



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

EUNICE BOBÔ DE CARVALHO

**EFEITO DA MODULAÇÃO DA GLUTAMINA, ALANIL-GLUTAMINA, β -
CAROTENO, ZINCO E DO LEITE DE CABRA TRANSGÊNICO CONTENDO
LISOZIMA HUMANA, EM CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS SOB AÇÃO DA
Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA**

FORTALEZA

2011

EUNICE BOBÔ DE CARVALHO

**EFEITO DA MODULAÇÃO DA GLUTAMINA, ALANIL-GLUTAMINA, β -
CAROTENO, ZINCO E DO LEITE DE CABRA TRANSGÊNICO CONTENDO
LISOZIMA HUMANA, EM CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS SOB AÇÃO DA
Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

**Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira
Lima**

FORTALEZA

2011

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

-
- C322e Carvalho, Eunice Bobô de
Efeito da modulação da glutamina, alanil-glutamina, β -caroteno, zinco e do leite de cabra transgênico contendo lisozima humana, em células epiteliais intestinais sob ação da *Escherichia coli* enteroagregativa/ Eunice Bobô de Carvalho. – 2011.
165 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2011.
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

1. *Escherichia coli* 2, Micronutrientes 3. Muramidase I. Título.

CDD 616.926

EUNICE BOBÔ DE CARVALHO

**EFEITO DA MODULAÇÃO DA GLUTAMINA, ALANIL-GLUTAMINA, β -
CAROTENO, ZINCO E DO LEITE DE CABRA TRANSGÊNICO CONTENDO
LISOZIMA HUMANA, EM CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS SOB AÇÃO DA
Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Defesa de Tese em: 29/07/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (UFC)

Profa. Dra. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz (UFMG)

Prof. Dra. Luciana Relly Bertolini (UNIFOR)

Prof. Dr. Alexandre Havt Binda (UFC)

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (UFC)

A Deus

A meu pai (*in memoriam*), eterno exemplo de vida;

A meu marido Pascal pelo seu companheirismo constante e a nossa filha Marie,
nosso grande amor;

A minha mãe, irmãos, sobrinhos, cunhados pelo carinho, afeto e apoio contínuos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, meu orientador, pelo apoio, compreensão, ensinamentos ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá, pelo seu empenho, colaboração e disposição bastante relevantes para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá pelo seu apoio e contribuições imprescindíveis no decorrer desses anos.

Ao Dr. Hemerson Yuri Ferreira Magalhães, pela sua amizade, ajuda e pelos momentos compartilhados nestes anos.

Ao doutorando Felipe Augusto Rocha Rodrigues, do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, pelo seu grande apoio e ajuda nas análises feitas em citometria de fluxo.

À Dra. Ila Fernanda Nunes Lima, pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, pela sua contribuição.

À Josiane da Silva Quetz, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, pelo companheirismo, ajuda e tranquilidade transmitidas.

Ao Manoel Bonfim Braga Neto, médico, pela sua ajuda na elaboração de protocolos e apoio dado durante a evolução da tese.

Ao Antônio Marcos Martins da Silva, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFC, pela sua amizade, palavras de conforto e apoio ao longo desta caminhada acadêmica e profissional há mais de 20 anos.

À Herene Barros Lucena Miranda, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFC, pela amizade e ajuda.

Ao Antônio Vinícius Alves da Silva, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, pelo seu companheirismo e ajuda imprescindíveis para este estudo.

Ao Jones Barbosa Lima-Neto, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, pela sua contribuição na determinação do protocolo da adesão bacteriana em cultura de células e por seu apoio neste estudo.

À Francisca Alves de Oliveira, funcionária do Laboratório de Controle de Qualidade do Centro de Hematologia e Hemoterapia (HEMOCE) pelo companheirismo e compreensão nestes anos.

Ao Orleânco Gomes Ripardo, doutorando do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, pela alegria que tive de vê-lo evoluir de estagiário do curso de graduação a aluno de doutorado, bem como pelo seu apoio e amizade.

A Mara de Moura G. Prata, Pedro Henrique Quintela S. de Medeiros e Paloma Araújo Cavalcante, bolsistas do Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), pelo brilho juvenil doado ao nosso ambiente de pesquisa e contribuições para realização deste estudo.

Aos demais pós-graduandos, alunos de iniciação científica, bem como voluntários do LDI, da Unidade de Pesquisas Clínicas/ Instituto de Biomedicina (UPC/IBIMED), da UFC, pelo apoio direto ou indireto na realização deste trabalho.

Ao José Amadeus de Souza, pela sua dedicação constante como funcionário da UPC/IBIMED, o que torna viável a realização dos diversos trabalhos realizados.

À Kátia Lima Nogueira, pela sua dedicação e gentileza na administração para o desenvolvimento dos estudos realizados na UPC/IBIMED.

À Maria do Carmo Nunes de Pinho, Verônica Maria de Oliveira, Conceição de Maria Nogueira, Terezinha Freire de França, Luciana França da Silva, Charliene Melo, Charles Melo e Francisco de Sousa Júnior e demais funcionários da UPC/IBIMED, todos maravilhosos.

Ao Dr. Richard L. Guerrant, da Universidade da Virgínia (USA), por sua colaboração internacional e contribuições científicas oferecidas à UPC/IBIMED.

Ao Dr. James P. Nataro, da Universidade de Maryland, por suas sugestões valiosas a esse estudo.

À Dr^a. Elizabeth A. Maga, pesquisadora colaboradora Norte Americana, do Departamento de Ciência Animal da Universidade de Davis, Califórnia, EUA, pela sua colaboração internacional e doação do leite de cabra transgênico para execução deste estudo.

À Prof^a. Dr^a Geane Andrade Cunha, pelo incentivo e apoio durante o doutorado.

Aos colegas, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFC, pela atenção ao longo desses anos.

Às secretarias, Ivone Mary Fontenele de Sousa e Rita de Cássia Almeida Nunes, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFC,

À Dr^a. Luciana Maria de Barros Carlos, diretora do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), pela compreensão e apoio dados nestes anos.

*“Quanto mais amor temos, tanto mais fácil
fazemos a nossa passagem pelo mundo.”*

Immanuel Kant

RESUMO

Efeito da modulação da glutamina, alanil-glutamina, β -caroteno, zinco e do leite de cabra transgênico, contendo lisozima humana, em células epiteliais intestinais sob ação da *Escherichia coli* enteroagregativa. Eunice Bobô de Carvalho. Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Julho de 2011. Orientador: prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

As infecções entéricas causam cerca de 2,5 milhões de mortes ao ano. A EAEC está associada à causa de doenças diarréicas persistentes. Este estudo analisou *in vitro* (IEC-6, Caco-2 e HEp-2), o papel dos micronutrientes glutamina, alanil-glutamina, β -caroteno, zinco, e dos leites de cabra transgênico com lisozima humana e controle nos ensaios de proliferação, migração, viabilidade, apoptose, necrose celular, adesão bacteriana em resposta à infecção causada pela cepa de EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. A cepa bacteriana de EAEC-042 mostrou redução significativa na migração ($p < 0,001$) e na viabilidade celular ($p < 0,001$) e esta aumentou a apoptose ($p < 0,001$) e necrose ($p < 0,001$) em resposta a lesão ao epitélio intestinal. Foi observado que os micronutrientes na presença da bactéria reduziram significativamente a apoptose e necrose ocasionados por esta, bem como reduziram significativamente a adesão bacteriana, além de aumentar a migração celular. Os leites controle e transgênico apresentaram redução significativa da adesão bacteriana ($p < 0,001$), independente da presença da camada de gordura, além de reduzirem significativamente a apoptose ($p < 0,001$) e a necrose ($p < 0,001$) ocasionadas pela EAEC-042. A análise qualitativa de aderência celular, considerada padrão ouro, mostrou redução na aderência bacteriana quando associados aos micronutrientes, comparados ao controle com EAEC-042. Nota-se a quase ausência de aderência em ambos os leites. Este estudo mostra a importância dos micronutrientes e leite de cabra transgênico ou não, sobre a proteção epitelial intestinal nas agressões bacterianas.

Palavras-chave: EAEC-042. Micronutrientes. Leite de Cabra Transgênico. Lisozima.

ABSTRACT

Effect of modulation of glutamine, alanyl- glutamine, beta-carotene, zinc, and the milk of transgenic goats containing human lysozyme in intestinal epithelial cells in reponse to infection caused by Enteroaggregative Escherichia coli. Eunice Bobô de Carvalho. Thesis submitted to the Pos-Graduation Program of Medical Sciences from School of Medicine from Federal University of Ceará. Julho/2011. Professor: PhD Aldo Ângelo Moreira Lima.

The enteric infections cause 2.5 million deaths each year. The Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) is associated with persistent cause of diarrheal diseases. This study examined in vitro (IEC-6, Caco-2 and HEP-2 cells) the role of the micronutrients glutamine (Glu), alanyl-glutamine (Ala-Glu), beta-carotene (β -Carot), zinc (Zn), and the milk of transgenic goats containing human lysozyme (M-Lyso) and their respective controls (Ctrl) in the following assays: proliferation, migration, viability, apoptosis, cell necrosis, and bacterial adhesion in response to infection caused by the EAEC-042 bacterial strain at a concentration of 2.5×10^5 CFU/mL. The effect of infection by EAEC-042 bacterial strain was evidenced by significant reduction in migration ($p < 0.001$) and cellular viability ($p < 0.001$); also increased apoptosis ($p < 0.001$) and necrosis ($p < 0.001$) in response to damage to the intestinal epithelium. It was observed that the micronutrients in the presence of bacteria significantly reduced apoptosis and necrosis caused by EAEC-042, as well as significantly reduced bacterial adhesion and increases cell migration. The control and transgenic milk abolished bacterial adhesion ($p < 0.001$), independent of milk fat, and significantly reduce apoptosis ($p < 0.001$) and necrosis ($p < 0.001$) caused by EAEC-042. The qualitative analysis of EAEC adherence, considered as gold standard method, showed a reduction in bacterial adherence associated with intervention with micronutrients when compared with the EAEC-042 infection control. In conclusion, our study demonstrates the importance of intervention with micronutrients and milk (transgenic or not) in protecting the intestinal epithelial challenged by bacterial aggression.

Keywords: EAEC-042. Micronutrients. Transgenic Goat Milk. Lysozyme.

LISTA DE FIGURAS

1	Casos de doença diarréica aguda, por região, segundo a MDDA, em 2004 – Brasil.	26
2	<i>Escherichia coli</i> ao ME, ampliada em 10.000x.	30
3	Contribuição dos elementos genéticos para a evolução da patogenicidade da <i>E. coli</i> .	32
4	Glutamina	44
5	Alanil-glutamina	46
6	β -caroteno	47
7	Lisozima	52
8	Processo de preparação da cepa bacteriana EAEC-042 para utilização em experimentos.	62
9	A. Frasco contendo Meio Essencial Mínimo Modificado Dulbecco – DMEM; B. Frasco de cultura para manutenção de células; C. Células IEC-6 (Nº ATCC CRL 1592TM).	63
10	Células Caco-2 (Nº ATCC HTB-37)	64
11	Células HEp-2 (Nº ATCC CCL-23)	65
12	Processo de remoção da camada gordurosa do leite.	67
13	Processo de proliferação celular.	69
14	Processo de migração celular.	71
15	Análise de viabilidade, apoptose e necrose celular através por citometria de fluxo.	73
16	Processo de adesão celular.	75
17	Processo para realização do padrão de aderência bacteriana.	77
18	Proliferação celular depois de 24 horas de incubação com glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM.	79
19	Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com Glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM em meio DMEM sem glutamina.	80
20	Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) e adição de Glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM em meio DMEM sem glutamina.	81
21	Concentração de EAEC-042 na contagem de colônias em placas de MacConkey utilizado na adesão bacteriana.	82
22	Curva tempo resposta EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$	83

UFC/mL.

- 23** Adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) na adição de glutamina nas concentrações 0,3; 1; 3; 10 e 30 mM. **84**
- 24** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células viáveis na adição de glutamina nas concentrações 3; 10 e 30 mM. **85**
- 25** Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem de células em apoptose nas concentrações de glutamina de 3; 10 e 30 mM. **86**
- 26** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em necrose depois de acrescentar glutamina nas concentrações de 3; 10 e 30 mM. **87**
- 27** Proliferação celular depois de 24 horas de incubação com alanil-glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM. **88**
- 28** Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com alanil-glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM em meio DMEM livre de glutamina. **89**
- 29** Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada a alanil-glutamina nas concentrações 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM em meio DMEM livre de glutamina. **90**
- 30** Adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a cepa bacteriana EAEC- 042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada a alanil-glutamina nas concentrações de 0,3; 1; 3; 10 e 30 mM. **91**
- 31** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células viáveis quando da associação da alanil-glutamina nas concentrações 3; 10 e 30 mM. **92**
- 32** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em apoptose celular quando da associação da alanil-glutamina nas concentrações 3; 10 e 30 mM. **93**
- 33** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em necrose celular quando da associação da alanil-glutamina nas concentrações 3; 10 e 30 mM. **94**
- 34** Proliferação celular depois de 24 horas de incubação com β -caroteno nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 μ M. **95**
- 35** Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com o micronutriente β -caroteno, nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 μ M em meio DMEM (DMSO a 0,5%) livre de glutamina. **96**

- 36** Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada ao micronutriente β -caroteno, dissolvido em DMSO a 0,5%, nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 μ M em meio DMEM livre de glutamina. **97**
- 37** Adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada β -caroteno nas concentrações de 0,3; 1; 3; 10 e 30 μ M. **98**
- 38** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células viáveis na adição de β -caroteno nas concentrações 3; 10 e 30 μ M. **99**
- 39** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em apoptose com o β -caroteno nas concentrações 3; 10 e 30 μ M. **100**
- 40** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em necrose com o β -caroteno nas concentrações 3; 10 e 30 μ M. **101**
- 41** Proliferação celular depois de 24 horas de incubação com acetato de zinco nas concentrações de 3, 10, 30, 100, 150 e 300 μ M. **102**
- 42** Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com acetato de zinco nas concentrações de 3; 10; 30; 100; 150 e 300 μ M em meio DMEM livre de glutamina a 0,1% de soro fetal bovino. **103**
- 43** Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada ao acetato de zinco nas concentrações de 3; 10; 30; 100; 150 e 300 μ M em meio DMEM livre de glutamina a 0,1% de soro fetal bovino. **104**
- 44** Adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a bactéria EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada acetato de zinco nas concentrações de 3, 10, 30, 100e 300 μ M. **105**
- 45** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células viáveis com o acetato de zinco nas concentrações 30; 100 e 150 μ M. **106**
- 46** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em apoptose celular com o acetato de zinco nas concentrações 30; 100 e 150 μ M. **107**
- 47** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em necrose celular com o acetato de zinco nas concentrações 30; 100 e 150 μ M. **108**

- 48** Proliferação celular depois 24 horas de incubação com o leite de cabra (controle e transgênico) com a remoção da camada gordurosa nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40. **109**
- 49** Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com o leite de cabra controle e transgênico, com remoção da camada gordurosa nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40 em meio DMEM livre de glutamina. **110**
- 50** Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada ao leite de cabra controle e transgênico com remoção da camada gordurosa nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40 em meio DMEM sem glutamina. **111**
- 51** Adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a cepa bacteriana EAEC 042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada ao leite de cabra, controle e transgênico, após remoção da camada gordurosa, nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40. **112**
- 52** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células viáveis em meio contendo leite de cabra controle e transgênico, com remoção da camada gordurosa nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40. **114**
- 53** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em apoptose celular em meio DMEM livre de glutamina, contendo leite de cabra controle e transgênico, com remoção da camada gordurosa nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40. **116**
- 54** Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em necrose celular em meio DMEM livre de glutamina, contendo leite de cabra controle e transgênico, com remoção da camada gordurosa nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40. **118**
- 55** Proliferação celular depois de 24 horas de incubação com o leite de cabra (controle e transgênico) com a camada gordurosa nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40. **119**
- 56** Migração celular em IEC-6 depois de após 24 horas de incubação com o leite de cabra controle e transgênico, com a camada gordurosa nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40 em meio DMEM livre de glutamina. **120**
- 57** Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada ao leite de cabra controle e transgênico, com a camada gordurosa, nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40 em meio DMEM sem glutamina. **121**
- 58** Adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a cepa bacteriana EAEC 042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada **122**

ao leite de cabra, controle e transgênico, com a camada gordurosa, nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40.

- | | | |
|-----------|---|------------|
| 59 | Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células viáveis em meio contendo leite de cabra controle e transgênico, com a camada gordurosa nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40. | 124 |
| 60 | Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em apoptose celular em meio contendo leite de cabra controle e transgênico, com a camada gordurosa, nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40. | 126 |
| 61 | Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em necrose celular em meio contendo leite de cabra controle e transgênico, com a camada gordurosa, nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40. | 128 |
| 62 | Padrão ouro de aderência da cepa bacteriana EAEC-042. | 129 |
| 63 | Padrão ouro de aderência bacteriana com células HEP-2. | 130 |
| 64 | Padrão ouro de aderência bacteriana com células HEP-2. | 132 |
| 65 | Padrão ouro de aderência bacteriana com células HEP-2. | 133 |
| 66 | Padrão ouro de aderência bacteriana com células HEP-2 | 135 |
| 67 | Padrão ouro de aderência bacteriana com células HEP-2 | 136 |

LISTA DE QUADROS

1	Agentes bacterianos associados à doença diarréica.	28
2	Agentes parasitários associados à doença diarréica.	28
3	Agentes virais associados à doença diarréica.	29
4	Composição (%) do leite de diferentes espécies de mamíferos.	53
5	Composição nutricional do leite de vaca e de cabra em 100mL.	55
6	Resumo dos Resultados Obtidos entre os Leites Controle e Transgênico.	137

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
mm	Milímetros
g	Gramas
°C	Graus Celsius
h	Horas
kb	Quilobase
kDa	Quilodaltons
mM	Milimolares
μM	Micromolares
μg	Microgramas
μL	Microlitros
mg	Miligramas
mL	Mililitros
nm	Nanômetros
pb	Pares de base
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia/ mL

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aderência agregativa
AAF	Fimbria de aderência agregativa (aggregative adherence fimbriae)
AAF/I	Fimbria de aderência agregativa I (aggregative adherence fimbriae I)
AAF/II	Fimbria de aderência agregativa II (aggregative adherence fimbriae II)
AAF/III	Fimbria de aderência agregativa III (aggregative adherence fimbriae III)
AAF/IV	Fimbria de aderência agregativa IV (aggregative adherence fimbriae IV)
Aap	Proteína anti-agregação de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC anti-aggregation protein)
aggR	Regulador de aderência agregativa de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC aggregative adherence regulator)
AJs	Junções aderentes (adherens junctions)
aspU	Proteína secretada U de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC secreted protein U)
ATP	Adenosina trifosfato
Caco-2	Linhagem celular derivada de carcinoma de cólon humano
CK	Creatina Kinase
DA	Aderência difusa verdadeira
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DALY	Anos de vida saudável perdidos por morte prematura ou incapacidade (disability associated life years)
DNA	Ácido desoxirribonucléico (deoxyribonucleic acid)
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST-1	Enterotoxina termoestável 1 de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC <i>heat-stable enterotoxin</i> 1)
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva

ELISA	Imunoensaio enzimático (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
Gap	Junções de comunicação (<i>gap junctions</i>)
Gln -	Meio livre de glutamina
Gln +	Meio com glutamina
HBSS	Solução tampão hipotônico (<i>Hank's Balanced Salt Solution – HBSS</i>)
HeLa	Linhagem celular derivada de carcinoma cervical humano
HEp-2	Linhagem celular derivada de carcinoma laríngeo humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICAM	Molécula de adesão intercelular 1
IEC-6	Linhagem celular epitelial derivada de células epiteliais intestinais derivadas de criptas do jejuno de ratos normais
IL	Interleucina
JAM	Molécula de adesão juncional (<i>junctional adhesion molecule</i>)
LA	Padrão de aderência localizado
MDDA	Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas
OD	Densidade óptica
pAA	Plasmídeo que confere o fenótipo AA à <i>escherichia coli</i> enteroagregativa
PBS	Tampão salina fosfato (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia de polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PepT1	Proteína transportadora dependente de íons hidrogênio (<i>H(+)-dependent transporter – PepT1</i>)
Pet	Toxina codificada por plasmídeo (<i>plasmid-encoded toxin</i>)
Pic	Proteína envolvida na colonização intestinal (<i>protein involved in intestinal colonization</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RPM	Rotações por minuto
Sat	Toxina autotransportadora secretada (<i>secreted autotransporter toxin</i>)
SNP	Polimorfismo em um único nucleotídeo (<i>single nucleotide</i>)

polymorphism)

STa	Toxina termoestável de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
T84	Linhagem celular epitelial derivada de adenocarcinoma de cólon humano
TGI	Trato gastrointestinal
TJs	Junções firmes (<i>tight junctions</i>)
TLR5	Receptor Toll-like 5 (<i>Toll-like receptor 5</i>)
ZO	Zonulinas

LISTA DE REAGENTES

1. Meio Essencial Dulbecco Modificado (DMEM) com glutamina;
2. Meio Essencial Dulbecco Modificado (DMEM) sem glutamina;
3. Meio essencial mínimo (MEM);
4. Piruvato de sódio 100mM;
5. Insulina bovina pancreática;
6. Solução de aminoácidos não-essenciais;
7. Solução de penicilina/Estreptomicina;
8. Soro fetal bovino;
9. Tripsina/ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA);
10. Solução tampão de fosfato salina (PBS);
11. Triton X-100;
12. Reagente para proliferação celular (WST);
13. Reagente Mitomicina C;
14. Ácido Dimetilsulfóxido;
15. L-Glutamina;
16. Alanil-Glutamina;
17. Acetato de Zinco;
18. β -Caroteno;
19. Reagentes para detecção de apoptose e necrose, anexina V e iodeto de propídio, através da citometria de fluxo;
20. Reagente laranja de acridina;
21. Solução de May-Grunwald adicionado de metanol;
22. Água tamponada;
23. Solução de Giemsa;
24. Meio de cultura bacteriana MacConkey;
25. Meio de cultura bacteriana Ágar-sangue;
26. Álcool a 70%;
27. Tampão hipotônico HBSS.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Doenças diarréicas – morbidade e mortalidade	25
1.2	Caracterização da diarréia	27
1.3	Etiologia das doenças diarréicas	27
1.4	<i>Escherichia coli</i>	30
1.4.1	<i>Escherichia coli</i> ENTEROAGREGATIVA (EAEC)	33
1.5	Epitélio Intestinal	41
1.6	A Importância dos nutrientes nas doenças diarréicas	43
1.6.1	Glutamina	44
1.6.2	Alanil-glutamina	46
1.6.3	β -caroteno	47
1.6.4	Zinco	49
1.6.5	Leite caprino contendo lisozima humana.	51
2	JUSTIFICATIVA	57
3	OBJETIVOS	59
3.1	Objetivo Geral	59
3.2	Objetivos Específicos	59
4	MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1	Cepa Bacteriana – <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC-042)	61
4.2	Cultura de Células	63
4.3	Leite de Cabra Transgênico Contendo Lisozima Humana	66
4.3.1	Remoção da Camada Gordurosa do Leite	66
4.4	Proliferação Celular	68
4.5	Migração Celular	69
4.6	Citometria de Fluxo	72
4.7	Adesão Bacteriana	74
4.8	Padrão de Aderência Bacteriana	76
4.9	Análise Estatística	77
5	RESULTADOS	79

5.1	Análise da Glutamina (0,3; 1; 3; 10; 30 mM)	79
5.1.1	Proliferação Celular	79
5.1.2.1	Migração na Ausência da Cepa Bacteriana EAEC-042	80
5.1.2.2	Migração na Presença da Cepa Bacteriana EAEC-042	81
5.1.3	Adesão Bacteriana	82
5.1.3.1	Preparação do Inóculo de EAEC-042	82
5.1.3.2	Curva tempo-resposta usada no protocolo de adesão bacteriana de EAEC- 042	83
5.1.4	Citometria de Fluxo	85
5.2	Análise da Alanil-Glutamina (0,3; 1; 3; 10; 30 mM)	88
5.2.1	Proliferação Celular	88
5.2.2.1	Migração na Ausência da Cepa Bacteriana EAEC-042	89
5.2.2.2	Migração na Presença da Cepa Bacteriana EAEC-042	90
5.2.3	Adesão Bacteriana	91
5.2.4	Citometria de Fluxo.	92
5.3	Análise do β-caroteno (0,3; 1; 3; 10; 30 μM)	95
5.3.1	Proliferação Celular	95
5.3.2.1	Migração na Ausência da Cepa Bacteriana EAEC-042	96
5.3.2.2	Migração na Presença da Cepa Bacteriana EAEC-042	97
5.3.3	Adesão Bacteriana	98
5.3.4	Citometria de Fluxo	99
5.4	Análise do Acetato de Zinco (3; 10; 30; 100; 150; 300 μM)	102
5.4.1	Proliferação Celular	102
5.4.2.1	Migração na Ausência da Cepa Bacteriana EAEC-042	103
5.4.2.2	Migração na Presença da Cepa Bacteriana EAEC-042	104
5.4.3	Adesão Bacteriana	105
5.4.4	Citometria de Fluxo	106
5.5	Análise do Leite de Cabra Controle e Transgênico Contendo Lisozima Humana – Leite com Remoção da Camada Gordurosa	109
5.5.1	Proliferação Celular	109
5.5.2.1	Migração na Ausência da Cepa Bacteriana EAEC-042	110

5.5.2.2	Migração na Presença da Cepa Bacteriana EAEC-042	111
5.5.3	Adesão Bacteriana	112
5.5.4	Citometria de Fluxo.	113
5.6	Análise do Leite de Cabra Controle e Transgênico Contendo Lisozima Humana – Leite com a Camada Gordurosa	119
5.6.1	Proliferação Celular	119
5.6.2.1	Migração na Ausência da Cepa Bacteriana EAEC-042	120
5.6.2.2	Migração na Presença da Cepa Bacteriana EAEC-042	121
5.6.3	Adesão Bacteriana	122
5.6.4	Citometria de Fluxo	123
5.7	Padrão de Aderência com EAEC-042	129
5.7.1	Padrão de Aderência Bacteriana – Alanil-glutamina, Glutamina, β -Caroteno e Zinco - em células HEp-2.	130
5.7.2	Padrão de Aderência Bacteriana – em células HEp-2 Leite de Cabra Controle com a Remoção da Camada gordurosa.	132
5.7.3	Padrão de Aderência Bacteriana – em células HEp-2 Leite de Cabra Transgênico com a Remoção da Camada Gordurosa.	133
5.7.4	Padrão de Aderência Bacteriana – em células HEp-2 Leite de Cabra Controle Contendo a Camada Gordurosa.	135
5.7.5	Padrão de Aderência Bacteriana – em células HEp-2 Leite de Cabra Transgênico Contendo a Camada Gordurosa.	136
6	DISCUSSÃO	139
7	CONCLUSÃO	151
	REFERÊNCIAS	152

1 INTRODUÇÃO

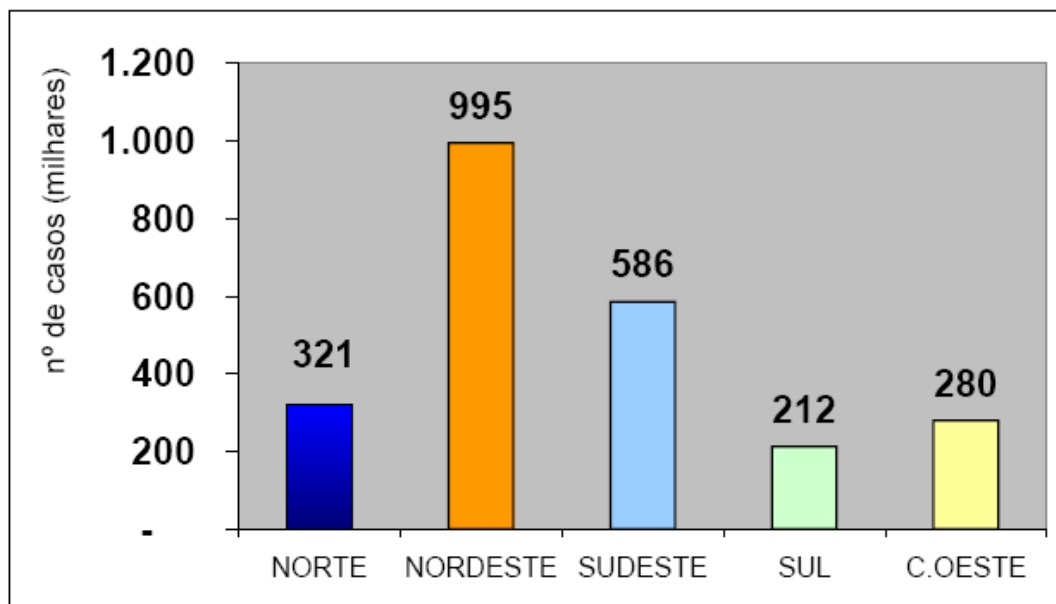
1.1 Doenças diarreicas – morbidade e mortalidade

Os patógenos bacterianos entéricos são capazes de colonizar, danificar o epitélio e/ou liberar uma ou mais enterotoxinas ou citotoxinas que prejudicam a função da barreira intestinal ou mesmo desencadeiam secreção, inflamação ou lesão intestinal através de uma série de fatores de virulência. As infecções entéricas causam mundialmente cerca de 2,5 milhões de mortes por ano (KOSEK *et al.*, 2003), número que chegou a 4,6 milhões em 1982 antes de serem adotadas medidas preventivas como a terapia de reidratação oral (VISWANATHAN *et al.*, 2009). Uma das Metas de Desenvolvimento do Milênio é reduzir em 2/3 a mortalidade de crianças menores de 5 anos entre 1990 e 2015 (UNICEF, 2008). Embora a maioria dos casos de mortalidade de crianças menores de 5 (cinco) anos ocorra na Índia, Nigéria e China, dos 20 países com maiores taxas de mortalidade 19 estão na África.

O Grupo de Pesquisa Epidemiológica de Saúde da Criança (CHERG) criado pela OMS em 2001 usou vários métodos na determinação das causas específicas de mortalidade. Segundo o CHERG estima-se que 18% das mortes em crianças desnutridas menores de 5 (cinco) anos se devam a doenças diarreicas (PETRI *et al.*, 2008). Para esse fim a comunidade internacional – incluindo as Nações Unidas e organizações de países doadores – promove campanhas verticais. A reidratação oral, os suplementos de vitamina A e a vacinação contra o sarampo (devido à conhecida comorbidade entre sarampo e diarreia) são os principais elementos dessas campanhas, que objetivam evitar mortes por diarreia em curto prazo (VICTORA, 2009). A Organização Mundial de Saúde calculou em quase 50 milhões o número de crianças salvas graças ao tratamento com base de soro fisiológico e zinco desde sua adoção há 25 anos. No Brasil, de todos os óbitos infantis registrados no período de 1985 – 1987, a diarreia foi responsável por 17,3%; entretanto, no período de 2003 – 2005 respondeu por 4,2% de todos os óbitos (VICTORA, 2009).

Desde 1994, foi instituída no Brasil a Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas – MDDA, um importante instrumento para o acompanhamento destes agravos na esfera municipal, fortalecendo a capacidade resolutiva do nível primário de saúde, subsidiando o planejamento e avaliação das ações de prevenção e controle. Atualmente, está implantada em 4.379 (78,8%) municípios do País. Os principais objetivos da MDDA são: conhecer a magnitude das diarreias agudas; subsidiar análise dos indicadores de morbidade e mortalidade por estes agravos; identificar os agentes etiológicos envolvidos e detectar os surtos de forma precoce. Em 2004 foram notificados ao Ministério da Saúde pelo sistema de vigilância da MDDA, 2.395.485 casos de diarreia, sendo distribuídos por região de procedência: 321.141 no Norte; 995.055 no Nordeste; 212.328 no Sul; 586.191 no Sudeste e 279.770 na região Centro-Oeste (Figura 1). Nesse mesmo ano, foram investigados 76,3% dos surtos notificados pela MDDA. (Ministério da Saúde, 2005).

Figura 1: Casos de doença diarréica aguda, por região, segundo a Monitorização de Doenças Diarréica Aguda, em 2004 – Brasil.



Fonte: COVEH/CGDT/DEVEP/SVS/MS, 2005.

1.2 Caracterização da diarreia

A diarreia resulta de um desequilíbrio entre absorção e secreção de íons, ou seja, do transporte de fluidos e eletrólitos através do epitélio intestinal, sendo caracterizada pela elevação no volume fecal, quantidade de água para restabelecer a concentração apropriada dos íons e frequência de evacuações (FORDTRAN, 1967; GUERRANT *et al.*, 2001; VISWANATHAN *et al.*, 2009).

De acordo com o Ministério da Saúde (2005) a diarreia é uma síndrome, caracterizada pelo aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou de pouca consistência, com frequência acompanhada de vômito, febre e dor abdominal; em alguns casos há presença de muco e sangue. Tem duração entre dois até 14 dias, sendo assim, autolimitada. Varia das formas leves até as graves. As complicações ocorrem devido à desidratação e ao desequilíbrio hidroeletrólítico, sendo este relacionado, com frequência, à assistência e tratamento instituídos de forma inadequada, podendo, inclusive, causar o óbito, principalmente na presença de desnutrição. Os episódios diarreicos repetidos podem ocasionar desnutrição crônica, com retardo do desenvolvimento estado-ponderal e, até mesmo, da evolução intelectual. Guerrant *et al.* (1999) mostraram um significativo decréscimo tanto na aptidão física como em teste da função cognitiva em crianças na faixa etária de seis a nove anos, acompanhadas nos dois primeiros anos de vida. No Brasil, apesar dos importantes avanços alcançados na prevenção e controle das doenças infecciosas, as doenças diarreicas agudas, ainda continuam como um dos principais problemas de saúde pública e um grande desafio às autoridades sanitárias.

1.3 Etiologia das doenças diarreicas

Há vários microorganismos associados à etiologia das doenças diarreicas. Nos países em desenvolvimento, as bactérias continuam sendo os principais agentes etiológicos, seguidas por vírus e parasitas. As bactérias mais comumente relacionados a doenças diarreicas são *Escherichia coli enterotoxigênica*, *Shigella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Vibrio sp.*, e *Salmonella sp.* (Quadro 1). Dentre as causas parasitárias podemos citar *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba histolytica* e *Cyclospora cayetanensis* (Quadro 2). Rotavírus, norovírus e sapovírus são os principais vírus associados à diarreia (Quadro 3). Outros vírus entéricos são

também importantes nesta etiologia, tais como coronavírus, torovírus e enterovírus (HARRINGTON *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2000; QUETZ, *et al.*, 2010; PARKS *et al.*, 1999; BROOKS *et al.*, 2006; GUERRANT *et al.*, 1983; MORENO *et al.*, 2008). A *Escherichia coli* enteroagregativa – EAEC é um patógeno que inicialmente estava associado à diarreia persistente em crianças de países em desenvolvimento. Porém, encontra-se cada vez mais emergente em seus diversos aspectos clínicos e é considerada como uma das principais causas de diarreia de viajantes (HARRINGTON *et al.*, 2005).

Quadro 1 - Agentes bacterianos associados à doença diarreica

Agentes	Grupo etário dos casos	Modo de transmissão e principais fontes	Reservatórios principais
<i>S. aureus</i>	Todos	Alimentos	Seres humanos e animais
<i>Campylobacter</i>	Todos	Fecal-oral, alimento, água, animais domésticos	Aves, bovinos e ambiente
<i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	Todos	Fecal-oral, alimento, água, pessoa a pessoa	Seres humanos
<i>E. coli</i> enteropatogênica	Crianças	Fecal-oral, alimento, água, pessoa a pessoa	Seres humanos
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	Adultos	Fecal-oral, alimento, água, pessoa a pessoa	Seres humanos
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	Todos	Fecal-oral, alimento, água, pessoa a pessoa	Seres humanos
<i>Salmonella</i> não tifóide	Todos, principalmente crianças	Fecal-oral, alimento, água	Aves, mamíferos domésticos e silvestres, bem como répteis
<i>Shigella spp</i>	Todos, principalmente crianças	Fecal-oral, alimento, água, pessoa a pessoa	Primatas
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Todos	Fecal-oral, alimento, água, pessoa a pessoa, animal doméstico	Suínos
<i>Vibrio cholerae</i>	Todos, principalmente adultos	Fecal-oral, alimento, água	Ambiente

Fonte: Adaptado de MMWR - Vol. 39, rr. 14, 1990

Quadro 2 - Agentes parasitários associados à doença diarreica

Agentes	Grupo etário dos casos	Modo de transmissão e principais fontes	Reservatórios principais
<i>Balantidium coli</i>	Ignorado	Fecal-oral, alimentos, água	Primatas, roedores e suínos
<i>Cryptosporidium</i>	Crianças e adultos com Aids	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa, animais domésticos	Seres humanos, bovinos, outros animais domésticos
<i>Entamoeba histolytica</i>	Todos, principalmente adultos	Fecal-oral, alimento, água	Seres humanos
<i>Giardia lamblia</i>	Todos, principalmente crianças	Fecal-oral, alimento, água	Seres humanos, animais selvagens e domésticos
<i>Isospora belli</i>	Adultos com Aids	Fecal-oral	

Fonte: Adaptado de MMWR - Vol. 39, rr. 14, 1990

Quadro 3 - Agentes virais associados à doença diarréica

Agentes	Grupo etário dos casos	Modo de transmissão e principais fontes	Reservatórios principais
<i>Astrovírus</i>	Crianças pequenas e idosos	Fecal-oral, alimento, água	Provavelmente seres humanos
<i>Calicivírus</i>	Crianças e adultos	Fecal-oral, alimento, água, nosocomial	Provavelmente seres humanos
<i>Adenovírus entérico</i>	Crianças pequenas	Fecal-oral e nosocomial	Provavelmente seres humanos
<i>Norwalk</i>	Crianças maiores e adultos	Fecal-oral, alimento, água, pessoa a pessoa	Seres humanos
Rotavírus grupo A	Crianças pequenas	Fecal-oral, nosocomial alimento, água, pessoa a pessoa	Seres humanos
Rotavírus grupo B	Crianças e adultos	Fecal-oral, água, pessoa a pessoa	Seres humanos
Rotavírus grupo C	Crianças e adultos	Fecal-oral	Seres humanos

Fonte: Adaptado de MMWR - Vol. 39, rr. 14, 1990

A grande maioria dos casos de diarréia ocorridos em países desenvolvidos se deve a agentes virais que apresentam características sazonais. Entretanto, em países em desenvolvimento, os agentes mais frequentemente envolvidos são as bactérias e os parasitas. Devido à precariedade das condições de higiene, as crianças são expostas bem precocemente a uma grande variedade de patógenos entéricos, o que leva a uma série de repetições de episódios diarréicos (PODEWILS *et al.*, 2004; PARASHAR *et al.*, 1998).

No Brasil, as principais causas de diarréias persistentes se devem a *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *Cryptosporidium spp.* e *Giardia lamblia*. Nos casos de diarréia aguda, a *E. coli* enterotoxogênica (EPEC) é a que predomina, em seguida são os rotavírus e torovírus (LIMA *et al.*, 1992; LIMA; GUERRANT, 1992; NEWMAN *et al.*, 1994; 1999).

A *Escherichia coli* patogênica é atualmente um fator bastante relevante em doenças diarréicas em todo o mundo como se observa em diversos relatos científicos (PENNINGTON, 2010; GOLAN *et al.*, 2011; GRANDESSO *et al.* 2010; OTEO *et al.*, 2010; MENG *et al.*, 2010).

1.4 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria bacilar Gram-negativa e juntamente com o *Staphylococcus aureus* é a mais comum e uma das mais antigas bactérias simbiontes do homem. Pertence à família das *Enterobacteriaceae*, são aeróbias e anaeróbias facultativas, habitam o lúmem intestinal de seres humanos e de outros animais de sangue quente. Possui múltiplos flagelos e é um dos únicos seres vivos capaz de produzir todos os componentes que o compõe, a partir de compostos básicos e de fontes de energia suficiente. Foi descoberta pela primeira vez pelo médico austríaco, Theodor Escherich, em 1884 (MURRAY, 2004). Atualmente a *E. coli* é a espécie mais isolada em laboratórios clínicos (KONEMAN *et al.*, 2001) (Figura 2).

Figura 2: *Escherichia coli* ao Microscópio Eletrônico, ampliada em 10.000X.

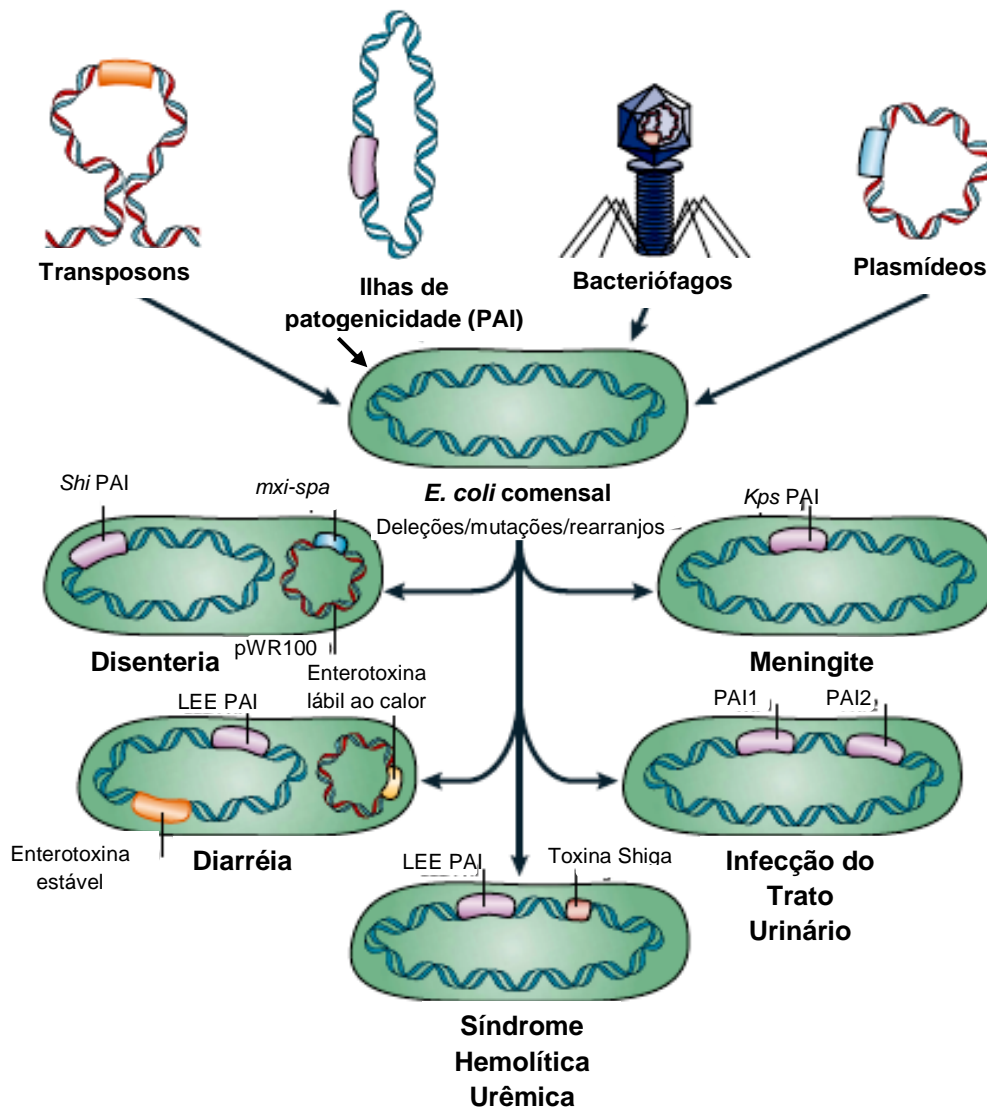


Fonte: [HTTP://pt.wikipedia.org](http://pt.wikipedia.org)

É uma bactéria que coloniza o trato gastrointestinal de crianças poucas horas depois do nascimento. Como uma bactéria comensal raras vezes causa doença em seu hospedeiro, exceto em pessoas imunodeprimidas ou quando há ruptura da barreira epitelial intestinal, como, por exemplo, nos casos de peritonites. Existem alguns clones de *E. coli* que adquirem alguns fatores de virulência específicos que os tornam capazes de adaptação ao novo ambiente e permitem com

que venham a ocasionar sérios danos à saúde do seu hospedeiro pela ampliação do seu espectro patogênico. Esses fatores de virulência podem ser adquiridos através de elementos genéticos que são transmitidos de uma célula para outra, como por exemplo, os plasmídeos, os transposons, os bacteriófagos e as ilhas de patogenicidade, podendo criar novas combinações na formação de novos fatores de virulência. Esses elementos podem ficar separados do ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid* - DNA) ou podem incorporar-se a ele. Somente as principais combinações na formação destes fatores de virulência persistem e se tornam patótipos específicos de *E. coli* capazes de causar doenças em indivíduos saudáveis. Três síndromes clínicas podem resultar de infecções causadas por esses patótipos: doença diarréica entérica; infecções do trato urinário; e meningite séptica. Embora diversos estudos, genéticos e fisiológicos desta espécie tenham sido feitos, muito dos mecanismos desta simbiose permanecem a esclarecer. (KAPER *et al.*, 2004; DONNENBERG, 2000; FASANO, 2002) (Figura 3).

Figura 3: Contribuição dos elementos genéticos na patogenicidade da *E. coli*.



Os fatores de virulência da *E. coli* por diferentes elementos genéticos incluindo os transposons, plasmídeos, bacteriófagos e ilhas de patogenicidade (PAIs). A *E. coli* comensal pode através de deleções, mutações ou rearranjos alterar sua patogenicidade assumindo formas capazes de causar doenças como diarreia, disenteria, síndrome hemolítica urêmica, infecções do trato urinário e meningites. Shi PAI, ilhas de patogenicidade derivadas de *Shigella*; mxi-spa, genes codificadores do sistema de secreção tipo III; kps PAI, ilhas de patogenicidade do gene codificador *kps*; pWR 100, plasmídeo de virulência de 213Kb derivado de *Shigella flexneri*; LEE PAI, locus de deleção de enterócitos.

Fonte: modificado de KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004.

Há seis categorias bem descritas de patógenos relacionados às infecções intestinais (KAPER, 2004; NATARO, 1998; RUSSO, 2000; SWEENEY, 1996):

- 1- *E. coli* enteropatogênica (EPEC) – responsável por diarreias com grande quantidade de muco, pouco sangue, febre baixa, mal-estar, vômitos, acomete em geral crianças;
- 2- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) – caracterizada por diarreias sanguinolentas com leucócitos e dor abdominal, pode evoluir para síndrome hemolítico-urêmica;
- 3- *E. coli* enterotoxogênica (ETEC) – conhecida como a diarreia dos viajantes, é aquosa, apresenta câimbras abdominais e desidratação;
- 4- *E. coli* enteroagregativa (EAEC) – conhecida por diarreia persistente em adultos e crianças, foi identificada como a causa de diversos focos disseminados pelo mundo;
- 5- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) – causa disenteria com febre, colite, tenesmo, sangue, muco e leucócitos fecais;
- 6- *E. coli* difusamente aderente (DAEC) – causa colite inflamatória invasiva moderada e ocasionalmente disenteria.

1.4.1 *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)

Cravioto *et al.* (1979), descreveram a adesão bacteriana de cepas de EPEC à cultura de células de carcinoma laríngeo humano (HEp-2) e sua utilização para caracterização de *E. coli*. Outros experimentos utilizando cepas bacterianas não EPEC em cultura de células de carcinoma cervical humano (HeLa) e de HEp-2, mostraram que há também aderência à monocamada de células, porém apresentam um padrão de aderência diferente (SCALETSKY, 1984; NATARO, 1985). As cepas EPEC possuíam padrão de aderência localizado (LA), enquanto as não EPEC aderiam difusamente em toda a superfície da monocamada. Mathewson *et al.*, (1985) relataram a aderência de cepas não EPEC às monocamadas de células HEp-2 e as denominaram de *E. coli* enteroaderentes, que produziam diarreia em adultos.

O padrão de aderência de cepas não EPEC que aderiam difusamente às células foram divididos em duas categorias: 1ª - Aderência agregativa (AA), denominadas de *E. coli* enteroaderentes-agregativa, as quais conferiam um padrão de auto-aglutinação tanto na monocamada celular como na superfície do vidro utilizado para o crescimento da monocamada de células HEP-2, e esta aderência era semelhante a “tijolos empilhados”; 2ª - Aderência difusa verdadeira (DA), apresentando uma aderência bacteriana difusa sobre toda a superfície da monocamada celular, pouca agregação e aderência à superfície do vidro (NATARO, 1987). Anos após, os termos enteroaderente e enteroaderente-agregativa foram substituídos por enteroagregativa e difusamente aderentes (NATARO; KAPER, 1998).

A EAEC foi então caracterizada como um grupo de bactérias que abrange sorogrupos de *E. coli* aderentes a linhagens celulares como as células HEP-2 e HeLa que formam agregados de bactérias que se localizam não somente na superfície da célula como também à superfície do vidro em forma de “tijolos empilhados” – aderência agregativa (AA). A configuração de “tijolos empilhados” é considerada como padrão típico de aderência agregativa (NATARO, 1995).

É importante o conhecimento de que a infecção por patógenos entéricos específicos, tais como *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *Cryptosporidium* spp. pode afetar o crescimento, mesmo na ausência de diarreia. O ciclo vicioso de repetidas infecções entéricas podem levar a desnutrição e às deficiências de desenvolvimento. Portanto, a duração prolongada da doença diarreica, deve certamente ser interrompida de modo a evitar problemas mais sérios. Descobertas recentes em algumas áreas, abriu novas oportunidades para interromper este ciclo vicioso. Primeiro, o reconhecimento do impacto a longo prazo de repetidas infecções entéricas aumentou consideravelmente o valor estimado de uma intervenção eficaz. Em segundo lugar, novas sondas moleculares têm se revelado cada vez mais eficazes em estudos de patógenos entéricos virais, bacterianos e parasitários na traçabilidade de sua virulência. Por último, desvendar o genoma do hospedeiro e determinar a suscetibilidade possibilitando a busca de caminhos para novas intervenções. Por conseguinte, é imperativo a compreensão da epidemiologia, etiologia e fisiopatologia das infecções entéricas, bem como as interações patógeno-hospedeiro, na elucidação de intervenções inovadoras para controlar as

consequências ainda devastadores da malnutrição ocasionada por repetidas infecções entéricas e determinantes para a formação da aptidão física e função cognitiva nos primeiros anos da infância (PETRI *et al.*, 2008).

A EAEC está fortemente associada à causa de doenças diarréicas persistentes, definida como episódio diarréico, iniciado com um quadro agudo de diarréia aquosa ou disenteria que se mantém por 14 dias ou mais (U. S. AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPEMENT, 2005), em crianças e adultos, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos, e foram bem identificadas como causa de surtos pelo mundo inteiro. Porém, no final da década de 80 e início da década de 90, não havia certeza da relação entre EAEC e diarréia, o que gerou dúvidas sobre sua patogenicidade em seres humanos (OKEKE; NATARO, 2001). Alguns autores relataram sua relação com a doença (CRAVIOTO *et al.*, 1991; FANG *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 1992; BHATNAGAR *et al.*, 1993; HENRY *et al.*, 1992) e outros autores não encontraram relação, sendo semelhantes os dados entre pessoas doentes e saudáveis (ALBERT *et al.*, 1995; ALBERT *et al.*, 1999; MAGALHÃES *et al.*, 1992; GIRÓN *et al.*, 1991; ECHEVERRIA *et al.*, 1992; ROSA *et al.*, 1998). Embora seja uma bactéria associada a doenças diarréicas em alguns indivíduos, existem outros, em que o microorganismo pode causar apenas uma infecção sub-clínica ou uma colonização. Crianças com infecções sintomáticas ou não, causadas por EAEC podem apresentar processo inflamatório intestinal com prejuízos ao desenvolvimento físico e cognitivo (STEINER *et al.*, 1998).

No Brasil, Fang *et al.* (1995) estudaram 4.800 casos de doença diarréica e destes, foram selecionadas 56 crianças com diarréia persistente, 52 com diarréia aguda e 42 controles. Neste grupo, cepas de EAEC foram isoladas em 68% dos casos de diarréia persistente, 46% dos casos de diarréia aguda e em 31% dos controles. No Nordeste do Brasil, Lima *et al.* (1992) observaram presença elevada de *E. coli* enteroaderente nas fezes e no suco jejunal de crianças com diarréia persistente (36% com aderência agregativa, 29% com aderência difusa e 13% com aderência localizada a células HEp-2).

A EAEC tem causado grandes surtos de diarréia na Europa, Reino Unido, Suíça e Japão. É também causa comum de diarréia entre os viajantes em países em desenvolvimento, e entre as crianças e as pessoas infectadas pelo HIV residentes

em países em desenvolvimento ou em países desenvolvidos. É uma causa comum de doença diarréica aguda em crianças e adultos (4,5%), atendidos nos serviços de emergência e unidades de internação nos EUA (COHEN *et al.*, 2005). A EAEC é também considerado um potencial agente de bioterrorismo (National Institutes of Health categoria B) (HUANG *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado em voluntários humanos, duas cepas de *E. coli* isoladas das fezes de dois adultos americanos com diarréia após viagem a Guadalajara no México foram administradas por via oral a voluntários que desenvolveram quadro diarréico (MATHEWSON *et al.*, 1986). Uma destas bactérias foi posteriormente identificada como EAEC (NATARO *et al.*, 1987). Mais tarde, quatro cepas de EAEC foram oferecidas aos voluntários após neutralização gástrica. Os sintomas gastrointestinais observados se deram após a administração da cepa 042, isolada de crianças com diarréia em Lima (Peru), o que sugeriu a complexa presença de diferentes mecanismos de virulência entre estas bactérias (NATARO *et al.*, 1995).

Na tentativa de elucidar o mecanismo patogênico da EAEC, a adesão induzida por esta bactéria tem sido estudada. Para isso, tem sido empregados modelos com linhagens celulares intestinais, tais como: Caco2, T84, HT29, HeLa e HEP-2 (KNUTTON *et al.*, 1992; CRAVIOTO *et al.*, 1991).

Embora, diferentes fatores de virulência sejam detectados pela reação em cadeia de polimerase (PCR), nenhuma das reações exibe 100% de especificidade. Diferentes estudos identificaram fatores de virulência específicos próprios da EAEC, mas os mecanismos pelos quais a bactéria exerce sua patogenicidade continuam por esclarecer (KAUR; CHAKRABORTI; ASEA, 2010).

A doença diarréica causada pela EAEC resulta de uma complexa interação entre hospedeiro e patógeno envolvido. Algumas destas infecções resultam em diarréia e induz uma resposta inflamatória, outras infecções não são sintomáticas. (HUANG, 2006).

A aderência agregativa da bactéria à mucosa intestinal é o primeiro passo para infecção por EAEC. São vários os fatores de virulência associados à adesão. Utilizando técnicas genéticas que permitiam o desenvolvimento de cepas mutantes, Nataro *et al.* (1992) clonaram um fragmento de 12Kb do plasmídeo de 65MDa (plasmídeo AA ou pAA), que confere o fenótipo AA à EAEC. O fragmento foi clonado

da cepa protótipo de EAEC 17-2, que foi isolada de uma criança com diarreia aquosa no Chile e foi em seguida introduzido na cepa de *E. coli* não aderente HB101. Através da microscopia eletrônica observou-se a presença de uma estrutura fimbrial flexível, denominada de fímbria de aderência agregativa I (*aggregative adherence fimbriae I* – AAF/I). A AAF/I tem papel na aderência agregativa de células HEP-2, na autoaglutinação bacteriana em caldo de cultura e na atividade de hemaglutinação de eritrócitos humanos. Outros estudos identificaram duas regiões plasmidiais, separadas por um intervalo de 9Kb de DNA, responsáveis pela síntese de AAF/I na cepa 17-2. A região um (1) contém os genes necessários para síntese e montagem; e a região dois (2) codifica um ativador transcricional de AAF/I, chamado de regulador de aderência agregativa de EAEC (*EAEC aggregative adherence regulator* – aggR). Somente na presença dessas duas regiões na mesma bactéria foi observada a adesão, a auto-aglutinação e a hemaglutinação (NATARO *et al.*, 1992; 1993; 1994; SAVARINO *et al.*, 1994).

Outro estudo mostrou que a cepa 17-2 era avirulenta por não causar diarreia em voluntários. Somente a cepa de EAEC 042 foi capaz de causar doença e à microscopia eletrônica e hibridação, esta não expressava AAF/I (NATARO *et al.*, 1995). Os genes necessários para a expressão de AAF/I na amostra 17-2 (*gga*) estão contidos no plasmídeo pAA1 e formam duas regiões distintas separadas por um segmento de 9kb não necessário para a biogênese fimbrial (NATARO *et al.*, 1992; 1993). Esse segmento foi depois associado à expressão da primeira enterotoxina de EAEC e nomeada de EAST1 (SAVARINO *et al.*, 1993). Czeczulin *et al.*, (1997) mostraram que apenas uma minoria das cepas de EAEC expressava AAF/I e identificaram na cepa 042 (O44:H18) outra fímbria de aderência agregativa e denominaram de fímbria de aderência agregativa II (*aggregative adherence fimbriae II* – AAF/II), que diferia genética e morfológicamente da AAF/I. A AAF/II é uma fímbria com 5nm de diâmetro, estrutura rígida formando feixes com 25% de identidade com a subunidade estrutural de AAF/I. Harrington *et al.*, (2005) relataram a liberação de interleucina 8 (IL-8) em células epiteliais intestinais induzidas por um componente fimbrial da cepa 042, o que sugere o envolvimento da adesina na resposta inflamatória por EAEC.

Os fenótipos agregativos de cepas de EAEC que não possuíam estruturas fimbriais ou que não hibridassem com as sondas específicas sugeriram aos

pesquisadores a investigação de fatores de adesão adicionais (KNUTTON *et al.*, 1992; BAUDRY *et al.*, 1990; YAMAMOTO *et al.*, 1991). Debroy *et al.* (1994) sugeriram haver uma proteína da membrana externa, expressa na presença do plasmídeo AA, associada à aderência de EAEC. Estes autores relataram uma única proteína da membrana externa, com 38kDa, com importante função na aderência agregativa das cepas (WAI; TAKADE; AMAKO, 1996). Também foi identificada uma proteína plasmidial da membrana externa de EAEC O111:H12, com 58kDa, denominada de Ap58, associada à aderência e hemaglutinação bacteriana (MONTEIRO-NETO *et al.*, 2003). Foram também descritas mais duas outras fímbrias de aderência (*aggregative adherence fimbriae III*– AAF/III e *aggregative adherence fimbriae IV*– AAF/IV). As fímbrias AAF/III ao contrário das fímbrias AAF/I e AAF/II são filamentos longos e flexíveis de 3 – 5nm (BERNIER; GOUNON; LE BOUGUÉNEC, 2002; BOISEN *et al.*, 2008).

Outro fator de virulência importante relatado e relacionado à infecção causada pela EAEC é a proteína dispersina, codificada por um gene localizado numa sequência anterior a do gene *aggR* no plasmídeo AA que foi denominada de proteína secretada U de EAEC (EAEC *secreted protein U* – *aspU*). Esse gene foi detectado em 80% das cepas de EAEC testadas. (CZECZULIN *et al.*, 1999). Sheikh *et al.* (2002) caracterizaram esse gene como uma proteína de baixo peso molecular (10,2kDa), imunogênica e sua codificação era regulada pelo gene do ativador transcricional *aggR*. Por conseguinte, alteraram a nomenclatura desse gene para *aap* (*anti-aggregation protein*). O produto de *aap*, dispersina ou proteína anti-agregação possui uma sequência sinal que é secretado para o meio extracelular, onde permanece ligado ao polissacarídeo da bactéria, neutraliza a carga negativa da superfície e permite a projeção de fímbrias. Mutações nesse gene ocasionam autoaglutinação muito intensa, indicando que a dispersina atua diminuindo a autoagregação das bactérias, aumentando a dispersão das mesmas. Além disso, as cepas mutantes em *aap* apresentam as fímbrias de adesão agregativa (AAF/II) coladas à superfície da bactéria, diferentemente das cepas selvagens que apresentam as fímbrias projetadas (SHEIKH *et al.*, 2002). Nish *et al.* (2003), revelaram que a dispersina é secretada no espaço periplasmático e seu transporte é mediado por um complexo de proteínas transportadoras ABC, que é codificado em uma região plasmidial sob controle do gene *aggR*. Essa região é chamada de *aat-P*

ABCD, e inclui mais cinco genes, dentre eles se destacam uma permease de membrana interna (*aatP*), uma proteína de ligação à adenosina trifosfato (ATP) (*aatC*) e uma proteína da membrana externa semelhante à TolC (*aatA*).

A EAEC é definida como a cepa que apresenta padrão de adesão agregativa (AA). Nas cepas protótipos este fenótipo é associado à presença do plasmídeo AA (*pAA*) que codificam as fímbrias AAFs e posteriormente foi demonstrado a sua participação na codificação de uma enterotoxina termo-estável, que foi denominada de enterotoxina termoestável 1 de EAEC (*enteroagregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1 – EAST-1*). Trata-se de uma proteína que apresenta homologia estrutural com a toxina termo-estável da ETEC (STa), mas há diferenças genéticas e imunológicas (SAVARINO *et al.*, 1991). Sua função ainda não está clara, mas parece contribuir para a diarreia aquosa. Outra proteína foi encontrada em abundância no sobrenadante de amostras isoladas de surto de EAEC e foi detectada no soro de pacientes infectados (ESLAVA *et al.*, 1993) e associada também ao gene plasmidial AA. Essa enterotoxina foi denominada de toxina codificada por plasmídeo (*plasmid-encoded toxin – Pet*) (ESLAVA *et al.*, 1998). Foi relatado efeito citotóxico da Pet na membrana de eritrócitos e em células HEp-2, ocasionando a degradação das proteínas do citoesqueleto celular (VILLASECA *et al.*, 2000). Neste mesmo surto foi também descrita outra proteína, clonada e sequenciada por Henderson *et al.* (1999), denominada de proteína envolvida na colonização intestinal (*protein involved in intestinal colonization – Pic*). É o único fator de virulência cromossomal descrito em EAEC.

Mendez-Arancibia *et al.* (2008) demonstraram em seu estudo de casos de EAEC que crianças diarreica na Tanzânia secretavam uma toxina autotransportadora secretada (*secret autotransporter toxin – Sat*). A sua atividade foi descrita em tecido intestinal de íleo de coelho em câmara de Ursing, apresentando acúmulo de líquido nas alças e necrose nos vilos (TADDEI *et al.*, 2005). GUIGNOT *et al.* (2007) relataram a ação da toxina em células epiteliais intestinais polarizadas, que provocou lesões nas junções celulares firmemente aderentes (tight junctions) - TJs da célula, com rearranjos nas proteínas ZO-1, ZO-3 e ocludina, resultando em aumento da permeabilidade paracelular, sem interferência na resistência elétrica transepitelial.

As infecções por EAEC estão associadas com inflamação intestinal e distúrbios no crescimento de crianças infectadas, mesmo na ausência de diarreia. Elevados níveis de lactoferrina e de IL-8 foram detectados em crianças infectadas. A liberação de IL-8 foi vista ser mediada por um fator solúvel e estável ao calor, um componente do flagelo da bactéria denominado de flagelina. (GUERRANT *et al.*, 1997; STEINER *et al.*, 1997; 1998; 2000). Posteriormente foi detectado o receptor *toll-like 5* (*Toll Like Receptor* - TLR5) como o responsável pela liberação de IL-8, pois a flagelina de EAEC ativava a proteína ativada por mitógeno (MAP) quinase p38 e esta seria dependente de TLR5 (DONELLY; STEINER, 2002; KHAN; KANG; STEINER, 2004).

Apesar de que diversos fatores de virulência tenham sido relatados na patogênese da EAEC, eles não são comuns a todas as cepas e o microorganismo embora tenha sido associado com doença diarreica em alguns indivíduos, em outros não ocorre ou ocorre apenas a colonização intestinal em condições subclínicas. No entanto, alterações histopatológicas mostram o aumento na produção de muco pelos enterócitos possivelmente associado à colonização persistente no trato intestinal (HUANG *et al.*, 2004; FLORES; OKHUYSEN, 2009). Estudos *in vitro* e *in vivo* relatam a existência de três fases na infecção pela EAEC, primeiramente ocorreria adesão à mucosa intestinal, apesar da sua interação com diferentes regiões do trato intestinal, há intensa adesão à mucosa do cólon, embora, alguns autores relatem adesão à mucosa do íleo e cólon. Haveria em seguida a produção de muco tanto pela bactéria como pela célula do hospedeiro, formando agregados depositados como uma camada de biofilme. Finalmente, ocorreria a resposta inflamatória com liberação de citocinas (HICKS *et al.*, 1996; HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). PEREIRA *et al.* (2008) mostraram a internalização da EAEC às células epiteliais intestinais Caco-2 e T84, sugerindo esse mecanismo de colonização da mucosa intestinal, assim a bactéria estaria protegida dos mecanismos de defesa do hospedeiro e da antibioticoterapia, favorecendo a persistência bacteriana.

1.5 Epitélio intestinal

A integridade do epitélio intestinal é de grande importância para a saúde do indivíduo. A renovação das proteínas intestinais representa 20 a 30% do *turnover* protéico do corpo inteiro (MARCHINI *et al.*, 1999). Este epitélio não somente é capaz de se adaptar a mudanças no seu ambiente como consegue manter funções complexas de digestão, absorção, secreção e desintoxicação de espécies oxidantes formadas na luz intestinal. Células epiteliais trocam mensagens com outros tipos celulares do seu ambiente, tais como células da resposta imunológica e do sistema nervoso entérico, de modo que estas interações bidirecionais constituem a chave para a manutenção da homeostasia tissular frente à agressão sofrida (SIAVOSHIAN *et al.*, 1997). O epitélio consiste em diferentes tipos celulares unidos por junções intercelulares, constituindo-se em células da cripta e dos vilos. Os vilos intestinais são compostos de diferentes colunas verticais de células. Os tipos celulares encontrados nos vilos dependerão da célula da cripta da qual se originaram (WONG *et al.*, 1999). As criptas contêm uma população de células tronco capaz de gerar qualquer tipo celular. Ainda não está elucidada a diferenciação das células tronco nos mais variados tipos celulares do epitélio intestinal (BJERKNES *et al.*, 1999).

Algumas células, derivadas de células tronco, têm a capacidade de adotar diferentes linhagens, mas ainda se desconhece como estas promovem ou reprimem este tipo de escolha de formação (WONG *et al.*, 1999).

O reparo da mucosa envolve pelo menos dois processos diferentes, que normalmente ocorrem dentro das primeiras 24 horas. O primeiro processo de reconstituição se faz quando da descamação de células epiteliais danificadas, seguidas pela migração de células viáveis adjacentes para reconstituir a área desnuda. Esse passo imediato é uma resposta inicial para a prevenção de lesão mucosal profunda. O segundo, as células perdidas são substituídas pelo processo de divisão celular, de forma que finalmente a mucosa danificada volta a sua espessura normal. Este processo inicia-se entre 12h às 16h depois de ocorrida a lesão, levando cerca de um a dois dias para sua finalização (McCOMARCK; VIAR; JOHNSON, 1992).

Há diferentes mecanismos pelos quais patógenos entéricos podem causar diarreia. No entanto, frequentemente compartilham vias patogênicas comuns. Alguns aderem primeiro à mucosa intestinal para dar início à sua patogenicidade, outros

produzem toxinas que alteram o transporte iônico no epitélio intestinal, algumas espécies podem invadir a mucosa e causar inflamação. Outros podem invadir a circulação sanguínea e gerar sérias consequências sobre a fisiologia celular, podendo levar a eventos que alteram desde os processos de sinalização celular até mesmo aqueles que afetam a manutenção de sua ultra-estrutura. Em muitos casos, a célula não consegue sobreviver a estas agressões, sendo a morte celular um impacto óbvio ocasionado pela invasão destes microorganismos.

Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo que pode ocorrer em situações de lesão celular, infecção e mesmo ausência de fatores de crescimento. A célula altera a integridade da membrana plasmática, aumenta o volume e perde funções metabólicas vitais. Mas, nem todos os eventos de morte celular são passivos. Os organismos pluricelulares são também capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares. A apoptose, forma fisiológica de morte celular programada, é caracterizada por modificações morfológicas e bioquímicas com importante papel no processo homeostático do epitélio intestinal que tem por fim manter o equilíbrio entre as células proliferativas localizadas nas criptas e a eliminação celular ocorrida nas criptas e nos vilos (MINGON *et al.*, 1998). Além do mais, este é um processo de defesa para remover células infectadas, mutadas, supérfluas ou que sofreram algum dano, prevenindo processos patológicos como a imunodeficiência, a auto-reatividade imunológica e o câncer. Um aumento na apoptose enterocítica ocorre entre 12-18 horas seguidas da invasão por bactéria patogênica (GUERRANT *et al.*, 1999). A apoptose clássica ocorre por ativação de enzimas da família de cisteínas proteases, conhecidas como caspases, que levam à clivagem de proteínas do citoesqueleto, ativação de nucleases e fragmentação do DNA. Uma inibição da apoptose poderá gerar doenças como linfomas, hepatomas e carcinomas nos cólons (MINGON *et al.*, 1998). Por outro lado, os mecanismos de defesa do hospedeiro têm um papel muito importante na aquisição da infecção entérica. Dentre eles, podem-se citar a acidez gástrica normal, o muco intestinal, a imunidade celular e humoral, a motilidade e flora microbiana intestinal (BRITO *et al.*, 2005a). O epitélio intestinal constitui no principal defensor contra microorganismos patogênicos que podem se desenvolver no lúmen intestinal, sendo por outro lado não responsivo à microbiota comensal e aos antígenos alimentares (WERSHIL *et al.*, 2008). A microbiota intestinal, em um homem adulto, consiste de centenas de

diferentes espécies de microorganismos, variando de 400 a 1000, destas, mais da metade não pode ser cultivada fora do intestino. Tanto células procarióticas como eucarióticas habitam o intestino, porém as espécies bacterianas predominam.

A desnutrição associada a infecções intestinais recorrentes causam inflamação, lesão tecidual, diarreia secretória e distúrbios metabólicos pela ausência da recaptção de macro/micronutrientes necessários à homeostase. A diarreia resulta do desequilíbrio entre absorção e secreção de íons e substâncias através do epitélio intestinal. Geralmente, este desequilíbrio é provocado pela presença de bactérias secretoras de toxinas que perturbam a organização do epitélio. O intestino absorve nutrientes que naturalmente formam uma barreira não somente a bactérias, como também a substâncias tóxicas (VISWANATHAN *et al.*, 2009). No intestino delgado, os nutrientes intraluminais contribuem com cerca de 50% das necessidades energéticas dos enterócitos. No cólon, a proporção calórica dos nutrientes é bem maior, com 70% (RUEMMELE *et al.*, 1999).

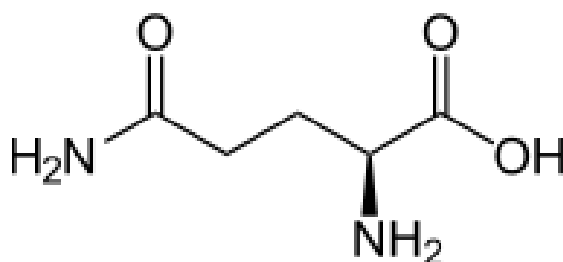
1.6 A importância dos nutrientes nas doenças diarreicas

O trato gastrointestinal atua tanto como barreira contra eventuais agressões provenientes do ambiente externo, como serve como principal porta de entrada para nutrientes. O epitélio intestinal é o principal defensor contra microorganismos patogênicos que podem se desenvolver no lúmen intestinal, sendo não defensivo à microbiota comensal e aos antígenos alimentares (DUGGAN; GANNON; WALKER, 2002; WERSHIL *et al.*, 2008). Uma nutrição protéico-energética deficiente constitui uma das causas mais frequentes de déficit imunitário. Os macronutrientes (carboidratos, proteínas e ácidos graxos) e micronutrientes (vitaminas e sais minerais) tais como a glutamina, arginina, ácidos graxos poliinsaturados, nucleotídeos e certos elementos (zinco, selênio, ferro), vitaminas (A, B12, E, C) e folatos exercem importante papel no crescimento, reparo e função da mucosa intestinal, como estão envolvidos em uma variedade de respostas imunológicas (LIMA *et al.*, 1992; 2004; BOULETREAU *et al.*, 1996; BUTTKE *et al.*, 1994; BASTARACHE, 2004).

1.6.1 Glutamina

A glutamina pode ser abreviada como Gln ou Q é um dos 20 aminoácidos codificados pelo código genético padrão. A sua cadeia lateral é constituída por uma amida formada pela substituição da hidroxila da cadeia lateral do ácido glutâmico por um grupo de amina funcional (Figura 4). Portanto, pode-se considerar uma amida de ácido glutâmico.

Figura 4. Estrutura química da glutamina



Fonte: <http://en.wikipedia.org>, 2010.

No sangue humano, a glutamina é o mais abundante aminoácido livre, apresentando uma concentração de aproximadamente 500-900 mmol/L. (BROSNAN, 2003). Esta assume diversas funções bioquímicas no organismo, como, síntese proteica, como qualquer outro aminoácido, regulação do equilíbrio ácido-base no rim pela produção de amônia, energia celular, doação de nitrogênio por meio de vários processos anabólicos e doação de carbono, para o ciclo do ácido cítrico (ALEDO, 2004; YUNEVA *et al.*, 2007).

A glutamina, sintetizada pela enzima glutamina sintetase do glutamato e amônia, tem sua produção tecidual mais relevante proveniente da massa muscular, sendo responsável por cerca de 90% de toda glutamina sintetizada. Constitui um componente nutricional necessário para a manutenção da integridade da mucosa

intestinal, assim como é essencial para a biossíntese do ácido nucléico e assume um papel chave na replicação celular (NEWSHOLME; PARRY-BILLINGS, 1990; BOHNSACK; HIRSCHI, 2004).

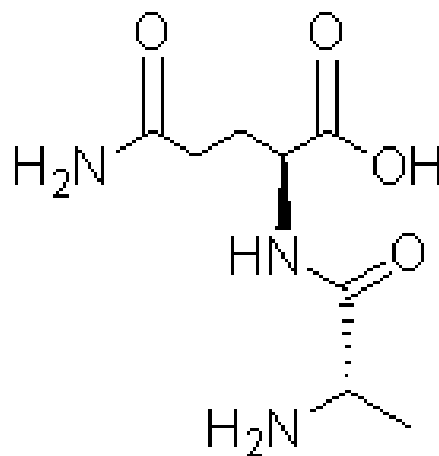
A L-glutamina é o principal aminoácido presente nos músculos e no plasma, sendo considerado um dos principais metabólitos para os enterócitos, principalmente em intestino delgado. Há diversos relatos sobre a importância da glutamina na função do trato gastrointestinal. Vários autores têm investigado seus efeitos e já foi demonstrada sua grande importância na reabilitação nutricional, sobre o estímulo de crescimento do vilos depois de terapia quimioterápica. RHOADS *et al.* (1997) mostraram seu efeito sobre os fatores de crescimento envolvidos no reparo e proliferação celular. Em cirurgias, traumas e transplantes de medula óssea, a concentração de glutamina diminui drasticamente no sangue e nos tecidos, o que pode ser devido ao aumento de sua captação pelas células intestinais (TUHACEK *et al.*, 2004).

LIMA *et al.* (2005), demonstraram que a glutamina, adicionada à nutrição enteral em crianças com desnutrição, prevenia danos à função da barreira intestinal. Estudos “*in vitro*”, mostraram redução na atrofia mucosal, redução na permeabilidade celular, animais expostos a bactérias Gram-negativas tinham menor danos à mucosa intestinal e maior taxa de síntese de proteínas quando na presença de glutamina. Quando o trato intestinal de ratos foi exposto à isquemia e reperfusão, o tratamento com glutamina ajudou a preservar as concentrações da glutathione mucosal e a diminuir as concentrações de marcadores da peroxidação lipídica (DUGGAN; GANNON; WALKER, 2002; LI *et al.*, 1994; HIGASHIGUCHI *et al.*, 1993; HARWARD *et al.*, 1994).

1.6.2 Alanil-glutamina

A alanil-glutamina é um dipeptídeo da glutamina (Figura 5) que pode ser utilizada como fonte estável e altamente solúvel de glutamina. A glutamina constitui o principal micronutriente para o intestino, bem como para muitas células do sistema imunológico que se torna condicionalmente essencial durante reações catabólicas.

Figura 5. Estrutura química da alanil-glutamina



Fonte: [HTTP://www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

A suplementação com glutamina auxilia no reparo e na função da mucosa intestinal. Mesmo em doses elevadas não são observados efeitos colaterais. O grande problema se deve à sua instabilidade em solução; porém, superado com a criação de dipeptídeos estáveis, tais como alanil-glutamina. Um estudo *in vivo* com ratos com diarreia induzida por toxina da cólera mostrou que alanil-glutamina melhora a absorção intestinal de eletrólitos de forma mais acentuada que as soluções tradicionais de glicose ou mesmo glutamina. Portanto, a alanil-glutamina tem grande potencial na terapia de reidratação oral e nutricional para pacientes com

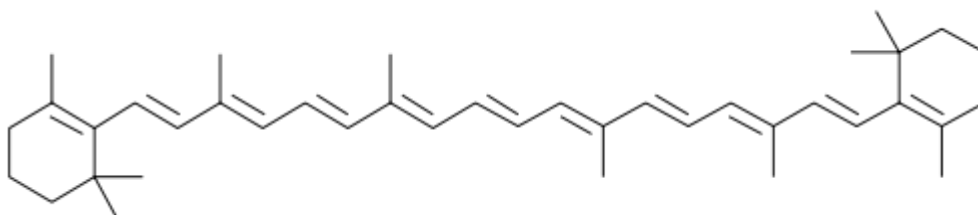
infecção intestinal, desnutrição, ou sob quimioterapia, ou radioterapia, ou com enterite induzida (CARNEIRO-FILHO, *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2002).

Estudos *in vitro* com células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) (ALTEHELD *et al.*, 2005) demonstraram que a alanil-glutamina manteve os níveis de glutathiona celular e impediu a redução da expressão de proteínas transportadoras, como a PepT1 (H(+)-dependent transporter – PepT1), sugerindo que esse dipeptídeo e outros poderiam ser empregado em lesões causadas pelo estresse oxidativo em células epiteliais intestinais. CRUZAT, ROGERO *et TIRAPGUI* (2010), demonstraram a ação do dipeptídeo alanil-glutamina na atenuação da respostas de biomarcadores inflamatórios e dos níveis plasmáticos de creatina kinase (CK) induzidos por exercício prolongado.

1.6.3 β -caroteno

O β -caroteno é um dos mais de 600 carotenóides existentes na natureza. São pigmentos que vão do amarelo ao vermelho e que estão distribuídos entre as plantas. Cerca de 50% deles podem potencialmente fornecer atividade de vitamina A, sendo assim referidos como carotenóides de provitamina A. O β -caroteno é a mais abundante e a mais eficaz provitamina A presente nos alimentos. Em teoria, uma molécula de beta-caroteno pode ser clivada em duas moléculas de vitamina A (Figura 6). Porém, o β -caroteno é apenas convertido parcialmente em vitamina A, sendo o restante armazenado.

Figura 6. Estrutura química do β -caroteno



Fonte: <http://en.wikipedia.org>, 2010.

Vários autores, atualmente, sugerem que além de ser uma fonte segura de vitamina A, o β -caroteno desempenha diversos papéis biológicos importantes que podem ser independentes do seu estado como provitamina. Sabe-se que ele inibe a formação de radicais livres, beneficia a visão noturna, aumenta a imunidade, dá elasticidade à pele, fortalece as unhas, além de atuar no metabolismo de gorduras. O β -caroteno atua também na obtenção do bronzeamento da pele. Quando transformado em vitamina A em nosso organismo, auxilia na formação de melanina, pigmento responsável por proteger a pele dos raios ultravioleta e conferir o bronzeamento. As principais fontes de β -caroteno são: cenoura, abóbora, beterraba, mamão, manga e a batata doce. Em quantidades menores, pode ser encontrado nos vegetais folhosos como couve, repolho, espinafre, agrião e brócolis. A vitamina A é essencial para o crescimento e diferenciação de uma série de células e tecidos. Durante a gravidez e durante todo o período de amamentação, a vitamina A tem um papel importante no desenvolvimento saudável do feto e do recém-nascido, como o desenvolvimento do pulmão e maturação. A Sociedade Alemã de Nutrição (DGE) recomenda um aumento de 40% na ingestão de vitamina A para gestantes e um aumento de 90% para as mulheres que amamentam (STROBEL; TINZ; BIESALSKI, 2007).

Alguns estudos epidemiológicos sugerem que as vitaminas antioxidantes, como o β -caroteno, podem atuar sobre causas primárias da hipertensão. O que se deve à conhecida atividade antioxidante dos carotenóides, consequência de sua estrutura singular e podem reagir várias vezes com radicais peroxila para formar moléculas estáveis. A literatura também relata casos de hipervitaminose associada a grandes doses que ocasionaram danos em consequência de sua impregnação hepática, o que resultaria em lesão, fibrose, hipertensão portal e hidrotórax hepático. Há estudos que sugerem uma possível ação pró-oxidante contrária a sua já conhecida ação antioxidante. Oliveira *et al.* (2007), mostraram que a suplementação de β -caroteno teve efeito positivo tanto no controle quanto na gênese da hipertensão arterial de ratos. (KRINSKY, 1998; BURTON, 1989; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Kar em 2002, mostrou que a aplicação tópica de β -caroteno foi eficaz contra o melasma e a sua aplicação prolongada estava associada a melhores efeitos.

Extratos de ácidos graxos dos cogumelos *Agaricus essettei* e *Agaricus bitorquis*, com alto teor de β -caroteno e ácido linoleico, apresentaram atividades antioxidantes, anticolinesterásicas e antimicrobiana. Foram eficazes contra bactérias gram positivas, especialmente contra *Micrococos luteus*, *Micrococos flavus*, *Bacilos subtilis* e *Bacilos cereus*.

A biodisponibilidade dos β -carotenos é altamente limitada devido a sua dispersão nos fluídos digestivos e na baixa captação pelas células epiteliais. Os carotenóides são liberados no trato gastrointestinal e dispersos com auxílios dos lipídeos e do fluido biliar. Posteriormente são finalmente solubilizados em micelas compostas de sais biliares, colesterol, ácidos graxos, monoacilgliceróis e glicerofosfolipídeos, tornando-se então acessíveis às células epiteliais do intestino delgado, pois há relatos que os componentes destas micelas influenciam de forma importante na absorção do β -caroteno (KOTAKE-NARA; YONEKURA; NAGÃO, 2010).

1.6.4 Zinco

O zinco é um elemento químico essencial para o organismo humano. O elemento intervém no metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos e atua como coenzima na atividade de mais de 100 enzimas; além de possuir um papel essencial na imunidade, divisão e crescimento celular. Participa, também, na cicatrização de ferimentos e na síntese de DNA.

É um metal encontrado em diversos alimentos como, carnes vermelhas, aves, ostras, mariscos, pescados, favos e nozes. Sua ingestão diária recomendada é cerca de 10mg. Também encontra-se na insulina e em diversas enzimas como a superóxido desmutase.

O elemento zinco é necessário a uma variedade de funções fisiológicas e bioquímicas, incluindo manutenção da barreira epitelial intestinal, função imunológica associada ao intestino, redução do estresse oxidativo e inibição de apoptose. O trato gastrointestinal é o principal local de regulação homeostática do zinco. Quando há deficiência de zinco no organismo, ocorre um aumento na taxa do

seu transporte através da membrana da mucosa intestinal mediada por transportadores de zinco de forma a aumentar a eficiência de sua absorção. Da mesma forma, quando seus níveis ficam extremamente baixos ou a ingestão é muito baixa durante períodos prolongados, há mecanismos compensatórios como a redução da excreção urinária, aumento plasmático e aumento da sua liberação tecidual, inclusive óssea.

Existem várias condições patológicas que estão acompanhadas de deficiência de zinco, tais como, doenças gastrointestinais, doença renal, alcoolismo, alguns tipos de câncer e AIDS. Esta deficiência pode também levar a uma variedade de sintomas clínicos, incluindo retardo no crescimento, desregulação da função imunológica, sintomas neuropsiquiátricos, acrodermatite ou hipogonadismo. Broekaert; Nanthakumar; Walker (2007), mostraram que a deficiência de zinco causou uma maior invasão de patógenos e maior secreção de IL-8 na diarreia infecciosa. A deficiência prolongada de zinco induz a atrofia da mucosa intestinal, diminuindo a absorção de outros nutrientes. A diarreia induz a perda de zinco pela mucosa gastrointestinal e inibe o *turnover* da mucosa, promovendo má absorção não somente de zinco como de outros nutrientes. Há relatos de que a suplementação de zinco reduz a duração e gravidade dos episódios diarreicos. Demonstrou-se também a associação de sua deficiência e imunodepressão que afeta a defesa do organismo contra infecções bacterianas e parasitárias (ZIEGLER *et al.*, 2003).

Por vários anos o zinco tem sido utilizado com sucesso no tratamento de diferentes tipos de injúrias teciduais, assim também como agente protetor em pacientes com lesões gastro-hepáticas. Este tem mostrado importante papel na redução da atividade de radicais livres, na aceleração do processo de mitose celular e também apresenta efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano. Um baixo nível de zinco foi medido em vários tecidos de pacientes com doença inflamatória intestinal, sugerindo uma deficiência adquirida. A avaliação dos níveis de zinco torna-se complexa devido às dificuldades encontradas para sua medição, pois mais que 95% do total de zinco permanece intracelular. A redução de zinco foi detectada na mucosa em biópsias de pacientes com doença inflamatória intestinal, sugerindo mais um sinal da associação da deficiência de zinco nestes pacientes. No entanto, o mecanismo permanece desconhecido, embora a má nutrição e outras etiologias como a mal absorção ou defeito no transporte ou armazenamento de zinco no

epitélio intestinal, têm também sido discutidos. Distúrbios adquiridos no metabolismo de zinco foram relacionados ao decréscimo das defesas anti-oxidantes e anti-inflamatórias da mucosa intestinal em pacientes com doença inflamatória, levando a danos teciduais. O excesso de zinco tem sido associado a reduções dos níveis de cobre, alterações na função do ferro e na diminuição da função imunológica, bem como dos níveis do bom colesterol (BROEKAERT; NANTHAKUMAR; WALKER, 2007).

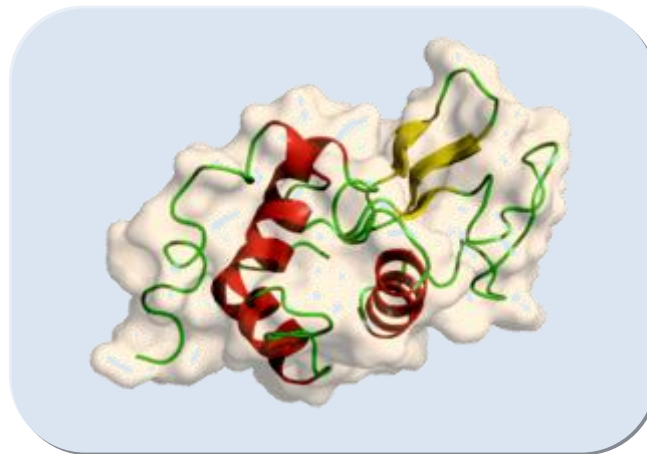
1.6.5 Leite caprino contendo lisozima humana

O leite humano fornece inúmeros benefícios à saúde das crianças, melhorando seu crescimento e conferindo proteção contra inúmeras doenças agudas e crônicas. Crianças amamentadas com leite materno apresentam uma microbiota intestinal mais saudável quando comparadas às crianças que não foram. A amamentação estabelece uma microbiota normal protetora contra as doenças diarréica, contribuindo para o desenvolvimento e maturação do trato gastrointestinal. Há diversas substâncias no leite que conferem proteção, tais como a lisozima, lactoferrina e a imunoglobulina A (IgA) secretória, que são fatores de defesa inespecíficos, além de outras substâncias com ação imunológica específica.

A lisozima (1,4- β -N-acetilmuramidase) é uma molécula antimicrobiana encontrada naturalmente em ovos de aves e em secreções de mamíferos, como lágrimas, saliva e leite (JOLLES; JOLLES, 1984) (Figura 7). Em virtude dessa atividade antimicrobiana intrínseca, a lisozima é comumente utilizada como conservante em uma ampla variedade de produtos alimentares, como carnes e queijos (CAGRI *et al.*, 2004; PROCTOR; CUNNINGHAM, 1988). Seu efeito bactericida se deve a clivagem da ligação glicosídica existente entre o carbono-1 (C1) do ácido N-acetilmurâmico e o carbono-4 (C4) da N-acetilglicosamina presentes no peptidoglicano da parede celular bacteriana, resultando em perda da integridade da membrana e consequente lise celular (ELLISON; GIEHL, 1991; BLAKE *et al.*, 1967). Embora sua ação seja mais efetiva contra bactérias Gram-positivas, que apresentam uma camada de peptidoglicano mais espessa, trabalhos *in vitro* e *in vivo*

têm confirmado sua atividade contra bactérias Gram-negativas (BRUNDIGE *et al.*, 2008; MAGA *et al.*, 2006b). Há relatos sobre a ação da lisozima na modulação da resposta inflamatória (GINSBURG, 2002; TAKADA *et al.*, 1994). No entanto, uma resposta inflamatória prolongada no trato gastrointestinal pode ocasionar lesões no epitélio intestinal levando à desnutrição e prejuízos ao crescimento da criança (MOORE *et al.*, 2001).

Figura 7. Lisozima



Fonte: Banco de dados de Proteína (*Protein Data Bank-PDB*)

A concentração de lisozima presente nos leites são as seguintes: bovino (0,13 a 0,16 μ g/mL); caprino (0,23 a 0,25 μ g/mL) e humano (400 μ g/mL) (CHANDAN *et al.*, 1968). Porém, com o uso da engenharia genética atualmente podem-se gerar animais com a capacidade de produção de um leite que expressa uma concentração superior dessa substância. Maga *et al.* (2006a), produziram o leite transgênico de cabra expressando uma concentração de 270 μ g/mL de lisozima. Em trabalhos anteriores foi observado o efeito antimicrobiano do leite transgênico de camundongos que expressavam, seja a lisozima humana, que foi capaz de reduzir o crescimento bacteriano de *Pseudomonas fragi* e *Lactobacillus viscosus* (MAGA *et al.*, 1994; 1995), seja pela hidrolase de peptídeoglicano – a lisostafina, em glândulas mamárias, que protegeu animais contra infecções estafilocócicas (KERR *et al.*, 2001).

A composição do leite caprino assim como de outras espécies apresentam variações em função da raça, alimentação, idade do animal, número de crias, estágio de lactação, variações climáticas. O quadro 4 abaixo mostra a composição do leite de diferentes espécies de mamíferos:

Quadro 4: Composição (%) do leite de diferentes espécies de mamíferos

Espécie	Água	Gordura	Proteína	Lactose	Minerais
Cabra	87,0	4,5	3,3	4,6	0,6
Vaca	87,6	3,8	3,3	4,7	0,6
Búfala	82,1	8	4,2	4,9	0,8
Ovelha	81,6	7,5	5,6	4,4	0,9
Égua	89,0	2,5	2,0	6,0	0,5
Camela	87,1	4,2	3,7	4,1	0,9

Fonte: RODRIGUES, 2010. <http://www.queijosnobrasil.com.br>

Cerca de 3% a 8% das crianças do mundo menores de 3 (três) anos são alérgicas às proteínas do leite bovino e igualmente a derivados lácteos. Essa reação alérgica é uma resposta imunológica do organismo frente a certas proteínas presentes no leite bovino. Tal estímulo desencadeia a liberação de histamina, produzindo os sintomas alérgicos como diarreia, otite, bronquite, erupções cutâneas e secreção nasal, falta de ar, edema e outras. A alergia é causada por uma predisposição genética e tende a acompanhar a pessoa por toda a vida. O leite caprino tem sido um substituto satisfatório nos casos de crianças e adultos alérgicos às proteínas do leite de vaca, que são a caseína alfa-s1, lactalbumina e beta globulina (estas últimas ditas proteínas do soro ou séricas). A caseína do leite caprino tem uma estrutura diferente, ele possui mais caseína- β , caseína alfa-s2 e pouca quantidade de caseína alfa-s1. O leite caprino serve como substituto para pessoas que são sensíveis ao leite bovino, embora vale ressaltar que dependendo da pré-disponibilidade genética, o indivíduo também pode apresentar reações alérgicas ao consumo de leite de cabra.

A gordura é um dos constituintes que junto à proteína afetam diretamente a característica final de um derivado lácteo, como por exemplo, o sabor e o aroma.

No leite, estão sob a forma de glóbulos, os triacilglicerois, cujo diâmetro pode variar consideravelmente em função do tipo de animal. No leite bovino, por exemplo, os glóbulos apresentam um diâmetro de 1 e 10 μm e para leite caprino inferior a 3 μm . Essa característica torna o leite caprino de mais fácil digestão quando comparado ao leite bovino, porém esta característica não afeta em nada o valor energético, ou seja, 1 grama de gordura de leite caprino ou bovino possui 9 Kcal. A digestão e a absorção do leite caprino são mais rápidas em comparação ao leite bovino, por isso, é indicado para crianças e idosos desnutridos. Tecnicamente o leite caprino apresenta grande dificuldade de desnate. Por apresentar tal particularidade podemos dizer que o leite caprino é naturalmente um leite homogeneizado.

O leite caprino possui um elevado teor de ácidos graxos de cadeia curta (caprílico, cáprico e capróico) que contribuem nas características acentuadas de odor e sabor (principalmente queijos mofados). Em termos nutricionais estes ácidos são importantes na profilaxia de tratamento de má absorção alimentar e distúrbios intestinais. A brancura típica do leite caprino se deve a ausência do pigmento caroteno que acentua a coloração amarelada em outros tipos de leites.

As proteínas do leite caprino são constituídas de 71% de caseínas, 22% de proteínas do soro (proteínas solúveis), e 7% de nitrogênios não protéicos. Em comparação com o leite bovino, o leite caprino contém menos caseínas mais proteínas séricas e nitrogênio não protéico. A proteína de grande relevância para tecnologia de produtos lácteos é a caseína (proteína do leite), cuja função biológica é de nutrição. É subdividida em quatro frações principais que são: alfas (s1 e s2) caseínas, beta-caseína e kappa-caseína. Em comparação com o leite bovino, o leite caprino contém menos caseína alfa-s1 (caprino 15% versus bovino 39%) e mais caseína-alfa s2 (caprino 21% versus bovino 10%) e mais caseína-beta (caprino 48% versus bovino 35%). As proteínas que permanecem em solução a pH de 4,6 são denominadas de proteínas do soro lácteo, formadas por um grupo variado que incluem: alfa-lactoalbumina, beta-lactoglobulina, albumina do soro sanguíneo, imunoglobulinas e peptídeos de baixo peso molecular. Como outros tipos de leite, o leite caprino é também uma das mais ricas fontes de proteína, constituídas de aminoácidos essenciais.

Outro componente, o cálcio, presente no leite e associado a outros minerais como o fosfato, citrato e magnésio, é o grande responsável por seu equilíbrio. O leite é um alimento complexo que apresenta o maior conteúdo de cálcio em comparação com outros alimentos. O quadro 5 abaixo mostra a composição nutricional do leite de vaca e cabra em 100mL.

Quadro 5: Composição nutricional do leite de vaca e de cabra em 100mL

NUTRIENTE	LEITE DE VACA	LEITE DE CABRA
Energia	63 calorias	65 calorias
Proteínas	3,2g	3,4g
Carboidratos	4,8g	4,4g
Gordura	3,5g	3,8g
Colesterol	14mg	11mg
Fósforo	93mg	111mg
Potássio	152mg	204mg
Magnésio	13mg	14mg
Cálcio	119mg	134mg
Ácido fólico	5mcg	1mcg

Fonte: RODRIGUES, 2010. <http://www.queijosnobrasil.com.br>

2 JUSTIFICATIVA

As infecções diarreicas constituem ainda um grande obstáculo à saúde pública. Em países desenvolvidos, contribuem primariamente para a morbidade, porém, em países em desenvolvimento são responsáveis, sobretudo, pelo alto índice de mortalidade, especialmente em crianças abaixo de cinco anos de idade (CHENG *et al.*, 2005; VISWANATHAN *et al.*, 2009). Embora com a terapia de reidratação oral que resultou na redução da mortalidade por diarreia que leva à desidratação, as taxas globais de morbidade por diarreia não têm diminuído (KOSEK *et al.*, 2003). Segundo a Organização Mundial da Saúde, 1999, as doenças diarreicas foram responsáveis por altos índices de anos de vida saudável perdidos por morte prematura ou incapacitação, *disability associated life years* (DALY) (WHO, 2000). No Brasil, de todos os óbitos infantis registrados no período de 1985 – 1987, a diarreia foi responsável por 17,3%, entretanto no período de 2003 – 2005 respondeu por 4,2% de todos os óbitos (VICTORA, 2009). Uma das Metas de Desenvolvimento do Milênio é reduzir em 2/3 a mortalidade de crianças menores de 5 anos entre 1990 e 2015 (UNICEF, 2008).

Nos países em desenvolvimento, as bactérias continuam sendo os principais patógenos causadores das doenças diarreicas, seguidas por vírus e parasitas. A *Escherichia coli enteroagregativa* – EAEC, um patógeno que inicialmente estava associado à diarreia persistente em crianças de países em desenvolvimento é considerada como uma das principais causas de diarreia de viajantes (HARRINGTON *et al.*, 2005).

Os macronutrientes (carboidratos, proteínas e ácidos graxos) são essenciais para a manutenção e crescimento tecidual. De igual importância é o papel dos micronutrientes (vitaminas e minerais) no controle da progressão do ciclo celular (BONHSACK *et al.*, 2004).

Uma maior compreensão dos efeitos da modulação de micronutrientes e do leite de cabra transgênico contendo lisozima humana nas lesões intestinais causados por microorganismos, como EAEC, auxiliará na redução dos efeitos lesivos e abrirá perspectivas para a implantação de melhorias para a saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Para uma melhor compreensão da patogenia das infecções intestinais, avaliar alterações causadas pela cepa bacteriana da *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) 042 em cultura de células epiteliais intestinais IEC-6 (células epiteliais intestinais derivadas de criptas do jejuno de ratos normais) e Caco-2 (células de adenocarcinoma de cólon humano), e o efeito de micronutrientes glutamina, alanil-glutamina, beta-caroteno, zinco e leite caprino transgênico contendo lisozima humana na prevenção das disfunções.

3.2 Objetivos Específicos

Elaborar protocolo com EAEC em cultura de células;

Avaliar o papel modulador da glutamina, alanil-glutamina, β -caroteno, zinco e do leite de cabra transgênico contendo lisozima humana sobre a barreira funcional intestinal *in vitro*, analisando seus efeitos na proliferação, migração, adesão bacteriana, apoptose e necrose em células epiteliais intestinais IEC-6 e Caco-2;

Avaliar os efeitos da cepa EAEC 042 na barreira funcional intestinal *in vitro*, pelo estudo da migração, adesão bacteriana, apoptose e necrose em células epiteliais intestinais IEC-6 e Caco-2;

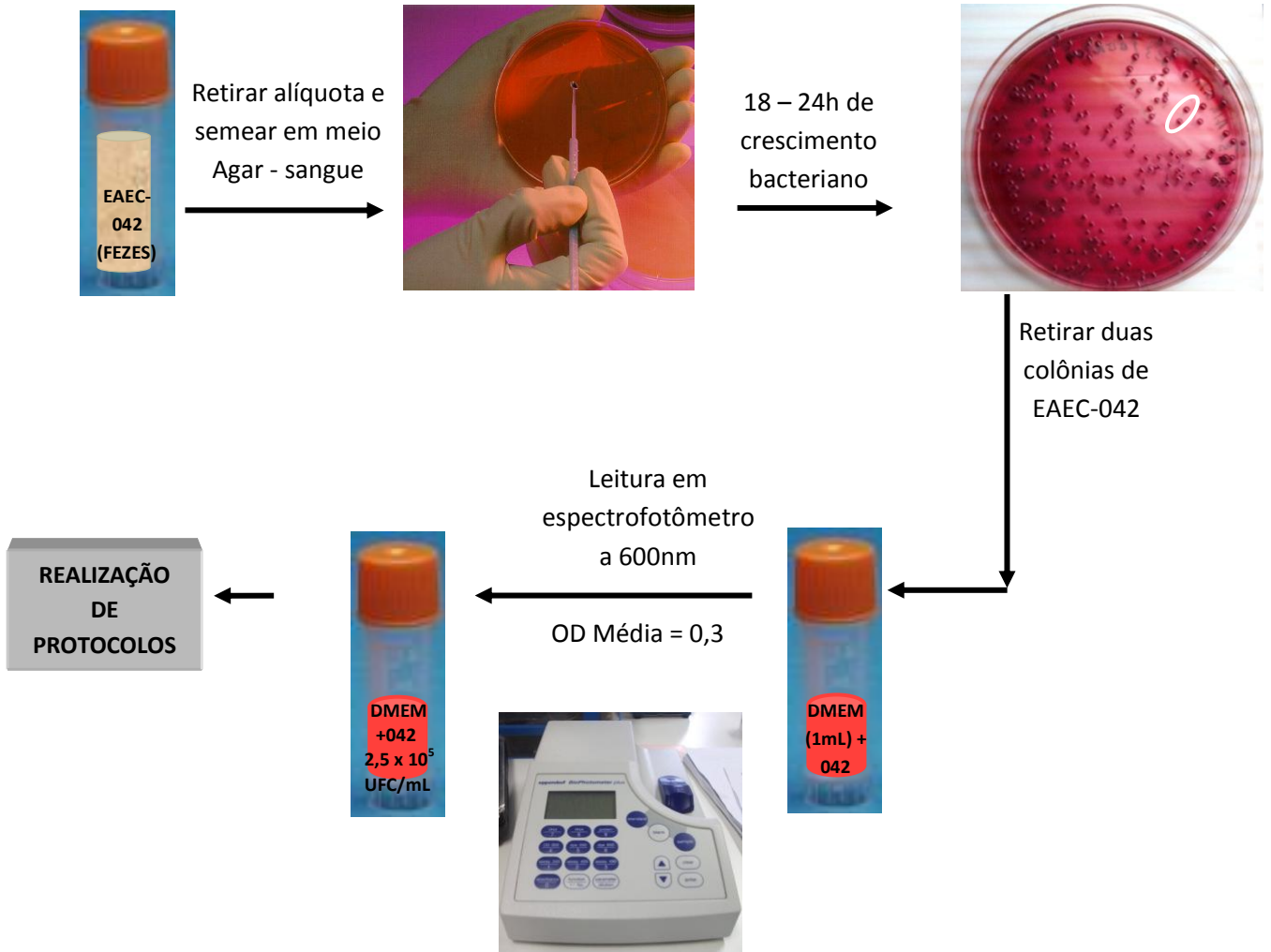
Avaliar o papel modulador da glutamina, alanil-glutamina, β -caroteno, zinco e leite caprino transgênico contendo lisozima humana sob a ação da cepa bacteriana EAEC 042 sobre a barreira funcional intestinal *in vitro*, analisando seus efeitos na migração, adesão bacteriana, apoptose e necrose em células epiteliais intestinais IEC-6 e Caco-2.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepa Bacteriana – *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC-042)

Neste estudo foi realizado utilizando a cepa bacteriana padrão de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) 042 (O44: H18), cedida pelo pesquisador James P. Nataro, da Universidade de Virgínia – USA. A EAEC 042, isolada de uma criança com diarreia em Lima, no Peru, em 1983, é considerada uma cepa padrão capaz de causar diarreia em voluntários (NATARO *et al.*, 1995). Em todos os protocolos, esta bactéria foi cultivada por 18 a 24 horas (MARSHALL, 1995) em meio ágar sangue por técnica microbiológica de esgotamento e, em cada experimento realizado, foram utilizadas inicialmente duas colônias da bactéria diluídas em 1 mL de meio Dulbecco modificado (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY) adequado ao tipo celular adotado e em seguida feita a análise espectrofotométrica relacionando a turbidez com a concentração bacteriana existente. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600nm. A média da leitura obtida foi de 0,288 (n= 30 e desvio padrão de 0,026), dessa forma esta média passou a ser a referência para a padronização da quantidade de bactéria usada nas diluições para os protocolos posteriores (Figura 8).

Figura 8: Processo de preparação da cepa bacteriana EAEC-042 para utilização em experimentos.



4.2 Cultura de Células

Foram empregadas **células epiteliais intestinais derivadas de criptas do jejuno de ratos normais (IEC-6)**, nas passagens de 23 – 30, obtidas da Coleção Americana de Cultura (American Type Culture Collection-ATCC, Rockville, MD) e cultivadas em meio Dulbecco modificado (DMEM, *GIBCO, Grand Island, NY*) com acréscimo de 5% de soro fetal bovino inativado (*GIBCO, Grand Island, NY*), 10 mg de insulina bovina (*SIGMA, St Louis, MO*), 50UI/mL de penicilina (*GIBCO, Grand Island, NY*) e 50 µg/mL de estreptomicina (*GIBCO, Grand Island, NY*). Essa linhagem celular intestinal é usada em ensaios para investigação de reparo de lesão intestinal (McCOMARCK *et al.*, 1992) (Figura 9C).

Figura 9: A. Frasco contendo Meio Essencial Mínimo Modificado Dulbecco – DMEM; B. Frasco de cultura para manutenção de células; C. Células IEC-6 (Nº ATCC CRL 1592TM).

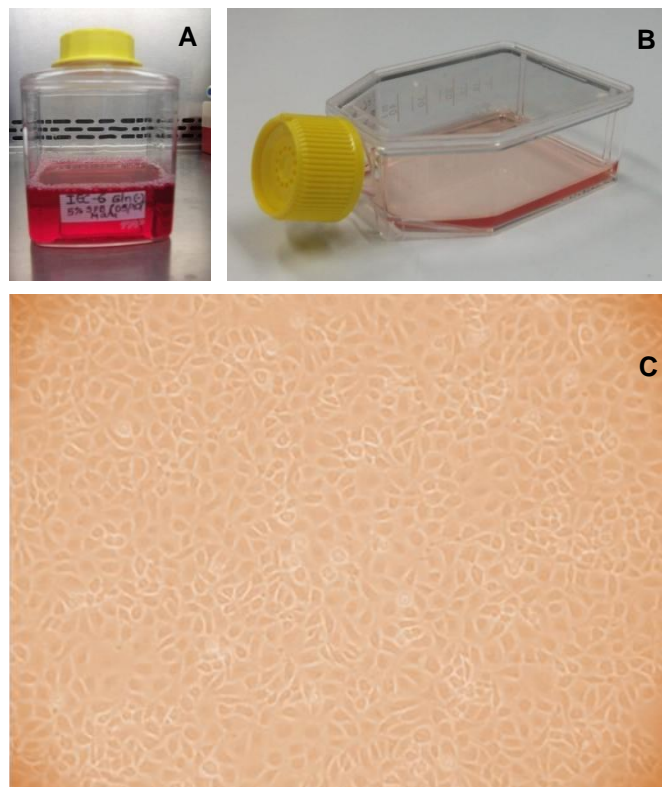
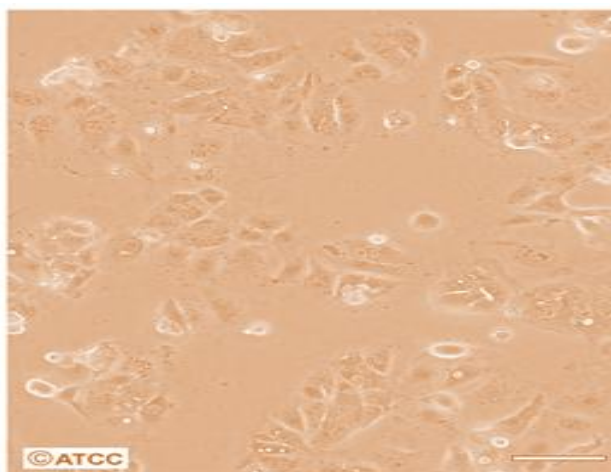


Imagem em microscopia óptica invertida com aumento de 100X.

As células de adenocarcinoma de cólon humano (CACO-2), nas passagens de 45 – 49, obtidas da ATCC (Rockville, MD, USA) incubadas a 37°C, em 5% de CO₂ e 95% de O₂ e cultivadas em meio Dulbecco modificado (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY) contendo 10% de soro bovino fetal, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, além de aminoácidos não-essenciais (GIBCO, Grand Island, NY) e piruvato de sódio (GIBCO, Grand Island, NY). A célula CACO-2 é uma linhagem celular frequentemente empregada como modelo de epitélio intestinal, pois formam monocamadas celulares diferenciadas mimetizando células do topo da cripta e da base dos vilos intestinais (MARIADSON *et al.*, 2000) (Figura 10).

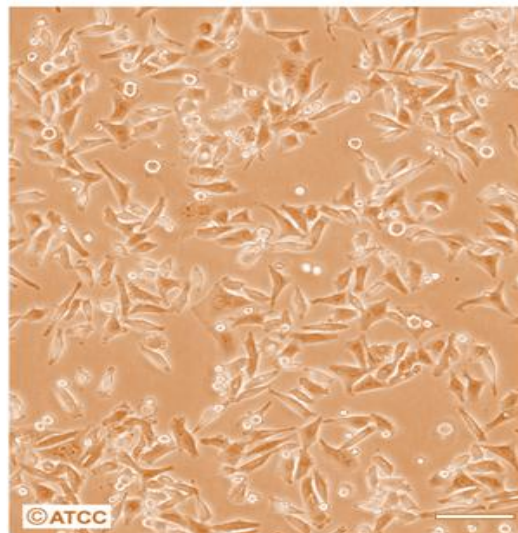
Figura 10: Células CACO-2 (Nº ATCC HTB-37).



Fonte: <http://www.atcc.org/Attachments/1985.jpg>

Foram também usadas **células de carcinoma de laringe humana, células HEp-2, nas passagens de 8 e 9**. Obtidas da ATCC (*Rockville, MD, USA*) incubadas a 37°C, em 5% de CO₂ e 95% de O₂ e cultivadas em meio Essencial Mínimo (MEM) (*GIBCO, Grand Island, NY*) contendo 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Estas células foram usadas no estudo da aderência bacteriana da EAEC 042 (NATARO *et al.*, 1992) (Figura 11).

Figura 11: Células HEp-2 (Nº ATCC CCL-23).



Barra de Escala de 100µm.

Fonte:<http://www.atcc.org/Attachments/1760.jpg>

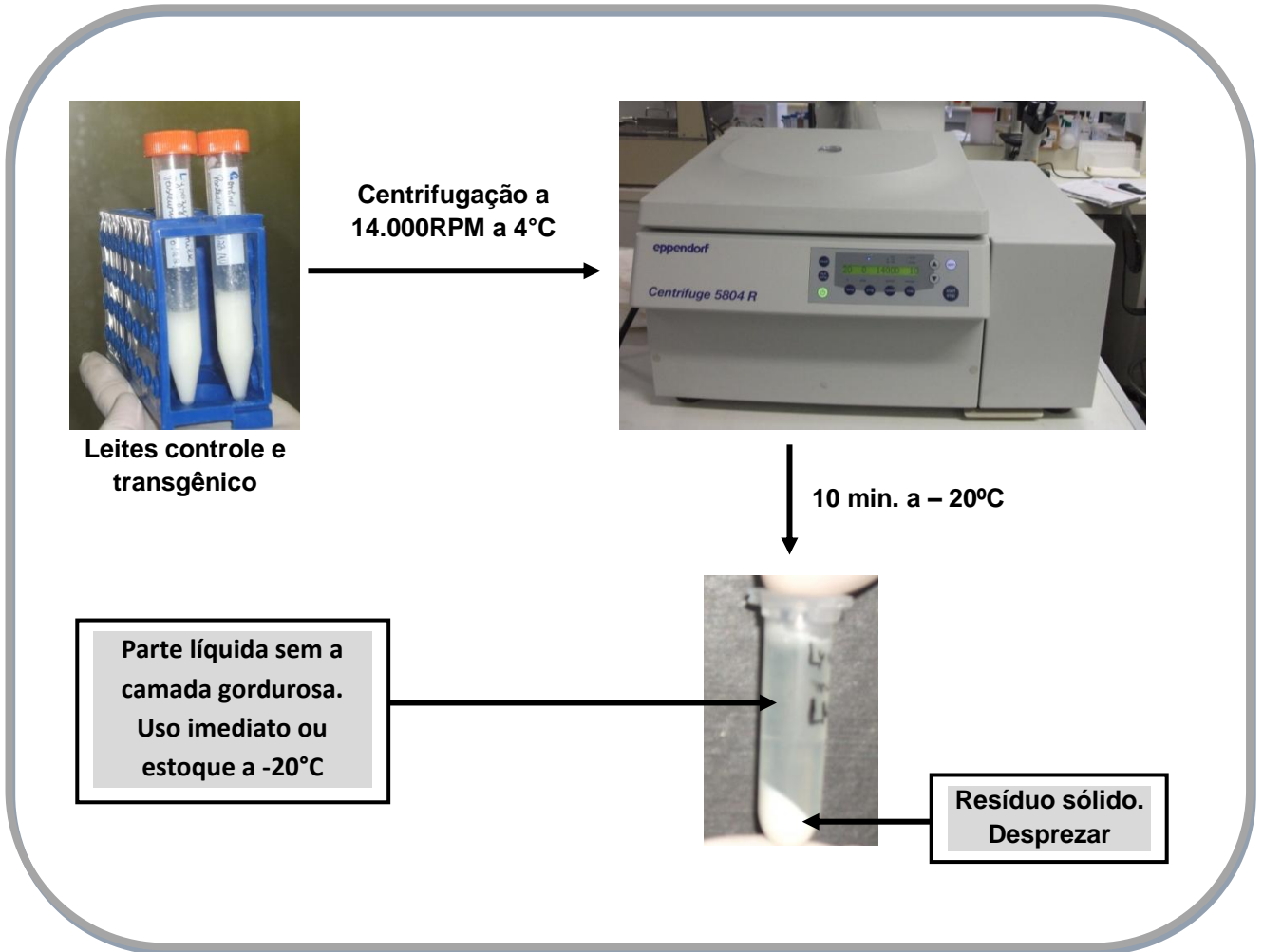
4.3 Leite de Cabra Transgênico Contendo Lisozima Humana

O leite caprino transgênico contendo lisozima humana foi produzido como descrito por Maga *et al.*(2003) e cedidos juntamente com o leite de cabra não transgênico, utilizado como controle, pela pesquisadora colaboradora Norte Americana Elizabeth A. Maga, do Departamento de Ciência Animal da Universidade de Davis, Califórnia, EUA. Embora a lisozima esteja naturalmente presente nos leites bovino (0,13 a 0,16 g/mL), caprino (0,23 a 0,25 g/mL) e humano (400 mg/mL) (CHANDAN *et al.*, 1968), o uso da engenharia genética permite a geração de animais com a capacidade de produção de um leite que expressa uma concentração superior dessa substância. Inicialmente, foi realizada a migração e a adesão bacteriana com os leites controle e transgênico na diluição de 1:5. Para permitir uma mistura homogênea do leite com o meio de cultura foi retirada a camada de gordura do leite; entretanto, os mesmos ensaios foram também feitos sem a remoção da camada gordurosa.

4.3.1 Remoção da Camada Gordurosa do Leite

Para fazer a remoção da camada de gordura do leite fez-se uma centrifugação inicial por 3 (três) minutos a 14.000 RPM a 4°C. Após centrifugação, deixou-se em repouso no freezer a -20°C durante 10 minutos o sobrenadante juntamente com a camada sólida precipitada no fundo do tubo. Em seguida, transferiu-se a parte líquida para outro frasco e foi descartada a parte sólida. Caso não fosse utilizado de imediato, a parte líquida separada era estocada em freezer a -20°C (Figura 12).

Figura 12: Processo de remoção da camada gordurosa do leite

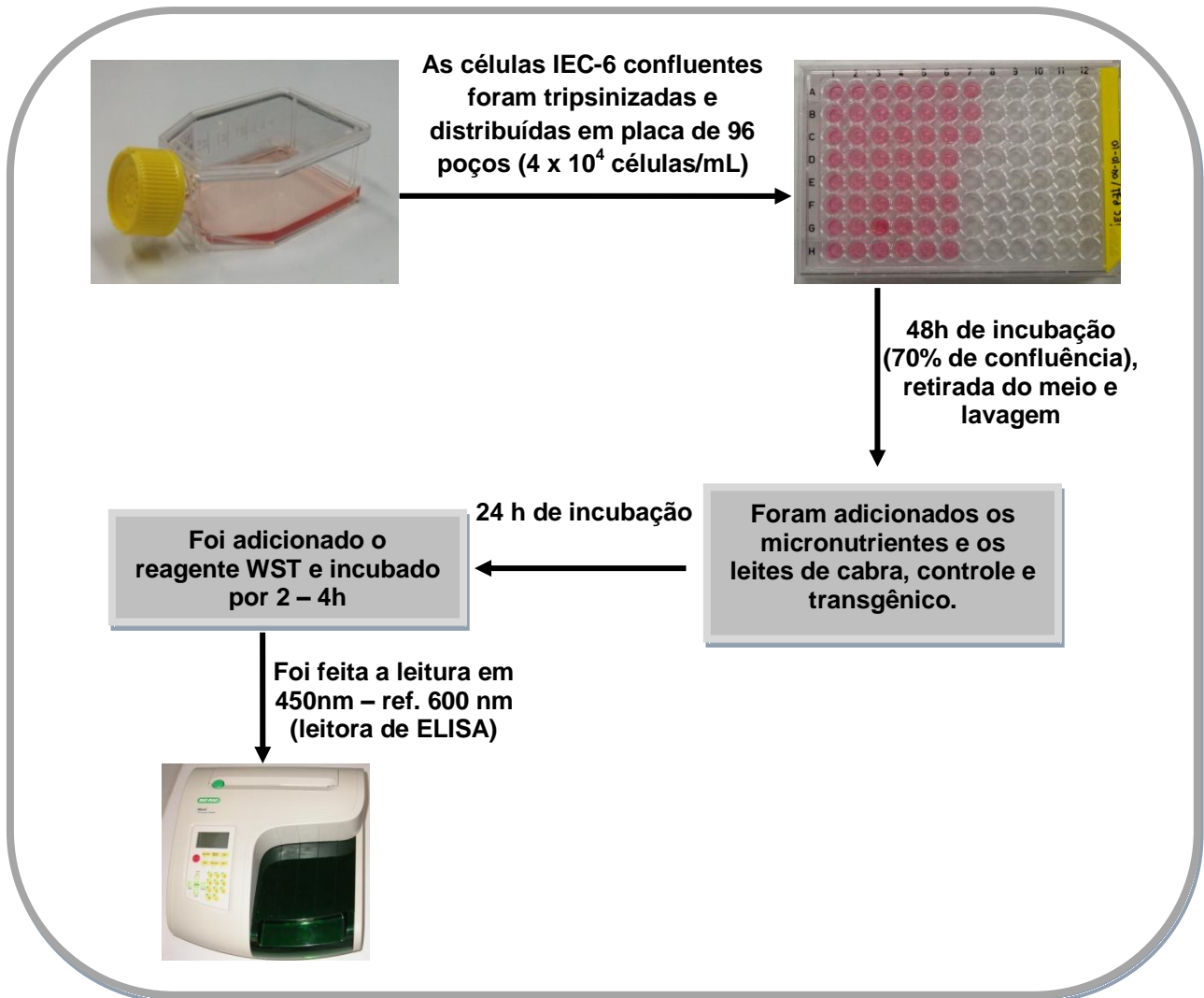


4.4 Proliferação Celular

Para análise da proliferação celular foi utilizada a linhagem celular IEC-6 passagens 23 – 27. Inicialmente, as células foram cultivadas em meio DMEM padrão em frascos de cultura de 25 ou 75cm² e mantidas a 37°C em 5% de CO₂ até que a monocamada esteja com cerca de 90 a 100% de confluência. Em seguida, as células foram tripsinizadas e transferidas para uma placa contendo 96 poços em uma concentração de $4,0 \times 10^4$ células/mL (BRITO *et al.*, 2005a). As células foram incubadas por 48 horas a 37°C em 5% de CO₂ para atingirem cerca de 70% de confluência. A seguir, o meio foi completamente removido, os poços lavados com o meio padrão e, a cada poço, foram adicionados 100 uL dos micronutrientes glutamina (0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM), alanil-glutamina (0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM), β -caroteno (0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 uM), zinco (0,3; 3,0; 30; 100 e 300 uM) e leite de cabra controle e transgênico nas diluições de 1:5; 1:10; 1:15; 1:20 e 1:40 preparados em meio livre de glutamina. A proliferação celular foi analisada somente na ausência da bactéria, pois devido à intensa proliferação bacteriana o valor da densidade óptica obtido é superior à linearidade permitida pelo equipamento de leitura (Leitora de Elisa). Foi feita uma incubação de 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. Em seguida, para avaliar a proliferação das células epiteliais intestinais, foi adicionado 10 uL do reagente de proliferação, um composto tetrazólico WST e incubado por 2 – 4 horas. Este composto é clivado à formazan por enzimas celulares. O aumento do número de células viáveis resulta no aumento da atividade da dehidrogenase mitocondrial na amostra. Este aumento da atividade enzimática leva a um aumento de formazan formado, o qual é proporcional ao número de células metabolicamente ativas na cultura.

Após incubação, a medida da absorbância das amostras, assim como do branco (100 μ L de meio sem a adição de células) foi feita com uma leitora de Elisa. O comprimento da absorbância do formazan produzido está entre 420 – 480 nm, sendo a leitura feita em 450 nm com referência de comprimento de onda maior que 600nm (Figura 13).

Figura 13: Processo de proliferação celular



4.5 MIGRAÇÃO CELULAR

Para análise da migração celular foi usada a linhagem celular intestinal IEC-6, nas passagens de 23 – 27. Inicialmente, as células foram cultivadas em meio Dulbecco modificado (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY) em frascos de cultura de 25 ou 75cm² e mantidas a 37°C em 5% de CO₂ até que a monocamada esteja com

cerca de 90 a 100% de confluência. Em seguida, as células foram tripsinizadas e transferidas para uma placa contendo 12 poços em uma concentração de $2,4 \times 10^5$ células/mL (BRITO *et al.*, 2005a). Depois de 72h, foi adicionado a cada poço 5 ug/mL da substância anti-proliferativa, mitomicina C e incubadas por 15 a 30 minutos. Após a incubação, o meio foi retirado, as células lavadas com meio padrão e foram adicionados a cada poço 500 uL deste meio. Em seguida, foi feito um risco na monocamada com uma lâmina estéril, de modo a arrastar as células para a borda do poço. Foram lavadas duas vezes com o próprio meio (500 uL/ poço) e incubadas com meio sem glutamina suplementado com glutamina (0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM), alanil-glutamina (0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM), β -caroteno (0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 uM), zinco (0,3; 3,0; 30; 100 e 300 uM) e leite de cabra controle e transgênico nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40 na presença ou ausência das cepas padrões 042 de EAEC na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. As células intestinais foram incubadas por 24 horas, observadas em microscópio invertido (*aus Jena, Germany*) em um aumento de 10x e fotografadas. O número de células na linha de migração mais longa foi contado de acordo com a área de superfície do poço da placa (adaptado de McCORMACK *et al.*, 1992 e BRITO *et al.*, 2005a) (Figura 14). A contagem das células em migração foi efetuada com o programa *Image pro-plus* (*Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD*). Como as bactérias ficaram em suspensão no meio causando turvação intensa, antes de serem fotografadas, as células foram lavadas com tampão HBSS (137 mmol/ L NaCl, 5,36 mmol/ L KCl, 1,67 mmol/ L CaCl₂, 1 mmol/ L MgCl₂, 1,03 mmol/ L MgSO₄, 0,44 mmol/ L KH₂PO₄, 0,34 mmol/ L Na₂HPO₄ e 5,6 mmol/ L de glucose) (ROSELLI *et al.*, 2003) e em seguida adicionado meio DMEM padrão para IEC-6 de forma a retirar as bactérias suspensas no meio tornando mais fácil a contagem celular para avaliar os efeitos dos micronutrientes e leite.

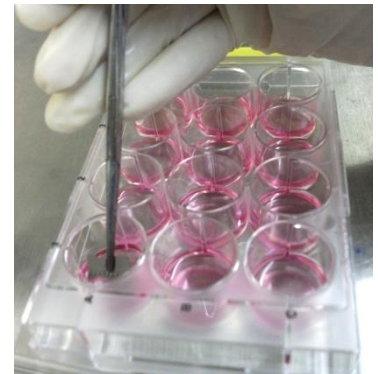
Figura 14: Processo de migração celular. Migração em 0h (A) e em 24h (B)



As células IEC-6 confluentes foram tripsinizadas e distribuídas em placa de 12 poços ($2,4 \times 10^5$ células/mL)



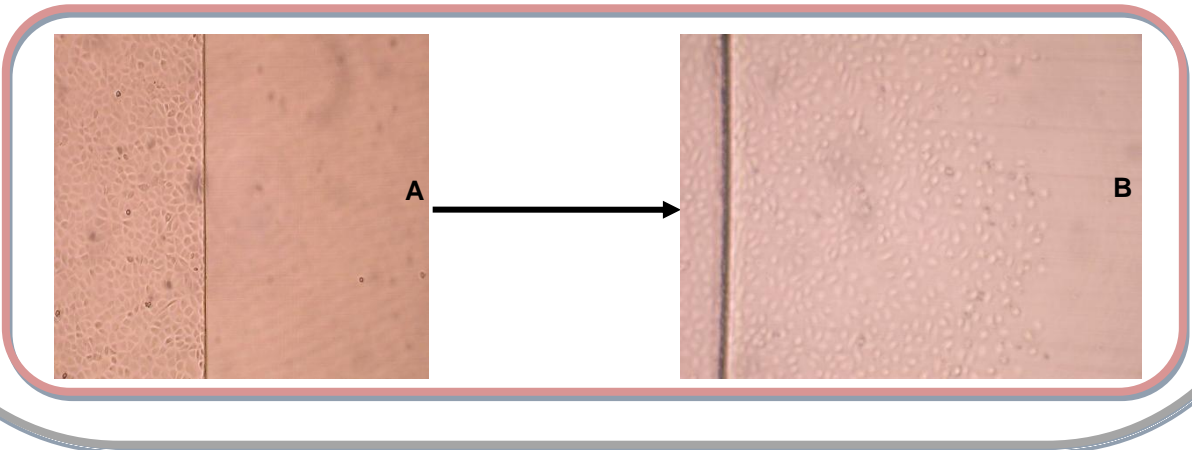
72h de incubação com Mitomicina C ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$). Lavagem. Raspagem das células com lâmina para migração celular



Incubação com micronutrientes e leite por 24 h associados ou não com EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$)



Fotografar as imagens da migração celular e efetuar contagem de células



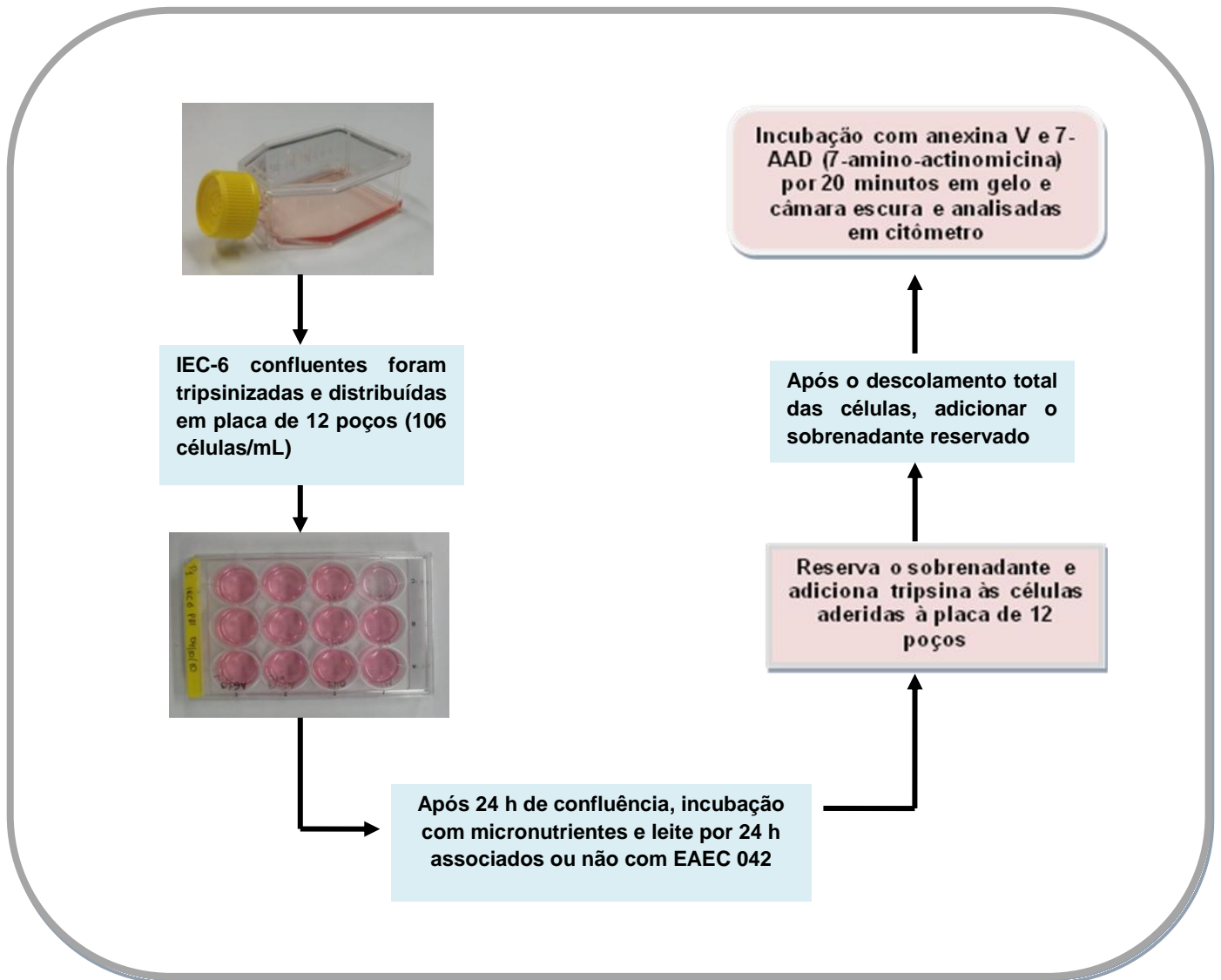
Migração em 0h (A) e em 24h (B)

4.6 CITOMETRIA DE FLUXO

Para análise da viabilidade, apoptose e necrose celular através da citometria de fluxo, foi utilizada a linhagem celular intestinal IEC-6. Inicialmente, as células foram cultivadas em meio Dulbecco modificado (DMEM, *GIBCO, Grand Island, NY*) em frascos de cultura de 25 ou 75 cm² e mantidas a 37°C em 5% de CO₂ até que a monocamada esteja com cerca de 90 a 100% de confluência. Em seguida, as células foram tripsinizadas e transferidas para uma placa contendo 12 poços em uma concentração de 10⁶ células/mL (BRITO *et al.*, 2005b) e incubadas por 24 horas. Depois desse período, o meio foi completamente removido, os poços lavados com o meio padrão e acrescentados 1 mL dos micronutrientes glutamina (3,0; 10 e 30 mM), alanil-glutamina (3,0; 10 e 30 mM), β-caroteno (3,0; 10 e 30 uM), zinco (30; 100 e 150 uM) e leite de cabra controle ou transgênico nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40, todos preparados em meio livre de glutamina, na presença ou ausência da cepa bacteriana EAEC-042 na concentração de 2,5 x 10⁵ UFC/ mL. Foi feita uma incubação de 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e mantido a temperatura ambiente. Às células aderidas foram adicionados 300 µL de tripsina e a placa incubada em estufa de CO₂ até o total descolamento das células aderidas. A seguir, às células foi adicionado o sobrenadante reservado inicialmente. A suspensão de células (135 µL) foi incubada com 5 µL de AAD e 10 µL de *Annexin-V-PE* do kit Guavanexin. Depois de 20 minutos de incubação, em gelo picado e no escuro, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (*EasyCyte, Guava Technologies, EUA*) com os filtros vermelho e amarelo (Figura 15).

A externalização do fosfolípido de membrana, a fosfatidilserina, é um dos primeiros eventos a ocorrer quando a célula entra em apoptose. Esta análise por citometria de fluxo permite diferenciar células viáveis, apoptóticas e necróticas pela coloração diferencial por fluorescência. A detecção das células apoptóticas é feita pela ligação da anexina-V conjugada a PE com a fosfatidilserina externalizada (fluorescência amarela). As células necróticas são coradas pelo corante 7AAD (7-amino-actinomicina), que emitem fluorescência vermelha e penetra nas membranas celulares desintegradas e se ligam ao núcleo. As células sem marcação pelos corantes são viáveis, as de coloração verde são consideradas apoptóticas e aquelas positivas para os dois corantes são consideradas necróticas.

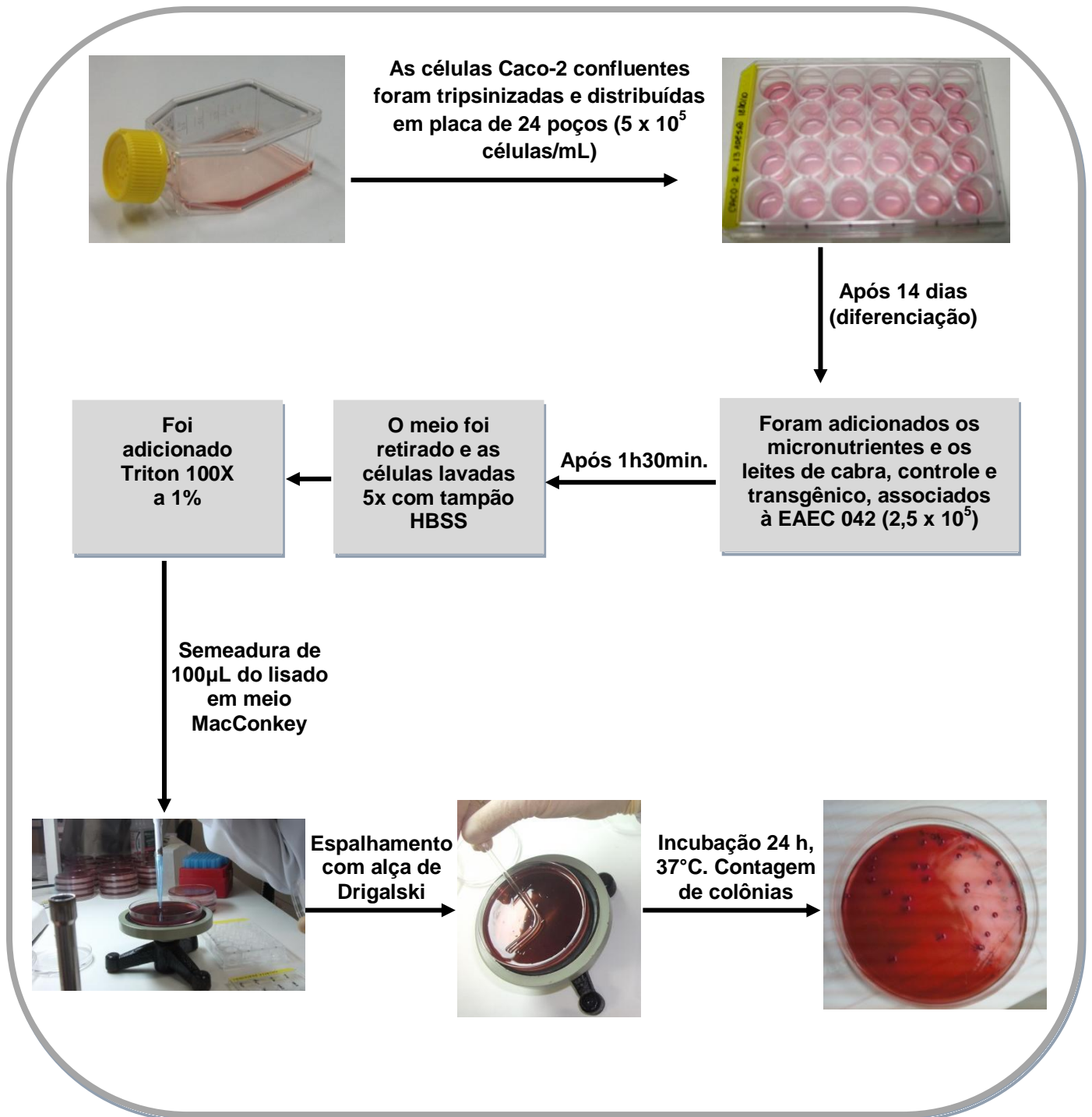
Figura 15: Análise de viabilidade, apoptose e necrose celular por citometria de fluxo



4.7 Adesão Bacteriana

Células Caco-2 na concentração de 5×10^5 células/ poço, em placas de 24 poços com 1 mL de meio DMEM padrão foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de O₂, com troca de meio, três vezes por semana. Após período de diferenciação, que leva em torno de 14 dias, o meio foi trocado por um novo meio livre de glutamina. Em seguida, os micronutrientes glutamina (0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM), alanil-glutamina (0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM), β-caroteno (0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 μM), zinco (0,3; 3,0; 30; 100 e 300 μM) e leite de cabra controle ou transgênico nas diluições de 1:5; 1:10; 1:15; 1:20 e 1:40 foram adicionados na presença da cepa padrão EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. Depois de 18 a 24 horas de crescimento bacteriano e incubadas por uma hora e trinta minutos (1h:30), tempo definido por experimentos prévios para construir uma curva tempo resposta em adesão bacteriana da EAEC-042, mostrado na figura 21 nos resultados. Após a incubação, as bactérias não aderidas foram removidas por lavagem com o tampão HBSS (137 mmol/ L NaCl, 5,36 mmol/ L KCl, 1,67 mmol/ L CaCl₂, 1 mmol/ L MgCl₂, 1,03 mmol/ L MgSO₄, 0,44 mmol/ L KH₂PO₄, 0,34 mmol/ L Na₂HPO₄ e 5,6 mmol/ L de glucose). Em seguida, as células foram lisadas com Triton-X 100 a 1% e as bactérias viáveis foram quantificadas 24 -48 horas por semeadura de 100 uL do lisado em placas contendo o meio MacConkey (ROSELLI *et al.*, 2003). As placas foram consideradas adequadas para contagem quando havia entre 25 a 300 colônias. A figura 16 mostra a concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, adequada para o protocolo de adesão bacteriana. E esta foi também utilizada a outros protocolos neste estudo.

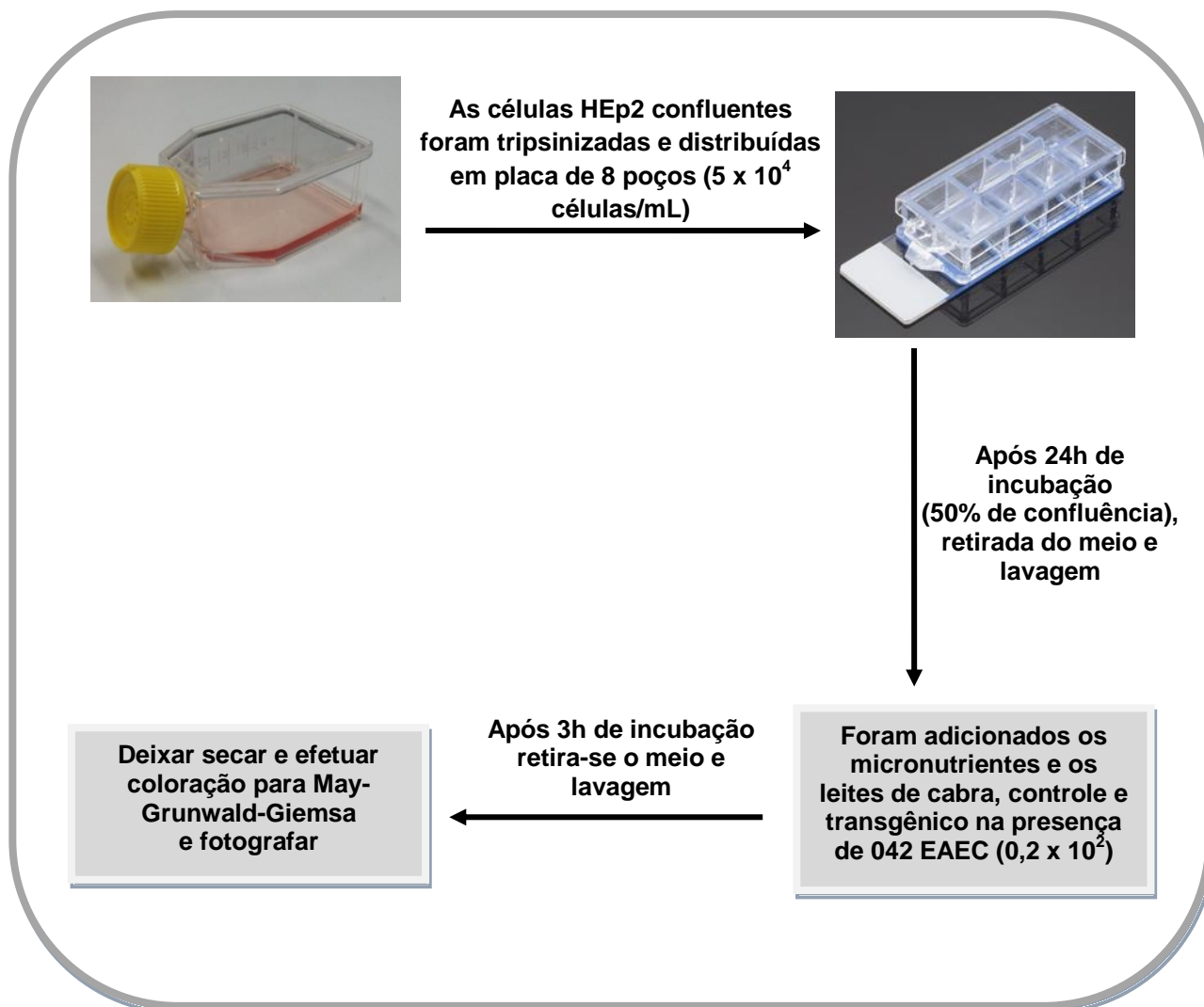
Figura 16: Processo de adesão celular



4.8 Padrão de Aderência Bacteriana

Para análise do padrão de aderência bacteriana foi usada a linhagem celular intestinal HEp-2, passagem 8. Inicialmente, as células foram incubadas a 37°C, em 5% de CO₂ e 95% de O₂ e cultivadas em meio Essencial Mínimo (MEM)(GIBCO, *Grand Island, NY*) contendo 10% de soro fetal bovino. Em seguida, as células foram tripsinizadas e transferidas para lâminas de vidro apropriadas contendo 8 poços em uma concentração de 5,0 x 10⁴ células/mL. Após 24 horas, com a monocamada em torno de 50% de confluência, o meio foi completamente removido e adicionado a cada poço 400 uL dos micronutrientes glutamina 10 mM, alanil-glutamina 10 mM, β-caroteno 10 uM, zinco 30 uM e leite de cabra controle ou transgênico nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40 preparados em meio livre de glutamina. Foi feita uma incubação de 3 horas a 37°C em 5% de CO₂ na presença de EAEC-O42 na concentração de 0,2 x 10² UFC/mL. A seguir, depois de feitas duas lavagens com o meio padrão para HEp-2, as lâminas foram coradas pelo May-Grunwald Giemsa. As células bacterianas aderidas às células HEp-2 foram fotografadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (1000X) (Figura 17).

Figura 17: Processo para realização do padrão de aderência bacteriana



4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados em triplicada através de média \pm E.P.M, usando o teste não paramétrico de análise de múltiplas variáveis ANOVA, seguido por correção de Bonferroni. Embora, os dados estatísticos tenham sido elaborados entre os diversos grupos estudados, neste estudo foram mostrados apenas aqueles entre concentrações e controle utilizado. O programa *GraphPad Prism software* versão 4.01 para *Windows* foi utilizado para as análises. O nível de significância de 5% foi adotado.

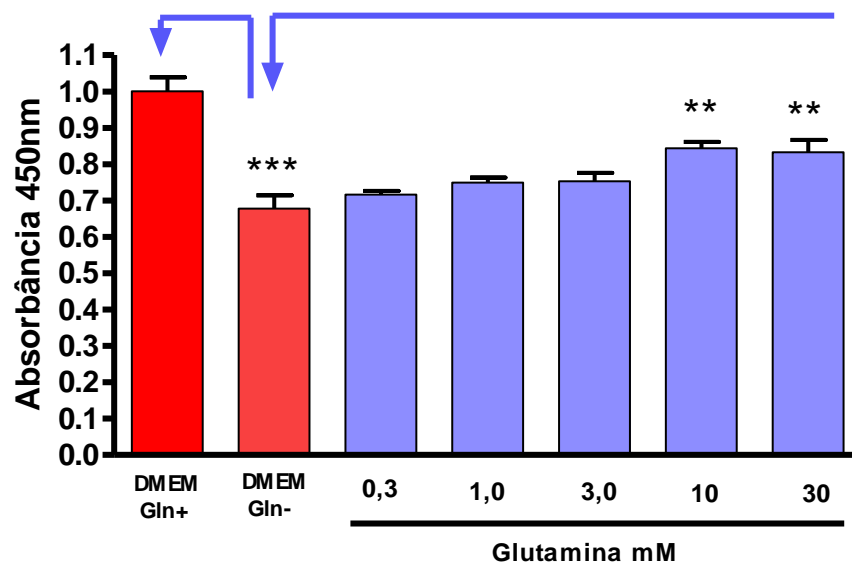
5 RESULTADOS

5.1 Análise da Glutamina (0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM)

5.1.1 Proliferação Celular

A figura 18 mostra a análise da proliferação celular em células IEC-6 depois de 24 horas de incubação com glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM. A proliferação celular no meio DMEM livre de glutamina (DMEM Gln-) mostrou-se significativamente reduzida em relação ao meio DMEM com glutamina (DMEM Gln+) ($p < 0,001$). Nota-se aumento significativo na proliferação quando 10 mM e 30 mM de glutamina foram adicionados no meio livre de glutamina ($p < 0,01$) comparados ao controle DMEM livre de glutamina (DMEM Gln-), mas não nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0 mM.

Figura 18: Proliferação celular depois de 24 horas de incubação com glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM.



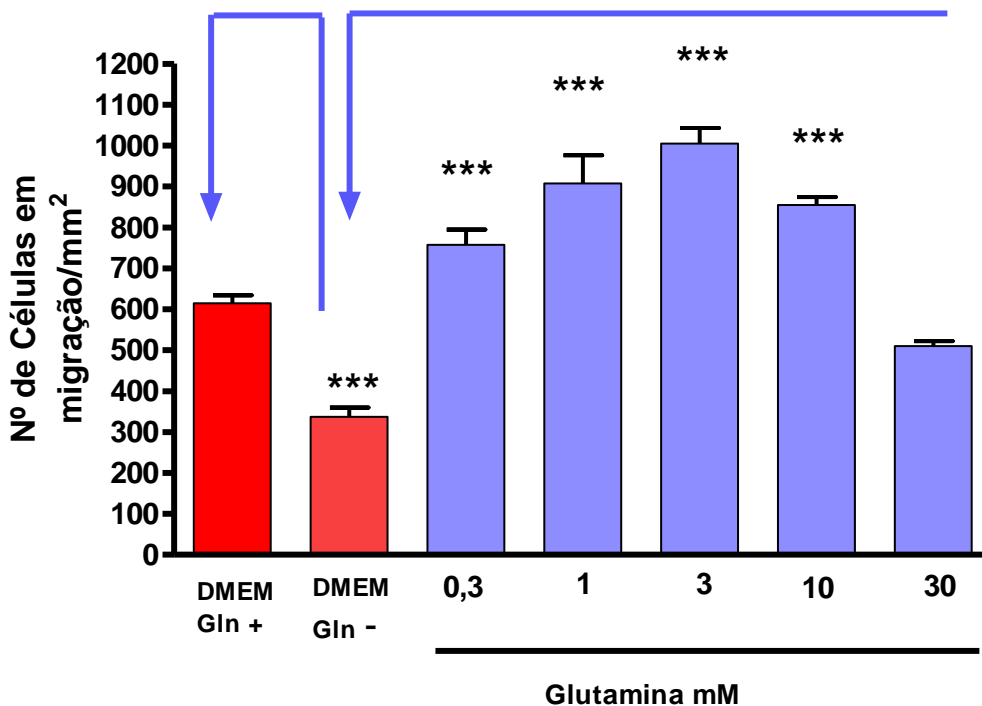
Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. DMEM Gln- vs DMEM Gln+ / Glutamina mM vs DMEM Gln- .

5.1.2 MIGRAÇÃO CELULAR

5.1.2.1 Migração na Ausência da Cepa Bacteriana EAEC 042

A figura 19 mostra o ensaio de migração celular depois de 24 horas de incubação com Glutamina nas concentrações de 0,3; 1; 3; 10 e 30 mM. A migração celular no meio DMEM livre de glutamina (DMEM Gln-) mostrou-se significativamente reduzida em relação ao meio DMEM com glutamina (DMEM Gln+) ($p < 0,001$). Nota-se aumento significativo da migração celular nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0 e 10 mM ($p < 0,001$) de Glutamina quando comparado ao meio livre de glutamina. Não foi observada diferença na concentração de 30 mM.

Figura 19. : Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com Glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM em meio DMEM sem glutamina.

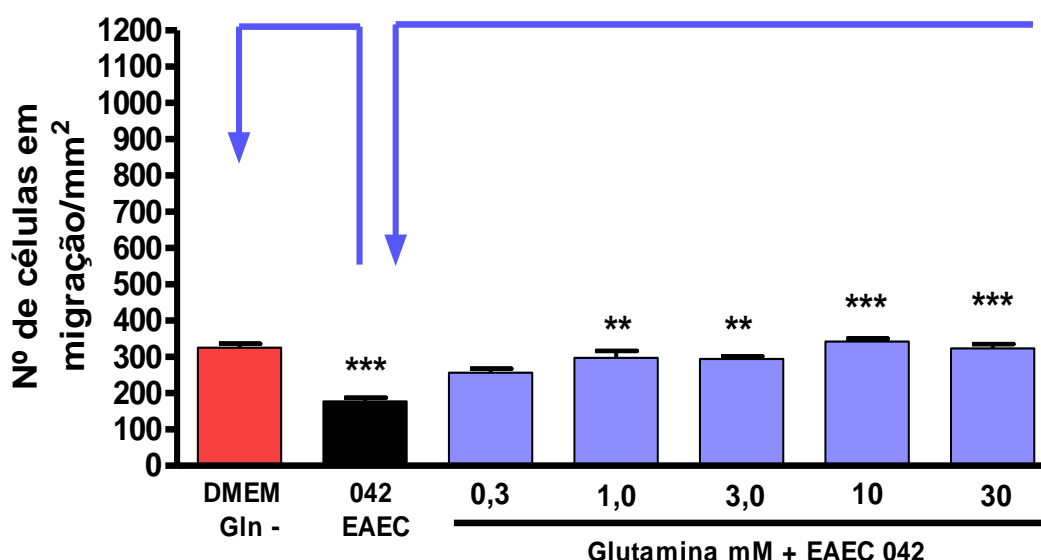


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (***) $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. DMEM Gln- vs DMEM Gln+ / Glutamina mM vs DMEM Gln-.

5.1.2.2 Migração na Presença da Cepa Bacteriana EAEC 042

A figura 20 mostra o ensaio de migração celular depois de 24 horas de incubação da cepa bacteriana EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL na presença de Glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM. Nota-se redução significativa na migração quando as células expostas à cepa bacteriana EAEC-042 ($p < 0,001$) foram comparadas com as células em meio DMEM livre de Glutamina (Gln -) e aumento progressivo da migração celular na presença de Glutamina, na medida em que houve aumento das concentrações de Glutamina de 1,0 e 3,0 e de 10 e 30 mM ($p < 0,001$). Não foi observada diferença significativa na concentração de 0,3 mM.

Figura 20. Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) e adição de Glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM em meio DMEM sem glutamina.



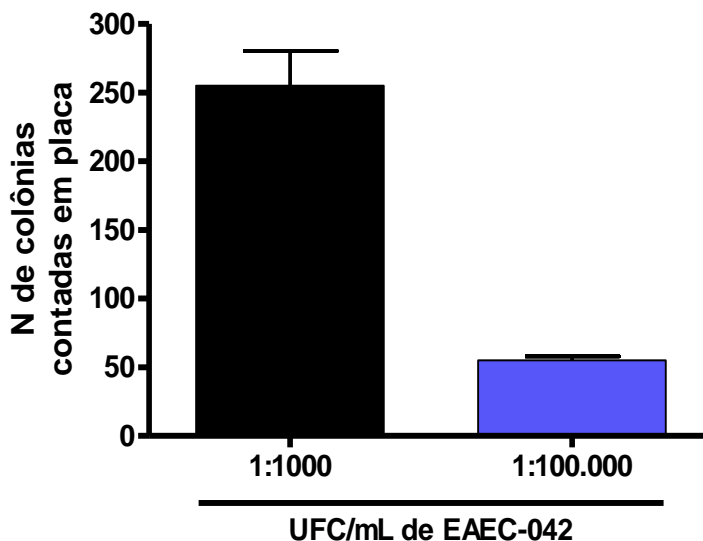
Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. EAEC-042 vs DMEM Gln+ / Glutamina mM + EAEC-042 vs EAEC-042.

5.1.3 Adesão Bacteriana

5.1.3.1 Preparação do Inóculo de EAEC-042

As placas adequadas para contagem devem ter entre 25 a 300 colônias, por esse motivo, após experimentos realizados com concentrações diferentes da bactéria EAEC-042, os dados apresentados na figura 21 mostram que a concentração da bactéria escolhida para experimentos foi com a diluição de 1:1000 (10^{-3}), equivalente a $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, pois a concentração com a diluição de 1:100.000 (10^{-5}) apresentou um número reduzido de colônias. Da mesma forma, pode-se concluir que com uma concentração maior que $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, o número de colônias por placa para contagem seria superior ao valor adequado para contagem. Esta concentração bacteriana foi utilizada para os demais experimentos.

Figura 21: Concentração de EAEC-042 na contagem de colônias em placas de MacConkey utilizado na adesão bacteriana.

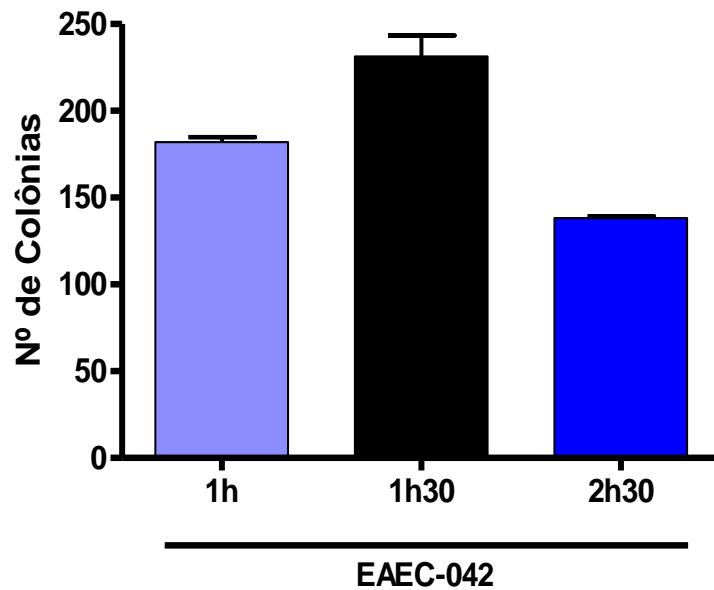


A concentração de escolha para os ensaios foi com a diluição de 1:1000 (10^{-3}), equivalente a $2,5 \times 10^5$ UFC/ mL

5.1.3.2 Curva tempo-resposta usada no protocolo de adesão bacteriana de EAEC-042

O tempo de escolha para análise da adesão bacteriana da cepa EAEC-042 às células Caco-2 no ensaio de adesão quantitativa foi o de 1 hora e 30 minutos como mostrado na figura 22.

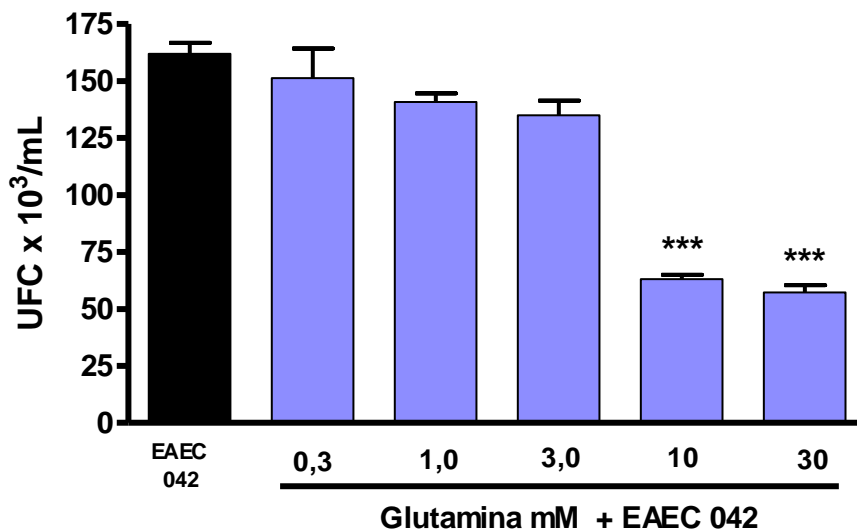
Figura 22: Curva tempo resposta EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL.



Ensaio de adesão bacteriana.

A figura 23 mostra a adesão bacteriana em células Caco-2 depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL na dependência das concentrações de Glutamina de 0,3; 1; 3; 10 e 30 mM. Nota-se redução significativa na adesão bacteriana nas concentrações de 10 mM e 30 mM ($p < 0,001$) de glutamina, quando comparado à cepa bacteriana EAEC-042 sem adição de glutamina não houve redução significativa da adesão bacteriana nas concentrações de 0,3; 1,0 e 3,0 mM.

Figura 23: Adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) na adição de glutamina nas concentrações 0,3; 1; 3; 10 e 30 mM.

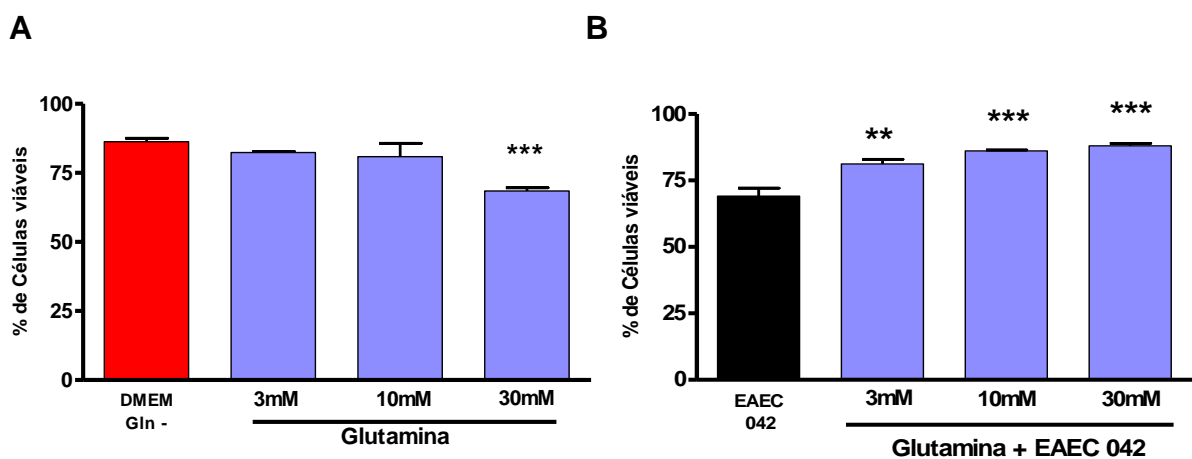


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (***) $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. Glutamina mM + EAEC-042 vs EAEC-042

5.1.4 Citometria de Fluxo

A análise realizada por citometria de fluxo mostrou resultados referentes à porcentagem de células viáveis, em apoptose e em necrose na presença e na ausência da bactéria EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. Na figura 24A, pode-se observar que na concentração de 30 mM houve redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,001$), enquanto nas concentrações iniciais a viabilidade permaneceu inalterada (3 e 10 mM) em relação ao controle com o meio DMEM livre de glutamina. Há redução significativa da viabilidade celular na presença da cepa bacteriana EAEC-042 quando comparadas ao meio DMEM Gln- ($p < 0,001$). Na figura 24B, na presença da cepa bacteriana EAEC-042 houve aumento significativo da porcentagem de células viáveis com a indução da glutamina nos meios de cultura em todas as concentrações analisadas, sendo em 3 mM ($p < 0,01$) e em 10 e 30 mM ($p < 0,001$), quando comparadas ao controle com EAEC-042.

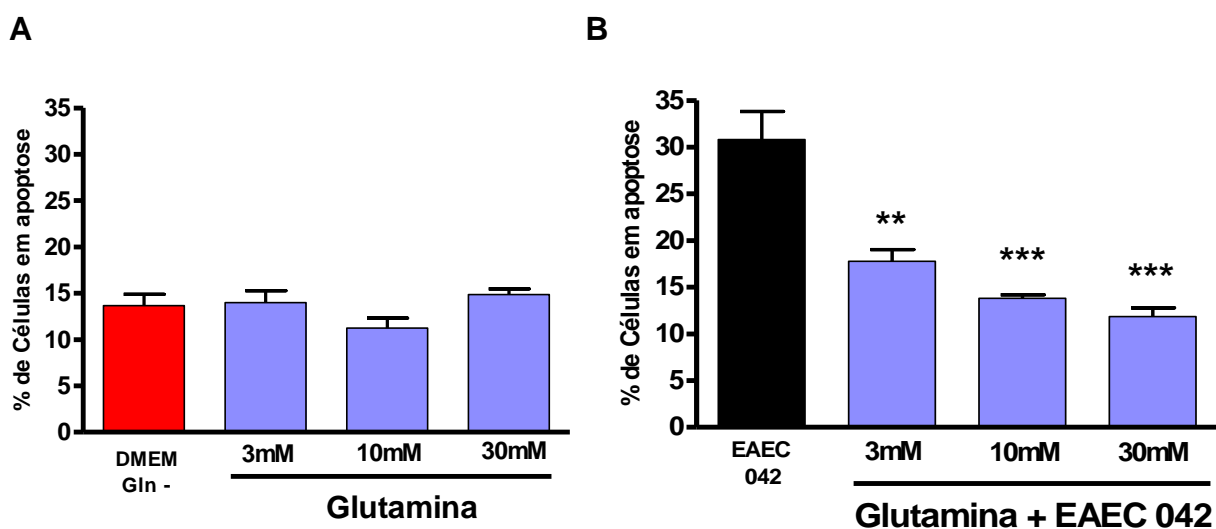
Figura 24: Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células viáveis na adição de glutamina nas concentrações 3; 10 e 30 mM.



A) Na ausência da cepa bacteriana. Glutamina mM vs DMEM Gln- e **B)** Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL) Glutamina mM vs EAEC-042. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

Na figura 25A, nota-se que independentemente da concentração, a glutamina não alterou significativamente em relação a apoptose celular. Por outro lado, houve aumento significativamente na apoptose celular na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($p < 0,001$) quando comparado com o controle em meio DMEM livre de glutamina. No entanto, na adição de glutamina, observou-se redução significativa da apoptose causada pela bactéria nas concentrações de 3 mM ($p < 0,01$) e em 10 e 30 mM ($p < 0,001$).

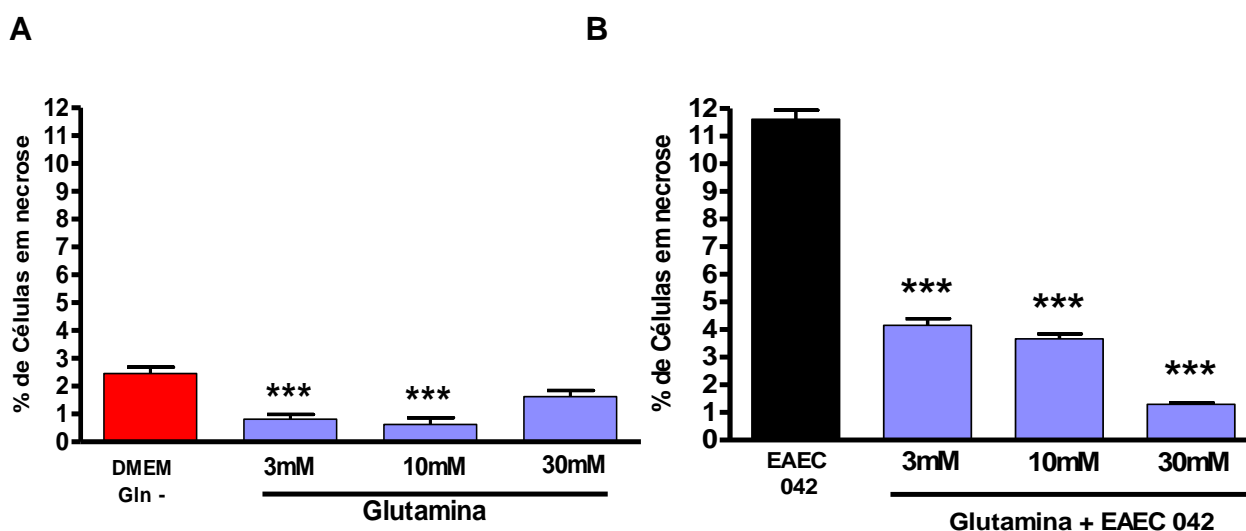
Figura 25: Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem de células em apoptose nas concentrações de glutamina de 3; 10 e 30 mM.



A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. Glutamina mM vs DMEM Gln- e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL). Glutamina mM vs EAEC-042. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

A figura 26A mostra redução significativa ($p < 0,001$) da necrose celular quando a glutamina nas concentrações iniciais de 3 e 10 mM, foi acrescentada ao meio de cultura sem glutamina. Houve aumento significativo da necrose celular na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($p < 0,001$) em comparação ao controle com meio DMEM livre de glutamina. A figura 26B mostra que com a adição de glutamina em todas as concentrações foi observada redução significativa da necrose celular ($p < 0,001$).

Figura 26: Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em necrose depois de acrescentar glutamina nas concentrações de 3; 10 e 30 mM.



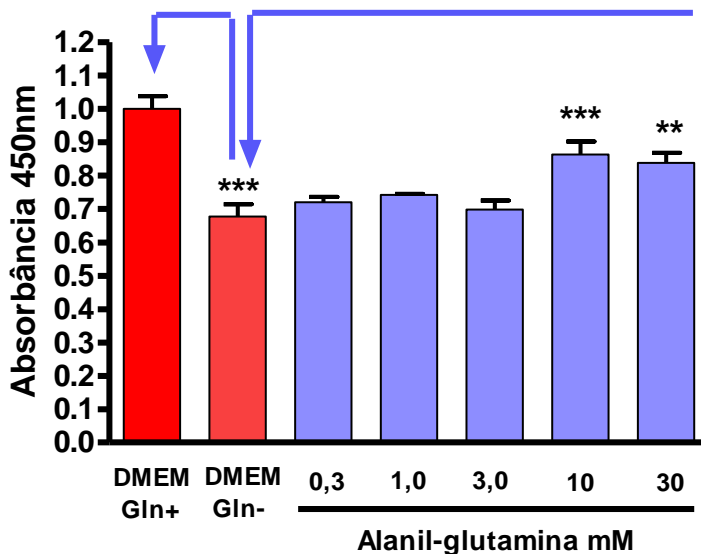
A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. Glutamina mM vs DMEM Gln- e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL). Glutamina mM vs EAEC-042. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (***) $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

5.2 Análise da Alanil - Glutamina (0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM)

5.2.1 Proliferação Celular

A figura 27 mostra a análise da proliferação celular em células IEC-6 depois de 24 horas de incubação com alanil-glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM. A proliferação celular no meio DMEM livre de glutamina (DMEM Gln-) mostrou-se significativamente reduzida em relação ao meio DMEM com glutamina (DMEM Gln+) ($p < 0,001$). Nota-se aumento significativo na proliferação quando 10 mM ($p < 0,001$) e 30 mM ($p < 0,01$) de alanil-glutamina foram adicionados no meio livre de alanil-glutamina, mas não nas concentrações de 0,3; 1,0 e 3,0 mM.

Figura 27. Proliferação celular depois de 24 horas de incubação com alanil-glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM.

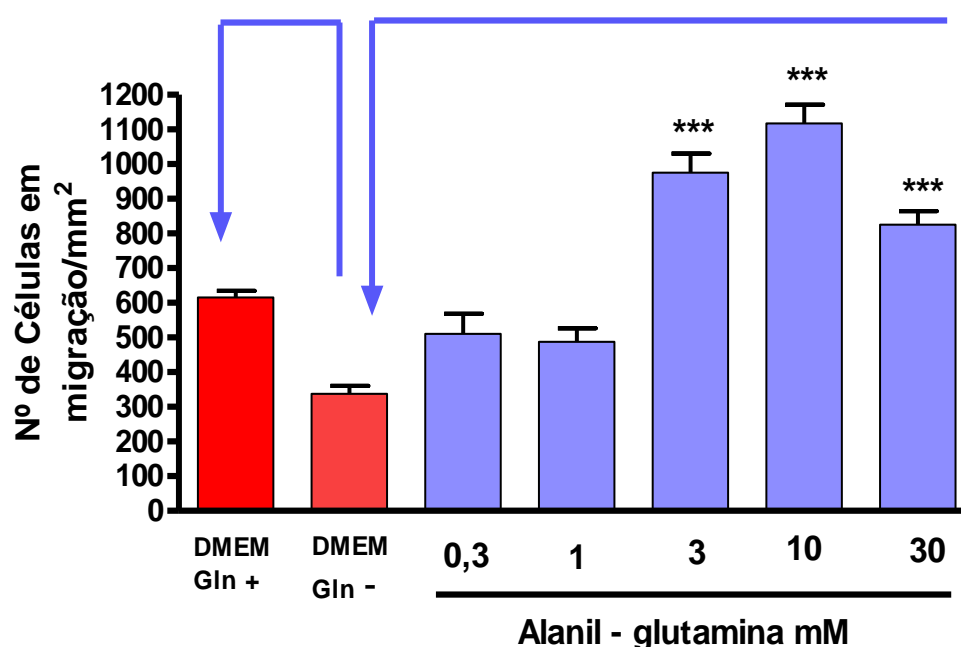


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. DMEM GI- vs DMEM Gln+ / Alanil - Glutamina mM vs DMEM Gln-

5.2.2.1 Migração na Ausência da Cepa Bacteriana EAEC-042

A figura 28 apresenta os dados obtidos no ensaio de migração celular depois de 24 horas de incubação do micronutriente alanil-glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM. Houve redução significativa da migração celular no meio DMEM livre de glutamina (DMEM Gln-) quando comparado com o meio DMEM com glutamina (DMEM Gln+) ($p < 0,001$). Houve aumento significativo da migração celular nas concentrações de 3,0; 10 e 30 mM ($p < 0,001$) de alanil-glutamina quando comparado ao meio DMEM livre de glutamina. Não foram observadas diferenças significativas com as concentrações iniciais.

Figura 28. Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com alanil-glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM em meio DMEM livre de glutamina.

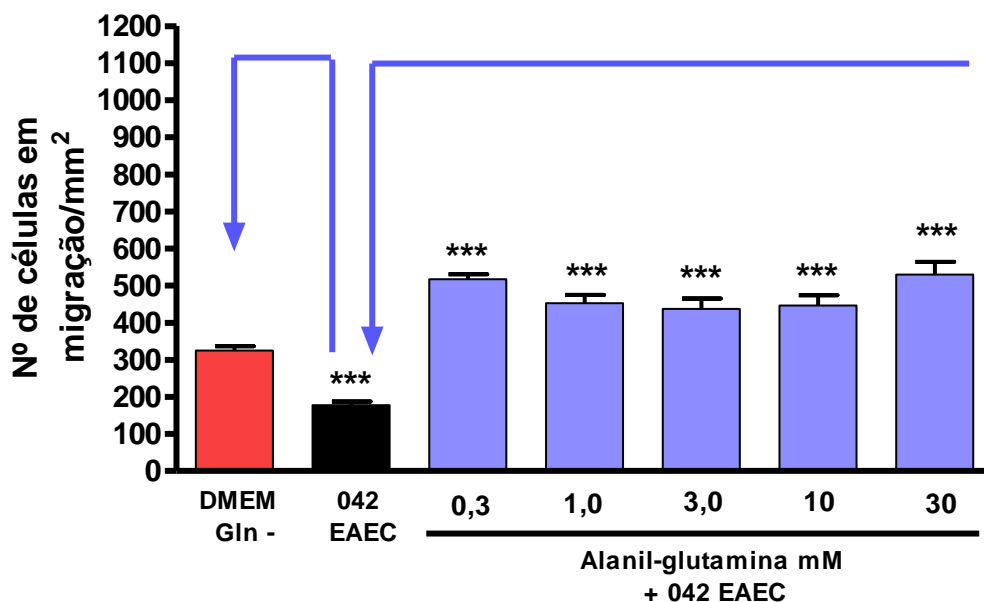


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (***) $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. DMEM Gln- vs DMEM Gln+ / Alanil - Glutamina mM vs DMEM Gln-.

5.2.2.2 Migração na Presença da Cepa Bacteriana EAEC- 042

A figura 29 apresenta os dados obtidos no ensaio de migração celular após 24 horas de incubação da cepa da bactéria EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL associada a alanil-glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM. Houve redução significativa da migração celular na exposição à cepa bacteriana EAEC-042 ($p < 0,001$) em comparação à migração das células em meio DMEM sem glutamina (controle) e aumento significativo da migração celular na presença de alanil-glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM ($p < 0,001$).

Figura 29. Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada a alanil-glutamina nas concentrações 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM em meio DMEM livre de glutamina.

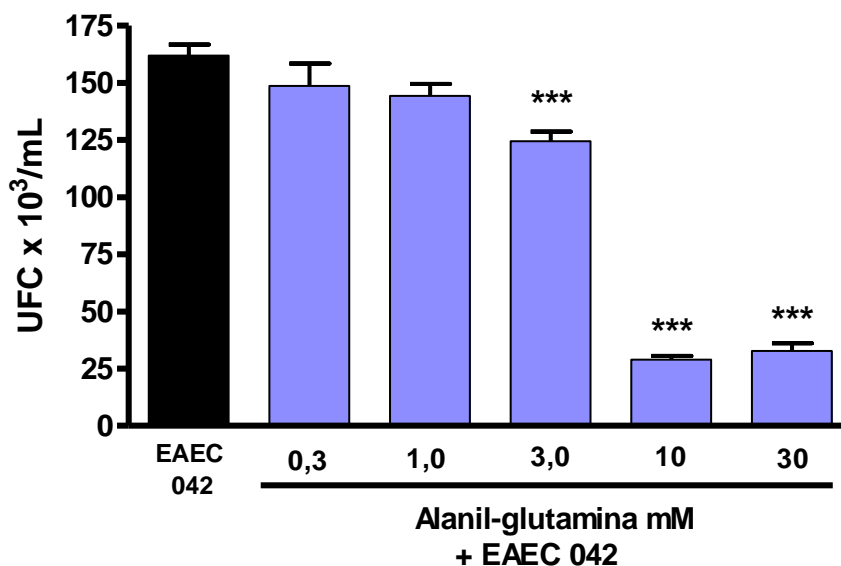


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (***) $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. Alanil - glutamina mM + EAEC-042 vs EAEC-042 / EAEC-042 vs DMEM Gln-

5.2.3 Adesão Bacteriana

A figura 30 mostra a análise quantitativa da adesão bacteriana em células Caco-2 depois de 1 hora e 30 minutos de incubação da bactéria EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL na presença de alanil-glutamina nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 mM. Nota-se redução significativa na adesão bacteriana com a alanil-glutamina nas concentrações de 3, 10 e 30 mM ($p < 0,001$) na comparação da adesão da cepa bacteriana EAEC-042. Porém a melhor resposta apresentada por este micronutriente ocorreu nas concentrações de 10 e 30 mM.

Figura 30: Adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a cepa bacteriana EAEC- 042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada a alanil-glutamina nas concentrações de 0,3; 1; 3; 10 e 30 mM.

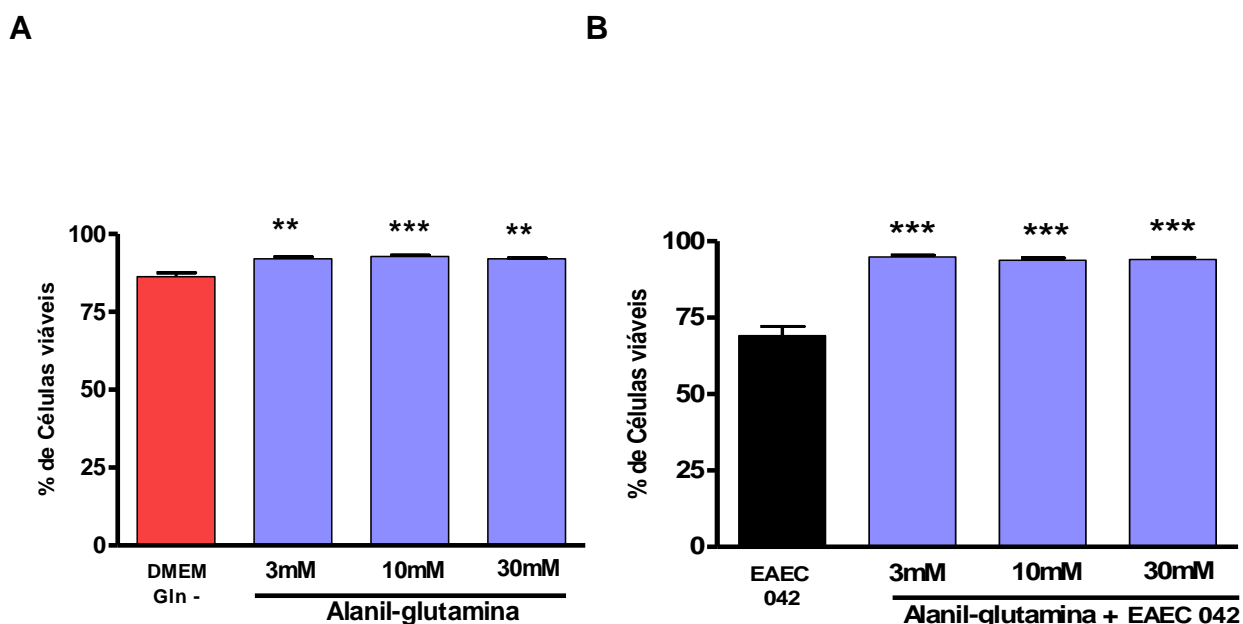


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (***) $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. Alanil - Glutamina + EAEC-042 mM vs EAEC-042

5.2.4 Citometria de Fluxo

A figura 31A mostra aumento da viabilidade celular com a associação da alanil-glutamina nas concentrações de 3 mM e 30 mM ($p < 0,01$), 10 mM ($p < 0,001$), na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. Houve redução significativa da viabilidade celular no controle da cepa EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL ($p < 0,001$) quando comparado ao controle com o meio DMEM livre de glutamina. Porém na figura 31B, observa-se aumento da viabilidade celular em todas as concentrações analisadas (3, 10 e 30 mM) de alanil-glutamina na presença da cepa bacteriana ($p < 0,001$).

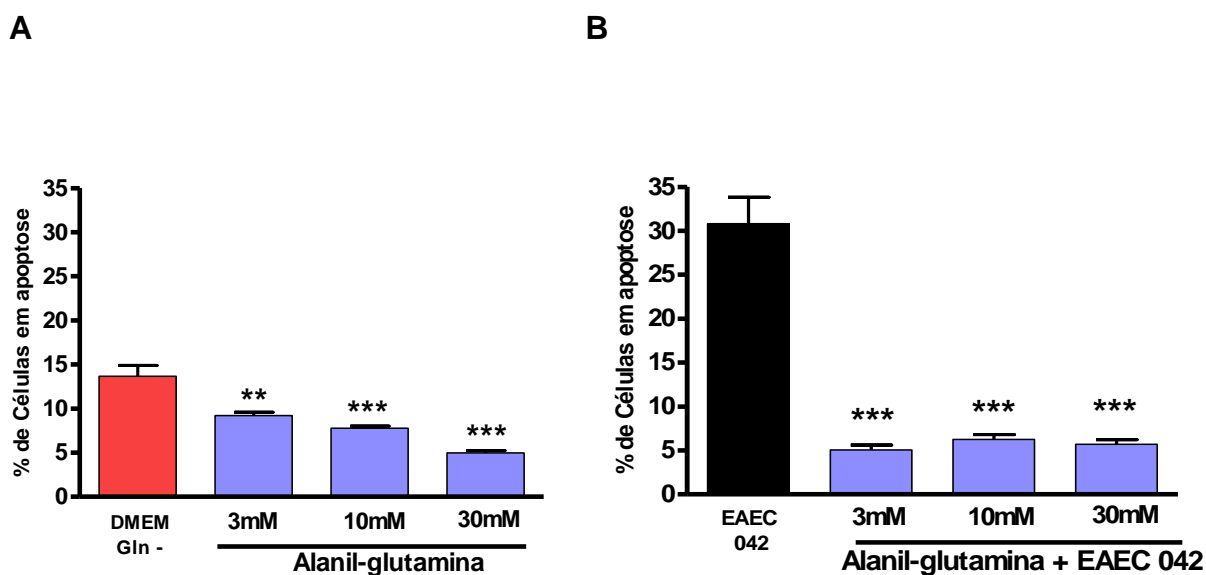
Figura 31: Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células viáveis quando da associação da alanil-glutamina nas concentrações 3; 10 e 30 mM.



A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. Alanil - glutamina mM vs DMEM Gln- e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL). Alanil - glutamina + EAEC-042 mM vs EAEC-042. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

Na figura 32A é demonstrada a redução da apoptose celular na associação com a alanil-glutamina nas concentrações de 3 mM ($p < 0,01$), 10 e 30 mM ($p < 0,001$). Houve aumento significativo da apoptose na presença da cepa EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL ($p < 0,001$) em comparação ao controle do meio DMEM livre de glutamina. Nota-se na figura 32B uma resposta de redução significativa da apoptose celular nas concentrações de alanil-glutamina na presença da bactéria, $p < 0,001$.

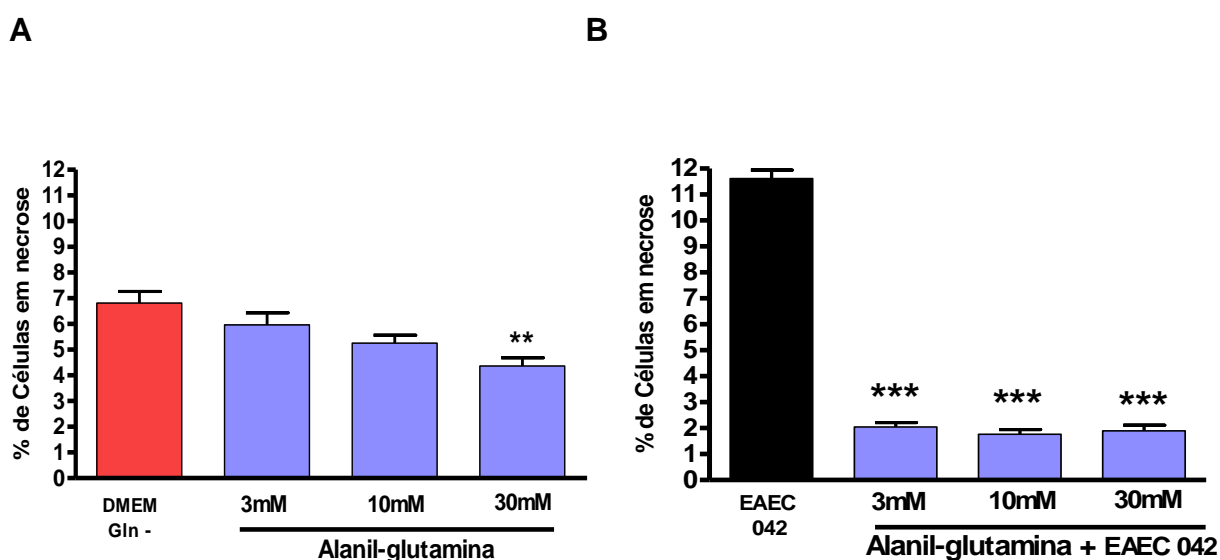
Figura 32: Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em apoptose celular quando da associação da alanil-glutamina nas concentrações 3; 10 e 30 mM.



A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. Alanil - glutamina mM vs DMEM Gln- e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL). Alanil - glutamina mM + EAEC-042 vs EAEC-042. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, ($p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.**

É demonstrado na figura 33A redução significativa da necrose celular na concentração de 30 mM de alanil-glutamina ($p < 0,01$) quando comparado ao controle de meio DMEM livre de glutamina, o mesmo não ocorreu com as concentrações iniciais de 3 e 10 mM, em que não houve efeito significativo. Houve aumento significativo da necrose celular na presença da EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL ($p < 0,001$) quando comparado ao controle meio DMEM livre de glutamina. A figura 33B mostra redução significativa na necrose em todas as concentrações de alanil-glutamina na presença da cepa bacteriana ($p < 0,001$).

Figura 33: Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em necrose celular quando da associação da alanil-glutamina nas concentrações 3; 10 e 30 mM.



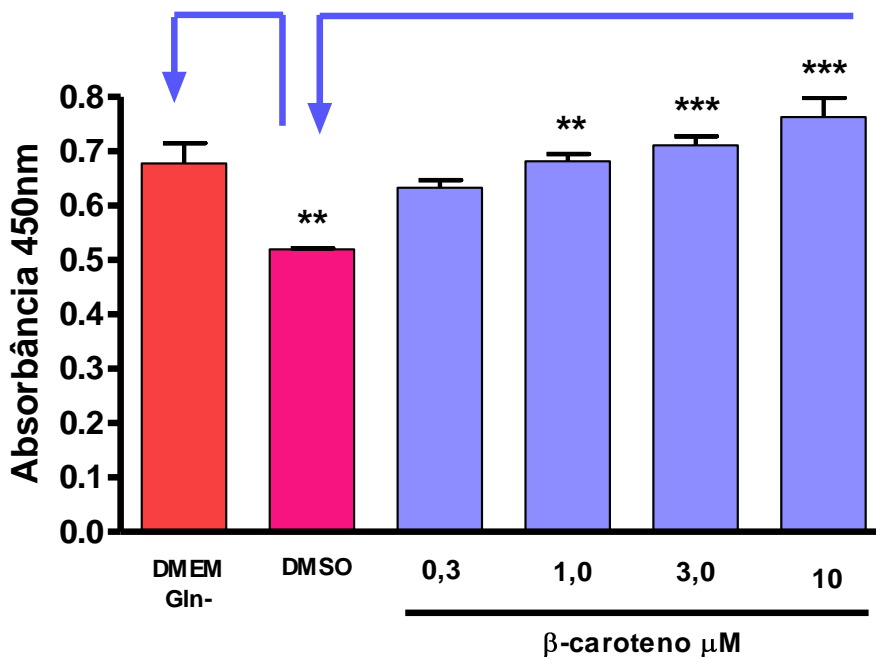
A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. Alanil - glutamina mM vs DMEM Gln- e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL). Alanil - glutamina mM + EAEC-042 vs EAEC-042. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

5.3 Análise do β -caroteno (0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 μ M)

5.3.1 Proliferação Celular

A figura 34 mostra a análise da proliferação celular na linhagem celular IEC-6 depois de 24 horas de incubação com o β -caroteno nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0 e 10 μ M. A proliferação do meio contendo 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), usado como diluente do β -caroteno, mostrou-se significativamente reduzida em relação ao meio DMEM livre de glutamina (DMEM Gln-) ($p < 0,01$). Nota-se aumento significativo na proliferação celular nas concentrações de 1 μ M ($p < 0,01$); 3 μ M e 10 μ M ($p < 0,001$) de β -caroteno comparado à proliferação no meio controle com DMSO.

Figura 34: Proliferação celular depois de 24 horas de incubação com β -caroteno nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 μ M.

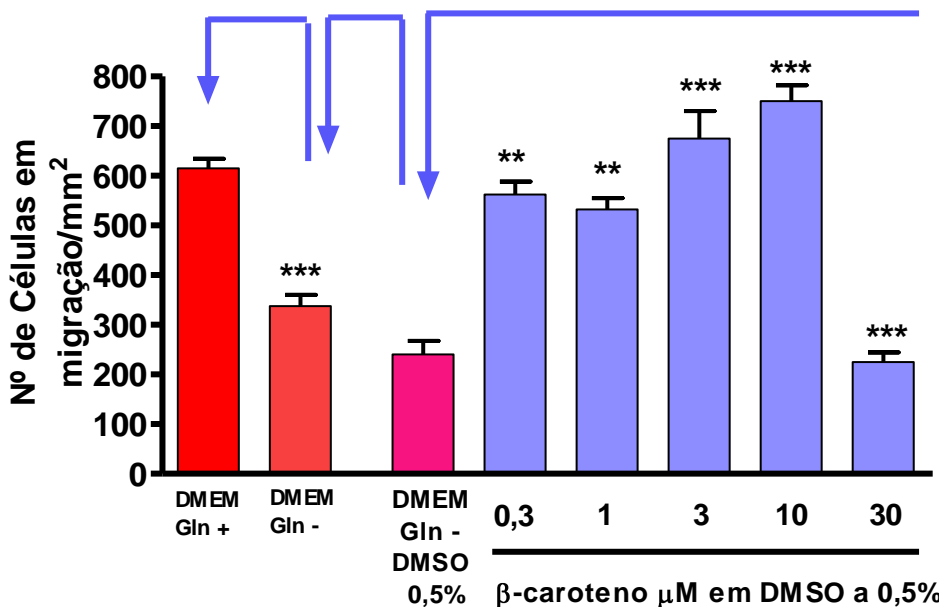


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. β -caroteno μ M vs DMSO / DMSO vs DMEM Gln-

5.3.2.1 Migração na Ausência da Cepa Bacteriana EAEC-042

A figura 35 mostra o ensaio de migração celular depois de 24 horas de incubação do micronutriente β -caroteno nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 μ M. A migração celular no meio contendo 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) usado como diluente do β -caroteno não apresentou redução significativa em relação à migração no meio DMEM livre de glutamina (DMEM Gln-), que por sua vez foi menor que a migração observada no meio DMEM com glutamina (DMEM Gln+). Houve aumento significativo da migração celular na presença do micronutriente nas concentrações de 0,3 e 1,0 μ M ($p < 0,01$) e 3,0 e 10 μ M ($p < 0,001$) em comparação ao meio DMEM com 0,5% de DMSO livre de glutamina. Houve redução significativa da migração na concentração de 30 μ M.

Figura 35. Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com o micronutriente β -caroteno, nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 μ M em meio DMEM (DMSO a 0,5%) livre de glutamina.

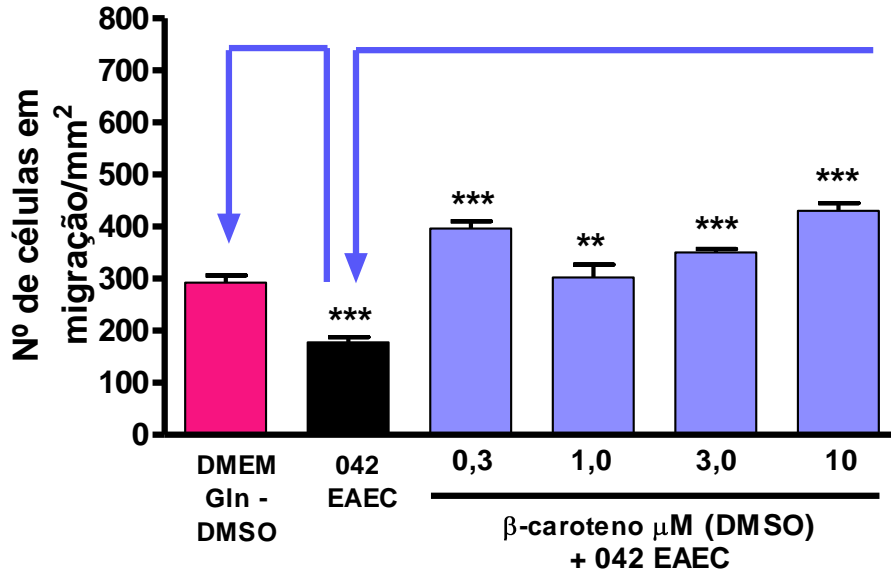


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. β -caroteno μ M vs DMSO / DMSO vs DMEM Gln- / DMEM Gln- vs DMEM Gln+.

5.3.2.2 Migração na Presença da Cepa Bacteriana EAEC 042

A figura 36 mostra o ensaio de migração celular depois de 24 horas de incubação da cepa bacteriana de EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL em meio contendo o micronutriente β -caroteno nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 μ M. Há redução significativa na migração das células IEC-6 quando expostas à cepa bacteriana EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL ($p < 0,001$) em comparação ao observado no meio DMEM com DMSO e livre de glutamina e aumento significativo da migração celular na presença do micronutriente nas concentrações de 0,3 μ M ($p < 0,001$); 1,0 μ M ($p < 0,01$); 3,0 e 10 μ M ($p < 0,001$).

Figura 36. Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada ao micronutriente β -caroteno, dissolvido em DMSO a 0,5%, nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 μ M em meio DMEM livre de glutamina.

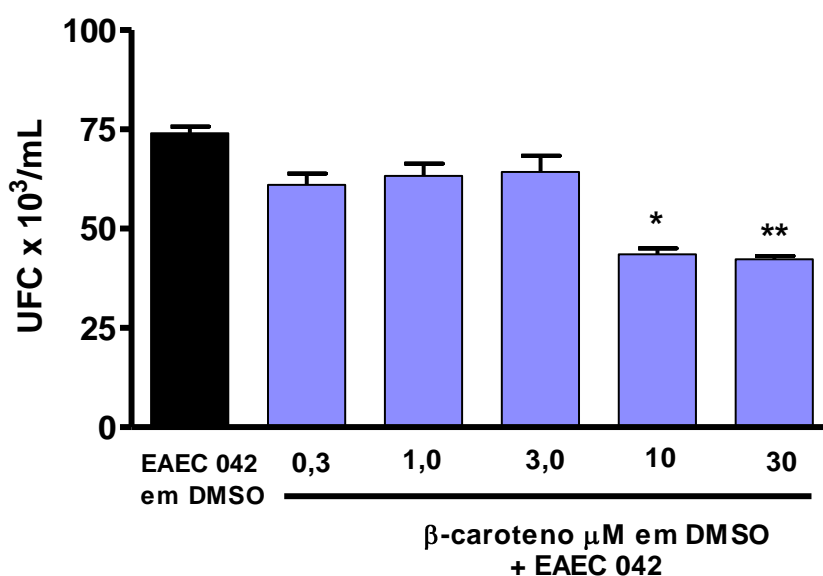


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. β -caroteno μ M vs EAEC-042.

5.3.3. Adesão Bacteriana

A figura 37 mostra a análise quantitativa da adesão bacteriana em células Caco-2 depois de 1 hora e 30 minutos de incubação da cepa EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL com adição de β -caroteno nas concentrações de 0,3; 1,0; 3,0; 10 e 30 μ M. Nota-se redução significativa na adesão bacteriana na presença de β -caroteno nas concentrações de 10 μ M ($p < 0,05$) e 30 μ M ($p < 0,01$) na comparação com o meio contendo 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), mas sem β -caroteno. Não foi observada redução significativa da adesão bacteriana nas concentrações de 0,3; 1,0 e 3,0 μ M.

Figura 37: Adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada β -caroteno nas concentrações de 0,3; 1; 3; 10 e 30 μ M.

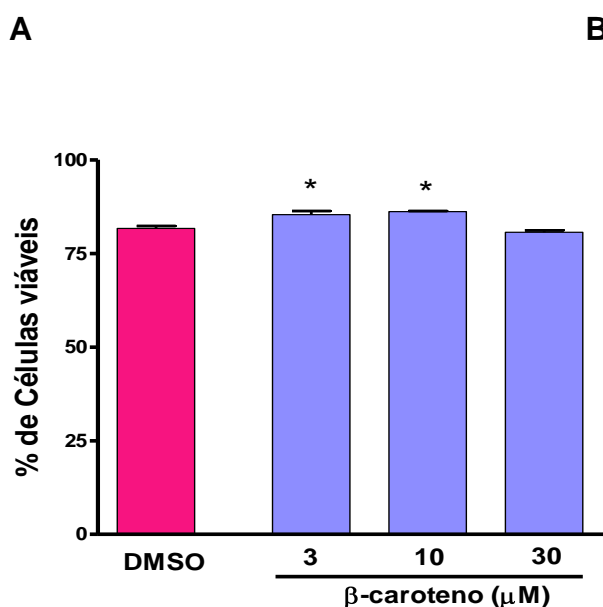


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. β -caroteno μ M vs EAEC-042

5.3.4 Citometria de Fluxo

A figura 38A mostra aumento significativo da viabilidade celular sob a ação de β -caroteno nas concentrações de 3 μM e 10 μM ($p < 0,05$) na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. Houve redução significativa da viabilidade celular incubada com a cepa EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL ($p < 0,001$) quando comparado ao controle com o meio DMEM livre de glutamina sem bactéria. Porém na figura 38B, observa-se redução significativa da viabilidade celular quando β -caroteno na concentração de 3 μM ($p < 0,001$) foi acrescentado à cultura com a cepa EAEC -042.

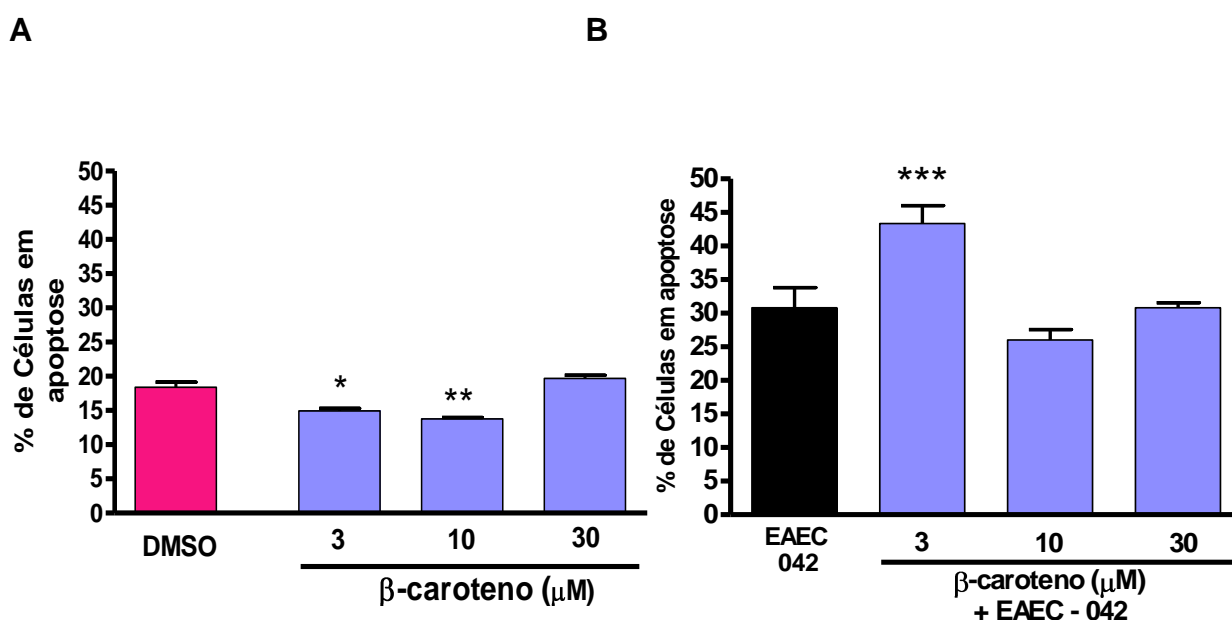
Figura 38. Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células viáveis na adição de β -caroteno nas concentrações 3; 10 e 30 μM .



A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. β -caroteno μM vs DMSO e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL). β -caroteno μM vs EAEC-042. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

A figura 39A mostra que a redução significativa da apoptose celular sob a ação do β -caroteno nas concentrações de 3 μ M ($p < 0,05$) e 10 μ M ($p < 0,01$) na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. Não houve alteração significativa na concentração de 30 μ M. Houve aumento significativo da apoptose celular no controle da cepa EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL ($p < 0,001$) quando comparado ao controle com o meio DMEM livre de glutamina. Na figura 39B há um aumento significativo da apoptose celular na concentração de 3 μ M ($p < 0,001$) na associação com EAEC – 042.

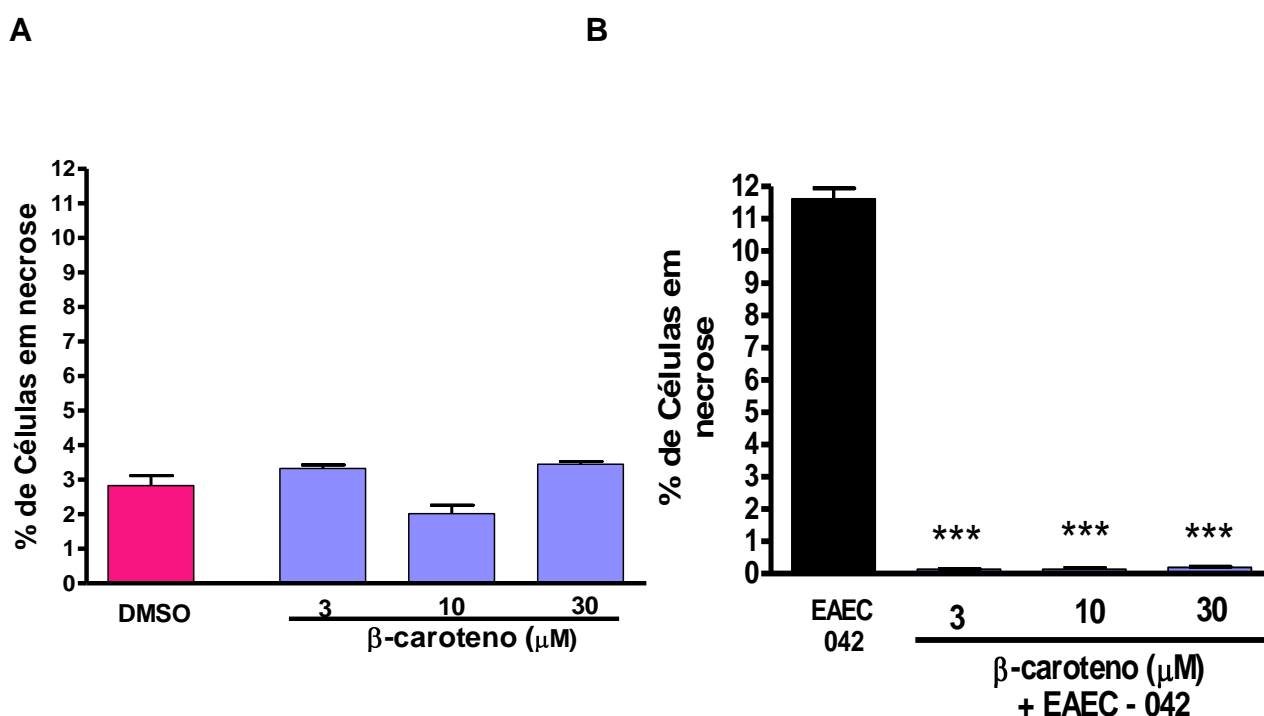
Figura 39: Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em apoptose com o β -caroteno nas concentrações 3; 10 e 30 μ M.



A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. β -caroteno μ M vs DMSO e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL). β -caroteno μ M vs EAEC-042. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

A figura 40A mostra a porcentagem de necrose celular induzida por β -caroteno nas concentrações de $3\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ ($p<0,01$) e $30\mu\text{M}$ na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. Não houve alteração significativa entre as diversas concentrações e o meio com DMSO. Houve aumento significativo da necrose celular na presença da cepa EAEC-042 ($p<0,001$) quando comparado com o controle com o meio DMEM livre de glutamina. Na figura 40B há redução significativa da necrose em todas as concentrações de β -caroteno ($p<0,001$).

Figura 40: Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em necrose com o β -caroteno nas concentrações 3; 10 e $30\mu\text{M}$.



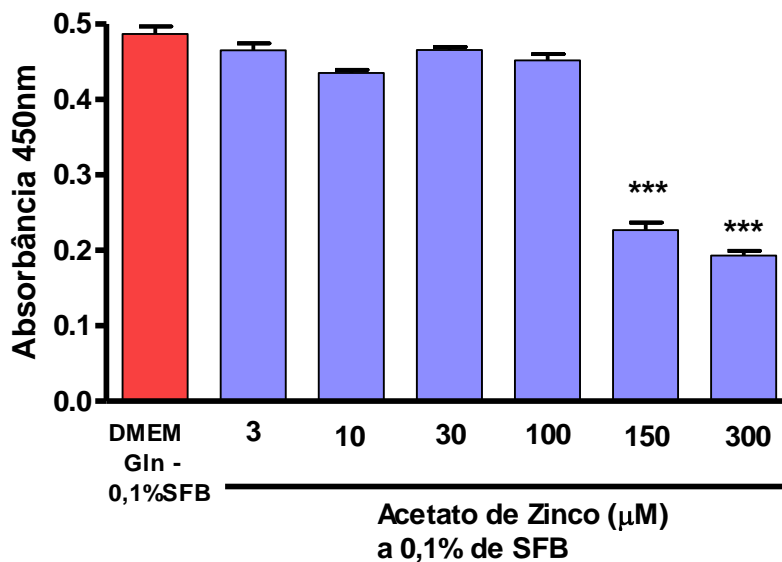
A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. β -caroteno μM vs DMSO e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL). β -caroteno μM vs EAEC-042. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (***) $p<0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

5.4 Análise do Acetato de Zinco (3, 10, 30, 100, 150 e 300 μM)

5.4.1 Proliferação Celular

A figura 41 mostra o ensaio de proliferação celular depois de 24 horas de incubação com acetato de zinco em meio DMEM com 0,1% de soro fetal bovino (SFB) nas concentrações de 3, 10, 30, 100, 150 e 300 μM . Ocorreu redução significativa na proliferação nas concentrações de zinco de 150 e 300 μM ($p < 0,001$) quando comparadas ao meio DMEM livre de glutamina com 0,1% de SFB. Nas concentrações de 3, 10, 30 e 100 μM não houve diferença na proliferação celular em relação ao meio DMEM sem glutamina com 0,1% de SFB.

Figura 41: Proliferação celular depois de 24 horas de incubação com acetato de zinco nas concentrações de 3, 10, 30, 100, 150 e 300 μM .

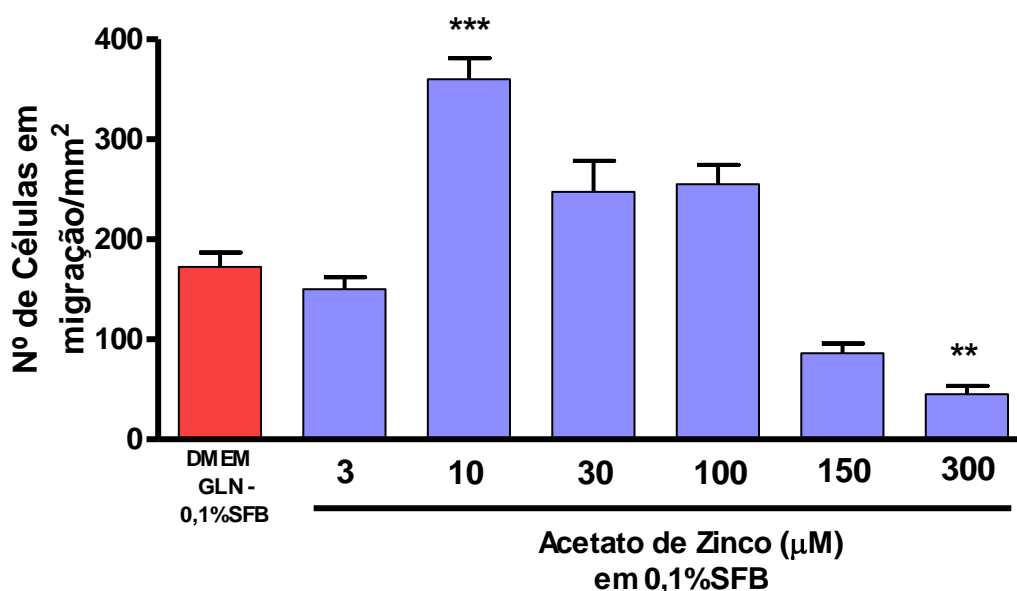


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (***) $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. Acetato de zinco vs DMEM Gln-

5.4.2.1 Migração na Ausência da Cepa Bacteriana EAEC-042

A figura 42 apresenta os dados da migração celular depois de 24 horas de incubação com acetato de zinco, em meio DMEM contendo 0,1% de soro fetal bovino livre de glutamina, nas concentrações de 3; 10; 30; 100; 150 e 300 μM . Houve aumento significativo da migração celular na presença do micronutriente na concentração de 10 μM ($p < 0,001$) em comparação ao meio DMEM com 0,1% de soro fetal bovino livre de glutamina. Houve redução da migração nas concentrações de 150 e 300 μM , porém somente na última, o resultado foi significativo ($p < 0,01$).

Figura 42. Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com acetato de zinco nas concentrações de 3; 10; 30; 100; 150 e 300 μM em meio DMEM livre de glutamina a 0,1% de soro fetal bovino.

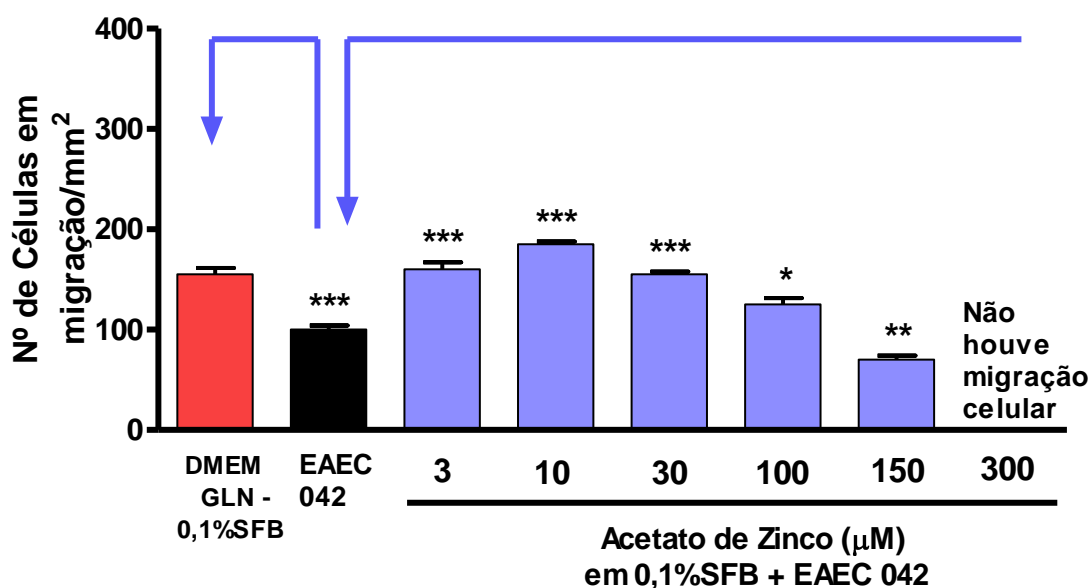


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. Acetato de zinco vs DMEM Gln-.

5.4.2.2 Migração na Presença da Cepa Bacteriana EAEC-042

A figura 43 mostra os dados do ensaio de migração celular depois de 24 horas de incubação da cepa EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL com acetato de zinco nas concentrações de 3; 10; 30; 100; 150 e 300 μ M. Houve redução significativa na migração quando a célula foi exposta à cepa bacteriana em comparação à migração das células em meio DMEM livre de glutamina com 0,1% de soro fetal bovino e aumento significativo da migração na presença de acetato de zinco nas concentrações de 3; 10 e 30 μ M ($p < 0,001$) e 100 μ M ($p < 0,05$). As células apresentaram redução significativa na migração celular na presença de acetato de zinco na concentração de 150 μ M ($p < 0,01$) e não houve migração celular na concentração de 300 μ M.

Figura 43. Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada ao acetato de zinco nas concentrações de 3; 10; 30; 100; 150 e 300 μ M em meio DMEM livre de glutamina a 0,1% de soro fetal bovino.

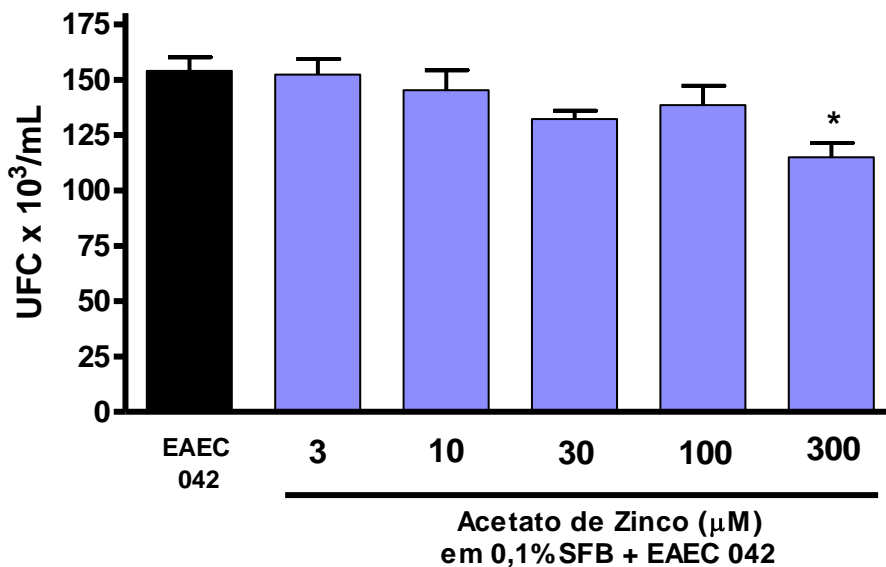


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. Acetato de zinco vs EAEC-042 / EAEC-042 vs DMEM Gln-.

5.4.3 Adesão Bacteriana

A figura 44 mostra a análise quantitativa da adesão bacteriana em células Caco-2 depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a bactéria EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL com adição de acetato de zinco nas concentrações de 3, 10, 30, 100 e 300 μM . Houve redução significativa ($p < 0,05$) da adesão bacteriana somente na concentração de 300 μM .

Figura 44. Adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a bactéria EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada acetato de zinco nas concentrações de 3, 10, 30, 100 e 300 μM .

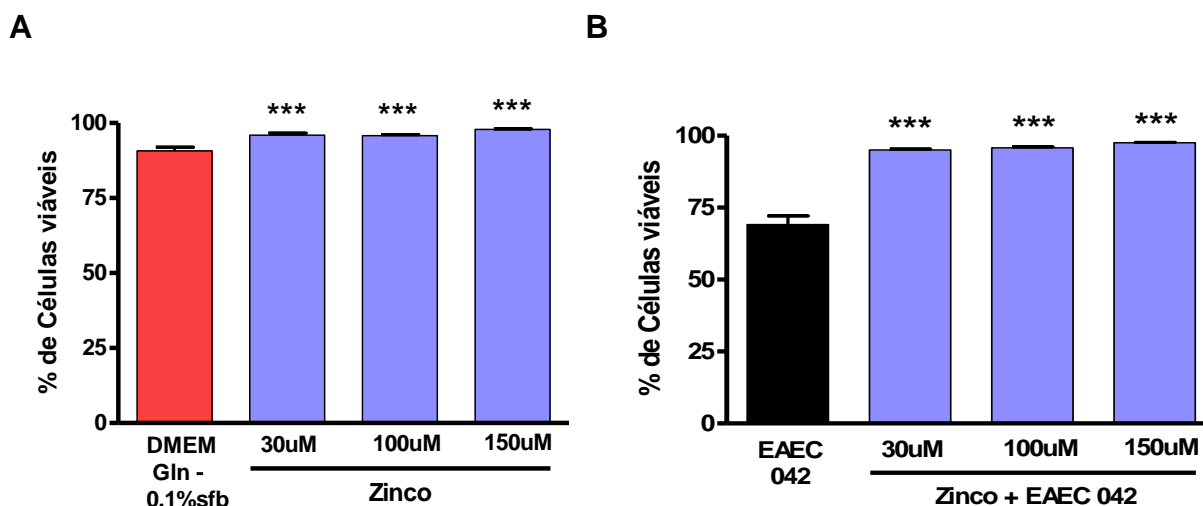


Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, ($*p < 0,05$) no programa GraphPad Prism versão 4.0. Acetato de zinco vs EAEC-042.

5.4.4 Citometria de Fluxo

A figura 45A mostra a porcentagem de células viáveis com a adição de acetato de zinco nas concentrações de 30, 100 e 150 μM . Houve aumento significativo da viabilidade celular ($p < 0,001$) em todas as concentrações. Houve redução significativa da viabilidade celular na presença da cepa EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. ($p < 0,001$), quando comparada com o meio DMEM livre de glutamina e bactéria. Pode-se observar na figura 45B que houve aumento significativo da viabilidade celular nas três concentrações de acetato de zinco na presença de EAEC-042 ($p < 0,001$).

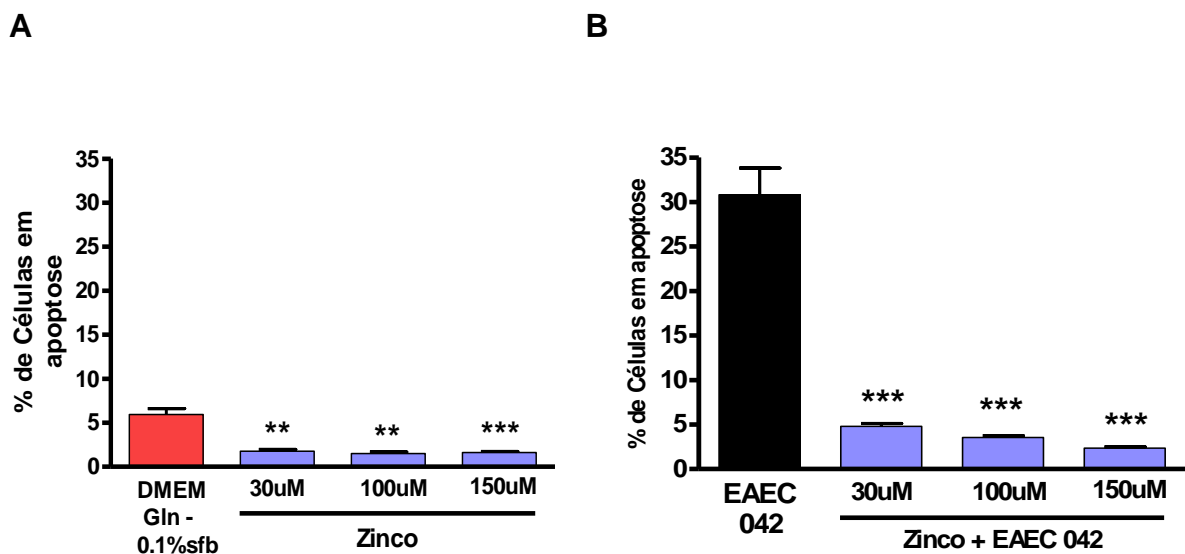
Figura 45. Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células viáveis com o acetato de zinco nas concentrações 30; 100 e 150 μM .



A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. Acetato de zinco vs DMEM Gln- e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL). Acetato de zinco vs EAEC-042. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, no programa GraphPad Prism versão 4.0 (***) $p < 0,001$).

A figura 46A mostra a porcentagem de células em apoptose depois da adição de acetato de zinco nas concentrações de 30, 100 e 150 μM . Houve redução significativa da apoptose celular nas concentrações de 100 μM ($p < 0,01$) e 150 μM ($p < 0,001$). Houve aumento significativo da apoptose celular na presença da cepa EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. ($p < 0,001$), na comparação com o meio DMEM livre de glutamina e bactéria. Pode-se observar na figura 46B que houve redução significativa da apoptose celular na adição de zinco nas três concentrações de acetato de zinco analisadas ($p < 0,001$).

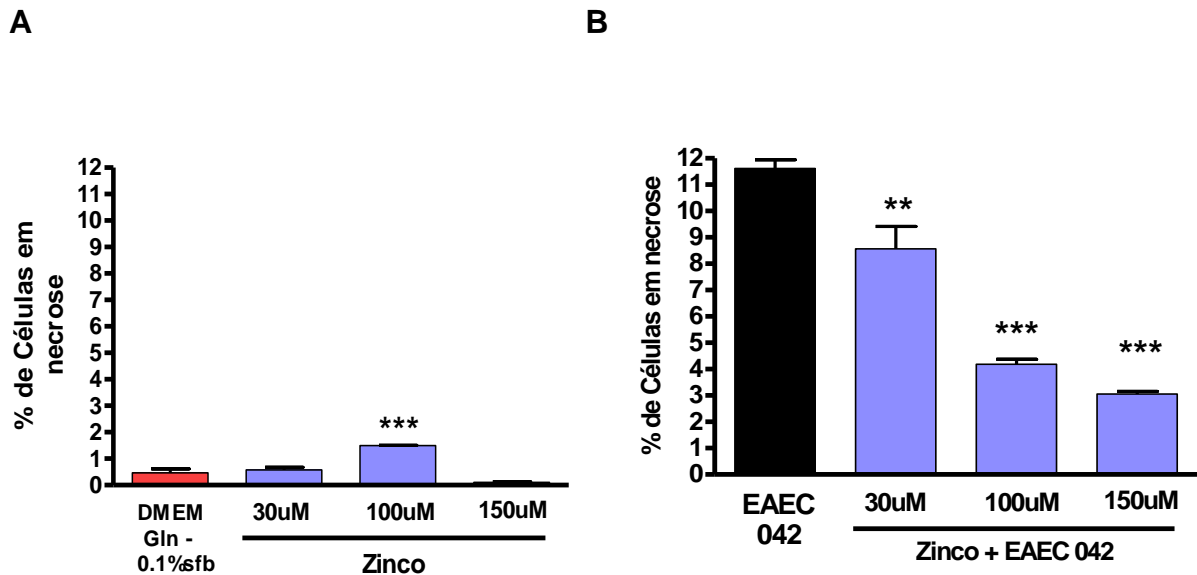
Figura 46. Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em apoptose celular com o acetato de zinco nas concentrações 30; 100 e 150 μM .



A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. Acetato de zinco vs DMEM Gln- e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^3$ UFC/ mL). Acetato de zinco vs EAEC-042. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, no programa GraphPad Prism versão 4.0 (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A figura 47A mostra a porcentagem de células em necrose celular depois da adição de acetato de zinco nas concentrações de 30, 100 e 150 μM . Houve aumento significativo da necrose celular na concentração de 100 μM ($p < 0,001$). Houve aumento significativo da necrose celular na presença da cepa bacteriana EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. ($p < 0,001$), na comparação com o meio DMEM livre de glutamina e bactéria. Pode-se observar na figura 47B que houve redução progressiva da necrose nas três concentrações de acetato de zinco na presença de EAEC-042 30 μM ($p < 0,01$), 100 e 150 μM ($p < 0,001$).

Figura 47. Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em necrose celular com o acetato de zinco nas concentrações 30; 100 e 150 μM .



A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042. Acetato de zinco vs DMEM Gln- e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL). Acetato de zinco vs EAEC-042. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, no programa GraphPad Prism versão 4.0 (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.5 Análise do Leite de Cabra Controle e Transgênico Contendo Lisozima Humana - Leite com Remoção da Camada Gordurosa

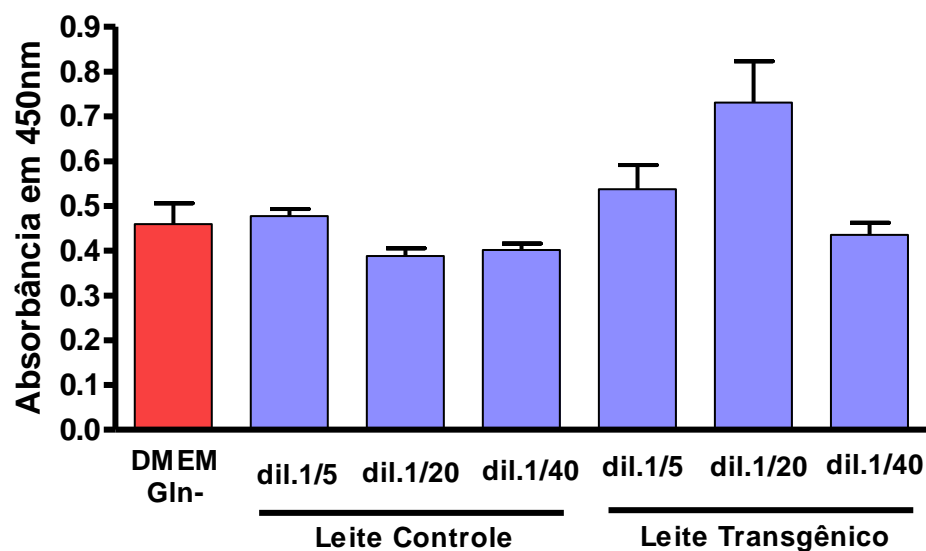
5.5.1 Proliferação Celular

Leite com Remoção da Camada Gordurosa

A figura 48 mostra o ensaio de proliferação celular depois de 24 horas de incubação com o leite de cabra controle e transgênico, depois de retirada a camada gordurosa, nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40. Nota-se uma tendência a um aumento na proliferação com a diluição de 1:20 com o leite transgênico, porém não significativa, quando comparado ao meio DMEM livre de glutamina. De forma geral não houve diferença na proliferação celular na presença de ambos os leites, controle e transgênico.

Não houve diferença significativa entre as diferentes diluições do leite controle na comparação com o leite de cabra transgênico.

Figura 48. Proliferação celular depois 24 horas de incubação com o leite de cabra (controle e transgênico) com a remoção da camada gordurosa nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40.



Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, no programa GraphPad Prism versão 4.0.

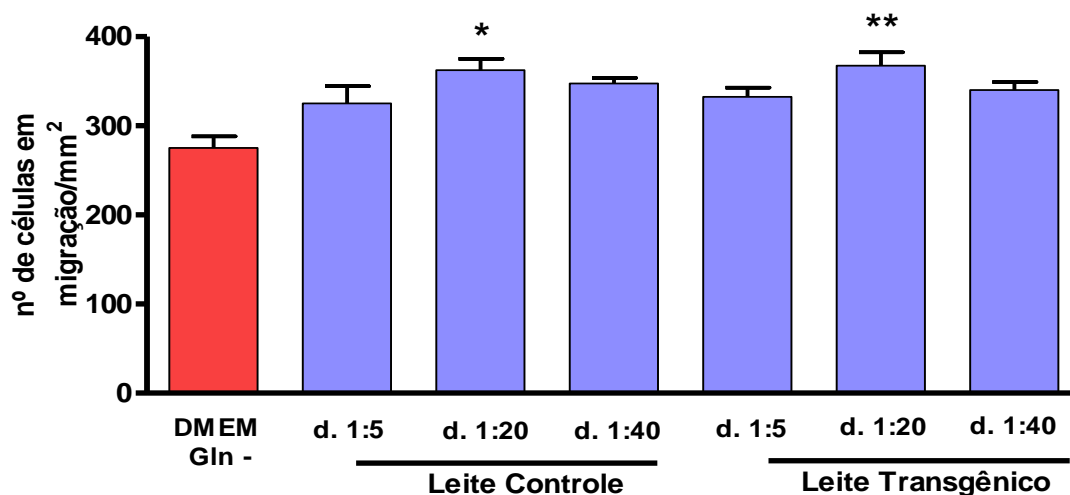
5.5.2.1 Migração na ausência da cepa Bacteriana EAEC-042

Leite com Remoção da Camada Gordurosa

A figura 49 mostra os dados obtidos no ensaio de migração celular depois de 24 horas de incubação com o leite de cabra controle e transgênico, depois da remoção da camada gordurosa nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40. Os resultados mostram aumento significativo da migração celular na diluição de 1:20 tanto do leite controle ($p < 0,05$) como do transgênico ($p < 0,01$) em comparação ao meio DMEM livre de glutamina. Não houve diferenças nas diluições de 1:5 e 1:40 dos dois leites comparados ao DMEM livre de glutamina.

Não houve diferença significativa quando as diluições dos leites controle e transgênico foram comparadas.

Figura 49. Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com o leite de cabra controle e transgênico, com remoção da camada gordurosa nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40 em meio DMEM livre de glutamina.



Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

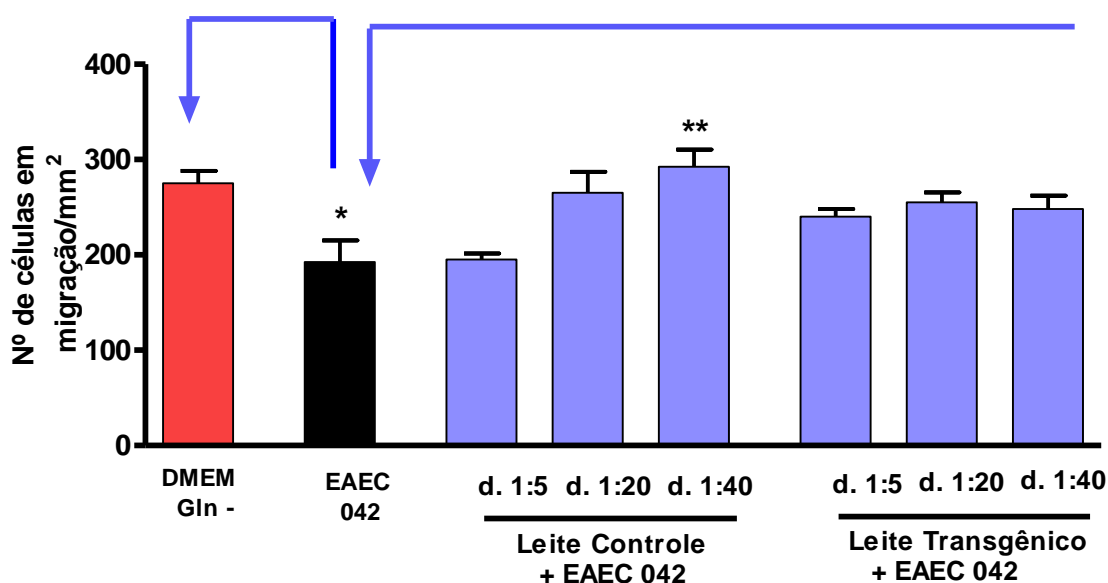
5.5.2.2 Migração na Presença da Cepa Bacteriana EAEC-042

Leite com Remoção da Camada Gordurosa

A figura 50 mostra os dados obtidos no ensaio de migração celular depois de 24 horas de incubação com a cepa EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL e leite de cabra transgênico nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40. Os dados mostram redução significativa da migração celular quando há exposição à cepa EAEC-042 ($p < 0,05$) na comparação com o meio padrão DMEM livre de glutamina. Vê-se um aumento significativo da migração na adição de leite controle na diluição de 1:40 ($p < 0,01$) na presença da cepa bacteriana em comparação ao meio com a cepa EAEC-042 e sem leite. Não foi observada diferença na migração celular, induzida pelo leite de cabra transgênico.

Não houve diferença significativa entre os leites controle e transgênico.

Figura 50. Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada ao leite de cabra controle e transgênico com remoção da camada gordurosa nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40 em meio DMEM sem glutamina.



Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

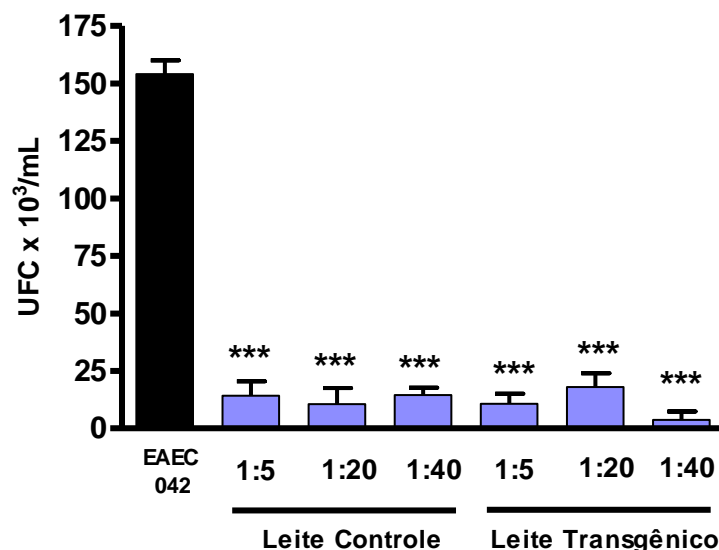
5.5.3 Adesão Bacteriana

Leite com Remoção da Camada Gordurosa

A figura 51 mostra os dados obtidos no ensaio de adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com leite de cabra controle e transgênico, depois da remoção da camada gordurosa, nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40 na presença da cepa bacteriana de EAEC- 042. Ocorreu redução significativa ($p < 0,001$) da adesão em todas as concentrações dos dois leites, controle e transgênico.

Não houve diferença significativa na adesão bacteriana quando o leite de cabra controle foi comparado ao leite de cabra transgênico.

Figura 51. Adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a cepa bacteriana EAEC 042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada ao leite de cabra, controle e transgênico, após remoção da camada gordurosa, nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40.



Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (***) $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

5.5.4 Citometria de Fluxo

Leite com a Remoção da Camada Gordurosa

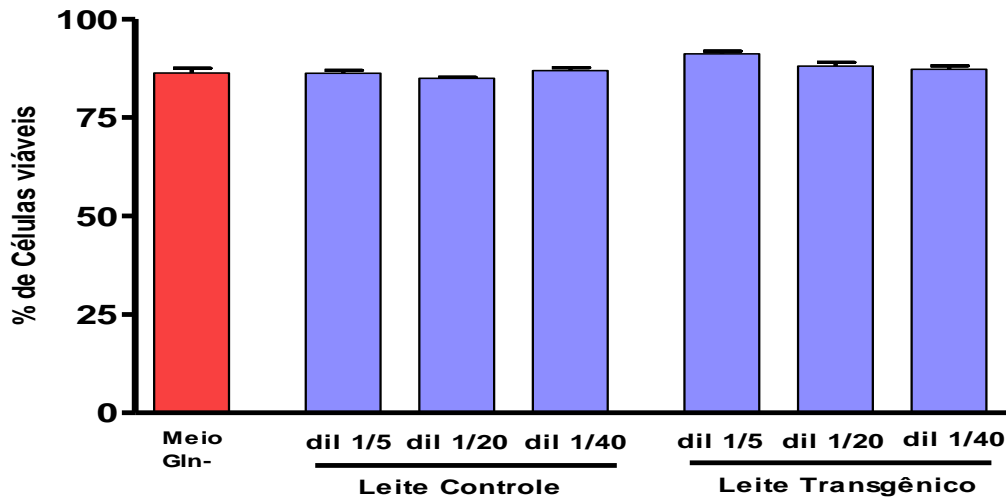
As figuras 52A e 52B mostram a análise da viabilidade celular através da citometria de fluxo do leite de cabra controle e transgênico com a remoção da camada gordurosa do leite, na ausência e na presença da EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente. Na figura 52A não foi observada significância entre as concentrações estudadas, leite controle e transgênico, quando comparadas ao controle DMEM livre de glutamina. Porém, houve redução da viabilidade no controle com a cepa EAEC-042 em relação ao meio DMEM livre de glutamina. Na figura 52B nota-se aumento significativo da viabilidade celular na totalidade das concentrações analisadas, controle e transgênico, quando associada à EAEC – 042 em relação ao seu controle.

A diluição 1:5 do leite transgênico apresentou aumento significativo de viabilidade celular ($p < 0,01$) em relação à diluição 1:20 do leite controle, na ausência da cepa EAEC-042. Na presença da cepa EAEC-042 foi observado que:

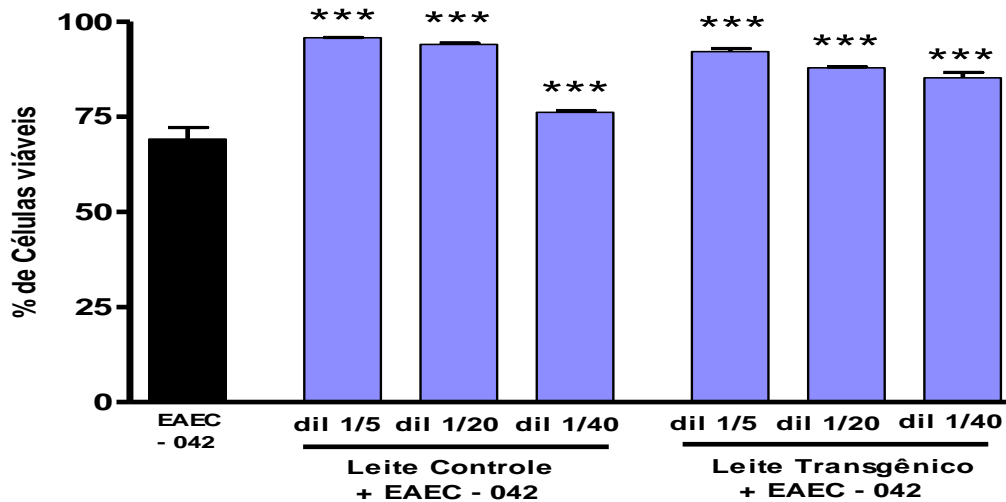
- Houve aumento da viabilidade com a diluição de 1:5 do leite controle quando relacionadas às diluições de 1:40 ($p < 0,001$) do leite controle e as diluições de 1:20 e 1:40 ($p < 0,001$) do transgênico;
- Houve aumento da viabilidade da diluição de 1:20 do leite controle quando comparadas as diluições de 1:40 ($p < 0,001$) do controle e com as de 1:20 ($p, 0,05$) e 1:40 ($p, 0,001$) do transgênico;
- As diluições do leite transgênico 1:5, 1:20 e 1:40 aumentaram significativamente a viabilidade ($p < 0,001$) em relação a diluição de 1:40 do leite controle.
- Houve aumento significativo em 1:5 do leite transgênico ($p < 0,05$) comparado a 1:40 do mesmo.

Figura 52. Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células viáveis em meio contendo leite de cabra controle e transgênico, com remoção da camada gordurosa nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40.

A



B



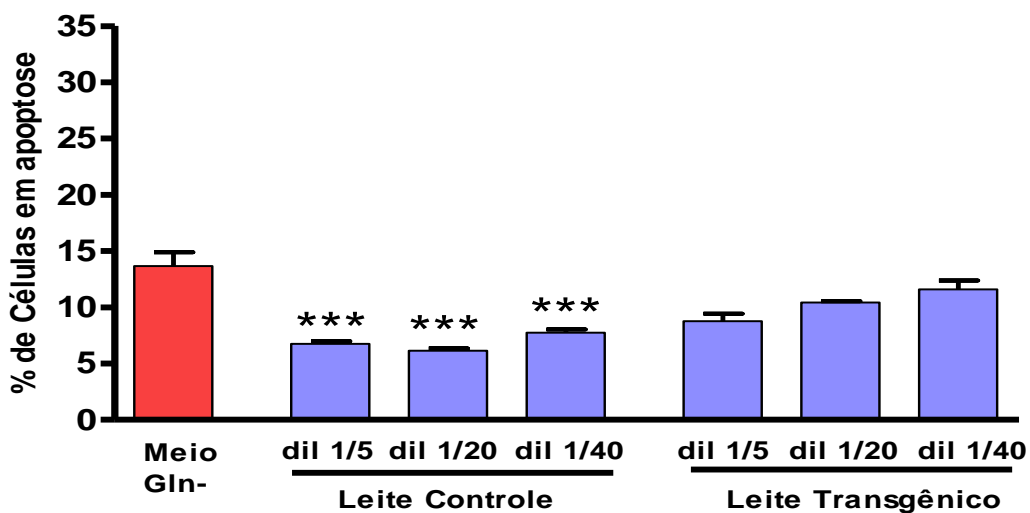
A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042 e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL). Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, no programa GraphPad Prism versão 4.0 (***) $p < 0,001$.

As figuras 53A e 53B mostram a análise da apoptose celular através da citometria de fluxo do leite de cabra, controle e transgênico, com a remoção da camada gordurosa, na ausência e na presença da EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente. Houve aumento significativo da apoptose celular na presença da EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. Na figura 53A observa-se redução significativa da apoptose celular em nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40 do leite controle ($p < 0,001$) quando comparados ao controle com meio DMEM livre de glutamina. Não houve redução com o leite transgênico. Na figura 53B, na presença de EAEC-042, os leites controle e transgênico mostraram redução significativa da apoptose celular comparado ao controle EAEC-042 ($p < 0,001$).

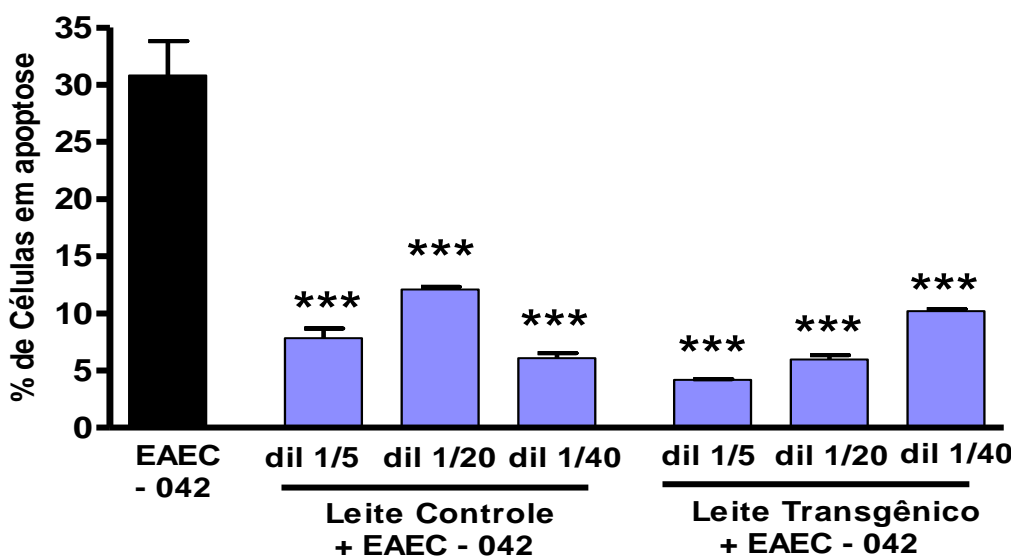
Houve redução significativa da apoptose no leite transgênico na diluição de 1:40 ($p < 0,05$) em relação ao leite controle na diluição 1:20 na ausência da EAEC - 042. O leite controle na diluição de 1:5 aumentou significativamente a apoptose em relação à diluição de 1:40 ($p < 0,001$). A diluição de 1:20 do leite transgênico reduziu a apoptose quando comparado às diluições 1:5 ($p < 0,001$) e 1:20 ($p < 0,01$) do leite controle, e 1:40 (0,05) do transgênico.

Figura 53. Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em apoptose celular em meio DMEM livre de glutamina, contendo leite de cabra controle e transgênico, com remoção da camada gordurosa nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40.

A



B



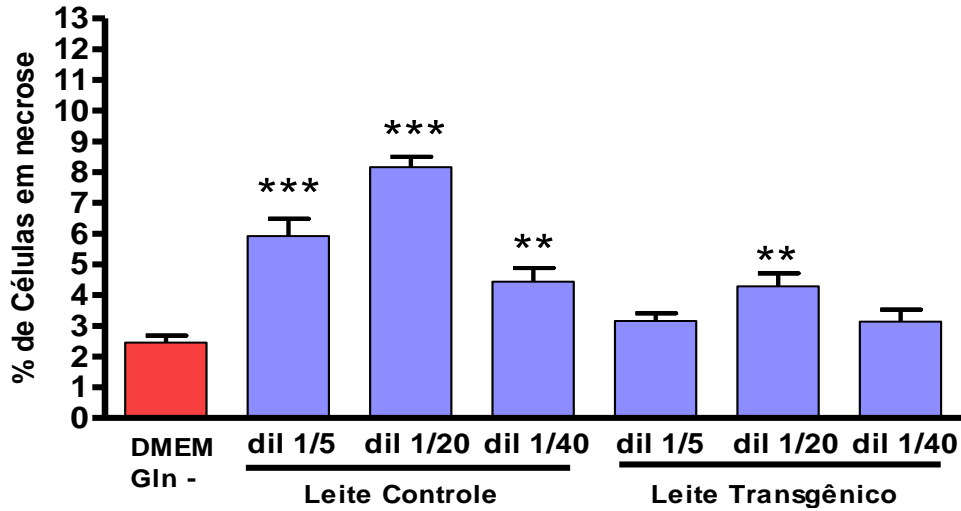
A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042 e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL). Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, no programa GraphPad Prism versão 4.0 (***) $p < 0,001$.

As figuras 54A e 54B mostram a análise relativa à necrose celular avaliada por citometria de fluxo, na presença do leite de cabra, controle e transgênico, com remoção da camada gordurosa, na ausência e na presença da EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente. Houve aumento significativo da necrose celular na presença da EAEC-042. A figura 54A mostra aumento significativo da necrose celular nas diluições do leite controle 1:5 ($p < 0,001$), 1:20 ($p < 0,001$), 1:40 ($P < 0,01$) e na diluição de 1:20 ($p < 0,01$) do leite transgênico comparados ao meio DMEM livre de glutamina, na ausência da cepa EAEC-042. Na figura 54B, houve redução em todas as diluições, tanto controle como transgênico ($p < 0,001$) na associação com a bactéria.

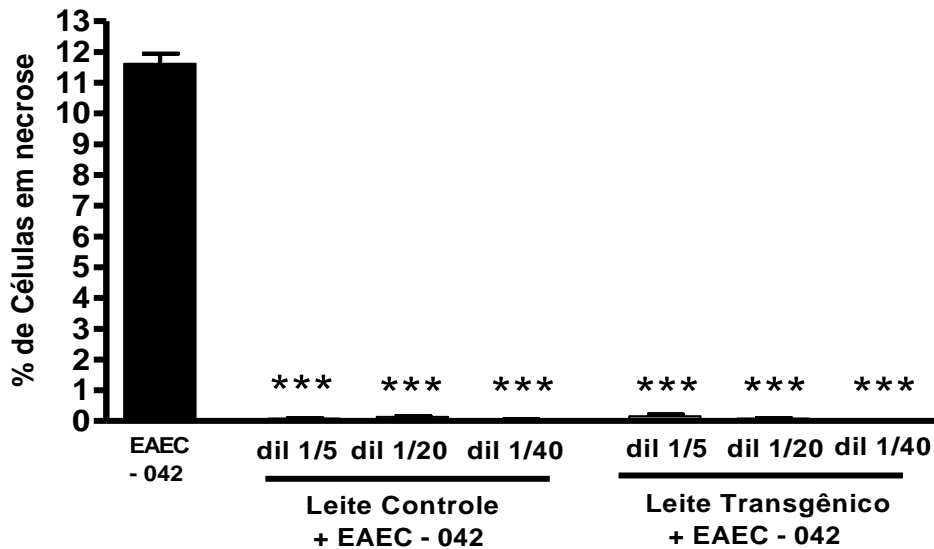
Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042, houve diferença significativa na redução da necrose com a diluição de 1:5 do leite controle em relação à diluição de 1:20 do controle ($p < 0,001$). O leite transgênico apresentou redução significativa da necrose nas diluições de 1:5 ($p < 0,001$) e 1:40 ($p < 0,001$) e 1:20 do transgênico ($p < 0,05$), quando comparados ao controle na diluição de 1:5. Houve diferença significativa na redução da necrose com a diluição de 1:40 do leite controle comparado à diluição de 1:20 do mesmo. É mostrada uma redução significativa da necrose nas diluições do leite transgênico comparadas à diluição de 1:20 do leite controle.

Figura 54. Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em necrose celular em meio DMEM livre de glutamina, contendo leite de cabra controle e transgênico, com remoção da camada gordurosa nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40.

A



B



A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042 e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL). Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, no programa GraphPad Prism versão 4.0 (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.6 Análise do Leite de Cabra Controle e Transgênico Contendo Lisozima Humana - Leite com a Camada Gordurosa

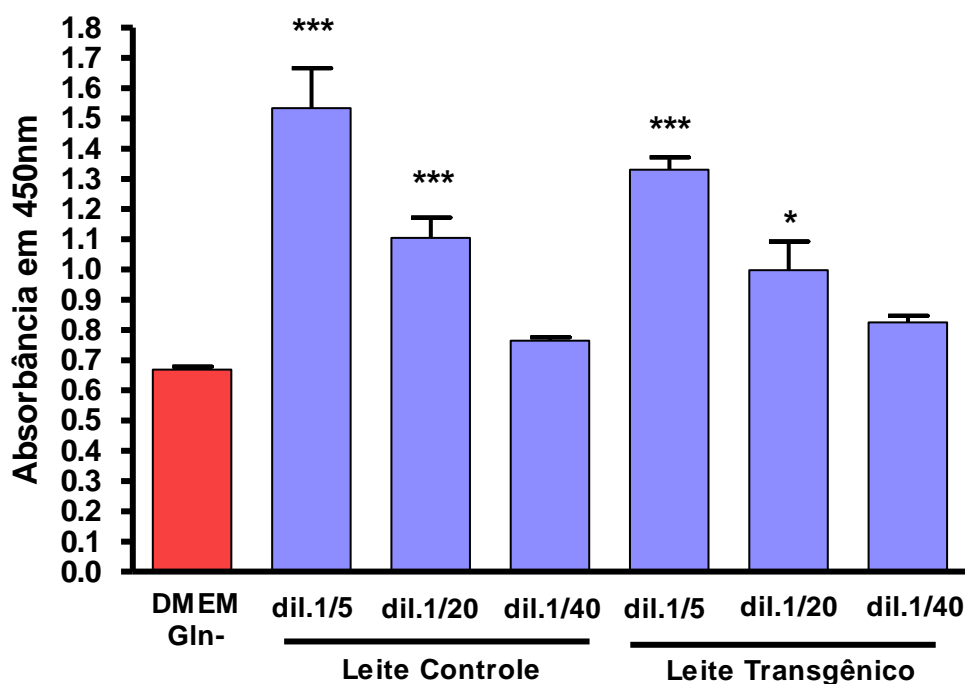
5.6.1 Proliferação Celular

Leite com a Camada Gordurosa

A figura 55 mostra o ensaio de proliferação celular depois de 24 horas de incubação com o leite de cabra com a camada gordurosa, controle e transgênico nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40. Nota-se um aumento na proliferação com as diluições de 1:5 e 1:20 em ambos os leites, quando comparados ao meio DMEM livre de glutamina. Não houve significância na proliferação celular em ambos os leites, controle e transgênico com a diluição de 1:40.

O leite controle na diluição 1:5 apresentou aumento significativo na proliferação comparado ao leite transgênico nas diluições 1:20 e 1:40 (ambos $p < 0,001$). Na diluição 1:40 do leite controle houve redução significativa em relação ao leite transgênico com a diluição 1:5 ($p < 0,001$).

Figura 55. Proliferação celular depois de 24 horas de incubação com o leite de cabra (controle e transgênico) com a camada gordurosa nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40.



Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

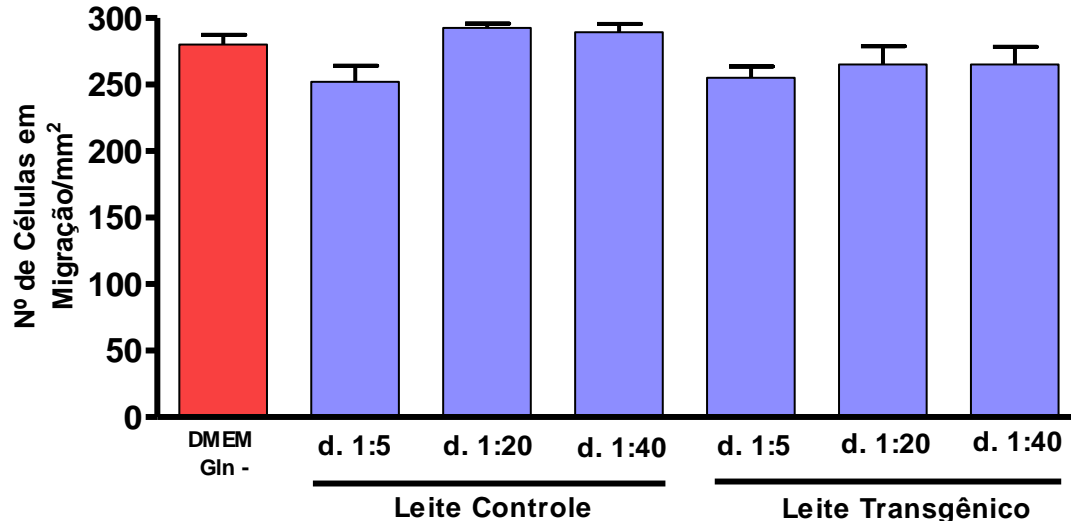
5.6.2.1 Migração na Ausência da Cepa Bacteriana EAEC-042

Leite com a Camada Gordurosa

A figura 56 mostra os dados obtidos no ensaio de migração celular, com a camada gordurosa, depois de 24 horas de incubação do leite de cabra controle e transgênico nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40. Não houve significância na migração celular nos leites, controle e transgênico, quando comparados ao meio DMEM livre de glutamina.

A diluição 1:40 do leite de cabra transgênico apresentou aumento significativo da migração em comparação a diluição 1:5 do leite controle ($p < 0,01$).

Figura 56. Migração celular em IEC-6 depois de após 24 horas de incubação com o leite de cabra controle e transgênico, com a camada gordurosa nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40 em meio DMEM livre de glutamina.



Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, no programa GraphPad Prism versão 4.0.

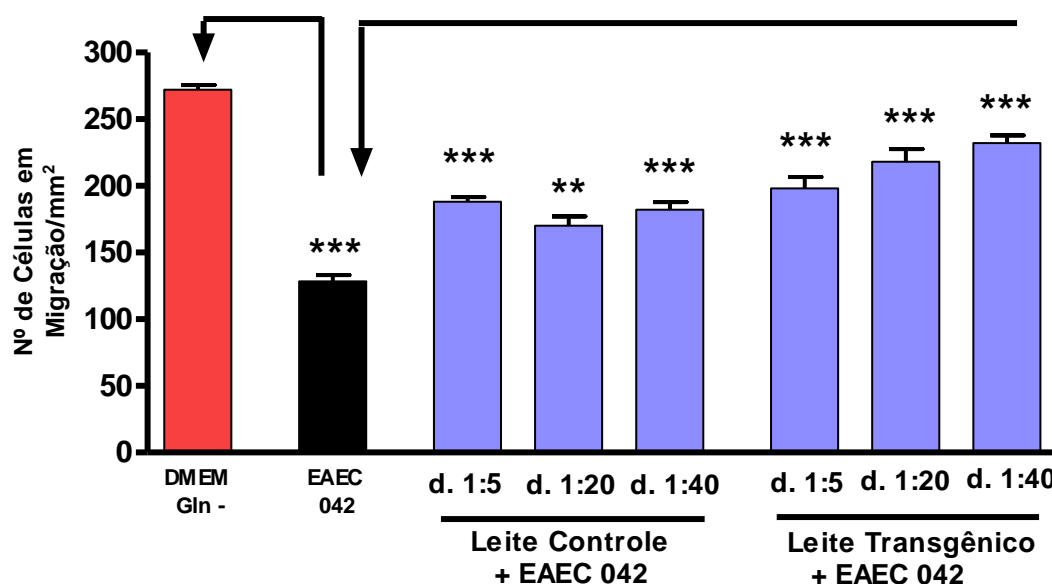
5.6.2.2 Migração na Presença da Cepa Bacteriana EAEC-042

Leite com a Camada Gordurosa

A figura 57 mostra os dados obtidos no ensaio de migração celular depois de 24 horas de incubação da cepa da bactéria EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL associada ao leite de cabra transgênico contendo lisozima humana nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40. Os dados mostram redução significativa da migração celular quando há exposição à cepa bacteriana da EAEC-042 ($p < 0,001$) quando comparados ao meio padrão DMEM livre de glutamina. Vê-se um aumento significativo da migração em todas as diluições, em ambos os leites associados à cepa bacteriana em comparação ao controle com a EAEC-042.

Houve aumento significativo da migração entre a diluição de 1:20 do leite de cabra transgênico quando comparada as diluições do leite controle de 1:20 ($p < 0,001$) e de 1:40 ($p < 0,05$). Assim como, aumento significativo da migração do leite transgênico na diluição 1:40 comparada as diluições do leite controle 1:5, 1:20 e 1:40 ($p < 0,001$).

Figura 57. Migração celular em IEC-6 depois de 24 horas de incubação com a cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada ao leite de cabra controle e transgênico, com a camada gordurosa, nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40 em meio DMEM sem glutamina.



Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

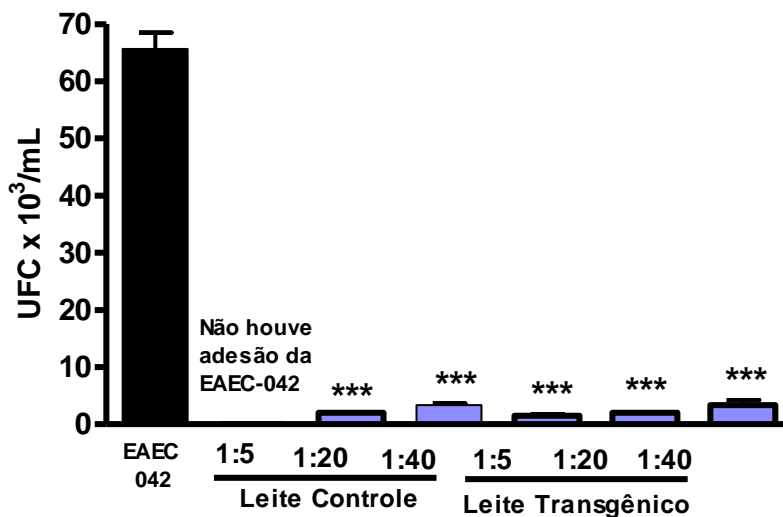
5.6.3 Adesão Bacteriana

Leite com a Camada Gordurosa

A figura 58 mostra os dados obtidos no ensaio de adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação do leite de cabra controle e transgênico, com a camada gordurosa, nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40 associados com a cepa bacteriana de EAEC- 042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. Ocorreu redução significativa ($p < 0,001$) em ambos os leites, controle e transgênico, em todas as diluições.

Não houve diferença significativa na adesão bacteriana quando comparado o leite de cabra controle ao leite de cabra transgênico.

Figura 58. Adesão bacteriana depois de 1 hora e 30 minutos de incubação com a cepa bacteriana EAEC 042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) associada ao leite de cabra, controle e transgênico, com a camada gordurosa, nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40.



Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, (***) $p < 0,001$) no programa GraphPad Prism versão 4.0.

5.6.4 Citometria de Fluxo

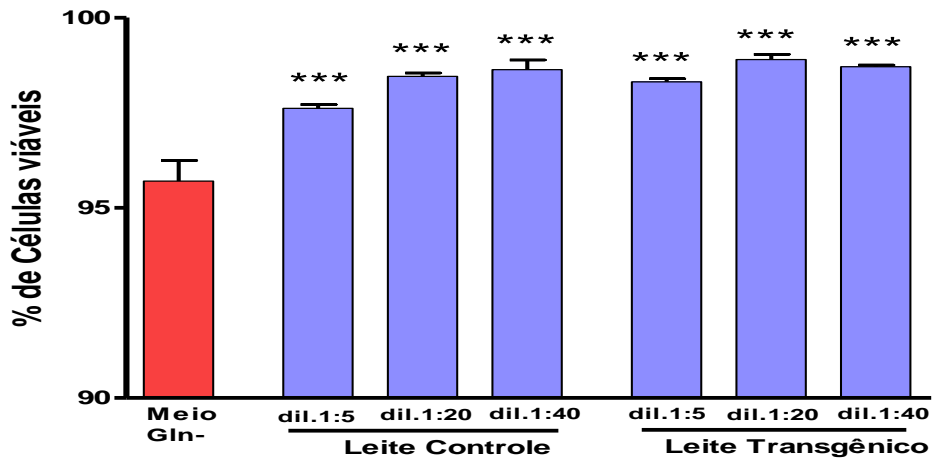
Leite com a Camada Gordurosa

As figuras 59A e 59B mostram a análise da viabilidade celular através da citometria de fluxo do leite de cabra controle e transgênico com a camada gordurosa, na ausência e na presença da EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente. Na figura 59A observa-se aumento significativo da viabilidade celular em ambos os leites, controle e transgênico ($p < 0,001$) quando comparados ao controle com meio DMEM livre de glutamina. Na figura 59B, na presença de EAEC-042, há aumento significativo da viabilidade celular comparado ao controle EAEC-042.

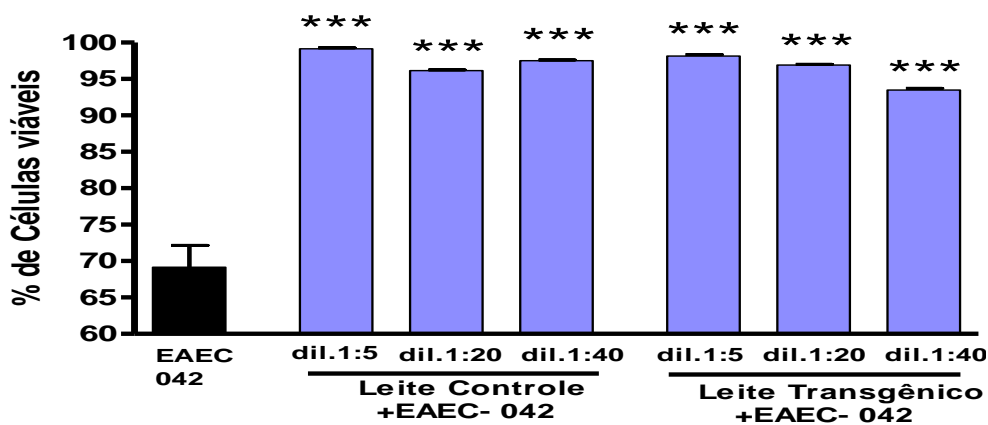
Na ausência da cepa bacteriana, a viabilidade celular foi significativamente reduzida na diluição de 1:5 do leite controle quando comparada a diluição de 1:20 do leite transgênico. Na presença da EAEC-042, o leite controle na diluição 1:5 apresentou aumento significativo da viabilidade celular quando comparado ao leite de cabra transgênico na diluição de 1:40 ($p < 0,01$). Assim como, a diluição de 1:5 do leite transgênico aumentou a viabilidade celular quando comparada a diluição de 1:40 do leite transgênico ($p, 0,05$).

Figura 59. Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células viáveis em meio contendo leite de cabra controle e transgênico, com a camada gordurosa nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40.

A



B



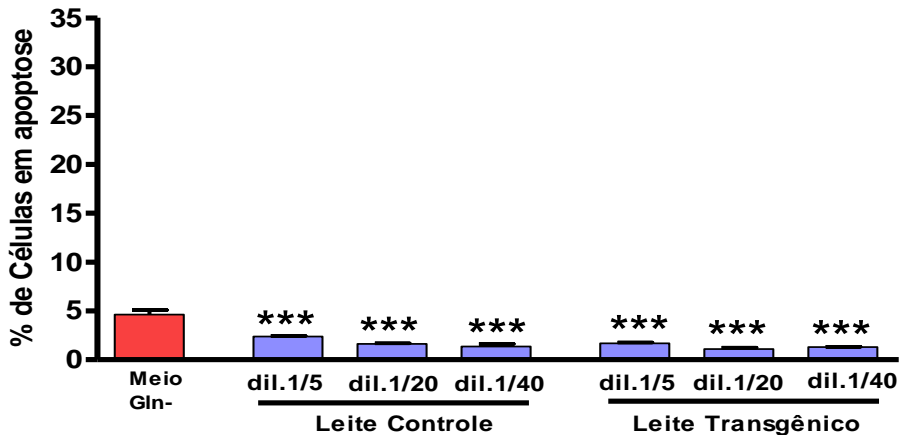
A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042 e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL). Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, no programa GraphPad Prism versão 4.0 (***) $p < 0,001$.

As figuras 60A e 60B mostram a análise da apoptose celular através da citometria de fluxo do leite de cabra, controle e transgênico, com a camada gordurosa, na ausência e na presença da EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente. Houve aumento significativo da apoptose celular na presença da EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. Na figura 60. A observa-se redução significativa da apoptose celular em ambos os leites, controle e transgênico ($p < 0,001$) quando comparados ao controle com meio DMEM livre de glutamina. Na figura 60B, na presença de EAEC-042, os leites controle e transgênico mostraram redução significativa da apoptose celular comparado ao controle EAEC-042.

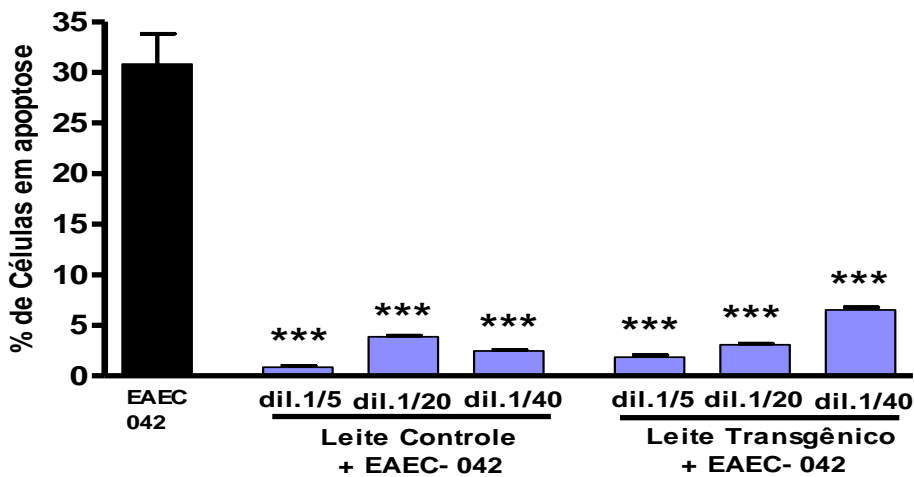
Houve redução significativa da apoptose nas diluições de 1:20 ($p < 0,01$) e 1:40 ($p < 0,05$) do leite transgênico comparado a diluição de 1:5 do leite controle na ausência da cepa EAEC-042. Na presença da bactéria, houve aumento significativo da apoptose celular na diluição de 1:40 do leite transgênico quando comparado as diluições de 1:5 tanto do leite controle controle ($p < 0,01$) como com o leite transgênico ($p < 0,05$).

Figura 60. Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em apoptose celular em meio contendo leite de cabra controle e transgênico, com a camada gordurosa, nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40.

A



B



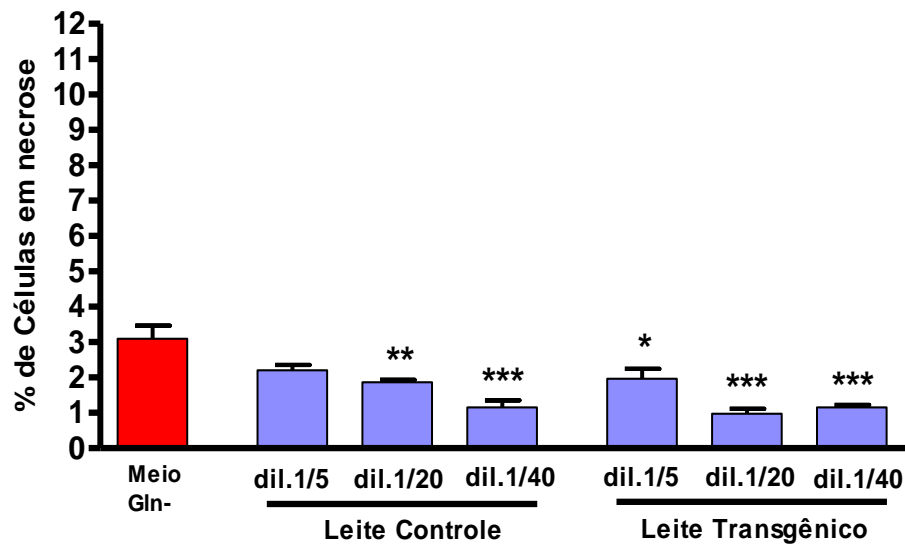
A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042 e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL). Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, no programa GraphPad Prism versão 4.0 (***) $p < 0,001$.

As figuras 61A e 61B mostram a análise da necrose celular através da citometria de fluxo do leite de cabra, controle e transgênico, com a camada gordurosa, na ausência e na presença da EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente. Houve aumento significativo da necrose celular na presença da EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. Na figura 61A observa-se redução significativa da necrose celular em nas diluições de 1:20 ($p < 0,01$) e 1:40 ($p < 0,001$) do leite controle e nas diluições 1:5 ($p < 0,05$) e 1:20 e 1:40 ($p < 0,001$) do leite transgênico quando comparados ao controle com meio DMEM livre de glutamina. Na figura 61B, na presença de EAEC-042, há redução significativa da necrose celular ($p < 0,001$) quando da associação do leite controle e transgênico quando comparado ao controle EAEC-042.

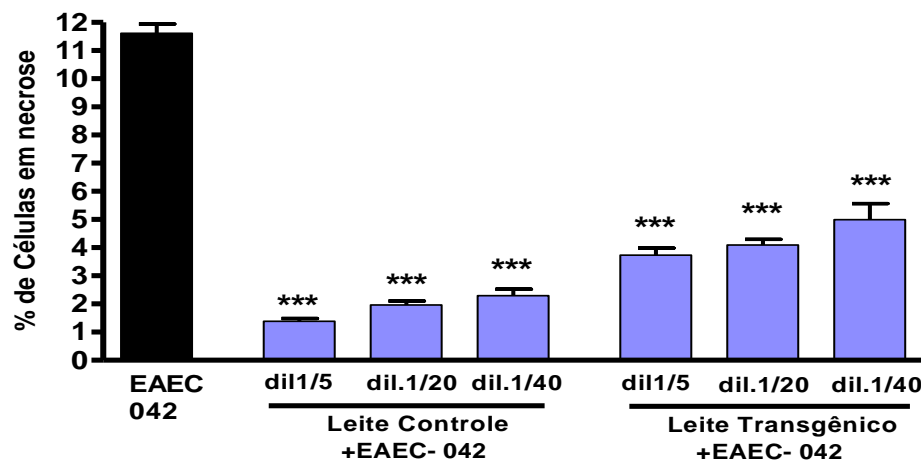
Houve redução significativa da necrose na diluição de 1:40 quando comparada a diluição de 1:5 do leite controle ($p < 0,05$) e na redução significativa da necrose nas diluições de 1:20 ($p < 0,01$) e 1:40 ($p < 0,05$) do leite transgênico comparada a diluição de 1:5 do leite controle na ausência da cepa EAEC-042. Na presença da bactéria, houve redução significativa da necrose celular na diluição de 1:5 do leite controle quando comparado as diluições de 1:5 ($p < 0,001$), 1:20 ($p < 0,001$) e 1:40 ($p < 0,001$) do leite transgênico. Houve redução significativa da necrose celular na diluição de 1:20 do leite controle quando comparado as diluições de 1:5 ($p < 0,01$), 1:20 ($p < 0,001$) e 1:40 ($p < 0,001$) do leite controle transgênico. Bem como, a necrose foi reduzida na diluição de 1:40 do leite controle quando comparada ao leite transgênico nas diluições de 1:5 ($p < 0,05$), 1:20 ($p < 0,01$) e 1:40 ($p < 0,001$).

Figura 61. Análise por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células em necrose celular em meio contendo leite de cabra controle e transgênico, com a camada gordurosa, nas diluições de 1:5; 1:20 e 1:40.

A



B

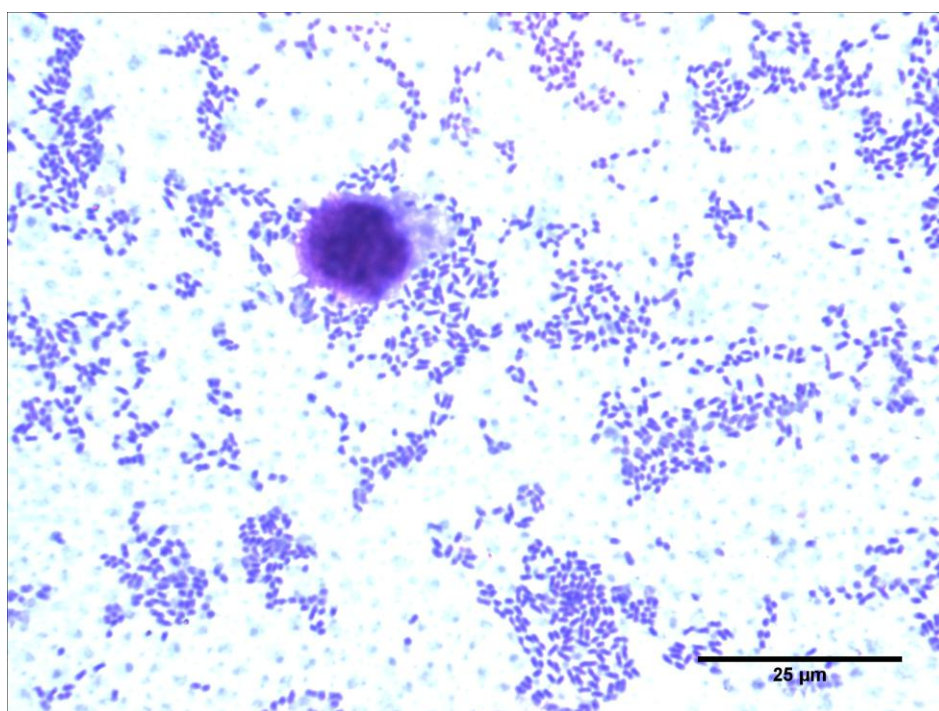


A) Na ausência da cepa bacteriana EAEC-042 e B) Na presença da cepa bacteriana EAEC-042 ($2,5 \times 10^5$ UFC/ mL). Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, no programa GraphPad Prism versão 4.0 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.7 Padrão de Aderência com EAEC-042

A figura 62 é meramente ilustrativa, pois a concentração usada não fez parte de qualquer ensaio neste estudo, aproximadamente 1×10^7 UFC/mL da cepa bacteriana de EAEC-042 aderida às células HEp-2 em meio essencial mínimo, porém o padrão de aderência fica mais evidente devido a alta concentração.

Figura 62. Padrão ouro de aderência da cepa bacteriana EAEC-042

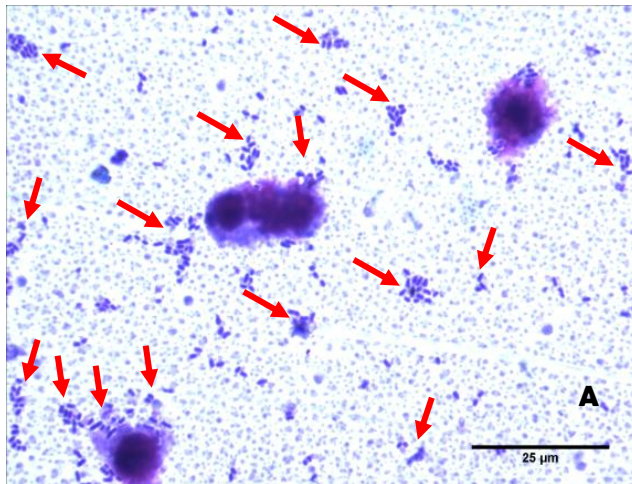


Concentração aproximada de 1×10^7 UFC/ mL).

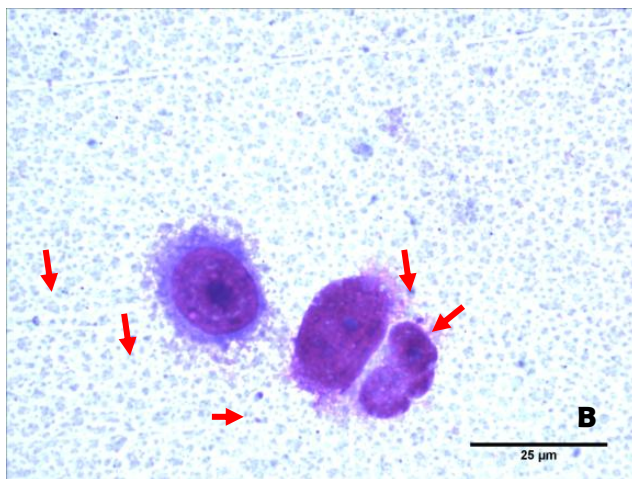
Na figura 63 está representado o padrão ouro de aderência bacteriana da cepa **(A)** EAEC-042 na concentração de $0,2 \times 10^2$ UFC/mL aderida às células HEp-2 em meio essencial mínimo e sua associação aos micronutrientes **(B)** Alanil-glutamina (10 mM), **(C)** Glutamina (10 mM), **(D)** β -caroteno (10 μ M) e **(E)** Zinco (30 μ M). Embora seja uma análise qualitativa observa-se uma redução na adesão bacteriana quando da presença de micronutrientes quando comparado ao controle com a cepa de EAEC-042 que se encontra repleto de bactérias como mostrado nas imagens a seguir.

5.7.1 Padrão de Aderência Bacteriana – Alanil-glutamina, Glutamina, β -Caroteno e Zinco – em células HEp-2

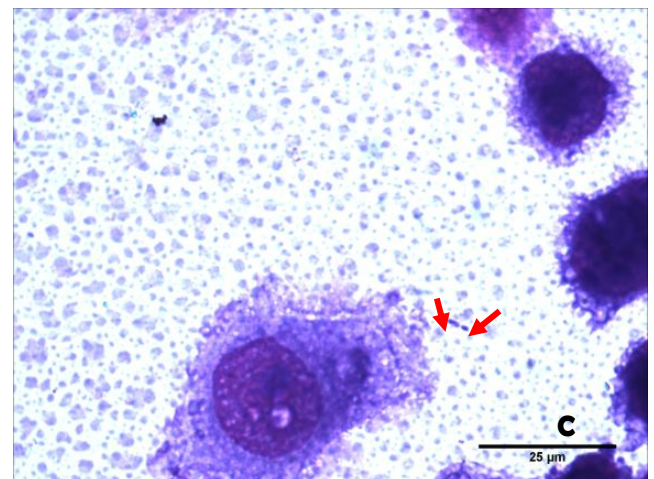
Figura 63. Padrão ouro de aderência bacteriana com células HEp-2.



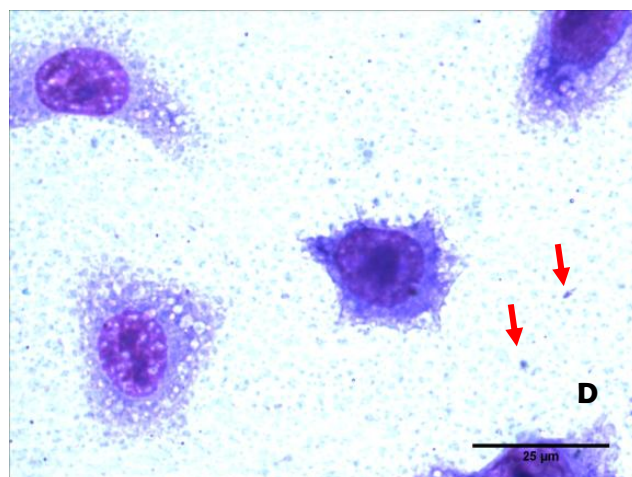
EAEC-042



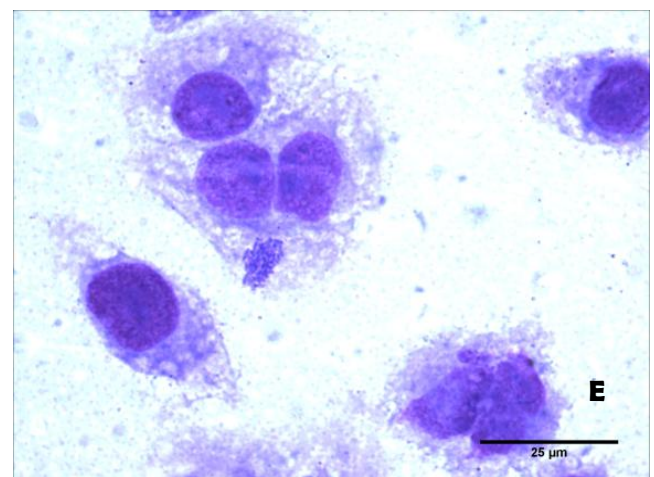
Alanil-glutamina 10mM + EAEC-042



Glutamina 10mM + EAEC-042



β -Caroteno 10 μ M + EAEC-042



Zinco 30 μ M

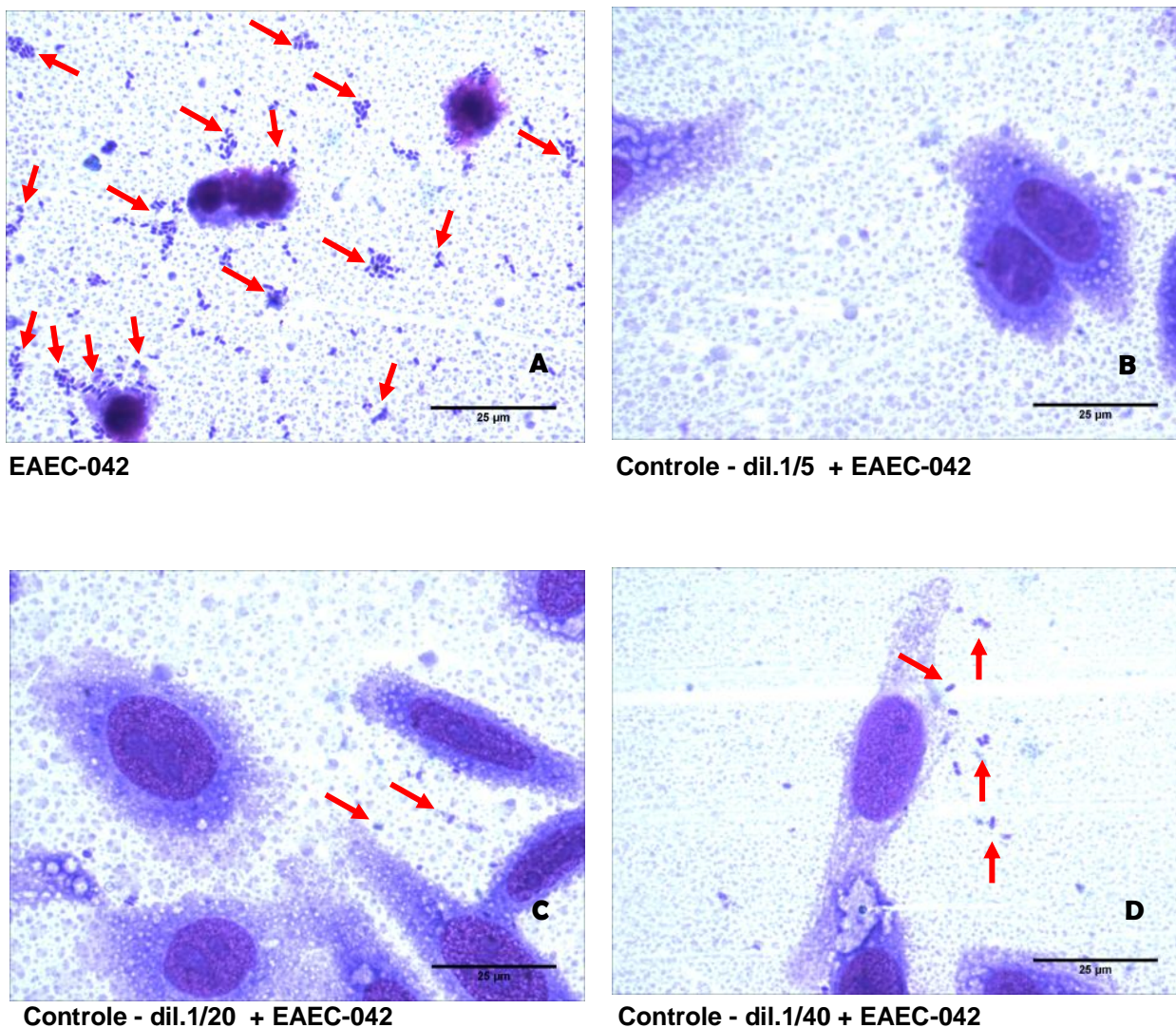
Coloração de May-Grunwald-Giemsa. (A) EAEC-042 ($0,2 \times 10^2$ UFC/ mL); (B) Alanil-glutamina 10 mM associada à EAEC-042; (C) Glutamina 10 mM associada à EAEC-042; (D) β -Caroteno 10 μ M associado à EAEC-042 e (E) Zinco 30 μ M associado à EAEC-042. Aumento de 1000X.

As figuras 64 e 65 representam o padrão ouro de aderência bacteriana da cepa EAEC-042 aderida às células HEp-2 em meio essencial mínimo acrescido de leite de cabra caprino natural e transgênico, respectivamente, com a remoção da camada gordurosa ambos nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40. Pode-se observar a quase ausência de adesão bacteriana no leite quando comparados à cepa de EAEC 042 que se encontra repleta de bactérias como mostrado abaixo. **(A)** Cepa bacteriana EAEC 042 $0,2 \times 10^2$ UFC/mL; Leite controle nas diluições **(B)** 1:5, **(C)** 1:20 e **(D)** 1:40; e leite transgênico nas diluições de **(E)** 1:5, **(F)** 1:20 e **(G)** 1:40.

5.7.2 Padrão de Aderência Bacteriana – em células HEp-2

Leite de Cabra Controle com a Remoção da Camada Gordurosa

Figura 64. Padrão ouro de aderência bacteriana com células HEp-2.

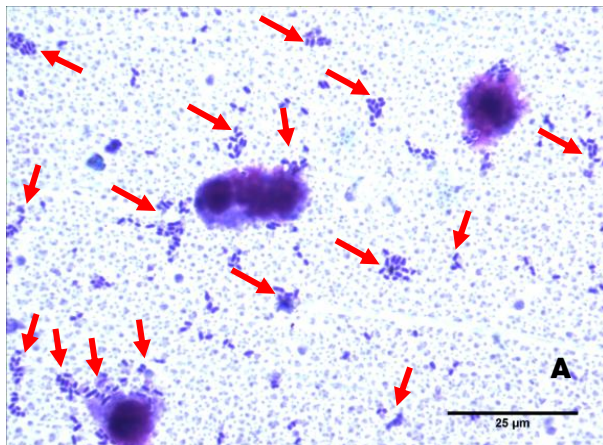


Coloração May-Grunwald-Giemsa. Ensaio feito com o leite sem a camada gordurosa. (A) EAEC 042 ($0,2 \times 10^2$ UFC/mL); Leite de cabra controle associado à EAEC 042 ($0,2 \times 10^2$ UFC/mL): (B) diluição 1:5; (C) diluição 1:20 ; (D) diluição 1:40. Aumento de 1000X.

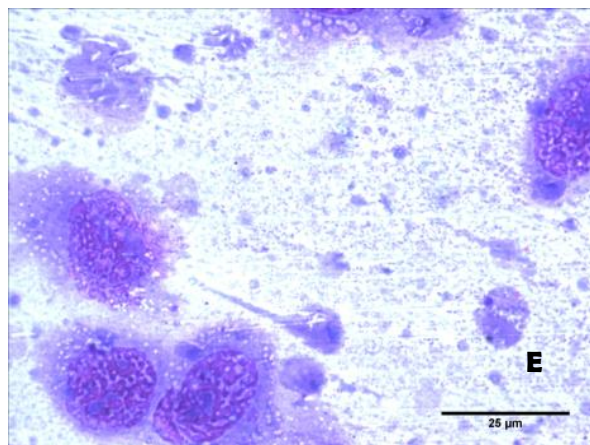
5.7.3 Padrão de Aderência Bacteriana – em células HEp-2

Leite de Cabra Transgênico com a Remoção da Camada Gordurosa.

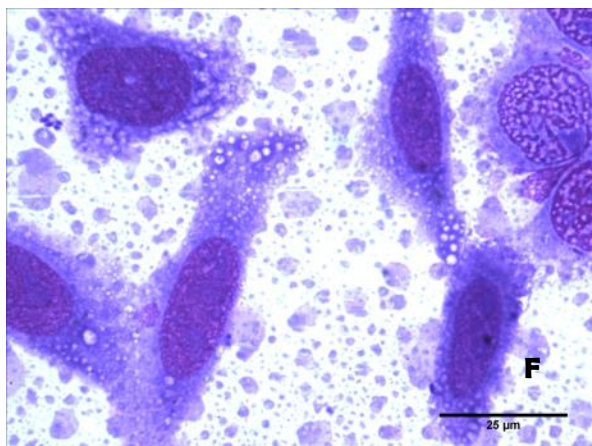
Figura 65. Padrão ouro de aderência bacteriana com células HEp-2.



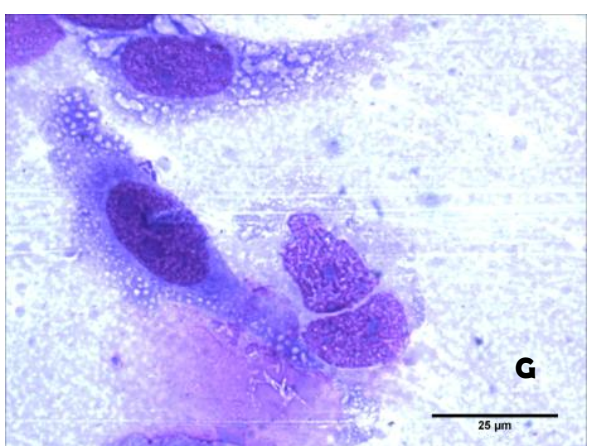
EAEC-042



Transgênico - dil.1/5 + EAEC-042



Transgênico - dil.1/20 + EAEC-042



Transgênico - dil.1/40 + EAEC-042

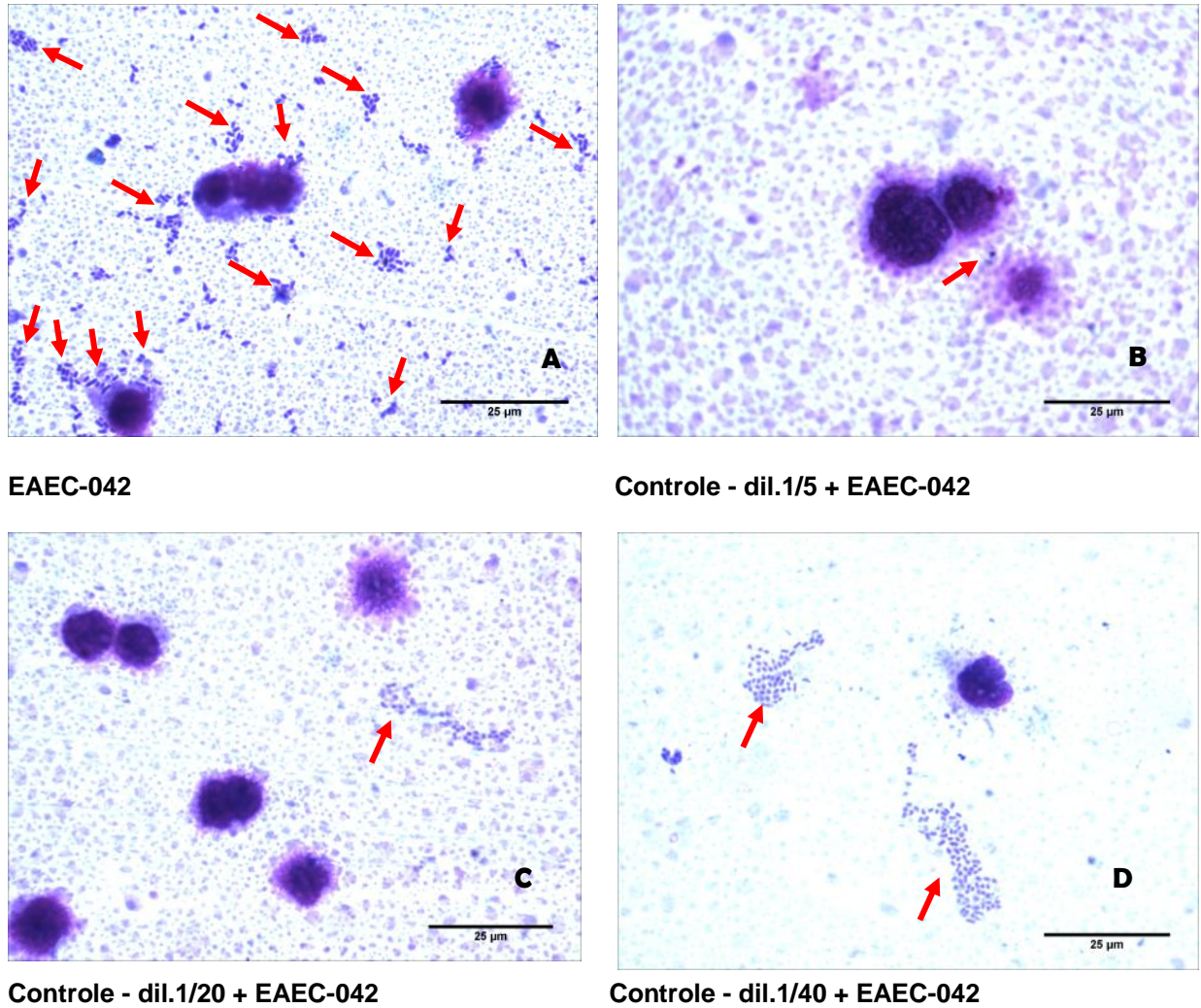
Coloração May-Grunwald-Giemsa. Ensaio feito com o leite sem a camada gordurosa. (A) EAEC 042 ($0,2 \times 10^2$ UFC/mL); Leite de cabra transgênico contendo lisozima humana associado à EAEC 042 ($0,2 \times 10^2$ UFC/mL): (E) diluição 1:5; (F) diluição 1:20 ; (G) diluição 1:40. Aumento de 1000X.

As figuras 66 e 67 mostram o padrão ouro de aderência bacteriana da cepa EAEC-042 aderida às células HEp-2 em meio essencial mínimo acrescido de leite caprino natural e transgênico, respectivamente, com a camada gordurosa, ambos nas diluições de 1:5, 1:20 e 1:40. Pode-se observar a quase ausência de adesão bacteriana nos leites quando comparados quantidade de bactérias aderidas na imagem **(A)** Cepa bacteriana EAEC 042 $0,2 \times 10^2$ UFC/mL; Leite controle nas diluições **(B)** 1:5, **(C)** 1:20 e **(D)** 1:40; e leite transgênico nas diluições de **(E)** 1:5, **(F)** 1:20 e **(G)** 1:40.

5.7.4 Padrão de Aderência Bacteriana – em células HEp-2

Leite de Cabra Controle Contendo a Camada Gordurosa

Figura 66. Padrão ouro de aderência bacteriana com células HEp-2

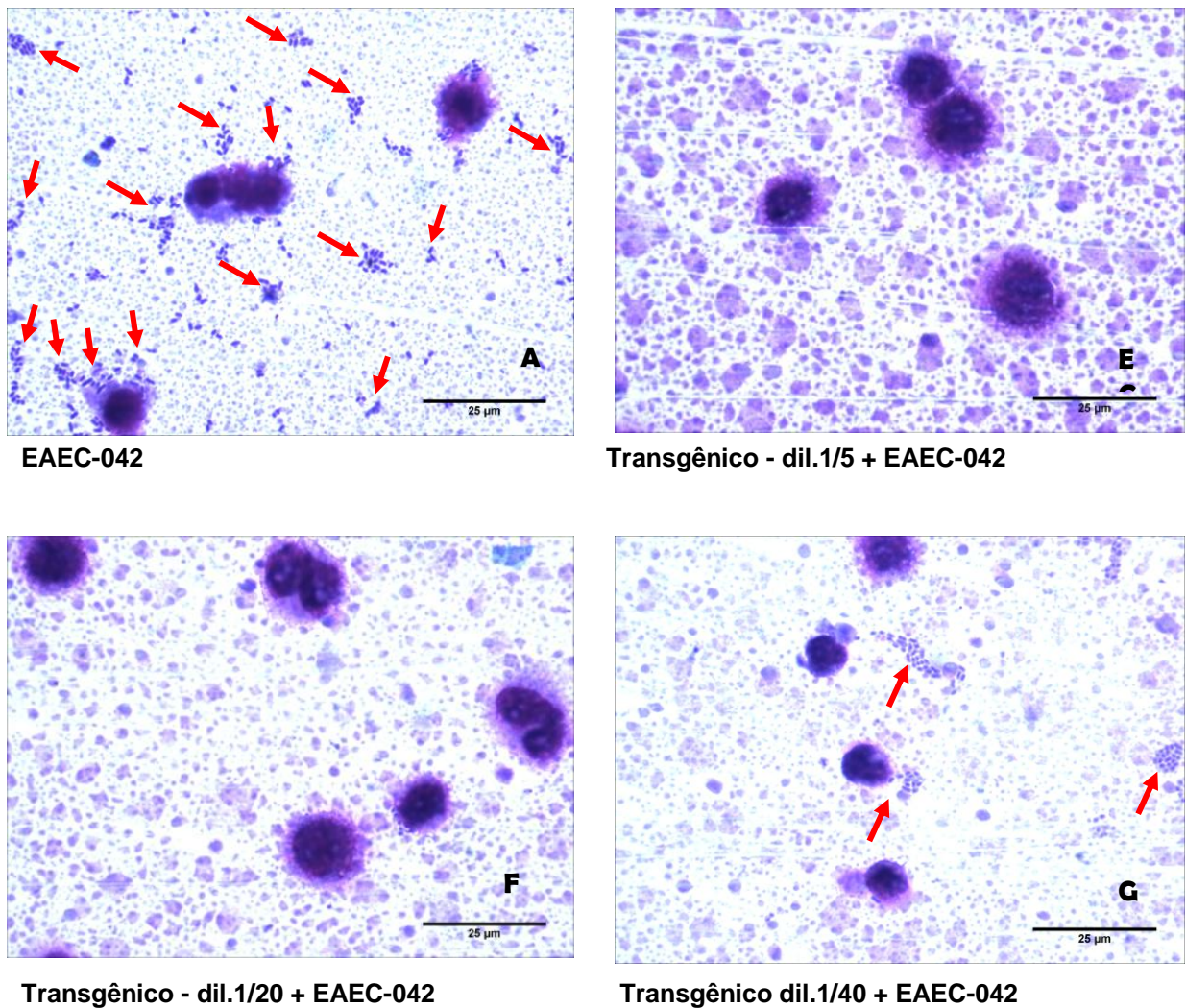


Coloração May-Grunwald-Giemsa. Ensaio feito com o leite com a camada gordurosa. (A) EAEC 042 ($0,2 \times 10^2$ UFC/mL); Leite de cabra controle associado à EAEC 042 ($0,2 \times 10^2$ UFC/mL): (B) diluição 1:5; (C) diluição 1:20 ; (D) diluição 1:40. Aumento de 1000X.

5.7.5 Padrão de Aderência Bacteriana – em células HEp-2

Leite de Cabra Transgênico Contendo a Camada Gordurosa

Figura 67. Padrão ouro de aderência bacteriana com células HEp-2



Coloração May-Grunwald-Giemsa. Ensaio feito com o leite com a camada gordurosa. (A) EAEC 042 ($0,2 \times 10^2$ UFC/mL); Leite de cabra transgênico contendo lisozima humana associado à EAEC 042 ($0,2 \times 10^2$ UFC/mL): (E) diluição 1:5; (F) diluição 1:20 ; (G) diluição 1:40. Aumento de 1000X.

Quadro 6 – Resumo dos Resultados Obtidos entre os Leites Controle e Transgênico

		LEITE SEM GORDURA	LEITE COM GORDURA
PROLIFERAÇÃO		*	*
MIGRAÇÃO	EAEC-042 ausente	*	*
	EAEC-042 presente	*	❖ transgênico (1:20) ❖ transgênico (1:40)
ADESÃO		*	*
CITOMETRIA			
VIABILIDADE	EAEC-042 ausente	*	*
	EAEC-042 presente	❖ controle (1:20)	*
APOPTOSE	EAEC-042 ausente	*	*
	EAEC-042 presente	❖ transgênico (1:20)	*
NECROSE	EAEC-042 ausente	❖ transgênico (1:5) ❖ transgênico (1:20)	*
	EAEC-042 presente	*	❖ Controle (1:5) ❖ Controle (1:20) ❖ Controle (1:40)

Observação: Análise comparativa de diluições semelhantes entre os leites

- * Não há diferença significativa entre os leites controle e transgênico
- ❖ Há diferença significativa entre os leites controle e transgênico nesta diluição

6 DISCUSSÃO

Em estudo realizado em crianças provenientes de uma comunidade carente em Fortaleza, no Ceará, nordeste brasileiro, foi demonstrado que doenças diarréicas persistentes constituem um fator de risco para desnutrição (MOORE, 2000; SCHORLING; GUERRANT, 1990). Além disso, observou-se que um episódio de diarréia persistente nos primeiros anos de vida nestas crianças, está associado com a queda do crescimento em 1,7cm e que isso implicaria possivelmente com no mínimo 1,5 a 4,0cm no déficit de crescimento aos 4 a 6 anos de idade (GUERRANT *et al.*, 1999; MOORE, 2001).

Uma das principais causas de diarréias persistente na infância em vários países do mundo, assim como nas comunidades de Fortaleza, no Ceará é a infecção intestinal causada pela EAEC (LIMA *et al.*, 2000). As crianças portadoras dessa bactéria, mesmo as que não apresentaram diarréia, mostraram déficit de crescimento, que pode ser devido a processos inflamatórios intestinais que levam a implicações fisiológicas outras, além da diarréia. A desnutrição e déficit cognitivos são também fatores preocupantes associados a esse microorganismo (STEINER *et al.*, 1998). A atrofia parcial do vilos ocasionando redução da digestão e absorção de nutrientes somada às lesões na função da barreira intestinal, alterando permeabilidade celular, permitindo translocação de macromoléculas, gera respostas imunológicas e inflamatórias. No entanto, muitos questionamentos sobre mecanismos envolvidos, assim como a gravidade da infecção ainda não estão claramente descritos (LUNN, 2000; BARBOZA *et al.*, 1999; FACUNDES-NETO *et al.*, 2000).

Neste estudo, os micronutrientes (em diferentes concentrações) e o leite caprino controle e transgênico (em três diferentes diluições) tiveram seus efeitos avaliados tanto na ausência como na presença da cepa bacteriana de EAEC-042 na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, exceto o ensaio de proliferação que foi feito apenas na ausência da bactéria.

Esta pesquisa demonstrou que na presença da cepa bacteriana EAEC-042 houve redução significativa da migração celular em cerca de 1/2 quando comparado com o controle. Também houve redução significativa da viabilidade

celular. Além disso, houve aumento significativo da morte celular tanto por apoptose, aproximadamente duas vezes maior que o controle com meio DMEM livre de glutamina, como por necrose que foi 5 (cinco) vezes maior que a necrose observada nos controles.

Dados da literatura mostram que um dos mecanismos da patogênese da infecção por EAEC é a sua aderência ao íleo terminal e ao colon por aderência agregativa da fímbria com produção de citotoxina como a *pet* (toxina codificada por plasmídeo). Esta bactéria causa enterite inflamatória, e pacientes com diarreia por EAEC apresentaram altos níveis de marcadores inflamatórios, incluindo a interleucina 8 (IL-8), lactoferrina e leucócitos. A IL-8 tem importante papel na patogênese da EAEC, pois recruta neutrófilos à mucosa epitelial intestinal, causando destruição epitelial e aumento da secreção de fluidos (HUANG *et al.*, 2007). Isso pode estar relacionado à atrofia do vilos com redução da digestão e absorção de nutrientes, um dos mecanismos que poderia justificar a perda de peso em crianças em desnutrição. Alteração da viabilidade celular e aumento de apoptose e necrose ocasionada pela presença da bactéria são fatores que alterariam a barreira epitelial intestinal afetando sua função e esses mecanismos necessitam de serem reforçados em estudos posteriores.

A renovação celular envolve processos naturais dinâmicos como a proliferação, migração, diferenciação, alteração na barreira funcional intestinal, apoptose e necrose, diretamente relacionados ao estado nutricional (ZIEGLER *et al.*, 2003). A suplementação alimentar com micronutrientes como a glutamina, alanil-glutamina, β -caroteno e zinco, bem como o leite caprino controle e transgênico, contendo lisozima humana, poderia atuar de forma benéfica na absorção intestinal protegendo e/ou recuperando a mucosa intestinal lesada (RUEMMELE *et al.*, 1999).

A glutamina, um dos aminoácidos mais abundantes no sangue, precursor para síntese de ácidos nucléicos, glutatona e outros aminoácidos, tem importante papel na proliferação celular. Atua prevenindo a atrofia da mucosa durante a inanição e é usado em nutrição parenteral. Apesar de ser usado na hidratação oral e mesmo na nutrição parenteral, o nutriente está ausente em produtos comercializados e em soluções mistas de reidratação, devido a sua instabilidade, principalmente em soluções ácidas, o que prejudica sua esterilização e dificulta o seu armazenamento, podendo gerar produtos como o glutamato, com propriedades

neurotóxicas (BRITO *et al.*, 2005b; TUHACEK *et al.*, 2004). Por esta razão foi desenvolvido o seu dipeptídeo como fonte de glutamina, a alanil-glutamina, que é um composto estável, altamente solúvel, e que suporta altas temperaturas.

A proliferação e a migração celular são fenômenos que agem em conjunto de modo a melhorar a função de renovação e reparo celular (DIGNASS, 2001). Uma lesão significativa na mucosa intestinal leva a mudanças ao longo da cripta que podem levar a uma hiperplasia compensatória (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004).

Nesta pesquisa, nos ensaios de proliferação celular, em células IEC-6, depois 24h de incubação com a glutamina e seu dipeptídeo alanil-glutamina na ausência da EAEC-042, houve aumento do efeito proliferativo nas concentrações de 10 e 30 mM, à semelhança do observado por BRITO *et al.*, 2005b. O aumento proliferativo com a glutamina iniciou-se com a concentração de 10 mM e permanecendo até a concentração de 30 mM. Quando analisado o efeito com o dipeptídeo, nota-se que este se inicia também com a concentração de 10 mM, porém, a curva começa a entrar em declínio quando 30 mM são acrescentados à cultura.

O β -caroteno, provitamina A, impede ou inibe a formação de radicais livres, devido ao seu importante papel como agente antioxidante. A principal fonte geradora de radicais livres é o estresse oxidativo. A deficiência de vitamina A pode levar, principalmente em crianças, à susceptibilidade a infecções e alterações da integridade de mucosas (STROBEL; TINZ; BIESALSKI, 2007). Extratos de ácidos graxos de cogumelos *Agaricus essettei* e *Agaricus bitorquis* com alto teor de beta-caroteno e ácido linoleico apresentam atividades antioxidantes, anticolinesterásicas e antimicrobiana, sendo eficazes contra bactérias Gram positivas, especialmente contra *Micrococos luteus*, *Micrococos flavus*, *Bacilos subtilis* e *Bacilos cereus*. No entanto, há muito a se esclarecer sobre sua ação contra bactérias.

Neste estudo, o β -caroteno aumentou a atividade proliferativa celular progressivamente de acordo com as concentrações de 1 a 10 μ M. Há necessidade de estudos posteriores para detalhamento de mecanismos não esclarecidos.

O zinco atua como um cofator essencial para diversas metaloenzimas e tem importante papel na imunidade, crescimento e divisão celular. Por anos, tem

sido bastante usado com sucesso no tratamento de diferentes tipos de lesões teciduais, servindo como agente protetor em pacientes com problemas gastrointestinais. Têm sido relatadas suas atividades sobre a redução de radicais livres e na ativação da mitose celular e na inibição bacteriana (ANDERSON, 1995).

O zinco é necessário a uma variedade de funções fisiológicas e bioquímicas: manutenção da barreira intestinal; função na resposta imunológica intestinal; redução do stress oxidativo e inibição da apoptose; participação na síntese e no metabolismo de ácidos nucléicos (RNA) e proteínas; importante na ação de hormônios, como insulina, glucagon, corticotróficos, hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante.

No ensaio de proliferação celular o zinco não mostrou efeito proliferativo nas concentrações de 3 a 100 μM , mas, com as concentrações de 150 a 300 μM houve efeito contrário, redução na proliferação celular. Cario *et al.*, 2000, mostraram que o zinco nas concentrações de 6, 25 e 50 μM não apresentava efeitos sobre a proliferação celular em monocamadas de células IEC-6 e que em concentrações superiores a 100 μM o zinco provoca efeito deletério sobre o epitélio. Nossos dados corroboram com este último relato.

Depois da remoção da camada gordurosa do leite não foi encontrado aumento significativo da proliferação celular em ambos os leites, controle e transgênico. Da mesma forma, também não houve diferença significativa entre leite caprino controle e transgênico. Embora, na presença da camada gordurosa, tenha ocorrido aumento significativo da proliferação, nas duas primeiras diluições (1:5 e 1:20) de ambos os leites.

O leite caprino possui um elevado teor de ácidos graxos de cadeia curta (caprílico, cáprico e capróico) que são importantes na profilaxia de tratamento de má absorção alimentar e distúrbios intestinais.

MCCORMACK; VIAR; JOHNSON, (1992) relataram a dependência das células IEC-6 de poliaminas para a migração celular. Como a glutamina é capaz de ativar a ornitina descarboxilase, uma enzima importante para a síntese de poliaminas (RHOADS *et al.*, 1997), este nucleotídeo assume papel importante na migração. Outros autores também mostraram dados que corroboram com os resultados desse estudo (MCCORMACK; VIAR; JOHNSON, 1992). Há relatos que

sua suplementação oferece resultados superiores aos encontrados com a glutamina (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2002).

Neste estudo, a migração celular foi investigada pela lesão da monocamada de células com uma lâmina cortante. Depois de 24 horas de incubação com o peptídeo glutamina e seu dipeptídeo alanil-glutamina foi demonstrado que houve aumento da migração, em concordância com resultados de BRITO *et al.*, 2005a . A glutamina e a alanil-glutamina estimularam a migração celular na ausência de EAEC-042, assim como também aumentaram o efeito migratório das células na presença da bactéria na concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL quando comparados aos controles de meio DMEM livre de glutamina e com a cepa bacteriana adicionada ao meio, respectivamente. Na ausência da bactéria, o efeito positivo na migração com a glutamina iniciou-se na concentração de 0,3 mM, permanecendo assim até 10 mM. Com a alanil-glutamina a migração aumentou significativamente a partir da concentração de 3 mM até 30 mM. Na presença da cepa EAEC-042 não houve aumento na migração na concentração de 0,3 mM de glutamina com aumento progressivo nas maiores concentrações, com melhores resultados em 10 e 30 mM. A alanil-glutamina apresentou aumento da migração em todas as concentrações estudadas, de 0,3 mM a 30 mM e a quantidade de células em migração foi bem superior (500/ mm²) ao número de células com a glutamina (300/ mm²).

Nesta pesquisa, na ausência da bactéria, a migração celular com o β -caroteno foi significativamente aumentada nas concentrações de 0,3 a 10 μ M e significativamente reduzida em 30 μ M. Na presença da EAEC-042, houve aumento significativo da migração nas concentrações de 0,3 a 10 μ M. Embora se observe que o número de células em migração na ausência da EAEC-042 é superior (550-750 mm²) comparado ao número de células na migração na presença desta (300-400 mm²).

Há autores que relatam um efeito contrário do β -caroteno em concentrações maiores, gerando uma ação pró-oxidante. É interessante investigar melhor os diversos mecanismos de ação do β -caroteno para melhor compreensão da questão.

O acetato de zinco, na ausência da EAEC-042 levou a um aumento significativo da migração celular somente na concentração de 10 μM , mas reduziu a migração na concentração maior de 300 μM . Com a presença da EAEC-042, pode-se observar um aumento significativo da migração nas concentrações de 3 a 100 μM . Na concentração de 150 μM houve redução significativa da migração e na a maior concentração 300 μM , não houve migração celular.

Foi demonstrado que concentrações fisiológicas de sulfato de zinco (<100 μM) aumentam significativamente a migração, enquanto que concentrações supra fisiológicas (>100 μM) dificultam a reconstituição e eventualmente induzem à morte celular.

O resultado obtido no ensaio de migração celular, na ausência da EAEC-042, com a remoção da camada gordurosa do leite, mostrou que houve aumento significativo na migração na presença do leite na diluição de 1:20. No entanto, na presença da EAEC-042, apenas na diluição de 1:40 de leite houve um aumento significativo da migração. Com a camada gordurosa e na ausência da EAEC-042, não houve aumento significativo na migração celular quando ambos os leites, controle e transgênico foram testados. Mas, na presença da EAEC-042, os dois leites levaram a aumento significativo da migração. Vale ressaltar que nas diluições de 1:20 e 1:40 do leite de cabra transgênico a migração foi significativamente aumentada em relação as mesmas diluições com o leite controle.

O leite humano contém diversas substâncias bioativas e conhecidamente com propriedades antioxidantes em células do trato gastrointestinal, bem como a espermina, uma poliamina. As poliaminas, como descrito anteriormente, assumem papel importante na migração celular; sendo capazes de reduzir o estresse oxidativo do peróxido de hidrogênio sobre células IEC-6. A lisozima presente no leite humano tem ação antimicrobiana e participa na modulação da resposta inflamatória.

A integridade da barreira epitelial intestinal é de fundamental importância para manutenção das células epiteliais, bem como para prevenir a entrada de bactérias patogênicas que causem inflamação (LU; WALKER, 2001). Os micronutrientes e o leite caprino estudados são conhecidos por seus efeitos benéficos na renovação e reparo celular, manutenção da integridade da membrana

celular, propriedades antioxidantes e antibacterianas, além de outras citadas anteriormente.

Neste estudo, a atividade anti-adesão bacteriana do leite caprino e micronutrientes foi investigada. A glutamina mostrou redução significativa da adesão bacteriana nas concentrações de 10 e 30 mM. A alanil-glutamina, reduziu significativamente a adesão a partir da concentração de 3 mM, que se acentuou nas concentrações de 10 e 30 mM, uma resposta praticamente duas vezes mais acentuada quando comparada a glutamina nas mesmas concentrações. Segundo BRITO *et al.* (2002), a glutamina e alanil-glutamina conferem proteção contra agressão da toxina A do *Clostridium difficile* agindo na manutenção da integridade da membrana celular, aumentando a resistência elétrica transepitelial e conseqüentemente redução da permeabilidade celular envolvendo as proteínas de adesão. Neste estudo, os mecanismos dessa resposta frente à EAEC-042, que possui diversos fatores de virulência, deverão ser posteriormente investigados.

Nesta pesquisa, o β -caroteno induziu redução significativa da adesão bacteriana nas concentrações de 10 e 30 μ M. Os danos celulares podem ser gerados pelo próprio organismo e são provenientes do metabolismo celular, é o chamado estresse oxidativo. O que constitui a principal fonte de radicais livres. São assim denominados por serem uma molécula ou fragmento molecular que contém um ou mais elétrons na sua camada mais externa. A principal fonte endógena de radicais livres é a peroxidação lipídica. Todos os organismos estão susceptíveis ao estresse oxidativo, pois as espécies de oxigênio semi-reduzido, superóxido e peróxido de hidrogênio, são produzidos pelas mitocôndrias durante a respiração. Estudos sugerem um papel antioxidante dos carotenóides, como o β -caroteno, cuja ação antioxidante se deve à sua estrutura química, pois pode reagir diversas vezes com radicais peróxilas para formar compostos estáveis (BURTON, 1989).

O acetato de zinco reduziu a adesão bacteriana na concentração de 300 μ M, porém esse efeito foi devido à ação tóxica dessa alta concentração, pois à microscopia se observaram danos na própria monocamada de células, com destruição completa, da mesma forma que a sua ação na EAEC-042 se deve possivelmente a um efeito bactericida e não à redução de adesão da bactéria à célula.

Alguns autores relatam o efeito protetor do zinco pela sua ação antibacteriana, pelo seu efeito inibidor do crescimento de algumas espécies de bactérias, como *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius*, *Enterococcus faecalis* e *Porphyromonas gingivalis*, envolvidas em infecções endodônticas. Algumas bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis ao zinco que as bactérias Gram-negativas. Roselli *et al.* (2003) demonstraram que o zinco exerce efeito protetor às células epiteliais contra a infecção pela *Escherichia coli enterotoxogênica* pela inibição da adesão e da internalização bacteriana, prevenindo o aumento da permeabilidade, e pela modulação da expressão de citocinas.

Neste estudo, o leite caprino controle e transgênico reduziram a adesão bacteriana independentemente da presença da camada de gordura, embora a resposta tenha sido mais acentuada na presença de gordura.

É conhecida a propriedade do leite humano de proteção contra as infecções. A qual está ligada às atividades antimicrobiana da lisozima e da lactoferrina. O leite transgênico caprino contendo lisozima é capaz de reduzir o crescimento bacteriano, mais efetivo contra bactérias Gram-positivas, por possuírem uma camada de peptidoglicano mais espessa, mas também, como demonstrado por diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm atividade contra bactérias Gram-negativas (BRUNDIGE *et al.*, 2008; MAGA *et al.*, 2006).

Na ausência da cepa EAEC-042, a análise da viabilidade celular por citometria de fluxo, na presença de glutamina, nas concentrações de 3 e 10 mM não houve alteração da viabilidade celular, apesar de uma redução na concentração de 30 mM. Quando a alanil-glutamina foi adicionada ao meio, pode-se observar que nas concentrações de 3, 10 e 30 mM houve aumento na viabilidade celular, o que demonstra um maior efeito protetor sobre a célula que a glutamina. Esses resultados são coerentes de certa forma com aqueles dados aqui obtidos quanto à migração celular. Pode-se observar nos ensaios realizados por BRITO *et al.* (2005b) que a concentração de 10 mM teve melhor efeito e em 30 mM começa uma redução. Não houve indução significativa da apoptose pela glutamina, mas a alanil-glutaminalevou à redução da apoptose nas concentrações de 3, 10 e 30 mM. A necrose celular decorrente da privação da glutamina no meio controle DMEM foi revertida com glutamina nas concentrações de 3 e 10 mM. O efeito apoptótico foi reduzido

gradativamente à medida que as concentrações de alanil-glutamina aumentaram, mas somente com significância na concentração de 30 mM.

Na presença da cepa EAEC-042, houve aumento da viabilidade celular com a glutamina nas concentrações de 3, 10 e 30 mM, resposta semelhante à obtida com seu dipeptídeo, mostrando que ambos conseguem reverter a lesão celular causado pela bactéria referente à preservação da viabilidade. A apoptose induzida pela bactéria foi reduzida pela metade quando houve adição de glutamina ou de seu dipeptídeo ao meio de cultura, com redução de aproximadamente 6 (seis) vezes maior com alanil-glutamina, mostrando que sobre a apoptose celular o dipeptídeo atua com muita eficiência, embora a glutamina também seja eficaz. A glutamina é conhecida necessária para vários tipos celulares e sua privação causa apoptose celular (MINAMOTO, 1991; PAPACONSTATINOU, 1998, 2000). A necrose foi reduzida em quase 3 (três) vezes pela glutamina nas concentrações de 3 e 10mM. Na concentração de 30mM essa redução foi 10 (dez) vezes maior, mas vale ressaltar que esta concentração causou redução da viabilidade celular. O efeito na redução da necrose com a alanil-glutamina foi praticamente duas vezes superior que o obtido com a glutamina.

O β -caroteno aumentou significativamente a viabilidade celular, na ausência da EAEC-042, nas concentrações de 3 e 10 μ M. Nestas mesmas concentrações houve redução da apoptose celular e não houve alteração sobre a necrose. Na presença da EAEC-042, o β -caroteno na concentração de 3 μ M causou redução no número de células viáveis e provocou aumento da apoptose, porém o micronutriente nas concentrações de 3, 10 e 30 μ M reduziu a necrose. A ação protetora do β -caroteno ainda precisa de investigações futuras. Talvez sua atividade antioxidante tenha papel sobre os mecanismos que inibem a necrose celular promovida pela EAEC-042.

Na ausência da bactéria, o acetato de zinco aumentou a viabilidade celular nas concentrações de 30, 100 e 150 μ M e reduziu a apoptose observada no meio controle DMEM privado de glutamina. Na presença da EAEC-042, os efeitos sobre a viabilidade celular e apoptose foram revertidos nas concentrações estudadas. O zinco possui efeito inibidor do crescimento bacteriano, bem como atua como agente protetor de células epiteliais pela inibição do aumento da

permeabilidade celular através da modulação de citocinas. Muitos efeitos do zinco são ainda desconhecidos e necessitam de investigação mais profunda para elucidação dos mecanismos envolvidos.

O leite controle e transgênico sem a remoção da camada gordurosa, na ausência da EAEC-042 não alterou a viabilidade celular. No entanto, o leite com a camada gordurosa, tanto o natural como o transgênico, aumentou a viabilidade celular. Também em todas as concentrações reduziu a apoptose celular, mas com remoção da camada gordurosa não interferiu na apoptose.

Houve aumento da necrose celular com o leite natural nas três diluições analisadas e na diluição de 1:20 com o leite de cabra transgênico, sem a camada gordurosa. Houve diferença significativa entre o leite caprino transgênico na diluição de 1:5 comparado ao leite natural na mesma diluição na redução da necrose celular. Foi mostrada uma redução significativa da necrose na diluição de 1:20 do leite de cabra transgênico comparada à diluição de 1:20 do leite controle. Na presença da camada gordurosa pode-se observar uma redução da necrose nas diluições de 1:20 e 1:40 do leite controle, O leite de cabra transgênico reduziu a necrose nas três diluições estudadas.

A análise realizada na presença da cepa bacteriana de EAEC-042, com remoção da camada gordurosa, tanto o leite controle como o leite de cabra transgênico, nas diluições estudadas, reverteram a redução da viabilidade celular estimulada pela EAEC-042. Houve aumento da viabilidade na diluição de 1:20 do leite controle quando comparado a diluição de 1:20 do leite de cabra transgênico. Na presença da camada gordurosa, houve um aumento acentuado da viabilidade celular quando ambos os leites em todas as diluições foram acrescentados ao meio, em comparação com o efeito ocasionado pela bactéria. A apoptose celular foi reduzida por ambos os leites, na ausência da camada gordurosa. Apresentando melhor resposta na redução da apoptose o leite de cabra transgênico na diluição de 1:20 comparada a mesma diluição do leite natural. Na presença da camada gordurosa, houve redução da apoptose na presença de ambos os leites nas diferentes diluições. Foi acentuada a redução da necrose induzida pelos leites (controle e transgênico) com remoção da camada gordurosa nas diferentes diluições quando comparada à redução da necrose induzida pelo natural e transgênico com a

camada gordurosa. O leite natural apresentou diferença significativa na redução celular na diluição de 1:5, quando comparada a mesma diluição do leite de cabra transgênico. O mesmo ocorrendo na diluição de 1:20 do controle comparado ao transgênico e na diluição de 1:40.

Muito se desconhece sobre os efeitos e os mecanismos envolvidos na modulação do leite sobre o epitélio intestinal, no que concerne à análise da viabilidade, apoptose e necrose, talvez a implicação de fatores como as poliaminas que são capazes de reduzir o estresse oxidativo do peróxido de hidrogênio sobre células IEC-6. Também a participação da lisozima presente no leite humano tem ação antimicrobiana e participa na modulação da resposta inflamatória, somados a diversos fatores que deverão ser esclarecidos para uma maior compreensão do efeito protetor do leite caprino.

Foram também demonstrados nesta pesquisa uma ação antibacteriana dos micronutrientes glutamina, alanil-glutamina, β -caroteno e zinco, assim como a atividade dos leites natural e transgênico como barreira protetora reduzindo ou mesmo impedindo a adesão da cepa EAEC-042 às células epiteliais intestinais.

7 CONCLUSÃO

A cepa bacteriana de EAEC-042 levou à redução da migração e da viabilidade celular. A principal causa de morte celular provocada pela bactéria se deve a apoptose.

Os micronutrientes glutamina, alanil-glutamina, β -caroteno e acetato de zinco e os leites de cabra controle e transgênico tiveram um efeito positivo aumentando proliferação celular, migração celular e viabilidade celular. Estes fatores também preveniram a adesão da cepa EAEC-042 nas células epiteliais intestinais *in vitro* e reverteram o efeito sobre a morte celular por apoptose e necrose.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, M.J.; FARUQUE, A.S.G.; FARUQUE, S.M.; SACK, R.B.; MAHALANABIS, D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 11, p. 3458-3464, 1999.
- ALBERT, M.J.; FARUQUE, S.M.; FARUQUE, A.S.G.; NEOGI, P.K.B.; ANSARUZZAMAN, M.; BHUIYAN, N.A.; ALAM, K.; AKBAR, M.S. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in bangladeshi children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 4, p. 973-977, 1995.
- ALEDO, J. C. Glutamine breakdown in rapidly dividing cells: waste or investment? **BioEssays.**, v. 26, n. 7, p. 778-785, 2004.
- ALTEHELD, B.; EVANS, M. E.; GU, L. H.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F. H.; JONES, D. P.; ZIEGLER, T. R. Alanylglutamine dipeptide and growth hormone maintain PepT1-mediated transport in oxidatively stressed Caco-2 cells. **J. Nutr.**, v. 135, n. 1, p. 19-26, 2005.
- ANDERSON, J. M.; VAN ITALLIE, C. M. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. G467 – G475, 1995.
- BARBOZA, J. M. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p.1499-1504, 1999.
- BASTARACHE, E. **Le zinc et ses composés**. Disponível em: <<http://www.sorel-tracy.qc.ca/edouarddb/>>. Smart.Conseil>. Acesso em: 22 set. 2004.
- 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. 1249-1251, 1990.
- BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4302-4311, 2002.
- BHATNAGAR, S.; BHAN, M.K.; SOMMERFELT, H., SAZAWAL, S.; KUMAR, R.; SAINI, S. - Enteroaggregative *Escherichia coli* may be a new pathogen causing acute and persistent diarrhea. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 25, p. 579-583, 1993.
- BJERKNES M., CHENG H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. **Gastroenterology**, v. 116, p. 7-14, 1999.
- BLAKE, C. C.; JOHNSON, L. N.; MAIR, G. A.; NORTH, A. C.; PHILLIPS, D. C.; SARMA, V. R. Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 167, p. 378-388, 1967.

BOISEN, N.; STRUVE, C.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P. New adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 7, p. 3281-3292, 2008.

BOHNSACK, B. L.; HIRSCHI, K. K. Nutrient regulation of cell cycle progression. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 24, p. 433-453, 2004.

BOULETREAU P. ; CHAMBRIER C. **Immunomodulation et nutrition entérale**. Conférences d'actualisation. Paris : Elsevier, 1996.

BRITO G.A.C., ALCÂNTARA C., CARNEIRO-FILHO, B.A., GUERRANT R.L. Pathophysiology and impact of enteric bacterial and protozoal infections: New approaches to therapy. **Chemotherapy.**, v. 51, Suppl. 1, p. 23-35, 2005a.

BRITO, G. A. C. Mechanism of *Clostridium difficile* toxina A-induced apoptosis in T84 cells. **J. Inf. Dis.**, v. 186, p. 1438-47, 2002.

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, 2005b.

BROEKAERT, I. J.; NANTHAKUMAR, N. N.; WALKER, W. A. Secreted probiotic factors ameliorate enteropathogenic infection in zinc-deficient human Caco-2 and T84 cell lines. **Pediatr. Res.**, v. 62, n. 2, p. 139-144, 2007.

BROOKS, J. T. ; OCHIENG, J. B. ; KUMAR, L. ; OKOTH, G. ; SHAPIRO, R. L. ; WELLS, J. G. ; BIRD, M. ; BOPP, C. ; CHEGE, W. ; BEATTY, M. E. ; CHILLER, T. ; VULULE, J. M. ; MINTZ, E. ; SLUTSKER, L. Surveillance for bacterial diarrhea and antimicrobial resistance in rural Western Kenya, 1997-2003. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 393-401, 2006.

BROSNAN, J. T. Interorgan amino acid transport and its regulation. **J. Nutr.**, v. 133, n. 6, 2068S-2072S, 2003.

BRUNDIGE, D. R.; MAGA, E. A.; KLASING, K. C.; MURRAY, J. D. Lysozyme transgenic goats' milk influences gastrointestinal morphology in young pigs. **J. Nutr.**, v. 138, n. 5, p. 921-926, 2008.

BURTON, G. W. Antioxidant action of carotenoids. **J. Nutr.**, v. 119, p. 109-111, 1989.

BUTTKE, T. M.; SANDSTROM, P. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. **Immunol. Today**, v. 15, p. 7-10, 1994.

CANEIRO-FILHO, B. A.; BUSHEN, O. Y.; BRITO, G. A.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Glutamine analogues as adjunctive therapy for infectious diarrhea. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 5, n. 2, p. 114-119, 2003.

CARNEIRO-FILHO BA, ORIA RB, WOOD RK, BRITO GA, FUJII J, OBRIG T, LIMA AA, GUERRANT RL. Alanylglutamine hastens morphologic recovery from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. **Nutrition**, v.20, n. 10, p. 934–941, 2004.

CHANDAN, R. C.; PARRY JR., R. M.; SHAHANI, K. M. Lysozyme, lipase, and ribonuclease in milk of various species. **J. Dairy Sci.**, v. 51, p. 606-607, 1968.

CHENG, M.; BOGGETT-CARSIENS, J. Consider sensory processing disorders in the explosive child: case report and review. **Can. Child Adolesc. Psychiatr Rev.**, v. 14, n. 2, p. 44-48, 2005.

COHEN, M. B.; NATARO, J. P.; BERNSTEIN, D. I.; HAWKINS, J.; ROBERTS, N.; STAAT, M. A. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. **J. Pediatr.**, v. 146, p. 54-61, 2005.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M.; 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, 1979.

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. **The Lancet**, v.337, p. 262-264, 1991.

CRUZAT, V. F.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Effects of supplementation with free glutamine and the dipeptide alanyl-glutamine on parameters of muscle damage and inflammation in rats submitted to prolonged exercise. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 28, n. 1, p. 24-30, 2010.

CZECZULIN, J. R.; BALEPUR, S.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.; HALL, R.; KOTHARY, M. H.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 10, p. 4135-4145, 1997.

CZECZULIN, J. R.; WHITTAM, T. S.; HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 6, p. 2692-2699, 1999.

DEBROY, C.; BRIGHT, B. D.; WILSON, R. A.; YEALY, J.; KUMAR, R.; BHAN, M. K. Plasmid-coded DNA fragment developed as a specific gene probe for the identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v. 41, n. 6, p. 393-398, 1994.

DONNELLY, M. A.; STEINER, T. S. Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. **J. Biol. Chem.**, v.277, n. 43, p. 20456-20461, 2002.

DIGNASS AU. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. **Inflamm. Bowel. Dis.**, v.7, n. 1, p. 68–77, 2001.

DONNENBERG, M. S. Pathogenic strategies of enteric bacteria. **Nature**, v. 406, n. 17, p. 768-774, 2000.

DUGGAN, C.; GANNON, J.; WALKER, W. A. Protective nutrients and nutritional foods for the gastrointestinal tract. **AM. J. Clin. Nutr.**, v. 75, p. 789- 808, 2002.

ECHEVERRIA, P.; SERICHANTALERG, O.; CHANGCHAWALIT, S.; BAUDRY, B.; LEVINE, M. M.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I. Tissue culture-adherent *Escherichia coli* in infantile diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 165, n. 1, p. 141-143, 1992.

ELLISON, R. T.; GIEHL, T. J. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 1080-1091, 1991.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCIA, F.; CZECZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 7, p. 3155-3163, 1998.

ESLAVA, C.; VILLASECA, J.; MORALES, R.; NAVARRO, A.; CRAVIOTO, A. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 93rd, 1993, Washington D. C. **Abstracts...** Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1993. Abstr. B-105, p. 44.

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

FANG, G.D.; LIMA, A.A.M.,; MARTINS, C.V.; NATARO, J.P.; GUERRANT, R.L. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v.21, n. 2, p. 137-144, 1995.

FASANO, A. Toxins and the gut: role in human disease. **Gut**, v. 50, Suppl. III. p. iii9-iii14, 2002.

FLORES, J.; OKHUYSEN, P. C. Enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 1, p. 8-11, 2009.

FORDTRAN, J.S. Speculations on the pathogenesis of diarrhea. **Fed. Proc.**, v. 26, n. 5, p. 1405 – 1414, 1967.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Surface application of lysozyme, nisin, and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and bologna. **J. Food Prot.**, v. 63, p. 1338-1346, 2000.

GINSBURG, I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, p. 171-179, 2002.

GIRÓN, J.A., JONES, T.; MILLAN-VELASCO, F.; CASTRO-MUÑOS, E.; ZÁRATE, L.; FRY, J.; FRANKEL, G.; MOSELEY, S.L.; BAUDRY, B.; KAPER, J.B.;

SCHOOLNIK G.K.; RILEY, L.W. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in mayan children in Mexico. **J. Infect. Dis.**, v. 163, p. 507-513, 1991.

GOLAN, L.; GONEN, E.; YAGEL, S.; ROSENSHINE, I.; SHPIGEL, N. Y. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* induce attaching and effacing lesions and hemorrhagic colitis in human and bovine intestinal xenograft models. **Dis.Mod. Mech.**, 2011 (doi:10.1242/dmm.005777), *IN PRESS*.

GRANDESSO, S.; SAPINO, B.; MAZZUCATO, S.; ALESSANDRINI, R.; SOLINAS, M.; GION, M. Study on in-vitro susceptibility of ESBL-positive *Escherichia coli* isolated from urine specimens. **Inez. Med.**, v. 18, n. 3, p. 162-168, 2010, *IN PRESS*.

GUERRANT R.L., STEINER T.S., LIMA A.E.M., Bobak D.A. How intestinal bacteria cause disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, suppl 2, p. S331-7, 1999.

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.

GUERRANT, R. L. ; KIRCHHOFF, L. V. ; SHIELDS, D. S. ; NATIONS, M. K. ; LESLIE, J. ; DE SOUSA, M. A. ; ARAUJO, J. G. ; CORREIA, L. L. ; SAUER, K. T. ; MCCLELLAND, K. E. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **J. Infect. Dis.**, v. 148, n. 6, p. 986-997, 1983.

GUERRANT, R.L.; GILDER, T. V.; STEINER, T. S.; THIELMAN, N. M.; SLUTSKER, L.; TAUXE, R. V.; HENNESSY, T.; GRIFFIN, P. M.; DUPONT, H.; SACK, R. B.; TARR, P.; NEILL, M.; NACHAMKIN, I.; RELLER, L. B.; OSTERHOLM, M. T.; BENNISH, M. L.; PICKERRING, L. K. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 331 – 350, 2001.

GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. M.; THIELMAN, N. M.; STEINER, T. S.; FONTELES, M. C. Diarrhea, demography and cell signaling: lessons from microbial toxins. **Trans. Amer. Clin. Climatol. Assoc.**, v. 108, p. 140-163, 1997.

GUIGNOT, J.; CHAPLAIS, C.; COCONNIER-POLTER, M. H.; SERVIN, A. L. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. **Cell. Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 204-221, 2007.

HARRINGTON, S. M.; STRAUMAN, M. C.; ABE, C.M.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 7, n. 1, p. 1565 – 1578, 2005.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 254, n.1, p.12-18, 2006.

HARWARD, T. R.; COE, D.; SOUBA, W. W.; KLINGMAN, N.; SEEGER, J. M. Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia/reperfusion. **J. Surg. Res.**, v. 56, p. 351-355, 1994.

HENDERSON, I. R.; CZECZULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J. P. Characterization of pic, a secret protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 11, p. 5587-5596, 1999.

HENRY, F.J.; UDOY, A.S.; WANKE, C.A.; AZIZ, K.M.A. Epidemiology of persistent diarrhea and etiologic agents in Mirzapur, Bangladesh. **Acta Paediatr Suppl.**, v. 381, p. 27-31, 1992.

HICKS, S.; CANDY, D. C. A.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosal *in vitro*. **Infect. Immun.** v. 64, n. 11, p.4751-4760, 1996.

HIGASHIGUCHI, T.; HASSELGREN, P. O.; WAGNER, K.; FISCHER, J. E. Effect of glutamine on protein synthesis in isolated intestinal epithelial cells. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.**, v. 17, p. 307-314, 1993.

HUANG, D. B.; OKHUYSEN, P. C.; JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 99, n. 2, p. 383-389, 2004.

HUANG, D. B.; MOHANTY, A.; DUPONT, H. L.; PABLO C. OKHUYSEN, P. C.; CHIANG, T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Med. Microb.**, v.55, p. 1303-1311, 2006.

HUANG, D. B.; MOHAMED, J. A.; NATARO, J. P.; DUPONT, H. L.; JIANG, Z. D.; OKHUYSEN, P. C. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travelers to developing countries. **J. M. Microbiology**, v. 56, p. 1386-1392, 2007.

JOLLES, P.; JOLLES, J. What's new in lysozyme research. **Mol. Cell. Biochem**, v. 63, p. 165-189, 1984.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 2, n. 2, p. 123 – 140, 2004.

KAUR, P.; CHAKRABORTI, A.; ASEA, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Food Borne Pathogen. **Interd. Persp. Infect. Dis.**, 2010, *IN PROCESS*.

KAR, H. K. Efficacy of beta-carotene topical application in melasma: an open clinical trial. **Indian J. Dermat. Venereol. Leprol.**, v. 68, n. 6, p.320-322, 2002.

KHAN, M. A.; KANG, J.; STEINER, T. S. Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. **Immunology**, v. 112, n. 4, p. 651-660, 2004.

KERR, D. E.; PLANT, K.; BRAMLEY, A. J.; WILLIAMSON, C. M.; LAX, A. J.; MOORE, K.; WELLS, K. D.; WALL, R. J. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. **Nat. Biotechnol.**, v. 19, p. 66-70, 2001.

KNUTTON, S.; SHAW, R. K.; BHAN, M. K.; SMITH, H. R.; MCCONNELL, M. M.; CHEASTY, T.; WILLIAMS, P. H.; BALDWIN, T. J. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 5, p. 2083-2091, 1992.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, JR. W. C. *Enterobacteriaceae*. In: KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 177-261.

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.

KOTAKE-NARA, E.; YONEKURA, L.; NAGÃO, A. Effect of glycerophospholipid class on the β -carotene uptake by human intestinal Caco-2 cells. **Biosci. Biochem. Biochem.**, v. 74, n. 1, p. 209-211, 2010.

KRINSKY, N. I. The antioxidant and biological properties of the carotenoids. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 20, n. 854, p. 443-447, 1998.

LI, J.; LANGKAMP-HENKEN, B.; SUZUKI, K.; STAHLGREN, L. H. Glutamine prevents parenteral nutrition-induced increases in intestinal permeability. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.**, v. 18, p. 303-307, 1994.

LIMA, A. A.; CARVALHO, G. H.; FIGUEIREDO, A. A.; GIFONI, A. R.; SOARES, A. M.; SILVA, E. A.; GUERRANT, R. L. Effects of an alanyl-glutamine-based oral rehydration and nutrition therapy solution on electrolyte and water absorption in a rat model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. **Nutrition**, v. 18, n. 6, p. 458-462, 2002.

LIMA A.A.M., GUERRANT R.L. Persistent diarrhea in children : epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact, and management. **Epidemiologic Reviews**, v. 14, p. 222-241, 1992.

LIMA A.A.M., GUERRANT R.L. Strategies to reduce the devastating costs of early childhood diarrhea and its potential long-term impact: imperatives that we can no longer afford to ignore. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 1552-4, 2004.

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, A. A.; FANG, G.; SCHORLING, J. B.; DE ALBUQUERQUE, L.; McAULIFFE, J. F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr.**, v. 81, Suppl. 381, p. 39-44, 1992.

LIMA, A. A. M.; BRITO, L. F. B.; RIBEIRO, H. B.; MARTINS, M. C. V.; LUSTOSA, A. P.; ROCHA, E. M.; LIMA, N. L.; MONTE, C. M. G.; GUERRANT, R. L. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. **J. Ped. Gastr. Nutr.**, v. 40, p. 28-35, 2005.

LU, L.; WALKER, W. A. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 1124S-1130S, 2001.

LUNN, P. G. The impact of infection and nutrition on gut function and growth in childhood. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 59, p. 147-154, 2000

MAGA, E. A.; ANDERSON, G. B.; HUANG, M. C.; MURRAY, J. D. Expression of human lysozyme mRNA in the mammary gland of transgenic mice. **Transgenic Res.**, v. 3, p. 36-42, 1994.

MAGA, E. A.; ANDERSON, G. B.; HUANG, M. C.; MURRAY, J. D. The effect of mammary gland expression of human lysozyme on the properties of milk in transgenic mice. **J. Dairy Sci.**, v. 78, p. 2645-2652, 1995.

MAGA, E.A.; SARGENT, R.G.; ZENG, H.; PATI, S.; ZARLING, D.A.; OPPENHEIM, S.M.; COLLETTE, N.M.; MOYER, A.L.; CONRAD-BRINK, J.S.; ROWE, J.D.; BONDURANT, R.H.; ANDERSON, G.B.; MURRAY, J.D. Increased efficiency of transgenic livestock production. **Transgenic Res.**, v. 12, n. 4, p. 485-96, 2003.

MAGA, E. A.; SHOEMAKER, C. F.; ROWE, J. D.; BONDURANT, R. H.; ANDERSON, G. B.; MURRAY, J. D. Production and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland. **J. Dairy Sci.**, v. 89, p. 518-524, 2006a.

MAGA, E. A.; CULLOR, J. S.; SMITH, W.; ANDERSON, G. B.; MURRAY, J. D. Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 3, p. 384-392, 2006b.

MAGALHÃES, M.; AMORIM, R. J.; TAKEDA, Y.; TSUKAMOTO, T.; ANTAS, M. G.; TATENO, S. Localized, diffuse, and aggregative-adhering *Escherichia coli* from infants with acute diarrhea and matched-controls. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 1, p. 93-97, 1992.

MARCHINI J.S., NGUYEN P., DESCHAMPS J.Y., MAUGÈRE P., KREMPF M., DARMAUN D. Effect of intravenous glutamine on duodenal mucosa protein synthesis in healthy growing dogs. **Am J Physiol.**, v. 276, p. E747-E753, 1999.

MARSHALL, J. L. **Manual de Laboratório Clínico: Microbiologia.** 1ª Ed: Santos, 2004.

MARIADASON, J. M.; RICKARD, K. L.; BARKLA, D. H.; AUGENLICHT, L. H.; GIBSON, P. R. Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation. **J. Cell Physiol.**, v. 183, n. 3, p. 347-354, 2000.

MATHEWSON, J. J.; JOHNSON, P. C.; DUPONT, H. L.; MORGAN, D. R.; THORNTON, S. A.; WOOD, L.V.; ERICSSON, C. D. A newly recognized cause of traveler's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 151, n. 3, p. 471-475, 1985.

MATHEWSON, J.J.; JOHNSON, P.C.; DU PONT, D.R.; SATTERWHITE, T.K.; WINSOR, D.K. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. **J. Infect. Dis.**, v. 154, n. 3, p. 524-527, 1986.

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.

MENDEZ-ARANCIBIA, E. ; VARGAS, M. ; SOTO, S. ; RUIZ, J. ; KAHIGWA, E. ; SCHELLENBERG, D. ; URASSA, H. ; GASCÓN, J. ; VILA, J. Prevalence of different virulence factors and biofilm production in enteroaggregative *Escherichia coli* isolates causing diarrhea in children in Ifakara(Tanzania). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 6, p. 985-989, 2008.

MENG, X. ; WANG, Y. ; YANG, J. ; HE, N. ; QIAN, S. ; HUA, J. Synthesis, Two-Photon Absorption and Optical Limiting Properties of Multi-branched Styryl Derivatives Based on 1,3,5-Triazine. **Chem. Asian. J.**, n/a, doi: 10.1002/Ásia.201000536.

MIGNON A., ROUQUET N., JOULIN V. Les caspases, les proteases à cystéine de l'apoptose : un enjeu thérapeutique pour demain ? **Médecine/Sciences**, v. 14, p. 9-17, 1998.

MINAMOTO, Y.; OGAWA. K.; ABE, H.; IOCHI, Y.; MITSUGI, K. Development of a serum-free and heat-sterilizable medium and continuous high-density cell culture. **Cytotechnology**, v. 5, Suppl 2, S35–S51, 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Informe técnico: Doença diarreica por rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano - VORH – 2005.

MONTEIRO-NETO, V.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; GIRÓN, J. A. Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination

and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. **Cell Microbiol.**, v. 5, n. 8, p. 533-547, 2003.

MOORE, S. R. Changes over time in the epidemiology of diarrhea and malnutrition among children in an urban Brazilian shantytown, 1989 to 1996. **Int J Infect Dis.**, v.4, p.179-186, 2000.

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

MORENO, A. C. R.; FERNANDES FILHO, A.; GOMES, T. A. T.; RAMOS, S. T. S.; MONTEMOR, L. P. G.; TAVARES, V. C.; SANTOS FILHO, L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrhea pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, n. 1, p. 50-57, 2008.

MURRAY, P. R. **Microbiologia médica**. 4. ed. [S.l.]: Elsevier, 2004.

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.; DENG, Y.; MANEVAL, D. R.; GERMAN, A. L.; MARTIN, W. C.; LEVINE, M. M. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 6, p. 2297-2304, 1992.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; Diarrheagenic *Escherichia coli*: **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 6, n. 9, p. 829-831, 1987.

NATARO, J. P.; SCALETSKY, I. C. A.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; TRABULSI, L. R. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 48, n. 2, p. 378-383, 1985.

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; GIRON, J. A.; SAVARINO, S. J.; KOTHARY, M. H.; HALL, R. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 3, p. 1126-1131, 1993.

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; YINGKANG, D.; WALKER, K. *AggR*, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 15, p. 4691-4699, 1994.

NEWMAM, R. D.; SEARS, C. L.; MOORE, S. R.; NATARO, J. P.; WUHIB, T.; AGNEW, D. A.; GUERRANT, R. L.; LIMA A. A. M. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 180, n. 1, p. 167-175, 1999.

NEWMAM, R. D.; ZU, S. X.; WUHIB, T.; LIMA A. A. M.; GUERRANT, R. L.; SEARS, C. L. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in a urban community in northeast Brazil. **Ann. Inter. Med.**, v. 120, n. 6, p. 500-505, 1994.

NEWSHOLME, E. A.; PARRY-BILLINGS, M. Properties of glutamine release from muscle and its importance for the immune system. **J. Parent. Enter. Nutr.**, v. 14, n. 4, Suppl-67S, 1990.

NISHI, J.; SHEIKH, J.; MIZUGUCHI, K.; LUISI, B.; BURLAND, V.; BOUTIN, A.; ROSE, D. J.; BLATTNER, F. R.; NATARO, J. P. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 46, p. 45680-45689, 2003.

OKEKE, I. N.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Lancet Infect. Dis.**, v. 1, p. 304-313, 2001.

OLIVEIRA, G. S.; FIGUEIREDO, A. S. P.; SANTOS, R. S.; VIANNA, L. M. Effect of beta-carotene supplementation on the blood pressure of rats. **Rev. Nutr. Campinas**, v. 20, n. 1, p. 39-45, 2007.

OTEO, J.; PÉREZ-VÁZQUEZ, M.; CAMPOS, J. Extended-spectrum [beta]-lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 23, n. 4, p. 320-326, 2010.

PAPACONSTANTINO, H. T.; HWANG, K. O.; RAJARAMAN, S.; HELLMICH, M. R.; TOWNSEND, C. M. JR.; KO, T. C. Gln deprivation induces apoptosis in intestinal epithelial cells. **Surgery**, v. 124, p.152–159, 1998.

PAPACONSTANTINO, H.T.; CHUNG, D.H.; ZHANG, W.; ANSARI, N. H.; HELLMICH, M. R.; TOWNSEND, C. M. JR.; KO, T. C. Prevention of mucosal atrophy: role of Gln and caspases in apoptosis in intestinal epithelial cells. **J Gastrointest. Surg.**, v. 4, p.416–423, 2000.

PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I. Rotavirus. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, n. 4, p. 561-570, 1998.

PARKS, C. G.; MOE, C. L.; RHODES, D.; LIMA, A. A.; BARRET, L.; TSENG, C. F.; BARIC, R.; TALAL, A.; GUERRANT, R. Genomic diversity of “Norwalk like viruses” (NLVs): pediatric infections in Brazilian shantytown children. **Child. Neuropsychol**, v.58, n. 4, p. 426 – 434, 1999.

PENNINGTON, H. *Escherichia coli* O157. **Lancet**. v.376(9750): p. 1428-1435, 2010.

PEREIRA, A. C. M.; BRITTO-FILHO, J. D.; CARVALHO, J. J.; DE LUNA, M. G.; ROSA, A. C. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains enter and survive

within cultured intestinal epithelial cells. **Microbiol. Pathog.**, v. 45, n. 5-6, p. 310-314, 2008.

PETRI, W. A. JR.; MILLER, M.; BINDER, H. J.; LEVINE, M. M.; DILLINGHAM, R.; GUERRANT, R. L. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **Am. Soc. Clin. Invest.**, v. 118, n. 4, p. 1277-1290, 2008.

PODEWILS, L. J.; MINTZ, E. D.; NATARO, J. P.; PARASHAR, U. D. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, n. 3, p. 155 – 168, 2004.

PROCTOR, V. A.; CUNNINGHAM, F. E. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and pharmaceutical. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 26, p. 359-395, 1988.

QUETZ, J. S.; LIMA, I. L. N.; HAVT, A.; CARVALHO, E. B.; LIMA, N. L.; SOARES, A. M.; MOTA, R. M. S.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. M. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. **Diag. Microb. Infect. Dis.**, v. 67, p. 220-227, 2010.

RHOADS, J. M.; ARGENZIO, R. A.; CHEN, W.; RIPPE, R. A.; WESTWICK, J. K.; COX, A. D.; BERSCHNEIDER, H. M.; BRENNER, D. A. L-Glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. **Am. J. Physiol.**, v. 272, n. 35, G943-G953, 1997.

RODRIGUES, J. <<http://www.queijosnobrasil.com.br>>. Acesso em: 10 set. 2004.

ROSA, A.C.P.; MARIANO, A.T.; PEREIRA, A.M.S.; TIBANA, A.; GOMES, T.A.T.; ANDRADE, J.C.R. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 781-790, 1998.

ROSELLI, M.; FINAMORE, A.; GARAGUSO, I.; BRITTI, M.A.; MENGHERI, E. Zinc oxide protects cultured enterocytes from the damage induced by *Escherichia coli*. **J. Nutrition**, v. 133, p. 4077-4082, 2003.

RUEMMELE F. ; RUEMMELE C. ; LEVY E. ; SEIDMAN E. Les mécanismes moléculaires de la régulation du renouvellement des cellules épithéliales intestinales par des nutriments. **Gastroenterol Clin. Biol.**, v. 23, p. 47-55, 1999.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; ROBERTSO, D. C.; LEVINE, M. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. **J. Clin. Invest.**, v. 87, n. 4, p. 1450-1455, 1991.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTIN, B. M.; LEVINE, M. M.; GUANDALINI, S.; GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 7, p. 3093-3097, 1993.

SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, n. 2, p. 534-536, 1984.

SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Diarrhea and catch-up growth. **Lancet**, v.335, p.599-600,1990.

SHEIKH, J.; CZECZULIN, J. R.; HARRINGTON, S.; HICKS, S.; HENDERSON, I. R.; LE BOUGUÉNEC, C.; GOUNON, P.; PHILLIPS, A.; NATARO, J. P. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Invest.**, v. 110, n. 9, p. 1329-1337, 2002.

SIAVOSHIAN S.; BLOTTIÈRE H.M.; LE FOLL E.; KAEFFER B.; CHERBUT C.; GALMICHE J.P. Comparison of the effect of different short chain fatty acids on the growth and differentiation of human colonic carcinoma cell lines *in vitro*. **Cell Biol Int.**, v. 21, p. 2817, 1997.

STEINER, T. S.; THIELMAN, N. M.; GUERRANT, R. L. Protozoal agents: what are the dangers for the public water supply? **Ann. Rev. Med.**, v. 48, p. 329-340, 1997.

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.; NATARO, J. P.; POTEET-SMITH, C. E.; SMITH, J. A.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* express a novel flagellin that cause IL-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 12, p.1769-1777, 2000.

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.

SWEENEY, N. J.; LAUX, D. C.; COHEN, P. S. The *Escherichia coli* K-12 *gntP* gene allows *E. coli* F-18 to occupy a distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 3497-3503, 1996.

TADDEI, C. R.; FASANO, A.; FERREIRA, A. J. P.; TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strains causes intestinal damage in animal model assays. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 250, p. 263-269, 2005.

TAKADA, K.; OHNO, N.; YADOMAE, T. Lysozyme regulates LPS-induced interleukin-6 release in mice. **Circ. Shock**, v. 44, p. 169-174, 1994.

TUHACEK, L. M.; MACKEY, A. D.; LI, N.; DEMARCO, V. G.; STEVENS, G.; NEU, J. Substitutes for glutamine in proliferation of rat intestinal epithelial cells. **Nutrition**, v. 20, p. 292-297, 2004.

UNICEF. **Countdown to 2015**: maternal, newborn and child survival. Tracking progress in maternal, neonatal and child survival: the 2008 report. New York, NY, 2008.

U. S. AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT; WHO; UNICEF. **Diarrhoea Treatment Guidelines**: including a new recommendations for the use ORS and zinc supplementation: for Clinic-Based Healthcare Workers. The MOST Project – Washington, D. C.: USAID, 2005.

VICTORA, CG. Diarrhea mortality: what can the world learn from Brazil? **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 1, p. 3 – 5, 2009.

VILLASECA, J. M.; NAVARRO-GARCIA, F.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; NATARO, J. P.; CRAVIOTO, A.; ESLAVA, C. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 10, p. 5920-5927, 2000.

VISWANATHAN, VK., HODGES, K., HECHT, G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhea. **Nat. Rev. Microbiology**, v.7, n. 2, p. 110 – 9, 2009.

WAI, S. N.; TAKADE, A.; AMAKO, K. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 135, n. 1, p. 17-22, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The world health report 2000 – Health systems: Improving performance. Geneva, **WHO**. 215p, 2000.

WERSHIL, B. K.; FURUTA, G. T. Gastrointestinal mucosal immunity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 121, suppl. 2, p. S380 – S383, 2008.

WONG M.H.; STAPPENBECK T.S.; GORDON J.I. **Gastroenterology**. Editorials. v. 116, p. 208-215, 1999.

YAMAMOTO, T.; ENDO, S.; YOKOTA, T.; ECHEVERRIA, P. Characteristics of adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to human and animal mucosa. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 10, p. 3722-3739, 1991.

YUNEVA, M.; ZAMBONI, N.; OEFNER, P.; SACHIDANANDAM, R.; LAZEBNIK, Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. **J. Cell. Biol.**, v. 178, n. 1, p. 93-105, 2007.

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