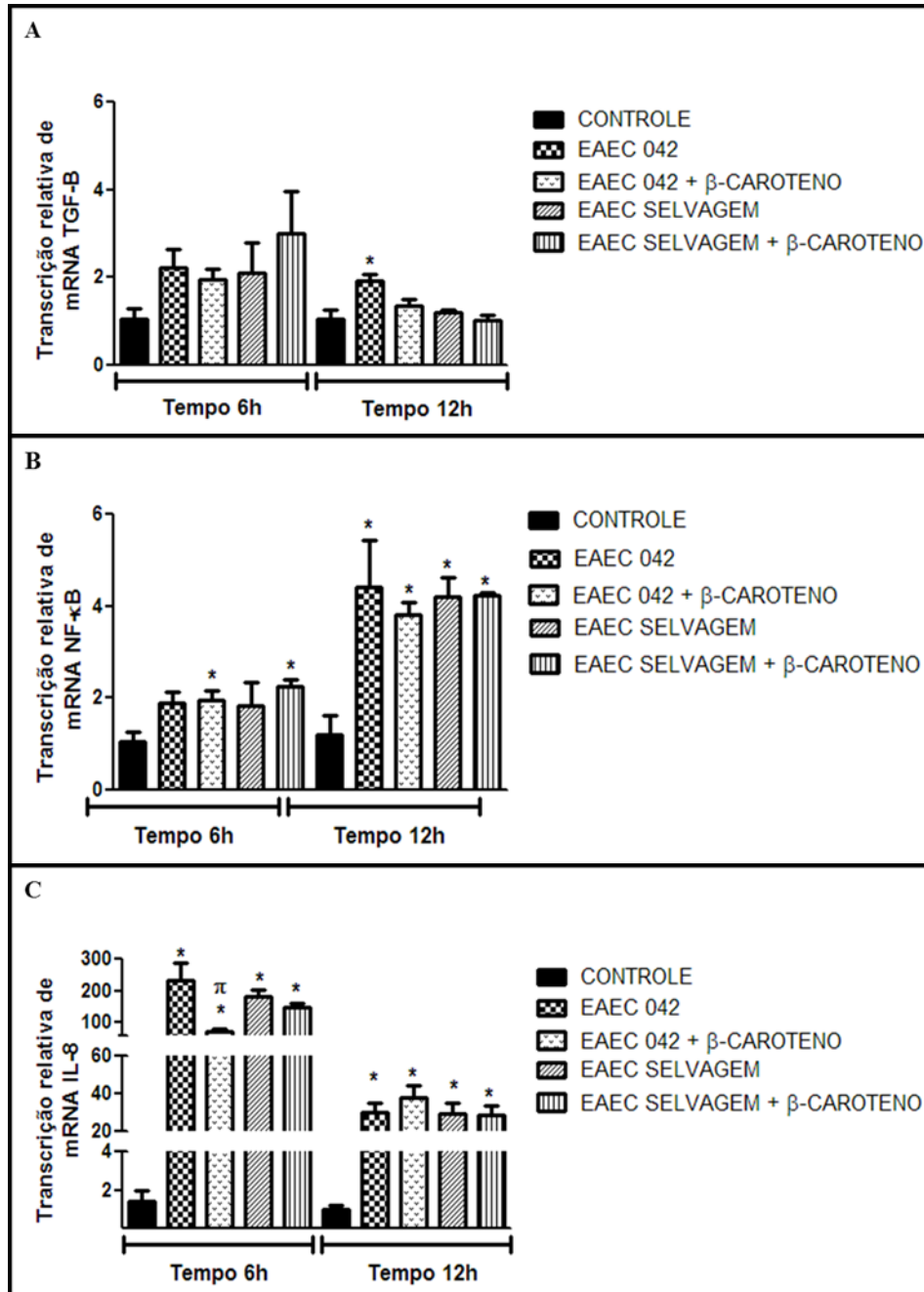
Os genes relacionados ao processo inflamatório e resposta imune, TGF- $\beta$ , NF- $\kappa$ B e IL-8, foram avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de  $\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC, conforme mostra o Gráfico 29 (A, B e C).

Como observado no Gráfico 29A, há aumento significativo da transcrição relativa do TGF- $\beta$  no grupo infectado com EAEC 042 quando comparado ao controle no tempo de 12h.

Verificou-se significativo acréscimo da transcrição relativa de NF- $\kappa$ B nos grupos tratados de infecção da EAEC 042 e EAEC selvagem quando comparados ao controle no tempo de 6, como mostra o Gráfico 29B. Observou-se também no mesmo gráfico todos os grupos aumentados nos níveis de transcrição de NF- $\kappa$ B em relação ao controle no tempo de 12h.

Em relação à transcrição de IL-8 verificou-se uma redução progressiva dos níveis de transcrição relativa de modo decrescente ao longo do tempo. Contudo, percebeu-se também uma diminuição significativa de IL-8 do grupo infectante da EAEC 042 quando comparada ao seu tratado no tempo de 6h.

Gráfico 29 - O tempo-efeito sobre a transcrição relativa dos genes TGF- $\beta$  (A), NF- $\kappa$ B (B) e IL-8 (C) avaliados após os tempos de 6 e 12h com o tratamento de  $\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M em células IEC-6 ao término da infecção de 3h com EAEC



Legenda:

(\*) Significativo em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

( $\pi$ ) Significativo em relação á cepa EAEC 042 ( $p < 0,05$ ).

A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Bonferroni

## 6 DISCUSSÃO

As doenças do trato gastrointestinal são cada vez mais reconhecidas pela variedade de patógenos que podem interromper a função intestinal, evidenciada pela presença ou não da síndrome diarreica (PETRI-JUNIOR *et al.*, 2008). Esta doença afeta principalmente a população infantil. De acordo com informações obtidas no relatório de doenças diarreicas nos anos de 2009 e 2010, realizado pelo plano de tratamento do Serviço de Vigilância Epidemiológica da Secretária Estadual do Ceará (SIVEP-MDDA), houve uma queda da prevalência de diarreia em crianças na faixa etária de 1 a 4 anos de idade, nos valores respectivos de 65.074 e 57.180 casos de diarreia notificada por ano (BRASIL, 2009; 2010). Outros estados brasileiros também conseguiram bons resultados no controle da morbimortalidade associada às doenças diarreicas. O Brasil foi um dos países que mais se destacaram no combate aos problemas associados à diarreia apresentando melhoras apreciáveis da mortalidade e da mortalidade. Entretanto, sob ponto de vista mundial, as taxas de morbidade não acompanharam o declínio das taxas de mortalidade em todos os países. Apesar das mudanças no perfil de morbi-mortalidade as doenças diarreicas ainda permanecem como um grave problema de saúde pública no Brasil e em diversos países em desenvolvimento (VICTORA *et al.*, 2009; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008).

Um dos principais agentes etiológicos das doenças diarreicas persistentes ( $\geq 14$  dias de duração) é a *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (FRANK *et al.*, 2011; HUANG *et al.* 2006). No presente estudo foi isolada uma cepa das fezes de uma criança que apresentava quadro de desnutrição. A referida cepa foi identificada e caracterizada por provas bioquímicas e por testes de biologia molecular. De acordo com o manual do kit API 20E, alguns parâmetros bioquímicos podem mudar entre as cepas de *E. coli* pela variação de percentual de positividade das reações. Foram observadas variações nas reações bioquímicas da cepa selvagem em relação às outras cepas controles (EAEC 042 e *E. coli* HS). A cepa selvagem apresentou positividade para enzima L-ornitina descarboxilase (70-20%), oxidou L-sucrose à sacarose (36-3%) e se apresentou não reativa em relação a L-raminose (82-30%). Em relação aos testes de biologia molecular, observou-se tanto para a cepa selvagem como para a cepa controle 042 a presença dos genes *aaiC* (gene cromossômico) e *aatA* (gene plasmidial). Estes genes foram usados para o diagnóstico das cepas de *E. coli* do tipo enteroagregativa e estão de acordo com a pesquisa realizada por Lima *et al* (2012). Além disto, foi feita uma triagem de alguns genes de virulência determinando a presença dos genes *aagR*, *pet*, *pic*, *aap*, *astA* tanto

na cepa selvagem como na cepa controle 042. É importante resaltar a ausência desses genes na cepa comensal da *E. coli* HS. Para assegurar que a cepa selvagem realmente se tratava de uma *E. coli* enteroagregativa foi verificado ainda o padrão ouro de diagnóstico em células HEp-2. Neste teste foi visto a organização da cepa isolada em “forma de tijolos empilhados” próximas as células conforme a semelhança ao rearranjo da cepa 042 e a diferença em relação a cepa comensal.

A patogênese da infecção causada pela EAEC é complexa e muito heterogênea (ELIAS *et al.*, 2002). Inúmeros estudos têm visto a capacidade da EAEC de se ligar ao epitélio ileal, jejunal e colônico causando danos pela interação com a barreira intestinal devido à carga bacteriana e a presença dos genes de virulência. Dentre estes genes podemos destacar o fator *aggR*, que é um dos principais reguladores dos genes de virulência da EAEC, e que controla a expressão de fatores de aderência, da proteína dispersina (codificado pelo gene *aap*), além de um conjunto de genes cromossômiais de EAEC (HUANG *et al.*; 2006). Em adição, o gene *pet* codifica uma enzima serino-protease autotransportada (SPATE I) que atua como uma enterotoxina. A secreção desta toxina é acompanhada da clivagem de espectrina do citoesqueleto das microvilosidades intestinais, causando alongamento e arredondamento das células, seguida de esfoliação e acompanhada da redução da força de tensionamento da actina (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). O gene *pic* codifica uma proteína capaz de degradar os componentes gelatinosos do biofilme, possibilitar a mobilidade da bactéria ao longo da mucosa facilitando o aumento da área a ser colonizada pela EAEC (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2010). O gene *astA*, por sua vez, codifica uma proteína termoestável (HUANG *et al.*, 2006). Múltiplos fatores podem contribuir para a promoção da aderência da EAEC ao epitélio intestinal, causando posterior liberação de citocinas e elicitação de uma resposta inflamatória (ANDRADE; FREYMÜLLER; FAGUNDES-NETO, 2010).

Utilizamos o teste de viabilidade celular no período de 24 horas para analisar o efeito de diferentes concentrações bacterianas incubadas por um período de 3 horas na presença das células intestinais de rato IEC-6. A realização de tais testes revelou que a melhor concentração para os inóculos das cepas foi de  $10^5$  UFC/mL. Foi verificado ainda que tanto a cepa padrão de EAEC (042) como a cepa EAEC selvagem causaram redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle, enquanto a cepa *E. coli* HS não causou danos quando comparado às células não infectadas. Tais resultados são semelhantes àqueles encontrados em estudo realizado por Carvalho (2011), onde a cepa EAEC 042 na



concentração bacteriana de  $10^5$  UFC/mL no tempo de 24 horas causou danos importantes nos parâmetros de migração, apoptose e necrose em células IEC-6. Carvalho *et al* (2011), ainda demonstrou, assim como nosso estudo, que a infecção, a partir do inoculo de  $10^5$  UFC/mL foi capaz de reduzir em até 50% a viabilidade celular quando comparada com células não infectadas.

Uma vez determinada a concentração bacteriana ideal para a continuação do estudo, os demais experimentos demonstraram que, na presença da cepa EAEC 042 e EAEC selvagem, houve redução significativa da viabilidade celular, conforme mostrado na curva do tempo-resposta. Contudo, a cepa comensal *E.coli* HS só causou diminuição na viabilidade celular no tempo de 48 horas. A ausência de danos em tempos inferiores às 48 horas pela cepa comensal deve-se, provavelmente, a ausência de genes codificadores de fatores virulência como foi determinado anteriormente. Em consequência deste fato, a cepa apresenta potencial menos lesivo na presença das células intestinais. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com Rasko *et al.* (2008), que demonstraram que a cepa *E. coli* HS mesmo em altas concentrações de  $10^{10}$  UFC na colonização de trato intestinal humano não causou efeito aparentemente clínico.

Além disso, sabe-se que os protooncogenes c-fos e c-jun têm a função cooperativa como fatores de transcrição induzíveis nos processos de transdução de sinal e que os seus produtos de proteína, Fos e Jun, formam um complexo heterodimérico denominado como ativador de proteína AP-1, que tem capacidade de estimular a proliferação ou morte celulares de acordo com o tipo de linhagem celular (SHAULIAN; KARIN, 2001). Neste trabalho, foi demonstrado que a infecção causada pelas cepas de EAEC testadas causaram diminuições significativas dos níveis de transcrição de c-jun e c-fos nos tempos de 0, 6 e 12 horas com resultados condizentes com os efeitos deletérios vistos anteriormente na viabilidade das células intestinais, enquanto a cepa comensal que não apresentou os genes de virulência citados, com exceção do LPS, só promoveu redução dos níveis dos genes c-fos e c-jun no tempo tardio de 48 horas. Diante destes fatos, sugere-se que citotoxinas liberadas pelas cepas de EAEC durante o período de 3 horas de infecção atuem na inibição da transcrição de c-jun e c-fos nos tempos estudados impedindo a sinalização de fatores tróficos celulares.

Outros estudos realizados em biopsias de mucosa intestinal infectadas com cepas de EAEC mostraram efeitos citotóxicos no íleo e no cólon. Estas alterações na mucosa ileal, tais como destruição parcial ou total das vilosidades, vacuolização do citoplasma basal dos

enterócitos, destacamento do epitélio e desarranjo da estrutura com extrusão de células epiteliais poderiam explicar a perpetuação do processo diarreico (ANDRADE; FREYMÜLLER; FAGUNDES-NETO, 2010). Os resultados aqui apresentados corroboram com os efeitos citotóxicos nas células ileais (IEC-6) acima descritos, haja visto que após a colonização das cepas de EAEC foi demonstrado um aumento significativo da apoptose nos tempos de 24 e 48 horas, enquanto a cepa comensal só causou apoptose celular no tempo de 24 horas sem a persistência temporal da lesão. Além disso, a cepa 042 mostrou-se com potencial mais lesivo do que as demais cepas, pois essa causou aumento significativo de células necróticas em todos os tempos estudados. Contudo, a EAEC selvagem só causou necrose no tempo de 24 horas. No caso da cepa comensal, como era esperado, não houve percentual de necrose significativo.

Com o objetivo de investigar os mecanismos de morte celular, foi analisado a expressão de mRNA das caspase 3, 8 e 9. Porém, somente a caspase 8 apresentou níveis de transcrição de mRNA aumentados associados com todas as cepas no tempo de 12 horas o que pode estar relacionado com a redução dos protooncogenes (c-jun e c-fos). Sabe-se que a caspase 8 está intimamente relacionada a várias vias de morte celular, principalmente a via extrínseca (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007), como também outros tipos de morte como a necroptose (VANDENABEELE *et al.*, 2010). Assim, a interação da EAEC com o epitélio causou morte celular ativando caspase 8 e desencadeando uma resposta imune juntamente com o progresso do processo inflamatório.

Em relação à resposta imune do epitélio intestinal, outros estudos têm mostrado o TGF- $\beta$  como importante supressor de tumor e inibidor de crescimento em células IEC-6 (WALSH *et al.*, 2009). O presente trabalho demonstrou que a cepa 042 foi capaz de aumentar os níveis de transcrição do mRNA de TGF- $\beta$  nos tempos de 6 e 12 horas, provavelmente favorecendo a inibição da proliferação celular e prolongando a ativação de fatores de morte como as caspases, enquanto a EAEC selvagem só elevou os níveis de TGF- $\beta$  no tempo de 6 horas, não conseguindo manter este gene com o nível elevado por mais tempo. Outras respostas celulares são produzidas após a infecção, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) reconhecem o LPS e as citotoxinas, estimulando os TLRs das células hospedeiras que desencadeiam as respostas imune e inflamatória. A ativação de TLR está associada com uma sinalização complexa que culmina na ativação de dois importantes fatores de transcrição, NF- $\kappa$ B e AP-1, que modificam o padrão de transcrição de muitas outras famílias de genes. O resultado da ativação final de NF- $\kappa$ B e AP-1 é multifacetada, dependente

dos insumos que movem a sinalização como também o tipo específico de célula (SHARMA;YOUNG;NEU, 2010). Normalmente, tanto o NF-kB como o AP-1 funcionam de forma sinérgica para induzir a inflamação. Isto pode talvez ser observado nos nossos resultados do tempo aqui denominado de tempo zero, que corresponde ao tempo final das 3 horas de infecção, onde observamos aumento da transcrição de NF-kB. Contudo, este aumento não foi observado no tempo de 6 horas. Entretanto, houve significativo aumento dos níveis de transcrição de NF-kB no tempo de 12 horas para todas as cepas, inclusive para a cepa comensal HS. Curiosamente, quando avaliamos os níveis de expressão do mRNA de IL-8 houve um grande aumento no tempo zero, em um patamar de 400 vezes maior que o grupo controle. Porém, ao passo que a expressão do mRNA de IL-8 foi reduzida para os níveis de 20 vezes superior ao grupo controle no tempo de 12 horas, os valores da transcrição de NF-kB voltaram a aumentar, como afirmamos acima. Desta forma, supomos que, em princípio, este aumento da transcrição de NF-kB no tempo de 12 horas poderia representar uma ação protetora, anti-inflamatória, diferente da sua ação no tempo zero. Baruch e colaboradores (2011) demonstraram que o NF-kB poderia induzir a expressão de fatores antiapoptóticos, uma ação protetora contra a morte celular. Contudo, esta hipótese não se reforça, pois no tempo de 12 horas foi observado o aumento da transcrição de caspase 8, culminando com um aumento significativo da apoptose no período de 24 horas e seu prolongamento até 48 horas após a infecção.

Estes dados corroboram com os fatos já descritos na literatura sobre a complexidade dos mecanismos patogênicos relacionados à infecção por cepas de EAEC. O que poderíamos deixar claro, até então, que os resultados indicam que as cepas de EAEC diminuem a viabilidade das células intestinais IEC-6 inibindo a transcrição de c-jun e c-fos e, conseqüentemente, impedindo a sinalização de fatores tróficos celulares e provocando a morte celular especialmente por estímulo relacionado com as vias induzidas por caspase 8.

A EAEC é um microorganismo bastante versátil e seus mecanismos de patogenicidade ainda precisam ser reforçados em estudos posteriores. Durante o percurso da doença diarreica os processos dinâmicos de renovação do epitélio intestinal como a proliferação, migração, diferenciação e morte celular estão alterados. Estas alterações estão cada vez mais associadas à deficiência nutricional por comprometer a integridade e a função intestinal. Existem nutrientes que já são reconhecidos por suas propriedades de modular a resposta imune como arginina, glutamina, betacaroteno, omega-3, nucleotídeos, vitamina A e zinco. (BALLESTAR; ESCOBAR; GRISI, 2002, KIM, 2011). Alguns estudos clínicos que

avaliaram fórmulas com imunonutrientes em pacientes hospitalizados têm demonstrado um benefício claro no que diz respeito à diminuição de complicações clínicas infecciosas em pacientes como também a redução do uso de antibióticos e diminuição do tempo de internação (SANTORA; KOSAR, 2010).

A glutamina é um nutriente condicionalmente essencial em estados de doença ou lesão grave. Nestes casos, a glutamina é liberada no organismo como um sinal de estresse para a ativação de genes que promovam a proteção celular e a resposta imune (SANTORA; KOSAR, 2010). Sabe-se que a glutamina já é utilizada em soluções de nutrição parenteral, porém, para suprir algumas de suas propriedades químicas não desejáveis, como a instabilidade ao calor e armazenamento e solubilidade limitada, entre outros fatores, foi desenvolvida a alanil-glutamina (AG) (LIMA, 2006), que é um dos focos do presente estudo.

Inicialmente foram avaliadas as concentrações entre 0,3 e 30 mM para determinar a dose a ser escolhida de AG a partir do ensaio de proliferação apenas no tempo de 24 horas. O grupo tratado com AG 1mM teve um incremento de 50% na proliferação celular quando comparado ao grupo sem glutamina. Por tal motivo a concentração de AG 1mM foi escolhida para a continuação dos experimentos. Outros estudos, como o realizado por Ueno *et al.* 2011, escolheram também a mesma concentração de alanil-glutamina (1mM) para suplementarem células intestinais (MSIE) após um modelo de desnutrição e foi visto que o tratamento das células com essa concentração de AG causou aumento da proliferação celular, além de redução do percentual de células apoptóticas.

Além disso, ainda no tempo de 24 horas foi visto que todas as concentrações testadas a partir 0,3 mM até 10 mM promoveram aumento proliferativo. Contudo, a curva começou a apresentar um leve declínio quando 30 mM foram acrescentados à cultura. Brito *et al.* (2005) avaliaram as mesmas concentrações de AG nos tempos de 6, 12 e 24 horas demonstrando o aumento significativo da proliferação celular em relação ao controle (meio sem glutamina) por meio da medida indireta do sal tretazolio (WST-1). Após a escolha da concentração AG 1mM foi feito a curva tempo-efeito para a avaliação da proliferação das células intestinais por 12, 24 e 48 horas, esta curva mostrou um crescimento da proliferação celular significante a partir do tempo de 24 horas quando comparado ao controle. Percebeu-se também que não foram alterados os níveis da expressão de mRNA de c-jun e c-fos nos grupos tratados com AG 1mM em relação ao controle. Estudos realizados por Quaroni *et al.* (1979) demonstraram que este tipo linhagem intestinal (IEC-6) inicia seu ciclo mitótico num período de 19-22

horas. Assim, o aumento da proliferação celular na presença de AG 1mM no tempo de 24 horas pode ser associado ao tempo de mitose da IEC-6.

É importante ressaltar que tanto a glutamina como a alanil-glutamina agem principalmente durante as injúrias nos tecidos e enterócitos, no intuito de evitar a morte celular, como mostram ensaios realizados *in vitro* e *in vivo* (BRITO *et al.* 2005; BRAGANETO *et al.* 2008; CARNEIRO *et al.*, 2006; SCHEIBE *et al.*, 2009). Porém, também se torna importante realizar estudos deste micronutriente sem infecção, para garantir que a concentração estudada não cause lesões às células. Nos testes realizados com AG sem a infecção bacteriana não foram verificadas diferenças significantes de apoptose e necrose em relação ao controle. Também não foram verificadas alterações significantes nos níveis de mRNA das caspases 3, 8 e 9 dos grupos tratados com AG 1mM, quando comparadas ao grupo controle. Nenhum comportamento de morte celular ou aumento da transcrição das caspases 3, 8 e 9 foi observado, pois estas células suplementadas com alanil-glutamina não sofreram injúrias, mostrando o importante papel deste micronutriente como indutor da proliferação celular.

No tempo de 12 horas foi verificado aumento dos níveis de NF-kB do grupo AG 1mM quando comparado ao controle. Estes dados corroboram com a hipótese proposta anteriormente no qual NF-kB poderia também estar associado com as vias anti-apoptóticas e de citoproteção dependendo do seu substrato de ativação (SHARMA; YOUNG; NEU, 2010). O aumento de NF-kB verificado pelo presente estudo pode ser um dos fatores predisponentes no aumento da resposta proliferativa no grupo tratando com AG 1mM.

$\beta$ -caroteno é precursor importante da síntese de vitamina A (pró-vitamina A), micronutriente essencial para crescimento e diferenciação do número de células e tecidos (STROBEL; TINZ; BIESALSKI, 2007). Por razões estruturais e com bases em dados experimentais, tem sido sugerido que o  $\beta$ -caroteno apresenta propriedades antioxidantes. Contudo, este dado tem sido contestado. Estudos *in vitro* têm demonstrado suas propriedades oxidativas baseado em análises de biomarcadores de danos oxidativos. Assim, ainda não existe um consenso em relação à sua função pró ou antioxidante (GRUNE *et al.*, 2010). Além disso, estudos clínicos de Vivekananthan *et al.* (2003), envolvendo um total de 138113 pacientes demonstraram a associação do uso de  $\beta$ -caroteno com o aumento de mortalidade está associada à doenças cardiovasculares.

No que diz respeito ao presente estudo, onde analisamos os efeitos do  $\beta$ -caroteno na proliferação celular após um período de 24 horas, na ausência de infecção bacteriana, com o intuito de escolhermos a concentração ideal para os testes de infecção, percebeu-se que 30  $\mu\text{M}$  foi a única concentração com aumento celular significativo em relação ao controle e com as outras concentrações testadas. Contudo, outros estudos como de Palozza *et al.* (2005), utilizando células de adenocarcinoma de colon humano, demonstraram que algumas linhagens celulares (LS-174 e HT-29) sofreram inibição do crescimento celular e perfil pró-apoptótico após suplementação de  $\beta$ -caroteno nas concentrações de 0.5–2.0  $\mu\text{mol/L}$ . Para assim evitar altas concentrações, como vimos no estudo de Palozza *et al.* (2005), para o presente estudo foi realizado um tratamento estatístico dos dados e a concentração escolhida foi de 8  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -caroteno, concentração esta a escolhida para dar continuidade aos experimentos. Além disso, foi realizado os ensaios de proliferação com a concentração escolhida nos tempos de 12, 24 e 48 horas. Porém, não houve aumento da proliferação celular em nenhum dos tempos. Também foi visto que os níveis de mRNA de c-jun e c-fos não foram alterados, o que corrobora com o fato de não encontrarmos efeito proliferativo direto nesta concentração.

Entre as características do  $\beta$ -caroteno é importante salientar sua capacidade de produzir, durante sua metabolização, além do retinol, o ácido retinóico, que apresenta atividade pró-oxidante e antiproliferativa (GRUNE *et al.* 2010). Estudos com linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humana (MCF-7) demonstraram que o tratamento com o  $\beta$ -caroteno promoveu indução de apoptose e aumento da transcrição do receptor proliferador ativador de peroxissoma (PPAR- $\gamma$ ), que foi associado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (CUI *et al.*, 2007). No presente trabalho, não foi observado apoptose celular significativa em células não infectadas suplementadas com  $\beta$ -caroteno, diferente do estudo de Cui *et al.* (2007) com as células cancerígenas. Contudo, foi visto aumento significativo de células necróticas nos tempos de 12 e 48 horas. Além disso, houve aumento dos níveis mRNA de caspase 8 com o uso de 8  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -caroteno em células não-infectadas no tempo de 12 horas. Este aumento dos níveis de transcrição de caspase 8 pode estar tanto associado com as vias de apoptose como também de necroptose. Estudos posteriores serão necessários para investigar a via de morte celular envolvida no processo com este micronutriente. O atual trabalho apresentou diferentes resultados em relação aos dados de Carvalho (2011), que demonstrou uma redução significativa de apoptose sob a ação do  $\beta$ -caroteno nas concentrações de 3  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) e 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ) na ausência de infecção

nas células IEC-6, além da ausência de necrose celular significativa. Tal diferença deve-se, provavelmente, as diferenças nos modelos experimentais empregados.

Kefaloyiann, Gaitanaki e Beis (2006) mostraram que durante o processo oxidativo dose-depedente existe uma forte indução da sinalização de MAPK que pode modular a proliferação. Contudo, a indução prologada poderia conduzir à morte celular e induzir a fosforilação de NF-kB p65. No estudo atual foi visto que no tempo de 12 horas houve elevação significativa dos níveis de transcrição de NF-kB no grupo  $\beta$ -caroteno não-infectado, o qual poderia estar associado à sua função prooxidante. Estes dados são reforçados com os achados do aumento dos níveis de transcrição de IL-8 no tempo de 6 horas.

Em adição, nossos resultados progrediram com o estudo da proliferação celular após infecção bacteriana com as cepas de EAEC sob as células intestinais IEC-6 suplementadas com alanil-glutamina (AG) e  $\beta$ -caroteno. Os dados revelaram que as lesões causadas pelas cepas de EAEC 042 e EAEC selvagem foram revertidas pela suplementação de AG 1mM nos tempos de 12, 24 e 48h. Estes resultados são semelhantes ao encontrado por Brito *et al.* (2005), os quais induziram a lesão com toxina A do *Clostridium difficile* (1–100 ng/ml) em células IEC-6 e trataram com alanil-glutamina (1–30 mM), mostrando assim uma alta capacidade proliferativa. Além disso, a glutamina é reconhecida pelo seu papel anti-inflamatório, sua capacidade de exercer papel trófico nas células intestinais por aumento da síntese de proteínas e nucleotídeos, como um reforço à ação mitogênica de fatores de crescimento, ativando as vias MAPK, ERKs e JNK e levando à rápida estimulação de c-jun o que conduz com a subseqüente ativação de AP-1 (BRASSE-LAGNEL; LAVOINNE; HUSSON, 2010). Entretanto, os dados encontrados no atual trabalho mostraram que os níveis de transcrição de c-jun e c-fos continuaram reduzidos mesmo como acréscimo da AG 1mM nas células após a infecção, o que não condiz com os mesmos efeitos encontrados com os estudos realizados com glutamina.

De acordo com os resultados encontrados de apoptose e necrose, ocorreu redução significativa do percentual de células apoptóticas com acréscimo de AG 1mM após a infecção. Além disso, os grupos tratados com AG 1Mm e infectados com EAEC 042 reduziram o percentual das células necróticas em todos os tempos avaliados. Foi possível também verificar que houve redução da necrose nas células tratadas com esse micronutriente após infecção com a cepa selvagem de EAEC. Igualmente aos dados relatados pelo nosso trabalho, a alanil-glutamina apresentou ação antiapoptótica nos resultados descritos por

Carneiro *et al.* (2006), que conduziram uma pesquisa em células T84 induzindo apoptose com toxina A do *Clostridium difficile* e mostraram que, após a adição de alanil-glutamina e glutamina houve um bloqueio da ativação de caspase 8 e redução do efeito da toxina na mucosa. Contudo, no presente trabalho a alanil-glutamina nas células IEC-6 após infecção não conseguiu bloquear a ativação da caspase 8 já observada no tempo de 12 horas. Outras pesquisas sugerem que a ativação das proteínas de choque térmico (HSP) seria uma via alternativa que contribuiria com a ação antiapoptótica da glutamina envolvendo a resposta com a ligação do DNA e a síntese de *heat shock factor protein 1* (HSF-1) (BRASSELAGNEL; LAVOINNE; HUSSON, 2010). Talvez a ação antiapoptótica e anti-necrótica da AG no presente trabalho esteja associada a outra via que não seja o bloqueio direto das caspases ou a concentração usada não foi capaz de promover tal proteção.

TGF- $\beta$  é um inibidor da proliferação e tem um papel importante no contrabalanço da proliferação celular (DIGNASS, 2001). Mesmo com a adição de AG 1mM após infecção com EAEC 042 ainda observamos um aumentado dos níveis de transcrição de TGF- $\beta$  no tempo de 6h. Contudo, no tempo de 12h já não aparece aumentado os níveis de TGF- $\beta$ . Resultados condizentes com a possível ação da alanil-glutamina, que aumentou a proliferação celular, inibiu a apoptose e necrose após a infecção. As células acrescidas de AG1mM após infecção com EAEC 042 ainda mantiveram os níveis aumentados da transcrição de NF-KB, assim como demonstraram o mesmo perfil visto anterior da redução drástica da transcrição de IL-8 na ausência da suplementação. Sugerimos que a dose empregada não tenha sido capaz de promover ação protetora.

De acordo com os resultados da curva tempo-efeito, só foram vistos aumentos significativos na proliferação celular com acréscimo de  $\beta$ -caroteno após a infecção no tempo de 24 horas. Provavelmente este resultado pode estar associado ao tempo mitótico das células IEC-6, que se encontra no período de 19-22 horas (QUARONI *et al.* 1979). Estes resultados também podem ter sido influenciados por certos fatores como a eficiência do  $\beta$ -caroteno durante a sua capacidade de absorção e/ou conversão a retinol, tipo de tecido estudado, genética, entre outros. Além disso, mudanças na expressão na via de clivagem causando oxidação ou redução para formação dos produtos em retinol e ácido retinóico, levam à diferença nos seus efeitos proliferativos ou antiproliferativo (HARISSON, 2012; GRUNE *et al.* 2010). Em adição, mesmo após a suplementação de  $\beta$ -caroteno depois da infecção, os níveis de transcrição de c-jun e c-fos permaneceram significativamente reduzidos. Carvalho



(2011) demonstrou em células intestinais na presença da EAEC 042 que a suplementação com  $\beta$ -caroteno na concentração de 3  $\mu$ M causou redução no número de células viáveis e provocou aumento da apoptose. Porém, este micronutriente, nas concentrações de 3, 10 e 30  $\mu$ M reduziu a necrose no tempo de 24 horas. Os resultados relacionados à apoptose mostraram uma redução deste percentual no tempo de 24 horas com a suplementação de  $\beta$ -caroteno após infecção da cepa selvagem. Contudo, no tempo de 48 horas ocorreu um aumento das células apoptóticas no mesmo grupo que antes havia diminuído, o que já se assemelha aos resultados de Carvalho (2011). No que diz respeito aos resultados de necrose, também observamos, no tempo de 24 horas, redução no percentual de células necróticas no grupo tratado após infecção com EAEC 042. Resultados condizentes com a pesquisa de Carvalho (2011). Porém, nos tempos de 12 e 48 horas foi visto aumento da necrose nos tratados após infecção com EAEC selvagem.

Entre o estudo das caspases, verificou-se que a transcrição relativa de caspase 8, mostrou-se aumentada em todos os grupos no tempo de 12 horas. Além disso, no tempo de 6 horas houve aumento da transcrição de caspase 9 no grupo acrescido de  $\beta$ -caroteno após infecção da cepa de EAEC padrão. O aumento significativo de caspase 3 também foi identificado nos grupos tratados com  $\beta$ -caroteno principalmente no tempo de 12 horas. Este aumento de caspase 3 também foi observado em outros modelos *in vitro* como de Palozza *et al.* 2005, onde o  $\beta$ -caroteno apresentou função pro-apoptótica. Portanto, devidos aos diferentes resultados relatados na nossa pesquisa se faz necessário estudos mais aprofundados para determinar que tipo de morte celular estaria relacionada com a ação desse micronutriente na presença ou ausência do dano causada pela EAEC. Sabe-se que a apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos (via extrínseca ou citoplasmáticas) relacionados aos receptores de morte que conduzem a sinalização de caspase 8 ou por fatores internos (via intrínseca ou mitocondrial), relacionados a caspase 9 que podem ser ativados por agentes citotóxicos como também espécies reativas de oxigênio (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Além disso, também se estabeleceu a necroptose que é considerada uma “necrose programada”, a qual envolve no seu processo caspase 8 (VANDENABEELE *et al.*, 2010).

No caso dos níveis de mRNA de NF- $\kappa$ B verificou-se aumento significativo em todos os grupos do tempo de 12 horas. Estes resultados provavelmente estão associados ao efeito anti-apoptótico do NF- $\kappa$ B como no estudo realizado por Sharma, Young e Neu (2010), pois também houve diminuição de forma temporal dos níveis de transcrição de IL-8.

## 7 CONCLUSÃO

Nos ensaios de viabilidade celular todas as infecções das cepas bacterianas provocaram redução significativa destes parâmetros. Contudo a cepa EAEC 042 mostrou um maior potencial lesivo que a EAEC selvagem, provocando um maior percentual de morte celular por um tempo mais prolongado. A *E. coli* HS mostrou-se menos danosa em relação às cepas de EAEC.

A morte celular provocada pelas cepas bacterianas envolve aumento da transcrição de caspase 8, o que pode estar relacionada com ativação da via extrínseca da apoptose. Entretanto fazem-se necessários estudos mais aprofundados para avaliar os mecanismos anteriores que levam a ativação da via de morte.

A suplementação com alanil-glutamina promoveu efeitos positivos na proteção epitelial contra os danos causados pela infecção das cepas tanto nos processos proliferativos quanto na inibição de morte celular. Contudo, a alanil-glutamina não bloqueou caspase 8, podendo sua função antiapoptótica está relacionada a outra via de ação neste modelo em estudo.

Em relação à suplementação com o betacaroteno, o mesmo só foi capaz de restaurar alguns danos celulares causados pelas cepas no tempo de 24 horas. Nos outros tempos, o betacaroteno mostrou-se potencialmente lesivo às células causando morte celular, provavelmente, relacionado aos seus efeitos prooxidantes que podem pela sua conversão em ácido retinóico. Serão necessárias investigações mais específicas para avaliar as ações do betacaroteno sobre as células intestinais.

## REFERÊNCIAS

- ADACHI, J. A.; JIANG, Z. D.; MATHEWSON, J. J. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. **Clin Infect Dis**, v. 32, p.1706-9, 2001.
- ANDRADE, J. A. B.; FREYMÜLLER, E.; FAGUNDES-NETO, U. Pathophysiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infection: an experimental model utilizing transmission electron microscopy. **Arq. Gastroenterol**, v. 4, n.3, p.306-312, 2010.
- ANDRADE, J. A.; FREYMÜLLER, E.; FAGUNDES-NETO, U. Adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to the ileal and colonic mucosa: an in vitro study utilizing the scanning electron microscopy. **Arq Gastroenterol**, v. 48, n. 3, p. 199-204, 2011.
- ANDRADE, J. A. B.; FAGUNDES-NETO, U. Diarreia persistente: ainda um importante desafio para o pediatra. **J. pediatr.** (Rio J.), v.76 (Supl.2), p.S119-S126, 2011.
- ANDRADE, J. A. B.; MOREIRA, C.; FAGUNDES-NETO, U. Diarréia persistente. **J. pediatr.** (Rio J.), v.76 (Supl.2), p.S119-S126, 2000.
- ARII, K.; KAI, T.; KOKUBA, Y. Degradation kinetics of L-alanyl-L-glutamine and its derivatives in aqueous solution. **Eur J Pharm Sci.** v.2, p.107-12, 1999.
- ASQUITH, M.; POWRIE, F. An innately dangerous balancing act: intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer. **J Exp Med.** v.2; n. 207, p.1573-7, 2010
- BALLESTER, D.; ESCOBAR, A. M. U.; GRISI, S. J. F. E. Diarréia persistente: revisão dos principais aspectos fisiopatogênicos, fatores de risco e implicações terapêuticas. **Pediatria** (São Paulo), v.24, n.(3/4), p.112-121, 2002.
- BARUCH, K.; GUR-ARIE, L.; NADLER, C.; KOPY, S.; YERUSHALMI, G.; BEN-NERIAH, Y.; YOGEV, O.; SHAULIAN E, GUTTMAN, C.; ZARIVACH, R.; ROSENSHINE, I. Metalloprotease type III effectors that specifically cleave JNK and NF- $\kappa$ B. **EMBO J.**, v.30, n.1, p.221-31, jan. 2011.
- BAUDRY, B.; SAVARINO, S. J.; VIAL, P.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J Infect Dis.**, v. 161, n.6, p.1249-51, jun. 1990.
- BENDICH, A. ; OLSON, J. A. Biological actions of carotenoids. **FASEB J.** ,v.3, n.8, p.1927-32, 1989
- BHAN, M. K.; BHANDARI, N.; SAZAWAL, S.; CLEMENS, J.; RAJ, P.; LEVINE, M. M.; KAPER, J. B. Descriptive epidemiology of persistent diarrhoea among young children in rural northern India. **Bull World Health Organ.**, v. 67, n. 3, p. 281-288, 1989.
- BIESALSK, H. K. comparative assessment of the toxicology of vitamin a and retinoids in man. **Toxicology.**, v. 57 , p.117-161, 1989.

BRAGA-NETO, M. B.; WARREN, C. A.; ORIÁ, R. B.; MONTEIRO, M. S.; MACIEL, A. A.; BRITO, G. A.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Alanyl-glutamine and glutamine supplementation improves 5-fluorouracil-induced intestinal epithelium damage in vitro. **Dig Dis Sci.**, v. 53, n. 10, p. 2687–2696, 2008.

BRASSE-LAGNEL, C. G.; LAVOINNE, A.M.; HUSSON, A.S., Amino acid regulation of mammalian gene expression in the intestine. **Biochimie**, v. 92, p. 729-735, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de doenças diarreicas agudas por semana epidemiológica segundo faixa etária, plano de tratamento.** Ceará, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim da SVS-Secretaria da Vigilância em Saúde/SIVEP-MDDA – Secretária de Saúde do Estado do Ceará. **Casos de doenças diarreicas agudas por semana epidemiológica segundo faixa etária, plano de tratamento, Ceará, 2010.**

BRASIL, Ministerio da saúde. Plano nacional de saúde: 2012-2015 (Brasil)- Brasília: Editora MS. 2011. p.20

BRITO, G. A.; CARNEIRO-FILHO, B.; ORIÁ, R. B.; DESTURA, R. V.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Clostridium difficile toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. **Dig. Dis. Sci.**, v. 50, n. 7, p. 1271-1278, 2005.

BUSHEN, O. Y.; DAVENPORT, J. A.; LIMA, A. B.; PISCITELLI, S. C.; UZGIRIS, A. J.; SILVA, T. M.; LEITE, R.; KOSEK, M.; DILLINGHAM, R. A.; GIRAO, A.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Diarrhea and Reduced Levels of Antiretroviral Drugs: Improvement with Glutamine or Alanyl-Glutamine in a Randomized Controlled Trial in Northeast Brazil. **Clin Infect Dis.**, v.15, n.38 p.1764-70, 2004

CANÓN, E; COSGAYA, J. M.; SCSUCOVA, S.; ARANDA. Rapid effect of retinoic acid on ERK and CREB phosphorylation in neuronal cells. **Molecular Biology of the Cel.**, v.15, p. 5583-5592, 2004.

CARNEIRO, B. A.; FUJII, J.; BRITO, G. A. C.; ALCANTARA, C.; ORIA, R. B.; LIMA, A. A. M.; OBRIG, T.; GUERRANT, R. L. Caspase and Bid Involvement in *Clostridium difficile* Toxin A-Induced Apoptosis and Modulation of Toxin A Effects by Glutamine and Alanyl-Glutamine In Vivo and In Vitro. **Infection and immunity**, p. 81–87, jan. 2006.

CARVALHO, E. B. **Efeito da modulação da glutamina, alanil-glutamina,  $\beta$ -caroteno, zinco e do leite de cabra transgênico contendo lisozima humana, em células epiteliais intestinais sob ação da *Escherichia coli* enteroagregativa.** 2011. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CERNIANO, G.; BRANDMAIER, P.; SCHOLZ, G.; ACKERMANN, O. P.; ALT, R.; ROTHE, K.; CROSSM, WITZIGMANN H. All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in adormant state. Subsequent nerve growth factor/ brain-derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit. **Journal of Pediatric Sugery**, v.43, n.7, p.1284-1294, 2008.

- CRAVIOTO, A. R. J.; GROSS, S. M.; SCOTLAND; ROWE. B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 3, p.95–99.
- CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFÁN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. **Lancet.**, v. 337, n. 8736, p. 262-264, 1991.
- CUI, Y.; LU, Z.; BAI, L.; SHI, Z.; ZHAO, W. E.; ZHAO, B. beta-Carotene induces apoptosis and up-regulates peroxisome proliferator activated receptor gamma expression and reactive oxygen species production in MCF-7 cancer cells. **Eur J Cancer**, v.43, p.2590-2, 2007.
- DIGNASS, A. U. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. **Inflamm Bowel Dis.**, v.7, n.1, p.68-77, fev. 2001.
- DUDLEY, E. G.; THOMSON, N. R.; PARKHILL, J.; MORIN, N. P.; NATARO, J. P. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol.**, v. 61, n. 5, p. 1267-1282, 2006.
- DURING, A.; DAWSON, H. D.; HARRISON, E. H. Carotenoid Transport Is Decreased and Expression of the Lipid Transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 Is Downregulated in Caco-2 Cells Treated with Ezetimibe., **J Nutr.**, v. 135, n.10, p.2305-12, 2005
- ELIAS, W. P.; UBER, A. P.; TOMITA, S. K., TRABULSI, L. R. & GOMES, T. A. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiol Infect.**, v. 129, p.49–55, 2002.
- FAGUNDES-NETO, U. et al. Studies of the small bowel surface by scanning electron microscopy in infants with persistent diarrhea. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, p.1437-1442, 2000.
- FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **Journal Clinical Investigation**, v.111, p.931-946, 2003.
- FUNDAÇÃO INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Comissão Nacional sobre Determinantes Sociais da Saúde. As causas sociais sobre as iniquidades em saúde no Brasil. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: < <http://www.cndss.fiocruz.br/pdf/home/relatorio.pdf> >. Acesso em: 3 jan. 2013
- FRANK, C.; WERBER, D.; CRAMER, J. P.; ASKAR, M.; FABER, M.; HEIDEN, M.; BERNARD, H.; FRUTH, A.; PRAGER, R.; SPODE, A.; WADL, M.; ZOUFALY, A.; JORDAN, S.; KEMPER, M. J.; PER FOLLIN; MÜLLER, L.; KING, L. A.; ROSNER, B.; BUCHHOLZ, U.; STARK, K., KRAUSE, G. Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. **N Engl J Med.**, v. 365, p.1771-1780, 2011.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells – A manual of basic technique and specialized applications**. 6ª edição. Wiley-liss, Nova Iorque, 2010.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Comissão Nacional sobre Determinantes Sociais da Saúde**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008.

GOKE, M.; PODOLSKY, D. K. Regulation of the mucosal epithelial barrier. **Baillieres Clin. Gastroenterol.**, v. 10, p. 393-405, 1996.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n.3, p.335-343, 2007.

GRUNE, T.; LIETZ, G.; PALOU, A.; ROSS, A. C.; STAHL, W.; TANG, G.; THURNHAM, D.; YIN, SHI – AN.; BIESALSKI, H. K.,  $\beta$ -Carotene Is a n Important Vitamin A Source for Humans. **J. Nutr.**, v. 140, p.2268S–2285S, 2010.

GUDAS, L. J.; SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, editors. **The retinoids**. 2nd ed. New York: Academic Press; p. 443 –520, 1994.

GUERRANT, R. L.; DEBOER, M. D.; MOORE, S. R.; SCHARF, R. J.; LIMA, A. A. The impoverished gut--a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v.10, n.4, p.220-9, abr. 2013.

GUERRANT, D. I.; MOORE, S. R.; LIMA, A. A.; PATRICK, P. D.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven year later in a poor urban community in northeast Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 5, p. 707 – 713, 1999.

HALAZONETIS T. D.; GEORGOPOULOS, K.; GREENBERG, M. E.; LEDER, P. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. **Cell**. v.2, n.55, p.917-24, 1988.

HARRISON, E. H. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1821, p.70–77, 2012.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett**, v. 254, p.12–1, 2006.

HUANG, D. B.; MOHANTY, A.; DUPONT, H. L.; OKHUYSEN, P. C.; CHIANG, Tom. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli* **Journal of Medical Microbiology**, v.55, part 10, p.1303–1311, 2006.

HUANG, Y.; SHAO, X. M.; NEU, J. Immunonutrients and neonates. **Eur J Pediatr.**, v.162, n.3, p.122-8, 2003

JIANG, Z. D.; OKHUYSEN, P. C.; GUO, D. C.; HE, R.; KING, T. M.; DUPONT, H. L., MILEWICZ, D. M. Genetic susceptibility to enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea: polymorphism in the interleukin-8 promoter region. **J Infect Dis**. v.15, n.188, p. 506-11, 2003.

- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev.**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.
- KEFALOYIANNI, E.; GAITANAKI, C.; BEIS, I. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. **Cell Signal.**, v.18, n.12, p.2238-51, dez. 2006.
- KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ.**, v. 81, n. 3, p. 197-204, 2003.
- KIM, H. Glutamine as an Immunonutrient. **Yonsei Med J.**, v.52, n.6, p.892-7, 2011.
- KIM, M.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine. **World Rev Nutr Diet.**, v.105, p.90-6, 2013
- KRIEHLER, E.; BAUER, W.; CHARBONNIER, A. S.; WINTER, D.; AMATSCHEK, S.; TAMANDL, D.; SCHWEIFER, N.; STINGL, G.; MAURER, D. Balance between NF-kappaB and JNK/AP-1 activity controls dendritic cell life and death. **Blood.**, v.1, n.106, p.175-83, 2005.
- LAMBERTI, L. M.; FISCHER WALKER, C. L.; BLACK, R. E. Systematic review of diarrhea duration and severity in children and adults in low- and middle-income countries. **BMC Public Health.**, v.12, p. 276, abr. 2012.
- LARSON, S. D.; LI, J.; CHUNG, D. H.; EVERS, B. M. Molecular mechanisms contributing to glutamine-mediated intestinal cell survival. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 293, p. G1262–G1271, 2007.
- LEVINE, M. M.; BERGQUIST, E. J.; NALIN, D. R.; WATERMAN, D. H.; HORNICK, R. B.; YOUNG, C. R.; SOTMAN, S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet.**, v. 1, n. 8074, p. 1119-1122, 1978.
- LEVINE, M. M.; FERRECCIO, C.; PRADO, V.; CAYAZZO, P. A.; ABREGO, P.; MARTINEZ, J. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level pri-urban community in Santiago, Chile. **Am J Epidemiol**, v.138, p.849-69, 1993.
- LIMA, A. A.; BRITO, L. F.; RIBEIRO, H. B.; MARTINS, M. C.; LUSTOSA, A. P.; ROCHA E. M.; LIMA, N. L.; MONTE, C. M.; GUERRANT, R. L. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 40, n. 1, p.28-35, 2005.
- LIMA, A. A. M.; MOORE, S. R.; BARBOZA JR., M.S.; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; NATARO, J. P.; FEDORKO, D. P.; WUHIB, T.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 181, n. 5, p. 1643-1651, 2000.

LIMA, N. L. **Suplementação de alanil-glutamina em crianças de uma comunidade carente de Fortaleza – CE: impacto sobre a barreira intestinal e estado nutricional infantil.** 2006.161f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

LIMA, N. L.; SOARES, A. M.; MOTA, R. M.; MONTEIRO, H. S.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. Wasting and intestinal barrier function in children taking alanylglutamine-supplemented enteral formula. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 44, p. 365–374, 2007.

LIMA, I. F. N. **Genes codificadores de fatores de virulência, inflamação e avaliação nutricional da infecção intestinal associada com Escherichia coli enteroagregativa em crianças de Fortaleza, Ceará, Brasil.** 2008. 197f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

LIMA, I. F.; QUETZ, J. D.; GUERRANT, R. L.; NATARO, J. P.; HOUP, E. R.; LIMA, A. A.; HAVT, A. Enteroaggregative Escherichia coli quantification in children stool samples using quantitative PCR. **APMIS.**2012

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Method Methods.**, v.25, n.4, p.402-8, dez. 2001.

LIBONI, K.C.; SCUMPIA, N.; LI, P.O.; NEU, J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B in human fetal and adult intestinal epithelium. **J. Nutr.**, v. 135, p. 245 e 251, 2005.

LIU, M.; LAVARONE, A.; FREEDMAN, L. P.; Transcriptional activation of the human p21 (WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation induction of U937cell differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p.31723-31728, 1996.

MACIEL, A. A.; ORIÁ, R. B.; BRAGA-NETO, M. B.; BRAGA, A. B.; CARVALHO, E. B.; LUCENA, H. B.; BRITO, G. A.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. Role of retinol in protecting epithelial cell damage induced by Clostridium difficile toxin A. **Toxicon.** v.15, n.50, p.1027-40, 2007.

McCOMARCK, S. A.; VIAR, M. J.; JOHNSON, L. R. Migration of IEC-6: a model for mucosal healing. **Am J Physiol.**, v.263, p.G426-G435, 1992.

MOORE, S.; LIMA, A.; SCHORLING, J. M.; BARBOZA, M. S.; SOARES, A. M.; GUERRANT, R. L. Changes over time in the epidemiology of diarrhea and malnutrition among children in an urban Brazilian shantytown, 1989 to 1996. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 4, p. 179, 2000.

MOORE, S R ; LIMA, A. Â. M. ; CONAWAY, M. R. ; SCHORLING, J B ; SOARES, A M ; GUERRANT, R L . Early childhood diarrhoea and helminthiasis associate with long-term linear growth faltering. **Int. J. Pediatr.**, v. 30, n.6, p. 1457-1464, 2001.

NATARO, J. P.; Enteroaggregative Escherichia coli pathogenesis. **Curr Opin Gastroenterol.** v.21,n.1, p.4-8, 2005



- NATARO, J. P.; DENG, Y.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S. J.; GUERS, L. D.; LEVINE, M. M.; TACKET, C. O. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J. Infect. Dis.**, v. 171, n. 2, p. 465-468, 1995.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, p. 142–201, jan. 1998.
- NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Disease**, v. 4, n. 2, april/june 1998.
- NAVARRO-GARCIA, F; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes.** v.2, n.1, p13-24, 2011.
- NILES, R. M., Recent Advances in the Use of Vitamin A (Retinoids) in the Prevention and Treatment of Cancer. **Nutrition.**, v.16, p.1084 –1090, 2000.
- PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Ed. Guanabara Koogan, 2005.
- PETRI-JUNIOR, W. A. P.; MILLER, M.; BINDER, H. J.; LEVINE, M. M.; DILLINGHAM, R.; GUERRANT, R. L. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **J. Clin. Invest.**, v.118, p.1277–1290, 2008.
- PALOZZA, P.; SERINI, S.; MAGGIANO, N.; TRINGALI, G.; NAVARRA, P.; RANELLETTI, F. O.; CALVIELLO, G. beta-Carotene downregulates the steady-state and heregulin-alpha-induced COX-2 pathways in colon cancer cells. **J Nutr.**, v.135, n.1, p.129-36, jan. 2005.
- PERTOVAARA , L.; SISTONEN, L.; BOS, T. J.; VOGT, P.; KESKI-OJA, J.; ALITALO, K. Enhanced jun gene expression is an early genomic response to transforming growth factor B stimulation. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n.3, p. 1255-1262, mar. 1989.
- QUARONI, A.; WANDS, J.; TRELSTAD, R.L.; ISSELBACHER, K.J. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. **J Cell Biol.**, v. 80, n. 2, p. 248-265, 1979.
- RASKO, D. A.; ROSOVITZ, M. J.; MYERS, G. S.; MONGODIN, E. F.; FRICKE, W. F.; GAJER, P.; CRABTREE, J.; SPERANDIO, V.; RAVEL, J. "The pan-genome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates." **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 6881-6893, 2008
- RAUSCHER, F. J.; CURRAN, T . Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. **Science** , New York, N.Y., v. 249, n.4973, p.1157-1161, 1990.
- RUEMMELE, F.; RUEMMELE, C.; LEVY, E.; SEIDMAN, E. Molecular mechanisms regulating intestinal epithelial cell turnover by nutrients. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, v. 23, p. 47-55, 1999.
- RUTTNER, M. E.; RENNA, N. F.; BALBI, L.; GARCIA, B.; GUIDONE, L.; FERNANDEZ, R.; PUIG, O.; ORTIZ, A. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* strains

isolated from children with acute diarrhea, in Mendoza, Argentina. **Rev. Argent. Microbiol.**, v.34, p. 167–170, 2002.

SANTORA, R.; KOZAR, R. A. Molecular mechanisms of pharmaconutrients. **J. Surg Research**, v. 161, n. 2, p. 288-294, 2010.

SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 181, n. 5, p. 1643-1651, 2000.

SHARMA, R.; YOUNG, C.; NEU J. Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. **J Biomed Biotechnol.**, v.305879, 2010.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 in cell proliferation and survival. **Oncogene.**, v.20, n.19, p.2390-400, Apr. 2001.

SILVA, R.L.S.; CALIXTO-LIMA, L.; CAMPOS, S.M.N. Nutrientes especiais em nutrição parenteral. In. CALIXTO-LIMA, L.; ABR AHÃO, V.; AUAD, G.R.V.; COELHO, S.C.; GONZALEZ, M.C.; SILVA, R.L.S. **Manual de Nutrição Parenteral**. 1ª ed. Rubio, cap 5, p. 85-89, 2010.

STAHL, W.; SIES, H. Photoprotection by dietary carotenoids: Concept, mechanisms, evidence and future development. **Mol. Nutr. Food Res.**, v.56, p.287-295, 2012

SOUBA, W.W. Intestinal glutamine metabolism and nutrition. **J. Nutr. Biochem.** vol. 4, 1993

SOURKES, T. L. The discovery and early history of carotene. **Bull. Hist. Chem.**, v. 34, n.1, 2009

STEHLE, P.; ZANDER, J.; MERTES, N.; ALBERS, S.; PUCHSTEIN, C.; LAWIN, P.; FÜRST, P. Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. **Lancet.**, v.1, n.8632, p.231-3, 1989

STEINER, T. S.; LIMA, A. A. M.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 177, n. 1, p. 88-96, 1998.

STEINER, T. S.; SAMIE, A.; GUERRANT, R. L. Infectious diarrhea: new pathogens and new challenges in developed and developing areas. **Clin Infect Dis.**, v .43, n.4, p .408-10, 2006.

STEINER, T. S.; THIELMAN, N. M.; GUERRANT, R. L. Enteric *Escherichia coli* Infections. **Tropical Infectious Diseases - Principles, Pathogens and Practice**, 3rd ed. p.110-120, 2010

STROBEL, M.; TINZ, J.; BIESALSKI, H. K. The importance of beta-carotene as a source of vitamin A with special regard to pregnant and breastfeeding women. **Eur. J. Nutr.**, v. 46, Suppl. 1, I/1 –I/20, 2007

UENO, P. M.; ORIA, R. B. ; GUEDES, M. M. ; de AZEVEDO, O. B. ; WU, D. ; WILSON, T. ; HOGAN, S. ; LIMA, A. ; GUERRANT, R. L. ; POLK, D. B. ; DENSON, L. A. ; MOORE, S. . Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. **Gastro and Liver Physiol**, v. 4, p. G612, 2011.

ULUKAYA, E.; ACILAN, C.; YILMAZ, Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology? **Cell Biochem Funct.**, n. 29, p.468-80, 2011.

VANDENABEELE, P.; GALLUZZI, L.; BERGHE, T. V.; KROEMER, G. molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature**, v.11, 2010.

VICTORA, C. G., Mortalidade por diarreia: o que o mundo pode aprender com o Brasil? **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 1, 2009.

VIVEKANANTHAN, D. P.; PENN, M. S.; SAPP, S. K.; HSU, A.; TOPOL, E. J. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. **Lancet**, v. 361, n.9374, p.2017-23, jun. 2003.

WALSH, M. F.; AMPASALA, D. R.; RISHI, A. K.; BASSON; M. D. TGF- $\beta$ 1 modulates focal adhesion kinase expression in rat intestinal epithelial IEC-6 cells via stimulatory and inhibitory Smad binding elements. **Biochim Biophys Acta**, v.1789, n.2, p.88–98, Fev. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2005**: make every mother and child count. Geneva: WHO, 2005. p. 243

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Outbreaks of E. coli O104:H4 infection**: update 30. Europe, 2011. Disponível em: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/emergencies/international-health-regulations/news/news/2011/07/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection-update-30>. Acesso em: 2 dez. 2012.

ZANOTTO-FILHO, A. Efeitos diferenciais do retinol e do ácido retinóico na proliferação, morte e diferenciação celular: o papel da mitocôndria e da xantina oxidase nos efeitos pró-oxidantes da vitamina A. 2009. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ZHANG, W.; LIU, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, v.12, n.1, p.9-18, 2002.

ZIEGLER, T. R.; EVANS, M. E.; FERNÁNDEZ-ESTÍVARIZ, C.; JONES, D. P. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. **Annu. Rev. Nutr.**, v.23, p. 229-261, 2003.

## APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabela da média e erro padrão dos grupos avaliados na proliferação celular

Hiperônimo de grupo	Grupos	Proliferação		
		12h	24h	48h
Controles	GLN (-)	1,47±0,06	0,99±0,11	1,87±0,03
	GLN (+)	1,69±0,04	2,13±0,10	2,52±0,05
	DMSO	1,43±0,07	1,07±0,09	1,85±0,06
Cepas Bacterianas	HS	1,17±0,07	0,79±0,07	1,07±0,10
	EAEC 042	0,80±0,02	0,51±0,06	0,95±0,09
	EAEC selvagem	0,95±0,03	0,63±0,07	1,11±0,06
Micronutrientes	AG 1mM	1,57±0,07	2,05±0,06	2,65±0,02
	β-caroteno 8μM	1,51±0,05	1,17±0,11	1,79±0,06
Tratados com AG	EAEC 042 + AG	1,07±0,07	1,96±0,13	2,20±0,10
	EAEC selvagem + AG	1,26±0,07	2,01±0,13	2,31±0,07
Tratados com β-caroteno	EAEC 042 +β-caroteno	0,98±0,06	1,04±0,14	1,15±0,08
	EAEC selvagem +β-caroteno	1,12±0,04	1,22±0,12	1,27±0,04

Fonte: dados do estudo

APÊNDICE B – Tabela da média e erro padrão dos grupos avaliados na morte celular

Hiperônimo dos grupos	Grupos	Apoptose			Necrose		
		12h	24h	48h	12h	24h	48h
Controles	GLN (-)	1,53±0,42	1,84±0,31	3,31±0,55	2,56±0,16	2,05±0,59	3,68±0,39
	GLN (+)	1,99±0,52	1,11±0,22	3,27±0,38	2,43±0,60	1,82±0,35	3,55±0,98
	DMSO	1,49±0,19	1,47±0,32	1,85±0,56	2,61±0,31	3,85±0,23	2,44±0,53
Cepas Bacterianas	HS	1,41±0,26	3,99±0,32	3,07±1,14	2,88±0,58	3,15±0,52	4,61±0,24
	EAEC 042	2,88±0,34	4,96±0,13	6,72±0,39	5,62±0,67	7,00±0,33	9,50±0,83
	EAEC selvagem	3,68±0,86	5,88±0,47	6,82±0,26	2,85±0,20	5,17±0,73	5,19±0,39
Micronutrientes	AG 1mM	0,93±0,17	1,28±0,37	1,72±0,40	2,86±0,067	1,74±0,40	3,37±0,44
	β-caroteno 8μM	0,99±0,09	1,62±0,18	1,85±0,56	3,76±0,25	2,62±0,53	4,62±0,13
Tratados com AG	EAEC 042 + AG	1,31±0,22	1,67±0,064	2,05±0,25	2,91±0,49	2,46±0,56	3,72±0,05
	EAEC selvagem + AG	1,85±0,59	1,44±0,30	2,57±0,34	2,72±0,22	2,19±0,45	4,34±0,58
Tratados com β-caroteno	EAEC 042 +β-caroteno	2,29±0,26	3,28±0,86	5,31±0,64	4,41±0,10	4,36±0,74	7,98±0,48
	EAEC selvagem+β-caroteno	2,69±0,53	2,85±0,80	8,91±0,60	4,21±0,18	3,57±0,30	7,81±0,33

Fonte: dados do estudo

APÊNDICE C – Tabela da média e erro padrão dos grupos avaliados na transcrição de genes associados com a proliferação celular

Hiperônimo dos grupos	Grupos	c-jun			c-fos		
		0h	6h	12h	0h	6h	12h
Controles	DMEM (0h)/GLN (-)	1,02±0,15	1,02±0,13	1,03±0,16	1,02±0,15	1,03±0,16	1,01±0,09
	GLN (+)	-----	2,74±0,69	0,86±0,09	-----	2,05±0,29	1,39±0,44
	DMSO	-----	2,24±0,78	0,80±0,08	-----	1,23±0,11	0,70±0,26
Cepas Bacterianas	HS	0,96±0,033	1,06±0,16	0,23±0,02	1,22±0,17	0,58±0,06	0,21±0,01
	EAEC 042	0,37±0,034	0,66±0,09	0,26±0,06	0,36±0,14	0,50±0,08	0,20±0,08
	EAEC selvagem	0,44±0,048	0,29±0,02	0,53±0,04	0,51±0,12	0,36±0,06	0,19±0,03
Micronutrientes	AG 1mM	-----	0,93±0,13	1,09±0,44	-----	1,50±0,05	0,84±0,38
	β-caroteno 8μM	-----	1,18±0,16	0,77±0,10	-----	1,14±0,06	0,49±0,12
Tratados com AG	EAEC 042 + AG	-----	0,22±0,02	0,37±0,05	-----	0,43±0,01	0,15±0,03
	EAEC selvagem + AG	-----	0,30±0,02	0,35±0,04	-----	0,34±0,02	0,15±0,03
Tratados com β-caroteno	EAEC 042 +β-caroteno	-----	0,52±0,06	0,33±0,06	-----	0,63±0,01	0,23±0,07
	EAEC selvagem + β-caroteno	-----	0,54±0,10	0,57±0,03	-----	0,63±0,06	0,29±0,07

Fonte: dados do estudo

APÊNDICE D – Tabela da média e erro padrão dos grupos avaliados na transcrição de genes associados com a resposta inflamatória e imune

Hiperônimo dos grupos	Grupos	TGF- $\beta$			NF- $\kappa$ B		
		0h	6h	12h	0h	6h	12h
Controles	DMEM (0h)/GLN (-)	1,02 $\pm$ 0,14	1,05 $\pm$ 0,23	1,05 $\pm$ 0,21	1,01 $\pm$ 0,09	1,05 $\pm$ 0,22	1,210 $\pm$ 0,4172
	GLN (+)	-----	0,93 $\pm$ 0,06	1,64 $\pm$ 0,08	-----	1,32 $\pm$ 0,17	3,012 $\pm$ 0,2785
	DMSO	-----	1,37 $\pm$ 0,17	1,66 $\pm$ 0,22	-----	1,09 $\pm$ 0,25	3,019 $\pm$ 0,7950
Cepas Bacterianas	HS	0,94 $\pm$ 0,17	0,83 $\pm$ 0,07	1,62 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,24	1,45 $\pm$ 0,06	3,758 $\pm$ 0,3906
	EAEC 042	1,47 $\pm$ 0,16	2,14 $\pm$ 0,09	1,93 $\pm$ 0,16	2,50 $\pm$ 0,18	1,89 $\pm$ 0,24	4,417 $\pm$ 1,013
	EAEC selvagem	1,27 $\pm$ 0,31	1,86 $\pm$ 0,04	1,21 $\pm$ 0,04	1,76 $\pm$ 0,12	1,83 $\pm$ 0,51	4,204 $\pm$ 0,4182
Micronutrientes	AG 1mM	-----	1,34 $\pm$ 0,15	1,32 $\pm$ 0,37	-----	1,26 $\pm$ 0,06	2,828 $\pm$ 0,3632
	$\beta$ -caroteno 8 $\mu$ M	-----	0,83 $\pm$ 0,07	1,89 $\pm$ 0,15	-----	1,28 $\pm$ 0,16	3,670 $\pm$ 0,3668
Tratados com AG	EAEC 042 + AG	-----	2,16 $\pm$ 0,24	1,26 $\pm$ 0,19	-----	1,46 $\pm$ 0,09	3,132 $\pm$ 0,3277
	EAEC selvagem + AG	-----	0,79 $\pm$ 0,16	0,83 $\pm$ 0,06	-----	1,69 $\pm$ 0,03	2,616 $\pm$ 1,216
Tratados com $\beta$ -caroteno	EAEC 042 + $\beta$ -caroteno	-----	1,95 $\pm$ 0,25	1,34 $\pm$ 0,17	-----	1,96 $\pm$ 0,21	3,821 $\pm$ 0,2628
	EAEC selvagem + $\beta$ -caroteno	-----	2,99 $\pm$ 0,95	1,02 $\pm$ 0,12	-----	2,25 $\pm$ 0,16	4,228 $\pm$ 0,07689

Fonte: dados do estudo

APÊNDICE E – Tabela da média e erro padrão dos grupos avaliados na transcrição de genes associados com a resposta inflamatória

Hiperônimo dos grupos	Grupos	IL-8		
		0h	6h	12h
Controles	DMEM (0h)/GLN (-)	1,02±0,16	1,412±0,5837	1,03±0,18
	GLN (+)	-----	0,9384±0,3882	0,63±0,10
	DMSO	-----	1,010±0,4060	0,86±0,15
Cepas Bacterianas	HS	462,7±98,11	145,0±25,25	23,55±1,44
	EAEC 042	442,5±55,79	231,6±58,51	30,14±4,85
	EAEC selvagem	462,4±36,22	180,1±21,57	29,70±5,23
Micronutrientes	AG 1mM	-----	2,960±0,1016	0,82±0,30
	β-caroteno 8μM	-----	5,844±1,034	0,85±0,08
Tratados com AG	EAEC 042 + AG	-----	147,9±29,39	28,42±4,61
	EAEC selvagem + AG	-----	151,8±32,88	30,54±0,74
Tratados com β-caroteno	EAEC 042 +β-caroteno	-----	73,83±4,810	37,81±6,80
	EAEC selvagem +β-caroteno	-----	147,7±13,58	28,97±4,46

Fonte: dados do estudo



APÊNDICE F – Tabela da média e erro padrão dos grupos avaliados na transcrição de genes associados com a morte celular

Hiperônimo dos grupos	Grupos	caspase 8			caspase 9		
		0h	6h	12h	0h	6h	12h
Controles	DMEM (0h)/GLN (-)	1,00±0,09	1,12±0,34	0,34±0,12	1,13±0,36	1,01±0,12	1,08±0,27
	GLN (+)	-----	0,8408±0,17	2,63±0,57	-----	0,52±0,03	1,70±0,11
	DMSO	-----	1,10±0,05	1,83±0,94	-----	1,54±0,13	1,18±0,19
Cepas Bacterianas	HS	0,72±0,14	1,50±1,50	4,15±0,19	1,12±0,27	1,44±0,09	1,30±0,06
	EAEC 042	0,92±0,14	0,85±0,11	5,09±1,03	0,64±0,11	1,91±0,31	1,84±0,41
	EAEC selvagem	0,58±0,33	1,63±0,34	6,00±0,78	0,54±0,027	1,59±0,27	1,74±0,20
Micronutrientes	AG 1mM	-----	0,88±0,27	0,58±0,17	-----	0,96±0,07	1,45±0,23
	β-caroteno 8μM	-----	0,79±0,18	3,16±0,11	-----	1,09±0,18	1,41±0,14
Tratados com AG	EAEC 042 + AG	-----	1,15±0,04	4,78±0,30	-----	1,28±0,090	1,37±0,21
	EAEC selvagem + AG	-----	0,68±0,26	3,99±0,32	-----	0,61±0,11	1,37±0,18
Tratados com AG	EAEC 042 +β-caroteno	-----	1,52±0,58	5,01±0,11	-----	0,81±0,05	1,53±0,20
	EAEC selvagem +β-caroteno	-----	2,72±0,21	4,60±0,19	-----	2,72±0,17	1,87±0,27

Fonte: dados do estudo

APÊNDICE G – Tabela da média e erro padrão dos grupos avaliados na transcrição de genes associados com a morte celular

Hiperônimo dos grupos	Grupos	caspase 3		
		0h	6h	12h
Controles	DMEM (0h)/GLN (-)	1,00±0,012	1,02±0,13	1,01±0,09
	GLN (+)	-----	1,05±0,17	1,22±0,01
	DMSO	-----	0,80±0,02	1,21±0,20
Cepas Bacterianas	HS	0,66±0,09	1,28±0,10	1,17±0,04
	EAEC 042	1,11±0,02	1,42±0,17	1,18±0,17
	EAEC selvagem	0,98±0,10	1,17±0,33	1,43±0,37
Micronutrientes	AG 1mM	-----	1,01±0,10	1,10±0,15
	β-caroteno 8μM	-----	0,79±0,06	1,21±0,10
Tratados com AG	EAEC 042 + AG	-----	1,22±0,07	1,60±0,12
	EAEC selvagem + AG	-----	0,67±0,04	1,61±0,13
Tratados com AG	EAEC 042 +β-caroteno	-----	0,95±0,41	1,72±0,14
	EAEC selvagem +β-caroteno	-----	2,06±0,19	1,7±0,11

Fonte : Dados do estudo