



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

ANTONIO VINICIOS ALVES DA SILVA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CAUSADOS PELA *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA (CEPA 239-1) NA EVOLUÇÃO CLONAL E RESPOSTA PRÓ-
INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS INTESTINAIS *in vitro* E SUA MODULAÇÃO COM
ALANIL-GLUTAMINA

FORTALEZA

2012

ANTONIO VINICIOS ALVES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CAUSADOS PELA *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA NA EVOLUÇÃO CLONAL E RESPOSTA PRÓ-INFLAMATÓRIA
DE CÉLULAS INTESTINAIS *in vitro* E SUA MODULAÇÃO COM ALANIL-GLUTAMINA**

Dissertação apresentada à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Coorientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

FORTALEZA

2012

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

S578a

Silva, Antônio Vinícius Alves da.

Avaliação dos efeitos causados pela *escherichia coli* enteroagregativa (cepa 239-1) na evolução clonal e resposta pró-inflamatória de células intestinais in vitro e sua modulação com Alanil-Glutamina / Antônio Vinícius Alves da Silva. – 2012.

113f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havat Bindá.

Coorientação: Prof. Dr. Aldo Angelo Moreira Lima.

1. Escherichia Coli . 2. Glutamina. 3. Diarreia. I. Título.

CDD: 616.3427

ANTONIO VINICIOS ALVES DA SILVA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CAUSADOS PELA *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA
NA EVOLUÇÃO CLONAL E RESPOSTA PRÓ-INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS
INTESTINAIS *in vitro* E SUA MODULAÇÃO COM ALANIL-GLUTAMINA

Dissertação submetida à coordenação do
Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade Federal do
Ceará como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em
Farmacologia.

Aprovado em 19/10/2012.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
Universidade do Estado da Bahia

Dra. Ila Fernanda Nunes Lima
Universidade Federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, meu agradecimento ao Supremo Criador da Ciência Universal, pelo discernimento que nos permite compreender nuances da Magna Ciência de Sua Criação, fonte perene de todas as inspirações e conhecimento.

AGRADECIMENTO

Acho que foi o mestre Machado de Assis que se adiantou ao afirmar de que em matéria de culpa, as graduações são infinitas. A isto devo acrescentar que não é diferente quando se trata de mérito. Minha parcela na construção do trabalho aqui materializado é apenas aquele pedaço que se enxerga mais facilmente, mas nem por isso mais importante que qualquer parcela de contribuição de tantas outras pessoas que estiveram comigo. Contribuições ímpares das quais eu jamais poderia prescindir e sem as quais este trabalho não seria possível. Registro minha terna e profunda gratidão a todas estas pessoas.

Ao Prof. Dr. Alexandre Havt, cujo exemplo sobressaem às palavras para ensinar que todo dia é um ótimo dia para aprender e buscar conhecimento, a quem sou grato por toda paciência, empenho e disponibilidade fundamentais à minha orientação durante todas as etapas do mestrado.

Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo, por todo conhecimento e pelo exemplo de dedicação que devota ao ensino e a pesquisa científica.

À mestranda Paloma Cavalcante, companheira de bancada, pela partilha das frustrações, lutos celulares e empolgações experimentais. Minha gratidão por todo apoio e ajuda com experimentos e, principalmente, pelas suas espontâneas sacadas vocabulares fora do comum que sempre alegrou à todos.

À mestranda Mara Prata, que mesmo com toda a tenacidade metálica que seu nome encerra, tem o coração mais nobre que prata ou ouro e de quem recebi suporte experimental incomensurável. Meu terno agradecimento pela ajuda, discussões científicas e também pelas não científicas.

À doutoranda Josi Quetz, outro exemplo de altruísmo que mesmo ante a uma rotina atribulada sempre respondeu às nossas interpelações por ajuda com um grande e sonoro SIM iluminado por seu largo e belo sorriso.

À Dra. Ila Fernanda, cujas explicações somaram compreensão ao meu entendimento e as sugestões colaboraram ao enriquecimento de meu trabalho.

Ao José Amadeus, o 'mozart' da funcionalidade do nosso instituto que, ao reger com maestria equipamentos, máquinas e demais processos burocráticos, cria a sinfônica harmonia necessária ao bom andamento dos trabalhos.

À Charliene Melo, Luciana França e Teresinha de Jesus, pelos cuidados na organização do laboratório.

À Dra. Eunice Bobô e Marcos Martins, amigos a quem agradeço por todas as dicas, maquetes e conselhos.

À Rejane Maciel, Joelma Irineu e Francisca Alves, companheiras de bancada que sempre me acompanharam ao longo dessa formação prestando todo apoio e incentivo que eu sempre precisei.

À Dra. Luciana Carlos e Ana Paula Lopes, pela compreensão das minhas necessidades e pelas diversas modalidades de apoio que recebi durante todo esse tempo.

À minha mãe, Marta, e minha família, pela estrutura, carinho e apoio.

Aos meus sobrinhos queridos Wesley e Annelise, pela importante lição de que em tudo há lição e de que a descoberta da estrutura de que um cabelo observado ao microscópio pode ser tao fascinante e surpreendente quanto a descoberta de um exoplaneta ou de um bóson fundamental.

“...Que me permita ensinar o pouco que sei e aprender o muito que não sei, traduzir o que os mestres ensinaram, e compreender a alegria com que os simples traduzem suas experiências...”

Oswaldo Antonio Begiato

RESUMO

A morte por diarreia aguda tem apresentado grande declínio desde a década de 80 em todas as regiões do mundo. Entretanto as doenças diarreicas ainda são responsáveis por 1,34 milhões de mortes infantis a cada ano e representam a segunda maior causa de mortalidade no grupo etário com idade inferior a 5 anos. Com o declínio de mortalidade por casos de diarreia aguda a diarreia persistente (DP) se tornou uma das principais doenças entéricas infantis contribuindo para morbidade das populações afetadas. Uma lesão no intestino delgado que se torna prolongada tem sido colocada como elemento central da patofisiologia da DP. A desnutrição proteica e a infecção por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) estão fortemente associados ao desenvolvimento da DP. O presente estudo investigou o efeito da suplementação de Alanil-Glutamina sobre monocamada de células da mucosa intestinal na ausência de infecções. Avaliou alguns parâmetros da lesão promovida por EAEC (cepa 239-1) sobre a mucosa intestinal *in vitro* e a modulação de tal dano pela Alanil-Glutamina 10mM. Os resultados obtidos mostram que os efeitos da suplementação de Ala-Gln 10mM não diferem dos efeitos exibidos pela glutamina livre 4mM. Em relação a cepa comensal *E. coli* HS, a infecção com EAEC reduziu de forma significativa a quantidade de células em migração, aumentou o percentil de necrose, diminuiu a proliferação celular e reduziu significativamente a transcrição dos genes das pequenas GTPases (RhoA, Cdc42 e Rac1) após 6h de contato com enterócitos. O contato com EAEC reduziu a transcrição de IL-8 (0h e 6h), NF-κB (6h) e TLR5 (6h e 12h) e aumentou a expressão proteica de TNF-α (12h). O tratamento da infecção com Ala-Gln 10mM alterou significativamente os seguintes parâmetros: aumento da quantidade de células em migração embora não tenha causado alteração na transcrição dos genes das pequenas GTPases, redução do percentual de necrose, aumento da proliferação celular, aumento da transcrição IL-8, NF-κB (6h) e TLR5 (6h e 12h). O tratamento com o dipeptídeo reduziu significativamente a secreção de TNF-α (12h) enquanto aumentou a expressão proteica de IL-6 (6 e 12h). Em conclusão, verificamos que a privação de glutamina diminui a resposta celular frente ao estímulo infeccioso. A EAEC, por sua vez, parece minimizar as defesas imunes inatas hospedeiro ao reduzir a transcrição de NF-κB e TLR5 e limitar o aumento da transcrição de IL-8. A Ala-Gln parece tornar a célula mais reativa frente aos estímulos lesivos, aumentando sua capacidade de resposta através do aumento transcricional de IL-8, NF-κB e TLR5. Por outro lado o aumento da expressão proteica de IL-6 parece ser um dos mecanismos pelas quais Ala-Gln promove efeito protetor sobre a barreira epitelial intestinal.

Palavras-chave: *Escherichia coli* enteroagregativa. Glutamina. Diarreia.

ABSTRACT

Death from acute diarrhea has been reduced since 80's. However diarrhoeal diseases account for nearly 1.34 million deaths a year among children under-five years of age, making them the second most common cause of child deaths worldwide. As mortality acute diarrhea was reduced, persistent diarrhea (PD) has become a major enteric diseases infant collaborating to morbidity of affected populations. Small intestinal mucosa injury that becomes prolonged has been named as a central mechanism in the pathophysiology of PD. The protein malnutrition and infection by *Escherichia coli* enteroaggregative (EAEC) are strongly associated with development PD. The present study investigated the effect of supplementation of Alanyl-Glutamine on monolayer of intestinal cells in the absence of infection, evaluated some parameters of the injury caused by EAEC (strain 239-1) on the intestinal mucosa in vitro and modulation of such injury by Alanyl-Glutamine 10mM. The result show that effects of supplementation of Alanyl-Glutamine 10mM is no different from effects free glutamine 4mM. Compared to *E. coli* HS, EAEC infection reduced the number of migrating cells, increased the percentage of necrosis, decreased the proliferation and transcription-reverse from small GTPases (RhoA, Rac1 and Cdc42), within 6 hours of contact. The contact EAEC reduced transcription of IL-8 (6h and 0h), NF-κB (6h) and TLR5 (6h and 12h) and increased TNF-α expression. The treatment of infection with Ala-Gln 10mM altered the following parameters: reduced the percentage of necrosis, increase of cell migration, although it has not caused changes in the transcription of Rho GTPases genes, increased transcription IL-8, NF-κB (6h) e TLR5 (6h and 12h). Treatment with dipeptido significantly reduced the secretion of TNF-α (12h) while increased protein expression of IL-6 (6 e 12h). In conclusion, found that glutamine deprivation decreases cellular response against the infectious stimulus. The EAEC appears to minimize the innate host immune defenses by reducing the transcription of NF-κB and TLR5 and limit the increased transcription of IL-8. The Ala-Gln seems to make the cell more reactive against injurious stimuli, increasing their responsiveness through increased transcriptional IL-8, NF-κB and TLR5. Moreover increased protein expression of IL-6 appears to be one of the mechanisms by which promotes Ala-Gln protective effect on the intestinal epithelial barrier.

Palavras-chave: *Escherichia coli* enteroagregativa. Glutamine. Diarrhea.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Representação esquemática da cronologia (linha do tempo) dos procedimentos experimentais utilizadas no presente estudo. 50
- Figura 2-** Resultado do ensaio de Padrão de aderência com EAEC 239-1 realizado em células HEp-2 e coradas com May-Grunwald-Giemsa. As setas verdes apontam para agregados bacterianos aderidos a superfície. Aumento 1000x 53
- Figura 3-** Resultado do ensaio do padrão de aderência com Escherichia coli HS em células HEp-2 e coradas com May-Grunwald-Giemsa. As setas apontam para bactérias aderidas a superfície. Aumento 1000x. 54
- Gráfico 1-** Custo total (em milhões; %) das internações por doença diarreica aguda em menores de 5 anos – Brasil, 1995-2004 19
- Gráfico 2-** Número de internações por doença diarreica aguda em crianças menores de cinco anos - Brasil, 1995-2004. 19
- Gráfico 3-** Migração de IEC-6 não-infectadas avaliadas em 12 (A) e 24h (B) após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM 55
- Gráfico 4-** Transcrição relativa do gene Rac1 em relação ao controle glutamina negativa realizado em células IEC-6 em 6h (A) e 12h (B) após adição de Alanil-Glutamina 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM. 56
- Gráfico 5-** Transcrição relativa do gene RhoA em relação ao controle glutamina negativa realizado em células IEC-6 não-infectadas 6h (A) e 12h (B) após adição de Alanil-Glutamina 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM. 57
- Gráfico 6-** Transcrição relativa de Cdc42 em relação ao controle glutamina negativa realizado em células IEC-6 não-infectadas 6h (A) e 12h (B) após adição de Alanil-Glutamina 10Mm ou meio padrão com glutamina 4mM 57
- Gráfico 7-** Percentual de apoptose medida em células IEC-6 não-infectadas 24h após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM 58
- Gráfico 8-** Percentual de necrose medida em células IEC-6 não-infectadas 24h após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM. 59
- Gráfico 9-** Proliferação celular realizada 24h após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina em células IEC-6 não-infectadas. 60
- Gráfico 10-** Transcrição relativa de NF-κB em relação ao controle glutamina negativa realizado em células IEC-6 não-infectadas 6h (A) e 12h (B) após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM. 61
- Gráfico 11-** Transcrição relativa de IL-8 em relação ao controle glutamina negativa realizado em células IEC-6 não-infectadas 6h (A) e 12h (B) após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM. 61

- Gráfico 12-** Transcrição relativa de TLR5 em relação ao controle glutamina negativa realizado em células IEC-6 não-infectadas 6h (A) e 12h (B) após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM. 62
- Gráfico 13-** Migração de células IEC-6 em 12h (A) e 24h (B) após infecção com EAEC ou *E. coli* HS. 63
- Gráfico 14-** Transcrição gênica relativa de Rac1 em células IEC-6 após três horas de infecção com *E. coli* HS ou EAEC(A) e após 6h (B) ou 12h (C). 64
- Gráfico 15-** Transcrição relativa de RhoA em células IEC-6 (A) após três horas de infecção com *E. coli* HS ou EAEC e após 6h (B) ou 12h (C). 65
- Gráfico 16-** Transcrição relativa de Cdc42 em células IEC-6 (A) após três horas de infecção com *E. coli* HS ou EAEC e após 6h (B) ou 12h (C). 65
- Gráfico 17-** Percentual de apoptose em células IEC-6 medida 24h após infecção com EAEC ou *E. coli* HS. 66
- Gráfico 18-** Percentual de necrose em células IEC-6 medida 24h após infecção com EAEC ou *E. coli* HS. 67
- Gráfico 19-** Proliferação celular medida 24h após infecção de células IEC-6 com EAEC ou *E. coli* HS. 68
- Gráfico 20-** Transcrição relativa de IL-8 em células IEC-6 após infecção (A) com *E. coli* HS ou EAEC, 6h (B) ou 12h (C). 69
- Gráfico 21-** Transcrição relativa de NF- κ B em células IEC-6 após infecção (A) com *E. coli* HS ou EAEC, 6h (B) ou 12h (C). 70
- Gráfico 22-** Transcrição relativa de TLR5 em células IEC-6 após (A) infecção com *E. coli* HS ou EAEC, 6h (B) ou 12h (C) 70
- Gráfico 23-** Valores da concentração de IL-6 em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC ou *E. coli* HS: (A) ao término da infecção e após 6h (A) e 12h (B). 75
- Gráfico 24-** Valores da concentração de TNF- α em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC ou *E. coli* HS: (A) ao término da infecção e após 6h (A) e 12h (B). 75
- Gráfico 25-** Migração de células IEC-6 após 12h (A) e 24h (B) de tratamento com Ala-Gln 10mM em células previamente infectadas com EAEC. 77
- Gráfico 26 -** Transcrição gênica relativa de Rac1 em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC após 6h (A) e 12h (B) de tratamento com Ala-Gln 10mM. 78
- Gráfico 27 -** Transcrição gênica relativa de RhoA em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC após 6h (A) e 12h (B) de tratamento com Ala-Gln 10Mm. 78
- Gráfico 28 -** Transcrição gênica relativa de Cdc42 em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC após 6h (A) e 12h (B) de tratamento com Ala-Gln 10Mm. 79

- Gráfico 29-** Percentual de apoptose em células IEC-6 medida após 24h de tratamento com 80 Ala-Gln 10mM em células previamente infectadas com EAEC.
- Gráfico 30-** Percentual de necrose em células IEC-6 medida após 24h de tratamento com Ala- 80 Gln 10mM em células previamente infectadas com EAEC.
- Gráfico 31-** Proliferação de células IEC-6 infectadas com EAEC e tratadas com Ala-Gln 10mM. 81
- Gráfico 32-** Transcrição gênica relativa de IL-8 em células IEC-6 previamente infectadas com 82 EAEC após 6h (A) e 12h (B) de tratamento com Ala-Gln 10Mm.
- Gráfico 33-** Transcrição gênica relativa de NF-kB em células IEC-6 previamente infectadas 83 com EAEC após 6h (A) e 12h (B) de tratamento com Ala-Gln 10Mm
- Gráfico 34-** Transcrição gênica relativa de TLR5 em células IEC-6 previamente infectadas com 84 EAEC após 6h (A) e 12h (B) de tratamento com Ala-Gln 10Mm.
- Gráfico 35-** Valores da concentração de IL-6 em células IEC-6 previamente infectadas com 85 EAEC 6h (A) e 12h (B) após adição de Ala-Gln 10mM.
- Gráfico 36-** Valores da concentração de TNF- α em células IEC-6 previamente infectadas 85 com EAEC 6h (A) e 12h (B) após adição de Ala-Gln 10mM.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Sequências de <i>primers</i> e condições de PCR para os genes avaliados	51
Tabela 2-	Transcrição relativa (r) dos genes avaliados em relação ao grupo controle sem glutamina imediatamente após 3h de infecção	71
Tabela 3-	Transcrição relativa (r) dos genes avaliados em relação ao grupo controle sem glutamina em 6h após adição de Ala-Gln 10mM em células previamente infectadas com HS ou EAEC.	72
Tabela 4-	Transcrição relativa (r) dos genes avaliados em relação ao grupo controle sem glutamina em 12h após adição de Ala-Gln 10mM em células previamente infectadas com HS ou EAEC.	73
Tabela 5-	Transcrição relativa (r) dos genes avaliados do grupo infectado com EAEC em relação ao grupo infectado com E. coli HS imediatamente após 3h de infecção (tempo 0h), 6h e 12h.	74
Tabela 6-	Transcrição relativa (r) dos genes avaliados no grupo infectado com EAEC e tratado com Alanil-Glutamina 10mM em relação ao grupo não tratado	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
AA	Aderência agregativa
Ala-Gln	L-Alanil-L-Glutamina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
cDNA	Ácido desoxirubonucléico complementar
DMEM	Meio de <i>Eagle</i> modificado por Dulbeco
DNA	Ácido desoxirubonucléico
dNTP	deoxinucleotídeo
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
Gln -	Glutamina negativa ou ausência de glutamina
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
h	hora
IFN-γ	Interferon gama
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolissacarídeo
MEM	Meio de <i>Eagle</i> modificado
min	minuto
mL	Mililitro
mM	milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF-κB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
PBS	Tampão fosfato salina (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
TLR5	Receptor toll like 5
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade formadora de colônia
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SUS	Sistema Único de Saúde
PSF	Programa de Saúde da Família
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	<i>As doenças diarreicas no contexto atual.....</i>	<i>17</i>
1.2	<i>A diarreia persistente</i>	<i>21</i>
1.3	<i>Escherichia coli enteroagregativa</i>	<i>23</i>
1.4	<i>O processo de reparo da barreira funcional intestinal.....</i>	<i>28</i>
1.5	<i>Alanil-glutamina.....</i>	<i>31</i>
2	JUSTIFICATIVA.....	37
3	OBJETIVOS	38
3.1	<i>Objetivo geral.....</i>	<i>38</i>
3.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>38</i>
4	METODOLOGIA.....	39
4.1	<i>Cultivo bacteriano</i>	<i>39</i>
4.2	<i>Preparo da suspensão bacteriana.....</i>	<i>40</i>
4.3	<i>Cultivo celular.....</i>	<i>40</i>
4.4	<i>Padrão de aderência bacteriano.....</i>	<i>41</i>
4.5	<i>Migração celular</i>	<i>42</i>
4.6	<i>Apoptose e necrose.....</i>	<i>43</i>
4.7	<i>Quantificação de citocinas.....</i>	<i>45</i>
4.7.1	<i>Obtenção e preparo das amostras</i>	<i>45</i>
4.9	<i>Análise da transcrição gênica</i>	<i>48</i>
4.9.2	<i>Transcrição reversa (RT)</i>	<i>48</i>
4.9.3	<i>PCR em tempo real (Real Time-PCR, RT-qPCR).....</i>	<i>49</i>
4.10	<i>Análise estatística</i>	<i>52</i>
5	RESULTADOS	53
5.1	<i>Caracterização funcional das cepas de E. coli utilizadas</i>	<i>53</i>
5.2	<i>Efeito da suplementação da Alanil-Glutamina sobre monocamada de células epiteliais intestinais</i>	<i>55</i>
5.2.1	<i>Migração celular.....</i>	<i>55</i>
5.2.3	<i>Morte celular</i>	<i>58</i>

5.2.4	<i>Proliferação celular</i>	59
5.2.5	<i>Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório</i>	60
5.2.6	<i>Quantificação de citocinas</i>	62
5.3	<i>Efeitos da infecção da EAEC e E. coli HS sobre monocamada de células epiteliais intestinais</i>	63
5.3.1	<i>Migração celular</i>	63
5.3.2	<i>Transcrição de genes relacionados com migração celular</i>	64
5.3.3	<i>Morte celular</i>	66
5.3.4	<i>Proliferação celular</i>	67
5.3.5	<i>Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório</i>	68
5.3.6	<i>Quantificação de citocinas</i>	74
5.4	<i>Efeitos da suplementação da Alanil-Glutamina sobre a lesão provocada pela EAEC em monocamada de células epiteliais intestinais</i>	75
5.4.1	<i>Migração celular</i>	76
5.4.2	<i>Transcrição de genes relacionados à migração celular</i>	77
5.4.3	<i>Morte celular</i>	79
5.4.4	<i>Proliferação celular</i>	80
5.4.5	<i>Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório</i>	81
5.4.6	<i>Quantificação de citocinas</i>	84
6	DISCUSSÃO	86
7	CONCLUSÃO	103
	REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 As doenças diarreicas no contexto atual

Estima-se que a cada ano as doenças diarreicas somem 2,4 milhões de mortes entre os todos os grupos etários nas diversas regiões do mundo (OMS, 2012). Tal fato coloca a diarreia como uma das principais causas de mortalidade e morbidade mundiais (LAMBERTI; FISCHER WALKER; BLACK *et al.*, 2012) e como uma importante preocupação de saúde pública. Nesse contexto as crianças figuram como as principais afetadas onde as diarreias respondem por 1,34 milhões de mortes anuais apenas no grupo etário com idade inferior a 5 anos. Uma cifra que responde por 15% dos óbitos nesse mesmo grupo etário e representa a segunda maior causa de mortalidade sendo ultrapassada apenas pela pneumonia (BLACK *et al.*, 2010).

Muito embora o número de mortes seja alarmante, a situação colocada é de uma melhoria só atingida recentemente que, por sua vez, é fruto de sucessivos avanços na compreensão e manejo do problema. Calcula-se que na década de 80 as doenças diarreicas tenham atingido a marca de 4,6 milhões de mortes apenas na população infantil (SNYDER; MERSON, 1982). Contribuíram para o declínio de óbitos observado desde a primeira metade da década de 80 a disponibilização e divulgação de tecnologias especificamente direcionadas ao manejo da diarreia, como a terapia com soro de reidratação oral que, segundo estima-se, tenha colaborado para salvar a vida de milhões de crianças (VISWANATHAN; HODGES; HECHT, 2009). Outras medidas implementadas e fundamentais ao declínio das mortes por diarreia foram melhorias gradativas nas condições de saneamento e no tratamento de água proporcionando ganhos em sua qualidade, campanhas para aumentar o tempo de amamentação total e exclusiva de lactentes (VICTORA, 2009), suplementação de alimentos básicos com vitamina A ou zinco, investimentos em atenção primária à saúde (FISCHER WALKER *et al.*, 2012; VICTORA, 2009) e, mais recentemente, a implementação de vacinas contra rotavírus (STRAND *et al.*, 2012).

É importante salientar que os avanços, sejam eles qualitativos ou quantitativos, não são distribuídos geograficamente de forma equitativa e apresentam grande heterogeneidade quando são consideradas as diversas partes do mundo ou

mesmo as diferentes regiões de um mesmo país. A maioria dos óbitos infantis por diarreia estão concentrados em países em desenvolvimento (BLACK *et al.*, 2010). Quando comparamos crianças que vivem em países ricos e industrializados e crianças que residem em países em desenvolvimento, encontramos as maiores incidências de casos fatais nestas últimas, provavelmente devido à falta de acesso à saúde de qualidade e tratamento oportuno e efetivo com a solução de reidratação oral (FISCHER WALKER *et al.*, 2012). É compreensível e em parte justificável porque os maiores índices de mortalidade por diarreia estão particularmente localizados na África subsaariana e no sudeste do continente asiático (BLACK *et al.*, 2010; BOSCHIPINTO; VELEBIT; SHIBUYA, 2008; VICTORA, 2009). De uma maneira geral as doenças diarreicas afetam de forma desproporcional crianças de países ricos e países pobres, sendo geralmente mais severa e apresentando também maior incidência nos países com baixo nível de renda (FISCHER WALKER *et al.*, 2012).

No Brasil os dados de mortalidade proporcional indicam um expressivo progresso no controle da doença. Durante o biênio de 1985-1987, a diarreia respondeu por 17,3% de todos os óbitos infantis, já no período de 2003-2005 foi responsável por apenas 4,3% de todos os óbitos na mesma população. Considerando as outras variações nas taxas de mortalidade, projeta-se que a redução nas taxas de mortalidade por diarreia por 1.000 nascidos vivos foi de aproximadamente 90% (VICTORA, 2009). A maior parte de tais progressos estão relacionados ao avanço nos programas sociais implementados nos últimos anos associados ao desenvolvimento econômico, que reduziu os níveis de pobreza absoluta no Brasil. Embora a concentração de renda seja ainda gritante tornando profundo o abismo entre ricos e pobres, as mudanças já surtiram grandes impactos no perfil de morbi-mortalidade de várias doenças, dentre elas as diarreias. Outra medida de grande impacto foi a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), há 20 anos, e em seu contexto a implementação do Programa de Saúde da Família (PSF). Com estas medidas o acesso à assistência primária à saúde foi fortemente ampliado. Por fim, é inegável que o sucesso na redução das mortes infantis por diarreia não teria tanto êxito sem a realização de intensas e bem sucedidas campanhas na promoção da terapia de reidratação oral (DE ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011; VICTORA, 2009). Tais campanhas, que contavam com a participação do Ministério da Saúde e setores não governamentais da sociedade (Pastoral da Criança e Sociedade Brasileira de

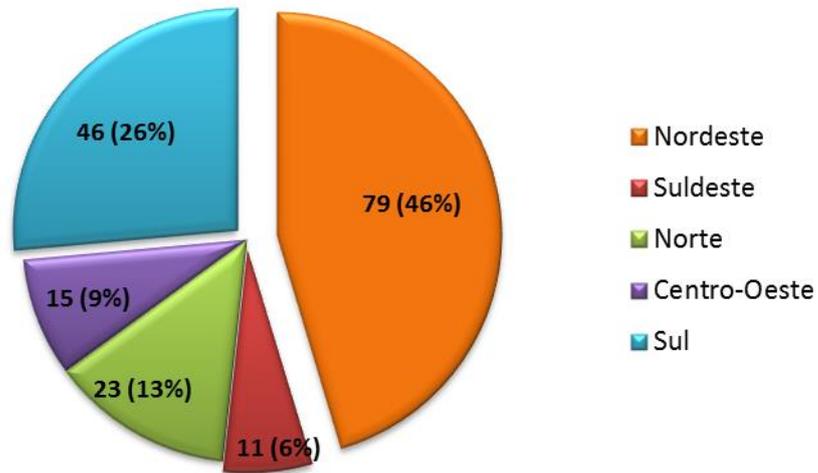
Pediatria), foram fundamentais à conscientização das comunidades da gravidade da diarreia e principalmente do controle desta através da terapia de reidratação oral.

Como já dito anteriormente, mesmo dentro de um país, as flutuações na taxa de incidência podem variar com grande amplitude e é o que de fato se observa no Brasil. A doença diarreica figura entre as principais causas de morbidade nos municípios da região Nordeste. No ano de 2004 o Ministério da Saúde registrou 2,4 milhões de casos de diarreia, dos quais 42% oriundos de municípios do Nordeste brasileiro (BRASIL, 2005).

A magnitude das doenças diarreicas pode ser mensurada pela vultosa quantidade de dinheiro destinada a tratá-las. A soma dos recursos brasileiros destinados ao pagamento de gastos nosocomiais por doença diarreica no período de 1995 a 2004 somaram a incrível cifra de R\$ 173.245.567,85 apenas para faixa etária de menores de 5 anos (BRASIL, 2005). O Nordeste foi responsável pelo consumo de 45% deste recurso ou R\$ 79 milhões conforme mostra o gráfico 1. Quantia necessária ao custeio da maioria de todas as internações (46%; 398.000) destinadas ao tratamento das diarreias apenas na faixa etária de crianças com idade inferior a 5 anos (Gráfico 2).

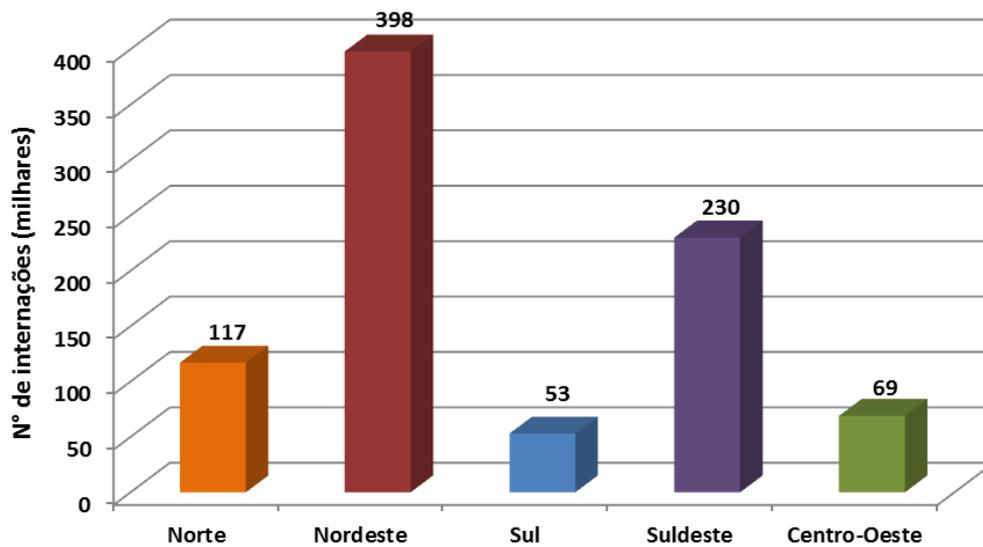
O Nordeste ainda concentra os maiores índices de óbitos infantis por diarreia. Tais disparidades geográficas são reflexos das grandes iniquidades socioeconômicas do país (DE ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011; VICTORA, 2009). O último censo realizado no Brasil em 2010 revelou que 59% das pessoas vivendo em condições de extrema pobreza estão concentradas em cidades nordestinas. Cerca de metade dos domicílios onde vivem tais pessoas não estão ligados à rede de esgoto pluvial ou fossa séptica nem ligados à rede geral de distribuição de água, sendo desprovidos de poço ou nascente na propriedade (IBGE, 2010).

Gráfico 1 - Custo total em milhões de reais (%) das internações por doença diarreica aguda em menores de 5 anos – Brasil, 1995-2004



Fonte: Ministério da Saúde (BRASIL, 2005)

Gráfico 2 - Número de internações por doença diarreica aguda em crianças menores de cinco anos.



Fonte: Ministério da Saúde (BRASIL, 2005)

A diarreia é uma síndrome na qual o aumento do número de evacuações de fezes de pouca consistência ou aquosa é geralmente acompanhada de febre, vômito e dor abdominal. Em geral, é uma síndrome autolimitada tendo duração de 2 a 14 dias (BRASIL, 2005). Entretanto, certa proporção de doenças diarreicas falha no processo de regressão espontânea e persiste por um período superior de tempo (BHUTTA *et al.*, 2004). Diarreia persistente (DP) é definida como a presença de 3 ou mais evacuações de fezes líquidas ou pastosas por um período superior a duas semanas em uma criança que perde ou permanece com peso constante (BHUTTA *et al.*, 2004; DE ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011; STRAND *et al.*, 2012). Presumivelmente de causa infecciosa, é frequentemente manifestada por uma enteropatia crônica onde há uma recuperação prejudicada do dano causado à mucosa intestinal associada a uma redução das capacidades digestivas e absorptivas do trato gastrointestinal (BHUTTA *et al.*, 2004). Convém salientar que o termo exclui as formas crônicas ou recorrentes de diarreia, tais como doença celíaca, fibrose cística, *sprue* tropical e outras manifestações diarreicas decorrentes de afecções hereditárias (DE ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011).

1.2 A diarreia persistente

À medida que declinam as mortes infantis por diarreia aguda, a DP passa a representar a maior fração de doenças entéricas infantis configurando-se como enorme desafio global (BHUTTA *et al.*, 2008). Outro fato importante relacionado ao declínio das mortes por diarreias agudas são as taxas de mortalidade associadas à DP que passaram a responder por 36 a 54% de todas as mortes relacionadas a diarreias (PEREIRA *et al.*, 2010; BHUTTA *et al.*, 2004), representando a maior proporção das mortes infantis relacionadas às doenças diarreicas (BHUTTA *et al.*, 2008).

A DP também apresenta alto impacto sobre as taxas de morbidade infantil. É pertinente lembrar que, ao afetar principalmente crianças, a DP instala-se durante um período crítico ao desenvolvimento humano. Como resultado da persistência da doença geram-se problemas como agravos na curva pondero-estatural, desenvolvimento prejudicado das funções intelectuais e cognitivas além de aumentar

a morbidade e mortalidade de outras doenças comuns à infância (MOORE *et al.*, 2010).

Embora o fator de risco epidemiológico mais importante para o desenvolvimento da DP seja a má condição nutricional (BHUTTA *et al.*, 2004; DE ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011; STRAND *et al.*, 2012), outros fatores apresentam peso relevante. Entre tais figuram sazonalidade, aspectos geográficos, condições socioeconômicas e educacionais, níveis de saneamento ambiental (DE DE ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011), deficiência de zinco, sexo masculino e infecção por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) ou *Cryptosporidium* sp. (BHUTTA *et al.*, 2008; DE ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011). Muito embora a compreensão mecanística do desenvolvimento da DP ainda não esteja claramente elucidada, percebe-se que a natureza do patógeno tem influência preponderante. Em experiência relatada por De Andrade e Fagundes-Neto (2011), os autores descreveram que em 200 pacientes com idade inferior a 1 ano de vida, quando alguma cepa patogênica de *E. coli* era isolada nas fezes, as chances de evolução para DP atingia 28,4%, ao passo que as chances de evoluir para DP com algum outro agente enteropatogênico era de apenas 6,9%.

Outro fator importante relacionado ao desenvolvimento da DP é o tempo de duração do episódio diarreico agudo. Moore *et al.* (2010) demonstraram, através de coorte realizado no nordeste brasileiro, que crianças que apresentam episódios diarreicos com duração entre 7 e 13 dias (Pro-D ou diarreia prolongada) têm 2,2 vezes mais chances de desenvolver DP durante a infância tardia. Como fator de risco, a Pro-D identificaria crianças cujos patógenos, dieta, estado nutricional, ou a própria genética predisporiam ao desenvolvimento de DP (MOORE *et al.*, 2010). Por outro lado, os episódios frequentes de Pro-D alterariam o estado nutricional, sistema imunológico, e induziriam alterações na barreira intestinal ou alterações na flora intestinal desempenhando um papel ativo na evolução da diarreia aguda para DP (MOORE *et al.*, 2010).

Compreender como se dá a evolução de um episódio diarreico agudo para DP tem sido a pergunta que motiva diversos autores que trabalham com o tema. Sabe-se que a resposta a esta pergunta envolve o interrelacionamento de múltiplos e complexos mecanismos fisiopatológicos que agravam o estado nutricional do

paciente. Um dos mecanismos centrais envolvidos na fisiopatologia da DP é a capacidade de uma lesão na mucosa do intestino delgado vir a tornar-se prolongada (BHUTTA *et al.*, 2004, 2008). Entretanto, faz-se importante distinguir entre a enteropatia causada pela colonização infecciosa persistente e a enteropatia pós-infecciosa que ocorre por falha ou retardo em seu processo de regeneração (BHUTTA *et al.*, 2008; DE ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011). Em tais casos, moléculas efetoras bacterianas que são secretadas para células hospedeiras são capazes de regular negativamente o sistema imunológico do hospedeiro propiciando, dessa maneira, as condições adequadas a uma colonização mais prolongada (BHUTTA *et al.*, 2004, 2008). Infecções intestinais frequentes provocam lesões na mucosa do intestino delgado podendo causar atrofia das microvilosidades. Como consequência, haveria redução da superfície absorptiva, aumento do infiltrado inflamatório na lâmina própria e ruptura da barreira funcional intestinal (DE ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011). Enquanto uma capacidade pobre de reparo intestinal é reconhecido como o elemento chave da morfologia anormal da mucosa, os fatores subjacentes a ineficiência ou baixa eficiência do processo de reparo continuam pobremente compreendidos (BHUTTA *et al.*, 2004; DE ANDRADE; FREYMULLER; FAGUNDES-NETO, 2009). Podem contribuir para a redução da capacidade de reparo do epitélio a deficiência em alguns micronutrientes, o que pode ser afetada por infecções entéricas concomitantes.

Em estudo publicado pelo Grupo Internacional de Trabalho para DP (BHUTTA *et al.*, 2008), os autores reforçam a necessidade de priorizar pesquisas na área de patogênese de DP. O mesmo grupo preconiza que as pesquisas deveriam ser focadas na necessidade de uma melhor compreensão da regulação do processo de reparo da lesão da mucosa intestinal paralelamente às abordagens terapêuticas específicas; a identificação de microorganismos associados ao desenvolvimento da DP bem como os mecanismos moleculares subjacentes à lesão que os mesmos são capazes de provocar; e estudo dos benefícios da utilização de micronutrientes para o tratamento ou prevenção da diarreia aguda e persistente.

1.3 *Escherichia coli* enteroagregativa

As diarreias são de etiologia muito diversificada, entretanto, cerca de 80% dos casos agudos são causados por algum patógeno entérico como vírus, bactéria ou enteroparasitas. Quando o agente etiológico é uma bactéria, as cepas diarreiogênicas de *Escherichia coli* são responsáveis pela maioria dos casos (ARAÚJO *et al.*, 2007; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). Tais patógenos podem ser classificados em seis diferentes patotipos que apresentam características clínicas, epidemiológicas e patogênicas distintas (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006), a saber: *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). As cepas de cada patotipo podem formar grupos clonais que são caracterizados pelos seus antígenos O (lipopolissacarídeo, LPS) e H (flagelo) que definem os sorogrupos (antígeno O, apenas) ou sorotipos (antígenos O e H) (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006).

EAEC é caracterizada pelo seu padrão de aderência agregativa sobre monocamada de células humanas (HEp-2) derivadas de adenocarcinoma de laringe (STEINER; THIELMAN; GUERRANT, 2010). Tal padrão de aderência agregativa (AA) é caracterizado pela aglutinação de bactérias sobre a superfície celular e sobre a superfície do vidro, embora a melhor característica do padrão de aderência seja a formação semelhante a tijolos empilhados (OKHUYSEN; DUPONT, 2010).

Dado o fato de tal patotipo ser definido por um ensaio fenotípico de agregação, a classificação permite incluir muitos subtipos de *E. coli*, com os mais variados tipos, ou nenhuma, virulência (STEINER; THIELMAN; GUERRANT, 2010). Atualmente a EAEC é classificada em típica ou atípica conforme presença ou ausência do *regulon aggR* (*aggregative adherence regulation*), respectivamente. Apesar de ser um gene plasmidial, *aggR* regula um *operon* cromossomal controlando alguns genes de virulência nas EAECs (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Recentemente, análises filogenéticas revelaram que existem três diferentes sub-famílias de EAEC que compartilham propriedades comuns entre si (STEINER; THIELMAN; GUERRANT, 2010).

Dada uma ampla heterogeneidade, alguns autores tem apontado a capacidade das diferentes cepas de EAEC de aderir a diferentes regiões do trato gastrointestinal. Algumas cepas ligam-se preferencialmente à mucosa do jejuno;

outras aderem ao íleo ou cólon (DE ANDRADE; FREYMULLER; FAGUNDES-NETO, 2010). A adesão à mucosa intestinal é um passo essencial à colonização e produção da doença pela EAEC. O padrão AA é resultado de diversas estruturas adesivas e não apenas da presença de fimbrias de adesão como até então era sugerido (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2010). Tal conclusão resulta da observação de que muitas cepas de EAEC que perderam os genes codificadores das fimbrias mantiveram a capacidade do padrão aderente sugerindo que diversas outras adesinas medeiam o padrão AA. Dentre as diversas fimbrias de adesão, as Fimbrias de Aderência Agregativa (AAF) I, II e III tem sido as mais caracterizadas. Satisfeita a necessidade da aderência ao epitélio intestinal, outro processo intimamente relacionado é a produção de um biofilme mucóide necessário aos efeitos posteriores induzidos pelo microorganismo. A formação de um biofilme persistente pode estar intimamente relacionado a capacidade de induzir diarreia e também com a habilidade de provocar uma colonização persistente (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2010).

A EAEC, tal como as demais cepas diarreiogênicas, diferenciam-se dos demais indivíduos da espécie pela capacidade de produzir elementos que as possibilita colonizar o trato intestinal. Para os diversos patótipos, muitas toxinas e diversos fatores de virulência têm sido amplamente descritos. Geralmente são codificados por plasmídeos ou ilhas de patogenicidade cromossomal (NATARO, 2010). Contudo, a importância clínica de muitos fatores de virulência ainda permanece pouco esclarecida (DE ANDRADE; FREYMULLER; FAGUNDES-NETO, 2010).

Dispersina é uma proteína antiagregativa cuja estrutura molecular já foi totalmente elucidada. Velarde *et al.* (2007) propuseram que a função da dispersina seria proteger a superfície negativa da bactéria de um colapso eletrostático com sua própria fímbria, já que esta apresenta carga positiva. Assim, uma vez que a fímbria apresenta-se livre, aumentaria as chances de colonização de outras superfícies o que permitira a dispersão bacteriana ao longo da mucosa intestinal. Contudo, o papel desempenhado pela proteína no contexto da patogenicidade da EAEC necessita de mais esclarecimentos, pois o gene codificador da dispersina (*aap*) não está presente em todas as cepas de EAEC. Além do mais, *aap* tem sido detectado também em cepas comensais de *E. coli* (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2010).

As enterobactérias secretam proteínas serina-proteases com ação similar a tripsina que são denominadas coletivamente de SPATEs (*Serine proteases autotransporters of Enterobacteriaceae*) (BOISEN *et al.*, 2010; DUTTA *et al.*, 2002). Filogeneticamente, as SPATEs são categorizadas em duas classes: Classe I, proteínas com atividade citotóxica para células epiteliais; Classe II, são proteínas com atividades mais diversificadas apesar de muitas serem conhecidas por sua ação sobre degradação de mucinas (BOISEN *et al.*, 2010; MOAL *et al.*, 2011).

A toxina Pic (*protein involved in intestinal colonization*) é classificada como uma SPATE de classe II, codificada pelo cromossomo bacteriano (ESLAVA *et al.*, 1998; MOAL *et al.*, 2011). Trata-se de uma proteína com atividade proteolítica cuja função é catalisar a degradação de mucinas (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2010). No contexto da patogenicidade da EAEC, a função da Pic é, ao degradar os componentes gelatinosos do biofilme, possibilitar a mobilidade da bactéria ao longo da mucosa facilitando o aumento da área a ser colonizada.

Pet (*plasmid encoded toxin*) é uma SPATE de classe I, uma toxina que induz a contração do citoesqueleto, perda das fibras de stress de actina e perda do contato focal da célula com sua matriz. Uma vez internalizado, Pet liga-se a α -fodrina, a proteína responsável pela conexão da membrana plasmática com o citoesqueleto, clivando-a em duas partes (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2010).

Apesar da necessidade do Pet para que cepas 042 possam manifestar efeitos citotóxicos sobre células humanas, apenas uma pequena fração de cepas de EAEC apresentam o gene que a codifica. Ainda assim uma grande quantidade de cepas são capazes de manifestar efeitos tóxicos sobre células (BOISEN *et al.*, 2009). Tal paradoxo está bem situado no contexto colocado anteriormente, a EAEC é um patotipo de muita heterogeneidade que se manifesta na multiplicidade de fimbrias e fatores de virulência que as muitas cepas podem vir a apresentar (BOISEN *et al.*, 2009).

O gene *sat* é prevalente em cepas de *E. coli* uropatogênica, EAEC e algumas cepas isoladas de *Shigella* (BOISEN *et al.*, 2009; MOAL *et al.*, 2011). A toxina Sat (*secreted autotransporter toxin*) está envolvida nas ações citotóxicas promovidas pelas bactérias que a expressam.

Sat causa uma ruptura dramática da F-actina do citoesqueleto celular, como as demais SPATEs de classe I. Apesar do fato de Sat também clivar fodrina, não há redistribuição desta tal como a que acontece por ação de Pet. (BOISEN *et al.*, 2009). Outra ação relevante na patogenicidade de Sat é a redistribuição das proteínas associadas às junções firmes, causando grandes alterações na permeabilidade paracelular (GUIGNOT *et al.*, 2007). Em recente trabalho realizado por Moal *et al.* (2011), os autores relatam um terceiro mecanismo pela qual Sat exerceria seus efeitos citotóxicos. Trata-se da promoção de autofagia induzida. Segundo os autores o processo autofágico induzido por Sat também estaria relacionado com a ação esfoliativa observada para a toxina, determinada pela perda de contato das células afetadas com a matriz que as sustenta.

EAEC foi relatada pela primeira vez em 1987 em uma criança com diarreia aguda na cidade de Lima, Peru. Contudo, a patogenicidade da EAEC só veio a experimentar grandes avanços após sete anos de sua descoberta. Em 1994 um estudo conseguiu comprovar que a EAEC (cepa 042) era capaz de causar diarreia na maioria dos voluntários saudáveis (NATARO, 1995). Posteriormente, em outros estudos com voluntários verificou-se que nem todas as cepas de EAEC eram capazes de induzir diarreia comprovando que a patogenicidade é muito complexa, além de muito heterogênea (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; STEINER; THIELMAN; GUERRANT, 2010).

A EAEC tem sido fortemente associada a causa da diarreia do viajante, diarreia persistente em crianças que vivem em áreas onde EAEC é endêmica; e diarreia em indivíduos imunocomprometidos por vírus da imunodeficiência. Este patógeno vem se tornando cada vez mais reconhecido como a principal causa de diarreia esporádica em adultos saudáveis e crianças (OKHUYSEN; DUPONT, 2010) e cada vez mais associado ao desenvolvimento de DP em crianças de países em desenvolvimento (STEINER; THIELMAN; GUERRANT, 2010).

Em estudo realizado no Nordeste brasileiro, Lima *et al.* (1992) observaram elevada presença de *E. coli* enteroaderente nas fezes e no suco jejunal de crianças com diarreia persistente (36% com aderência agregativa, 29% com aderência difusa e 13% com aderência localizada no ensaio de agregação utilizando células HEp-2). Em estudo prospectivo realizado por Araújo *et al.* (2007) nas cidades de São Paulo e

Ribeirão Preto no estado de São Paulo, os autores verificaram que a EAEC era o patógeno mais frequentemente associado aos casos de diarreias em crianças com idade inferior a 5 anos. Em outro estudo realizado por Fang et al. (1995), cepas de EAEC foram isoladas em 68% dos casos de diarreia persistente, 46% dos casos de diarreia aguda e em 31% dos controles.

Um conceito emergente é a noção de que certas cepas patogênicas, inclusive EAEC, podem causar uma diarreia aguda ou persistente mas que também podem persistir de forma subclínica no intestino humano, causando inflamação crônica na ausência de disenteria ou qualquer outra manifestação perceptível (OKHUYSEN; DUPONT, 2010)

1.4 O processo de reparo da barreira funcional intestinal

Reparo ao dano epitelial tem sido intensivamente estudado, entretanto, o processo de reparo ao dano da mucosa em mamíferos tem sido investigado em menor extensão (GUIGNOT *et al.*, 2007)

A regeneração envolve migração epitelial, proliferação, alterações na função celular e adaptação dos tecidos epiteliais subjacentes. A interação de vários tipos celulares e a confluência de vários processos não é bem conhecida. Acredita-se que uma variedade de fatores do hospedeiro também desempenhem papel preponderante na regulação (BLIKSLAGER *et al.*, 2007).

O epitélio intestinal funciona como barreira de primeira linha na defesa contra fatores hostis de origem externa que podem adentrar ao lúmen, (BLIKSLAGER *et al.*, 2007; LISUKA; KONNO, 2011). Dessa forma, a mucosa intestinal compõe uma das estruturas de mecanismos do sistema imunológico inato.

Em resposta a perda da continuidade epitelial, células lançam projeções de suas membranas para onde há ausência de continuidade determinando, dessa maneira, o sentido da migração. Células epiteliais ficam aderidas ao substrato

adjacente por meio de integrinas transmembranares que servem como ponto de ligação entre a matriz celular e regiões específicas chamadas contato focal. Durante o processo migratório torna-se necessário a formação de novos pontos de contato focal na borda para onde a célula se desloca como forma de gerar pontos de apoio para tração. É também necessário o desprendimento dos pontos focais na borda contrária para onde a célula se desloca (BLIKSLAGER *et al.*, 2007).

Como visto, para que a célula seja capaz de migrar é necessário um rearranjo de sua morfologia, com reestruturação do citoesqueleto, retração de seu citoplasma com projeção do mesmo para outra direção, perda e formação simultânea de pontos de contato da célula com a matriz onde esta se assenta. Parte das alterações morfológicas necessárias ao processo migratório é controlada por Rho GTPases, complexa família de proteínas presentes em todas as células eucariotas. Em vertebrados, RhoA, Rac e Cdc42 representam importantes membros já bem caracterizados da família Rho e estão envolvidos na resposta a estímulos extracelulares. Envolvida no efeito promotor de mobilidade encontra-se particularmente a proteína Rho que, além de RhoA, possui duas outras isoformas que compartilham 85% de homologia, RhoB e RhoC. Acredita-se que a ação do Rho aconteça primariamente na porção anterior da célula promovendo seu desprendimento da matriz enquanto Rac agiria primariamente na porção posterior, estimulando a protrusão da membrana mediada por actina (WHELLER; RIDLEY, 2004). Graças aos seus efeitos sobre polimerização da actina, contratilidade da actomiosina e importante ação sobre a dinâmica dos microtúbulos, Rho exerce papel fundamental na regulação do formato celular, polaridade e locomoção (BLIKSLAGER *et al.*, 2007).

Para dar início ao processo de locomoção celular é necessário que a célula esteja livre da adesão célula-matriz e do contato célula-célula. Rho-A desempenha um papel crítico na regulação da integridade de tais adesões que incluem ainda as junções aderentes e as junções firmes. Rho-A induz o aumento no número e tamanho das integrinas relacionadas à adesão focal em muitos tipos de celulares aderentes e é necessária para a formação dos podossomos em células dendríticas e epiteliais (WHELLER; RIDLEY, 2004).

A capacidade de defesa inata da mucosa reside em dois pontos chaves: o primeiro mecanismo é a capacidade de dificultar a invasão de patógenos e toxinas, uma vez que a mucosa constitui uma barreira física; o segundo mecanismo é decorrente da capacidade de reparos rápidos quando danos são provocados na monocamada epitelial (BLIKSLAGER *et al.*, 2007).

Em processos fisiologicamente normais há habilidade do trato gastrointestinal para restaurar a continuidade da superfície epitelial intestinal. As células próximas a superfície injuriada migram para o interior da lesão de forma a repovoar a área desnuda (BLIKSLAGER *et al.*, 2007; LISUKA; KONNO, 2011; SUN *et al.*, 2011) Tal processo é denominado de restituição epitelial. No segundo momento, as células que migraram, por meio de mitose, aumentam em número no processo de proliferação e, então, iniciam o processo de maturação e diferenciação celular restaurando, dessa forma, a integridade funcional da mucosa intestinal (SUN *et al.*, 2011)

Células do epitélio intestinal expressam receptores capazes de reconhecer sequências conservadas de microorganismos, conferindo a tais células a capacidade de reconhecer moléculas de patógenos (MEDZHITOV; JANEWAY, 2002). Estes incluem, dentre outros, membros da família de receptores *toll-like* (TLR). Quando ativados, tais receptores ativam uma resposta de alarme na forma de mediadores inflamatórios que levam a expressão de moléculas de adesão, ativam e recrutam células do sistema imunológico e regulam o tráfico de células inflamatórias em direção ao lúmen intestinal (BLIKSLAGER *et al.*, 2007). Uma vez no interior do trato intestinal a resposta evocada desempenha papel fundamental para debelar o microorganismo que a causou.

Há diversos mecanismos pelos quais o organismo controla os TLR, prevenindo ativação desnecessária e respostas inapropriadas durante o processo inflamatório. Tais mecanismos apresentam extrema importância no ambiente da mucosa intestinal, um local que está constantemente exposto a uma ampla variedade de estímulos antigênicos. São distribuídos espacialmente de forma a permitir especificidade em suas respostas. Por exemplo, são expressos principalmente no lado basolateral das células epiteliais. Assim, o contato com seus ligantes acontece apenas quando há ruptura das junções firmes por patógenos invasores ou quando ocorre dano epitelial (BLIKSLAGER *et al.*, 2007).

A sinalização por tais receptores é modulada fracamente como forma de minimizar a expressão inapropriada do gene inflamatório relacionado ao receptor (BLIKSLAGER *et al.*, 2007). A sinalização via TLR induzida por microorganismos comensais tem um papel protetor sendo necessária à homeostase do trato gastrointestinal. O sobre crescimento bacteriano no intestino delgado pela flora colônica ocupa lugar de destaque na fisiopatologia da DP. Esse fenômeno predispõe o dano da mucosa intestinal devido a bactérias anaeróbias como a *Veillonella* e a *Bacteroides* (DE ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011). Em tais circunstâncias a inter-relação entre a flora normal e hospedeiro pode ser alterada, levando a um estado inflamatório prolongado mediado, possivelmente, pela sinalização de TLR (BHUTTA *et al.*, 2008).

Em estudo publicado por Nathan (2010), os autores sugerem que há necessidade de um sinal binário (teoria das duas batidas) segundo a qual a inflamação seria desencadeada e propagada apenas quando dois sinais são gerados, um indicando a infecção e o outro indicando lesão tecidual (sinalizado por proteínas de choque térmico, peptídeos mitocondriais, dentre outros).

A resolução do processo imune deve ser finamente controlada, de forma a evitar fibrose, formação de abscesso e outros processos que levem a exacerbação do dano epitelial já instalado, e, mais uma vez, o epitélio desempenha um papel fundamental. Células da mucosa gastrointestinal secretam um número de mediadores anti-inflamatórios que inibem a resposta de neutrófilos e também são fonte de mediadores anti-inflamatórios derivados de ácidos-graxos, como as lipoxinas. Lipoxinas retardam o recrutamento de neutrófilos para a mucosa inflamada por inibirem a produção de IL-8, um importante quimiotáxico (BLIKSLAGER *et al.*, 2007).

1.5 Alanil-glutamina

A dieta constitui um dos maiores fatores ambientais que exercem efeitos em muitos dos aspectos relacionados aos riscos de doença ou saúde (JIMÉNEZ-CHILLARON *et al.*, 2012). Assim, sendo a condição nutricional do indivíduo um fator preponderante para o estabelecimento e desenvolvimento da doença diarreica

(BHUTTA *et al.*, 2008; DE ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011), especial atenção deve ser dada a tal fator ambiental.

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), cerca de um sexto da população mundial, pouco mais de um bilhão de pessoas, sofrem de subnutrição. Quando considerado a faixa etária dessas pessoas verifica-se que são 195 milhões de crianças a padecer com as consequências deste mal (UNICEF, 2009). Em países pobres, desnutrição e subnutrição, especialmente durante o período perinatal, aumentam não apenas a mortalidade e morbidade perinatais, mas também o risco de doenças crônicas durante a fase adulta (JIMÉNEZ-CHILLARON *et al.*, 2012).

Graças a programas de distribuição de renda como Fome Zero, Bolsa Família, e aumento do salário mínimo, o Brasil tem apresentado uma melhora dramática nos níveis de subnutrição e desnutrição de sua população (MONTEIRO *et al.*, 2009). Apesar das crianças com idade inferior a 5 anos com desnutrição somar apenas 7%, a cifra representa, em valores absolutos, 1,129 milhões de casos e coloca o Brasil como o país sul-americano com o maior número absoluto de crianças desnutridas (UNICEF, 2009).

Contraopondo-se ao conceito clássico da farmacologia que não considera os nutrientes como fármacos, alguns autores reconhecem que certos micronutrientes possuem propriedades tão ímpares, desempenhando ações ainda tão mais distintas, que utilizam o termo **farmaconutrientes** (SANTORA; KOZAR, 2010) ou **imunonutrientes** (KIM, 2011) para classificar e descrever algumas dessas substâncias frequentemente utilizadas como micronutrientes. A despeito do que sugere o próprio termo, claro está, o reconhecimento das propriedades farmacológicas dos mesmos.

Glutamina, arginina, ácidos graxos contendo ômega-3, nucleotídeos e beta-caroteno são alguns dos exemplos de farmaconutrientes ou imunonutrientes, com capacidade de modular vias imunes e metabólicas (SANTORA; KOZAR, 2010; KIM, 2011). Dentre estes é a glutamina, um dos vinte aminoácidos do código genético padrão, que tem despertado a maior atenção e levado a uma grande quantidade de estudos já publicados. Apesar disso, muitas das suas ações são ainda pouco compreendidas.

Aminoácidos essenciais são aqueles cujo nosso organismo não tem capacidade de sintetizar, necessitando, portanto, que os mesmos sejam fornecidos através da dieta. A glutamina ou L-glutamina é um aminoácido não essencial, uma vez que muitos dos tecidos do organismo humano são capazes de sintetizá-lo a partir do glutamato e amônia através de uma reação catalisada pela enzima glutamina-sintetase, presente no citosol (SCHEIBE *et al.*, 2009). Uma vez sintetizada, ou provida através da dieta, a glutamina dentre diversas outras funções, provê um grupamento amida para síntese de vários metabólitos, como purinas, pirimidinas e nucleotídeos que desempenham relevante papel no desenvolvimento do organismo. Também serve como substrato para diversas reações responsáveis pela formação de outros aminoácidos como arginina que, por sua vez, é fonte do óxido nítrico, importante vasodilatador e mediador de muitos outros processos fisiopatológicos (SCHEIBE *et al.*, 2009).

A glutamina é o aminoácido mais abundante no músculo e no plasma humano (HUANG *et al.*, 2003; ZIEGLER, 2006). Entretanto, em situações de doença seus níveis plasmáticos ficam muito reduzidos a ponto de que sua re-síntese é incapaz de prover a quantidade de glutamina suficiente para restaurar os níveis séricos (SCHEIBE *et al.*, 2009). Confrontando a sua classificação como a de um aminoácido não essencial e dado o fato do organismo não conseguir repô-lo em estados patológicos, diversos autores denominam a glutamina como um aminoácido “condicionalmente essencial” (HUANG; LIBONI; LI; NEU, 2007; SANTORA; KOZAR, 2010; SCHEIBE, 2009).

Paralelo ao conhecido papel dos aminoácidos como substratos necessários à síntese de proteínas, alguns aminoácidos desempenham papéis fundamentais a nível transcricional no controle do crescimento, função e integridade de células intestinais (BRASSE-LAGNEL; LAVOINNE; HUSSON, 2010). Além de ser o substrato energético essencial para as células do epitélio intestinal, a glutamina tem demonstrado exercer papéis relevantes sobre a integridade e diversas funções desse tipo celular (BRASSE-LAGNEL; LAVOINNE; HUSSON, 2010; ZIEGLER *et al.*, 2006). Muitos estudos têm demonstrado uma ampla variedade de genes alvos, vias de sinalização e fatores de transcrição envolvidos na ação da glutamina sobre células intestinais.

Alguns estudos demonstram que o crescimento celular é função do influxo de glutamina na célula e sugerem que tal aminoácido é utilizado para prover glutamato e cisteína, talvez por meio da síntese de glutatona. A glutamina exerce importantes ações tróficas sobre células intestinais reforçando a ação mitogênica de diversos fatores de crescimento. A recíproca demonstrou ser verdade quando constatou-se que células mantidas na presença de metionina-sulfoxamina, um inibidor da glutamina sintetase, apresentam uma acentuada redução de crescimento celular (MATÉS *et al.*, 2002). Algumas das ações tróficas da glutamina são exercidas parcialmente através da síntese e/ou ativação de fatores específicos de transcrição. Em células derivadas do jejuno de porco, a adição de glutamina provocou rápida estimulação da expressão do gene *c-jun*, associada com o aumento do mRNA e níveis enzimáticos intracelulares da ornitina descarboxilase (ODC) levando ao subsequente aumento da síntese de poliaminas e promovendo rápida restituição epitelial (BAN; KOZAR, 2010; ZIEGLER *et al.*, 2006). Em culturas de células de intestino de rato e porco, a expressão de *c-myc* e *c-jun* estavam relacionadas a proliferação e diferenciação celular (BRASSE-LAGNEL; LAVOINNE; HUSSON, 2010). Há indícios de que a glutamina possa influenciar o processo do ciclo celular. Em cultivo de linfócitos a proliferação e propagação destas células esteve relacionada ao maior número de células que passaram da fase G1 para S e G2/M (MATÉS *et al.*, 2002).

Glutamina também é uma fonte de energia para linfócitos e macrófagos e tem demonstrado importantes propriedades imunoestimulatórias em várias condições clínicas. Quando administrada oralmente a camundongos atímicos, glutamina aumentou de forma significativa a contagem de células T e a concentração de IL-2, um importante marcador para ativação precoce do sistema imune. Em modelo de colite induzida por indometacina em ratos, os diversos regimes de glutamina (profiláticos e terapêuticos) atenuaram de forma significativa o dano macroscópico causado à mucosa ileal e os distúrbios microcirculatórios (aderência de leucócitos, migração leucocitária e o cisalhamento anormal da parede vascular) (ZIEGLER *et al.*, 2006).

A glutamina tem um papel protetor sobre a mucosa intestinal por reduzir a bacteremia e apoptose de células epiteliais, influenciando a resposta imune e aumentando a função da barreira intestinal. Foi demonstrado em modelos animais que

a glutamina exerce um papel protetor sobre o intestino de roedores tratados com endotoxinas por reduzir a bacteremia e apoptose de células epiteliais, influenciando a resposta imune e aumentando a função da barreira funcional intestinal (BAN; KOSAR, 2010).

Parte significativa de muitas ações inflamatórias e imunomodulatórias da glutamina podem ser explicadas por sua modulação sobre o fator de transcrição nuclear *Kappa B* (NF- κ B). A adição de glutamina pode reduzir o nível de NF- κ B através da redução de sua síntese ou aumento de sua degradação (a administração de glutamina reduz a imunoreatividade a NF- κ B em intestino de ratos injuriados) em enterócitos de porcos tratados com LPS, reduzindo subsequentemente o processo inflamatório e apoptótico (BRASSE-LAGNEL; LAVOINNE; HUSSON, 2010).

Acredita-se que outro mecanismo relacionado a redução dos danos celulares e epiteliais seja dada pela capacidade da glutamina de induzir a glutatona, um importante antioxidante hidrossolúvel presente no citossol de muitos tipos celulares. A glutatona é responsável por neutralizar espécies reativas de oxigênio e radicais livres, minimizando assim o estresse oxidativo celular associado a exacerbação do processo inflamatório. Estudos em ratos demonstram que a administração intravenosa ou oral de L-glutamina reduz a esteatose hepática e aumenta os níveis de glutatona em vários modelos de estresse (MATÉS *et al.*, 2002)

Diversos distúrbios gastrointestinais têm-se mostrado como interessantes alvos para terapia com glutamina. Síndrome de malabsorção, que se seguem após retirada de parte do intestino, atrofia da mucosa e distúrbios diversos da barreira funcional intestinal associada com estados severos de doença, infecção e desnutrição; e estados inflamatórios da mucosa que cursam com dano ao epitélio requerendo cicatrização e reparo são alguns exemplos. Além disso, o intestino delgado e a mucosa colônica são alvos particularmente interessantes para glutamina dado o fato da pronta oxidação e metabolismo deste aminoácido por estes tecidos (ZIEGLER *et al.*, 2006).

Na qualidade de farmaconutriente torna-se essencial considerar que a observação de ações farmacológicas estão vinculadas a dose administrada. É pertinente dizer que o termo imunonutriente foi desenvolvido a partir da constatação

de que o estado de desnutrição *per se* prejudica o desempenho das funções imunológicas. Por conseguinte, em imunonutrição, quantidades de nutrientes superiores às observadas fisiologicamente são necessárias, por via parenteral ou enteral, como forma de obter efeitos farmacológicos (KIM, 2011). É necessário mais uma vez enfatizar que em estados patológicos há grande consumo de glutamina sendo sua síntese insuficiente para repor as concentrações normalmente observadas no organismo (KIM, 2011; SANTORA; KOZAR, 2012).

A utilização da glutamina é limitada por algumas condições farmacêuticas inerentes às propriedades físico-químicas de sua molécula, como solubilidade e estabilidade. A baixa solubilidade da glutamina em meio aquoso limita bastante sua utilização na nutrição enteral ou parenteral (KIM, 2011). A forma farmacêutica sólida mais comum apresenta o inconveniente de degradar-se facilmente quando em solução, decompondo-se em piroglutamato durante a esterilização por calor. Para contornar a baixa solubilidade e estabilidade em meio aquoso, o acoplamento químico da glutamina com outro aminoácido (glicina ou alanina) tem se mostrado como uma alternativa prática, tendo sido utilizado como componente de misturas nutritivas (LIMA *et al*, 1992; KIM, 2011).

A L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) é um dipeptídeo da glutamina de grande estabilidade que tem sido utilizado em modelos diversos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Os benefícios da utilização do dipeptídeo em detrimento da forma livre de glutamina são ainda teóricos e dependem, muito provavelmente, do modo de administração e do modelo em uso. Entretanto, existem muitos indícios de que a utilização do dipeptídeo apresenta certas vantagens sobre a glutamina na sua forma livre. Em estudos toxicológicos com ratos, glutamina livre administrada por via enteral reduziu os níveis hepáticos de glutatona e aumentou a concentração de substâncias reativas derivadas de tiobarbituratos aumentando os danos potenciais hepáticos decorrentes da peroxidação lípidica. Apenas a suplementação com o dipeptídeo Ala-Gln foi capaz de reduzir as espécies reativas derivadas do tiobarbiturato, efeito que ocorreu concomitantemente à recuperação da capacidade antioxidante hepática (MATILLA *et al.*, 2000). Em estudo feito no Nordeste brasileiro, a suplementação com Ala-Gln em crianças com diarreia demonstrou ganho de peso e melhora nos parâmetros de permeabilidade (LIMA *et al.*, 2002).

2 JUSTIFICATIVA

Durante as três últimas décadas grandes transformações no perfil de morbimortalidade têm sido observadas em todo o mundo. Nesse contexto o número de mortes por doenças diarreicas agudas tem declinado substancialmente em todas as regiões. Particularmente no Brasil, tais mudanças têm sido propulsionadas por transformações de cunho social e econômicas. Entretanto, com a redução do número de mortes por diarreia aguda, a diarreia persistente tem se configurado como uma das principais preocupações de saúde infantil, pois a sua instalação e persistência crônicas num momento delicado do desenvolvimento humano pode deixar sequelas constantes.

À medida que a diarreia persistente passou a representar a maior fração de doenças entéricas infantis, grandes esforços têm sido direcionados na tentativa de compreender como esta se desenvolve a partir de um episódio agudo diarreico. A epidemiologia tem contribuído com fatos instigantes. É sabido que a desnutrição é um fator de grande relevância envolvido com incidência e progressão das diarreias e que em países em desenvolvimento patógenos como EAEC estão altamente correlacionados ao progressão de tal patologia.

Por outro lado, sabe-se que na base do desenvolvimento da DP cursa uma pobre capacidade de reparo da mucosa epitelial gastrointestinal. Entender como e porque a baixa eficiência de reparo ou ineficiência de reparo acontece constitui um dos elementos chaves na compreensão mecanística do desenvolvimento da DP.

Considerando a grande importância da DP para saúde pública, seu desenvolvimento em populações desnutridas, sua estreita correlação etiológica com EAEC e a necessidade de compreender a relação destes fatores com o elemento chave no desenvolvimento da doença que é a capacidade prejudicada de reparo na mucosa intestinal, propomos o presente estudo que avaliou os efeitos da EAEC (cepa 239-1) sobre a barreira funcional intestinal *in vitro* concomitante a intervenção com Alanil-Glutamina, um importante micronutriente cuja propriedades benéficas sobre as funções de barreiras já foi demonstrado clinicamente em população infantil nordestina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a patogenia da *Escherichia coli* enteroagregativa (cepa 239-1) no que concerne ao dano causado à barreira funcional epitelial *in vitro* e as ações promovidas pela suplementação com alanil-glutamina sobre o referido dano.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar as ações promovidas pela Alanil-Glutamina sobre a barreira funcional intestinal *in vitro* na ausência de infecção.
- Avaliar o dano provocado pela *Escherichia coli* enteroagregativa sobre a barreira funcional intestinal *in vitro*.
- Investigar as ações promovidas pela Alanil-Glutamina sobre o dano provocado pela *Escherichia coli* enteroagregativa sobre a barreira funcional intestinal *in vitro*.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivo bacteriano

Em nosso estudo trabalhamos com infecção da EAEC 239-1 sobre células da mucosa intestinal. Trata-se de uma cepa enteroagregativa de sorotipo ORough:H21 isolada de uma criança com diarreia na Tailândia (DUDLEY *et al.*, 2006). A cepa bacteriana foi gentilmente cedida pelo Dr. James P. Nataro, da Universidade de Virginia, Estados Unidos.

Desde a sua descrição em 1987, a caracterização da virulência e patogenia da EAEC vem sendo descrita em diversos estudos através, principalmente, da utilização da cepa 042 em detrimento do estudo de outros grupos clonais de EAEC. Sabe-se que a cepa 042 secreta a toxina pet ao passo que a cepa 239-1 secreta sat, sendo esta a principal diferença entre as duas cepas de EAEC. A cepa 239-1 foi escolhida por ser um grupo clonal de EAEC pouco estudado, cujo grau de patogenicidade é pouco descrito.

Como controle para infecção pela EAEC, foi utilizado a cepa HS, um espécime comensal de *E. coli* que compõe a microbiota normal do cólon humano (LEVINE *et al.*, 1977). *E. coli* HS foi originalmente isolada das fezes de um pesquisador adulto saudável (LEVINE *et al.*, 1978) e tem sido utilizada em diversos estudos de colonização. Estudos clínicos realizados através da ingestão de suspensões bacterianas em voluntários, evidenciam que a cepa comensal é capaz de colonizar o trato gastrointestinal sem causar efeitos adversos detectáveis em concentrações baixas ou altas ou mesmo em concentrações muito elevadas como aquelas superiores a 10^{10} UFC/mL (LEVINE *et al.*, 1977, 1978; RASKO *et al.*, 2008). O fato de ser uma cepa sabidamente comensal, componente da microbiota normal humana e estar bem caracterizada molecularmente faz com que *E. coli* HS seja uma cepa de escolha em muitos estudos comparativos entre os diversos grupos clonais de *E. coli* (RASKO *et al.*, 2008).

O tratamento dado a *E. coli* HS foi exatamente o mesmo dado a EAEC tanto na forma de cultivo como na execução dos protocolos, onde a cepa comensal era

adicionada nos mesmos intervalos e sempre na mesma concentração e volume da cepa EAEC.

Durante todo o período de estudo as cepas bacterianas foram mantidas em meio líquido de TSB (*Trypticase Soy Broth*) contendo glicerol 10% (v/v) e armazenadas em câmara de congelamento a -20 °C. Nos momentos em que era necessário trabalhar com as cepas, as mesmas eram semeadas em placa de ágar MacConkey em condições assépticas, levada para estufa bacteriológica a 37 °C, onde permaneciam por 18-24h antes de sua utilização.

4.2 Preparo da suspensão bacteriana

Uma vez cultivadas conforme procedimento descrito no item 4.1, colônias bacterianas isoladas eram coletadas, na presença da chama e com auxílio de alça, e suspensas em meio *Eagle* modificado por Dulbeco - DMEM (Gibco, Estados Unidos) livre de glutamina. Após homogeneização, uma alíquota de 80µL era transferida para uma cubeta de vidro e sua densidade óptica no comprimento de onda de 600nm (OD_{600}) era medida contra um branco que continha apenas DMEM sem glutamina no espectrofotômetro Biophotometer (Eppendorf, Alemanha). Durante o decorrer do estudo foi utilizada uma suspensão bacteriana com $OD_{600} = 0,100 \pm 0,10$ para causar infecção em todos os protocolos utilizados, exceto no ensaio de proliferação, onde, após atingir $OD_{600} = 0,100 \pm 0,10$, a suspensão era diluída 10 vezes em DMEM. Através de dados não mostrados no presente estudo, foi determinado previamente diversos valores de OD_{600} e a concentração bacteriana correspondente. No presente caso, para a OD_{600} utilizada a concentração aproximada é de 10^7 UFC/mL.

4.3 Cultivo celular

Para a realização do presente trabalho foram utilizadas duas linhagens celulares: HEp-2 e IEC-6.

O cultivo de células HEp-2 serviu unicamente para realização do ensaio de padrão de aderência para as cepas bacterianas utilizadas. Tais células apresentam

morfologia epitelióide e são derivadas da contaminação de células HeLa (que por sua vez provém de adenocarcinoma de cérvix). Células HEp-2 foram obtidas a partir da Coleção Americana de Cultura (*American Type Culture Collection-ATCC*, Estados Unidos) sob número de catálogo CCL-23 (ATCC, 2012) e armazenadas em câmara de congelamento a -80 °C.

A cultura de HEp-2 foi realizada em garrafas de cultivo celular com meio essencial mínimo (MEM) (GIBCO, Estados Unidos) contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Estados Unidos) e 1% penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich, Estados Unidos). Durante o crescimento, as células foram mantidas sob incubação a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

Os modelos de lesão foram determinados *in vitro* através de cultivo celular. Para tanto, todos os experimentos, salvo os experimentos de aderência bacteriana, foram realizados com células IEC-6. Tais células derivam de uma linhagem celular não transformada de cariótipo diplóide normal, capazes de crescerem em monocamadas. Exibem muitas propriedades características das células epiteliais intestinais normais quando em cultivo celular (QUARONI *et al.*, 1979) sendo muito utilizada em modelos de recuperação intestinal (BRAGA-NETO *et al.*, 2008; BRITO *et al.*, 2005). Foram utilizadas células IEC-6 nas passagens 30 – 35, obtidas da Coleção Americana de Cultura (*American Type Culture Collection-ATCC*, Estados Unidos). Esta linhagem celular pode ser obtida na ATCC sob o número de catálogo CRL-1592 (ATCC, 2012). As células foram mantidas em cultivo no interior de garrafas de 75cm² (TPP®, Suíça) sob um meio DMEM com acréscimo de 5% de soro fetal bovino inativado (GIBCO, Estados Unidos), 10 mg de insulina bovina pancreática (Sigma Aldrich, Estados Unidos), 50UI/mL de penicilina (GIBCO, Estados Unidos) e 50 µg/mL de estreptomicina (GIBCO, Estados Unidos). Durante o cultivo, as garrafas de cultura celular foram mantidas no interior de estufa a 37°C sob uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. Foi realizada a troca do meio do cultivo a cada dois dias. Tal procedimento foi sempre realizado no interior de uma cabine de segurança biológica Tipo 2A.

4.4 Padrão de aderência bacteriano

Sendo a presença do padrão AA a principal propriedade das cepas entetroagregativas de *E. coli*, há necessidade de confirmar ou excluir tal propriedade funcional nas cepas bacterianas utilizadas pelo presente estudo. Com a finalidade verificar tal padrão, realizamos o ensaio do padrão de aderência conforme metodologia adaptada de Cravioto *et al.* (1991). Quando próximas a confluência completa, as células foram dissociadas com solução de tripsina EDTA (Sigma Aldrich, Estados Unidos) e após centrifugação foram suspensas no mesmo meio de cultivo. Uma alíquota de 200µL foi transferidas para poços de lâminas Lab-Tek® (Thermo Fisher Scientific, Alemanha) com oito cavidades. As lâminas foram mantidas em estufa de cultivo celular por 24h. Findo o período de incubação, as células HEp-2 foram lavadas 3 vezes com tampão PBS e receberam 200 µL de uma suspensão de EAEC contendo 10⁷ UFC/mL ou de igual volume de uma suspensão de *E. coli* HS na concentração de 10⁷ UFC/mL.

Após a permanência de 3h na estufa de cultivo celular, as células Hep-2 foram lavadas 3 vezes com tampão PBS e a elas foi adicionado 200µL de metanol por 30 segundos. Após este processo as células receberam a coloração May-Grunwald-Giemsa e foram observadas e fotografadas ao microscópio óptico (Nikon, Japão) no aumento de 1.000 vezes.

4.5 Migração celular

Com a finalidade de investigar o efeito deletério da EAEC sobre a capacidade migratória de células da mucosa intestinal e avaliar as ações da Ala-Gln na promoção da migração de células do epitélio intestinal no modelo de infecção com EAEC, realizamos os ensaios de migração celular utilizando células IEC-6 conforme metodologia adaptada de Carvalho (2011).

As células foram cultivadas conforme descrito no item 5.3 e após atingir aproximadamente 95% de confluência (verificada por meio de observação ao microscópio eletrônico), as mesmas foram retiradas do frasco de cultivo celular através de dissociação com tripsina EDTA (Sigma Aldrich, Estados Unidos). Após quantificação em câmara de Neubauer foi preparada uma suspensão com concentração aproximada de 2,5x10⁵ células/mL e adicionada 1mL da suspensão em placas de cultura de poliestireno com 12 poços (TPP®, Suíça). As placas foram

mantidas em estufa de cultivo celular com as condições já descritas. Após 48h todos os poços da placa tinham suas confluências e integridade verificadas. Após descarte do meio, a cada poço foi adicionado 1mL de uma solução de mitomicina C 5µg/mL (Sigma Aldrich, Estados Unidos). Em seguida, as células permaneceram na estufa durante 15 minutos e então foram lavadas 1 vez com PBS. A mitomicina C é um antibiótico com propriedade alquilante e inibe a mitose celular. No presente estudo foi utilizada para garantir que as células quantificadas fossem oriundas apenas do processo migratório e não de células em divisão. Após a retirada da droga, seu efeito inibitório sobre o ciclo celular persiste por aproximadamente 24h em células cultivadas *in vitro* (SHATKIN et al., 1962).

Com auxílio de uma lâmina estéril, foi realizado corte no centro da monocamada arrastando a lamina do centro em direção a periferia de maneira a formar uma área desnuda, sem presença de células. Uma vez realizado o corte, à cada poço foi adicionado 1mL da suspensão de EAEC 239-1 (10^7 UFC/poço) ou 1mL da suspensão de *E. coli* HS (10^7 UFC/poço). Após 3h, o meio contendo bactérias foi desprezado e as células foram lavadas com PBS por 3 vezes antes de receber meio suplementado ou não com as seguintes concentrações de Ala-Gln: 3, 10 e 30mM. É importante salientar que o meio adicionado às células, após descarte das bactérias continha, além da concentração padrão de penicilina e estreptomicina, 150µg/mL de gentamicina. Todo o procedimento de descarte, lavagens e adição de meio suplementado com antibióticos apresentava como finalidade a neutralização de bactérias viáveis após as 3h de interação célula-bactérias. Duas horas após a lavagem da monocamada de células, alíquotas do meio adicionado foram semeadas em placas de ágar sangue e após 24h de incubação em estufa bacteriológica (37 °C), resultaram em ausência crescimento bacteriano demonstrando a eficiência do processo de remoção e neutralização de bactérias viáveis. Após 12h e 24h os poços foram fotografados e as imagens das células foram analisadas com o *software* Image Pró Plus® (Media Cyberbetics, Estados Unidos).

4.6 Apoptose e necrose

O presente protocolo avaliou a capacidade da cepa EAEC 239-1 em induzir apoptose e/ou necrose nas células epiteliais intestinais, investigando o papel protetor

da Ala-Gln sobre a morte provocada por esta bactéria. Neste protocolo e em todos os protocolos seguintes, foi utilizado Ala-Gln apenas na concentração de 10mM. A escolha de tal concentração deve-se a trabalhos publicados anteriormente (BRAGANETO *et al.*, 2008; CARVALHO, 2011) que relatam melhores efeitos sobre a migração de células epiteliais intestinais com a utilização de Ala-Gln na concentração de 10mM.

Dentre diversas metodologias disponíveis, escolhemos analisar as diferenças morfológicas entre apoptose e necrose através das propriedades de dispersão da luz por meio da técnica de citometria de fluxo (KRYSKO *et al.*, 2008; VAN ENGELAND *et al.*, 1998).

Para cada experimento as células IEC-6 foram coletadas do frasco de cultivo, após confluência aproximada de 95%, por dissociação utilizando uma solução de tripsina 0,05% e 0,02% EDTA (Sigma Aldrich, Estados Unidos) e quantificadas em câmara de Neubauer. Foi preparada uma suspensão contendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/mL. Em cada poço de uma placa de 12 poços foi adicionado 1,0mL da suspensão de células e a placa foi mantida sob incubação no interior de estufa a 37 °C sob uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade durante 48 horas. Após este período, os meios dos poços foram descartados e substituídos por DMEM livre de glutamina contendo EAEC 239-1 (10^7 UFC/mL) ou *E. coli* HS (10^7 UFC/mL). Durante o mesmo período os poços não infectados foram incubados com igual quantidade de DMEM estéril sem glutamina. Após a adição das bactérias, as placas permaneceram por 3h na incubadora e então todos os poços tiveram seus meios descartados e foram lavados três vezes com 1mL de tampão PBS a 37°C.

As células receberam meio DMEM sem glutamina suplementado ou não com Ala-Gln na concentração de 10mM ou meio DMEM padrão com glutamina (4mM). As células foram mantidas em incubação por um período de 24 horas.

Foram realizados três experimentos independentes onde cada grupo era avaliado em triplicata. O sobrenadante de cada grupo (n=3) foi armazenado em um tubo de ensaio mantido sobre gelo enquanto as células do mesmo grupo aguardavam por 3 min na estufa após receberem 150µL de tripsina EDTA. O sobrenadante foi restituído a cada poço para neutralizar a ação da tripsina e facilitar a recuperação das células dissociadas. Após a homogeneização da placa o sobrenadante contendo as células foi aspirado e transferido para tubo de ensaio com tampa. Cada grupo foi transferido para um tubo formando um *pool* de três amostras. Após centrifugação a 450 x g durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao corpo de fundo foi

adicionado 500µL de tampão de ligação (*Binding Buffer*). Após centrifugação (450 x g; 5min), o sobrenadante foi descartado e o mesmo processo de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Após a última lavagem o material foi ressuspenso em 400µL e dividido em dois tubos contendo 200µL. Conforme recomendação de Krysko *et al.* (2007), os primeiros experimentos geraram amostras que foram marcadas para fazer ajustes de compensação no equipamento: amostras controle marcadas apenas com iodeto de propídio, apenas com Anexina V ou amostras sem qualquer marcação foram processadas diversas vezes antes do processamento normal das amostras teste. As informações obtidas com o processamento das amostras controle foram armazenadas na memória do computador acoplado ao equipamento e utilizadas para posterior reanálise e coleta de dados das amostras teste subsequentes. Para marcar todas as amostras controles e amostras teste foi utilizado o *kit* RC-ANXF-T100 APOPTOSIS ASSAY (EXBIO, República Theca). Para as amostras teste o primeiro tubo não recebia marcação e o segundo tubo recebia 5µL de iodeto de propídeo e 5µL de anexina V. Imediatamente após a adição dos marcadores todos os tubos foram incubados sob temperatura ambiente (22-25 °C) e ao abrigo da luz durante 15 minutos. As leituras foram realizadas imediatamente após a incubação como os marcadores. Em cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos utilizando CellQuest® software presente no citômetro FACS Calibur (Becton Dickison, Estados Unidos).

4.7 Quantificação de citocinas

4.7.1 Obtenção e preparo das amostras

Para a detecção e quantificação das citocinas envolvidas na ação lesiva intestinal por EAEC sobre a barreira funcional intestinal e a ação da Ala-Gln 10mM sobre células epiteliais não infectadas e sobre o dano provocado pela infecção com EAEC, foi utilizado o kit Bio-Plex Rat Cytokine 9 -plex 1X (Bio-Rad, Estados Unidos) que possibilitou a análise simultânea dos mediadores IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , GM-CSF, IFN- γ , IL-5, IL-2, IL-6 e IL-10.

Para este estudo foi realizado o mesmo protocolo descrito para os ensaios de migração celular. Os mediadores foram quantificados no sobrenadante das células, colhidos em intervalos pré-determinados. Os tempos de coleta do material foram: (1) ao término do período de infecção, ou seja, 3h após a adição das bactérias; (2) 6h após a neutralização das bactérias e adição do dipeptídeo; (3) 12h após a adição do dipeptídeo. Em cada tempo mencionado uma alíquota de 80 µL de cada poço era colhida. Em cada experimento os sobrenadantes dos poços de um mesmo grupo eram reunidos em um só tubo formando um *pool*. Foram analisados três experimentos o que perfaz um total de nove poços por cada grupo. Após a coleta do material, este era imediatamente congelado e mantido em câmara de congelamento a -80 °C.

4.7.2 Marcações com sondas específicas

Os anticorpos específicos foram ligados covalentemente à microesferas carboxiladas contendo distintos fluorocromos, utilizando método descrito por Fulton e colaboradores (1997). Resumidamente, cada anticorpo marcado foi covalentemente ligado a $2,5 \times 10^7$ microesferas carboxiladas e ativados por 20 minutos em uma solução de 18µL de fosfato de sódio monobásico pH 6.3 (100nM) contendo 500ug de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (EDC - Pierce Chemical, Rockford, IL) e 500ug de N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS - Pierce Chemical, Estados Unidos). As microesferas ativadas forão lavadas duas vezes com PBS, pH 7,4 e resuspendidas em 500µL de PBS contendo 125µg de anticorpos marcados. Toda a solução foi incubada em temperatura ambiente (25 °C) por 2 horas com homogeneização. Ao término da incubação, microesferas marcadas conjugadas aos anticorpos foram lavadas com PBS-TBN (PBS, pH 7,4, 0.02% Tween-20, 0.1% albumina sérica bovina-BSA e 0.05% azida sódica) e estocadas em temperatura de 2 a 8 °C na ausência de luz.

4.7.3 Hibridização

No processo de hibridização, 50µL da solução contendo anticorpos marcados conjugados às microesferas foi adicionada a 50µL do sobrenadante das células

imediatamente após o rápido descongelamento destas. Essa mistura foi aplicada em uma microplaca com filtro e incubada por 1 hora. Após a incubação, as amostras foram lavadas 2 vezes por filtração e ressuspensas em 50µL de PBS-BSA. Em seguida, 50µL de uma solução para detecção de anticorpos (4µg/mL), fornecido no próprio kit, foi adicionada e a mistura foi novamente submetida a um novo ciclo de incubação por 1 hora e 2 lavagens por filtração e solubilização em 50µL de PBS-BSA. Um volume de 50µL de streptavidina-R-ficoeritrina (4µg/mL) foi adicionado à solução e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Finalmente, as amostras foram lavadas duas vezes, ressuspensas em 100µL de PBS-BSA e levadas à leitura pelo equipamento Bio-Plex 200 (Bio-Rad, Hercules, CA). Os padrões necessários para a construção da curva padrão que possibilitará a quantificação dos mediadores investigados foram diluídos em PBS-BSA de acordo com as especificações do fabricante do kit *Bio-Plex Rat Cytokine 9 -plex 1X* (Bio-Rad, Estados Unidos).

4.8 Proliferação celular

Ao atingir confluência, as células IEC-6 foram coletadas e semeadas em placas de 96 poços (de $2,5 \times 10^4$ células/poço) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Após 24h, as células foram infectadas ou não com 100µL de uma suspensão de EAEC (10^6 UFC/mL) ou *E. coli* HS (10^6 UFC/mL) por 3h e lavadas 3 vezes com tampão PBS. Em seguida foram incubadas com meio DMEM padrão (4mM de glutamina), meio DMEM sem glutamina ou suplementado com Ala-Gln 10mM. Após 24h de incubação, o meio dos poços foram semeados em Ágar e incubados por 24h em estufa bacteriológica para verificar a presença de bactérias viáveis. Todos os poços foram lavados com tampão PBS e receberam 100 µL de meio DMEM sem glutamina e 10µL do reagente WST-1 (Roche Applied Science, Estados Unidos) permaneceram por 2h na estufa antes da leitura da absorbância em 450nm/620nm.

A utilização de sais de tetrazolium é um método bem estabelecido para a determinação de células viáveis e na proliferação celular em estudos de citotoxicidade. Tal ensaio é baseado na clivagem do sal de tetrazolium para formar um corante insolúvel (SYLVESTER, 2011). Como os demais sais de tetrazolium, WST-1 reage com a enzima mitocondrial succinato redutase e forma o corante

púrpura formazan que, sendo impermeável à membrana celular, acumula-se apenas no interior de células saudáveis, sendo liberado em células inviáveis (NGAMWONGSATI *et al.*, 2008). Logo, quanto maior for a quantidade de células viáveis, menor será a concentração do formazan no meio. Dessa forma, quanto maior for a absorbância do meio, maior será a quantidade de células viáveis presentes, podendo a leitura da absorbância ser utilizada como uma estimativa indireta da proliferação celular.

4.9 Análise da transcrição gênica

4.9.1 Extração do RNA total

Para análise da transcrição do mRNA as amostras foram preparadas conforme o procedimento descrito item 5.5, mas coletadas nos seguintes tempos: após término das 3h de infecção (0h) e 6h e 12h após a adição de Ala-Gln 10mM. Antes da coleta, os poços foram lavados 1 vez com tampão PBS e então as células foram removidas mecanicamente com auxílio de espátula plástica adequada. O material dos poços de cada grupo foi transferido para um único tubo de centrifugação, formando *pool* de três amostras para cada grupo. O material foi centrifugado a 5000 x g por 5 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. As células resultantes foram armazenadas em câmara de congelamento a -80 °C até o momento da extração do RNA.

O RNA total foi extraído de cada amostra utilizando o Kit RNeasy® Mini (Qiagen, Estados Unidos) seguindo as instruções do fabricante. De acordo com o procedimento, as células foram lisadas em tampão de lise contendo β-mercaptoetanol 10% (v/v). Ao término da extração, uma alíquota de 1µL do RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria com o equipamento Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) para fins da verificação da qualidade do RNA extraído e para a determinação da quantidade necessária para a construção do DNA complementar (cDNA).

4.9.2 Transcrição reversa (RT)

Como mostra a tabela 1, foram avaliados os níveis de mRNA de quatro genes relacionados com o processo migratório (RhoA, Rac1 e CDC42), e de genes envolvidos no processo inflamatório (NF- κ B p65, TRL5, IL-8), além do gene de referência (YWHAZ) . O cDNA foi sintetizado utilizando 1 μ g do RNA total de cada amostra. Cada amostra foi incubada com a enzima transcriptase reversa iScript™ (BioRad, Estados Unidos) e com água Milli-Q completando para volume total final de 20 μ L por reação. As condições para construção do cDNA foram: 25°C por 5 min; 42°C por 30 min., seguidos de um ciclo final de 85°C por 5 min. O cDNA sintetizado foi mantido em um freezer a -20 °C até sua amplificação por uma reação em cadeia de polimerase em tempo real (Real Time-PCR).

4.9.3 PCR em tempo real (Real Time-PCR, RT-qPCR)

Os iniciadores de DNA (*primers*) de todos os genes foram desenhados através do *software* gratuito disponibilizado *on line* no endereço eletrônico (<https://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>) de acordo com as bases de sequência de mRNA fornecidas pelo banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) sob o endereço eletrônico (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando a ferramenta *Nucleotide Blast*.

As reações em qPCR foram realizadas contendo 12,5 μ L iQ Supermix™ (Bio-Rad, Estados Unidos) (tampão padrão para a amplificação com os seguintes reagentes DNA-polimerase, dNTPs, e tampão de solução salina em concentrações ótimas para PCR em tempo real), 2 μ L de cada primer senso e anti-senso primers e 2 μ L de cDNA das amostras e água livre de nuclease para um volume final de 25 μ L. Amostras negativas também foram testadas, onde o cDNA era substituído por água Mili-Q autoclavada. A sequencias senso e antisenso de nucleotídeos e as condições da PCR de cada gene avaliado são descritas na tabela 1.

A expressão dos genes avaliados foi determinada por meio do sistema de detecção em tempo real iQ5 Real-Time PCR Detection System™ (Bio-Rad, Estados Unidos). A captação de fluorescência ocorreu a cada ciclo na fase de extensão. A reação ocorreu com ciclagens pré-determinadas; um ciclo inicial de 95 °C por 3

minutos seguido de amplificação em 40 ciclos, contendo período de desnaturação a 95 °C por 20 segundos; anelamento a 63 °C por 20 segundos; e extensão de 72 °C por 45 segundos. Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de melting, realizada para assegurar especificidade da amplificação e evitar a formação de dímeros de primer ou qualquer outro produto inespecífico.

Para fins de melhor visualização, a execução das diversas metodologias e protocolos de análise ao longo do tempo dos experimentos estão representados esquematicamente numa linha temporal, como mostra a figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática da cronologia (linha do tempo) dos procedimentos experimentais utilizadas no presente estudo.

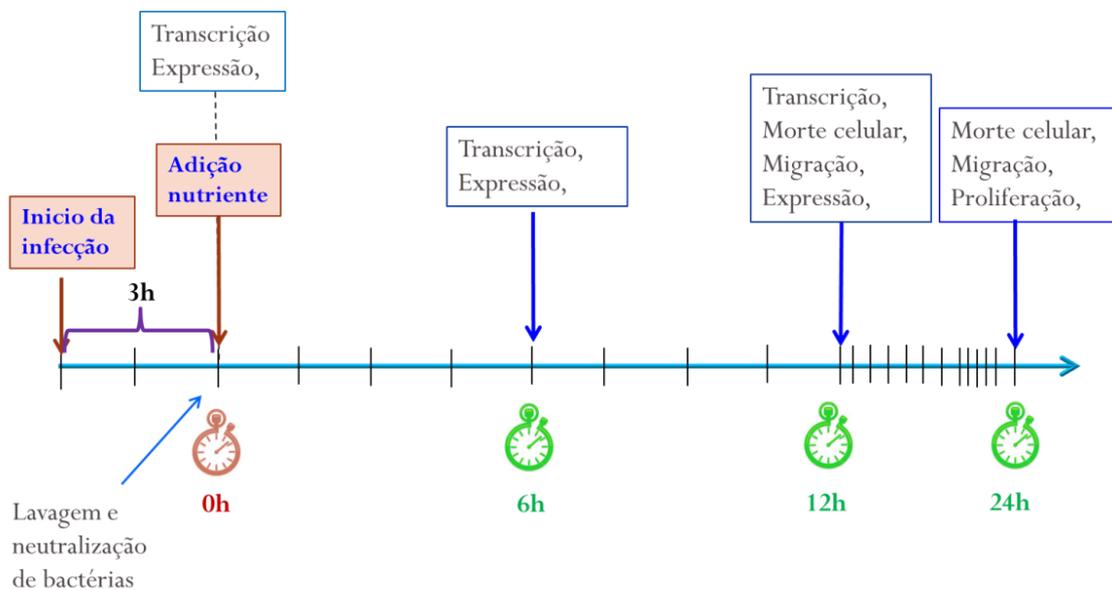


Tabela 1 - Sequencias de *primers* e condições de PCR para os genes avaliados

Gene	Primer Senso	Primer Antisenso	Nº Genbank	Condições da PCR (40 ciclos)	Referências
RhoA	TGGTGATGGAGCTTGTGGTAAG	AACATCAGTGTCTGGGTAGGAG	NM_057132. 3	95°C-20'' 58,5°C-20'' 72°C-45''	LEI <i>et al.</i> , 2010
Rac1	CAGCTGGACAGGAAGATTATGAC	CCACTAGGATGATGGGAGTATT G	NM_134366. 1	95°C-20'' 61°C-20'' 72°C-45''	LEI <i>et al.</i> , 2010
YWHA Z	GCTACTTGGCTGAGGTTGCT	TGCTGTGACTGGTCCACAAT	NM_013011. 3	95°C-20'' 60°C-20'' 72°C-45''	95°C-20'' 60°C-20'' 72°C-45''
NF-kB p65	ACGATCTGTTTCCCCTCATC	TGCTTCTCTCCCCAGGAATA	AF079314.1	58,5° C-20'' 61°C-20'' 72°C-45''	ZHU <i>et al.</i> , 2008
IL-8	GATGGCGTCTGTCTGGTGAA	GATGAAACGCATCCACATCG	NM_030845. 1	61°C-20'' 61°C-20'' 72°C-45''	HUANG <i>et al.</i> , 2011
TLR5	CCAACATCCAGGCAGCTGT	GCCTTCAGGTATGCCAGAG	NM_001145 828.1	95°C-20'' 61°C-20'' 72°C-45''	HUANG <i>et al.</i> , 2011
Cdc42	GCTTGTCGGGACCCAAATTG	ACACCTGCGGCTCTTCTTCG	NM_171994. 4	95°C-20'' 61°C-20'' 72°C-45''	LEI <i>et al.</i> , 2010

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: a desnaturação inicial de 95 °C por 3 minutos foi aplicada a todos *primers*

4.10 Análise estatística

Com exceção dos resultados obtidos na análise da transcrição gênica, todos demais resultados obtidos foram processados com *software* Graphpad Prism® 5.0 (Graphpad Software Inc., Estados Unidos) e os resultados são expressos ao longo do texto e em gráficos como média \pm erro padrão da média (EPM). O teste T de Student não pareado foi utilizado para verificar se as diferenças entre os grupos eram significantes, para tanto foi considerado como significativo todo $p < 0,05$.

Já a análise da amplificação gênica foi feita por meio de quantificação relativa através do *threshold cycle* (Ct) obtido nas amostras testes em relação ao Ct da amostra controle. O Ct representa primeiro ciclo completo de amplificação onde o amplicon de DNA foi detectado acima da linha basal de expressão (PFAFFL, 2001).

Um modelo matemático proposto por Pfaffl (2001) foi utilizado para determinar a quantificação relativa do gene alvo em comparação com o gene de referência. A expressão relativa (r) do gene alvo é calculada baseada na eficiência de uma amostra desconhecida contra a amostra controle. O valor do gene alvo é, então, expresso em comparação com o gene de referência utilizado (PFAFFL, 2001).

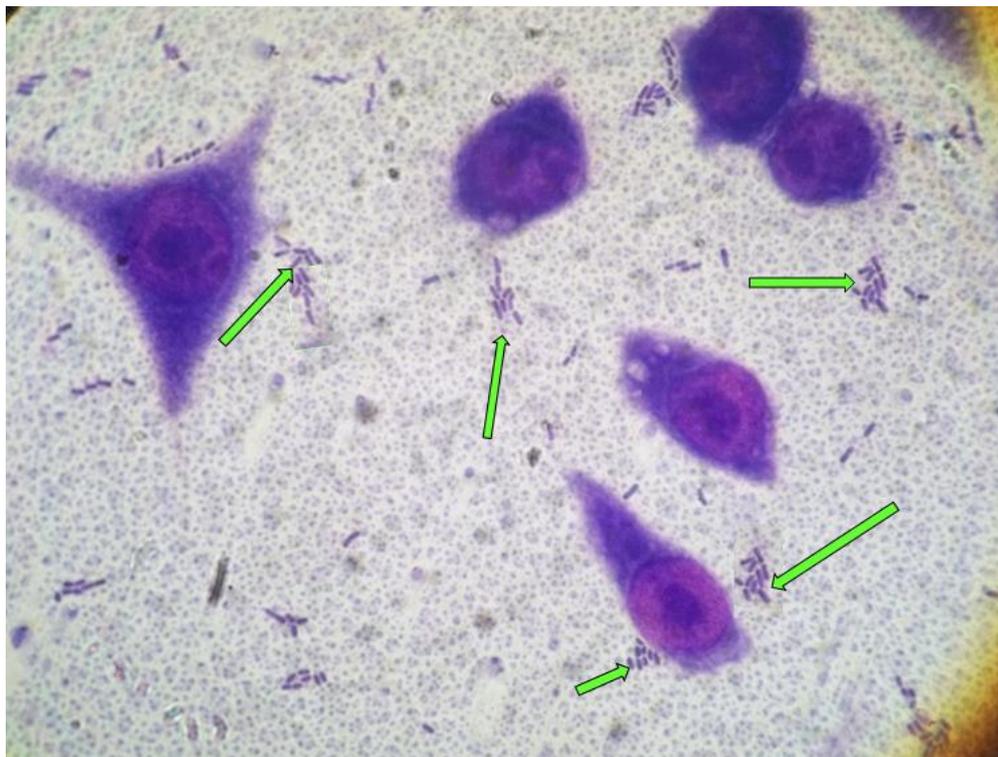
A significância entre os grupos foi calculada através da utilização *software* REST- *Relative Expression Software Tool* versão 2.0.13 (Qiagen, Estados Unidos). O *software* compara dois grupos (controle e tratado) e calcula a taxa de expressão relativa entre eles através da randomização entre todos os pontos gerados (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLÉ, 2002). É considerado significativo todo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

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

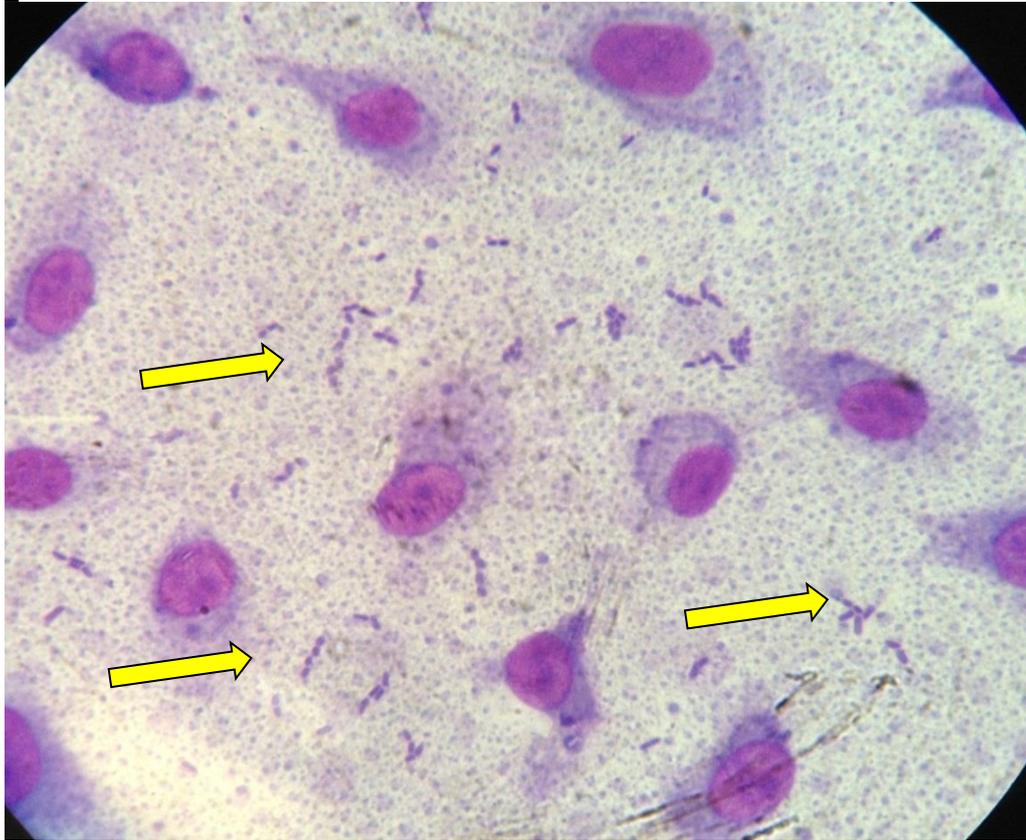
Os resultados obtidos com o ensaio de aderência confirmam o padrão enteroagregativo para a cepa EAEC 239-1. Como mostrado na figura 2, as setas indicam a agregação de bacilos em diversos pontos da superfície de vidro em formações que lembram “tijolos empilhados”. O resultado do ensaio do padrão de aderência para *E. coli* HS confirmam a ausência do padrão AA (Figura 3).

Figura 2 - Resultado do ensaio de padrão de aderência com EAEC 239-1 realizado em células Hep-2 e coradas com May-Grunwald-Giemsa. As setas verdes apontam para agregados bacterianos aderidos a superfície. Aumento 1000x



Fonte: dados da pesquisa

Figura 3 - Resultado do ensaio do padrão de aderência com *Escherichia coli* HS em células Hep-2 e coradas com May-Grunwald-Giemsa. As setas apontam para bactérias aderidas a superfície. Aumento 1000x



Fonte: dados do estudo

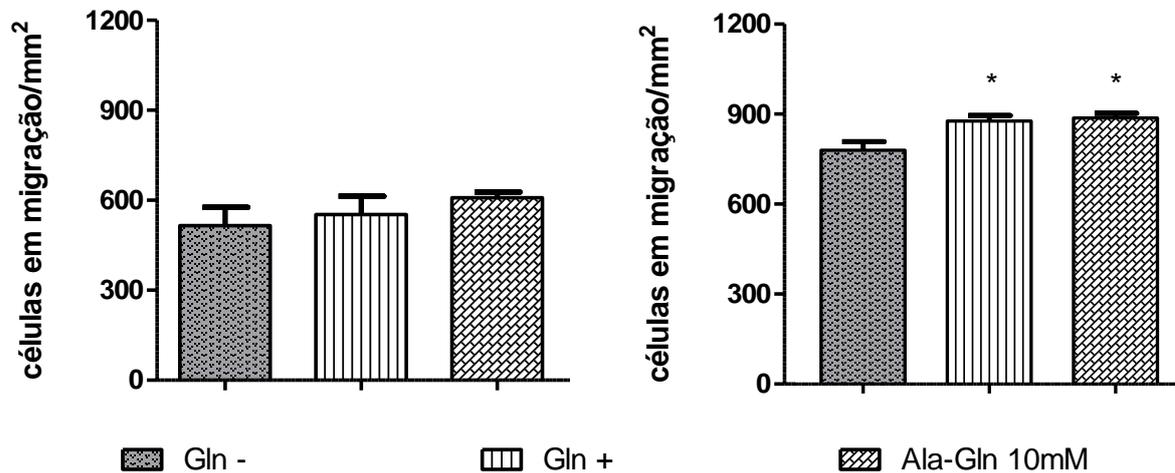
5.2 Efeito da suplementação da Alanil-Glutamina sobre monocamada de células epiteliais intestinais

5.2.1 Migração celular

Conforme exibido no gráfico 3, a análise da migração no tempo de 12h não mostrou quaisquer diferenças entre os grupos Ala-Gln 10mM ($608,9 \pm 18,3$ células/mm²), glutamina positiva ($552,2 \pm 61,3$ células/mm²) e controle sem glutamina ($515,4 \pm 60,7$ células/mm²).

No tempo de 24h, Ala-Gln 10mM ($958,9 \pm 16,7$ células/mm²) e glutamina positiva ($947,8 \pm 19,9$ células/mm²) exibiram diferenças significativas em relação ao grupo controle sem glutamina ($842,2 \pm 31,3$ células/mm²). Comparados entre si, glutamina e Ala-Gln 10mM não apresentaram diferenças, como mostra o gráfico 3.

Gráfico 3 - Migração de células IEC-6 não-infectadas avaliadas em 12 (A) e 24h (B) após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM.



* Significativo em relação a Gln -

5.2.2 Transcrição de genes relacionados à migração celular

Em 6h após adição de meio com glutamina (4mM) ou Ala-Gln 10mM, não foi verificada diferenças destes grupos em relação ao controle glutamina negativa no que diz respeito a expressão relativa do mRNA do gene Rac1. Decorrido o tempo de 12h, os mesmo grupos continuaram sem diferenças na expressão do mRNA do mesmo gene como mostra o gráfico 4. O gráfico 5 também mostra que ausência de significância foi verificada nas análises da transcrição de RhoA entre os três grupos avaliados no período de 6 e 12h. A transcrição de Cdc42 no tempo de 6h não mostrou diferenças entre os grupos. Contudo no tempo de 12h, glutamina positiva exibiu aumento da expressão de mRNA de Cdc42.

Gráfico 4 - Transcrição relativa do gene Rac1 em relação ao controle glutamina negativa realizado em células IEC-6 em 6h (A) e 12h (B) após adição de Alanil-Glutamina 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM.

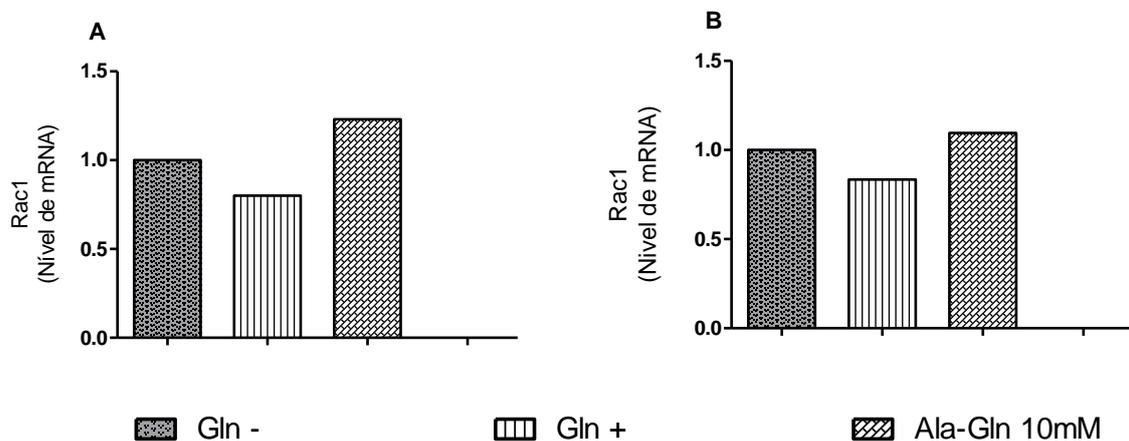


Gráfico 5 – Transcrição relativa do gene RhoA em relação ao controle glutamina negativa realizado em células IEC-6 não-infectadas 6h (A) e 12h (B) após adição de Alanil-Glutamina 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM.

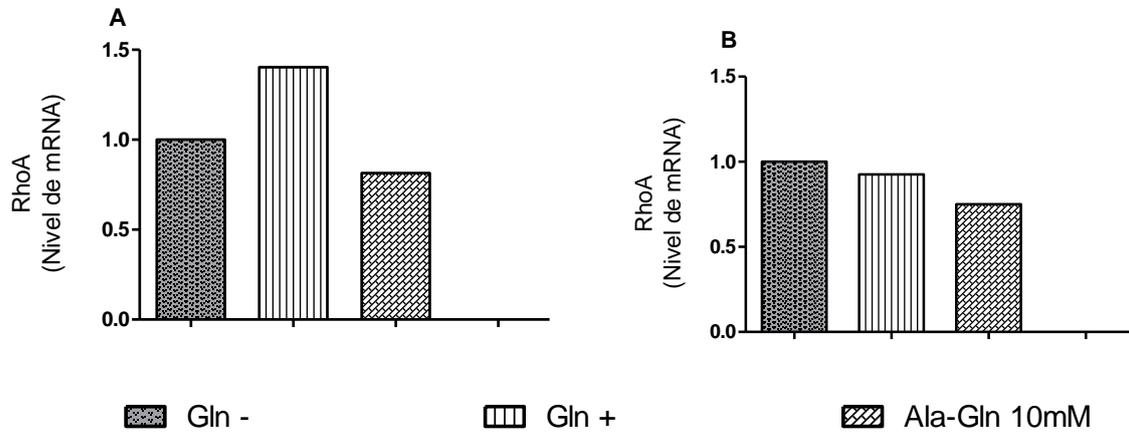
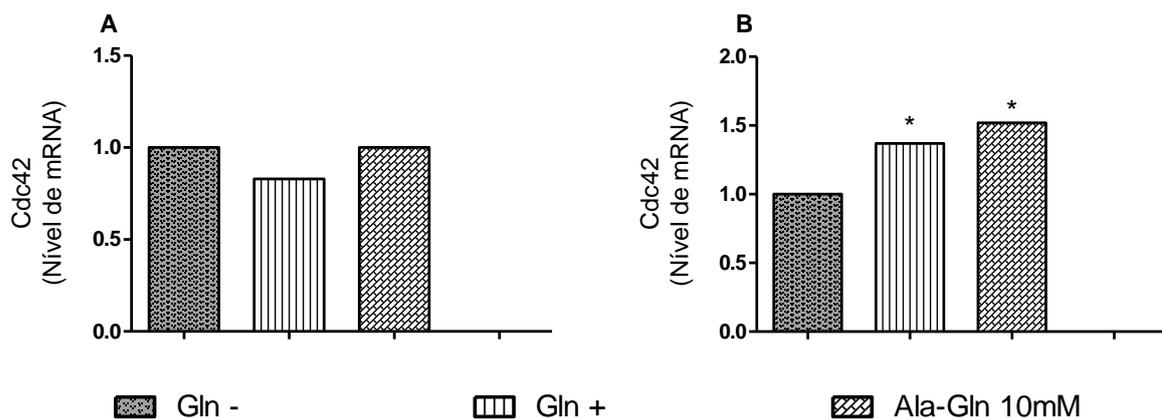


Gráfico 6 - Transcrição relativa de Cdc42 em relação ao controle glutamina negativa realizado em células IEC-6 não-infectadas 6h (A) e 12h (B) após adição de Alanil-Glutamina 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM



* Significativo em relação a Gln -

* Significativo em relação a Gln -

5.2.3 Morte celular

Como mostrado no gráfico 7, a análise de morte celular realizada no tempo de 24h revelou que o percentil de células em apoptose no grupo que recebeu Ala-Gln 10mM ($1,77\pm 0,02$) não diferiu quando comparado ao controle sem glutamina ($1,19\pm 0,22$). A avaliação da quantificação de células em necrose exibiu resultado semelhante, onde o grupos sem glutamina ($8,22 \pm 0,65$) ou suplementado com Ala-Gln 10mM ($9,2\pm 0,9$), não exibiram quaisquer diferenças entre si (gráfico 8).

Gráfico 7 - Percentual de apoptose medida em células IEC-6 não-infectadas 24h após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM.

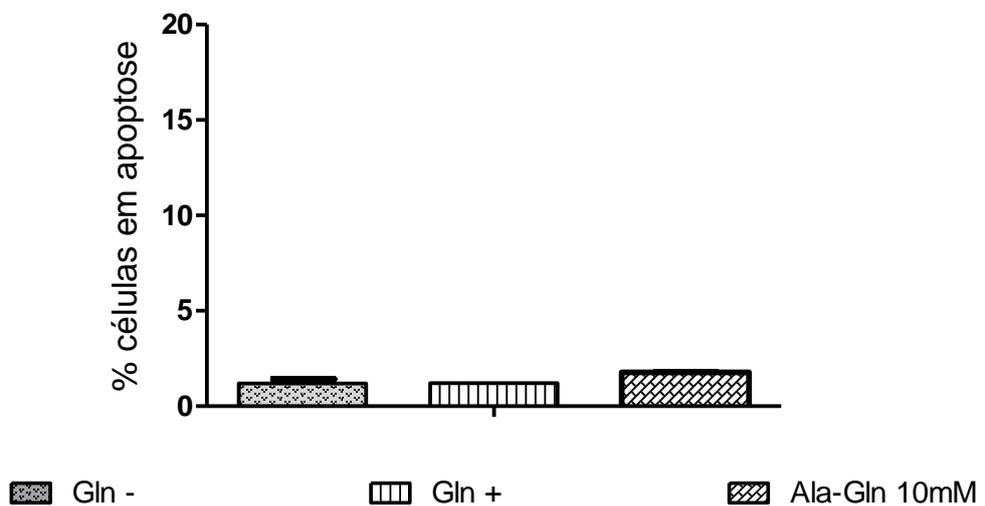
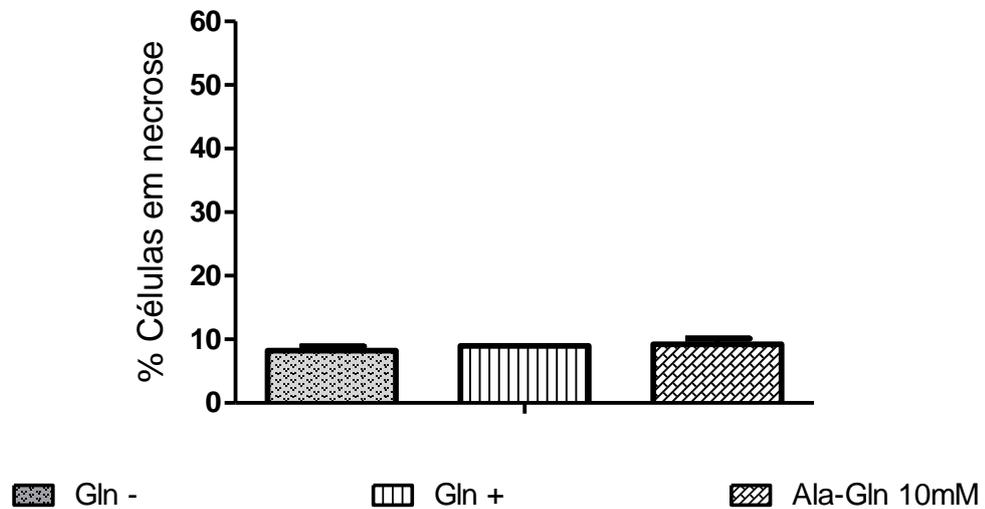


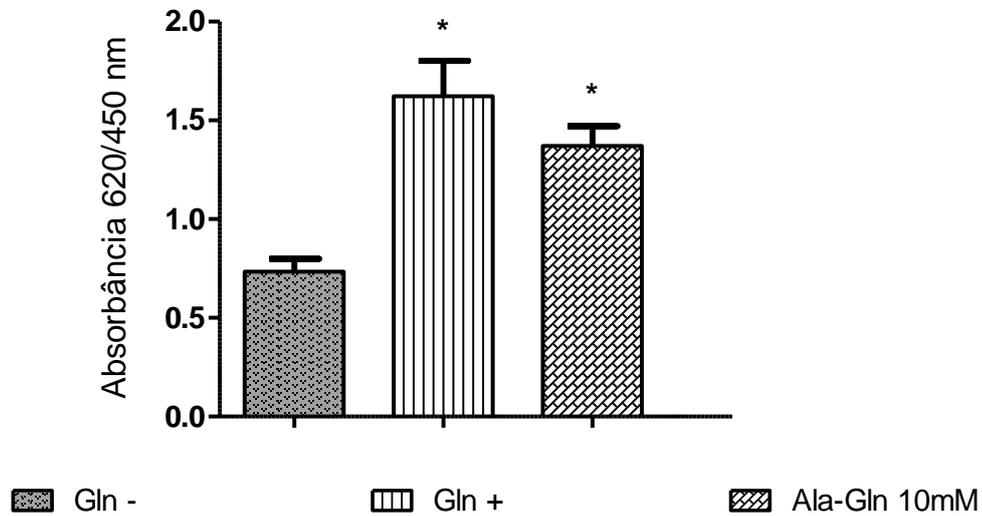
Gráfico 8 - Percentual de necrose medida em células IEC-6 não-infectadas 24h após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM.



5.2.4 Proliferação celular

Como mostrado no gráfico 9, em 24h o valor de absorbância nos grupos que receberam meio padrão com glutamina ($1,62 \pm 0,18$) ou suplementado com Ala-Gln 10mM ($1,28 \pm 0,10$) foi significativamente superior ao grupo que recebeu meio sem glutamina ($0,73 \pm 0,006$). Quando comparados entre si, Ala-Gln 10mM e meio padrão com glutamina (4mM) não exibiram diferença.

Gráfico 9 - Proliferação celular realizada 24h após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina em células IEC-6 não-infectadas.



* Significativo em relação a Gln -

5.2.5 Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório

A incubação por 6h com Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina (4mM) demonstrou ser capaz de reduzir a transcrição de NF- κ B, mesmo em ausência de infecção em qualquer um dos grupos avaliados. Em 12h não foi verificada diferença da expressão do gene de NF- κ B como evidencia o gráfico 10.

Apesar das diferenças observadas na transcrição gênica de IL-8 entre os grupo sem glutamina, meio padrão com glutamina ou meio suplementado com Ala-Gln 10mM, as mesmas não foram significantes nos tempos de 6 ou 12h conforme mostra o gráfico 11.

Como mostra o gráfico 12, não foram evidenciadas diferenças na transcrição de TLR5 entre os três grupos avaliados nos períodos de 6 e 12h

Gráfico 10 - Transcrição relativa de NF- κ B em relação ao controle glutamina negativa realizado em células IEC-6 não-infectadas 6h (A) e 12h (B) após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM.

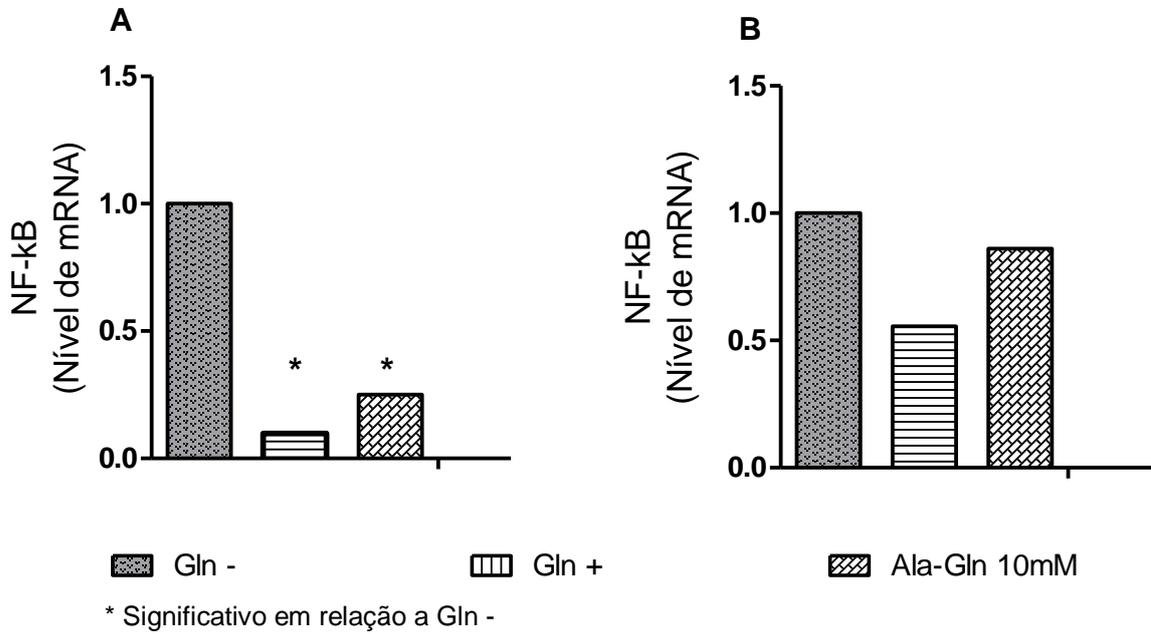


Gráfico 11 - Transcrição relativa de IL-8 em relação ao controle glutamina negativa realizado em células IEC-6 não-infectadas 6h (A) e 12h (B) após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM.

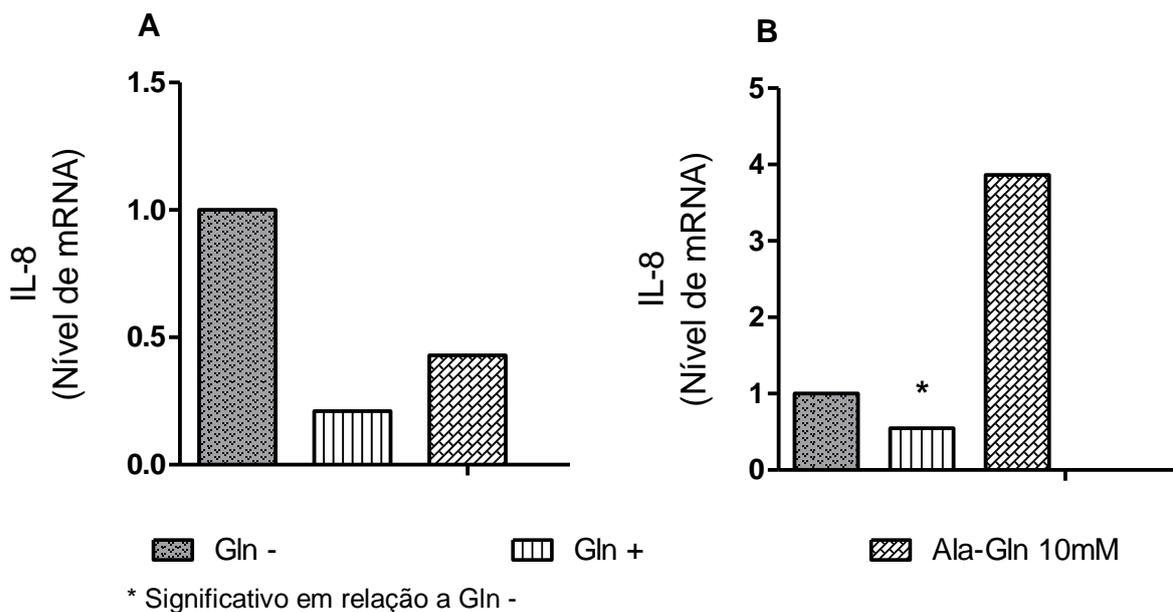
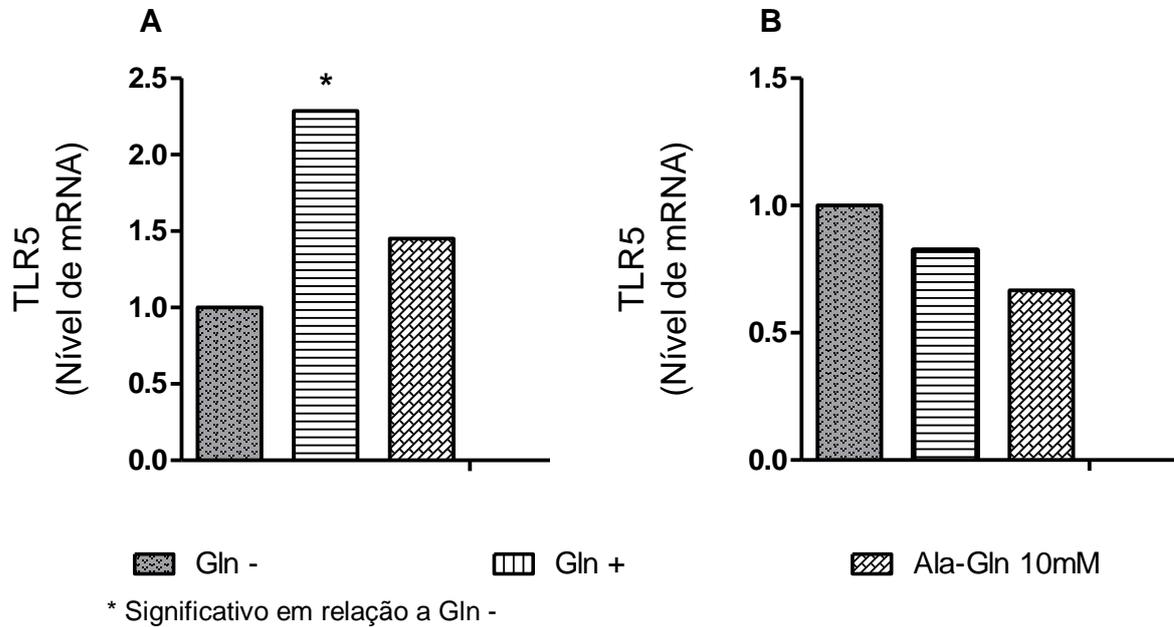


Gráfico 12 - Transcrição relativa de TLR5 em relação ao controle glutamina negativa realizado em células IEC-6 não-infectadas 6h (A) e 12h (B) após adição de Ala-Gln 10mM ou meio padrão com glutamina 4mM.



5.2.6 Quantificação de citocinas

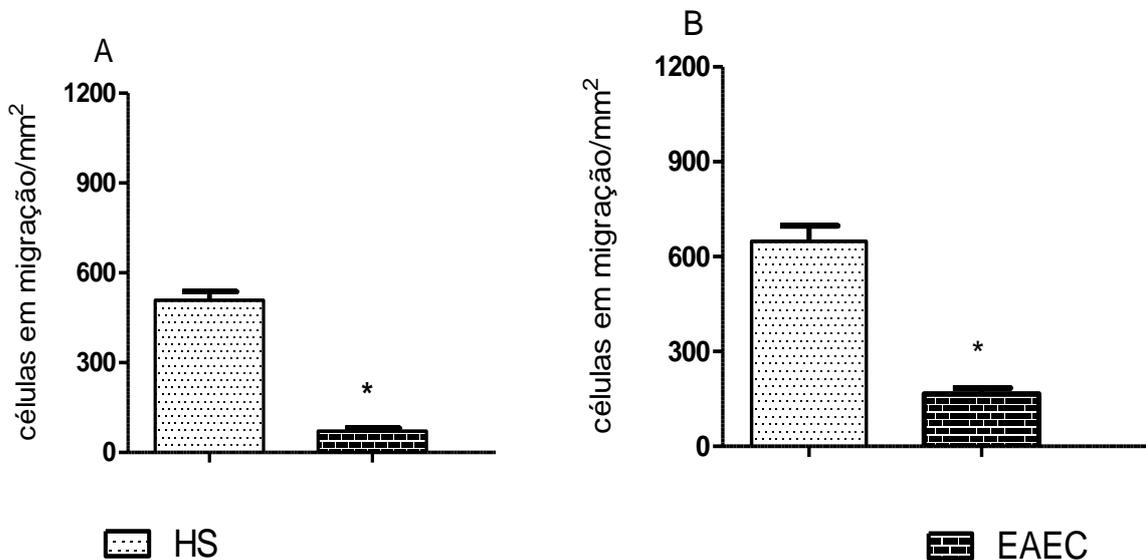
Os grupos não infectados expressarão valores de citocinas abaixo dos limites de linearidade dos analitos avaliados. Por tal motivo, estes resultados não foram aqui apresentados.

5.3 Efeitos da infecção da EAEC e *E. coli* HS sobre monocamada de células epiteliais intestinais

5.3.1 Migração celular

Em 12h o número de células em migração na monocamada infectada com EAEC ($71,43 \pm 10,6$ células/mm²) foi significativamente menor quando comparado ao grupo infectado com *E. coli* HS ($508,9 \pm 28,9$ células/mm²). Efeitos semelhantes foram observados na análise realizada em 24h, onde a quantidade de células em migração no grupo EAEC ($165,6 \pm 19,2$ células/mm²) foi notoriamente reduzida quando comparada ao número de células em migração do grupo infectado com *E. coli* HS ($648,9 \pm 48,2$ células/mm²), como mostra o gráfico 13.

Gráfico 13 - Migração de células IEC-6 em 12h (A) e 24h (B) após infecção com EAEC ou *E. coli* HS.

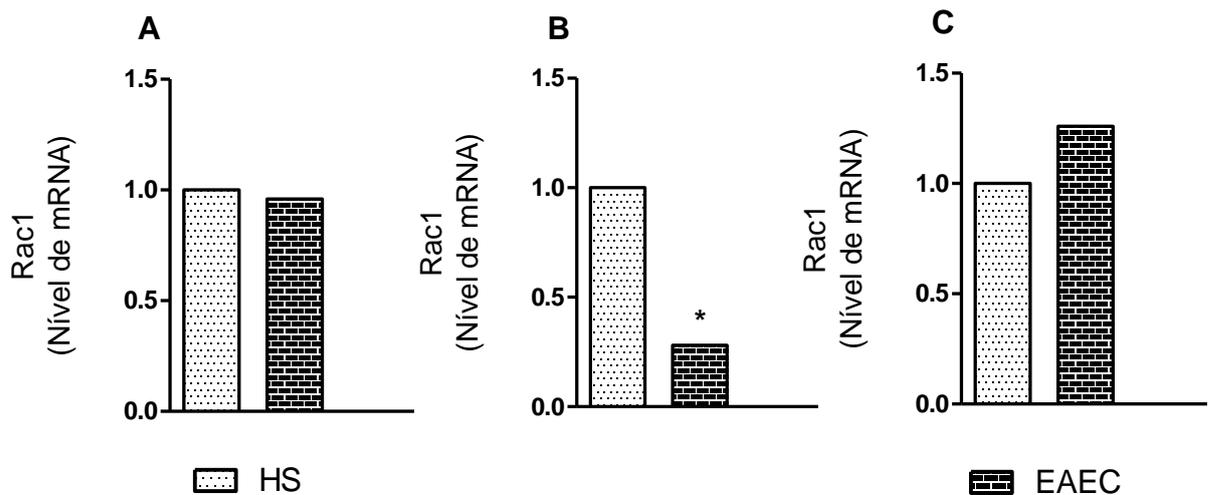


* significante em relação à HS

5.3.2 Transcrição de genes relacionados com migração celular

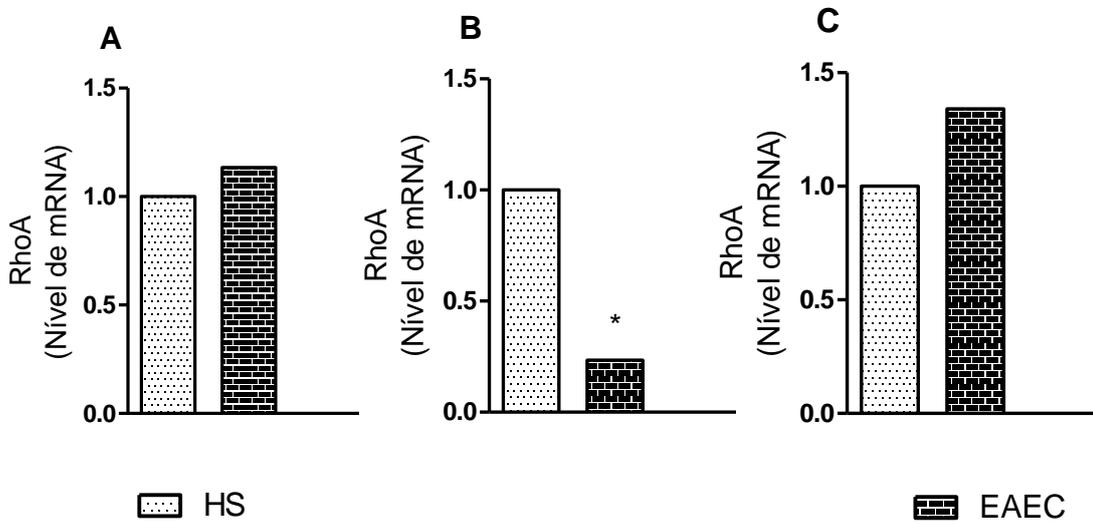
Os gráficos 14, 15 e 16 mostram resultados semelhantes para a transcrição do mRNA de Rac1, RhoA e Cdc42 em células infectadas com *E. coli* HS ou EAEC. Em todos eles não se verificou alterações significantes na transcrição dos genes avaliados, considerando a análise feita após término das três horas de infecção e após 12h da lavagem das bactérias. Contudo, os três genes avaliados exibiram diminuições significantes de suas transcrições após 6h de contato com EAEC.

Gráfico 14 - Transcrição gênica relativa de Rac1 em células IEC-6 após três horas de infecção com *E. coli* HS ou EAEC(A) e após 6h (B) ou 12h (C).



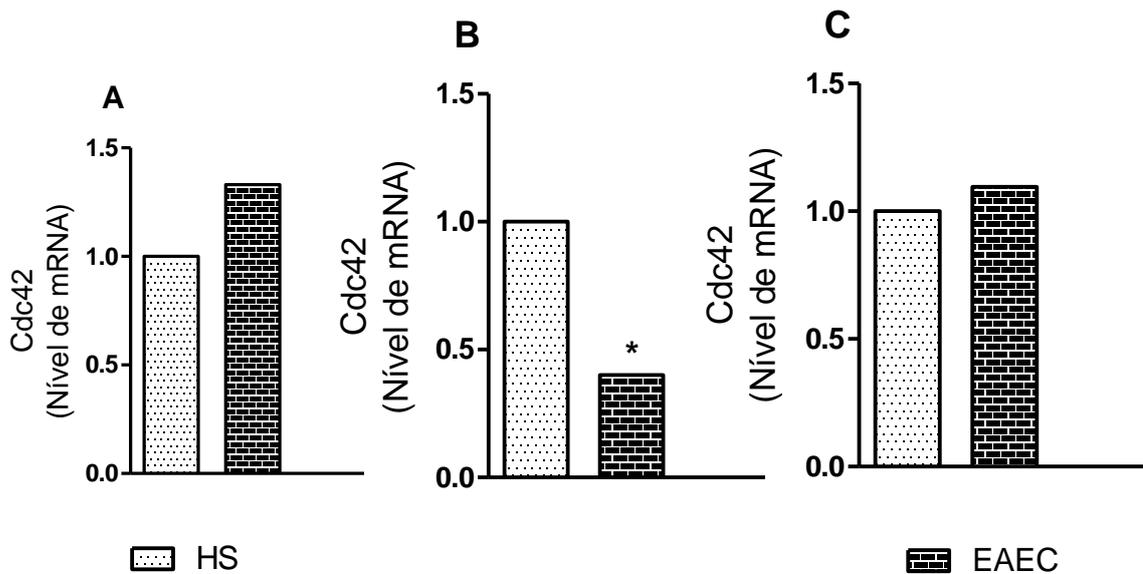
* significante em relação à HS

Gráfico 15 – Transcrição relativa de RhoA em células IEC-6 (A) após três horas de infecção com *E. coli* HS ou EAEC e após 6h (B) ou 12h (C).



* significativa em relação à HS

Gráfico 16 - Transcrição relativa de Cdc42 em células IEC-6 (A) após três horas de infecção com *E. coli* HS ou EAEC e após 6h (B) ou 12h (C).



* significativa em relação à HS

5.3.3 Morte celular

Em 24h não foi observada diferença importante entre o índice de apoptose causado pela infecção com EAEC e a apoptose induzida por *E. coli* HS (gráfico 17). Entretanto o efeito sobre necrose é notável. Em 24h foi verificado que o índice de necrose proporcionado por EAEC ($39,70 \pm 8,51$) foi significativamente maior que a necrose induzida por *E. coli* HS ($12,2 \pm 0,9$) como mostra o gráfico 18.

Gráfico 17 - Percentual de apoptose em células IEC-6 medida 24h após infecção com EAEC ou *E. coli* HS.

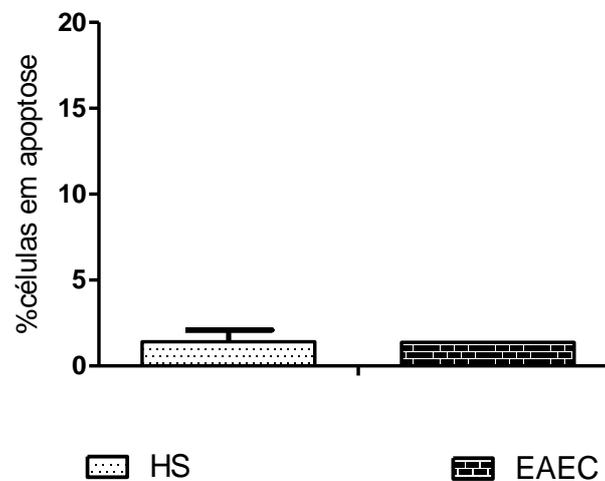
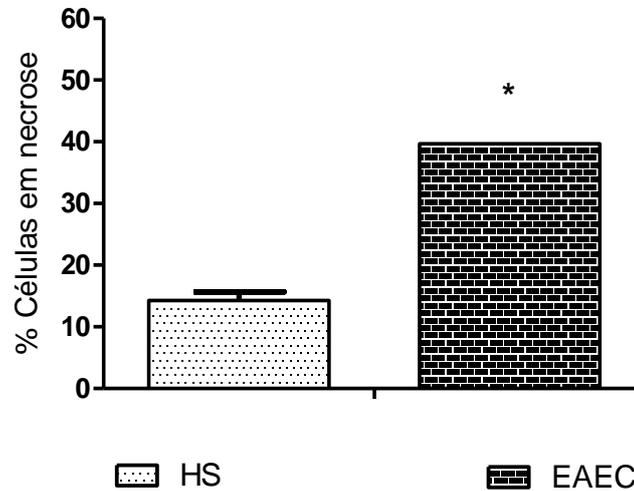


Gráfico 18 - Percentual de necrose em células IEC-6 medida 24h após infecção com EAEC ou *E. coli* HS.

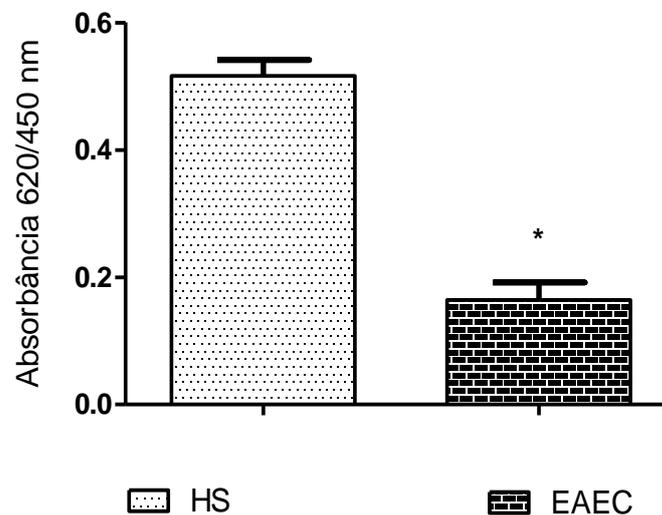


* Significativo em relação a HS

5.3.4 Proliferação celular

A capacidade da cepa EAEC em reduzir a proliferação da monocamada de células epiteliais é evidenciada no gráfico 19. No referido gráfico, a proliferação entre as células do grupo infectado com EAEC ($0,16 \pm 0,03$) foi significativamente inferior à proliferação do grupo infectado com *E. coli* HS ($0,51 \pm 0,02$).

Gráfico 19 - Proliferação celular medida 24h após infecção de células IEC-6 com EAEC ou *E. coli* HS.



* Significativo em relação à HS

5.3.5 Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório

Ao término do período de infecção, os grupos infectados exibiram grandes aumentos na expressão do mRNA de IL-8 quando comparados ao grupo não infectado (tabela 2). Contudo, o aumento nos níveis de expressão do mRNA de IL-8 é pronunciadamente maior na infecção causada por *E. coli* HS, como mostrado no gráfico 20 e na tabela 5. Em 6h após a infecção, a transcrição de IL-8 no grupo infectado com *E. coli* HS continuou significativamente alto e, em 12h, é o grupo infectado com EAEC que exibe valor significativamente maior para transcrição de IL-8, como mostra o gráfico 20 e as tabelas 3 e 4.

A tabela 2 também mostra que o nível de transcrição de NF- κ B após infecção, foi significativamente mais alto no dois grupos infectados com EAEC ou *E. coli* HS que

no grupo não-infectado. Já o gráfico 21 mostra que, apesar do aumento significativo da transcrição de NF- κ B nos grupos infectados, o aumento deste não foi diferente entre os dois grupos avaliados logo após a infecção. Entretanto em 6h, verificou-se que a transcrição relativa de NF- κ B foi menor no grupo infectado com EAEC (gráfico 21).

A tabela 2 mostra ainda que não houve diferenças na transcrição de TLR5 entre grupo não infectado e grupos infectados após o termino do período de infecção. Seguidamente o gráfico 22 apesar da ausência da diferença de transcrição de TLR5 entre os grupos após o termino da infecção, houve grande diferença na transcrição do gene deste receptor em 6h e 12h após infecção. Nos dois períodos é possível verificar que a cepa EAEC reduziu o nível de expressão de mRNA de TLR5 de forma significativa em relação a *E. coli* HS.

Gráfico 20 – Transcrição relativa de IL-8 em células IEC-6 após infecção (A) com *E. coli* HS ou EAEC, 6h (B) ou 12h (C).

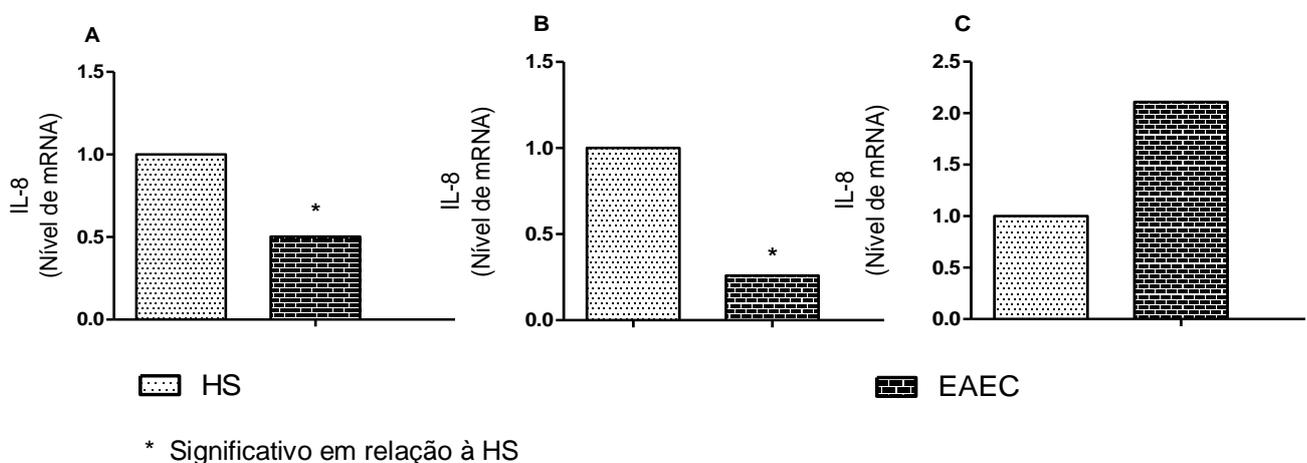
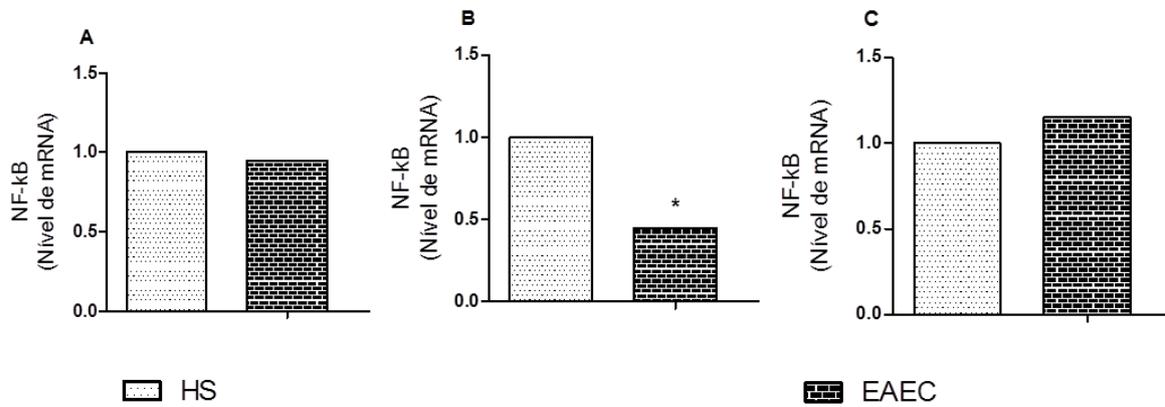
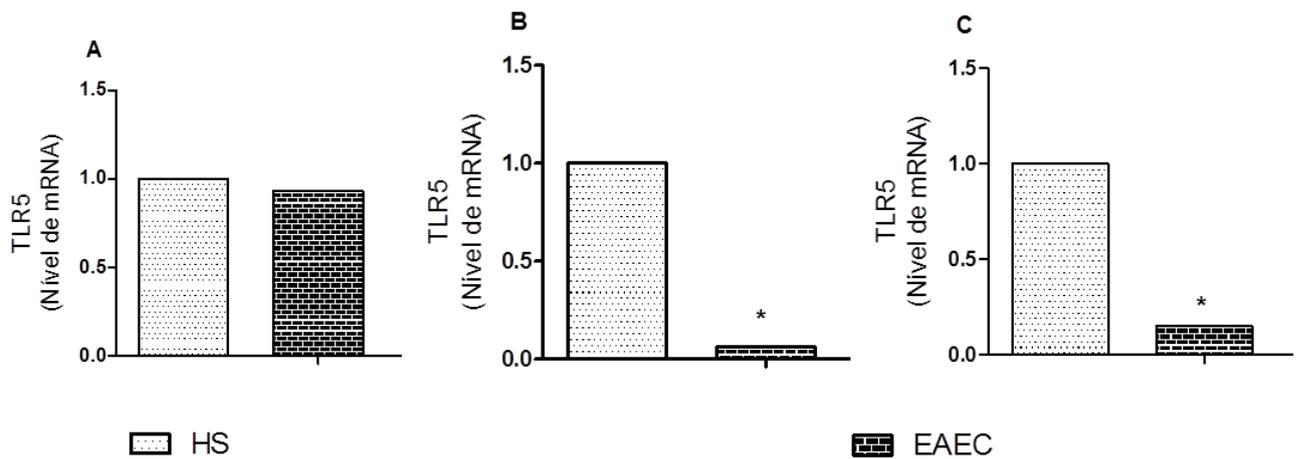


Gráfico 21 - Transcrição relativa de NF- κ B em células IEC-6 após infecção (A) com *E. coli* HS ou EAEC, 6h (B) ou 12h (C).



* Significativo em relação à HS

Gráfico 22 - Transcrição relativa de TLR5 em células IEC-6 após (A) infecção com *E. coli* HS ou EAEC, 6h (B) ou 12h (C)



* Significativo em relação à HS

Tabela 2 - Transcrição relativa (r) dos genes avaliados em relação ao grupo controle sem glutamina imediatamente após 3h de infecção.

Gene	EAEC		<i>E. coli</i> HS	
	r	Erro Padrão	r	Erro Padrão
Cdc42	1,666 [£]	1,329 - 2,165	1,25	1,036 - 1,522
Rac1	1,397	1,058 - 1,852	1,457 [£]	1,258 - 1,685
RhoA	1,422	1,107 - 1,840	1,253 [£]	1,076 - 1,432
NF-kB	1,77 [£]	1,477 - 1,986	1,869 [£]	1,626 - 2,167
IL-8	88,595 [£]	28,960 - 243,848	176,029 [£]	53,312 - 449,957
TLR5	0,613	0,268 - 1,470	0,657	0,481 - 0,952

Fonte: dados da pesquisa

£ aumento significativo em relação a Gln -
 ø redução significativa em relação a Gln -

Tabela 3 - Transcrição relativa (r) dos genes avaliados em relação ao grupo controle sem glutamina em 6h após adição de Ala-Gln 10mM em células previamente infectadas com HS ou EAEC.

Gene	Gln+		Ala-Gln 10mM		HS		EAEC		EAEC+Ala -Gln 10mM	
	r	Erro Padrão	r	Erro Padrão	r	Erro Padrão	r	Erro Padrão	r	Erro Padrão
IL-8	0,211	0,096 - 0,565	0,429	0,219 - 0,831	26,288 [£]	13,281 -39,894	6,885	3,892 - 12,778	36,148 [£]	19,033 - 66,414
TLR5	2,287 [£]	1,569 - 3,361	0,809	0,492 - 1,400	0,552 [¢]	0,422 - 0,760	0,034	0,016 - 0,065	0,169	0,136 - 0,213
Rac-1	0,782	0,601 - 0,954	1,314	0,906 - 2,066	0,851	0,687 - 1,124	0,245 [¢]	0,143 - 0,372	0,265 [¢]	0,215 - 0,342
Cdc42	0,829	0,655 - 1,147	1,110	0,655 - 1,147	0,966	0,733 - 1,214	0,39 [¢]	0,263 - 0,610	0,272 [¢]	0,202 - 0,345
RhoA	1,403	1,029 - 2,022	0,812	0,415 - 1,717	1,079	0,765 - 1,489	0,253 [¢]	0,173 - 0,426	0,197 [¢]	0,144 - 0,290
NF-kB	0,098	0,074 - 0,146	1,548 [£]	0,691 - 2,631	1,293	1,153 - 1,456	0,05 [¢]	0,027 - 0,093	0,04 [¢]	0,028 - 0,053

Fonte: dados da pesquisa

£ aumento significativo em relação a Gln -

¢ redução significativa em relação a Gln -

Tabela 4 - Transcrição relativa (r) dos genes avaliados em relação ao grupo controle sem glutamina em 12h após adição de Ala-Gln 10mM em células previamente infectadas com HS ou EAEC.

Gene	Gln+		Ala-Gln 10mM		HS		EAEC		EAEC+Ala -Gln 10mM	
	r	Erro Padrão	r	Erro Padrão	r	Erro Padrão	r	Erro Padrão	r	Erro Padrão
IL-8	0,548 ^ç	0,448 - 0,662	3,865	1,935 - 8,222	25,63 [£]	20,028 - 33,625	54,151 [£]	33,063 - 81,016	25,633 [£]	20,028 - 33,625
TLR5	0,825	0,425 - 1,628	0,667	0,364 - 1,526	0,348	0,165 - 0,646	0,053 ^ç	0,024 - 0,106	0,348	0,165 - 0,646
Rac-1	0,834	0,702 - 1,023	1,096	0,840 - 1,736	0,978	0,872 - 1,101	1,24 [£]	1,099 - 1,388	0,978	0,872 - 1,101
Cdc42	1,369 [£]	1,182 - 1,619	1,519	1,291 - 1,769	1,36	1,074 - 1,838	1,491 [£]	1,265 - 1,787	1,36	1,074 - 1,838
RhoA	0,925	0,642 - 1,418	0,751	0,393 - 1,627	0,935	0,653 - 1,441	1,257	0,949 - 1,688	0,935	0,653 - 1,441
NF-kB	0,556	0,485 - 0,643	0,861	0,377 - 1,435	1,832	1,691 - 2,055	2,113 [£]	1,609 - 3,347	1,832 [£]	1,691 - 2,055

Fonte: dados da pesquisa

£ aumento significativo em relação a Gln -

ç redução significativa em relação a Gln -

Tabela 5 - Transcrição relativa (r) dos genes avaliados do grupo infectado com EAEC em relação ao grupo infectado com *E. coli* HS imediatamente após 3h de infecção (tempo 0h), 6h e 12h.

Gene	0h		6h		12h	
	r	Erro Padrão	r	Erro Padrão	r	Erro Padrão
Cdc42	1,333	1,050 - 1,653	0,404 [£]	0,236 - 0,576	1,096	0,822 - 1,439
IL-8	0,503 [£]	0,380 - 0,652	0,262 [£]	0,179 - 0,393	2,113	1,284 - 3,136
NFkB	0,947	0,849 - 1,069	0,45 [£]	0,218 - 0,679	1,154	0,860 - 1,751
Rac-1	0,959	0,767 - 1,311	0,288 [£]	0,162 - 0,442	1,268	1,114 - 1,455
RhoA	1,135	0,879 - 1,471	0,235 [£]	0,145 - 0,337	1,344	0,991 - 1,822
TLR5	0,933	0,395 - 2,364	0,062 [£]	0,029 - 0,116	0,151 [£]	0,089 - 0,222

Fonte: dados da pesquisa

£ aumento significativo em relação à *E. coli* HS

£ redução significativa em relação à *E. coli* HS

5.3.6 Quantificação de citocinas

Apesar de o *kit* utilizado ser capaz de quantificar nove tipos de citocinas, apenas IL-6 e TNF- α apresentaram valores compatíveis com os limites de linearidade.

Os valores da secreção de IL-6 não mostraram qualquer diferença entre *E. coli* HS e EAEC em quaisquer um dos tempos analisados, como mostra o gráfico 23. Os valores de TNF- α induzidos pela infecção prévia com EAEC ou *E. coli* HS não foram diferentes após infecção ou até 6h depois. Contudo, em 12h verificou-se aumento significativo da concentração de TNF- α pelas células infectadas com EAEC (gráfico 24).

Gráfico 23 - Valores da concentração de IL-6 em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC ou *E. coli* HS: (A) ao término da infecção e após 6h (A) e 12h (B).

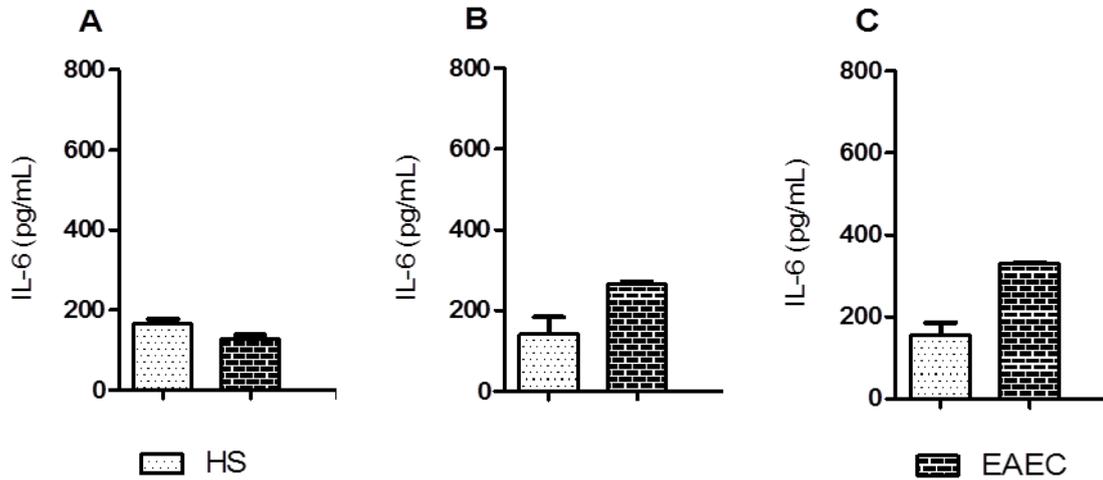
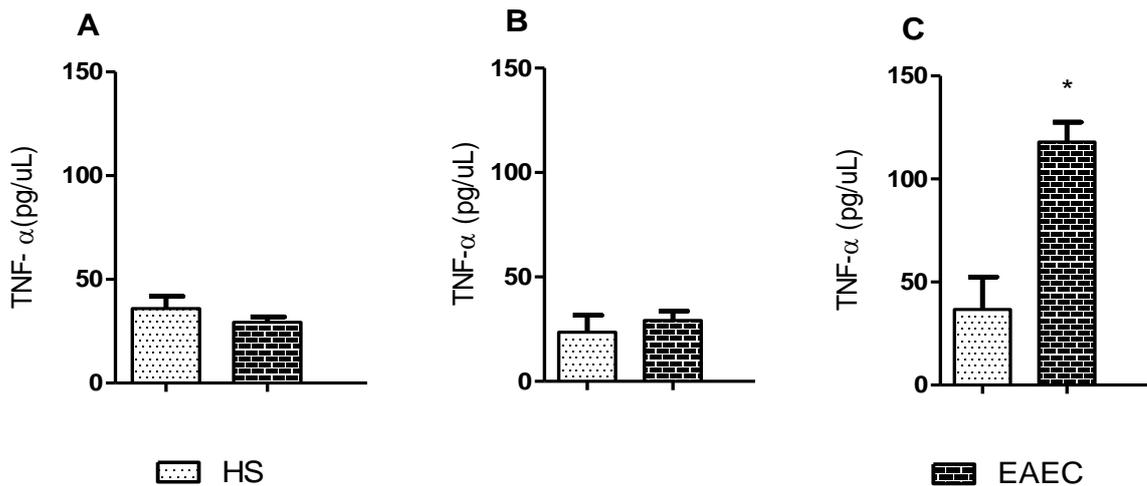


Gráfico 24 - Valores da concentração de TNF- α em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC ou *E. coli* HS: (A) ao término da infecção e após 6h (A) e 12h (B).



* Significativo em relação a HS

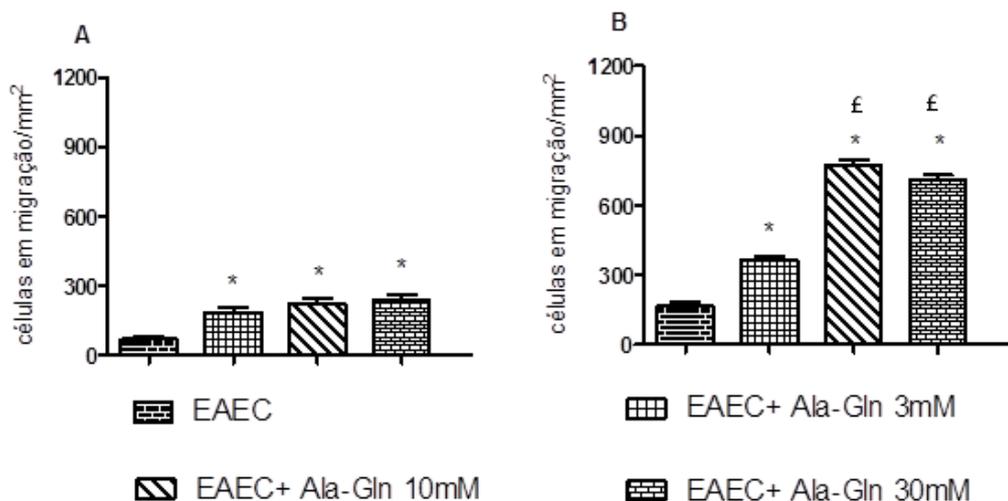
5.4 Efeitos da suplementação da Alanil-Glutamina sobre a lesão provocada pela EAEC em monocamada de células epiteliais intestinais.

5.4.1 Migração celular

O tratamento com Ala-Gln demonstrou efeitos benéficos após 12h de tratamento. Ala-Gln utilizada nas concentrações de 3mM ($188,6 \pm 15,9$ células/mm²), 10mM ($223,8 \pm 25,3$ células/mm²) ou 30mM ($242,5 \pm 21,1$) exibiram aumentos significativos da quantidade de células em migração quando comparados ao grupo infectado com EAEC não tratado com Ala-Gln ($71,43 \pm 10,6$ células/mm²). Entretanto não foi observada qualquer diferença de efeito entre as concentrações utilizadas no tratamento (gráfico 25)

A análise realizada em 24h revela diferenças ainda maiores entre grupo não tratado e grupos tratados, conforme visto no gráfico 25. No que diz respeito ao grupo não tratado ($165,6 \pm 19,2$ células/mm²), a suplementação com o dipeptídeo exibiu aumento significativo da migração para as três concentrações utilizadas. As concentrações de 10mM ($774,4 \pm 22,1$ células/mm²) e 30mM ($711,1 \pm 19,1$ células/mm²) foram significativamente superiores à concentração de 3mM ($365,3 \pm 14,4$ células/mm²).

Gráfico 25 - Migração de células IEC-6 após 12h (A) e 24h (B) de tratamento com Ala-Gln 10mM em células previamente infectadas com EAEC.



* Significativo em relação à EAEC

£ Significativo em relação à EAEC+Ala-Gln 3mM

5.4.2 Transcrição de genes relacionados à migração celular

Conforme mostram os gráficos 26, 27 e 28 a análise da transcrição relativa dos genes Rac1, RhoA, e Cdc42 realizada nos tempos de 6h e 12h, não revelou qualquer diferença significativa entre o grupo infectado não tratado e o grupo infectado e tratado com Ala-Gln 10mM.

Gráfico 26 - Transcrição gênica relativa de Rac1 em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC após 6h (A) e 12h (B) de tratamento com Ala-Gln 10mM.

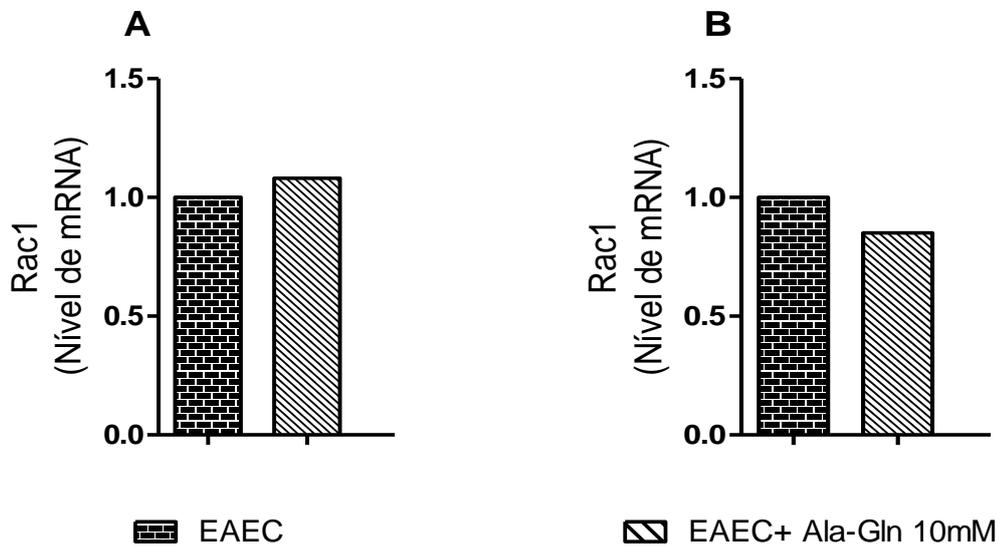


Gráfico 27 - Transcrição gênica relativa de RhoA em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC após 6h (A) e 12h (B) de tratamento com Ala-Gln 10mM.

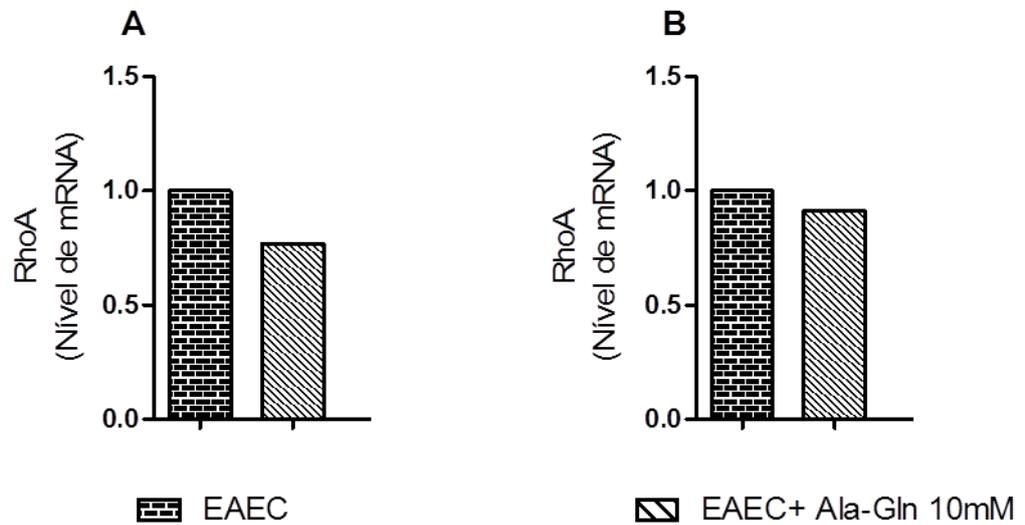
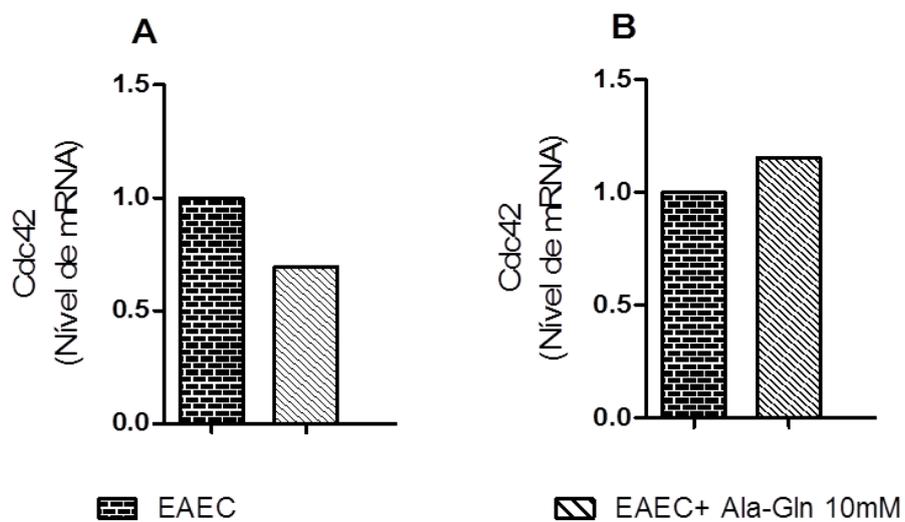


Gráfico 28 - Transcrição gênica relativa de Cdc42 em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC após 6h (A) e 12h (B) de tratamento com Ala-Gln 10mM.



5.4.3 Morte celular

O gráfico 29 mostra que não foram verificadas quaisquer diferenças nos índices de apoptose entre os grupos avaliados. Em relação à necrose (gráfico 30), verificou-se que o tratamento com Ala-Gln 10mM ($22,4 \pm 6,4$) foi capaz de reduzir de forma significativa a necrose induzida pela infecção com EAEC ($39,70 \pm 8,51$).

Gráfico 29 - Percentual de apoptose em células IEC-6 medida após 24h de tratamento com Ala-Gln 10mM em células previamente infectadas com EAEC.

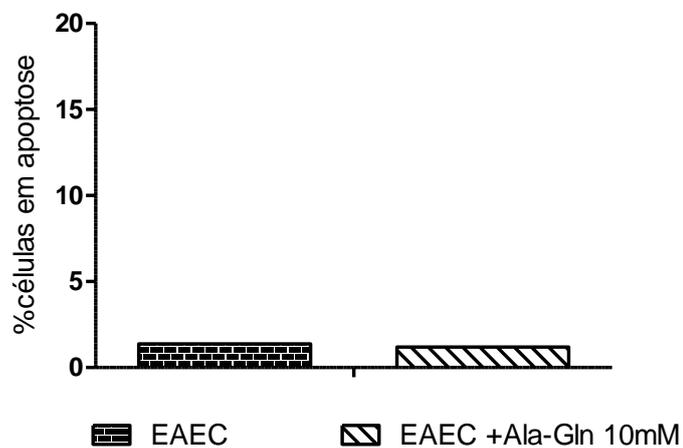
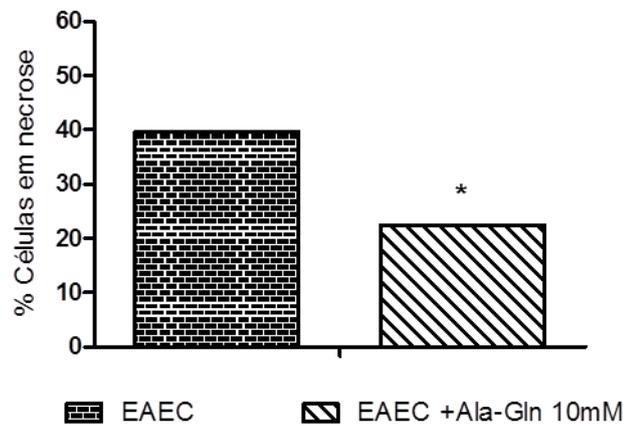


Gráfico 30 - Percentual de necrose em células IEC-6 medida após 24h de tratamento com Ala-Gln 10mM em células previamente infectadas com EAEC.

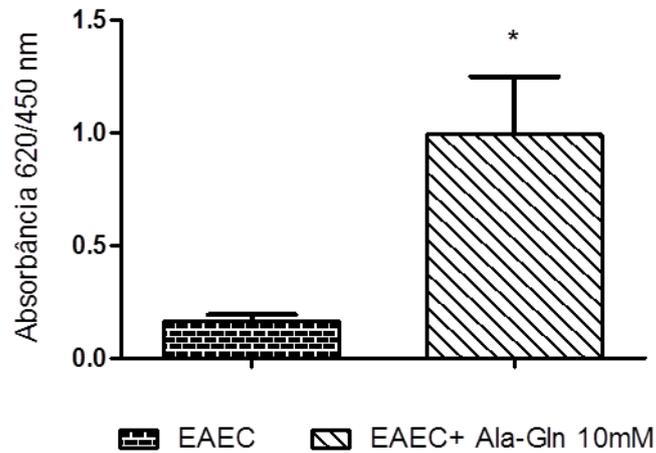


* Significativo em relação a EAEC

5.4.4 Proliferação celular

Como mostrado na seção 4.3.4 a EAEC causa significativa redução da proliferação celular. Contudo, tal dano sobre capacidade proliferativa das células intestinais epiteliais pôde ser restaurado quando as células infectadas receberam meio suplementado com Ala-Gln 10mM ($0,99 \pm 0,25$), como mostra o gráfico 31.

Gráfico 31 - Proliferação de células IEC-6 infectadas com EAEC e tratadas com Ala-Gln 10mM.



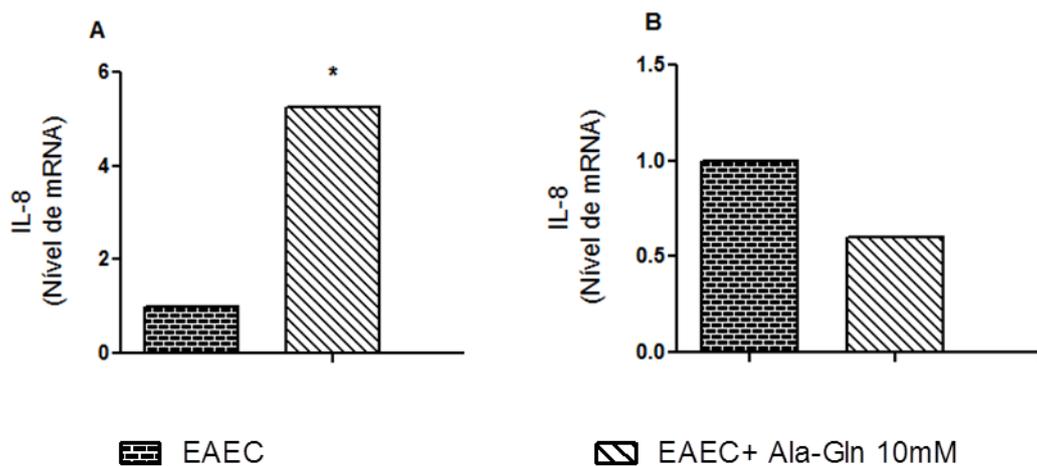
* Significativo em relação a EAEC

5.4.5 Transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório

Conforme mostra o gráfico 32, o tratamento com Ala-Gln 10mM em 6h aumentou significativamente a o nível relativo de mRNA de IL-8 em relação ao grupo infectado com EAEC e não tratado. Em 12h tal aumento não foi mais observado. Em 6h o tratamento não mostrou diferença em relação ao grupo não tratado no que diz respeito à transcrição relativa de NF-kB, contudo em 12h as células infectadas que

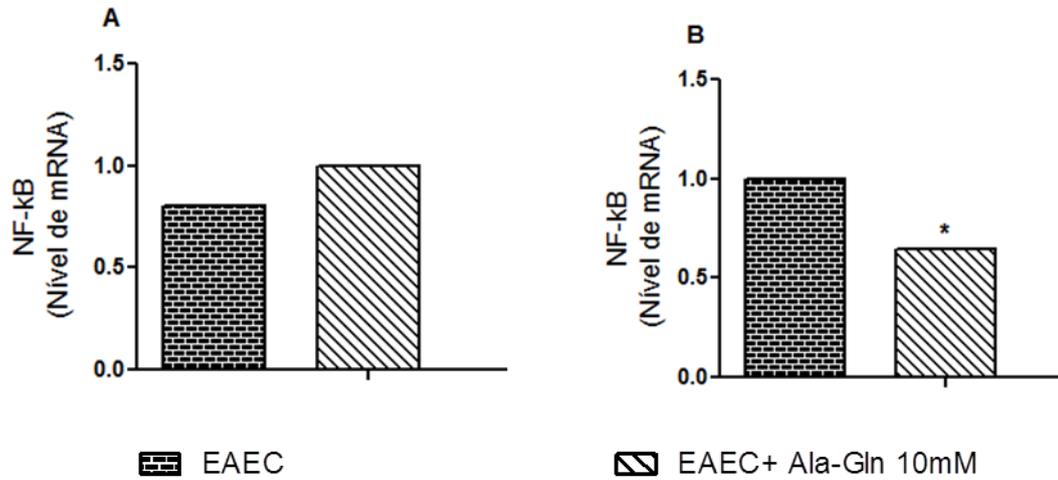
receberam Ala-Gln 10mM exibiram redução significativa da transcrição de NF-Kb (gráfico 33). O tratamento com dipeptídeo apresentou aumento significativo dos níveis transcricionais de TLR5 nos tempos de 6h e 12h, como mostrado no gráfico 34 e na tabela 6.

Gráfico 32 - Transcrição gênica relativa de IL-8 em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC após 6h (A) e 12h (B) de tratamento com Ala-Gln 10Mm.



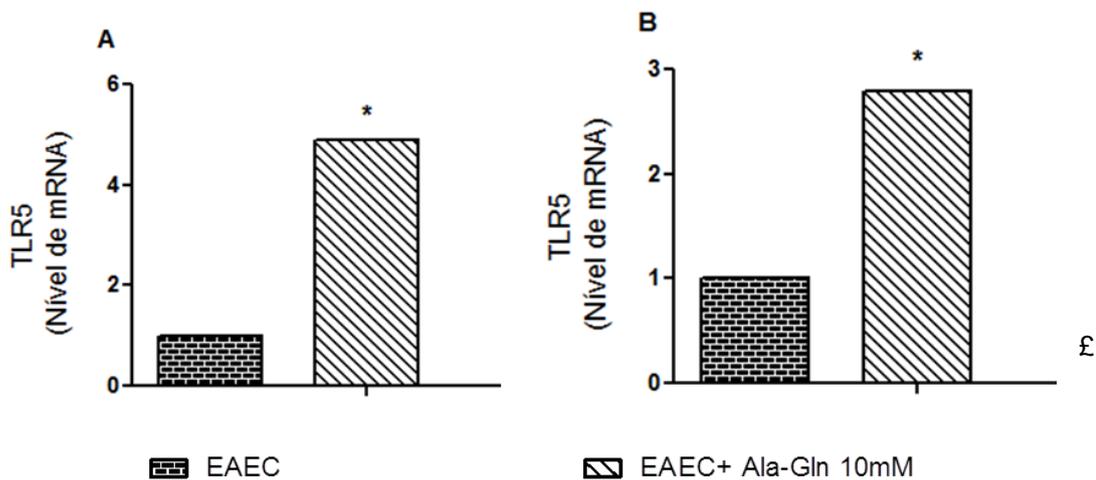
* Significativo em relação a EAEC

Gráfico 33 - Transcrição gênica relativa de NF- κ B em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC após 6h (A) e 12h (B) de tratamento com Ala-Gln 10mM.



* Significativo em relação à EAEC

Gráfico 34 - Transcrição gênica relativa de TLR5 em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC após 6h (A) e 12h (B) de tratamento com Ala-Gln 10mM.



*Significativo em relação a EAEC

Tabela 6 - Transcrição relativa (r) dos genes avaliados no grupo infectado com EAEC e tratado com Alanil-Glutamina 10mM em relação ao grupo não tratado.

Gene	6h		12h	
	r	Erro Padrão	r	Erro Padrão
Cdc42	0,696	0,489 - 1,164	1,154	1,006 - 1,379
IL-8	5,25 [£]	3,243 - 7,882	0,602	0,363 - 0,836
NFkB	0,807	0,503 - 1,566	0,654 [¢]	0,449 - 0,915
Rac-1	1,082	0,727 - 1,872	0,843	0,719 - 0,990
RhoA	0,779	0,497 - 1,273	0,913	0,768 - 1,058
TLR5	4,893 [£]	2,773 - 11,334	2,803 [¢]	2,407 - 3,362

Fonte: dados da pesquisa

£ aumento significativo em relação à EAEC

¢ redução significativa em relação à EAEC

5.4.6 Quantificação de citocinas

Com exceção de TNF- α e IL-6, os valores das demais citocinas não são mostradas porque exibiram valores nulos ou abaixo do limite de linearidade do método.

Em 6h, as monocamadas previamente infectadas e tratadas com Ala-Gln 10mM ($646,3 \pm 37,5$ pg/ μ L) exibiram valores significativamente mais altos de IL-6 em relação ao grupo sem tratamento ($265,40 \pm 5,4$ pg/ μ L). Conforme mostra o gráfico 35, resultado semelhante foi observado com análise realizada em 12h onde o grupo tratado ($507,0 \pm 105,5$ pg/ μ L) exibiu valores significativamente superiores ao grupo infectado e não tratado ($330,10 \pm 2,5$ pg/ μ L).

Expressão de TNF- α em 6 horas de tratamento exibiu grande aumento no grupo infectado e tratado com Ala-Gln 10mM ($64,55 \pm 6,1$ pg/ μ L), aumento este estatisticamente superior aos valores da cepa EAEC que não recebeu tratamento ($29,29 \pm 6,1$ pg/ μ L). No tempo posterior (12h), o valor de TNF- α mostrou-se significativamente reduzido no grupo infectado e tratado ($64,77 \pm 9,0$ pg/ μ L) em relação ao grupo infectado que não recebeu tratamento ($117,90 \pm 9,6$ pg/ μ L) (gráfico 36).

Gráfico 35 - Valores da concentração de IL-6 em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC 6h (A) e 12h (B) após adição de Ala-Gln 10mM.

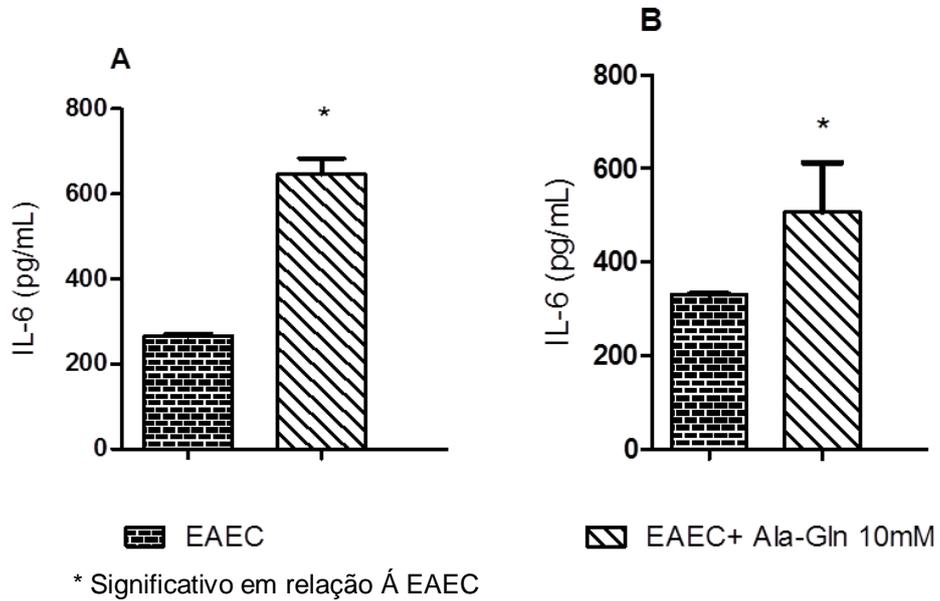
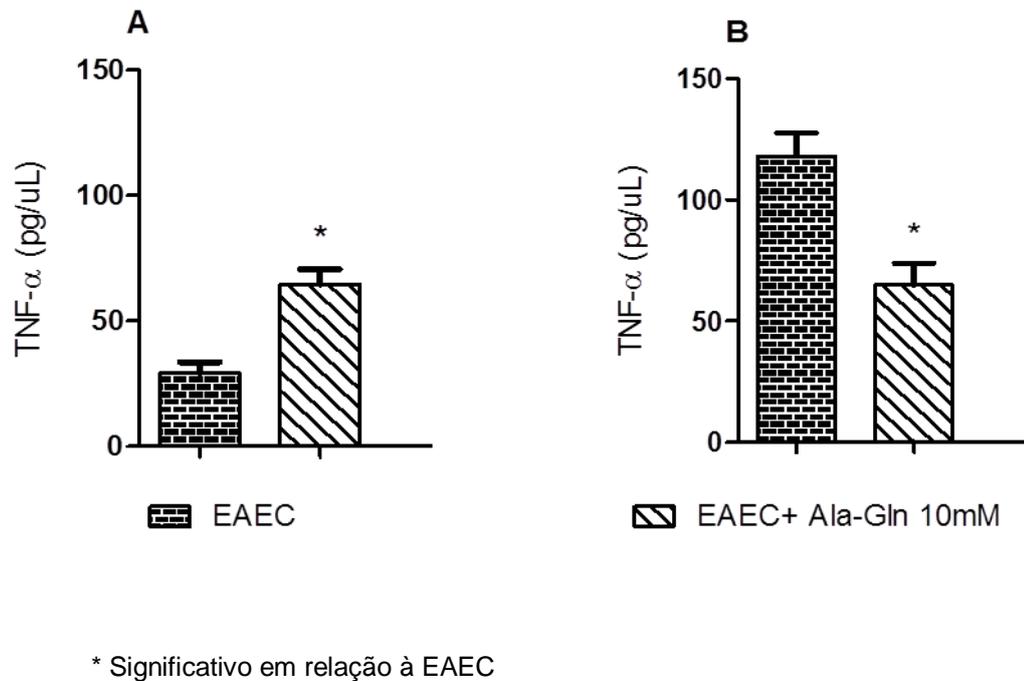


Gráfico 36 - Valores da concentração de TNF- α em células IEC-6 previamente infectadas com EAEC 6h (A) e 12h (B) após adição de Ala-Gln 10mM.



6 DISCUSSÃO

A manutenção da integridade da barreira é crítica para o crescimento normal, desenvolvimento e progressão de doenças. Apesar de sua função como uma importante barreira entre meio externo e interno atuando na prevenção de solutos, microrganismos e antígenos luminais indesejáveis, o epitélio intestinal pode ser lesionado por substâncias luminais tóxicas, inflamação, agentes farmacêuticos e interação com microrganismos.

Em concordância com importantes achados epidemiológicos que enfatizam a relevância de fatores dietéticos para o estabelecimento e progressão da diarreia, diferentes trabalhos chamam atenção para a importância de elementos da dieta na promoção do reparo de danos causados ao epitélio. Nesse contexto a eficácia de alguns aminoácidos, particularmente glutamina e arginina, tem sido relatada por muitos trabalhos (IIZUKA; KONNO, 2011).

Em um intervalo relativamente curto de 12h, nossos resultados comprovam a habilidade da cepa de EAEC 239-1 na redução da capacidade de restituição do epitélio, habilidade esta não compartilhada pela cepa comensal considerando o mesmo período avaliado. Ainda em 12h, os resultados apontam satisfatoriamente para a utilidade do dipeptídio em minorar o dano causado pela cepa patogênica dado o fato de esta prejudicar o processo migratório. É apenas em 24h que os resultados da suplementação com o dipeptídio mostram-se ainda mais evidentes. Apesar das três concentrações de Ala-Gln exibirem melhoras significativas em relação ao grupo não tratado, as concentrações de 10 e 30mM aumentam consideravelmente a quantidade de células em migração. Entretanto já na dose de 3mM é possível verificar, microscopicamente, que é notável o efeito da manutenção da integridade da monocamada de células embora não seja possível comprovar este resultado através do ensaio de migração celular. Nossos resultados corroboram os achados de Carvalho (2011), onde a Ala-Gln nas concentrações de 3, 10 e 30 proporcionaram aumentos significativos da proliferação em dano promovido na monocamada por EAEC (cepa 042).

A migração de células da mucosa demanda uma extensiva 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 ao processo é a formação dos filamentos através da polimerização de

actina (MOYER *et al.*, 2007; RAY *et al.*, 2003). Por essa razão é tão importante definir quais fatores são capazes de regular a função das GTPases caracterizando os mecanismos que contribuem para a dinâmica da migração (O'CONNOR; NGUYEN; MERCURIO, 2000).

RhoA está relacionada com controle dos pontos de adesão (O'CONNOR, K.L.; NGUYEN, B.K.; MERCURIO, 2000; RAY *et al.*, 2003). Rho e Rac regulam a polimerização da actina para produzir fibras de estresse e a formação da lamelipodia (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 sequencias sincronizadas, onde os diferentes membros da família Rho agem em etapas. Nesse contexto, a atividade de Rho GTPases é essencial a migração de células epiteliais intestinais.

Ao contrário da cepa comensal HS, passada apenas seis horas do término da infecção, a EAEC foi capaz de reduzir significativamente a expressão de todos os membros da família Rho GTPases analisados pelo presente estudo (RhoA, Rac1, Cdc42), fato que vir a somar-se as prováveis explicações do retardo da migração na monocamada infectada promovida pela EAEC.

Um dos atuais paradigmas envolvidos na progressão de um episódio agudo de diarreia para o desenvolvimento de DP consiste exatamente numa capacidade reconhecidamente pobre de reparo da mucosa intestinal fazendo com que uma lesão sofrida pelo epitélio intestinal venha a tornar-se prolongada (BHUTTA *et al.*, 2004) . Nossos resultados, ao mostrar o efeito deletério da EAEC sobre a família de Rho GTPase prejudicando a capacidade migratória das células epiteliais, poderiam contribuir com explicações plausíveis para baixa eficiência ou ineficiência do processo de reparo do epitélio intestinal. Explicação coerente não apenas por associar o achado clínico de deficiência de cura da lesão da mucosa intestinal com o achado *in vitro*, mas sobretudo por considerar a relevância do patógeno uma vez que EAEC está intimamente associada com DP.

Muitos trabalhos tem mostrado que diversos peptídios regulatórios, incluindo fatores de crescimento e citocinas, são capazes de modular o processo de reparo do epitélio intestinal (IIZUKA; KONNO, 2011). O presente estudo quantificou também a

expressão e secreção de algumas citocinas. O alto valor de expressão de IL-8 encontrada em nossos resultados poderia explicar também a maior capacidade migratória observada nas células tratadas com Ala-Gln. Lai e *et al.* (2011) demonstraram que a administração de IL-8 a células EA.Hy926, uma linhagem celular derivada do endotélio de veia do cordão umbilical, não apenas induziu a formação de protruções membranares e extensões de lamelipodia, mas também aumentou a formação de fibras de estresse possibilitando incrementos consideráveis na migração de tal linhagem celular. Os mesmo autores sugerem que o efeito do aumento de migração é mediado por um aumento da expressão de Rac1. Já o aumento de IL-6 proporcionado pelo tratamento com Ala-Gln, apesar de não ter efeitos sobre migração celular, contribui de forma indireta para este processo ao reduzir a morte celular possibilitando maior número de células viáveis capazes de migrar.

Nossos resultados mostraram-se insuficientes em responder se o micronutriente utilizado demonstra alguma ação direta sobre atividade de membros da família Rho GTPase.

Anteriormente vista como uma simples barreira com elevada capacidade seletiva, hoje reconhece-se que a monocamada de células epiteliais que separa o conteúdo luminal dos demais tecidos internos é um componente de grande dinamicidade responsável por funções altamente especializadas e de relevante importância ao funcionamento fisiológico normal do organismo (KARGNOFF, 2006). Dentre tais funções, a regulação da resposta imune. O epitélio intestinal expressa normalmente muito receptores relacionados à capacidade de resposta imunológica e os enterócitos tem o potencial de secretar uma ampla gama de citocinas inflamatórias envolvidas na sinalização imune para tecidos vizinhos e células inflamatórias (LIBONI, LI, NEU, 2004).

TRL constituem os principais componentes do sistema de defesa imune inato e a sinalização por eles evocada desempenha um papel crítico para a resposta imune adaptativa (CARMODY; CHEN, 2007; SHAMES; FINLAY, 2011, UEMATSU *et al.*, 2006). A ativação dos TLR por ligantes específicos determina uma cascata de sinalização celular que leva a uma resposta transcricional específica (SHAMES; FINLAY, 2011; CARMODY; CHEN, 2007). Todos os TLR convergem, sem prejuízo de outras respostas específicas, para a transcrição do NF- κ B. A ativação deste fator de transcrição é o principal regulador das respostas induzidas pelos TLR sendo crítico para o desempenho das funções dos mesmos (CARMODY; CHEN, 2007).

Até o momento, 13 TLR foram identificados em mamíferos. Dentre estes, TLR-5 é altamente expresso em células epiteliais intestinais desempenhando importantes funções na mucosa intestinal (UEMATSU *et al.*, 2006). A capacidade de distinguir precisa e rapidamente entre bactérias Gram negativas e Gram positivas, entre vírus e fungos é crítica para a resposta otimizada do sistema imune inato e para elaborar com sucesso uma resposta imune adaptativa posterior (CARMODY; CHEN, 2007). O reconhecimento de monômeros de flagelina pelo TLR-5 já é algo bem documentado na literatura (UEMATSU *et al.*, 2006) e sua ativação leva ao aumento transcricional e a secreção de IL-8 (STEINER *et al.*, 2000), uma importante quimiocina pró-inflamatória com grande capacidade quimioatraente para neutrófilos (KAGNOFF, 2006).

Em nossos resultados, embora os níveis de expressão de TLR-5, em três horas de infecção, não tenham exibido qualquer diferença entre os grupos, os valores de expressão de IL-8 mostraram-se dramaticamente alterados. Dada a natureza pró-inflamatória de IL-8, o baixo valor de expressão de tal citocina no grupo não infectado já era esperado. Chama atenção, contudo, o valor expressivamente baixo do nível de IL-8 no grupo infectado com EAEC quando comparada com o grupo infectado com cepa HS.

O envolvimento da IL-8 na patogenia da infecção causada por EAEC foi descrita pela primeira vez por Steiner *et al.* (1998). Os autores obtiveram resultados semelhantes aos nossos quando, utilizando células Caco-2, uma linhagem celular imortalizada originada de cólon humano, verificaram que a infecção por EAEC (cepa 042) durante 3 horas causava aumento de IL-8 significativamente maior que o controle não-infectado. Contudo, em oposição aos nossos resultados, Steiner *et al.* (1998) verificaram que o aumento de IL-8 foi maior quando comparado com a infecção por *E. coli* comensal (cepa K12). Utilizando modelos experimentais similares, os resultados de Steiner e cols. (1998) foram reproduzidos em outros trabalhos (KHAN; KANG; STEINER, 2004; STEINER *et al.*, 2000) e desde então os níveis fecais de IL-8 tem sido descritos como possíveis marcadores para infecção entérica causada por EAEC (GREENBERG, *et al.*, 2002). Sabendo que citocinas pró-inflamatórias são reguladas através de modos distintos em diferentes linhagens celulares imortalizadas (LIBONI; NEU, 2003; STEINER *et al.*, 2000) as diferenças encontradas por nós devem-se provavelmente ao fato de utilizarmos uma linhagem celular epitelial não transformada. A diferença da origem celular também pode ter importância na explicação do

observado, uma vez que os trabalhos citados utilizam células de origem humana enquanto nossos estudos foram feitos com células derivadas do intestino de rato.

Esclarecidas as diferenças metodológicas, os desníveis significativos observados na expressão de IL-8 entre a cepa comensal e EAEC são de grande importância. É sabido que o aumento de IL-8 é causado por monômeros da flagelina através da ativação de TLR-5 (UEMATSU *et al.*, 2006 ; STEINER *et al.*, 2000). No presente trabalho utilizamos duas cepas sabidamente flageladas em iguais concentrações e, assim, com condições semelhantes de causar aumento de IL-8.

Mesmo entre bactérias comensais há relatos que algumas cepas apresentam a capacidade de alterar o sítio de reconhecimento da flagelina, sítio este que seria reconhecido pelo TLR-5. Curiosamente, a alteração do mesmo sítio ocorre sem prejuízo da mobilidade bacteriana conferida pelo flagelo (UEMATSU *et al.*, 2006). Bactérias patogênicas possuem mecanismos mais específicos para escapar da resposta imune do hospedeiro desencadeada por IL-8 (UEMATSU *et al.*, 2006). Alguns estudos demonstraram que enquanto patógenos que causam lesão tipo A/E induzem a expressão de IL-8 através da ativação de TLR5 e de MAP kinase, moléculas efetoras secretadas por estes patógenos são capazes de regular negativamente a expressão de IL-8 em estágios muito precoces da lesão por eles causada (GAO *et al.*, 2009). Cirl e *cols.* (2008) relataram que algumas bactérias patogênicas como *Brucella melitensis* e *E. coli* uropatogênica possuem genes que codificam proteínas inibitórias homólogas a TIR (Toll/interleukin-1 receptor) capazes de interferir diretamente na sinalização molecular promovida por TLR. Modelos *in vitro* demonstram que tais proteínas homólogas causam interferência na sinalização de TLR prejudicando a produção e liberação de citocinas (CIRL *et al.*, 2008).

No presente trabalho, quando são comparados os dois grupos infectados no período de 3 horas, verifica-se grandes diferenças nos níveis de IL-8 entre grupos que expressam níveis similares de TLR-5, ou seja, para os mesmo nível de expressão de TLR-5 a cepa EAEC causa aumento de IL-8 significativamente menor. É provável que a reduzida expressão de IL-8 proporcionada pela EAEC possa decorrer de alguma interferência na sinalização molecular do TLR5.

À proporção que se interfere na sinalização molecular promovida pelos TLR, outras respostas transcricionais dependentes de tal sinalização também são prejudicadas, tal como o aumento de transcrição do NF- κ B promovido por tais receptores. Embora existam muitos outros mecanismos não dependentes de TLR

capazes de promover a transcrição de NF- κ B, em nossos experimentos a expressão reduzida de IL-8 promovida por EAEC no fim do período de infecção esteve associada a um menor nível de expressão de NF- κ B p65 no tempo de 6h, como discutido mais adiante.

É importante salientar que o reconhecimento de patógenos por parte do organismo dá-se por meio de receptores. A capacidade de evadir-se rapidamente das respostas evocadas pelo sistema imune inato em decorrência de tal reconhecimento é essencial durante os estágios iniciais da infecção (CIRL *et al.*, 2008) e determina, com frequência, o sucesso da colonização dos tecidos do hospedeiro.

Considerando nossos resultados, julgamos que apesar do aumento da expressão de IL-8 representar um mecanismo importante na patogênese da EAEC, este aumento parece ser limitado pela própria EAEC. A limitação da manifestação de altos níveis de uma importante citocina inflamatória pode representar um dos mecanismos plausíveis que explicam a ausência de uma potente resposta inflamatória nos períodos iniciais da colonização da mucosa pela EAEC, podendo estar também relacionada com o sucesso da colonização do intestino pela mesma cepa.

Enquanto os níveis de expressão de TLR-5 são praticamente os mesmos para os grupos infectados e grupo controle após 3h de infecção, nos períodos analisados posteriormente as diferenças mostram-se dramáticas. Assim, nos tempos de 6h e 12h, percebe-se que os grupos infectados expressam elevados níveis de IL-8 concomitante a uma expressão reduzida do TLR-5. Consideramos que este efeito deve-se a capacidade da IL-8 de modular negativamente a expressão do TLR-5.

É curioso notar o efeito do tratamento com Ala-Gln sobre o grupo infectado com EAEC. Neste grupo, a expressão de IL-8 no tempo de 6h encontra-se dramaticamente elevada em relação a todos os demais grupos do estudo, principalmente em relação àquele que, infectado com EAEC, não recebe tratamento. Olhando os dois grupos infectados com EAEC sob o prisma da evolução temporal, vemos que, a um valor de IL-8 relativamente baixo (comparado a cepa comensal) ao fim de 3h de infecção, o grupo que não recebe tratamento persiste com baixa expressão da citocina, ao passo que o grupo tratado com o dipeptídeo aumenta de forma drástica o valor de IL-8 após seis horas da adição do dipeptídeo.

Alguns autores publicaram trabalhos onde o tratamento com glutamina reduz a produção de IL-8 em linhagem de células humanas transformadas desafiadas com

LPS (HUBERT-BURON *et al.*, 2006; LIBONI; NEU, 2003; HUANG *et al.*, 2003). Salvaguardadas as limitações de cada modelo utilizado, devemos lembrar que células transformadas bem como as diferentes linhagens celulares respondem de forma diferente a estímulos similares (LIBONI; NEU, 2003). Além do mais, nos experimentos realizados pelos autores citados não há a presença de um fator sabidamente lesivo que condicione morte celular como aqueles presentes nas condições de nossos experimentos. No contexto do modelo que utilizamos, os altos valores da expressão de IL-8 proporcionados pelo tratamento com o dipeptídeo Ala-Gln na concentração de 10mM estão claramente associados com maior sobrevivência celular e melhor manutenção da integridade do epitélio como discutido nos resultados de apoptose/necrose e migração das células epiteliais no grupo infectado e tratado.

Além do fato claro e evidente do aumento da expressão de IL-8 proporcionado pelo dipeptídeo em células desafiadas com EAEC, não se pode afirmar sobre as vias mecanísticas envolvidas. Enquanto as vias moleculares do fenômeno observado necessitam de elucidação é conhecido que a regulação de IL-8 pela glutamina pode acontecer em outros níveis para além do controle transcricional exercido pelo aminoácido sobre a citocina, estes níveis incluem o nível translacional, a regulação do receptor, sua sinalização e degradação (HUANG *et al.*, 2003). O aumento da expressão de IL-8 proporcionado pelo tratamento com Ala-Gln parece acontecer de forma independente do controle de NF- κ B, pois no período de 6h os níveis desse fator de transcrição estão claramente reduzidos.

Sabe-se da capacidade da glutamina para modular algumas citocinas envolvidas no controle do processo inflamatório. Crê-se que esta modulação aconteça principalmente através do controle de fatores de transcrição específicos. NF- κ B é um fator de transcrição pleiotrópico capaz de controlar geneticamente diversas funções celulares (WAN *et al.*, 2011). Sua estrutura é composta por diversas subunidades das quais as mais conhecidas são as proteínas Rel, que incluem Rel A (p65), RelB, c-Rel, p50 e p52 (WAN *et al.*, 2011). A proteína ribossomal S3 (RPS3), descoberta recentemente, não está intimamente relacionada à estrutura dimérica do NF- κ B mas desempenha funções cruciais guiando-o para os sítios específicos após estímulo celular adequado. Além do mais, o complexo formado entre a RPS3 e p65 aumenta dramaticamente a afinidade de ligação do complexo NF- κ B pelos genes alvos.

Em nossos resultados, após o término de três horas de infecção, as cepas comensal e patogênica demonstram uma capacidade similar de induzir aumento da

expressão de NF- κ B. Contudo o aumento observado no período considerado pode ter sido causado não apenas pela infecção em si, mas principalmente também pela ausência de glutamina, uma vez que as cepas foram adicionadas em uma suspensão preparada em DMEM livre de glutamina. Reforça nossa observação o fato de que após 6h, a adição de glutamina ou Ala-Gln foram capazes de reduzir significativamente os valores de expressão de NF- κ B quando comparadas com o grupo que não recebeu glutamina. Verifica-se assim que a ausência da glutamina pode configurar-se em si própria como um componente pró-inflamatório para a mucosa intestinal. Utilizando outra linhagem de células epiteliais intestinais humanas, em células Caco-2 desafiadas com LPS a privação de glutamina reduziu o nível da proteína inibitória I κ B α , causando aumento da expressão de NF- κ B p65 (LIBONI *et al.*, 2005). Em concordância com esta observação, outro estudo mostrou que a adição de glutamina à células HCT-8 causou aumento de I κ B α , que estava associada também a redução na produção de IL-8 (HUBERT-BURON *et al.*, 2006).

A via pela qual a glutamina atenua as ações do NF- κ B, não esta claramente elucidada. Todavia sabe-se que a neutralização da ação do NF- κ B por glutamina não acontece apenas no nível genômico, mas sim em múltiplos níveis e de várias formas. Foi sugerido que o aumento dos níveis intracelulares de glutathione também seria o responsável pela inibição da ativação. Mesmo após a conclusão de todas as etapas genômicas, translacionais e proteômicas, a redução da ação do NF- κ B poderia acontecer através da inibição do seu principal fator de transcrição, AP-1 (BRASSELAGNEL; LAVOINNE; HUSSON, 2010).

No tempo de 6h, verifica-se uma acentuada redução da expressão da NF- κ B nos grupos infectados com a cepa patogênica. Atribuímos à EAEC a causa do efeito observado no tempo de 6h, onde as células previamente infectadas com a referida cepa apresentaram níveis similares e dramaticamente reduzidos de NF- κ B, efeitos estes não observados com a infecção da cepa comensal HS. Considerando as respostas obtidas imediatamente após o período de infecção e considerando ainda que uma das principais respostas decorrentes da ativação dos TLR é a ativação transcricional de NF- κ B (CARMODY; CHEN, 2007), o baixo nível de expressão desse fator de transcrição observado no tempo de 6h poderia também ser explicado pela possível interferência na sinalização molecular do TLR-5.

Gal e *col/s.* (2009) demonstraram que a cepa de *E. coli* O157:H7 é capaz de interferir diretamente com a sinalização de NF- κ B o que causaria prejuízos à resposta

imune inata do hospedeiro. No experimento realizado pelos mesmos, os autores atribuem tal interferência a presença da toxina NleH1 e NleH2 que inativam a RPS3 e dessa forma reduzem a transcrição de produtos dependentes de tal proteína. Dessa maneira, alguns produtos de genes da família do NF- κ B seriam suprimidos por este mecanismo. Não encontramos na literatura relatos de proteínas citotóxicas produzidas por alguma cepa de EAEC que fosse capaz de interferir diretamente na via do NF- κ B e reduzir sua expressão como foi relatado para cepa O157:H7. Contudo, a diminuição de NF- κ B por EAEC é um fato claramente observável. Os mesmo autores (WAN *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2009) sugerem que da mesma forma que outras bactérias patogênicas (o que inclui EAEC) secretam fatores solúveis que inativam importantes kinases no interior das células hospedeiras, mecanismos de diminuição da expressão de NF- κ B análogos ao da cepa O157:H7 podem ser compartilhados com outras bactérias patogênicas. Este pode ser um dos mecanismos prováveis pelos quais a EAEC reduziu o nível de expressão de NF- κ B mais do que qualquer outro grupo. Se extrapolado para um modelo de desnutrição proteica com privação de glutamina, é interessante notar que a infecção com EAEC seria capaz de subverter a sinalização da má condição nutricional ao propiciar as condições adequadas para sua colonização no trato intestinal do hospedeiro.

Os resultados da expressão gênica no tempo de 12h após infecção revelam que os grupos infectados expressam quantidades significativamente aumentadas de NF- κ B p65 em relação aos grupos que não receberam infecção. Verifica-se ainda que tratamento do grupo infectado com o dipeptídeo é capaz de aumentar significativamente a expressão do NF- κ B p65 em relação ao grupo não tratado infectado com EAEC.

Pode parecer contraditório que a glutamina ou Ala-Gln reduzam os níveis de expressão de NF- κ B quando adicionados às células privadas de glutamina e que os aumente quando adicionada às células infectadas. Deve-se observar que, dependendo do modelo experimental adotado, a glutamina apresenta capacidade tanto estimulatória como inibitória sobre a atividade de fatores de transcrição, especialmente o AP-1 (BRASSE-LAGNEL; LAVOINNE; HUSSON, 2010). Ademais, visto sob uma óptica mais integrativa, a glutamina parece modular a expressão de citocinas.

Numerosos outros alvos moleculares podem estar envolvidos na interferência da atividade de NF- κ B por bactérias patogênicas. Posteriormente, a compreensão de

tais alvos pode ajudar na elaboração de inovadoras abordagens terapêuticas antibacterianas através da restauração da atividade de NF- κ B aumentando a capacidade de resposta inflamatória do indivíduo (LE NEGRATE, 2012). Vale lembrar, contudo, que a atividade aumentada de NF- κ B responde por relevantes efeitos adversos sobre células da mucosa imune e do epitélio intestinal durante a inflamação crônica. Nesse contexto, a suplementação com Ala-Gln, exibe grande vantagem ao modular eficazmente a expressão de NF- κ B.

A habilidade de limitar o aumento da expressão de IL-8 e de reduzir acentuadamente a expressão de NF- κ B, proporciona à EAEC uma ampla capacidade de reduzir grande variedade de estímulos inflamatórios que seriam desencadeados pela expressão de tais fatores. É importante notar que esta observação correlaciona-se intimamente com os achados epidemiológicos encontrados por diversos autores de que a EAEC é a cepa diarreiogênica mais comumente associada a diarreia persistente (DE ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011) e com frequência a cepa mais isolada em crianças com DP em países em desenvolvimento. A mesma cepa também está associada a infecções persistentes e assintomáticas (OKHUYSEN; DUPONT, 2010). A propriedade de modular negativamente a resposta inflamatória do hospedeiro confere ao patógeno a habilidade de colonizar de forma silenciosa grandes áreas do epitélio intestinal limitando a mortalidade do hospedeiro. Esta combinação de efeitos aparentemente paradoxal faz sentido quando o conjunto de efeitos é visto como uma estratégia de sobrevivência do patógeno quanto espécie. A eficiente subversão da resposta imune hospedeiro representa uma grande vantagem adaptativa de grande valor evolutivo (LE NEGRATE, 2012). Ao minimizar a resposta inflamatória intestinal, o patógeno pode reproduzir-se aumentando a carga bacteriana carregada pelo indivíduo; ao limitar a morte do hospedeiro aumenta o número de indivíduos infectados que desempenhariam o papel de vetor disseminando o patógeno entre a população de indivíduos suscetíveis (WAN *et al.*, 2011). A susceptibilidade, por sua vez, pode estar condicionada ao estado nutricional do indivíduo, resultante de suas possibilidades (ou escolhas) dietéticas. Assim é que em populações pobres onde é comum a desnutrição calórico-proteica, há deficiências de muitos micronutrientes, principalmente aminoácidos. A glutamina inserida nesse contexto pode desempenhar importante papel na patogenicidade e redução do dano provocado por EAEC. Nossos resultados demonstram que o tratamento com Ala-Gln 10mM é capaz de aumentar a expressão de IL-8 e NF- κ B, fatores diminuídos na infecção pela cepa patogênica.

Dentro desse modelo, ao aumentar os níveis de IL-8 e NF- κ B, o tratamento com Ala-Gln restaura a capacidade do epitélio de responder satisfatoriamente à injúria proporcionada pela bactéria, aumentando as chances de uma eficiente resposta imune capaz de debelar a infecção que, de outro modo, poderia permanecer por maior período de tempo assintomática ou subclínica.

Durante o processo diarreico a integridade da superfície intestinal pode ser abalada por patógenos entéricos, e este ponto representa um dos elementos importantes da patologia causada por tais microorganismos. A capacidade de lesionar a mucosa do trato gastrointestinal acontece graças a habilidade conferida a tais patógenos de desequilibrar o balanço homeostático existente entre a produção de novas células e a morte das células epiteliais preexistentes, o que pode resultar em furos na barreira funcional intestinal.

O balanço entre proliferação e morte celular é fundamental à manutenção da homeostase do organismo e a ineficiência ou defeitos neste processo podem contribuir para muitas patologias humanas. Nossos resultados apontam que a EAEC é capaz de interferir negativamente nestes dois parâmetros, ou seja, apresenta tanto a habilidade de reduzir a ação proliferativa do epitélio quanto a capacidade de aumentar a morte celular. O resultado das duas ações é a clara descompensação do equilíbrio entre produção de novas células e a morte destas.

Após 24h, os índices de apoptose não mostraram diferença entre quaisquer dos grupos. É somente através dos resultados de necrose que se verifica uma diferença significativa na capacidade indutora de morte celular entre as duas cepas bacterianas utilizadas. O índice de morte celular proporcionado pela infecção da cepa patogênica é muito superior a morte causada pela cepa comensal; esta, por sua vez, não demonstra diferença em relação aos controles não infectados.

Na interpretação de tais resultados é extremamente relevante considerar alguns aspectos do modelo experimental e da metodologia empregada na quantificação da morte celular. Além da apoptose e necrose, muitos outros tipos de morte têm sido descritos tais como a autofagia, catástrofe mitótica, anóxia, cornificação, excitotoxicidade e a degeneração de Wallerian (KRYSKO *et al.*, 2008). Considerando a limitação da técnica, é conveniente perguntar se não seria outro tipo de morte, além da apoptose e necrose, aquele envolvido na patogenia da infecção por EAEC. A morte por autofagia, por exemplo, é um mecanismo de sobrevivência ativado em células sujeitas a privação de nutrientes ou fatores de crescimento (KRYSKO *et*

al., 2008), estresse celular, infecção e dano mitocondrial (VEREECKE; BEYART; VAN LOO, 2011). Alguns autores têm chamado atenção para o papel da glutamina na modulação da capacidade autofágica de alguns tipos celulares.

A necrose é a mais grave forma de morte celular e ocorre em múltiplas patologias, incluindo distúrbios neurodegenerativos, isquemia, toxicidade neuronal e infecções (MCCALL, 2010). É um termo que tem sido usado para descrever muitos tipos de morte celular (MCCALL, 2010) e tem causado algumas confusões. É importante distinguir a necrose de outras formas de morte celular, particularmente porque esta se encontra, com frequência, associada com perda injustificável de células em muitas patologias humanas. Entretanto, não há uma definição bioquímica clara de necrose celular e conseqüentemente nenhum marcador bioquímico que possa discriminar de forma inequívoca a necrose da apoptose (KRYSKO *et al.*, 2008). Mesmo a interpretação morfológica da morte celular pode ser muito complexa, podendo células apoptóticas passíveis de serem confundidas com células necróticas. A discriminação mais acurada só é possível através de uma abordagem integrada baseada tanto em parâmetros bioquímicos como morfológicos (KRYSKO *et al.*, 2008). Esta parece ser uma das principais limitações da técnica empregada para quantificação da morte celular pelo presente estudo: a possibilidade de que parte da necrose observada seja secundária, ou seja, uma necrose resultante de um processo apoptótico não depurado. Quando células apoptóticas não são depuradas por fagócitos, como em modelos *in vitro*, suas membranas tornam-se gradativamente mais permeabilizadas possibilitando a marcação pelo iodeto de propídio e, conseqüentemente, sua leitura como células necróticas (KRYSKO *et al.*, 2008). Todavia, sob a luz de conhecimentos mais recentes, a possibilidade contrária não deve ser descartada, a de que a necrose representa, de fato, o principal tipo de morte relacionado com a EAEC.

Durante muito tempo a necrose tem sido descrita como conseqüência do estresse causado por condições físico-químicas extremas, choque osmótico, estresse mecânico, extremos de frio ou calor, altas concentrações de peróxido de hidrogênio, dentre outros (KRYSKO *et al.*, 2008; FESTJENS; BERGHE; VANDENABEELE, 2006). Sob tais condições, a morte celular ocorreria de forma muito rápida através de um processo não controlado como conseqüência do estresse direto sobre a célula. Contudo, em anos mais recentes um grande corpo de evidências mostra que a necrose não é um tipo passivo de morte que acontece de forma acidental, mas sim

um processo que cumpre importante papel na fisiologia e patologia (MCCALL, 2010; FESTJENS; BERGHE; VANDENABEELE, 2006; KRYSKO *et al.*, 2008). Hoje é sabido que uma grande variedade de estímulos celulares (TNF, dsRNA, IFN- γ , depleção de ATP, isquemia) são capazes de induzir um processo necrótico através de uma sinalização e sequência bem definida de eventos que lembram um verdadeiro programa de morte celular (KRYSKO *et al.*, 2008) sendo provavelmente mantido também sob controle genético da célula (MCCALL, 2010).

A ativação de qualquer programa de morte celular é o resultado de um fino balanço entre sinais indutores de apoptose auto propagados e sinais supressores do programa de morte celular (FESTJENS; BERGHE; VANDENABEELE, 2006). Ao chegar num ponto irreversível onde a morte celular deve ocorrer, um mecanismo tanatogênico geralmente desencadeia a forma apoptótica de morte celular utilizando as vias dependentes e independentes de caspases, pois este tipo de morte evita respostas inflamatórias e autoimunes que são potencialmente perigosas para o organismo (PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003). Mas em alguns casos, a via necrótica é ativada sem, no entanto, significar que houve falha da ativação da via apoptótica. O programa de necrose em células da barreira imunológica (como a mucosa intestinal) em resposta à infecção por patógenos, desempenha um importante mecanismo adaptativo do organismo, pois a necrose é capaz de suscitar uma resposta inflamatória mais potente mobilizando maior número células do sistema imune aumentando as chances do organismo de debelar a infecção (PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003). O atual reconhecimento de que a necrose pode acontecer de forma programada, num processo denominado especificamente de necroptose, torna mais difícil concluir sobre o papel da lesão bacteriana e o efeito protetor da glutamina e Ala-Gln no presente trabalho. Estudos adicionais com investigações bioquímicas e morfológicas serão necessárias para compreender qual é a via de morte ativada nas células IEC-6 e a via mecanística pela qual a Ala-Gln confere proteção a tais células.

Ainda que não seja possível afirmar com exatidão sobre o real tipo de morte, é a interação com a cepa patogênica que determina os maiores índices de morte entre os grupos do presente estudo. A privação de glutamina exógena nem a adição desta em sua forma livre ou na forma Ala-Gln não exibiram diferenças sobre quaisquer das formas de morte avaliadas em grupos não-infectados durante o período de 24h.

A ação anti-apoptótica da glutamina já foi relatada em diversos modelos *in vitro* e *in vivo*. Utilizando experimentação *in vitro*, glutamina demonstrou ter ação anti-apoptótica sobre células humanas HT-29 tratadas com citocinas indutoras de morte celular (EVANS; JONES; ZIEGLER, 2003) e sobre células do intestino de rato IEC-18 tratadas com cloreto de amônio (BAN; KOZAR, 2010).

Alguns autores hipotetizam que a proteção anti-apoptótica da glutamina está relacionada com a modulação da proteína de Especificidade 3 (Sp3). Sp3 pertence a uma família de proteínas de fatores de transcrição altamente conservadas que compreende nove tipos de Sp das quais as mais estudadas são Sp1-Sp4. Estruturalmente semelhantes, Sp1 e Sp3, interagem com outras proteínas e ativam ou reprimem a expressão de genes alvos (BAN; KOZAR, 2010). Ban e Kozar (2010) verificaram que o nível de sp3 se correlaciona inversamente com a concentração de glutamina em células IEC-6, causando redução significativa de morte naquelas células que recebiam suplementação com glutamina. A inibição de Sp3 reduziu a expressão e atividade das caspases-3, -8 e -9. A partir de então, os autores hipotetizaram que a proteção anti-apoptótica da glutamina sobre células intestinais dá-se pela inibição da via Sp3.

Outros estudos sugerem que ação protetora da glutamina sobre mucosa intestinal dá-se por diversas vias como a indução de proteínas de choque térmico (HSP) (MATÉS *et al.*, 2002). HSP são proteínas com reconhecida ação protetora e com importante ação reguladora de programas tanatogênicos. A maioria das HSP estudadas como HSP70 e HSP27 são capazes de inibir a apoptose desencadeadas por estímulos vários como choque térmico, estresse oxidativo, TNF, radiação ultravioleta e quimioterápicos. Aumento da expressão destas proteínas também protegem células da necrose causada por choque térmico e isquemia/reperfusão (PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003). Em ratos com choque séptico induzido por LPS, a administração de glutamina induziu aumento de HSP25 e HSP72 e foi capaz de reduzir de forma significativa o dano resultante aos órgãos e a mortalidade dos animais (SANTORA; KOZAR, 2010;)

Outros estudos propõem outras ações para a glutamina. De forma ainda mais direta, a glutamina pode ser capaz de aumentar a expressão de proteínas repressoras do processo apoptótico como proteínas da família Bcl-2, reduzir a expressão de proteínas pró-apoptóticas e inibir algumas das caspases envolvidas na morte celular. Acerca das caspases o contrario também seria verdade, a privação de glutamina

poderia induzir apoptose pela sequencia de ativação das caspase-3 e caspase-8 (BAN;KOZAR, 2010), no entanto não foi o que observamos em nossos resultados.

Além do fato claramente observável de que a glutamina foi capaz de reduzir dramaticamente o índice de morte causada pela EAEC em nosso modelo, torna-se difícil explicar acerca dessa proteção conferida contra a morte celular. Principalmente por não ser possível afirmar com exatidão sobre o tipo de morte induzido pela bactéria e como tal morte se processa, informação de acentuada importância, pois a proteção anti-apoptótica da glutamina pode acontecer de diferentes maneiras em função do estímulo dado (MATÉS *et al.*, 2002). A literatura disponibiliza diferentes formas de induzir morte celular, entretanto todas elas compartilham o fato de ser um tipo de morte com mecanismos relativamente esclarecidos, uma vez que o dano é geralmente causado por administração de alguma toxina, substância química ou agente físico. Para experimento de cocultura há uma escassez de trabalhos relacionados de forma tal que não é possível afirmar ao certo como se dá a perda celular em um modelo onde a morte é determinada por uma complexa interação de dois sistemas biológicos.

Ainda que não seja possível afirmar sobre os mecanismos moleculares da morte dos enterócitos desafiados com EAEC ou sobre como se processa as ações moleculares do dipeptídeo necessárias à redução de tal morte, parte da ação protetora da Ala-Gln pode ser explicada com informação obtida através do estudo da modulação de citocinas no modelo de barreira intestinal. Embora tenhamos estudado diversas citocinas, apenas duas (TNF- α E IL-6) parece ter relevância no contexto do modelo utilizado.

IL-6 é uma citocina pleiotrópica com uma variedade de efeitos sobre células e tecidos (JIN *et al.*, 2010). É secretada em resposta a estímulos pró-inflamatórios por diversos tipos celulares, inclusive células do epitélio intestinal (AL-SADI; BOIVIN; MA, 2009). Alguns estudos tem demonstrado que IL-6 desempenha função degenerativa e favorece o dano a mucosa tendo sido também associada a progressão da colite (SUZUKI; YOSHINAGA; TANABE, 2006). Por outro lado, diversos outros trabalhos têm demonstrado um papel protetor da IL-6 sobre a função e integridade da mucosa intestinal (KIMIZUKA, NAKAO, NALESNIK, 2004). Entretanto, ainda não existe consenso acerca do real papel da IL-6 sobre a regulação da função da barreira intestinal.

Nos resultados obtidos pelo presente trabalho, ao término da infecção o nível de IL-6 no grupo infectado com HS é significativamente superior ao infectado com

EAEC. Entretanto, a análise realizada imediatamente 6h após a adição do dipeptídeo revela uma grande capacidade da Ala-Gln em aumentar a secreção de IL-6 mantendo-a significativamente alta também no tempo de 12h. Tais resultados sugerem que a Ala-Gln é capaz de promover um aumento da secreção de IL-6 em células infectadas com EAEC, sendo este aumento um das explicações para a redução da morte celular proporcionada pelo dipeptídeo em células que foram infectadas com EAEC. Apesar do comportamento da IL-6 relatado como ambíguo, em parte por ser esta uma citocina com ações tanto pró quanto anti-inflamatórias, nossos resultados corroboram àqueles relatados por Jin *et al.* (2010) de que a IL-6 desempenha um papel protetor na injúria promovida ao epitélio intestinal, aumentando dramaticamente a sobrevivência dos enterócitos e desempenhando importante papel na manutenção da função da barreira intestinal.

Muitos estudos tem demonstrado que as ações anti-apoptóticas da IL-6 sobre células epiteliais intestinais ocorre graças à capacidade de tal citocina em modular algumas vias envolvidas com morte celular (JIN *et al.*, 2010). Tal modulação acontece através da alteração do equilíbrio de algumas proteínas celulares e incluiria o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas como membros da família Bcl-2, FLIP e ref-1 (ROLLWAGEN *et al.*, 2006) e redução da expressão ou atividade de proteínas pro-apoptóticas como Fas e certas caspases, particularmente as caspases-3 e -6 (JIN *et al.*, 2010; ROLLWAGEN *et al.*, 2006). Considerando os relatos que a glutamina apresenta ação semelhante de aumentar proteínas anti-apoptóticas e reduzir proteínas pró-apoptóticas, a secreção de IL-6 pode vir a representar um elo entre ação protetora da glutamina sobre a barreira intestinal e suas ações moleculares.

A secreção de TNF- α demonstrou certa complementaridade com a secreção de IL-6. Embora o nível de TNF- α no tempo de 6h tenha sido superior no grupo infectado e tratado em relação ao grupo que não recebeu tratamento, percebemos uma inversão no tempo de 12h, onde o nível de TNF- α no grupo tratado é significativamente reduzido para níveis inferiores ao grupo infectado sem tratamento.

A ação do TNF- α não está relacionada apenas com a indução da morte celular em tecidos afetados. TNF- α leva ao encurtamento dos villi como consequência da perda de células do topo do vilus por apoptose. Mesmo em baixas doses TNF- α leva a perda de água e desestabilização da função da barreira através de um processo que resulta na internalização de ocludina, uma importante proteína componente das junções firmes. Em altas concentrações TNF induz exfoliação massiva das células do

epitélio intestinal como resultado da redistribuição das proteínas do complexo apical juncional, necessárias à extrusão das células apoptóticas (VEREECKE; BEYART; VAN LOO, 2011). Assim, ao reduzir a secreção de TNF- α , o dipeptídeo soma mais uma ação na redução da morte celular e preservação da integridade do epitélio intestinal.

No efeito evidente de reduzir o índice de morte em monocamada de células epiteliais, a Ala-Gln demonstrou agir de forma síncrona modulando simultaneamente duas citocinas envolvidas no processo de morte celular. Reduzindo os níveis de secreção de TNF- α paralela ao aumento da secreção de IL-6.

Enquanto a migração acontece de forma independente do processo proliferativo, a proliferação é considerada como uma fase tardia do processo de reparo epitelial (RAY *et al.*, 2003) pois acontece por volta de 24h após o processo migratório (BLIKSLAGER *et al.*, 2007). Apresenta uma importância crucial na manutenção da arquitetura do villus e permite manter um estoque de células e repondo aquelas ausentes em decorrência da migração para áreas desnudas.

Como já afirmado, nossos resultados evidenciam uma acentuada habilidade da cepa EAEC em reduzir o efeito proliferativo das células intestinais *in vitro*. Ação esta não observada para cepa comensal HS. Os mesmos dados demonstram também a capacidade do dipeptídeo em restaurar a capacidade proliferativa da monocamada de células infectadas com a cepa patogênica de EAEC.

7 CONCLUSÃO

A suplementação de Ala-Gln 10mM à células da mucosa intestinal ante a ausência de estresse, apresenta diferenças mínimas quando comparada ao fornecimento da forma livre de glutamina (4mM) presente no meio padrão destinado ao cultivo celular.

A ausência de uma fonte exógena de glutamina à células do epitélio intestinal pode ser um fator predisponente a infecção por EAEC uma vez que a privação deste micronutriente pode predispor a uma resposta celular menos reativa ao estímulo infeccioso.

A redução da transcrição NF-kB, TLR5 e IL8, principalmente durante a fase inicial da infecção, pode ser uma causa provável do sucesso da EAEC na colonização do trato intestinal de forma assintomática e por períodos prolongados.

A redução da transcrição dos genes das Rho GTPases pode representar uma das causas da redução da migração de células do epitélio intestinal e podem estar correlacionada com a baixa eficiência do processo de reparo intestinal. Contudo a suplementação com Ala-Gln não foi capaz de promover aumento da transcrição de tais genes.

O efeito protetor da suplementação de Ala-Gln sobre a morte de células do epitélio intestinal pode estar relacionada com a redução da expressão de TNF- α e com o aumento concomitante de IL-6.

REFERÊNCIAS

AL-SADI, R.; BOIVIN, M.; MA, T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. **Front Biosci.**, v.14, p.2765-2778, 2009.

ARAUJO, J.M.; TABARELLI, G.F.; ARANDA, K.R.; FABBRICOTTI, S.H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C.M.; SCALETSKY, I.C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhoea-associated pathotypes among Brazilian children. **J Clin Microbiol.**, v. 45, n. 10, p. 3396-3399, 2007.

BAN, K.; KOZAR, R. Glutamine protects against apoptosis via downregulation of Sp3 in intestinal epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v.299, p. 1344-1353, 2010.

BHUTTA, Z.A.; GHISHAN, F.; LINDLEY, K.; MEMON, I.A.; MITTAL, S.; RHOADS, M. Persistent and chronic diarrhea and malabsorption: Working Group Report of the Second World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 39, n. 2, p. 711-716, 2004.

BHUTTA, Z.A.; NELSON, E.A.; LEE, W.S.; TARR, P.I.; ZABLAH, R.; PHUA, K.B.; LINDLEY, K.; BASS, D.; PHILLIPS, A. Recent advances and evidence gaps in persistent diarrhea. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 48, n.2, p. 260-265, 2008.

BLACK, R.E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H.L.; LAWN, J.E.; RUDAN, I.; BASSANI, D.G.; JHA, P.; CAMPBELL, H.; WALKER, C.F.; CIBULSKIS, R.; EISELE, T.; LIU, L.; MATHERS, C. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet.**, v. 375, n. 9730, p. 1969-1987, 2010.

BLIKSLAGER, A.T.; MOESER, A.J.; GOOKIN, J.L.; JONES, S.L.; ODLE, J. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. **Physiol Rev.**, v. 87, n. 2, p. 545-564, 2007.

BOISEN, N.; RUIZ-PEREZ, F.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K.A.; NATARO, J.P. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 80, n. 2, p. 294-301, 2009.

BOSCHI-PINTO, C.; VELEBIT, L.; SHIBUYA, K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. **Bull World Health Organ.**, v. 86, n. 9, p. 710-717, 2008.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Indicadores de Mortalidade: C.6 mortalidade proporcional proporcional por doença diarreica aguda em menores de 5 anos de idade. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2007/c06.def> Acesso em 10.07.2012.

BRASSE-LAGNEL CG, LAVOINNE AM, HUSSON AS. Amino acid regulation of mammalian gene expression in the intestine. **Biochimie.**, v. 92, n. 7, p. 729-735, 2010.

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

CARMODY, R.J.; CHEN, Y.H. Nuclear fator-kappa B: activation and regulation during toll-like receptor signaling. **Cell Mol Immunol.**, v.4, n.1, p.31-41. 2007.

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.

CHEN, J.; LEE, C. T.; ERRICO, S. L.; BECKER, K. G.; FREED, W. J. Increases in expression of 14-3-3 eta and 14-3-3 zeta transcripts during neuroprotection induced by delta9-tetrahydrocannabinol in AF5 cells. **J. Neurosci. Res.**, v. 85, n. 8, p. 1724-1733, 2007.

CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFÁN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. **Lancet.**, v. 337, n. 8736, p. 262-264, 1991.

DE ANDRADE, J.A.; FREYMÜLLER, E.; FAGUNDES-NETO, U. Adherence of enteroagregative *Escherichia coli* to the ileal and colonic mucosa: an in vitro study utilizing the scanning electron microscopy. **Arq Gastroenterol.**, v. 48, n. 3, p. 199-204, 2011.

DE ANDRADE, J.A.B.; FAGUNDES-NETO, U. Persistent diarrhea: still an important challenge for the pediatrician. **J. Pediatr. (Rio J.)**, Porto Alegre, v. 87, n. 3, 2011.

DUDLEY, E.G.; THOMSON, N.R.; PARKHILL, J.; MORIN, N.P.; NATARO, J.P. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol.**, v. 61, n. 5, p. 1267-1282, 2006.

DUTTA, P.R.; CAPPELLO, R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J.P. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. **Infect Immun.**, v. 70, p. 7105–7113, 2002.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCIA, F.; CZECZULIN, J.R.; HENDERSON, I.R.; CRAVIOTO A.; NATARO J.P. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, v. 66, p. 3155-3153, 1998.

EVANS, M.E.; JONES, D.P.; ZIEGLER, T.R. Glutamine prevents cytokine-induced apoptosis in human colonic epithelial cells. **J Nutr.**, v. 133, n. 10, p. 3065-3071, 2003.

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

FESTJENS, N.; BERGHE, T.V.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1757, p.1371-1387, 2006.

FISCHER WALKER, C.L.; PERIN, J.; ARYEE, M.J.; BOSCHI-PINTO, C.; BLACK, R.E. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. **BMC Public Health.** v. 12, n. 220, 2012.

GREENBERG, D.E.; JIANG, Z.D.; STEFFEN, R.; VERENKER, M,P.; DUPONT, H.L. Markers of inflammation in bacterial diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenicity. **J Infect Dis.**, v.185, p.944-9, 2002.

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

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

HUANG YH, WANG PW, TIAO MM, CHOU MH, DU YY, HUANG CC, CHUANG JH. Glucocorticoid modulates high-mobility group box 1 expression and Toll-like receptor activation in obstructive jaundice. **J Surg Res.**, v. 170, n. 1, p. 47-55, 2011.

HUANG, Y.; LI, N.; LIBONI, K.;NEU, J. Glutamine decreases lipopolysaccharide-induced IL-8 production in Caco-2 cells through a non-NF- κ B p50 mechanism. **Cytokine.**, v.22, p.77-83. 2003.

IIZUKA, M.; KONNO, S. Wound healing of intestinal epithelial cells. **World J Gastroenterol.**, v.17, n.17, p.2161-2171, 2011.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Indicadores Sociais Municipais: uma análise dos resultados do universo do Censo Demográfico, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/indicadores_soci

[ais_municipais/default_indicadores_sociais_municipais.htm](#)> Acesso em: 2 Ago. 2012.

JIMÉNEZ-CHILLARÓN JC, DÍAZ R, MARTÍNEZ D, PENTINAT T, RAMÓN-KRAUEL M, RIBÓ S, PLÖSCH T. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. **Biochimie**. 2012 Jul 5

JIN, X.; ZIMEERS, T.A.; ZHANG, Z.; PIERCE, R.H.; KONIARIS, L.G. Interleukin-6 is an important in vivo inhibitor of intestinal epithelial cell death in mice. **Gut.**, v. 59, p186-196, 2010

KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. **Trends Mol Med**. v.13, n.11, p.460-9. 2007

KESSEL, A.; TOUBI, E.; PAVLOTZKY, E.; MOGILNER, J.; CORAN, A.G.; LURIE, M.; KARRY, R.; SUKHOTNIK, I. Treatment with glutamine is associated with down-regulation of Toll-like receptor-4 and myeloid differentiation factor 88 expression and decrease in intestinal mucosal injury caused by lipopolysaccharide endotox-aemia in a rat. **Clin. Exp. Immunol**, V.151, p.341-347, 2008

KIM, H. Glutamine as an immunonutrient. **Yonsei Med J**, v. 52, n. 6, p. 892-897, 2011.

KRYSKO, D.V.; BERGH, T.V.; HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods.**, v.44, p.205-221, 2008.

LAMBERTI L.M.; FISCHER WALKER, C.L.; BLACK, R.E. Systematic review of diarrhea duration and severity in children and adults in low- and middle-income countries. **BMC Public Health**. 2012 Apr 6;12:276.

LE NEGRATE, G. Subversion of innate immune responses by bacterial hindrance of NF-kB pathway. **Cell Microbiol.**, v. 14, n. 2, p. 155-167. 2012

LEI, L.; LI, J.; WANG, J. Y.; YANG, C. Q.; JIA, M. L.; JIANG, W. Role of RhoA in platelet-derived growth factor-BB-induced migration of rat hepatic stellate cells. **Chin Med J (Engl)**., v. 123, n. 18, p. 2502-2509, 2010.

LEVINE M.M.; CAPLAN E.S.; WATERMAN D.; CASH R.A.; HORNICK R.B.; SNYDER M.J. Diarrhea caused by Escherichia coli that produce only heat-stable enterotoxin. **Infect Immun.**, v. 17, n. 1, p. 78-82, 1977.

LEVINE, M.M.; BERGQUIST, E.J.; NALIN, D.R.; WATERMAN, D.H.; HORNICK, R.B.; YOUNG, C.R.; SOTMAN S. Escherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet.**, v. 1, n. 8074, p. 1119-1122, 1978.

LIMA, A. A.; FANG, G.; SCHORLING, J. B.; DE ALBUQUERQUE, L.; McAULIFFE, J. F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil:

etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr.** v. 81, Suppl. 381: p. 39-44, 1992.

MATILLA. B.; ORTIZ, J.; GONZALEZ, P.; GARCÍA-DÍEZ. F.; JORQUERA, F.; CULEBRAS, J.M.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; TUÑÓN M.J. Effects of parenteral nutrition supplemented with glutamine or glutamine dipeptides on liver antioxidant and detoxication systems in rats. **Nutrition**, v.16, n.2, p.125-128, 2000.

MCCALL, K. Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death

MCCORMACK, S.A.; VIAR, M.J.; JOHNSON, L.R. Migration of IEC-6 cells: a model for mucosal healing. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 263, n. 3, p. 426-435, 1992.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A.; .Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science.** v.296, n.8, p. 298 –300, 2002.

MOAL, V.L.; COMENGE, Y.; RUBY, V.; AMSELLEM, R.; NICOLAS, V.; SERVIN, A.L.; Secreted autotransporter toxin (Sat) triggers autophagy in epithelial cells that relies on cell detachment. **Cell Microbiol.**, v. 13, n. 7, p. 992-1013, 2011.

MOORE, S. ; LIMA, N. L. ; SOARES, A. M. ; ORIA, R. B. ; PINKERTON, R. C. ; BARRET, L. J. ; GUERRANT, R. L. ; LIMA, A. . Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. **Gastroenterology**, v. 4, p. 1156-1164, 2010.

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

NATHAN C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol**, v. 6, p.173–182, 2006.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W.P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative E. coli. **Gut Microbes.**, v. 2, n. 1, p. 13-24, 2011.

NGAMWONGSATIT, P.; BANADA, P.P.; PANBANGRED, W.; BHUNIA, A.K. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic Bacillus species using CHO cell line. **J Microbiol Methods.**, v. 73, n. 3, p. 211-215, 2008.

O'CONNOR, K.L.; NGUYEN, B.K.; MERCURIO, A.M. RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the alpha6beta4 integrin and cAMP metabolism. **J Cell Biol.**, v. 148, n. 2, p. 253-258, 2000.

PFÄFFL MW, HORGAN GW, DEMPFLER L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, v. 1, n. 30, p. e36, 2002

PFÄFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 9, p. 1-10, 2002.

POCHMANN, Marcio. Estrutura social no Brasil: mudanças recentes. Serv. Soc. Soc., São Paulo, n. 104, Dec. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-66282010000400004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 31 Ago. 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-66282010000400004>

PROSKURYAKOV, Y.; KONOPLYANNIKOV, A.G.; GABAI, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Exp Cell Res.**, v. 283, p. 1-16, 2003.

QUARONI, A.; WANDS, J.; TRELSTAD, R.L.; ISSELBACHER, K.J. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. **J Cell Biol.**, v. 80, n. 2, p. 248-265. 1979.

RASKO, D.A.; ROSOVITZ, M.J.; MYERS, G.S.; MONGODIN, E.F.; FRICKE, W.F.; GAJER, P.; CRABTREE, J.; SEBAIHIA, M.; THOMSON, N.R.; CHAUDHURI, R.; HENDERSON, I.R.; SPERANDIO, V.; RAVEL, J. The pangenome structure of Escherichia coli: comparative genomic analysis of E. coli commensal and pathogenic isolates. **J Bacteriol.**, v. 190, n. 20, p. 6881-6893, 2008.

RAY, R.M.; MCCORMACK, S.A.; COVINGTON, C.; VIAR, M.J.; ZHENG, Y.; JOHNSON, L.R. The requirement for polyamines for intestinal epithelial cell migration is mediated through Rac1. *J Biol Chem.*, v. 278, n. 15, p.13039-13046, 2003.

ROLLWAGEN, F.M.; MADHAVAN, S.; SINGH, A.; LI Y.Y.; WOLCOTT, K.; Maheshwari, R. IL-6 protects enterocytes from hypoxia-induced apoptosis by induction of bcl-2 mRNA and reduction of fas mRNA. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.347, n.4, p.1094-8, 2006

RUCHAUD-SPARAGANO, M.H.; MARESCA, M.; KENNY, B. Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) inactivate innate immune responses prior to compromising epithelial barrier function. **Cell Microbiol.**, v.9, n.8, p.1909-1921, 2007.

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

SHATKIN, A.J.; REICH, E.; FRANKLIN, M.; TATUM, E.L. Effect of mitomycin C on mammalian cells in culture. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 55, p. 277-289, 1962.

SILKE, J. The regulation of TNF signalling: what a tangled web we weave. **Curr Opin Immunol.**, v. 23, n. 5, p. 620-626, 2011.

SNYDER, J.D.; MERSON, M.H. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. **Bull World Health Organ.**, v. 60, n. 4, p. 605-613, 1982.

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

STRAND, T.A.; SHARMA, P.R.; GJESSING, H.K.; ULAK, M.; CHANDYO, R.K.; ADHIKARI, R.K.; SOMMERFELT, T. H. Risk factors for extended duration of acute diarrhea in young children. *PLoS One.*, v. 7, n. 5, p. e36436, 2012.

SUN, L.X.; CHEN, L.H.; LIN, Z.B.; QIN, Y.; ZHANG, J.Q.; YANG, J.; MA, J.; YE, T.; LI, W.D.; Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on IEC-6 cell proliferation, migration and morphology of differentiation benefiting intestinal epithelium healing in vitro. *J Pharm Pharmacol*, v. 63, n. 12, p. 1595-603, 2011.

SYLVESTER, P.W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol.*, v. 716, p.157-168, 2011.

VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Annexin V-Affinity Assay: a Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry.*, v. 31, p.1-9, 1998.

VELARDE, J.J.; VARNEY, K.M.; INMAN, K.G.; FARFAN, M.; DUDLEY, E.; FLETCHER, J.; WEBER, D.J.; NATARO, J.P. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*, v. 66, n. 5, p. 1123-1135, 2007.

VEREECKE, L.; BEYART, R.; VAN LOO, G. Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease. *Trends Mol Med.*, v.17, n.10, p.19-20, 2011.

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

VINGGAARD, A.M.; JACOBSEN, H.; METZDORFF, S.B.; ANDERSEN, H.R.; NELLEMAN, C. Antiandrogenic effects in short-term in vivo studies of the fungicide fenarimol. *Toxicology.*, v. 207, n. 1, 2005.

VISWANATHAN, VK., HODGES, K., HECHT, G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhea. *Nat. Rev. Microbiology.*, v.7, n. 2, p. 110 –119, 2009.

WAN, F.; WEAVER, A.; GAO, X.; BERN, M.; HARDWIDGE. IKK β phosphorylation regulates RPS3 nuclear translocation and NF- κ B function during infection with *Escherichia coli* strain O157:H7. *Nat Immunol.*, v.12, n.4, p.335-43. 2011

WHELLER, A.P.; RIDLEY, A.J. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res.* v. 301, n. 1, p. 43-9, 2004.

YU, Y.; ZENG, H.; LYONS, S.; CARLSON, A.; MERLIN, D.; NEISH, A.S.; GERWITZ, T. TLR5-mediated activation of p38 MAPK regulates epithelial IL-8 expression via posttranscriptional mechanism. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 285, p.282-290. 2003.

ZHU, X.; LUO, J.; CHEN, X.; WANG, J.; WANG, G.; LI, H.; XU, Y.; FENG, J.; TU, H. Expression characteristic and significance of interleukin-6, nuclear factor kappa beta, and bone formation markers in rat models of osteoporosis. **Transl Res.**, v. 152, n. 1, p. 18-23, 2008.