



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

CAROLINE REBOUÇAS DAMASCENO

Avaliação da infecção por *Escherichia coli* enteroagregativa cepa 042 em modelo de desnutrição *in vitro* de células epiteliais intestinais (IEC-6)

**FORTALEZA
2024**

CAROLINE REBOUÇAS DAMASCENO

Avaliação da infecção por *Escherichia coli* enteroagregativa cepa 042 em modelo de desnutrição *in vitro* de células epiteliais intestinais (IEC-6)

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

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Freitas Clementino.

**FORTALEZA
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D162a Damasceno, Caroline Rebouças.
Avaliação da infecção por *Escherichia coli* enteroagregativa cepa 042 em modelo de desnutrição in vitro de células epiteliais intestinais (IEC-6) / Caroline Rebouças Damasceno.
– 2024.
71 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Marco Antonio de Freitas Clementino.
1. Desnutrição. 2. Células epiteliais intestinais. 3. *Escherichia coli* enteroagregativa. I.
Título.

CDD 616.9

CAROLINE REBOUÇAS DAMASCENO

Avaliação da infecção por *Escherichia coli* enteroagregativa cepa 042 em modelo de desnutrição *in vitro* de células epiteliais intestinais (IEC-6)

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antonio de Freitas Clementino (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Me. Jean Carlos Souza Silva
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A minha mãe, Hevilane Rebouças, pelo amor e esforço que me fizeram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e proteção constante. "Rendei graças ao Senhor, porque ele é bom; porque a sua misericórdia dura para sempre" (Salmo 136:1).

Expresso minha profunda gratidão ao meu avô, Dr. Raimundo do Carmo Rebouças, pelo exemplo de pai e profissional da saúde ético e humanitário que deixou.

À minha mãe, Hevilane Rebouças, agradeço imensamente pelo estímulo constante, apoio incondicional e por acreditar em minhas decisões. Te amo para sempre.

Agradeço ao meu padrinho, Francisco Nepomuceno, e à sua esposa, Wellyka Araújo, pelo suporte de fé e pelas orações.

À Dra. Déborah Arruda e à Dra. Luísa Bisol, sou grata pelo suporte terapêutico essencial e por não me abandonarem nos momentos de dificuldade.

Minha sincera gratidão à minha família Rebouças Nepomuceno Lopes, por serem uma rede de apoio fundamental, compartilhando momentos felizes e servindo como refúgio em tempos difíceis.

Agradeço ao meu namorado, Felipe, pelo amor incondicional e por oferecer escuta e conforto durante as dificuldades.

Agradeço às minhas amigas Flavinha, Faby, Jade e Marina, pelo suporte constante e pela presença mesmo na distância e na correria do dia a dia.

Aos meus colegas de laboratório, Dayara, Thiago, Davi, Marcus, Mikael, Karyne, Luciana e Xhulla, sou imensamente grata pelos ensinamentos, ajudas experimentais e pelo apoio como amigos ao longo desses anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Clementino, agradeço por abrir as portas para mim, por acreditar em minha capacidade e por estar sempre presente, compreendendo-me nos momentos desafiadores e ao Prof. Dr. Alexandre Havt, sou grata pelo acolhimento em seu laboratório, pelos conselhos, cuidados e apoio contínuo que me proporcionou.

Agradeço ao Sr. Valdeni pela gentileza e pelo encorajamento diário, ao funcionário Jeff, pelo zelo com nosso local de trabalho a José Amadeus, por sua eficiência em resolver os desafios e às técnicas Charliene e Tuane pelo apoio essencial.

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

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa.

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre começando, de que precisamos continuar e de que seremos interrompidos antes de terminar. Portanto, devemos fazer da interrupção um caminho novo, da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte e da procura um encontro.” Fernando Pessoa

RESUMO

A *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é o patotipo mais emergente e geneticamente heterogêneo, sendo considerado um importante patógeno entérico da infância mundialmente. Na região semiárida do Brasil, foi verificado em 2019 que, em um total de 1.200 crianças com diarreia, a positividade para EAEC era mais prevalente frente às outras bactérias entéricas, estando presente em mais da metade dos casos e em metade dos controles. O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo *in vitro* de desnutrição para investigar a patobiologia da cepa 042 de EAEC em células epiteliais intestinais (IEC-6). As células IEC-6 foram expostas a redução de 50% dos nutrientes por sete dias e infectadas com a EAEC por três horas após a desnutrição. Foram realizadas análises de proliferação, viabilidade e morfologia celular, além da expressão de proteínas como a CDC2-p34, CDC 42, caspases 3, 8 e 9, CFTR, PEPT1 e SGLT1 e de genes como o FABP, ATF2, CREB1, ELK1 e FOXO3a na ausência e presença de infecção. O modelo desenvolvido demonstrou que a redução de nutrientes, na presença e ausência de infecção, foi capaz de reduzir significativamente a proliferação e a viabilidade celular, além de ter impactos negativos no diâmetro e na área celular. Diante da infecção, observamos que não houve diferença significativa no número de unidades formadoras de colônias bacterianas, demonstrando que o estado nutritivo da célula pode não interferir na propensão à infecção. A desnutrição, com ou sem infecção, não alterou significativamente a expressão proteica dos marcadores. A falta de modelos de infecção por EAEC é um desafio na compreensão de sua patogênese, especialmente pela escassez de modelos abrangendo desnutrição e infecção. São necessárias mais pesquisas explorando diferentes concentrações bacterianas e períodos de análise mais curtos.

Palavras-chave: Desnutrição, Células epiteliais intestinais, *Escherichia coli* enteroagregativa.

ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is the most emerging and genetically heterogeneous pathotype, being considered an important enteric pathogen of childhood worldwide. In the semi-arid region of Brazil, it was found in 2019 that, in a total of 1,200 children with diarrhea, positivity for EAEC was more prevalent when compared to other enteric bacteria, being present in more than half of the cases and in half of the controls. The aim of this study was to develop an *in vitro* model of malnutrition to investigate the pathobiology of EAEC strain 042 in intestinal epithelial cells (IEC-6). IEC-6 cells were exposed to 50% nutrient reduction for seven days and infected with EAEC for three hours after starvation. Analyses of cell proliferation, viability and morphology were carried out, in addition to the expression of proteins such as CDC2-p34, CDC 42, caspases 3, 8 and 9, CFTR, PEPT1 and SGLT1, and genes such as the FABP, ATF2, CREB1, ELK1 and FOXO3 a in the absence and presence of infection. The model developed demonstrated that the reduction of nutrients, in the presence and absence of infection, was capable of significantly reducing cell proliferation and viability, in addition to having negative impacts on cell diameter and area. In the face of infection, we observed that there was no significant difference in the number of bacterial colony-forming units, demonstrating that the nutritional status of the cell may not interfere with the propensity to infection. Malnutrition, with or without infection, did not significantly alter the protein expression of several markers. The lack of models of EAEC infection is a challenge in understanding its pathogenesis, especially due to the scarcity of models covering malnutrition and infection. More research exploring different bacterial concentrations and shorter analysis periods is needed.

Key words: Malnutrition. Intestinal epithelial cells. Enteroaggregative *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Hospitalização de crianças menores de um ano por desnutrição em 2022	19
Figura 2 - Microscopia eletrônica da bactéria <i>Escherichia coli</i>	22
Figura 3 - Microscopia de células epiteliais intestinais (IEC-6) com 80% de confluência	28
Tabela 1 - Sequências dos genes utilizados na RT-qPCR	34
Figura 4 - Taxas de proliferação celular em células desnutridas	36
Figura 5 - Taxa de viabilidade celular em células desnutridas por 7 dias	37
Figura 6 - Microscopia confocal de células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas	37
Figura 7 – Medida de área e diâmetro de células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas	38
Figura 8 – Expressão de proteínas responsáveis pelo transporte celular em células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas por 7 dias	40
Figura 9 - Expressão de proteínas responsáveis pelo ciclo celular em células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas por 7 dias	41
Figura 10 - Expressão de proteínas responsáveis pelo apoptose celular em células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas	43
Figura 11 - Medida da área e do diâmetro de células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas infectadas e não infectadas por EAEC (042)	44
Figura 12 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)	45
Figura 13 - Taxas de viabilidade celular em células IEC-6 nutridas e desnutridas infectadas e não infectadas por EAEC (042)	46
Figura 14 - Expressão de proteínas responsáveis pelo transporte celular em células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas, na ausência e presença de infecção por EAEC (042)	48
Figura 15 - Expressão de proteínas responsáveis pelo ciclo em células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas, na ausência e presença de infecção por EAEC (042)	49

Figura 16 - Expressão de proteínas responsáveis pela apoptose em células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas, na ausência e presença de infecção por EAEC (042)	51
Figura 17 - Efeito da infecção por EAEC (042) sobre a transcrição gênica de mediadores das vias de sinalização celular em células (IEC-6) nutridas e desnutridas.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATF2	Fator de Transcrição Ativador 2
CDC 2 P34	Quinase Ativadora de Quinase Dependente de Ciclina
CDC42	<i>Cell Division Cycle 42</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
CREB1	Proteína de Ligação ao Elemento Responsivo CAMP 1
DHAA	Direito Humano a Alimentação Adequada
DMEM	Meio de <i>Eagle</i> Modificado por <i>Dulbecco</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
ELK1	<i>E26 Transformation-Specific Like 1</i>
ENANI	Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil
ESPEN	Sociedade Europeia de Nutrição Clínica e Metabolismo
FABP	<i>Fatty Acid-Binding Protein</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOXO3a	Fator de Transcrição <i>Forkhead</i> Box O 3a
GEMS	Estudo Multicêntrico Entérico Global
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEC-6	Células Epiteliais Intestinais
IL1- α	Interleucina 1 Alfa
LB	Luria Bertani
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos-1
mRNA	RNA Mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	Tampão Fosfato e Salina
PEPT 1	Peptídeo Semelhante a <i>Glucagon</i> 1
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
SGLT 1	<i>Sodium-Glucose Co-Transporter</i>
TNF- α	Fator de Necrosa Tumoral Alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Desnutrição Infantil	17
2.1.1	Epidemiologia da Desnutrição	18
2.2	Modelos de Desnutrição <i>in vivo</i>	20
2.2.1	Modelos de Desnutrição <i>in vitro</i>	21
2.3	<i>Escherichia coli</i>	22
2.3.1	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	23
3	HIPÓTESES	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	Objetivo Geral	27
4.2	Objetivos Específicos	27
5	MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1	Linhagem celular	28
5.2	Cultivo de celular	29
5.3	Modelo padrão de nutrição	29
5.4	Meio de desnutrição <i>in vitro</i>	29
5.5	Análise de proliferação celular	29
5.6	Análise de viabilidade celular	29
5.7	Aquisição da cepa bacteriana	30
5.7.1	Recuperação das cepas bacterianas	30
5.8	Infecção das células IEC-6	31
5.9	Análise de alterações morfológicas e físicas das células	31
5.10	Análise da expressão de proteínas <i>Western Blotting</i>	31
5.11	Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR)	32
6	ANÁLISE DE DADOS	35
7	RESULTADOS	36
7.1	Efeito da redução de nutrientes na proliferação e viabilidade celular.....	36

7.2	Efeito da desnutrição na morfologia celular	37
7.3	Efeito da desnutrição na expressão de proteínas em células epiteliais intestinais (IEC-6)	38
7.4	Efeito da infecção por EAEC (042) na morfologia de células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas	44
7.5	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)	45
7.6	Efeito da infecção por EAEC 042 na viabilidade celular em células nutridas e desnutridas.....	46
7.7	Efeito da infecção por EAEC 042 em células nutridas e desnutridas sob a expressão de proteínas envolvidas nos processos de transporte celular, apoptose e ciclo celular.....	47
7.8	Efeito da infecção por EAEC 042 em células nutridas e desnutridas sob a transcrição de genes envolvidas nos processos de transporte celular, apoptose e ciclo celular.....	52
8	DISCUSSÃO	55
9	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

A desnutrição é considerada uma deficiência energético-proteica que está associada a fatores como o déficit de alimentação e infecções entéricas persistentes, problemas esses presentes em dimensões alarmantes em grande parte do mundo. Em situações extremas, como a fome, podem ser a causa direta da morte. Em 2001, a desnutrição infantil foi associada a 54% das mortes infantis (10,8 milhões de crianças) nos países em desenvolvimento (UNICEF, 2013; WHO, 2017).

No Brasil, até a década de 1990, a desnutrição infantil esteve presente nos grupos populacionais mais pobres, aumentando a incidência de doenças infecciosas e desempenhando um papel de suma importância na sequência de eventos que culminaram no óbito (Black *et al.*, 2013). Nos anos de 1989 a 2006, a prevalência da desnutrição em crianças menores de cinco anos, que leva em consideração crianças com peso abaixo do esperado, reduziu de 7,1% para 1,8%.

As taxas de mortalidade infantil no Brasil, também reduziram. Em 1990 era de 53,7 óbitos por mil nascidos vivos, em 2011 houve a redução para 17,7. Essa redução se fez acreditar que em 2015 o país alcançaria um resultado superior a meta de desenvolvimento do milênio (Roma, 2019). Apesar dos avanços no país, os estados do Norte e do Nordeste mantiveram o nível de mortalidade elevado, obtendo em 2011 taxas superiores a 20 óbitos por mil nascidos vivos (UNICEF, 2021).

Acredita-se que exista um ciclo vicioso que inclui a desnutrição e infecções entéricas, com ou sem diarreia, onde ambas permanecem interligadas de tal forma que uma contribui para a presença e permanência da outra (Guerrant *et al.*, 2008). Este ciclo infecção entérica-desnutrição pode prejudicar a capacidade absorptiva intestinal do indivíduo, comprometendo os mecanismos imunológicos e acarretando a progressão da doença.

Diante disso, os patógenos entéricos ou seus produtos passam do lúmen intestinal em direção à lâmina própria, promovendo a infiltração leucocitária na mucosa e causando danos nas vilosidades, o que faz com que haja uma redução da superfície absorptiva e ruptura da barreira intestinal (Crane, Jones, Berkley, 2015; Syed, Ali, Duggar, 2016).

Ademais, estudos apontam que os patógenos mais comuns envolvidos na desnutrição infantil sejam as *Escherichia coli* diarreiogênicas (Amour *et al.*, 2016; Acosta *et al.*, 2017). *E. coli* representa a causa mais comum de diarreias pediátricas, sendo responsável por diferentes síndromes clínicas importantes como a diarreia do viajante, colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica, diarreia persistente e diarreia aquosa de bebês (Nataro; Kaper, 1998; Jensen *et al.*, 2014).

A *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é considerada mundialmente como um importante patógeno entérico da infância, no entanto, o mecanismo de patogênese ainda não está completamente elucidado. Isso se deve principalmente pela heterogeneidade das cepas, ou seja, em alguns casos, há associação clara da EAEC com a diarreia e, em outros, ela parece causar apenas infecção subclínica, ou ainda, apenas uma colonização intestinal (Havt *et al.*, 2017).

Contudo, as pesquisas demonstram que as colonizações por EAEC, mesmo sem a sintomatologia de diarreia, acabam ocasionando impactos significativos no crescimento infantil (Steiner *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2014).

Nesse contexto, tendo em vista a importância epidemiológica de infecções por EAEC, faz-se necessário estudos que melhor compreendam o mecanismo de patogênese como as alterações celulares e moleculares ocasionadas pela infecção, para promoção de um melhor entendimento da patobiologia dessas infecções. Assim, o presente trabalho se propôs a analisar a infecção da cepa padrão de EAEC, a 042, em células submetidas ou não à desnutrição.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Desnutrição Infantil

O Direito Humano à alimentação adequada está previsto no artigo 25 da Declaração Universal dos Direitos Humanos de 1948; no Pacto Internacional sobre Direitos Econômicos, Sociais e Culturais (artigo 11) de 1966; bem como na Agenda 2030 da ONU (Organização das Nações Unidas), que inclui dois Objetivos de Desenvolvimento Sustentável diretamente relacionados à saúde e ao acesso a uma alimentação de qualidade (UNICEF, 2023). No Brasil, o direito à alimentação está entre o rol de direitos sociais garantidos pelo artigo 6º da Constituição Federal, incluído após a aprovação da Emenda Constitucional nº 64 de 2010 (UNICEF, 2023).

A nutrição é um processo básico para a vida, sendo um dos componentes-chave desde o nascimento (Ribeiro, Vilar, Sousa Carmo, 2020). Esse processo inicia-se pela ingestão do alimento, passando pela digestão, absorção, transporte, assimilação dos nutrientes até a excreção dos resíduos, sendo a absorção de nutrientes de essencial importância para que o indivíduo consiga desempenhar suas funções vitais, como o crescimento, a reprodução e a manutenção do corpo na saúde e na doença (Serón-Arbelloa *et al.*, 2022).

Já a desnutrição ou subnutrição, de acordo com a Sociedade Europeia de Nutrição Clínica e Metabolismo, pode ser definida como um estado resultante da falta de ingestão ou absorção de nutrientes, que resulta na alteração da composição corporal (diminuição da massa livre de gordura) e da massa celular corporal, levando à atenuação da função física e mental e ao comprometimento clínico resultado da própria doença (Soeters *et al.*, 2017).

A desnutrição pode se instalar diante de uma situação primária, como viver em condições de pobreza, por falta de alimentos, ou em razão de uma conjuntura secundária, como a redução da ingestão de nutrientes devido à anorexia que acompanha a doença e ao estresse metabólico causado por isso (Cederholm *et al.*, 2017). Assim, a resposta ao estresse acelera o metabolismo, provocando um desequilíbrio hormonal que leva a um aumento do catabolismo proteico, consumo das reservas proteicas e impacta na alteração da função de diferentes órgãos e na atividade das defesas imunes do indivíduo (Serón-Arbelloa *et al.*, 2022).

Quando ocorre na primeira infância, as consequências da desnutrição estão associadas à maior mortalidade, às alterações funcionais na defesa imunológica, à recorrência de doenças infecciosas, à redução da força muscular geral, aos prejuízos no desenvolvimento psicomotor, além de menor aproveitamento escolar e menor capacidade produtiva na idade adulta (Checkley *et al.*, 2008).

A desnutrição é evitável se o problema for diagnosticado precocemente. No entanto, devido ao alto risco de morte, crianças com desnutrição grave devem ser adequadamente diagnosticadas e, se necessário, internadas em instituição hospitalar até que este risco diminua e ela possa, então, ser acompanhada em outros níveis de atenção à saúde, inclusive em domicílio. Entretanto, a prevenção e o controle da desnutrição dependem de medidas amplas, para além de ações no campo da saúde pública, que sejam eficientes no combate à pobreza e à fome, o que, na maioria das vezes, não ocorre devido à falta de sensibilização, informação e conhecimento, colaborando para o aumento do tempo de internação e custos hospitalares (Petri *et al.*, 2008; Fagundes-Neto, 2013).

Além disso, repetidos episódios de doenças infecciosas graves na primeira infância, tais como diarreia, pneumonia e malária causam uma acentuada perda de peso, levando então à desnutrição. No entanto, a diarreia revela-se como o mais importante sintoma determinante da desnutrição a qual, por sua vez, aumenta a incidência da duração de novas infecções intestinais, ocasionando um ciclo vicioso de diarreia-desnutrição (Caulfield *et al.*, 2004; WHO, 2010).

Ressaltando-se que o ciclo vicioso da diarreia-desnutrição é caracterizado pelo consumo inadequado de alimentos, aumento de doenças, perda de peso, baixa imunidade, danos na mucosa gastrointestinal, perda de apetite, má absorção do alimento e alterações importantes no metabolismo (Sawaya, 2006). Desse modo, todas essas doenças, associadas com a desnutrição aumentam o risco de mortalidade infantil (Caulfield *et al.*, 2004; WHO, 2010).

2.1.1 Epidemiologia da Desnutrição

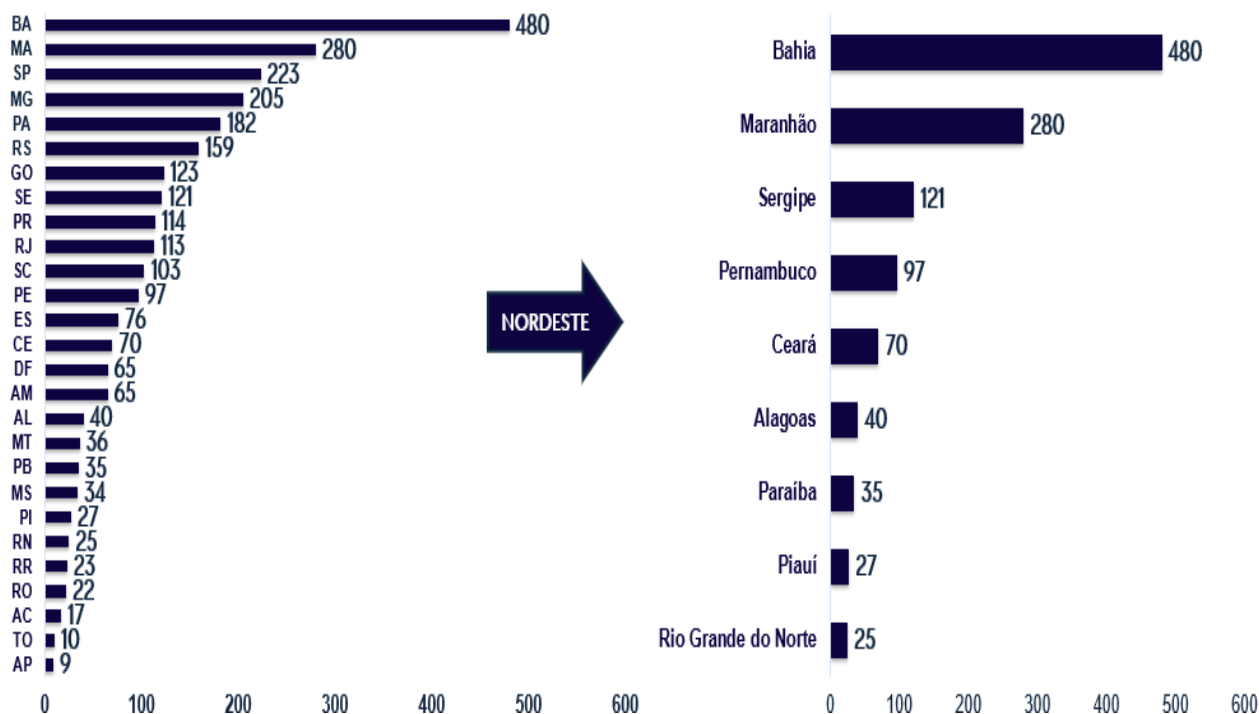
A mortalidade em menores de cinco anos constitui um indicador

chave na avaliação da situação mundial de saúde, tendo a sua inclusão entre os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio para o período do ano de 1990 a 2015 e entre os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável para o período posterior até 2030 (UNICEF, 2023).

No ano de 2022, no Brasil, ocorreram 2.754 internações por desnutrição, sequelas da desnutrição e deficiências nutricionais de bebês com idade menor que um ano. De acordo com o Observatório de Saúde na Infância (Observa Infância), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), os números de 2022 são equivalentes a sete internações por dia. Apenas na Bahia, houve 480 internações, seguida do Maranhão com 280 e São Paulo com 223. Entre as regiões, o Nordeste fica à frente com 1.175 hospitalizações (FIOCRUZ, 2022) (Figura 1).

Desse modo, os números apresentados repetiram os indicadores do ano de 2022, quando foram registradas 2.979 hospitalizações.

Figura 1 – Hospitalização de crianças menores de um ano por Desnutrição 2022 no Brasil..



Fonte: adaptado de UNICEF, 2023.

Apesar de grandes avanços ocorridos nas últimas décadas, dados mundiais indicam que pelo menos 33% das crianças menores de cinco anos

(250 milhões de crianças) não estão se desenvolvendo de forma adequada devido à desnutrição crônica. A deficiência de vitaminas e outros nutrientes essenciais atinge, pelo menos, 50% das crianças menores de cinco anos e 66% das crianças entre seis meses e dois anos não recebem os alimentos necessários para o seu desenvolvimento. Essa carência alimentar impacta o desenvolvimento físico, provoca dificuldades de aprendizagem, baixa a imunidade, aumenta a frequência de infecções e, em muitos casos, pode levar à morte (UNICEF, 2023).

Segundo estudo realizado pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), cerca de 54% das famílias beneficiárias do programa Bolsa Família possuíam crianças com idade até os cinco anos e onze meses, que deixaram de fazer alguma refeição ou não comeram a quantidade suficiente, devido à ausência de recursos antes da pandemia. Já durante a pandemia, esse índice cresceu para 72%. Além disso, 52% dos entrevistados relataram queda da qualidade da alimentação domiciliar desde o início da crise sanitária global (UNICEF, 2023).

De acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017- 2018 (POF), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 36,7% dos domicílios particulares do país apresentavam algum grau de insegurança alimentar, ou seja, de privação de alimentos, atingindo todos os membros da família (IBGE, 2019).

2.2 Modelos de Desnutrição *in vivo*

Atualmente, os modelos de desnutrição existentes na literatura buscam seguir uma das quatro condições: submeter o animal a uma restrição calórica proteica, restringindo a quantidade do consumo de ração; na alimentação *ad libitum* (animal possui livre acesso ao alimento e a água) restringir algum componente essencial, como as dietas hipoproteicas, mas isocalóricas; as dietas deficientes em algum micronutriente (minerais e vitaminas); dietas regionais que utilizam como base o consumo alimentar de indivíduos de determinadas regiões, ocorrendo nesta última uma combinação de deficiências proteicas com de outros micronutrientes (Anstead *et al.*, 2001; Angelantonio *et al.*, 2016).

A restrição calórica proteica consiste em diminuir o consumo da ração diária do animal, fazendo com que o seu consumo total seja menor do que o consumo de animais que fazem a utilização da ração *ad libitum* (Osborne *et al.*, 1917; McCay *et al.*, 1943). Foi a partir das melhorias desses protocolos de restrição alimentar que surgiram os modelos especificamente de desnutrição, a fim de explorar os impactos do *status* nutricional em órgãos e sistemas, como por exemplo, do imunológico (Mittal; Woodward, 1985).

No modelo baseado no consumo de proteínas deficientes é amplamente utilizado quando a finalidade é diminuir a disponibilidade de proteína, tornando a dieta hipoproteica e isocalórica, mas não de restringir o consumo de ração pelo animal. Em um modelo de isenção total de proteínas, foi observado a redução na altura das vilosidades intestinais em ratos adultos (Belmonte *et al.*, 2007).

Nos modelos baseados em dietas regionais, existe a Dieta Básica Regional (DBR) (Teodósio *et al.*, 1990). Com base em um levantamento do consumo familiar da região do Nordeste Brasileiro, e levando em conta menores custos e disponibilidade dos alimentos, foi formulada uma ração multideficiente de proteína, lipídios, vitaminas e minerais e rica em carboidratos, caracterizando uma restrição nutricional qualitativa (Barreto Medeiros *et al.*, 2004; Salameh *et al.*, 2019)

Dietas hipoproteicas, por vezes, ensejam também a falta de micronutrientes, como zinco e selênio (Cunningham-Rundles; Mcneeley; Moon, 2005; Filteau; Woodward, 1982). Esses micronutrientes são também capazes de atuar regulando o sistema imunológico. Em um modelo animal, o consumo aumentado de selênio, modulou a ativação e diferenciação de células T (Hoffmann *et al.*, 2010). Em modelos com restrição de zinco na dieta quando passam por desafios imunológicos, eles apresentam alterações, como diminuição do tamanho das vilosidades frente à infecção por *Escherichia coli* enteroagregativa (Bolick *et al.*, 2014), e colonização prolongada por *Shigella flexneri*, a qual pode ser revertida após suplementação de zinco (Medeiros *et al.*, 2019).

Já camundongos fêmeas quando submetidas a duas dietas, hiper e hipovitamínica para vitamina A, durante o período pré-gestacional até o momento do nascimento dos filhotes, foi possível observar que as células

linfóides inatas do tipo 3 eram controladas por sinalização dependente de vitamina A ainda no ambiente intrauterino. O consumo materno de vitamina A também modificou o tamanho dos órgãos linfóides secundários e a eficiência da resposta imune nos filhotes, mesmo quando adultos (Pavert *et al.*, 2014).

2.3 Modelos de Desnutrição *in vitro*

No que se refere aos modelos *in vitro*, na literatura consta um modelo que faz uso de células do adenocarcinoma ileocecal humano (HCT-8) e outro que utiliza células epiteliais intestinais (IEC-6).

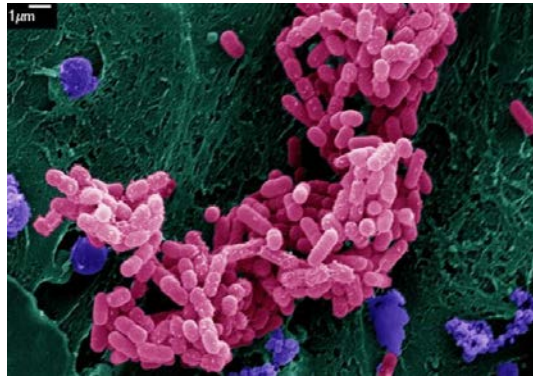
No modelo que utiliza células HCT-8 eles tentaram mimetizar a desnutrição proteica *in vivo*, com redução do soro fetal bovino (FBS) para 1% do meio. O cultivo celular se deu em meio de cultivo padrão dessas células até elas atingirem a confluência de 80%-90%, quando eram submetidas ao meio de desnutrição, onde ficavam por 24 horas. Após esse tempo as células eram expostas também por 24 horas a uma determinada concentração de oocistos de *Cryptosporidium parvum* e tratadas com oligodesoxinucleotídeos e alanil-glutamina para testar o seu potencial terapêutico (Costa *et al.*, 2012).

Semelhantemente, o modelo que utilizou células IEC-6 também houve a tentativa de mimetizar a desnutrição proteica, porém o cultivo celular se deu na ausência de FBS. As células foram mantidas até atingirem cerca de 80% de confluência e então eram submetidas ao meio de cultivo sem FBS e adicionado substâncias como o retinol e palmitato de retinol, a fim de avaliar o seu potencial benéfico ao epitélio intestinal (Freitas *et al.*, 2021).

2.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é um bacilo Gram-negativo (Figura 2), móvel, anaeróbio facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. É uma bactéria amplamente distribuída na natureza e é a mais abundante na microbiota comensal gastrointestinal humana. Ela concentra-se na camada mucosa do cólon, onde coexiste com as células do hospedeiro em uma relação de simbiose, desempenhando papel fisiológico importante para o funcionamento do organismo (Allocati *et al.*, 2013; Koneman, 2022).

Figura 2- Microscopia eletrônica da bactéria *Escherichia coli*.



Fonte: *Baylor College of Medicine*, 2020.

Legenda: Imagem de microscopia eletrônica da bactéria *E. coli* (em rosa) aderindo à superfície de um organoide do cólon humano.

Além disso, já foram identificadas diversas variantes de *E. coli* altamente adaptadas a outros sítios, devido a aquisição de fatores de virulências específicos, frequentemente localizados em elementos genéticos transmissíveis, como ilhas genômicas, bacteriófagos, plasmídeos ou transposons e que, assim, podem ser facilmente transferidos para outras bactérias (Hacker; Hentschel; Dobrindt, 2003; Johnson; Nolan, 2009).

Desta forma, esse deslocamento permite que a bactéria ocasione diversas doenças, mesmo em indivíduos saudáveis, tornando-a uma das principais causadoras de infecções do trato gastrointestinal e urinário, meningite neonatal e até mesmo de infecções generalizadas, como as septicemias (Kaper; Nataro; Mobley, 2004; Leimbach; Hacker; Dobrindt, 2013; Lösch *et al.*, 2015).

Atualmente já foram isoladas seis estirpes de *E. coli* que são responsáveis por causar infecções diarreioagênicas. Elas foram denominadas de *E. coli* diarreioagênicas e são: a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), a *E. coli* enteroagregativa (EAEC), a *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e a *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (Nataro; Kaper, 1998; Jensen *et al.*, 2014).

Assim, todas as cepas listadas, representam, em nível global, as causas mais comuns de diarreias pediátricas, sendo responsáveis por diferentes síndromes clínicas importantes como, a diarreia do viajante, colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica, diarreia persistente e diarreia aquosa de bebês (Nataro; Kaper, 1998; Jensen *et al.*, 2014).

2.3.1 *Escherichia coli* enteroagregativa

A *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é o patotipo mais emergente e geneticamente heterogêneo, sendo considerado mundialmente como um importante patógeno entérico da infância. Ela possui como característica principal a capacidade de formação de microcolônias, a partir da adesão à monocamada de células de carcinoma laríngeo humano (HEp-2), formando um padrão de adesão agregativa, onde as bactérias se aderem entre si, formando uma configuração conhecida como “tijolos empilhados” (Huang, 2006; Farfán-García, 2016).

O mecanismo de patogênese da EAEC ainda não está completamente elucidado, principalmente devido a heterogeneidade das cepas, ou seja, em alguns casos, há associação clara da EAEC com a diarreia e, em outros, ela parece causar apenas infecção subclínica, ou ainda, apenas uma colonização intestinal (Steiner *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2014).

Ainda assim, estudos demonstram que as colonizações por EAEC, mesmo sem a sintomatologia de diarreia, acabam ocasionando impactos significativos no crescimento infantil (Steiner *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2014). Acredita-se que a EAEC atue no epitélio, exacerbando a produção de muco e favorecendo a formação de um biofilme sobre as células e, conseqüentemente, a sua colonização persistente no sítio, onde ela inicia os danos à mucosa intestinal com a secreção de citocinas e enterotoxinas (Navarro-Garcia; Elias, 2011; Kotloff *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2014; Lösch *et al.*, 2015).

Além disso, em estudos sugerem que EAEC pode ser a causa bacteriana mais comum de doenças diarreicas em todas as idades nos Estados Unidos, além de ser a segunda causa mais comum de diarreia do viajante e ser considerada um patógeno oportunista associado a casos de diarreia grave em pacientes com imunodeficiência adquirida e em crianças com desnutrição em países em desenvolvimento (Nataro *et al.*, 2006; Roche, 2010).

Um estudo caso-controle multicêntrico prospectivo, realizado em países da África e Ásia com foco na diarreia infantil, intitulado de “Estudo Multicêntrico Entérico Global” (GEMS) avaliou crianças com idade entre 2 e 54 meses com diarreia moderada a grave e encontrou uma alta prevalência de infecções por EAEC, embora sem associação com a doença (Kotloff *et al.*, 2013).

No Brasil, altas taxas de infecções por EAEC já foram demonstradas em diferentes regiões, tanto em crianças como em adultos, sendo associada a casos de diarreia aguda, diarreia persistente e condições assintomáticas. As maiores taxas encontram-se nas regiões sudeste e nordeste, chegando a 71% em amostras diarreicas na cidade de São Paulo (Liebchen *et al.* 2011); e 41% na cidade de Fortaleza, de acordo com Lima e colaboradores (2013). Neste último estudo foi detectada uma alta prevalência deste patógeno em quadros assintomáticos.

Na região semiárida do Brasil, um estudo caso-controle que englobou seis cidades com população maior que 50 mil habitantes: Crato, no Ceará; Ouricuri, em Pernambuco; Picos, no Piauí e Cajazeiras, Patos e Sousa, na Paraíba, verificou que, em um total de 600 crianças com diarreia, EAEC era a mais prevalente frente às outras bactérias entéricas, estando presente em 59,22

% dos casos e em 50 % entre os controles (Lima *et al.*, 2019).

Já em estudo de coorte multicêntrico realizado em países da América do Sul, Ásia e África, intitulado “Etiologia, Fatores de Risco e Interações de Infecções Entéricas e Desnutrição e as Consequências para a Saúde Infantil” (MAL-ED), observou-se que a infecção por EAEC foi a segunda e a terceira mais prevalente no primeiro e segundo ano de vida das crianças participantes, apresentando associação estatística da presença desse patógeno à desnutrição infantil (Lima *et al.*, 2000).

3. HIPÓTESES

- O modelo *in vitro* desnutrição desenvolvido neste estudo é capaz de reduzir a proliferação e viabilidade celular em células epiteliais intestinais (IEC-6).
- O modelo *in vitro* desnutrição desenvolvido neste estudo é capaz de induzir a apoptose celular em células epiteliais intestinais (IEC-6).
- O modelo *in vitro* desnutrição desenvolvido neste estudo é capaz de causar a parada do ciclo celular em células epiteliais intestinais (IEC-6).
- A *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) apresenta mecanismos diferentes de infecção celular a depender do estado nutrido e desnutrido.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar a patobiologia da cepa 042 de *Escherichia coli* enteroagregativa em modelo de desnutrição *in vitro* de células epiteliais intestinais (IEC-6).

4.2 Objetivos Específicos

- Padronizar um modelo de desnutrição *in vitro* utilizando células epiteliais intestinais (IEC-6).
- Analisar a proliferação das células submetidas à desnutrição *in vitro*.
- Analisar a viabilidade celular das células submetidas ou não a um modelo *in vitro* de desnutrição na presença e ausência da infecção.
- Investigar os efeitos da infecção pela cepa padrão de EAEC (042) em um modelo de desnutrição *in vitro*.
- Analisar a expressão de proteínas associadas ao transportadores de nutrientes, ciclo celular e apoptose, em células submetidas ou não a um modelo de desnutrição na presença e ausência da infecção por EAEC 042.
- Analisar a expressão gênica de FABP, ATF2, CREB1, ELK1 e FOXO3a em células submetidas ou não a um modelo de desnutrição na presença e ausência da infecção por EAEC 042.

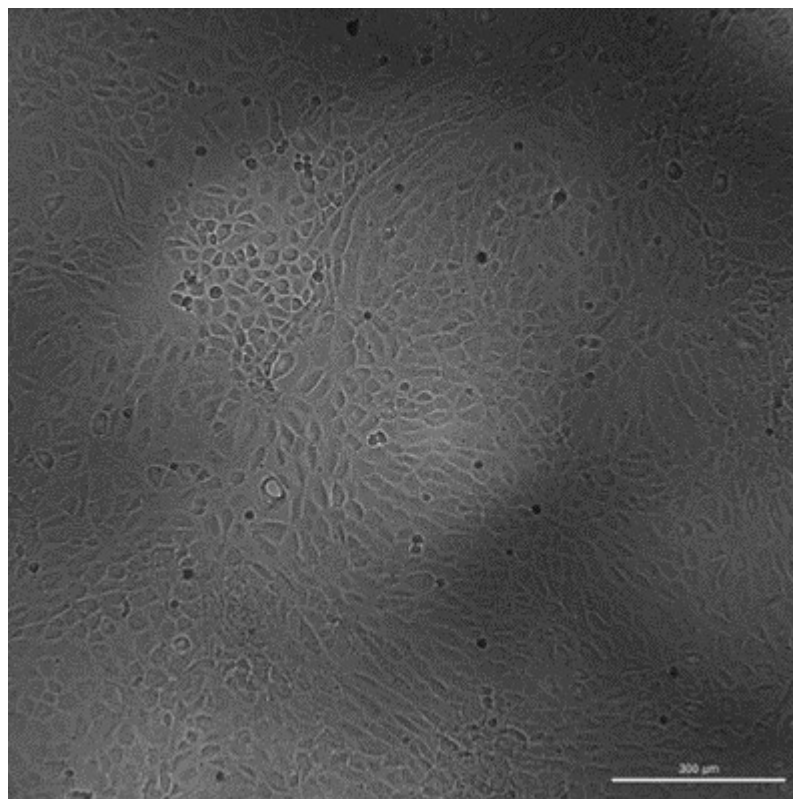
5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Linhagem celular

Neste estudo foram utilizadas células epiteliais intestinais (IEC-6), em passagens de 20-40, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro), provenientes da cripta do jejuno de rato e constituem uma linhagem celular de cariótipo diploide e de crescimento *in vitro* normal.

Assim, essas células são uma linhagem não transformada, aderente, com morfologia epitelióide, que crescem em monocamadas (Figura 3) com características de células não diferenciadas de criptas do intestino delgado, amplamente utilizadas em modelos para avaliar parâmetros de recuperação intestinal (McCormack *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 2005, Carvalho *et al.*, 2012).

Figura 3 – Microscopia de células epiteliais intestinais (IEC-6) com 80% de confluência



Fonte: autora da pesquisa.

Legenda: Microscopia de células epiteliais intestinais crescidas em placa de cultivo celular e com 80% de confluência.

5.2 Cultivo de celular

As células IEC-6 foram mantidas em dois tipos de meios de cultivo: um meio com condições padrão de nutrição e um meio em condições de desnutrição. Ambos os grupos foram acondicionados em estufa nas condições de 5% de CO₂ e 95% de O₂, na temperatura de 37° C durante todo o cultivo celular.

5.3 Modelo padrão de nutrição

Neste modelo foi utilizado o meio Dulbecco Modification of Minimum Essential Media (DMEM) (Capricorn Scientific) acrescido de 5% de soro fetal bovino inativado, 10mg de insulina humana recombinante (GIBCO), 50U/mL de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina.

5.4 Meio de desnutrição *in vitro*

Realizamos uma adaptação de Freitas (2021) com privação parcial de nutrientes, onde reduzimos 50% da composição total do meio DMEM. Atualmente, os modelos de desnutrição *in vitro* são comprovados por meio da redução da proliferação e aumento da apoptose (Ueno *et al.*, 2011; Freitas, 2021).

5.5 Análise de proliferação celular

A análise de proliferação celular consistiu no plaqueamento de quantidade determinada de células e ao final do período experimental, a quantidade de células foi recalculada.

Assim, para este experimento, foi padronizada a quantidade de $1,5 \times 10^6$ de células por poço. Após a contagem das células, com a utilização da câmara de Neubauer (Precicolor HGB Germany), as células foram plaqueadas em placa de seis poços, sendo a divisão de três poços para o grupo nutrido (GN), adicionado 3ml de meio padrão de nutrição e os outros três poços para o grupo desnutrido (GD) com a diluição do meio padrão de nutrição para 1,5ml juntamente com 1,5ml de PBS.

Desse modo, transcorrido tempo experimental de sete dias, com troca de meio a cada dois dias, foram refeitas as contagens de células de cada poço.

5.6 Análise de viabilidade celular

A análise de viabilidade celular foi testada no período de 7 dias após o início da desnutrição e 24 horas após a infecção. Ela foi realizada pelo ensaio colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio (MTT), que é amplamente utilizado para qualificar e/ou quantificar as células metabolicamente ativas na cultura.

O MTT é um sal de tetrazólio de cor amarelada, que é internalizado nas células viáveis por endocitose e reduzido no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em sal de formazan, de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso. Em seguida, foi adicionado um agente surfactante para solubilização dos cristais formados e os produtos foram lidos por espectrofotometria.

As placas de cultivo celular foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Como controle negativo, foi utilizado PBS estéril, pH 7.4. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4000 RPM por 5 min e 100 µL de sobrenadante foram removidos. Foram adicionados 100 uL de uma solução de MTT a 10% em PBS em cada poço e incubou-se a placa a 37°C por um período de três horas. Decorrido o tempo de incubação, a placa foi centrifugada a 3.500 rpm por cinco minutos e, em seguida, desprezou-se a solução, para garantir que o MTT presente no meio fosse apenas a porção que foi endocitada.

Por fim, foi adicionado 100 uL de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada um dos poços e a placa ficou mantida em agitação por 30 minutos. A leitura da OD foi realizada em comprimento de onda de 562 nm em leitor de placas de microplacas (SYNERGY H1, BioTek).

5.7 Aquisição da cepa bacteriana

A cepa bacteriana de EAEC O44:H18 (*strain* 042), foi cedida em parceria com o pesquisador Dr. James P. Nataro, da Universidade de Virgínia (Virgínia, Estados Unidos), responsável pela descoberta e isolamento do patotipo de *E. coli* enteroagregativa.

5.7.1 Recuperação das cepas bacterianas

Para a recuperação da cepa bacteriana congelada foram utilizados

5mL de meio Luria Bertani (LB), onde as bactérias foram inoculadas e, posteriormente, foram incubadas em estufa bacteriológica a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, onde permaneceram por um período de 18 a 24 horas em agitação para seu crescimento.

Encerrado o período de agitação, as bactérias foram semeadas em ágar MacConkey (KASVI, Laboratórios Cond. S.A.) para testar sua pureza. Infecção das células IEC-6

Os experimentos de infecção foram realizados em laboratório de nível de biossegurança 2 (NB2) e o manuseio das bactérias ocorreu dentro de cabines de fluxo laminar. Após padronizado a concentração bacteriana de 10^7 UFC/mL, as bactérias foram suspensas no meio DMEM sem antibiótico, contendo as células, por 3 horas, tempo necessário para que ocorresse a adesão das bactérias sobre as células.

Concluído o período de incubação da monocamada de células infectadas, houve a lavagem por três vezes com a solução de tampão fosfato de sódio (PBS) e, em seguida, foi acrescido o meio DMEM adicionado do antibiótico gentamicina, na concentração de $200\mu\text{g/mL}$, escolhido previamente, de acordo com a sensibilidade testada pelo método de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton e de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), a fim de cessar a infecção.

5.8 Análise de alterações morfológicas e físicas das células

Para a análise morfológica, as células em estudo foram cultivadas (1×10^5 /poço) em placas de 6 poços. Após o tempo experimental de sete dias, as células foram encaminhadas para análise de morfologia no equipamento *Cytation C10 Confocal Imaging Reader* (BioTek).

5.9 Análise da expressão de proteínas *Western Blotting*

A expressão de proteínas foi realizada por meio da técnica de *Western Blotting*. Os *pellets* das células foram homogeneizados em tampão de RIPA (Tris 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Triton 1%) e, após trinta minutos em gelo, foram centrifugados a 16.000G por vinte minutos.

Assim, os sobrenadantes resultantes foram separados em tubos devidamente rotulados. A quantidade total de proteínas de cada amostra foi

mensurada utilizando-se o *Bradford™ Protein Assay Kit* (BIO-RAD), com uma curva de BSA de 6 pontos. Os volumes foram ajustados para que as quantidades de proteínas fossem equivalentes em cada amostra para, então, separar as proteínas por eletroforese em gel SDS-PAGE.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas, por eletroforese, para uma membrana de nitrocelulose (BIO-RAD) durante duas horas a 120 V. Seguida a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução de BSA (do inglês, *Bovine Serum Albumin*) a 5% em tampão TBS-T (Tris-NaCl com 1% de Tween 20) por uma hora sob agitação.

Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes, cada lavagem com dez minutos de duração, utilizando o tampão TBS-T. Os anticorpos primários SGLT- 1, PEPT-1, CFTR, CDC 42, CDC 2 p34, caspase 8, caspase 9, caspase 3 e GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) foram diluídos em solução BSA 5% na proporção de 1:1.000, e deixados em contato com a membrana sobre refrigeração e agitação branda durante todo o período noturno (*overnight*).

Transcorrido o período entre 16 a 18 horas, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes, por cinco minutos cada, e foram incubadas com anticorpos *secundários Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate* (BIO-RAD), diluídos em BSA a 5% na proporção 1:1000, durante uma hora e trinta minutos sob agitação.

Por fim, uma nova lavagem de três vezes por cinco minutos cada foi realizada e as marcações foram reveladas utilizando o *Clarity™ and Clarity Max™ Western ECL Substrates* (BIO-RAD) no transluminador *ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™* (BIO-RAD).

5.10 Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR)

As células intestinais IEC-6 foram cultivadas em placas de 6 poços em condições de nutrição e desnutrição e na presença ou não da infecção por EAEC cepa 042 e a avaliação da expressão gênica foi realizada por meio de transcrição reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR) de dois passos, utilizando SYBR Green como fluoróforo.

Após os experimentos, as células foram encaminhadas para a

extração de RNA. O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (TRI Reagent® Sigma- Aldrich). A quantidade e qualidade dos RNAs extraídos foram analisados espectrofotometricamente através de leituras da absorbância em 260 nm e da razão das absorbâncias de 260/280 nm, respectivamente, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific). A partir dessa primeira quantificação, foi realizada a diluição das amostras em um tubo separado para que todas estivessem com a mesma concentração de 200 ng/µl. Logo depois, a diluição foi quantificada por meio do fluorímetro Qubit™ 4 (Invitrogen). A amostra diluída foi utilizada para produzir o DNA complementar (cDNA) na quantidade de 1 µg. O cDNA foi produzido utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega) O cDNA sintetizado foi armazenado em freezer -20°C até a sua utilização.

Todos os primers tinham na solução mãe a concentração de 100 µM. A solução mãe foi diluída para 20 µM e em seguida para 5 µM. Esta última diluição foi utilizada na qPCR para obter uma concentração de 0,8 µM de cada *primer* no volume final da reação.

A reação foi realizada utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) com volume final de 15 µl, sendo destes: 1 µl de cDNA, 2,4 µl de cada primer (senso e anti-senso), 7,5 µl de master mix da enzima (2X) e 1,7 µl de água livre de nuclease para completar o volume final.

O equipamento utilizado foi o Applied Biosystems QuantStudio® 3 Real- Time PCR System. A etapa de desnaturação foi realizada a 95 °C e a etapa de anelamento e de extensão foi realizada a 65 °C para o gene *EEF1A1* e a 60 °C para os demais genes. Os genes de referência foram utilizados 35 ciclos e os demais genes foram utilizados 40 ciclos.

Com os valores de CT (*Cycle threshold*, ciclo limiar) determinados pela reação de qPCR, a análise da transcrição gênica relativa foi calculada utilizando o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak e Schmittgen (2008). O $\Delta\Delta CT$ foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\Delta CT \text{ amostra (CT do gene alvo - CT do gene de referência) - } \Delta CT \text{ amostra normalizadora (Média do } \Delta CT \text{ do grupo controle).}$$

Uma vez determinado o $\Delta\Delta CT$, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, que

resultou no valor da transcrição gênica relativa. O resultado revela quantas vezes o gene de interesse está alterado nas amostras em relação ao grupo controle, tendo como padrão os genes de referência EEF1A1 e YWHAZ.

Tabela 1 - Sequências dos genes utilizados na RT-qPCR

MECANISMO ENVOLVIDO	GENE	SEQUÊNCIA DO INICIADOR (5' - 3')	TAMANHO DO PRODUTO (PB)
MARCADOR DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR	FABP	S: GGAAGCTTGGAGCTCATGACA	116
		A: GACGCCGAGTTCAAACACAAC	
VIAS DE SINALIZAÇÃO	ATF2	S: CTGTAATCACCCAGGCACCA A: GGGATTCCTGGAACACTAGGC	199
	ELK1	S: TCCCAGCCATCCTAACAGAG A: CCTAGCAGGCTTGGGCTAAG	130
	FOXO3-4	S: TGGAAGAACTCCATCCGYCAC A: ATGATCCACCAAGAGCTCTTG C	92
	CREB1	S: TCTAGTGCCCAGCAACCAAG A: TCTCTTGCTGCTTCCCTGTT	198

GENES DE REFERÊNCIA	EEF1A1	S: TGCTGGAGCCAAGTGGCTAAT A: GTGCCAATGCCGCCAATTT	181
	YWHAZ	S: GCTACTTGGCTGAGGTTGC	61

A: TGCTGTGACTGGTCCACAA

Fonte: adaptado de Freitas, 2014.

6. Análise de dados

Os resultados foram processados através do *software GraphPad Prism 8.0®*. Inicialmente, sendo testada a normalidade dos dados (Shapiro Wilk) para a escolha do teste a ser utilizado. Conforme a normalidade, se utilizou o teste T ou Mann Whitney e ANOVA ou Kruskal Wallis.

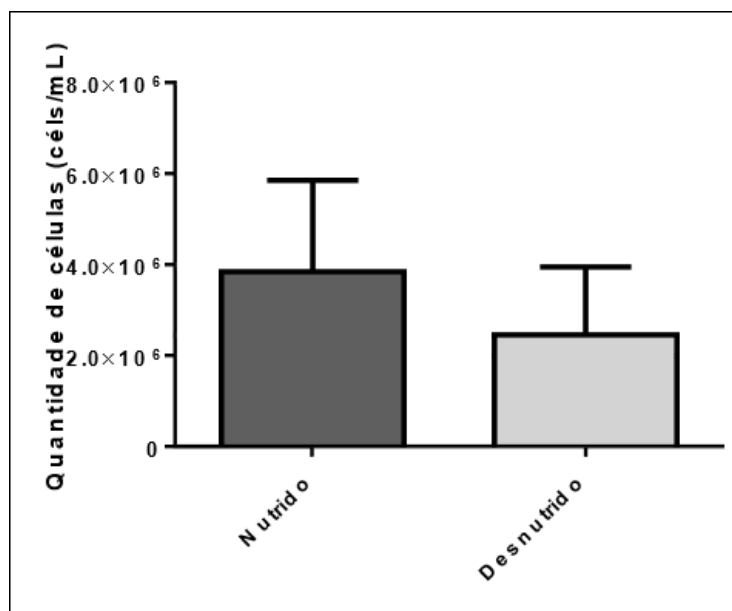
Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão médio (E.P.M) ou valor mediano, máximo e mínimo e analisados por ANOVA ou teste de Mann- Whitney. O intervalo de confiança foi de 95% e os testes foram considerados estatisticamente significativos quando o $p \leq 0,05$.

7 Resultados

7.1 Efeito da redução de nutrientes na proliferação e viabilidade celular

A proliferação celular pode ser identificada pelas quantidades de células em ambos os grupos. Observa-se que após 7 dias de tratamento ocorreu uma diferença significativa entre os valores apresentados na quantidade de células do grupo desnutrido quando comparado ao grupo nutrido (Figura 4). O grupo nutrido apresentou maior proliferação que o desnutrido, demonstrando que a desnutrição afetou a proliferação celular.

Figura 4 – Taxas de proliferação celular em células desnutridas.

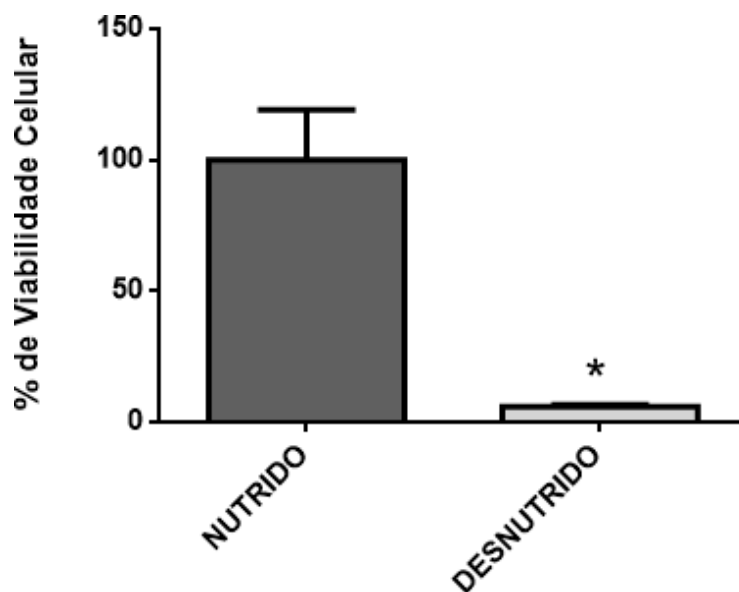


Fonte: autor da pesquisa.

Os valores da figura representam a média \pm E.P.M da proliferação celular em células desnutridas. Grupos: células controle nutridas (GN) e células desnutridas (GD). A análise estatística foi realizada por meio do teste T (N = 6). Não houve diferença significativa entre os grupos.

A viabilidade celular é identificada pelas taxas de absorvância do teste de MTT, conforme descrito no tópico 5.6. Na Figura 5, observa-se que no tempo experimental de 7 dias, ocorre uma redução significativa de 100% de viabilidade nas células do grupo nutrido (100% de DMEM) para 6% nas células do grupo desnutrido (50% de DMEM).

Figura 5 – Taxa de viabilidade celular em células desnutridas por 7 dias.



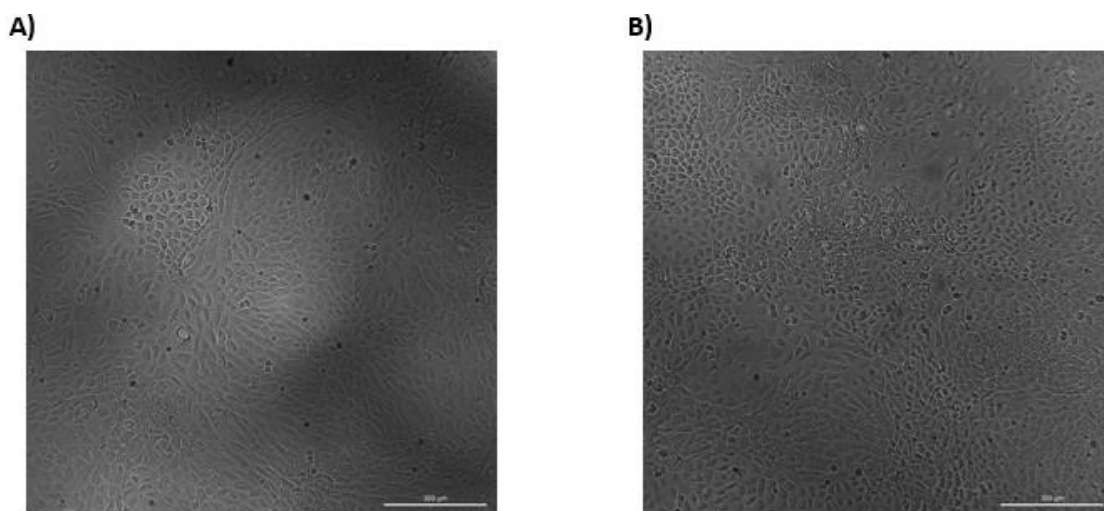
Fonte: autora da pesquisa.

Legenda: Representação gráfica das taxas de viabilidade celular de células epiteliais intestinais IEC-6 nutridas (barra cinza escuro) e desnutridas (barra cinza claro) no tempo de 7 dias. Os valores estão representados em média e E.P.M. A análise estatística foi realizada pelo teste T, havendo diferença significativa entre os grupos (* $P < 0,0001$) (N=6).

7.2 Efeito da desnutrição na morfologia celular.

O possível efeito da desnutrição na morfologia das células (Figura 6) foi analisado pela diferença de tamanho da área e do diâmetro celular (Figura 7).

Figura 6 - Microscopia confocal de células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas.

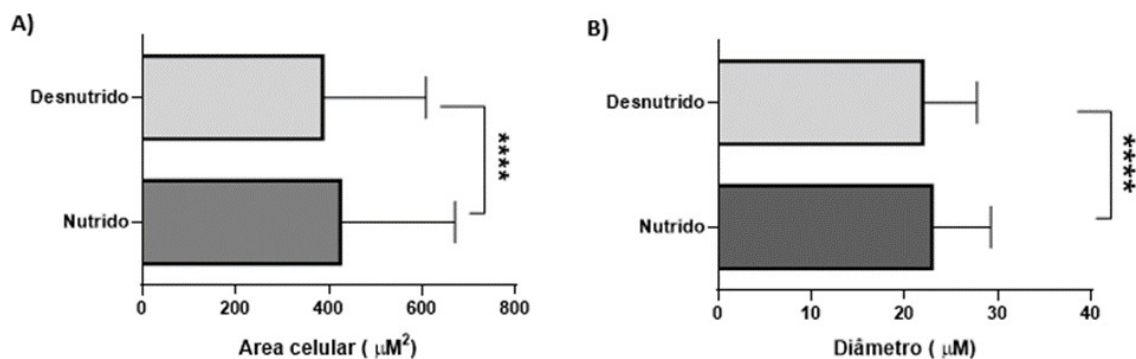


Fonte: autora da pesquisa.

Legenda: Microscopias representativas de células epiteliais intestinais (IEC-6) A) nutridas e B) desnutridas no período de 7 dias no aumento de 300 μm .

Observou-se que existe uma diferença significativa entre os valores apresentados pelos grupos, onde as células do grupo desnutrido apresentaram um menor tamanho de área (386,369 μm^2) quando comparado ao grupo nutrido (424,225 μm^2). O mesmo foi observado na comparação entre as medidas dos diâmetros celulares, onde as células do grupo desnutrido apresentaram um menor tamanho de área (21,9126 μm) quando comparado ao grupo nutrido (22,9132 μm).

Figura 7 – Medidas de área e diâmetro de células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas



Fonte: autora da pesquisa.

Legenda: Representação gráfica das medidas médias de A) Área celular (μm^2) e de B) Diâmetro celular (μm) de células epiteliais intestinais IEC-6 nutridas (barra cinza escuro) e desnutridas (barra cinza claro) no tempo de 7 dias. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Sidak. **** $P < 0,05$ em relação ao grupo nutrido. N desnutrido= 102.695, N nutrido= 63.792

7.3 Efeito da desnutrição na expressão de proteínas em células epiteliais intestinais (IEC-6)

A desnutrição *in vitro*, caracterizada redução de nutrientes essenciais no meio de cultivo, pode levar a alterações significativas na homeostase celular, afetando diretamente a expressão de importantes moduladores fisiológicos. O impacto da desnutrição na expressão dessas proteínas celulares, como o transportador de íons de cloreto de sódio (CFTR), o transportador de peptídeos (PEPT-1), e os co-transportadores de sódio e glicose (SGLT-1), bem como nas

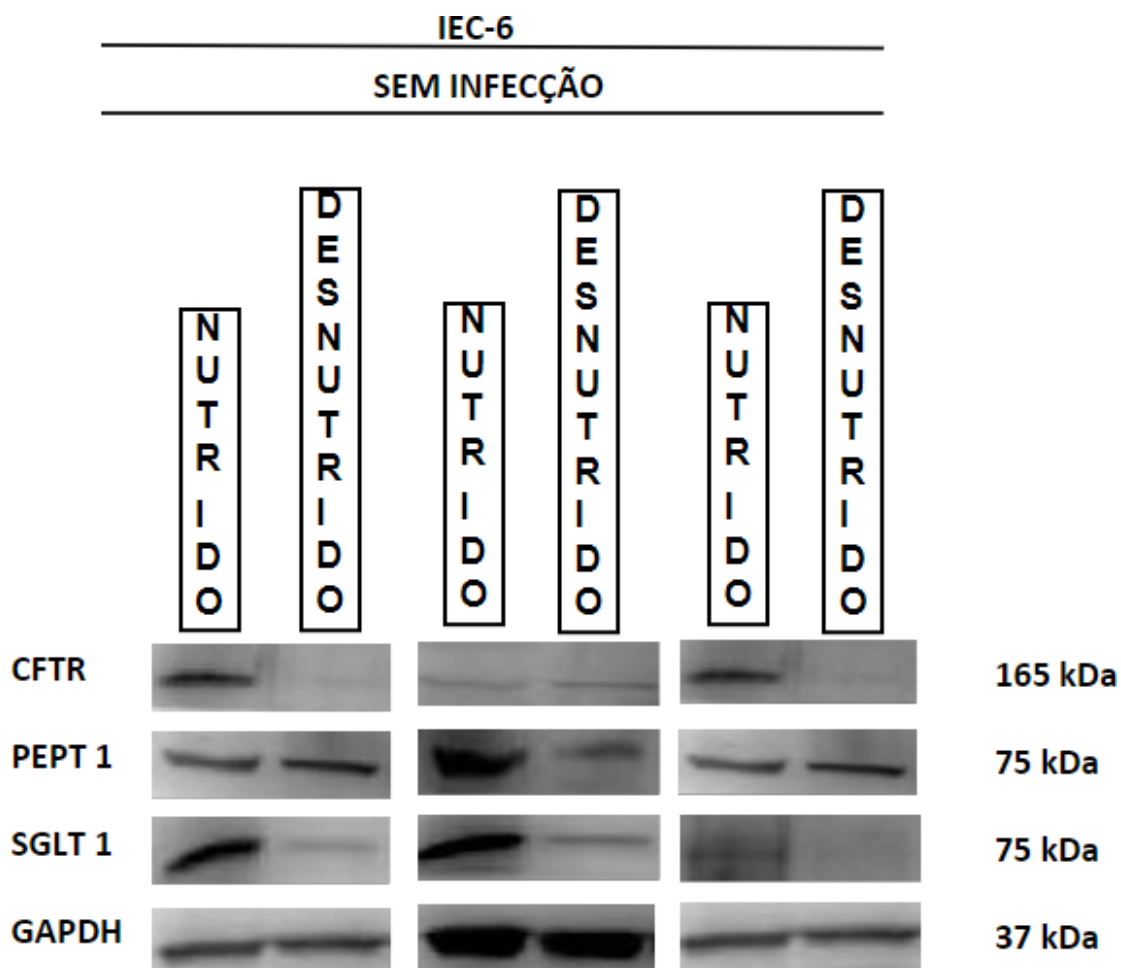
proteínas reguladoras do ciclo celular (CDC2 P34 e CDC42) e nas proteínas envolvidas na apoptose (caspases 9, 8 e 3), foi analisado através da técnica de *Western Blotting*.

O CFTR, uma proteína de membrana que atua como canal para cloreto de sódio, é fundamental para a manutenção do equilíbrio eletrolítico e da hidratação das superfícies epiteliais. Estudos demonstram que a desnutrição pode reduzir a expressão do CFTR, comprometendo a função excretora das glândulas exócrinas e a absorção de água no trato intestinal. O PEPT-1, por sua vez, é crucial para a absorção de dipeptídeos e tripeptídeos, e sua expressão diminuída pode impactar negativamente a absorção de proteínas, levando a um estado de catabolismo proteico.

Além disso, o SGLT-1, responsável pela coabsorção de sódio e glicose, é vital para a homeostase energética. A desnutrição pode resultar em uma diminuição da expressão do SGLT-1, afetando a absorção de glicose e contribuindo para a hipoglicemia. As proteínas CDC2 P34 e CDC42 são essenciais para a regulação do ciclo celular, e sua modulação na desnutrição pode causar um atraso na progressão celular, impactando a regeneração tecidual e a resposta imune.

Os níveis das proteínas CFTR e SGLT-1 diferiram entre o grupo nutrido e o grupo desnutrido, conforme demonstrado na figura 8. A redução na expressão do CFTR sugere um comprometimento na homeostase eletrolítica, enquanto a diminuição do SGLT-1 indica uma redução na absorção de glicose e sódio. Esses resultados destacam o impacto negativo da desnutrição na função celular e na regulação do equilíbrio homeostático.

Figura 8 - Expressão de proteínas responsáveis pelo transporte celular em células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas por 7 dias.



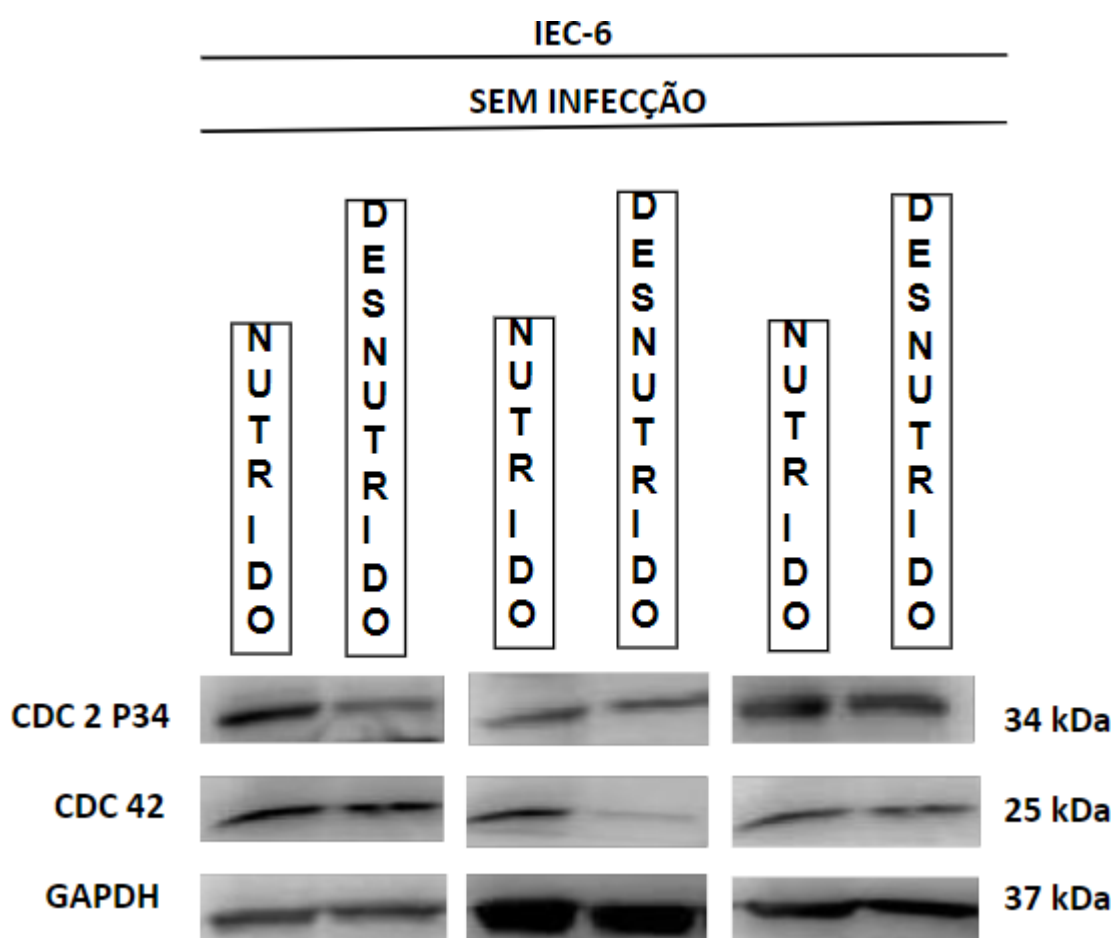
Fonte: autora da pesquisa.

Legenda: Representação da expressão proteica de CFTR, PEPT-1, SGLT-1 e GAPDH em células epiteliais intestinais IEC-6 nutridas (a esquerda) e desnutridas (a direita) no tempo de 7 dias.

As proteínas CDC2 P34 e CDC42 desempenham papéis críticos na regulação do ciclo celular e na sinalização celular. A CDC2 P34, uma quinase dependente de ciclina, é fundamental para a transição entre as fases do ciclo celular, especialmente na entrada na mitose, garantindo que as células se dividam de maneira ordenada e eficiente. Por outro lado, a CDC42 é uma GTPase que regula processos como a polaridade celular, a formação de protrusões celulares e a migração celular. A interação entre essas proteínas é essencial para a manutenção da integridade celular e a resposta a estímulos

ambientais. A análise da expressão dessas proteínas é vital para entender como a desnutrição pode impactar a progressão do ciclo celular e a homeostase tecidual. A figura a seguir (Figura 9) apresenta os resultados da expressão dessas proteínas nas diferentes condições nutricionais.

Figura 9 - Expressão de proteínas responsáveis pelo ciclo celular em células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas por 7 dias.



Fonte: autora da pesquisa.

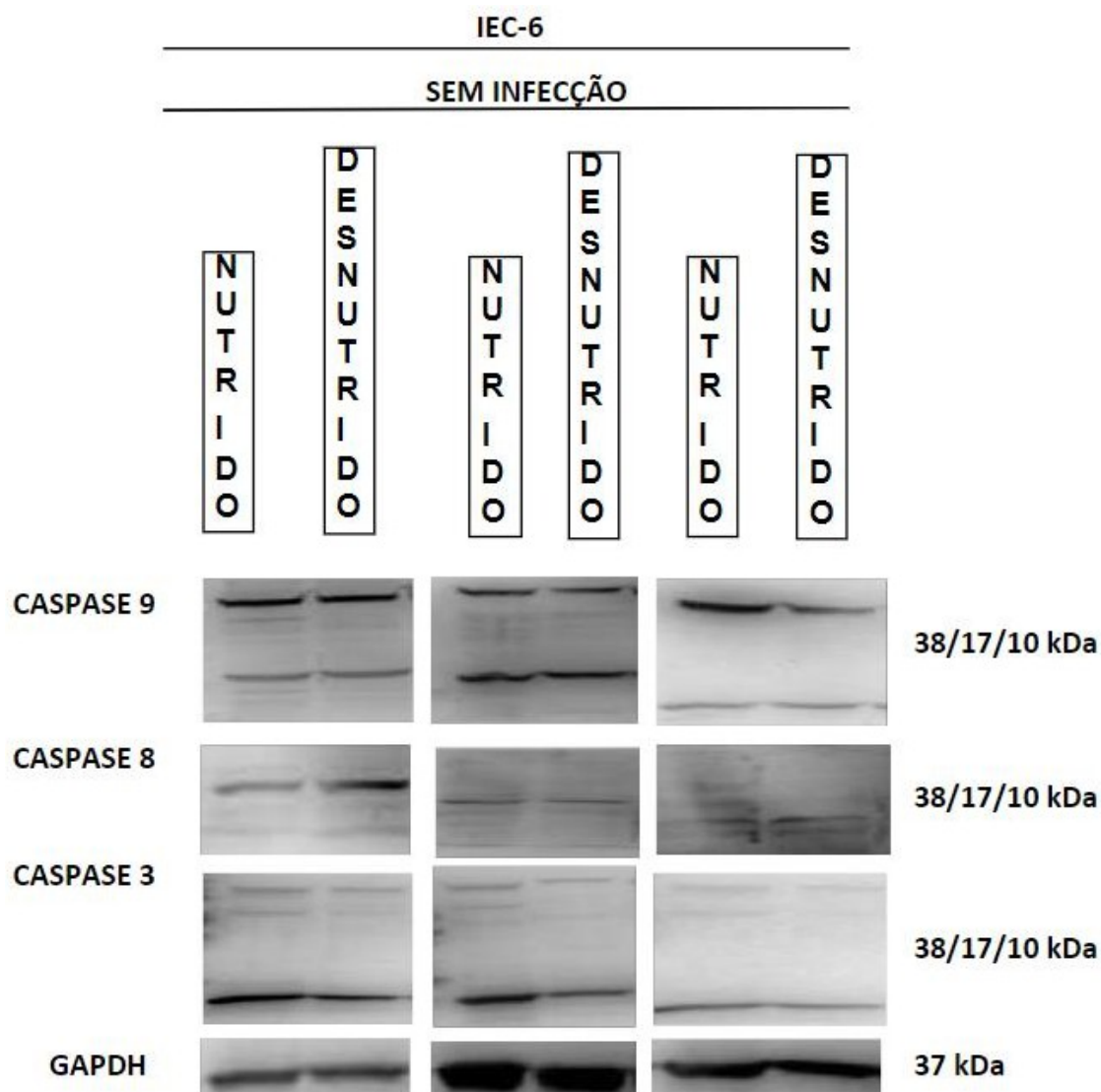
Legenda: Representação da expressão proteica de CDC 2 P34, CDC 42 e GAPDH em células epiteliais intestinais IEC-6 nutridas (a esquerda) e desnutridas (a direita) no tempo de 7 dias.

Não foi observada diferença na expressão das proteínas CDC2 P34 e CDC42 entre os grupos nutridos e desnutridos. Esses resultados sugerem que, apesar das alterações metabólicas associadas à desnutrição, os mecanismos

de regulação do ciclo celular mediado por essas proteínas podem permanecer intactos, indicando uma possível adaptação celular em resposta à falta de nutrientes. Essa constância na expressão pode ter implicações importantes para a compreensão da dinâmica celular em condições de estresse nutricional.

Já as caspases 9, 8 e 3 desempenham papéis fundamentais nos mecanismos de apoptose, sendo essenciais para a regulação da morte celular programada. A caspase 9 é ativada na via intrínseca da apoptose, respondendo a sinais de estresse celular e danos no DNA, enquanto a caspase 8 atua na via extrínseca, mediada por receptores de morte que recebem estímulos externos. Por sua vez, a caspase 3 é frequentemente referida como uma "caspase efetora", responsável pela execução final do processo apoptótico, levando à degradação de componentes celulares essenciais. A análise da expressão dessas caspases é crucial para compreender as implicações da desnutrição na apoptose celular, fornecendo informações sobre como a falta de nutrientes pode influenciar a sobrevivência celular e a homeostase tecidual. A figura a seguir (Figura 10) ilustra as variações nos níveis de expressão dessas proteínas em resposta à desnutrição *in vitro*.

Figura 10 - Expressão de proteínas responsáveis pela apoptose em células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas por 7 dias.



Fonte: autora da pesquisa.

Legenda: Representação da expressão proteica de Caspase 9, Caspase 8, Caspase 3 e GAPDH de células epiteliais intestinais IEC-6 nutridas (a esquerda) e desnutridas (a direita) no tempo de 7 dias.

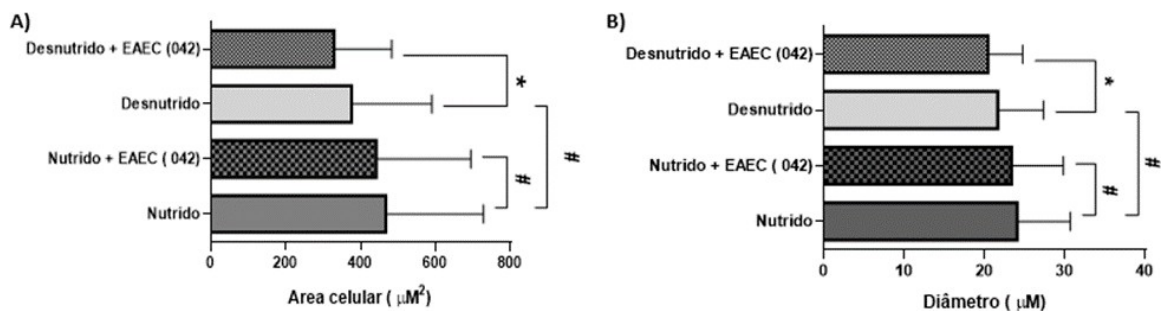
Não foi observada diferença significativa na expressão das proteínas caspases 9, 8 e 3 entre os grupos nutridos e desnutridos, assim como ocorreu com as proteínas CDC2 P34 e CDC42. Esses resultados sugerem que, apesar das condições adversas associadas à desnutrição, tanto os mecanismos de apoptose quanto os de regulação do ciclo celular podem permanecer relativamente intactos. Essa ausência de variação na expressão dessas

proteínas indica uma possível adaptação celular às limitações nutricionais, refletindo a complexidade das respostas celulares nessa situação de estresse nutricional.

7.4 Efeito da infecção por EAEC (042) na morfologia de células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas

Para verificar o efeito da infecção por EAEC na morfologia das células foi analisada a diferença de tamanho da área e do diâmetro celular (Figura 11).

Figura 11 - Medida da área e do diâmetro de células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas infectadas e não infectadas por EAEC (042).



Fonte: autora da pesquisa.

Legenda: Representação gráfica das medidas médias de A) Área celular (μM^2) e de B) Diâmetro celular (μM) de células epiteliais intestinais IEC-6 nutridas (barra cinza escuro), nutridas e infectadas (barra cinza escuro quadriculada), desnutridas (barra cinza claro) e desnutridas infectadas (barra cinza claro quadriculada). A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via seguido do pós- teste de Sidak. # $P < 0,0001$ em relação ao grupo nutrido e * $P < 0,0001$ em relação ao grupo desnutrido. N desnutrido= 78.557, N desnutrido infectado=107.026, N nutrido= 53.945 e N nutrido infectado= 22.964.

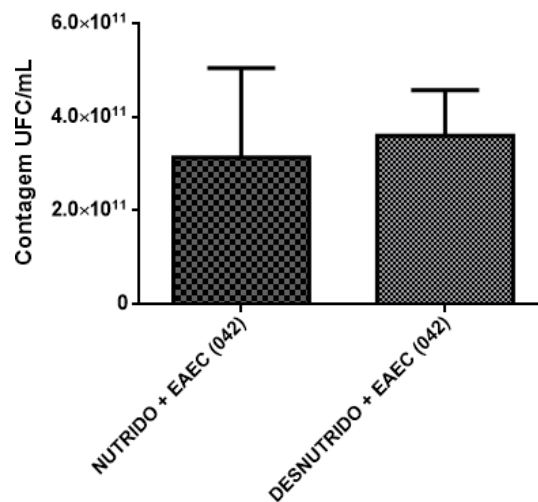
Os resultados referentes ao tamanho da área e diâmetro celular das células IEC-6 revelaram diferenças significativas entre os grupos avaliados. Comparando o grupo nutrido sem infecção com o grupo nutrido infectado, observou-se uma redução no tamanho celular, o que sugere que a infecção pode induzir estresse celular e afetar a morfologia das células, potencialmente comprometendo suas funções. Além disso, a comparação entre o grupo nutrido sem infecção e o grupo desnutrido evidenciou uma diminuição adicional no tamanho e diâmetro das células, indicando que a desnutrição também exerce

um impacto negativo sobre a morfologia celular. Por fim, ao comparar o grupo desnutrido sem infecção com o grupo desnutrido infectado, novamente foi observada uma redução no tamanho celular, sugerindo que a infecção exacerba ainda mais os efeitos adversos da desnutrição. Esses resultados ressaltam a importância do estado nutricional na manutenção da integridade celular e como a interação entre desnutrição e infecção pode influenciar a morfologia e, possivelmente, a funcionalidade das células epiteliais intestinais.

7.5 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)

Os resultados da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Escherichia coli* enteroagregativa mostraram uma tendência de maior quantidade de bactérias no grupo desnutrido infectado em comparação ao grupo nutrido infectado (Figura 12).

Figura 12 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).



Fonte: autora da pesquisa.

Legenda: Representação gráfica da contagem de unidades formadoras de colônias no sobrenadante celular de células epiteliais intestinais IEC-6 nutridas infectadas (barra cinza escuro quadriculada) e desnutridas infectadas (barra cinza claro quadriculada). Os valores estão representados em média e

E.P.M. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney.

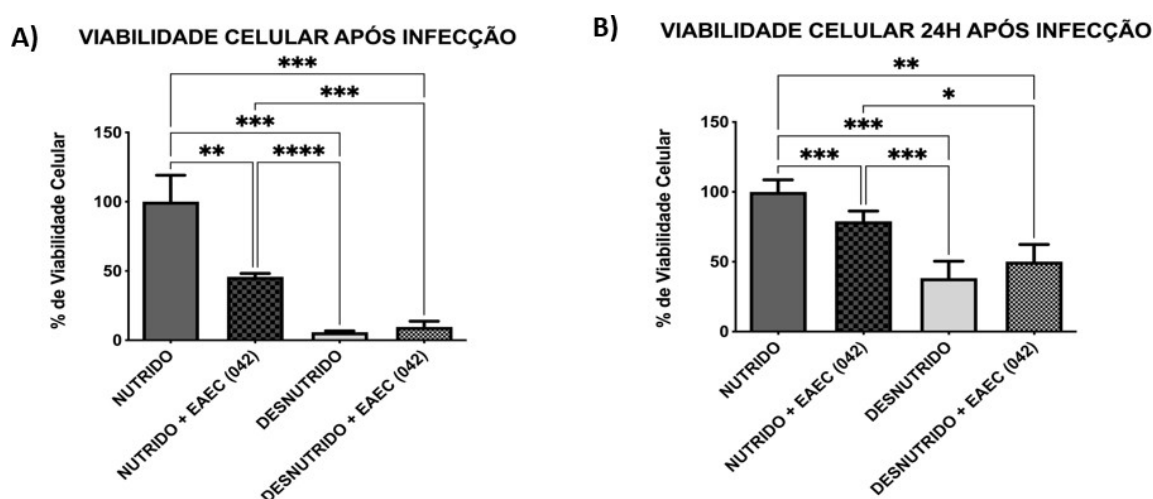
Embora a contagem de UFC tenha sido maior no grupo desnutrido, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Isso pode sugerir que, embora a desnutrição possa criar um ambiente que favoreça a colonização bacteriana, as

condições nutricionais *in vitro* ainda desempenham um papel importante na resposta à infecção. A ausência de significância estatística implica que, apesar da tendência observada, outros fatores podem estar influenciando a colonização bacteriana.

7.6 Efeito da infecção por EAEC 042 na viabilidade celular de células nutridas e desnutridas

Avaliamos a viabilidade celular das células IEC-6 infectadas por EAEC 042 em dois tempos: imediatamente após a infecção e 24 horas após a infecção (Figura 13).

Figura 13 – Taxas de viabilidade celular em células IEC-6 nutridas e desnutridas, infectadas e não infectadas por EAEC (042).



Fonte: autora da pesquisa.

Legenda: Representação gráfica da viabilidade celular de células epiteliais intestinais IEC-6 nutridas (barra cinza escuro), nutridas infectadas (barra cinza escuro quadriculada), desnutridas (barra cinza claro) e desnutridas infectadas (barra cinza claro quadriculada). Os valores estão representados em média e E.P.M. A análise estatística foi realizada pelo ANOVA de uma via e teste de múltiplas comparações de Bonferroni, havendo significância entre os grupos NUTRIDO vs. NUTRIDO + EAEC (042), NUTRIDO vs. DESNUTRIDO, NUTRIDO vs. DESNUTRIDO + EAEC (042), NUTRIDO + EAEC (042) vs. DESNUTRIDO e NUTRIDO + EAEC (042) vs. DESNUTRIDO + EAEC (042) (****P < 0,0001).

A análise das taxas de viabilidade das células IEC-6 revelou diferenças significativas entre todos os grupos avaliados, incluindo células nutridas e desnutridas, infectadas e não infectadas por *Escherichia coli* enteroagregativa. As células nutridas não infectadas apresentaram as taxas de viabilidade mais elevadas, indicando que a nutrição adequada é fundamental para a manutenção

da saúde celular e da funcionalidade. Em contraste, as células desnutridas, independentemente da infecção, mostraram uma redução marcante na viabilidade, evidenciando o impacto negativo da falta de nutrientes nas condições celulares.

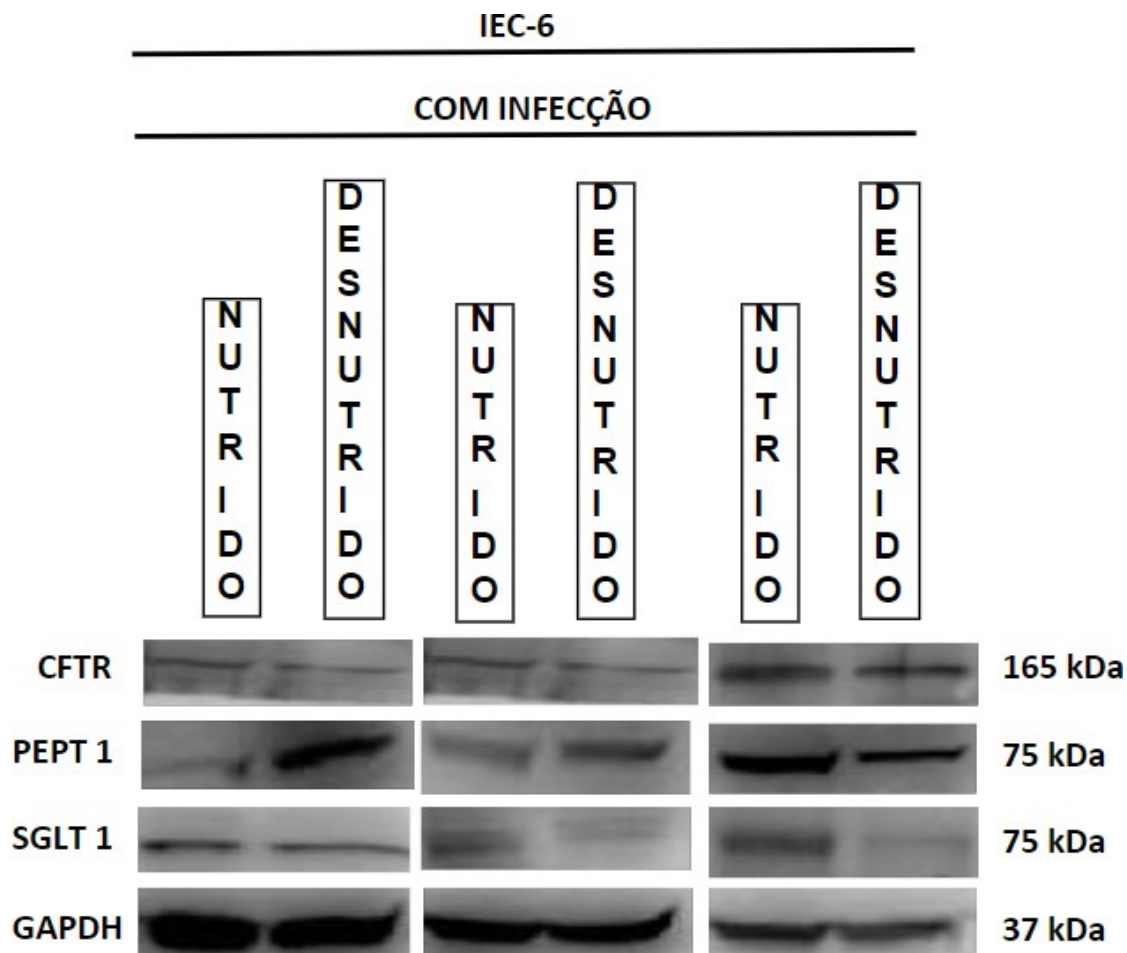
Quando comparadas as células infectadas, observou-se que tanto o grupo nutrido infectado quanto o grupo desnutrido infectado apresentaram taxas de viabilidade significativamente inferiores em relação aos seus respectivos controles não infectados. Isso sugere que a infecção por EAEC exerce um efeito adverso considerável sobre a saúde das células, exacerbando os efeitos já prejudiciais da desnutrição. Além disso, a viabilidade das células desnutridas infectadas foi significativamente menor do que a das células nutridas infectadas, indicando que a combinação de desnutrição e infecção pode ser particularmente devastadora para a integridade celular.

Esses resultados ressaltam a importância da nutrição na resposta celular a infecções e sugerem que a desnutrição não apenas compromete a capacidade das células de resistir a patógenos, mas também pode amplificar os danos causados pela infecção, levando a consequências mais graves para a saúde intestinal.

7.7 Efeito da infecção por EAEC 042 em células nutridas e desnutridas sob a expressão de proteínas envolvidas nos processos de transporte celular, apoptose e ciclo celular.

O impacto da infecção na expressão de proteínas celulares essenciais também foi investigado por meio da técnica de *Western blotting*. Esta análise buscou elucidar como o estresse infeccioso pode alterar a expressão dessas proteínas. A figura a seguir (Figura 14) apresenta os resultados obtidos na análise de proteínas transportadoras CFTR, PEPT-1 e SGLT-1.

Figura 14 – Expressão de proteínas responsáveis pelo transporte celular em células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas, na ausência e presença de infecção por EAEC (042).



Fonte: autor da pesquisa.

Legenda: Representação da expressão proteica de CFTR, PEPT-1, SGLT-1 e GAPDH de células epiteliais intestinais IEC-6 nutridas infectadas (a esquerda) e desnutridas infectadas (a direita).

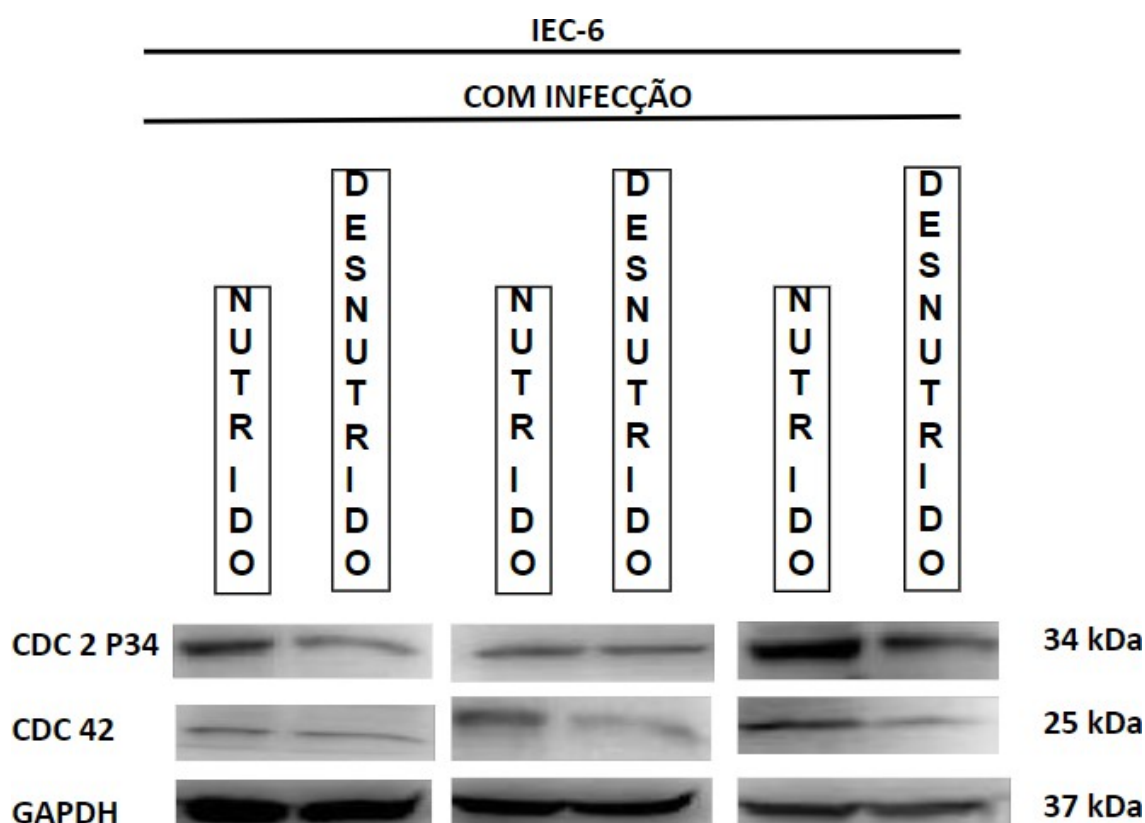
A análise da expressão das proteínas CFTR, PEPT1 e SGLT1 não revelou diferenças entre os grupos nutridos infectados e desnutridos infectados. Esses resultados sugerem que, mesmo diante da desnutrição, a infecção pode não ser suficiente para alterar a expressão dessas proteínas-chave responsáveis pelo transporte de íons e nutrientes.

A ausência de variações na expressão dessas proteínas entre os grupos infectados pode indicar que as células estão mantendo a expressão dessas moléculas, possivelmente como um mecanismo adaptativo para preservar

funções essenciais em um contexto de estresse como a infecção. Essa constância sugere que as células podem ter mecanismos compensatórios que atuam para mitigar os efeitos adversos da infecção, permitindo que a absorção de nutrientes e a regulação eletrolítica permaneçam funcionais, mesmo em condições desafiadoras.

Entretanto, é importante considerar que, apesar de não haver diferenças significativas na expressão dessas proteínas, isso não necessariamente reflete uma funcionalidade preservada.

Figura 15 - Expressão de proteínas responsáveis pelo ciclo celular em células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas, na ausência e presença de infecção por EAEC (042).



Fonte: autora da pesquisa.

Legenda: Representação da expressão proteica de CDC 2 P 34, CDC 42 e GAPDH de células epiteliais intestinais IEC-6 nutridas infectadas (a esquerda) e desnutridas infectadas (a direita).

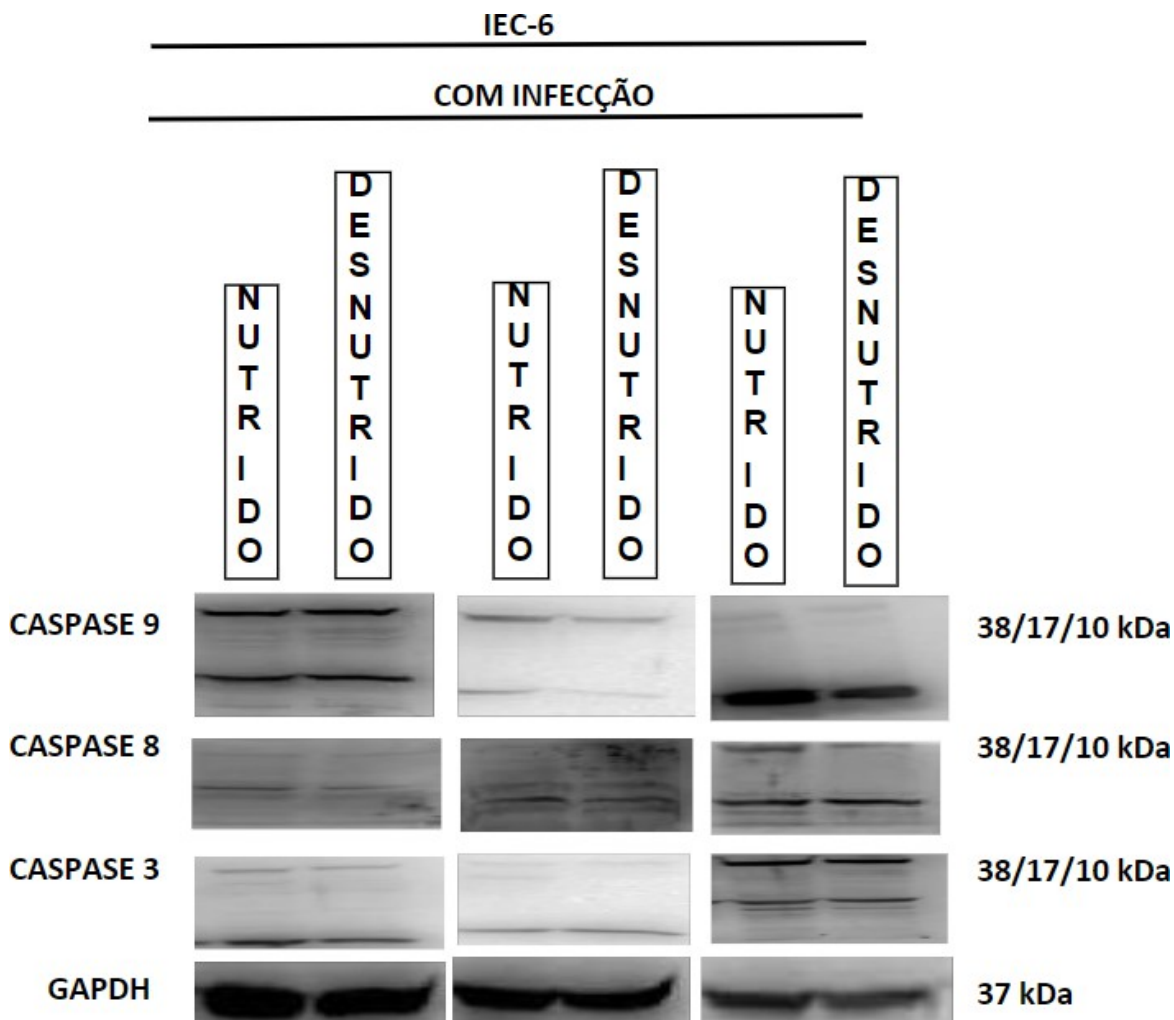
Na análise das proteínas CDC2 P34 e CDC42, observou-se que apenas a proteína CDC 42 apresentou uma diferença de expressão entre o grupo nutrido infectado e o grupo desnutrido infectado. Esse resultado indica que a

desnutrição pode afetar a regulação da CDC42, uma proteína GTPase fundamental para o controle da ciclagem celular, polaridade e migração celular. A redução na expressão da CDC42 no grupo desnutrido infectado sugere que a infecção pode prejudicar a capacidade das células de manter uma resposta adequada ao estresse e de se dividir de maneira eficiente.

Em contrapartida, a ausência de diferença significativa na expressão da proteína CDC2 P34 entre os grupos sugere que este componente do ciclo celular pode estar preservado em condições de desnutrição e infecção, possivelmente indicando um mecanismo compensatório que mantém sua função mesmo em um contexto desafiador. Essa preservação da CDC2 P34 poderia ser crucial para a continuidade do ciclo celular em um ambiente desfavorável, enquanto a alteração na expressão da CDC42 pode indicar um comprometimento nas funções relacionadas à migração e adaptação celular.

Esses resultados ressaltam a complexidade das interações entre nutrição, infecção e regulação do ciclo celular, sugerindo que, embora algumas proteínas possam ser mantidas, outras, como a CDC 42, podem ser mais vulneráveis às condições adversas. A compreensão dessas dinâmicas é essencial para elucidar os mecanismos subjacentes ao impacto da desnutrição em respostas celulares.

Figura 16 - Expressão de proteínas responsáveis pela apoptose em células epiteliais intestinais (IEC-6) nutridas e desnutridas, na ausência e presença de infecção por EAEC (042).



Fonte: autora da pesquisa.

Legenda: Representação da expressão proteica de Caspase 9, Caspase 8, Caspase 3 e GAPDH de células epiteliais intestinais IEC-6 nutridas infectadas (a esquerda) e desnutridas infectadas (a direita).

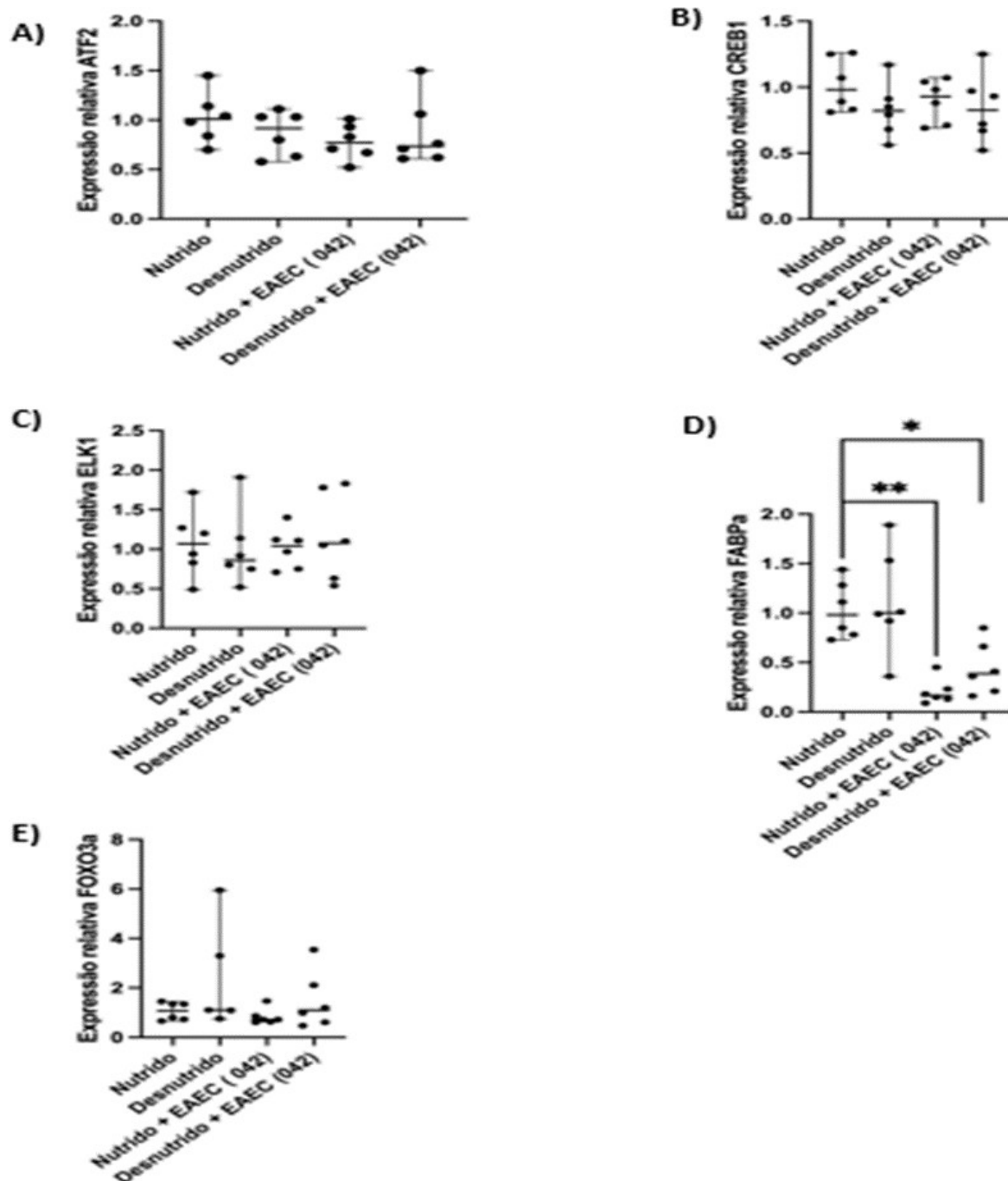
A análise da expressão das proteínas caspases 9, 8 e 3 não revelou diferenças entre o grupo nutrido infectado e o grupo desnutrido infectado. Esses resultados sugerem que a desnutrição não altera a ativação das vias de apoptose mediadas por essas caspases, que desempenham papéis cruciais na morte celular programada.

A constância na expressão dessas proteínas em ambos os grupos, mesmo sob condições de infecção, pode indicar que as células estão mantendo um mecanismo de controle da apoptose que não é diretamente afetado pela desnutrição. Isso sugere a possibilidade de uma adaptação celular que preserva a capacidade de resposta ao estresse, permitindo que as células enfrentem tanto a infecção quanto a falta de nutrientes sem uma alteração aparente na apoptose.

7.8 Efeito da infecção por EAEC 042 em células nutridas e desnutridas sob a transcrição de genes envolvidos nos processos de transporte celular, apoptose e ciclo celular

A avaliação da expressão gênica dos genes FABP, ATF2, CREB1, ELK1 e FOXO3a foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real (qPCR), que permite quantificar com precisão os níveis de RNA mensageiro. O gene FABP é conhecido por seu papel no transporte de ácidos graxos, enquanto o ATF2 e o CREB1 são fatores de transcrição críticos na resposta celular a estresses diversos. O ELK1, por sua vez, está envolvido na sinalização celular, e o FOXO3a desempenha um papel fundamental na regulação do ciclo celular e na apoptose. A figura a seguir (Figura 17) apresenta os resultados obtidos nas análises da expressão gênica desses alvos.

Figura 17 - Efeito da infecção por EAEC (042) sobre a transcrição gênica de mediadores das vias de sinalização celular em células IEC-6 nutridas e desnutridas.



Fonte: autora da pesquisa.

Legenda: Representação gráfica da transcrição relativa de A) ATF2, B) CREB1, C) ELK1, D) FABPa e

E) FOXO3a em células epiteliais intestinais IEC-6 nutridas, nutridas infectadas, desnutridas e desnutridas infectadas. Os valores estão representados em mediana e E.P.M. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $P < 0,05$. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,001$.

Observou-se que apenas a expressão relativa do gene FABP apresentou diferença significativa. Essa diferença foi identificada especificamente entre o grupo nutrido sem infecção e o grupo nutrido infectado, bem como entre o grupo nutrido sem infecção com o grupo desnutrido infectado. Esses resultados sugerem que a infecção pode induzir alterações na regulação do FABP, possivelmente refletindo a adaptação metabólica em resposta ao estresse causado pela infecção. Por outro lado, a ausência de variações significativas na expressão dos outros genes analisados indica que, nas condições experimentais avaliadas, suas atividades podem permanecer relativamente estáveis, mesmo diante da desnutrição ou da infecção.

8. DISCUSSÃO

A desnutrição é um problema de saúde global, especialmente em áreas onde a falta de acesso a alimentos adequados é prevalente. A EAEC é uma cepa de *Escherichia coli* associada a infecções intestinais, e a compreensão de como a desnutrição influencia a resposta do intestino a esse patógeno pode ter implicações significativas para o manejo clínico dessas infecções, especialmente em regiões onde a desnutrição e as infecções intestinais são problemas comuns.

A maioria dos casos de desnutrição ocorridos em países de média e baixa renda ocorre devido a deficiências nutricionais nas dietas complementares ao leite materno (Brown; Dewey; Allan, 1998). Atualmente, a quantificação dos nutrientes da dieta complementar de crianças e sua associação com a desnutrição infantil é bastante escassa na literatura (Campbell *et al.*, 2018; Ersino; Henry; Zello, 2016; Owais, 2016; Raymond, 2017), refletindo diretamente em dietas experimentais de desnutrição com pouca representatividade clínica.

Sabe-se que o prejuízo da função absorptiva intestinal, proveniente de infecções entéricas tem impacto relevante nos casos de desnutrição global. Isso impacta em distúrbios na função imunológica e perda da integridade da barreira intestinal, prejudicando a função absorptiva intestinal e predispondo ainda mais a recorrência de episódios de doenças entéricas (mesmo assintomáticas) e translocação bacteriana, levando a um estado inflamatório intestinal crônico, que culmina com a má absorção de nutrientes, amplificando e reiniciando o ciclo infecção entérica e desnutrição (Takele; Zewotir; Ndanguza, 2023).

No que se refere a digestão e absorção de nutrientes, ambas são funções primordiais do trato gastrointestinal e, para desempenhar estas funções, a sua mucosa possui taxas altas de renovação celular comparadas a outros tecidos, sendo a integridade deste epitélio dependente do equilíbrio entre as taxas de proliferação, migração e apoptose celular (Bhattacharya; Ray; Johnson, 2005). Sabe-se que durante a desnutrição a absorção intestinal encontra-se afetada (Lunn, 2000), isso porque os tecidos que possuem altas taxas de renovação celular, como é o caso do epitélio gastrointestinal, tendem a apresentar uma diminuição da proliferação celular quando submetidos à

desnutrição, ocasionando uma atrofia da mucosa gástrica e intestinal, reduzindo o tamanho das criptas, vilosidades e microvilosidades intestinais (Ortiz; Betancourt, 1984; Molina; Pelissari; Feirhmann, 2009). Isso corrobora com achados deste presente estudo, onde foi demonstrado que a desnutrição prejudicou a proliferação celular de células epiteliais intestinais, principalmente no sétimo dia com redução de 50% dos nutrientes. Esses dados sugerem que as células em desnutrição tendem a diminuir o seu metabolismo o que conseqüentemente acaba impactando na sua proliferação celular. Este resultado corroborou com outros estudos, onde foi verificado uma diminuição da proliferação em células intestinais desnutridas (Ueno *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2021). Além disso, estudos *in vivo* também verificaram uma diminuição da taxa proliferativa das criptas durante a desnutrição (Chaudhary *et al.*, 2000; Goodlad; Wright, 1984; Holt; Kotler, 1988).

Arigony *et al.* (2013) observaram a variabilidade das características de diferenciação e proliferação de células-tronco cultivadas com diferentes soros fetais bovinos (FBS) e, conseqüentemente, diferentes quantidades de micronutrientes. Eles destacaram a influência das condições de cultura celular, como a utilização de um meio de cultivo deficiente em nutrientes essenciais e como isso pode afetar a viabilidade e a estabilidade genômica celular. Isso condiz com nossos achados de que o cultivo em redução de nutrientes diminui não somente a viabilidade das células, como também reduz o seu tamanho. Em condições normais, as taxas de proliferação celular coincidem com as taxas de apoptose, o que é fundamental para a manutenção da homeostase do epitélio intestinal e da integridade tecidual. No entanto, a apoptose (morte celular programada), um processo altamente regulado, que envolve uma sequência de mecanismos intracelulares, incluindo a ativação de cascatas de proteínas, também atua como um mecanismo de defesa celular, ativado sempre que ocorre uma invasão por agentes patogênicos, ou ainda quando o DNA é lesado (Elmore, 2007; Grivicich, Regner, Rocha, 2007). Neste estudo, observamos que não houve diferenças significativas na expressão de caspase 8, que atua como iniciadora, e também das caspases efetoras 9 e 3 pelo grupo desnutrido quando comparado com o grupo nutrido. Este fato pode ser talvez explicado em virtude da maior confluência das células nas placas do grupo nutrido, haja visto que as mesmas mantiveram proliferação não retardada pela desnutrição e por

consequência da falta de espaço na placa, elas também entraram em apoptose.

O intestino delgado mantém um sistema complexo de transportadores com propriedades eletrofisiológicas necessárias para manter a homeostase associada aos fluxos paracelulares e transcelulares através das células epiteliais intestinais (Sampaio *et al.*, 2016). A proteína CFTR atua como um canal iônico seletivo para o transporte de cloreto (Cl⁻) através das membranas celulares. No intestino, esse transporte é essencial para o ajuste do equilíbrio eletrolítico, tendo um impacto significativo na osmolaridade e, conseqüentemente, no transporte de água. Observamos que na análise qualitativa da expressão desta proteína no grupo desnutrido houve uma redução da expressão quando comparada ao grupo nutrido. Isto juntamente com o fato de o meio de cultivo celular conter PBS, sugerimos que as células desnutridas podem ter sofrido desidratação e por isso apresentaram redução dos seus tamanhos.

Sampaio *et al.* (2016) ao utilizarem a dieta básica regional por 7 dias em um modelo murino agudo de desnutrição, não observaram nenhuma diferença significativa na expressão de proteínas relacionadas com o transporte de glicose (SGLT-1) e de peptídeos (PEPT-1) nas análises de intestino delgado dos animais, corroborando com os achados do presente estudo, onde a expressão destas proteínas pelas células epiteliais dessa região do intestino, não diferiu significativamente entre o grupo desnutrido e nutrido. Já Pinheiro *et al.* (2013), em um modelo de restrição proteica dietética em ratas grávidas, obteve um aumento da expressão destas duas proteínas transportadoras.

Para prevenir uma possível lesão ao seu DNA e se proteger da apoptose, estudos sugerem que as células desnutridas tornam-se quiescentes, saindo do ciclo celular e entrando na fase G₀. Além disso, a taxa proliferativa está diretamente relacionada com a progressão do ciclo celular (Agarwal *et al.*, 2006; Schafer, 1998). Desse modo, o nosso resultado, mesmo que não significativo, de redução da expressão de CDC 2 P34 pelas células desnutridas e a diminuição da proliferação celular, sugerem que há uma parada da progressão do ciclo celular pelas células desnutridas e que isso se relaciona com a diminuição da proliferação. Esses resultados também estão de acordo com os resultados encontrados por Borelli *et al.*, (2009), onde animais com desnutrição proteica apresentaram maior percentagem de células de medula óssea na fase

G0/G1 e menor porcentagem nas fases S/G2/M com relação ao controle nutrido. Isso sugere que a desnutrição proteica diminui a capacidade proliferativa das células devido à dificuldade que as células desnutridas têm de transpor a fase G1 em consequência da falta de nutrientes necessários para a progressão do ciclo (Gómez *et al.*, 1996; Ortiz; Betancourt, 1984).

As doenças do trato gastrointestinal são cada vez mais reconhecidas pela diversidade de patógenos que podem impactar na função intestinal, evidenciada pela presença ou não da síndrome diarreica (Petri-Junior *et al.*, 2008). Esta doença afeta principalmente a população infantil. De acordo com informações obtidas no relatório de doenças diarreicas nos anos de 2018 a 2022, realizado pelo plano de tratamento do Serviço de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Estadual do Ceará (SIVEP- DDA/ SESS), no ano de 2022, foram observados 54.221 casos de Doença Diarreica Aguda (DDA) em crianças menores de 5 anos de idade no Ceará (Ministério da Saúde, 2022).

No que se refere à patogênese da infecção pela EAEC, é considerada complexa e possui uma heterogênea rede de eventos (Elias *et al.*, 2002). Os estudos destacam a capacidade da EAEC de se aderir ao epitélio ileal, jejunal e colônico, resultando em danos à barreira intestinal devido à carga bacteriana e à presença de genes de virulência. Entre esses genes, o fator *aggR* assume um papel crucial, atuando como um dos principais reguladores dos genes de virulência da EAEC. O *aggR* controla a expressão de fatores de aderência, como a proteína dispersina (codificada pelo gene *aap*), juntamente com um conjunto de genes cromossômiais da EAEC (Huang *et al.*, 2006).

Adicionalmente, o gene *pet* codifica a serino-protease autotransportada (SPATE I), funcionando como uma enterotoxina. A secreção dessa toxina resulta na clivagem da espectrina do citoesqueleto das microvilosidades intestinais, ocasionando o alongamento e arredondamento das células, seguido por esfoliação e redução na força de tensionamento da actina (Harrington; Dudley; Nataro, 2006). O gene *pic* codifica uma proteína capaz de degradar os componentes gelatinosos do biofilme, favorecendo a mobilidade da bactéria ao longo da mucosa e aumentando a área de colonização pela EAEC (Navarro-Garcia; Elias, 2010). Por sua vez, o gene *astA* codifica uma proteína termoestável (Huang *et al.*, 2006). Essa interação complexa de genes e fatores contribui para a aderência da EAEC ao epitélio intestinal, desencadeando a

liberação subsequente de citocinas e provocando uma resposta inflamatória (Andrade; Freymüller; Fagundes-Neto, 2010).

Utilizamos o teste de viabilidade celular no período 0 horas e 24 horas após a infecção por EAEC 042 para analisar o efeito da concentração bacteriana incubada pelo período de 3 horas na presença das células IEC-6. Seguimos o estudo conduzido por Prata *et al.*, (2019) onde determinava que a melhor concentração para o inóculo da cepa 042 em células nutridas era de 10^5 UFC/mL. Eles verificaram que essa cepa causou uma redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle 24 horas depois da infecção. Os nossos achados foram que as células nutridas infectadas reduzem significativamente a sua viabilidade já no tempo logo após a infecção e que há uma redução ainda maior da viabilidade de células que foram submetidas à desnutrição e infectadas.

No tempo de 24 horas após a infecção, obtivemos que a viabilidade de células nutridas infectadas ainda é diminuída significativamente quando comparadas às nutridas não infectadas e que as células desnutridas infectadas continuam com sua viabilidade reduzida significativamente quando comparadas com esses dois grupos. Esses resultados também são semelhantes àqueles encontrados em estudo realizado por Carvalho (2011), onde a cepa EAEC 042 na mesma concentração bacteriana e no tempo de 24 horas foi capaz de reduzir em até 50% a viabilidade celular quando comparada com células não infectadas.

Em uma investigação utilizando biópsias da mucosa intestinal, colonizadas por cepas de EAEC, revelaram efeitos citotóxicos distintos nas regiões do íleo e do cólon. Foi observado alterações marcantes na mucosa ileal, incluindo a destruição parcial ou total das vilosidades, vacuolização do citoplasma basal dos enterócitos e desorganização epitelial com extrusão de células epiteliais, fornecendo uma possível explicação para os casos infecciosos que há a persistência do processo diarreico no indivíduo (Andrade; Freymüller; Fagundes-Neto, 2010). Em contrapartida, os resultados que obtivemos com a análise de células coletadas 24 horas após a infecção, demonstraram que o grupo nutrido infectado e desnutrido infectado possuíam expressão de caspase 8 aumentada, porém as caspases 9 e 3 estavam diminuídas, sugerindo que nesse tempo pós infecção ainda há a ativação de apoptose, porém essa ação

não é efetiva. Pois a apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos (via extrínseca ou citoplasmáticas) relacionados aos receptores de morte que conduzem a sinalização de caspase 8 ou por fatores internos (via intrínseca ou mitocondrial), relacionados a caspase 9 que podem ser ativados por agentes citotóxicos como também espécies reativas de oxigênio (Grivicich; Regner; Rocha, 2007). Além disso, também se estabeleceu a necroptose que é considerada uma “necrose programada”, a qual envolve no seu processo caspase 8 (Vandenabeele *et al.*, 2010).

A migração de células da mucosa demanda uma extensa reorganização da actina do citoesqueleto, processo controlado pela família de pequenas GTPases que inclui Rho, Rac e Cdc42. (Iizuka; Konno, 2011; Ray *et al.*, 2003). Uma etapa fundamental do processo é a formação dos filamentos através da polimerização de actina (Moyer *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2003). RhoA está relacionada com controle dos pontos de adesão (O'Connor; Nguyen; Mercurio, 2000; Ray *et al.*, 2003). Rho e Rac regulam a polimerização da actina para produzir fibras de estresse e a formação da lamellipodia (Ray *et al.*, 2003). Rac1 induz a montagem de uma malha de filamentos de actina na periferia celular necessários a formação das protrusões da membrana celular. Cdc42 desencadeia o direcionamento da extensão do filopodia para a periferia onde localiza-se a área desnuda (Iizuka; Konno, 2011; Ray *et al.*, 2003). A reorganização do citoesqueleto e formação das estruturas necessárias à migração é um processo de sequências sincronizadas, onde os diferentes membros da família Rho agem em etapas. No presente estudo obtivemos pequena redução da expressão da proteína CDC 42 no grupo desnutrido infectado.

Freitas *et al.*, 2021 analisaram células IEC-6 com privação total de nutrientes e suplementadas com moléculas de vitamina A. Os resultados obtidos mostraram que as moléculas desencadeiam mecanismos de sobrevivência para a cripta epitelial intestinal sob privação de nutrientes. Baseado nisso, eles analisaram a expressão gênica de genes associados à diferenciação celular e aos mecanismos reguladores do ciclo. No nosso estudo testamos alguns desses genes com a finalidade de verificar se haveria impacto na expressão perante a condição de desnutrição juntamente com a infecção nas células. Obtivemos que apenas o gene FABP demonstrou ter sua expressão alterada, com redução

significativa de expressão apenas nas células nutridas e desnutridas que foram infectadas, sugerindo que o fator infecção é de fato capaz de reduzir a diferenciação celular. Além disso, estudos trazem a importância da proteína de ligação a ácidos graxos da membrana plasmática (FABP do inglês, *fatty acid-binding protein*) na absorção de ácidos graxos de cadeia longa no intestino delgado (Broudy *et al.*, 2010). Sendo assim, sugerimos também que o fator infecção atua impactando o fluxo absorptivo de lipídeo.

9. CONCLUSÃO

A reduzida existência de modelos de infecção por EAEC tem sido um grande obstáculo na elucidação da sua patogênese e essa problemática é potencializada pela ausência de modelos que englobam a desnutrição juntamente com a infecção. Embora os modelos *in vitro* não reproduzam completamente a complexidade do organismo vivo, eles representam uma ferramenta valiosa para elucidar os mecanismos subjacentes à desnutrição e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas a condições nutricionais desfavoráveis que podem facilitar o processo infeccioso.

Sendo assim, no modelo *in vitro* de desnutrição desenvolvido em células epiteliais intestinais com redução parcial de nutrientes em um período experimental de 7 dias que foi capaz de afetar significativamente as taxas de proliferação e de viabilidade das células.

Essa redução de nutrientes do modelo experimental, tanto na ausência quanto na presença de infecção, evidenciou alterações, embora não significativas, na expressão proteica de CFTR, SGLT-1 e CDC2 P34 nas análises realizadas 24 horas após a infecção. Esses resultados indicam que, apesar da ausência de significância estatística, as variações observadas podem sugerir uma resposta adaptativa das células à privação de nutrientes e ao estresse associado à infecção. Essa resposta pode refletir mecanismos compensatórios que, embora não suficientemente robustos para se traduzirem em alterações mensuráveis, ainda assim indicam uma potencial vulnerabilidade do sistema, ressaltam a importância de considerar a interação entre nutrição e infecção, especialmente no que diz respeito ao impacto nas vias de sinalização celular e na expressão de proteínas-chave envolvidas na resposta imunológica e na homeostase celular.

O não impacto na transcrição gênica de ATF2, CREB1, ELK1 e FOXO3a, sugere que os mecanismos moleculares envolvidos na resposta a essas condições podem não ter sido ativados de forma suficiente para provocar alterações detectáveis nesse período. Esses achados indicam a complexidade da interação entre desnutrição e infecção, e levantam questões sobre a temporalidade e os níveis de exposição que poderiam afetar esses marcadores.

Diante desses resultados, faz-se necessários outros estudos que investiguem o efeito de concentrações bacterianas mais elevadas, assim como a diminuição do tempo de análise.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. M. *et al.* **Relação entre crescimento e doença, enteropatógenos e ingestão alimentar nos primeiros 2 anos de vida:** resultados do estudo de coorte de nascimentos MAL-ED. *BMJ saúde global*, v. 4, pág. e000370, 2017.
- AGARWAL, M. K. *et al.* Macrophage inhibitory cytokine 1 mediates a p53- dependent protective arrest in S phase in response to starvation for DNA precursors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 44, p. 16278–83, 31 out. 2006.
- ALLOCATI, N. *et al.* Escherichia coli in Europe: an overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 12, p. 6235-6254, 2013.
- AMOUR, C. *et al.* **Epidemiologia e impacto da infecção por Campylobacter em crianças em 8 ambientes com poucos recursos:** resultados do estudo MAL-ED. *Doenças infecciosas clínicas*, v. 63, n. 9, pág. 1171-1179, 2016.
- ANDRADE, J. A. B.; FREYMÜLLER, E.; FAGUNDES-NETO, U. Pathophysiology of enteroaggregative Escherichia coli infection: an experimental model utilizing transmission electron microscopy. **Arq. Gastroenterol**, v. 4, n.3, p.306-312, 2010.
- ANGELANTONIO, E. *et al.* Índice de massa corporal e mortalidade por todas as causas: meta-análise de dados individuais dos participantes de 239 estudos prospectivos em quatro continentes. **The Lancet**, v. 10046, pág. 776-786, 2016.
- ANSTEAD, G. M. *et al.* A desnutrição altera a resposta imune inata e aumenta a visceralização precoce após a infecção por Leishmania donovani. **Infeção e Imunidade**, v. 69, n. 8, pág. 4709-4718, 2001.
- ARIGONY, A. L. V. *et al.* The influence of micronutrients in cell culture: a reflection on viability and genomic stability. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE. **Imagem do Mês:** bactéria e. coli crescendo em mini-intestinos. Bactéria E. coli crescendo em mini-intestinos. 2020. Disponível em: <https://blogs.bcm.edu/2020/09/01/from-the-labs-image-of-the-month-e-coli-bacteria-growing-on-mini-guts/>. Acesso em: 19 jan. 2024.
- BHATTACHARYA, S.; RAY, R. M.; JOHNSON, L. R. Decreased apoptosis in polyamine depleted IEC-6 cells depends on Akt-mediated NF-κB activation but not GSK3β activity. **Apoptosis**, v. 10, p. 759-776, 2005.
- BLACK, R. E. *et al.* Maternal and child undernutrition and overweight in low- income and middle-income countries. **Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 427–51, 3 ago. 2013.
- BOLICK, D. T. *et al.* Intestinal cell kinase is a novel participant in intestinal cell signaling responses to protein malnutrition. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e106902, 2014.
- BORELLI, P. *et al.* Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Sociedade Brasileira de Biofísica, v. 42, n. 6, p. 523–30, jun. 2009.

BOUDRY, G. *et al.* Role of Intestinal Transporters in Neonatal Nutrition: Carbohydrates, Proteins, Lipids, Minerals, and Vitamins. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 380–401, 2010.

BROWN, K.; DEWEY, K.; ALLEN, L.. Complementary feeding of young children in developing countries: a review of current scientific knowledge. **Complementary feeding of young children in developing countries: a review of current scientific knowledge**, p. 228-228, 2012.

CAMPBELL, R. K. *et al.* Infant and young child feeding practices and nutritional status in Bhutan. **Matern Child Nutr**, v. 14, n. 4, p. e12762, 2018.

CARVALHO, E. B. 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. 2011. 165 f. **Tese** (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CAULFIELD, L. E. *et al.* Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria, and measles. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 1, p. 193–198, 2004.

CEDERHOLM, T. *et al.* ESPEN guidelines on definitions and terminology of clinical nutrition. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 49-64, 2017.

CHAUDHARY, R. *et al.* Physiological slowing and upregulation of inhibition in cortex are correlated with behavioral deficits in protein malnourished rats. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76556, jan. 2013.

CHECKLEY, W. *et al.* Multi-country analysis of the effects of diarrhoea on childhood stunting. **International journal of epidemiology**, v. 37, n. 4, p. 816–30, ago. 2008.

COSTA, L. B. *et al.* Novel in vitro and in vivo models and potential new therapeutics to break the vicious cycle of *Cryptosporidium* infection and malnutrition. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 9, p. 1464-1471, 2012.

CRANE, R. J.; JONES, K. D. J; BERKLEY, J. A. Environmental enteric dysfunction: an overview. **Food and nutrition bulletin**, v. 36, n. 1_suppl1, p. S76-S87, 2015.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MCNEELEY, D. F.; LUA, A. Mecanismos de modulação nutricional da resposta imune. **Revista de Alergia e Imunologia Clínica**, v. 115, n. 6, pág. 1119-1128, 2005.

DDA (Data and Analytics) - BRASIL. (2022). Visualização de Dados: Monitoramento de Doenças Diarreicas Agudas. **Tableau Public**. Disponível em: [https://public.tableau.com/app/profile/dda.brasil/vizzesDC]. Acesso em: 26 de janeiro de 2023.

ERSINO, G. HENRY, C.J.; ZELLO, G. A. Suboptimal feeding practices and high levels of undernutrition among infants and young children in the rural communities of Halaba and Zeway, Ethiopia. **Food Nutr Bull**, v. 37, p. 409–24, 2016.

FAGUNDES-NETO, U. Persistent diarrhea: still a serious public health problem in developing countries. **Current gastroenterology reports**, v. 15, n. 9, p. 345, set. 2013.

FARFÁN-GARCÍA, A. E. *et al.* Mecanismos de virulência de *Escherichia coli* enteropatógena. **Revista Chilena de Infectología**, v. 33, n. 4, p. 438-450, 2016.

FILTEAU, SM; WOODWARD, B. O efeito da deficiência protéica grave na concentração sérica de zinco em camundongos alimentados com um nível de exigência ou com um nível muito alto de zinco na dieta. **A Revista de Nutrição**, v. 112, n. 10, pág. 1974-1977, 1982.

FREITAS, R. E. M. de. Avaliação biológica e de fatores gênicos modulados pelos retinóides no ciclo celular, proliferação, diferenciação, apoptose e necrose em células de cripta intestinal de rato. 2014. 91 f. **Dissertação** (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2014.

FREITAS, R. E. M. de. *et al.* Retinoids delay cell cycle progression and promote differentiation of intestinal epithelial cells exposed to nutrient deprivation. **Nutrition**, v. 85, p. 111087, 2021.

GÓMEZ, J. L. *et al.* Cell cycle phase duration in bone marrow cells from malnourished rats during suckling. **Mutation research**, v. 352, n. 1-2, p. 57– 60, 10 jun. 1996.

GOODLAD, R. A.; WRIGHT, N. A. The effects of starvation and refeeding on intestinal cell proliferation in the mouse. **Virchows Archiv B**, v. 45, p. 63-73, 1984..

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

GUERRANT, R. L. *et al.* Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 9, p. 487–505, set. 2008.

GUTIÉRREZ, E. J. *et al.* Enteric parasites and enteroaggregative *Escherichia coli* in children from Cañazas County, Veraguas Province, Panama. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 2, p. 267, 2014.

HAVT, A. *et al.* Prevalence and virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* in malnourished and nourished Brazilian children. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 89, n. 2, p. 98-105, 2017.

HOLT, P. R.; YEH, K. Y.; KOTLER, D. P. Altered controls of proliferation in proximal small intestine of the senescent rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 8, p. 2771-2775, 1988.

HUANG, D. B. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 5, p. 556-563, 2006.

IBGE. **PESQUISA DE ORÇAMENTOS FAMILIARES (POF) 2017-2018**: primeiros resultados. Rio de Janeiro, 2019.

JENSEN, B. H. *et al.* Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative

Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 614-630, 2014.

JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 4, p. 750-774, 2009.

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

KOTLOFF, K. L. *et al.* Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209-222, 2013.

LEIMBACH, A.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. E. coli as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. **Between Pathogenicity and Commensalism**, p. 3-32, 2013.

LIMA, A. A. M *et al.* Etiology and severity of diarrheal diseases in infants at the semiarid region of Brazil: a case-control study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007154, 2019.

LIU, L. *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The Lancet**, v. 379, n. 9832.

LÖSCH, L. S. *et al.* Detección de genes de virulencia del patotipo enteroagregativo en cepas de *Escherichia coli* aisladas de fuentes de agua subterránea de la provincia del Chaco, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 2, p. 88-94, 2015.

LUNN, P. G. The impact of infection and nutrition on gut function and growth in childhood. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, n. 1, p. 147– 54, fev. 2000.

MACIEL, B. LL *et al.* Higher Energy and Zinc Intakes from Complementary Feeding Are Associated with Decreased Risk of Undernutrition in Children from South America, Africa, and Asia. **The Journal of Nutrition**, v. 151, n. 1, p. 170-178, 2021.

MCCAY, C. M. *et al.* Crescimento, envelhecimento, doenças crônicas e expectativa de vida em ratos. **Arco Bioquímica**, v. 2, pág. 469-479, 1943.

MCCORMACK, J. P.; JEWESSON, P. J. Uma reavaliação crítica da “gama terapêutica” dos aminoglicosídeos. **Doenças Infecciosas Clínicas**, v. 14, n. 1, pág. 320-339, 1992.

MICHAELSEN, K. F.. Complementary Feeding of Young Children in Developing Countries: a Review of Current Scientific Knowledge: edited by Kenneth Brown, Kathryn Dewey, and Lindsay Allen, 1998, 178 pages, softcover. **World Health Organization**, Geneva. 2000.

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Doenças Diarreicas Agudas e Desnutrição em Menores de 5 anos no Ceará. **Secretaria de Saúde do Ceará**. 2022. Disponível em: https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/BE_dda_dtha_26122022.pdf. Acesso em: 26 de

dezembro de 2022.

MITTAL, A.; WOODWARD, B. Células epiteliais tímicas de camundongos gravemente desnutridos: acúmulo de ésteres de colesterol e ausência de vacúolos citoplasmáticos. **Anais da Sociedade de Biologia Experimental e Medicina**, v. 3, pág. 385-391, 1985.

MOLINA, G.; PELISSARI, F. M.; FEIRHMANN, Andresa C. Consequências da desnutrição proteica para o trato gastrointestinal. **Arquivos do MUDI**, v. 13, n. 1/2/3, p. 12-24, 2009.

NATARO, J. P. *et al.* Diarrheagenic escherichia coli infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 4, p. 402-407, 2006.

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

ORTIZ, R.; BETANCOURT, M. Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. **The Journal of Nutrition**, v. 114, n. 3, p. 472–6, mar. 1984.

OSBORNE, T. B.; MENDEL, L. B. Incidência de cálculos urinários fosfáticos em ratos alimentados com rações experimentais. **Jornal da Associação Médica Americana**, v. 1, pág. 32-33, 1917.

OWAIS, A. *et al.* Minimum acceptable diet at 9 months but not exclusive breastfeeding at 3 months or timely complementary feeding initiation is predictive of infant growth in rural Bangladesh. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0165128, 2016 p. 2151-2161, 2012.

PAZ, M. G. A. da; ALMEIDA, M. F. de; GÜNTHER, W. M. R. Prevalência de diarreia em crianças e condições de saneamento e moradia em áreas periurbanas de Guarulhos, SP. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, p. 188-197, 2012.

PETRI W. A. *et al.* Infecções entéricas, diarreia e seu impacto na função e no desenvolvimento. **A Revista de Investigação Clínica**, v. 118, n. 4, pág. 1277-1290, 2008.

PINHEIRO, D. F. *et al.* Maternal protein restriction during pregnancy affects gene expression and immunolocalization of intestinal nutrient transporters in rats. **Clinical Science**, v. 125, n. 6, p. 281-289, 2013.

PRATA, M. M. G. *et al.* Alanyl-Glutamine protects against damage induced by enteroaggregative Escherichia coli strains in intestinal cells. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 68, n. 2, p. 190-198, 2019.

RAYMOND, J. *et al.* Analysis of nutritional adequacy of local foods for meeting dietary requirements of children aged 6–23 months in rural central Tanzania. **Arch Public Health**, v. 75, p. 60, 2017

RIBEIRO, A. B.; VILAR, M. C. H.; CARMO, S. V. T. de S. Morbimortalidade por desnutrição e deficiências nutricionais em crianças menores de 1 ano no estado de São Paulo: análise de tendências temporais entre 1980 e 2018. **BEPA. Boletim**

Epidemiológico Paulista, v. 17, n. 194, p. 15-20, 2020.

ROMA, J. C. Os objetivos de desenvolvimento do milênio e sua transição para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. **Ciência e Cultura**, v. 71, n. 1, p. 33-39, 2019.

SAMPAIO, I. C. *et al.* Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, 2016.

SAWAYA, A. L. Desnutrição: consequências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. **Estudos Avançados**, v. 20, n. 58, p. 147–158, dez. 2006.

SCHAFER, K. A. The Cell Cycle: A Review. **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 6, p. 461–478, 1 nov. 1998.

SERÓN-ARBELLOA, C. *et al.* Malnutrition screening and assessment. **Nutrients**, v. 14, n. 12, p. 2392, 2022.

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

SOETERS, P. *et al.* Defining malnutrition: a plea to rethink. **Clinical Nutrition**, v. 36,

STEINER, T. S. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 1, p. 88-96, 1998.

SYED, S.; ALI, A.; DUGGAN, C. Environmental Enteric Dysfunction in Children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 63, n. 1, p. 6-14, 2016

TAKELE, K.; ZEWOTIR, T.; NDANGUZA, D. A combined model of child malnutrition and morbidity in Ethiopia using structural equation models. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 471, 2023.

TEODÓSIO, N. R. *et al.* A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 40, n. 4, p. 533-547, 1990.

UENO, P. M. *et al.* Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 301, n. 4, p. G612–22, out. 2011.

UNICEF. **Desnutrição**. Disponível em: <https://www.unicef.org/brazil/desnutricao>. Acesso em: 10 abr. 2021.

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

WAZNY, Kerri *et al.* Setting research priorities to reduce mortality and morbidity of childhood diarrhoeal disease in the next 15 years. **PLoS medicine**, v. 10, n. 5, p. e1001446, 2013.

WHO. **Facts for Life**. [s.l: s.n.]. Disponível em: www.factsforlifeglobal.org. Acesso em: 10 abr. 2021.

WHO. Guideline: Updates on the management of severe acute malnutrition in infants and children. **Geneva: World Health Organization**, 2013a.

WHO. One health. **World Health Organization**, v. 736, 2017.

WHO. World Health Statistics 2013 - Indicator compendium. **World Health Organization**, 2013b.