

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

**EFEITO SECRETÓRIO INTESTINAL DO SOBRENADANTE DE  
MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM A TOXINA A DO *CLOSTRIDIUM*  
*DIFFICILE*: PAPEL DA INTERLEUCINA-1 $\beta$**

FC-00006112-9

**MARCOS FÁBIO GADELHA ROCHA**

**FORTALEZA-CE**

**1998**

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

EFEITO SECRETÓRIO INTESTINAL DO SOBRENADANTE DE  
MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM A TOXINA A DO *CLOSTRIDIUM*  
*DIFFICILE*: PAPEL DA INTERLEUCINA-1 $\beta$

MARCOS FÁBIO GADELHA ROCHA

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, sob orientação do **Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima**, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

FORTALEZA-CE

1998

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

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial desta Instituição.

*Marcos Fábio Gadelha Rocha*  
\_\_\_\_\_  
Marcos Fábio Gadelha Rocha

**Data da Defesa:** 14/05/1998

**Banca Examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

~~Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro~~

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles

~~Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha~~

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jorge Sabbaga

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

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial desta Instituição.

\_\_\_\_\_  
Marcos Fábio Gadelha Rocha 

**Data da Defesa:** 14/05/1998

**Banca Examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jorge Sabbaga

## AGRADECIMENTOS

*(...) e aprendi que se depende sempre  
de tanta muita diferente gente  
toda pessoa sempre é as marcas das  
lições diárias de outras tantas pessoas*

*e é tão bonito quando a gente entende  
que a gente é tão gente  
onde quer que a gente vá*

*é tão bonito quando a gente sente  
que nunca está sozinho  
por mais que pense estar...*

(Caminhos do coração) Luiz Gonzaga Jr.

Com base nos trechos da música “Caminhos do coração”, poder-se-ia dedicar este trabalho a uma infinidade de pessoas, professores, pesquisadores e entidades que, de alguma maneira, me influenciaram no decorrer da sua elaboração, cada um estando presente de várias formas e em algum lugar deste estudo.

Dessa forma, cumpre-me expressar reconhecimentos a todos aqueles que contribuíram neste projeto, em especial:

Ao Prof. Dr. **Aldo Ângelo Moreira Lima**, pela orientação científica e efetiva participação durante todas as etapas deste trabalho.

Aos Professores Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, Dr. Alberto Melo Soares, Dr. Manassés Claudino Fonteles e Dr. Carlos Alberto Flores (*in memoriam*), que muito contribuíram cientificamente.

Aos Senhores Dr. Richard L. Guerrant (Universidade da Virgínia, VA-USA) e Dr. David M. Lyerly (TECLAB, VA-USA), pelo fornecimento das toxinas A e B e outros materiais utilizados na fase experimental.

Aos Professores Dr. Krishnamurti M. Carvalho e Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho, pelo empenho no programa de pós-graduação em Farmacologia.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas, Maria do Carmo N. Pinho, Maria Isabel L.T. McAuliffe, Kátia Maria L. Nogueira, Terezinha F. França, José A. de Souza, Jociê A. Silva, Bento F. de Oliveira, Joana M. Tavares, Maria Silvia H. França, Valéria Jane, Maria Luzia S. Melo e Rosânia Maria P. Silva, que, de uma forma ou de outra, prestaram-me uma ajuda muito importante.

A Maria Jânia Teixeira, Adriana P. Nascimento, Francisco Arnaldo V. Lima, Aíla Maria M. Alves e Maria Rosália Rodrigues, pela inestimável colaboração.

Aos estudantes Germana C. Paixão (Mestranda), Nilberto R. F. Nascimento (Mestrando), Messias S. S. Neto (Mestrando), Alessandra C. Silva, Patrícia M. de Carvalho e José Estelita P. Aguiar, que participaram, de algum modo, nesse meu empreendimento.

A João Bosco Feitosa dos Santos e José Júlio Costa Sidrim, amigos de todas as horas e situações diversas.

A Nilza Dutra Alves e Adriana de Queiroz Pinheiro, pelo apoio e amizade.

Aos colegas do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará, em especial aos Professores José Clielder R. da Silva, Maurício Masih e Otacílio L. de Souza.

A Sílvia Maria A. de Lima e Vasco Pinheiro D. Bastos, pelo grande apoio na Coordenação do curso em Farmacologia.

Ao Prof. João Vianney Campos de Mesquita, pela revisão ortográfica.

Agradecimentos especiais, também, às instituições Universidade Federal do Ceará-UFC, Universidade Estadual do Ceará-UECE e Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1	Classificação das diarreias infecciosas.....	1
1.2	O <i>Clostridium difficile</i> como agente indutor de diarreia inflamatória....	3
1.2.1	Marcos Históricos.....	3
1.2.2	Microbiologia do <i>Clostridium difficile</i> .....	5
1.2.3	Toxinas do <i>Clostridium difficile</i> .....	6
1.2.4	Doenças relacionadas com o <i>Clostridium difficile</i> .....	7
1.2.5	Atividades biológicas das Toxinas A e B.....	8
1.3	Atividade funcional dos macrófagos no processo inflamatório agudo....	13
1.4	Fisiologia e imunofarmacologia da mucosa intestinal: papel de células e mediadores inflamatórios.....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAIS &amp; MÉTODOS</b> .....	26
3.1	Animais.....	26
3.1.1	Ratos.....	26
3.1.2	Coelhos.....	26
3.2	Toxinas.....	26
3.3	Drogas.....	27
3.4	Composição das soluções e meio de cultura.....	27
3.5	Cultura de macrófagos.....	29
3.5.1	Obtenção dos macrófagos.....	29
3.5.2	Manuseio dos macrófagos <i>in vitro</i> .....	30
3.5.3	Análise da viabilidade celular.....	32

3.6	Dosagem de citocinas.....	34
3.6.1	Ensaio para detecção de IL-1 $\beta$ .....	34
3.6.2	Ensaio para detecção de TNF- $\alpha$ .....	36
3.7	Câmaras de Üssing.....	38
3.7.1	Preparação da solução de Ringer.....	38
3.7.2	Preparação e montagem do íleo.....	38
3.7.3	Montagem e funcionamento das câmaras.....	39
3.8	Protocolos Experimentais.....	42
3.8.1	Atividade secretória intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com as toxinas A e B do <i>Clostridium difficile</i> .....	42
3.8.2	Efeito da toxina A na secreção intestinal.....	43
3.8.3	Efeito do anticorpo PCG <sub>4</sub> na síntese do fator de secreção intestinal produzido por macrófagos estimulados com toxina A.....	43
3.8.4	Atividade das toxinas da <i>Bordetella pertussis</i> sobre a liberação do fator de secreção intestinal.....	43
3.8.5	Efeito do inibidor de síntese protéica na liberação do fator de secreção intestinal.....	44
3.8.6	Ação dos inibidores de proteases sobre a liberação do fator de secreção intestinal.....	44
3.8.7	Efeito de inibidores de fosfolipase A <sub>2</sub> , ciclooxigenase, lipoxigenase e antagonista de PAF na síntese do fator de secreção intestinal.....	45
3.8.8	Efeito de inibidores da síntese de TNF- $\alpha$ na gênese do fator de secreção intestinal.....	45
3.8.9	Dosagem de TNF- $\alpha$ no sobrenadante de macrófagos estimulados com as toxinas A e B.....	46



3.8.10	Ação do antagonista do receptor de interleucina-1 na secreção intestinal.....	46
3.8.11	Efeito dos anticorpos monoclonais anti-IL-1 $\alpha$ e anti-IL-1 $\beta$ na secreção intestinal.....	47
3.8.12	Identificação da IL-1 $\beta$ como fator de secreção intestinal.....	47
3.8.13	Atividade da interleucina-1 $\beta$ na secreção intestinal.....	47
3.8.14	Ação da bumetanida na atividade secretória intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com a toxina A.....	48
3.8.15	Efeito do pré-tratamento da mucosa ileal com tetrodotoxina e indometacina sobre a secreção intestinal.....	48
3.9	Análise estatística.....	48
4	<b>RESULTADOS</b> .....	49
4.1	Efeito secretório intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A.....	49
4.2	Cinética tempo-efeito da secreção intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ou B.....	49
4.3	Efeito da toxina A nas câmaras de Üssing.....	50
4.4	Efeito do anticorpo PCG <sub>4</sub> na síntese do fator de secreção intestinal produzido por macrófagos estimulados com toxina A.....	50
4.5	Atividade das toxinas da <i>Bordetella pertussis</i> sobre a liberação do fator de secreção intestinal.....	50
4.6	Efeito do inibidor de síntese protéica na liberação do fator de secreção intestinal.....	51
4.7	Papel de proteases na síntese do fator de secreção intestinal.....	51
4.8	Atividade da dexametasona e quinacrina na liberação do fator de	

	secreção intestinal.....	52
4.9	Efeito dos inibidores de ciclo e lipoxigenase na síntese do fator de secreção intestinal.....	52
4.10	Envolvimento do fator de agregação plaquetária na gênese do fator de secreção intestinal.....	53
4.11	Efeito de inibidores da síntese de TNF- $\alpha$ na gênese do fator de secreção intestinal.....	53
4.12	Dosagem de TNF- $\alpha$ no sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ou B.....	53
4.13	Ação do antagonista do receptor de interleucina-1 na secreção intestinal.....	54
4.14	Efeito dos anticorpos anti-IL-1 $\alpha$ e anti-IL-1 $\beta$ na secreção intestinal.....	54
4.15	Identificação da interleucina-1 $\beta$ como fator de secreção intestinal.....	55
4.16	Estudo comparativo dos níveis de interleucina-1 $\beta$ no sobrenadante de macrófagos estimulados com doses equimolares de toxina A e B.....	55
4.17	Atividade da interleucina-1 $\beta$ na secreção intestinal.....	56
4.18	A bumetanida bloqueia a secreção intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulado com toxina A.....	56
4.19	Participação de prostaglandinas na atividade secretória intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulado com toxina A.....	57
4.20	Envolvimento do sistema nervoso entérico na secreção intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulado com toxina A....	57
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>107</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura-1</b>	Obtenção da monocamada de macrófagos.....	30
<b>Figura-2</b>	Manuseio dos macrófagos.....	31
<b>Figura-3</b>	Análise da viabilidade celular.....	32
<b>Figura-4</b>	Ensaio para detecção de interleucina-1 $\beta$ .....	35
<b>Figura-5</b>	Ensaio para detecção de TNF- $\alpha$ .....	37
<b>Figura-6</b>	Preparação do íleo.....	39
<b>Figura-7</b>	Funcionamento das câmaras de Üssing.....	42
<b>Figura-8</b>	Efeito secretório intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A.....	58
<b>Figura-9</b>	Cinética tempo-efeito da secreção intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ou B.....	59
<b>Figura-10</b>	Efeito da toxina A nas câmaras de Üssing.....	60
<b>Figura-11</b>	Efeito do anticorpo PCG <sub>4</sub> na síntese do fator de secreção intestinal produzido por macrófagos estimulados com toxina A.....	61
<b>Figura-12</b>	Atividade das toxinas da <i>Bordetella pertussis</i> sobre a liberação do fator de secreção intestinal.....	62
<b>Figura-13</b>	Efeito do inibidor de síntese protéica na liberação do fator de secreção intestinal.....	63

<b>Figura-14</b>	Papel de proteases na síntese do fator de secreção intestinal.....	64
<b>Figura-15</b>	Ação da dexametasona na gênese do fator de secreção intestinal....	65
<b>Figura-16</b>	Efeito do bloqueador de fosfolipase A <sub>2</sub> sobre a síntese do fator de secreção intestinal.....	66
<b>Figura-17</b>	Efeito do bloqueador dual de ciclo e lipoxigenase sobre a síntese do fator de secreção intestinal.....	67
<b>Figura-18</b>	Ação do inibidor de ciclooxigenase na síntese do fator de secreção intestinal.....	68
<b>Figura-19</b>	Efeito do inibidor de lipoxigenase na liberação do fator de secreção intestinal.....	69
<b>Figura-20</b>	Envolvimento do fator de agregação plaquetária na gênese do fator de secreção intestinal.....	70
<b>Figura-21</b>	Efeito da pentoxifilina sobre a síntese do fator de secreção intestinal.....	71
<b>Figura-22</b>	Ação da talidomida sobre a gênese do fator de secreção intestinal.....	72
<b>Figura-23</b>	Dosagem de TNF- $\alpha$ no sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ou B.....	73
<b>Figura-24</b>	Ação do antagonista do receptor de interleucina-1 na secreção intestinal.....	74
<b>Figura-25</b>	Efeito dos anticorpos anti-IL-1 $\alpha$ e anti-IL-1 $\beta$ na secreção intestinal....	75

<b>Figura-26</b>	Identificação da interleucina-1 $\beta$ como fator de secreção intestinal...	76
<b>Figura-27</b>	Estudo comparativo dos níveis de interleucina-1 $\beta$ no sobrenadante de macrófagos estimulados com doses equimolares de toxina A e B.....	77
<b>Figura-28</b>	Atividade da interleucina-1 $\beta$ na secreção intestinal.....	78
<b>Figura-29</b>	A bumetanida bloqueia a secreção intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulado com toxina A.....	79
<b>Figura-30</b>	Participação de prostaglandinas na atividade secretória intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulado com toxina A.....	80
<b>Figura-31</b>	Envolvimento do sistema nervoso entérico na secreção intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulado com toxina A.....	81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela-1</b>	Meio de cultura RPMI.....	28
<b>Tabela-2</b>	Solução de tioglicolato 3%.....	28
<b>Tabela-3</b>	Solução salina tamponada com fosfato (PBS).....	28
<b>Tabela-4</b>	Líquido de Turk.....	28
<b>Tabela-5</b>	Composição da solução de Ringer.....	29
<b>Tabela-6</b>	Percentual da viabilidade dos macrófagos.....	33

## ABREVIATURAS UTILIZADAS NO TRABALHO

anti-IL-1 $\alpha$	anticorpo monoclonal anti- interleucina-1 $\alpha$
anti-IL-1 $\beta$	anticorpo monoclonal anti- interleucina-1 $\beta$
ARU	seqüência repetida de aminoácidos da toxina A
BN52021	antagonista do receptor de PAF
BUMET	bumetanida
CaCo-2	células epiteliais humanas
CHX	cicloheximida
Cl <sup>-</sup>	cloreto
DEXA	dexametasona
DMSO	dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
fMLP	N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenil-alanina
FSI	fator de secreção intestinal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
I. PROT	inibidores de proteases
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL-1 $\alpha$	interleucina-1 $\alpha$
IL-1 $\beta$	interleucina-1 $\beta$
IL-1ra	antagonista do receptor de IL-1
IL-2	interleucina-2
IL-3	interleucina-3
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
INDO	indometacina
LPS	lipopolissacarídeo
LTB <sub>4</sub>	leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	leucotrieno C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	leucotrieno D <sub>4</sub>
M	molar
M $\phi$ s	macrófagos
$\mu$ A	microampere
Mk 886	<i>3[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropa-noic acid</i>
NaCl	cloreto de sódio

NDGA	ácido nordihidroguaiarético
PAF	fator de agregação plaquetária
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCG <sub>4</sub>	anticorpo monoclonal anti-toxina A
PGE <sub>1</sub>	prostaglandina E <sub>1</sub>
PGE <sub>2</sub>	prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	prostaglandina 2α
PGI <sub>2</sub>	prostaglandina I <sub>2</sub>
PTF:	pentoxifilina
QUINAC	quinacrina
RPMI	meio de cultura
SOB. Mφs	sobrenadante de macrófagos
T-84	células epiteliais humanas
TALID	talidomida
TNF-α	fator de necrose tumoral-α
TTX	tetrodotoxina
TxA	Toxina A
TxB	Toxina B
TxP	toxina pertussis ativa
TxPm	toxina pertussis mutante
vs.	versus
ΔIsc	delta da variação na corrente de curto-circuito



## RESUMO

O *Clostridium difficile* produz duas exotoxinas denominadas toxina A (TxA; 308 kDa) e toxina B (TxB; 279 kDa). O modo de ação intestinal dessas toxinas ainda é pouco compreendido, não obstante vários trabalhos científicos confirmarem seu envolvimento na patogênese de doenças diarréicas inflamatórias. No início desse estudo foi determinado o efeito secretório intestinal induzido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com TxA ou TxB, no íleo de coelho montado em câmaras de Üssing. A partir desse protocolo, observou-se que o sobrenadante de macrófagos estimulados com TxA ( $3,2 \times 10^{-7} \text{M}$ ,  $9,6 \times 10^{-7} \text{M}$  e  $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) causa secreção intestinal ( $\Delta \text{Isc} = 41,0$ ,  $52,0$  e  $90,0 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ , respectivamente). Entretanto, o sobrenadante de macrófagos tratados com TxB ( $3,6 \times 10^{-7} \text{M}$ ) não alterou de forma significativa essa atividade ( $\Delta \text{Isc} = 28,0 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  vs  $\Delta \text{Isc}_{\text{controle}} = 20,0 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Vale salientar que a adição de TxA ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) diretamente nas câmaras de Üssing não produziu secreção intestinal ( $\Delta \text{Isc} = 2,2 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Ademais, a gênese do fator de secreção intestinal (FSI), presente neste sobrenadante, foi bloqueada (80%) pela incubação de TxA com o PCG<sub>4</sub>. Na etapa seguinte, investigou-se o envolvimento de proteína G na gênese do FSI, através do tratamento prévio dos macrófagos com a toxina pertussis ativa. Daí, evidenciou-se que esse procedimento é capaz de bloquear a liberação do FSI (bloqueio: 61%). A seguir, avaliou-se o efeito de vários bloqueadores farmacológicos sobre a síntese do FSI. Assim, foi observado que inibidores específicos, como por exemplo, inibidor de síntese protéica (67%), proteases (57%), fosfolipase A<sub>2</sub> (54%), ciclooxigenase (62%), ciclo e lipoxigenase (48%), síntese de TNF- $\alpha$  (48%) e antagonista de PAF (55%), reduzem a síntese e liberação do FSI. Em adição, evidenciou-se que, a exemplo do IL-1ra (80%), o anticorpo monoclonal anti-IL-1 $\beta$  (72%), mas não anti-

IL-1 $\alpha$  ( $p > 0,05$ ), bloqueou de maneira significativa o efeito secretório do FSI. Na etapa subsequente, procurou-se identificar o FSI, através do método de ELISA. Dessa forma, observou-se que TxA ( $3,2 \times 10^{-7}M$ ,  $9,6 \times 10^{-7}M$  e  $3,2 \times 10^{-6}M$ ), mas não TxB ( $3,6 \times 10^{-7}M$ ; 28,0 pg/ml), é capaz estimular a síntese de IL-1 $\beta$  (665,0, 413,0 e 3477,0 pg/ml, respectivamente). Evidenciou-se, ainda, que o sobrenadante de macrófagos estimulados com TxA ( $3,2 \times 10^{-7}M$  e  $3,2 \times 10^{-6}M$ ) ou TxB ( $3,6 \times 10^{-7}M$ ) apresenta altos níveis de TNF- $\alpha$  (803,0, 1040,0 e 555,0 pg/ml, respectivamente). Por último, buscou-se determinar o mecanismo de ação do FSI, através do pré-tratamento da mucosa ileal com indometacina, bumetanida ou tetrodotoxina. A partir desses experimentos, observou-se que a atividade do FSI é dependente do transporte de Cl $^-$ ; e que este efeito pode ser bloqueado com indometacina (88%), bem como pela tetrodotoxina (84%). Portanto, os dados deste trabalho demonstram que macrófagos estimulados com a toxina A sintetizam IL-1 $\beta$ , que é capaz de provocar secreção intestinal. Demonstram, também, que a gênese dessa citocina é dependente da ativação de uma proteína G; e que PAF, prostaglandinas e TNF- $\alpha$  estão envolvidos nesse evento. Ademais, essa atividade secretória intestinal é dependente da síntese de prostaglandinas, por células residentes, e ativação do sistema nervoso entérico.

**Palavras-chave:** *Clostridium difficile*, toxina A, toxina B, macrófagos, secreção intestinal e interleucina-1 $\beta$ .

## ABSTRACT

The *Clostridium difficile* produces two exotoxins denominated toxin A (TxA; 308 kDa) and toxin B (TxB; 279 kDa). The mode of intestinal action of those toxins is not still totally understood, nevertheless several scientific studies have confirmed the involvement of the same ones, in the pathogenesis of the diarrheal diseases. In the beginning of this work it was determined the intestinal secretory effect induced by the supernatant of macrophages stimulated with TxA or TxB, in rabbit ileum mounted in Ussing chambers. From this protocol it was observed that the supernatant of macrophages stimulated with TxA ( $3,2 \times 10^{-7} \text{M}$ ,  $9,6 \times 10^{-7} \text{M}$  and  $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) cause a potent intestinal secretion ( $\Delta \text{Isc} = 41,0, 52,0$  and  $90,0 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ , respectively). However, the supernatant of macrophages treated with TxB ( $3,6 \times 10^{-7} \text{M}$ ) did not alter significantly this activity ( $\Delta \text{Isc} = 28,0 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  vs.  $\Delta \text{Isc}_{\text{control}} = 20,0 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). It is worth pointing out that the addition of toxin TxA ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) directly in the Ussing chambers did not produce intestinal secretion ( $\Delta \text{Isc} = 2,2 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). In addition, the genesis of the factor of intestinal secretion (FSI), present in this supernatant, was blocked (80%) by the incubation of TxA with the PCG<sub>4</sub>. In the following stage it was investigated the involvement of G protein in the genesis of FSI, through a previous treatment of the macrophages with the active pertussis toxin. So, it was evidenced that this procedure is able to block the release of FSI (blockade: 61%). Following, it was evaluated the effect of several pharmacologic blockers on the synthesis of FSI. Thus, it was observed that specific inhibitors, for example, inhibitor of protein synthesis (reduction: 67%), proteases (57%), phospholipase A<sub>2</sub> (54%), cyclooxygenase (62%), cyclo and lipoxigenase (48%), TNF- $\alpha$  synthesis (48%) and PAF antagonist (55%), reduce the synthesis and release of FSI. In addition, it was evidenced that, such as IL-1ra (80%), the monoclonal

antibody anti-IL-1 $\beta$  (72%), but not anti-IL-1 $\alpha$  ( $p > 0,05$ ), blocked significantly the secretory effect of FSI. In the subsequent stage it was tried to identify the FSI, through ELISA method. In that way, it was observed that TxA ( $3,2 \times 10^{-7}$  M,  $9,6 \times 10^{-7}$  M and  $3,2 \times 10^{-6}$  M), but not TxB ( $3,6 \times 10^{-7}$  M), is capable to stimulate the synthesis of IL-1 $\beta$  (665,0, 413,0 e 3477,0 pg/ml, respectively). It was also evidenced, that the supernatant of macrophages stimulated with TxA ( $3,2 \times 10^{-7}$  M and  $3,2 \times 10^{-6}$  M) or TxB ( $3,6 \times 10^{-7}$  M) presents high levels of TNF- $\alpha$  (803,0, 1040,0 and 555,0 pg/ml, respectively). At last, it was determined the mechanism of action of FSI, through the previous treatment of the ileum mucosal with indomethacin, bumetanide or tetrodotoxin. Thus it was observed that the activity of FSI is dependent on the Cl<sup>-</sup> transport; and that this effect could be blocked with indomethacin (88%), as well as with tetrodotoxin (84%). Therefore, the data of this work demonstrate that macrophages stimulated with TxA synthesizes IL-1 $\beta$  which is able to provoke intestinal secretion. They, also, demonstrate that the genesis of this cytokine is dependent of the activation of a G protein; and that PAF, prostaglandins and TNF- $\alpha$  are involved in this event. In addition, this secretory activity is dependent on the prostaglandins synthesis, by resident cells, and activation of the enteric nervous system.

**Keywords:** *Clostridium difficile*, toxin A, toxin B, macrophage, intestinal secretion and interleukin-1 $\beta$ .

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1- Classificação das diarréias infecciosas

Os agentes infecciosos constituem as causas mais frequentes de doenças diarréicas, dentre os diversos mecanismos etiopatogênicos destas enfermidades. A diarréia infecciosa representa uma resposta inespecífica do hospedeiro a inúmeros patógenos intestinais, tais como vírus, bactérias e protozoários, podendo determinar manifestações clínicas amplas e debilidade, variando da inconveniência mínima até uma doença grave que resulta na morte por grande perda fecal de líquidos e eletrólitos (Field e cols., 1989; Binder, 1990; Guerrant & Bobak, 1991; Tamai e cols., 1992; Lima, 1994; Sack e cols., 1997).

As diarréias infecciosas podem ser classificadas em inflamatória e não-inflamatória, com base na presença ou não, respectivamente, de leucócitos nas fezes (Guerrant, 1994). A pesquisa de leucócitos pode ser realizada por meio da coloração pelo azul de metileno, cujo uso destina-se principalmente à detecção de diarréias inflamatórias agudas provocadas por patógenos intestinais invasivos (Harris e cols., 1972). Existe, ainda, outra forma para diagnosticar a diarréia inflamatória, que consiste na determinação dos níveis de lactoferrina, liberada por neutrófilos. Nessa perspectiva, Guerrant e cols., 1992, evidenciaram o fato de que a sensibilidade deste método na detecção de doenças diarréicas causada por *Shigella sp* e *Clostridium difficile*, situa-se em torno de 95%, mostrando-se, portanto, como uma potente ferramenta no diagnóstico complementar das diarréias inflamatórias.

A diarréia não-inflamatória acomete usualmente o intestino delgado e em geral é provocada por vírus, protozoários ou bactérias produtoras de enterotoxinas, as quais promovem diarréias aquosas, com variáveis graus de severidade (Bobak &

Guerrant, 1992; Sears & Kaper, 1996; Sack e cols, 1997). Nesse contexto, destacam-se aquelas causadas por *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* enterotoxigênica. Esses microrganismos aderem ao epitélio do intestino, mas não o rompem nem o lesam significativamente. Por conseguinte, não há uma destruição comprometedora na mucosa intestinal nem a presença de leucócitos nas fezes (Avery e cols., 1992; Bobak & Guerrant, 1992).

Por outro lado, a disenteria inflamatória acomete mais freqüentemente a parte distal do intestino delgado e cólon. Esse tipo de diarreia pode ser causada por microrganismos invasivos, como por exemplo, *Salmonella sp*, *Shigella sp* e *Campylobacter sp*, ou por agentes que elaboram toxinas lesivas para o tecido, tais como o *Clostridium difficile* e a *Escherichia coli* enterohemorrágica. Estes microrganismos, de uma forma ou de outra, promovem uma destruição do revestimento mucoso do intestino com o conseqüente aparecimento de sangue, serosidade e leucócitos nas fezes (Barret, 1992; Tomai e cols., 1992; Guerrant e cols., 1992; Guerrant, 1994; Sears & Kaper, 1996; Sack e cols., 1997).

Em geral, as diarreias inflamatórias representam a faixa mais grave das doenças diarreicas e requerem tratamento e avaliação mais intensivos. Partindo desse princípio, as pesquisas envolvendo o *Clostridium difficile* têm se tornado cada vez mais evidentes, visto que, hoje em dia, esse microrganismo é considerado um importante patógeno hospitalar, causador de diarreia inflamatória, bastante prevalente (McFarland e cols., 1989; Lima & Lima, 1993; Anglim & Farr, 1994; Samore e cols., 1996; Katz e cols., 1997; Starr e cols., 1997).

Corroborando esta idéia, Lima e cols., 1993, demonstraram, em estudo realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, Brasil, que o *Clostridium difficile* é o principal agente causador de diarreia nosocomial nesse estabelecimento (Lima & Lima, 1993).

## 1.2- O *Clostridium difficile* como agente indutor de diarreia inflamatória

### 1.2.1- Marcos históricos

Uma das primeiras descrições da colite pseudomembranosa foi feita por Finney em 1893, a partir da observação de uma pseudomembrana diftérica, presente no cólon de uma paciente que apresentou uma colite fatal depois de uma cirurgia. Contudo, vale salientar que, o agente causador desta enfermidade não foi elucidado nesta época (Lyerly e cols., 1988).

Somente em 1935, Hall & Toole, estudando a flora intestinal de recém-nascidos saudáveis, descreveram um membro, até então desconhecido, do gênero *Clostridium*, que recebeu inicialmente a denominação de *Bacillus difficilis* e logo em seguida de *Clostridium difficile*, refletindo exatamente a dificuldade encontrada para isolar e manter esse microrganismo em cultura pura (Hall & Toole, 1935).

Nesse mesmo ano, Hall & Toole demonstraram, ainda, que o *C. difficile* era extremamente toxicogênico em cultura. Essa evidência foi baseada no achado de lesões, parada respiratória e morte quando da injeção de cultura líquida ou filtrado do meio que continha esse microrganismo, em animais experimentais (Hall & Toole, 1935).

Depois de sua descoberta, o *Clostridium difficile* passou por uma relativa obscuridade, haja visto que a colite pseudomembranosa foi uma condição rara na era pré-antibiótica. Contudo, em meados dos anos 1960 e início da década de 1970, essa enfermidade atingiu proporções epidêmicas, tornando-se uma complicação comum ao uso de antibióticos (Tedesco e cols., 1974; Swartzberg e cols., 1977; Bartlett e cols., 1978; Lyerly e cols., 1988).

Somente por volta de 1970, as bactérias anaeróbias começaram a ser implicadas como importantes agentes causadores de doenças intestinais. Por

consequente, surgiram vários estudos em busca de antimicrobianos ativos contra esses agentes infecciosos emergentes; tendo sido a lincomicina um dos primeiros sucessos (Tedesco e cols., 1974; Lyerly e cols., 1988).

Entretanto, logo foi observado que muitos dos pacientes tratados com a lincomicina e seus congêneres freqüentemente apresentavam diarréia e uma severa inflamação da mucosa colônica. Dessa forma, esse antibiótico mostrava-se eficaz não somente contra as bactérias anaeróbias, mas também como um fator desencadeante da colite pseudomembranosa, possivelmente favorecendo a ativação do *Clostridium difficile* que, até então, se encontrava inócuo apenas como um microrganismo da microbiota intestinal (Tedesco e cols., 1974; Tedesco e cols., 1976; Swartzberg e cols., 1977; Lyerly e cols., 1988).

A partir do final da década de setenta, o *Clostridium difficile* tem sido reconhecido com freqüência cada vez maior como um importante enteropatógeno. Nesse sentido, dados epidemiológicos, nos Estados Unidos, indicam que até ¼ dos pacientes hospitalizados albergam esse agente; e que muitos desenvolvem sintomas de diarréia e colite (McFarland e cols., 1989; Pothoulakis & LaMont, 1993; Ho e cols., 1996; Samore e cols., 1996; Starr e cols., 1997).

Nos dias de hoje, há numerosos estudos laboratoriais e clínicos demonstrando que o *Clostridium difficile* é o principal agente causador de doenças intestinais associadas ao uso de antimicrobianos, que variam desde diarréia autolimitada, relativamente benigna, a colite pseudomembranosa grave, que, muitas vezes, pode ser fatal (Lyerly e cols., 1988; Kelly e cols., 1994; Sears & Kaper, 1996; Settle & Wilcox, 1996; Ho e cols., 1996; Starr e cols., 1997).

É importante ressaltar o fato de que, com o advento do uso indiscriminado de antimicrobianos, as doenças relacionadas ao *Clostridium difficile* têm se tornado cada vez mais freqüentes e, dessa maneira, têm aumentado os índices de



mortalidade por doenças diarréicas causadas por esse microrganismo (Bartlett, 1990; Kelly e cols., 1994; Anglim & Farr, 1994; Ho e cols., 1996; Settle & Wilcox, 1996; Settle, 1996).

### 1.2.2- Microbiologia do *Clostridium difficile*

O *C. difficile* é reconhecido como um bacilo anaeróbio obrigatório, Gram-positivo e com esporo subterminal, que faz parte da microbiota intestinal, tanto do homem como de outros animais (Lyerly e cols., 1988; Pothoulakis & LaMont, 1993, Kelly e cols., 1994).

Até por volta de 1977, era difícil se fazer a distinção entre o *Clostridium difficile* e outros microrganismos comumente encontrados nas fezes, como, por exemplo, o *Clostridium sporogenes*. Por conseguinte, as doenças associadas ao *C. difficile* não eram adequadamente diagnosticadas. Entretanto, George e cols., 1978, desenvolveram um meio de cultura seletivo contendo cicloserina e cefoxitima e frutose em ágar, o qual facilitou sensivelmente o isolamento desse agente. Vale salientar que atualmente vários sistemas de automação estão sendo utilizados para identificação de bactérias anaeróbias, incluindo o *Clostridium difficile*.

Em adição, existem alguns métodos laboratoriais, do tipo ELISA, cultura de células, contraímuno-elektroforese e aglutinação pelo látex, para detecção das toxinas do *C. difficile*. Dentre esses, o ensaio utilizando a cultura de células é considerado o método padrão e, por conseguinte, serve de parâmetro para os outros testes (Lyerly e cols., 1988).

### 1.2.3- Toxinas do *Clostridium difficile*

O *Clostridium difficile* produz duas toxinas denominadas de toxina A (enterotoxina) e toxina B (citotoxina), que possuem uma seqüência de 2710 e 2366 aminoácidos e pesos moleculares de 308 e 279 kDa, respectivamente (Dove e cols., 1990; Barroso e cols., 1990). Dentre os aminoácidos que compõem essas toxinas, a aspargina, glicina e glutamina são os que se apresentam em maiores quantidades (Banno e cols., 1984; Dove e cols., 1990; Barroso e cols., 1990).

O modo de ação biológica dessas toxinas ainda é pouco compreendido, não obstante muitas publicações confirmarem sua participação efetiva, na patogênese de doenças diarréicas associadas a antibióticos (Bette e cols., 1991; Baldacini e cols., 1992; Pothoulakis & LaMont, 1993; Kelly e cols., 1994; Pothoulakis, 1996).

Corroborando essa evidência, existem alguns trabalhos demonstrando, em portadores humanos ou animais, a presença de cepas de *C. difficile* que não produzem toxinas e que, conseqüentemente, são incapazes de desencadear as doenças diarréicas relacionadas com este microrganismo (Lyerly e cols., 1988; Bartlett, 1990; Kelly e cols., 1994; Pothoulakis, 1996).

Ademais, tem sido relatado que é possível um amplo espectro de resposta do hospedeiro ao *C. difficile*, passando do estado de portador assintomático até a colite pseudomembranosa. Esta variação, ainda, não é bem compreendida e pode estar associada com diferenças entre as cepas do microrganismo, não toxigênicas, ou com variações na resposta do hospedeiro, relacionadas com modificações nos receptores das toxinas ou nas defesas imunológicas (Pothoulakis & LaMont, 1993; Settle, 1996; Settle & Wilcox, 1996; Pothoulakis, 1996).

#### 1.2.4- Doenças relacionadas com o *Clostridium difficile*

A diarreia associada a antibióticos e/ou a colite pseudomembranosa, tanto em animais como no homem, tem sido comumente relacionada ao *Clostridium difficile* toxigênico numa frequência de 50 a 80 %, para diarreia associada a antibióticos, e 90 a 100 % para colite pseudomembranosa (George e cols., 1978; Bartlett e cols., 1978; Bartlett, 1990; Kelly e cols., 1994).

A flora intestinal, tanto do homem como dos animais, quando íntegra, impede eficazmente a colonização pelo *C. difficile*. Contudo, os antibióticos constituem o principal fator de alteração da microbiota bacteriana, provocando a sua substituição por microrganismos resistentes às drogas em uso, os quais proliferam e podem provocar quadros patológicos diversos (Sack e cols., 1997). O desequilíbrio da microbiota intestinal se manifesta especialmente com o surgimento de diarreia, ou até mesmo com um quadro grave de colite pseudomembranosa provocada pelo *Clostridium difficile* (Kelly e cols., 1994; Sears & Kaper, 1996; Settle, 1996).

Em geral, esse quadro clínico produzido pelo *C. difficile* ocorre em pacientes que tiveram a sua flora intestinal anaeróbia alterada por antibióticos, do tipo clindamicina, ampicilina, amoxicilina, macrolídeos, lincosamidas, aminoglicosídeos, cefalosporinas etc (Kelly e cols., 1994; Ho e cols., 1996; Settle & Wilcox, 1996).

A colite pseudomembranosa caracteriza-se por uma severa inflamação da mucosa colônica e pela formação de uma pseudomembrana composta de fibrina, muco, células epiteliais necrosadas e leucócitos (George e cols., 1978; Lyerly e cols., 1988; Gröschel, 1996). Esta enfermidade é diagnosticada pela observação endoscópica da pseudomembrana ou pela presença de microabcessos no cólon de pacientes com diarreia, e com história de exposição a antibiótico/quimioterápicos, nas últimas 6-8 semanas (Kelly e cols., 1994; Gröschel, 1996; Katz e cols., 1997).

Outra forma de manifestação da infecção pelo *Clostridium difficile* é o surgimento de diarreia leve a moderada, denominada diarreia associada a antibióticos. Em geral, esse distúrbio é menos grave e de tratamento mais fácil do que a forma clássica de colite pseudomembranosa (Lyerly e cols., 1988; Pothoulakis & LaMont, 1993; Kelly e cols., 1994).

### 1.2.5- Atividades biológicas das Toxinas A e B

Nos últimos anos, vários pesquisadores têm se empenhado na investigação dos mecanismos moleculares, envolvendo as toxinas A e B do *Clostridium difficile*. Por conseguinte, surgiram vários trabalhos evidenciando o fato de que ambas as toxinas são capazes de monoglicosilar proteínas *Rho*, pertencentes à família de GTPases de baixo peso molecular (Just e cols., 1994; Dillon e cols., 1995; Just e cols., 1995., Giry e cols., 1995; Schmidt e col., 1996; Hofmann e cols., 1997).

O mecanismo pelo qual a glicosilação de proteínas *Rho* provoca inativação molecular ainda não foi bem esclarecido. Entretanto, sabe-se que esse efeito se encontra relacionado, pelo menos em parte, com alterações na transdução de sinal (Just e cols., 1994; Schmidt, e cols., 1996; Denhardt, 1996).

Vale salientar que essa glicosilação de proteínas *Rho*, além de inativar várias atividades biológicas de determinadas moléculas, também é capaz de intermediar alguns eventos celulares produzidos por toxinas bacterianas (Aktories, 1994; Aktories, 1997a; Aktories, 1997b). Ratificando essa evidência, recentemente foi demonstrado que os mecanismos de apoptose, alterações no citoesqueleto e inibição da fosfolipase D, provocados pelas toxinas A e B, são dependentes da inativação de proteínas *Rho* (Just e cols., 1994; Just e cols., 1995; Giry e cols., 1995; Schmidt e cols., 1996).

As toxinas do *C. difficile*, especialmente a toxina B, causam arredondamento celular e marginalização do núcleo. Essas mudanças morfológicas, geralmente, são irreversíveis e inibem a divisão celular. Dessa maneira, essas toxinas mostram uma atividade antiproliferativa (Fiorentini & Thelestan, 1991). Em adição, há estudos demonstrando que a toxina B causa uma série de efeitos inespecíficos em células de mamíferos, tais como perda de potássio e cálcio intracelulares e diminuição na síntese de ácido ribonucléico e desoxirribonucléico com a conseqüente redução na síntese protéica (Florin & Thelestan, 1984).

A literatura relata que a toxina B é desprovida de efeitos enterotóxicos, ou seja, não é capaz de provocar secreção de fluidos, lesão morfológica, nem infiltrado inflamatório na mucosa intestinal (Taylor e cols., 1981; Lyerly e cols., 1982). Entretanto, esta toxina é considerada cerca de mil vezes mais potente que a toxina A, no que diz respeito aos seus efeitos citotóxicos, para vários tipos de células de mamíferos em cultura (Lyerly e cols., 1988; Baldacini e cols., 1992).

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que as toxinas A e B do *Clostridium difficile* são potentes indutoras da migração de neutrófilos em cavidade peritoneal e bolsa de ar subcutânea de ratos, dependentemente da liberação de fatores quimiotáticos, do tipo leucotrienos e citocinas, por macrófagos (Rocha, 1994; Rocha e cols., 1997; Souza e cols., 1997).

Essas evidências estão fundamentadas nos seguintes fatos: (1) o aumento da população de macrófagos, pelo tratamento com tioglicolato, amplificou o efeito da migração de neutrófilos; (2) a depleção de células peritoneais residentes, por meio da lavagem peritoneal, inibiu essa atividade; (3) o tratamento dos animais com inibidores específicos de lipoxigenase, tais como MK 886 e BWA4C, também, bloqueou o referido evento; (4) a incubação de soros anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  com toxina A neutralizou a capacidade dessa toxina em promover infiltração de

neutrófilos, em bolsas de ar subcutâneas. Evidenciou-se, ainda, que somente o soro anti-TNF- $\alpha$  inibiu essa atividade quando o estímulo inflamatório foi a toxina B; e (5) por fim, demonstrou-se que monocamadas de macrófagos estimulados com toxina A ou B foram capazes de liberar, no sobrenadante da cultura, fatores quimiotáticos para neutrófilos, *in vivo* (Rocha, 1994; Rocha e cols., 1997; Souza e cols., 1997).

Em adição, foi demonstrado que a toxina A é capaz de estimular a síntese e a liberação de interleucina-1, por macrófagos em cultura, que, por sua vez, é capaz de induzir a proliferação de linfócitos (Miller e cols., 1990). Além do mais, Flegel e cols., 1991, evidenciaram que ambas as toxinas do *C. difficile* são potentes estimuladoras da liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, por monócitos humanos, *in vitro*.

Está bem demonstrado em animais experimentais que a toxina A, através de seus efeitos enterotóxicos, é capaz de produzir uma intensa secreção de fluidos, aumento da permeabilidade intestinal e uma potente reação inflamatória aguda na mucosa intestinal, caracterizada por necrose epitelial, edema hemorrágico, ulceração e ativação de macrófagos e mastócitos, com a subsequente mobilização de neutrófilos para o foco inflamatório (Lyerly e cols., 1982; Lyerly e cols., 1985; Triadofilopoulos e cols., 1987; Lima e cols., 1988; Triadofilopoulos e cols., 1989; Kelly e cols., 1994; Burakoff e cols., 1995).

Corroborando esse fato, Lima e cols., 1989, demonstraram que a injeção de toxina A em alça intestinal de coelho, a partir das duas primeiras horas, provoca uma significativa infiltração de células mononucleares e uma potente secreção intestinal semelhante àquela produzida pela toxina do *Vibrio cholerae*, que é um clássico agente secretório. Outros pesquisadores, desse mesmo grupo, evidenciaram ainda que esta secreção vem acompanhada por uma excessiva reação inflamatória, as quais foram bloqueadas por inibidores de fosfolipase A<sub>2</sub>, de ciclooxigenase e por

antagonistas do fator de agregação plaquetária (Fang e cols., 1994; Fonteles e cols., 1995).

O resultado da inflamação intestinal provocada pela toxina A, no intestino de coelho, é um acentuado influxo de neutrófilos para o segmento afetado com a conseqüente destruição da mucosa intestinal (Pothoulakis & LaMont, 1993; Kelly e cols., 1994; Burakoff e cols., 1995). Essa lesão celular é mais grave na extremidade da vilosidade, porém, toda a mucosa é envolvida por uma intensa reação inflamatória com áreas de necrose (Pothoulakis & LaMont, 1993). Ademais, por meio desse mesmo protocolo, observou-se que, diferentemente da toxina da cólera que provoca secreção de fluidos acelulares e ricos em proteínas, a toxina A induz um potente efeito secretório intestinal caracterizado pela presença de exsudato que contém neutrófilos, monócitos e enterócitos descamados (Triadofilopoulos e cols., 1989; Pothoulakis & LaMont, 1993).

Os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória da toxina A são muito complexos e envolvem, pelo menos em parte, a liberação de potentes mediadores inflamatórios, do tipo prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), e leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), fator ativador de plaquetas (PAF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-8 (IL-8), histamina e óxido nítrico, por células residentes da lâmina própria intestinal (Triadofilopoulos e cols., 1987; Triadofilopoulos e cols., 1989; Linevsky e cols., 1990; Miller e cols., 1990; Burakoff e cols., 1995; Qiu e cols., 1996; Mahida e cols., 1996).

Os mastócitos, da mesma forma que os macrófagos, têm sido implicados nas ações biológicas da toxina A. Nesse sentido, foi observado que a injeção desta toxina, na alça intestinal de coelho, induz um aumento na produção de histamina e LTC<sub>4</sub> que são sintetizados especialmente por mastócitos (Linevsky e cols., 1990).

Observou-se, também, que o ketotifen (estabilizador de mastócitos) reduz de forma significativa a lesão, secreção de fluidos, permeabilidade intestinal e níveis de PAF, LTC<sub>4</sub> e LTB<sub>4</sub> provocados pela toxina A no íleo de ratos (Pothoulakis e cols., 1993). Foi relatado, ainda, que essa toxina causa a liberação de uma protease específica, denominada RMCPII, por mastócitos da lâmina própria intestinal, que pode ser bloqueada pelo ketotifen (Pothoulakis e cols., 1993; Pothoulakis e cols., 1994; Castagliuolo e cols., 1994), reforçando, portanto, a participação dos mastócitos residentes da lâmina própria intestinal na enterotoxicidade da toxina A. Por outro lado, recentemente o nosso grupo demonstrou que essas células não participam do evento da migração de neutrófilos provocada pelas toxinas A e B (Rocha, 1994; Rocha e cols., 1997; Souza e cols., 1997).

Existem, ainda, alguns trabalhos mostrando a participação do sistema nervoso entérico na modulação dos efeitos enterotóxicos da toxina A (Castagliuolo e cols., 1994; Pothoulakis e cols., 1994; Mantyh e cols., 1996). Portanto, foi evidenciado que o antagonista de substância P (CP-96, 345) inibe potentemente a secreção de fluidos, permeabilidade intestinal ao manitol, inflamação na lâmina própria e necrose epitelial produzidas pela toxina A, no modelo de alça intestinal de ratos (Pothoulakis e cols., 1994). Além do mais, observou-se que determinados inibidores neuronais, como, por exemplo, lidocaína, hexametônio e capsaicina são capazes de reduzir a secreção intestinal, atividade da mieloperoxidase e permeabilidade ao manitol, em mucosa ileal de rato exposta a toxina A (Castagliuolo e cols., 1994).

Por último, Mantyh e cols., 1996, demonstraram também que a injeção de toxina A no íleo de rato induz a liberação de substância P, a partir de neurônios aferentes primários, que, por sua vez, age em neurônios entéricos e plexos mioentéricos. Portanto, mais uma vez evidenciou-se a importância do componente neuronal na fisiopatologia dos efeitos enterotóxicos da toxina A.



### **1.3- Atividade funcional dos macrófagos no processo inflamatório agudo**

Os macrófagos pertencem ao sistema fagocitário mononuclear, que é um sistema composto por células com características morfológicas, imunológicas e funcionais semelhantes. As células pertencentes a este sistema são formadas na medula óssea, a partir de uma linhagem de células fagocíticas mononucleares, que alcançam os tecidos através da corrente sanguínea. Os macrófagos têm sua origem a partir de uma célula-mãe na medula óssea, passando pelo estágio de monoblastos para formar os pró-monócitos que, por sua vez, dividem-se dando origem aos monócitos do sangue periférico que, no tecido conjuntivo dos órgãos, são chamados de histiócitos, macrófagos fixos ou macrófagos residentes (Van Furth, 1988; Ogle e cols., 1994; Laskin & Pendino, 1995).

Os macrófagos são encontrados praticamente em todos os tecidos e fluidos do organismo (Van Furth, 1988; Johnston, 1988). Embora apresentem a mesma origem, os macrófagos residentes em diferentes locais podem apresentar características bioquímicas e estruturais distintas, dependendo de seu microambiente (Johnston, 1988; Ogle e cols., 1994). Dessa forma, os macrófagos podem receber diversas denominações, tais como células de Kupper (fígado), macrófagos alveolares (pulmão), macrófagos pleurais e peritoneais (cavidades serosas), células microgliais (sistema nervoso central), osteoclastos (osso) etc.

Ademais, os macrófagos podem permanecer quiescentes em determinadas cavidades serosas, por um longo período. Contudo, são células pluripotentes, ou seja possuem a propriedade de tornarem-se ativadas por estímulos externos. A ativação de macrófagos foi originalmente descrita em animais infectados com patógenos intracelulares, tais como, micobactéria, listéria, brucela e toxoplasma. Os macrófagos ativados são células mais responsivas e que possuem um citoplasma

mais irregular, com maior número de mitocôndrias, maior quantidade de enzimas e com elevada atividade microbicida e tumoricida (Cohn, 1978; North, 1978; Takemura & Werb, 1984). Esse estado de ativação pode ser acionado por citocinas ou por interações não imunológicas que perturbam a membrana celular, como, por exemplo, certos produtos bacterianos. A literatura afirma que, dentre as citocinas, o interferon gama tem um papel especial na mediação do processo de ativação endógeno do macrófago (Adams & Hamilton, 1987; Nathan, 1987; Laskin & Pendino, 1995).

Por outro lado, os macrófagos que são expostos a irritantes, tais como tioglicolato, óleo mineral, caseína, proteose-peptona ou glicogênio, são denominados de macrófagos estimulados. Nessa situação, eles não possuem efeitos bactericida nem tumoricida. Contudo, apresentam uma maior responsividade aos agentes ativadores do que os macrófagos residentes ou monócitos (North, 1978; Adams & Hamilton, 1987).

Desde os tempos de Metchnikoff até os dias de hoje, os macrófagos têm sido reconhecidos funcionalmente como células defensoras do organismo. Segundo Ferreira, 1980, os macrófagos residentes agem como células de alarme, os quais em contato com agentes injuriantes desencadeiam os mecanismos de defesa através da produção e liberação de inúmeras substâncias, tais como enzimas, inibidores de enzimas, fatores da coagulação, componentes do sistema complemento, citocinas, intermediários reativos do oxigênio, derivados lipídicos, dentre outros, que participam ativamente na gênese dos eventos que ocorrem na reação inflamatória aguda (Ogle e cols., 1994; Laskin & Pendino, 1995). Em adição, após esse estágio mais precoce da inflamação, os macrófagos se tornam abundantes e digerem avidamente microrganismos, debris celulares, complexos antígeno-anticorpo, células

neoplásicas e outras partículas estranhas (Le Fevre e cols., 1979; Takemura & Werb, 1984; Unanue & Allen, 1987; Nathan, 1987).

Várias pesquisas foram conduzidas com o intuito de demonstrar a importância do macrófago na inflamação aguda. Nessa perspectiva, Kazmierowski e cols., 1977, em um estudo inicial, demonstraram a importância dos macrófagos alveolares no acúmulo de neutrófilos no exsudato broncoalveolar em primatas.

Além do mais, foi demonstrado que a infiltração neutrofílica induzida pela carragenina, hemácias de carneiro ou soro heterólogo, em cavidades peritoneais de ratos, pode ser bloqueada ou potencializada, pelo tratamento prévio com soro anti-macrófago e tioglicolato, respectivamente (Souza & Ferreira, 1985). Evidenciou-se, também, que a migração de neutrófilos provocada pela carragenina, zymozan ou LPS é mínima em cavidades peritoneais depletadas de macrófagos (Souza e cols., 1988).

Existe, ainda, uma série de trabalhos demonstrando a importância de certas citocinas, liberadas por macrófagos, tais como: IFN- $\gamma$ , IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-8, na mediação da migração de neutrófilos para o foco inflamatório (Cunha & Ferreira, 1986; Faccioli e cols., 1990; Ribeiro e cols., 1990; Ribeiro e cols., 1991).

Ademais, conforme comentado, os macrófagos residentes desempenham um papel fundamental no evento da migração de neutrófilos, em cavidades peritoneais e bolsas de ar subcutâneas de ratos, provocada pelas toxinas A e B do *Clostridium difficile* (Rocha e cols., 1997; Souza e cols., 1997).

Dessa forma, fica evidente que os macrófagos, além de exercerem um papel fundamental na fase crônica do processo inflamatório, participam ativamente na modulação de vários eventos da inflamação aguda. Ademais, apresentam uma importante influência sobre o funcionamento do sistema imunológico (Ogle e cols., 1994; Laskin & Pendino, 1995).

#### **1.4- Fisiologia e imunofarmacologia da mucosa intestinal: papel de células e mediadores inflamatórios**

Durante essa última década, tem aumentado muito o interesse pelos mecanismos de controle da fisiologia epitelial, em particular o envolvimento de células imunes e seus respectivos mediadores. Há tempo se sabe que o epitélio intestinal atua como uma barreira no controle de patógenos intestinais. Contudo, só recentemente tem se tornado evidente a participação das células do sistema imunológico no seu funcionamento (Hinterleitner & Powell, 1991; Schreiber e cols., 1992; McKay & Perdue, 1993; Perdue & McKay, 1994; Stack e cols., 1995; Theodorou e cols., 1996).

A mucosa intestinal contém grande número de células imunocompetentes, como, por exemplo, linfócitos, macrófagos, neutrófilos, mastócitos etc, localizadas próximo ao epitélio e geralmente associadas a estruturas nervosas. Portanto, a contigüidade destas estruturas pode explicar a interrelação funcional do sistema imune com sistema nervoso entérico e trato digestivo (Stead e cols., 1987; Schreiber e cols., 1992; Ciancio & Chang, 1992; Perdue & McKay, 1994).

Existem muitos trabalhos demonstrando que as células imunes da lâmina própria intestinal são aptas para sintetizar determinados mensageiros químicos, do tipo metabólitos do ácido araquidônico, fator de agregação plaquetária, oxidantes, aminas biogênicas e citocinas que, por sua vez, podem alterar as funções do epitélio intestinal de forma direta ou até mesmo indiretamente, através da ativação de outros tipos celulares e/ou sistema nervoso entérico (Schreiber e cols., 1992; McKay & Perdue, 1993; Perdue & McKay, 1994; Eberhart & Dubois, 1995; Stack e cols., 1995; Theodorou e cols., 1996).

Os metabólitos do ácido araquidônico, em especial as prostaglandinas, desempenham um papel relevante na fisiopatologia das diarreias inflamatórias. Corroborando essa afirmação, tem sido relatados altos níveis desses eicosanóides, tanto nas diarreias de ocorrência natural como naquelas produzidas em animais experimentais. Além do mais, existem alguns trabalhos relatando o fato de que muitos destes mediadores inflamatórios estimulam a secreção de cloro e água no intestino (McKay & Perdue, 1993; Eberhart & Dubois, 1995; Stack e cols., 1995).

Alguns estudos evidenciaram que a principal fonte de prostaglandinas no intestino são os macrófagos e mastócitos da região subepitelial que, por sua vez, são particularmente reconhecidos como grandes produtores de eicosanóides. Esses mediadores, em especial as prostaglandinas, têm sido implicados na fisiopatologia das doenças inflamatórias intestinais, visto que além de induzirem secreção diretamente, podem intermediar ainda as ações de outros agentes sobre a fisiologia do enterócito (Bern e cols., 1989; Calderaro e cols., 1991; Schreiber e cols., 1992; McKay & Perdue, 1993; Perdue & McKay, 1993; Eberhart & Dubois, 1995).

Ratificando essa idéia, há várias pesquisas evidenciando a importância das prostaglandinas na secreção intestinal. Dessa forma, foi observado que a adição de PGE<sub>2</sub> e PGE<sub>1</sub>, em alça intestinal de coelho, *in vitro*, induz um aumento significativo na corrente de curto-circuito, decorrente da secreção de cloreto (Racussen e cols., 1980; Heintze e cols., 1983), podendo ser bloqueada pelo inibidor de ciclooxigenase, indometacina (Smith e cols., 1981).

Além do mais, outros trabalhos têm demonstrado que determinadas prostaglandinas induzem uma ativa secreção de cloreto e, conseqüentemente, de água na luz intestinal, por um mecanismo dependente de AMPc (Racussen e cols., 1980; Musch e cols., 1987). Evidenciou-se, ainda, que estes eicosanóides em monocamadas de células T-84 apresentam basicamente os mesmos efeitos

observados em preparações de mucosa intestinal, em câmaras de Üssing (Halm e cols., 1988; McKay & Perdue, 1993).

Calderaro e cols., 1991, investigando a correlação entre o metabolismo do ácido araquidônico e a secreção intestinal demonstraram uma intensa atividade da enzima ciclooxigenase, após a pré-incubação de fragmentos de cólon, *in vitro*, com ácido araquidônico exógeno ou cálcio ionóforo A23187, resultando na produção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$  e  $\text{TXB}_2$ . Dentre esses mediadores, somente a  $\text{PGE}_2$  foi capaz de estimular a secreção intestinal, em câmara de Üssing. Evidenciaram, também, que tanto a síntese de prostaglandinas como a secreção intestinal foram bloqueadas pela indometacina, ratificando, portanto, a importância da enzima ciclooxigenase nessas atividades biológicas ora mencionadas.

Ainda no que se refere ao envolvimento das prostaglandinas na fisiologia do epitélio intestinal, existem vários trabalhos científicos evidenciando estes eicosanóides como intermediadores da secreção intestinal induzida por uma série de agentes farmacológicos. Nessa perspectiva, foi observado que fMLP (Finley & Smith, 1989; Barret e cols., 1990), PAF (Hanglow e cols., 1989, Powell, 1992),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Powell, 1992), leucotrienos (Smith e cols., 1988; Smith e cols., 1992), IL-1 (Chiossone e cols., 1990; Chang e cols., 1990), IL-3 (Chang e cols., 1990) e  $\text{TNF-}\alpha$  (Kandil e cols., 1992), atuam indiretamente via produção de prostaglandinas por células imunes presentes na lâmina própria e submucosa intestinal.

A literatura relata que há um aumento na síntese de leucotrienos intestinais, tanto em animais com inflamação intestinal induzida experimentalmente como em indivíduos com colite ulcerativa. Portanto, essas evidências têm sugerido a participação desses agentes na patogênese das doenças inflamatórias do intestino (Schreiber e cols., 1992; Smith, 1992; McKay & Perdue, 1993). Não obstante, o papel dos leucotrienos na fisiologia do enterócito ainda precisa ser melhor

esclarecido, levando-se em consideração a existência de uma série de discordâncias que existe entre diversos autores. Por exemplo, há trabalhos que demonstram que os peptidoleucotrienos, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>, no lado seroso da câmara de Üssing, induzem um transiente aumento na corrente de curto-circuito em íleo de coelho ou rato (Smith e cols., 1988; Smith e cols., 1992; Smith, 1992).

Por outro lado, Bern e cols., 1989, não evidenciaram nenhum envolvimento entre os produtos da lipoxigenase e a secreção de cloro em intestino de coelho, montado em câmaras de Üssing. Ademais, Calderaro e cols., 1991, analisando a relação entre os eicosanóides e a secreção intestinal, também não encontraram a participação da lipoxigenase nesta atividade.

Por fim, no tocante ao LTB<sub>4</sub>, tem sido relatado que esse leucotrieno não participa diretamente no transporte iônico do intestino. Contudo, age como potente quimioatraente, estimulando, dessa forma, a migração de neutrófilos para o intestino, com conseqüente lesão da mucosa intestinal (Elton e cols, 1989; Smith, 1992; McKay & Perdue, 1993).

Dentre as células da lâmina própria intestinal tem sido referido que os macrófagos, mastócitos e células endoteliais são fontes importantes do fator de agregação plaquetária (Snyder, 1990). Existe uma série de evidências clínicas, experimentais e histopatológicas, correlacionando o PAF com doenças inflamatórias do intestino (Schreiber e cols., 1992; McKay & Perdue, 1993; Morteau e cols., 1993; Fonteles e cols., 1995; Meenam e cols., 1996).

Especificamente no tocante a secreção intestinal, foi demonstrado que o fator de agregação plaquetária é capaz de produzir alterações na corrente de curto-circuito em intestino de rato e coelho, em câmaras de Üssing, de forma dose dependente. Observou-se, ainda, que este efeito é bifásico ou seja, logo após à sua adição (1-2 min.) ocorre um aumento na I<sub>sc</sub> e somente 15 minutos depois há um

novo pico (Hanglow e cols., 1989; Berne e cols., 1989; Powell, 1992). Por fim, demonstrou-se, também, que esta atividade secretória intestinal é dependente da síntese de prostaglandinas, assim como da ativação do sistema nervoso entérico (Hanglow e cols., 1989).

O envolvimento do peróxido de hidrogênio na neurofisiologia da secreção intestinal pode ocorrer tanto por mecanismos diretos como indiretos. Na primeira situação, este agente interage com o epitélio intestinal, através de um mecanismo dependente de cálcio, alterando a absorção de NaCl e a secreção de cloreto (Powell, 1992, Tamai e cols., 1992).

No tocante ao efeito indireto do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi observado que este metabólito atua por meio da síntese de prostaglandinas que, por sua vez, alteram o transporte intestinal por processos mediados por nucleotídeos cíclicos. Ademais, à semelhança do observado com o fator de agregação plaquetária, o peróxido de hidrogênio produz alterações bifásicas na corrente de curto-circuito (Karayalcin e cols., 1990; Powell, 1992).

A partir de observações clínicas e experimentais tem sido referido que determinadas citocinas, em especial a IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , participam da fisiopatologia da lesão e/ou secreção intestinal. Há vários trabalhos mostrando que essas moléculas possuem ações, do tipo autócrina, parácrina e endócrina, que medeiam direta ou indiretamente as alterações funcionais, locais ou sistêmicas, relacionadas com a patogênese das doenças inflamatórias no intestino (Sartor e cols., 1988; Kusagami e cols., 1991; Isaacs e cols., 1992; Young e cols., 1993; Hyams e cols., 1993; McKay & Perdue, 1993; Sartor, 1994).

O fator de necrose tumoral é uma citocina pró-inflamatória produzido por vários tipos celulares, em especial por linfócitos, macrófagos e mastócitos, que compõem a lâmina própria do intestino. Essa citocina tem sido comumente apontada



como um dos mediadores inflamatórios implicados nas alterações da fisiologia epitelial (Berschneider & Goralska, 1992; McKay & Perdue, 1993; McKay & Perdue, 1994; Sartor, 1994).

Ratificando o que ora se expôs, tem sido descrito que o TNF- $\alpha$ , de maneira autócrina e/ou parácrina, pode induzir uma expansão na população de células residentes da lâmina própria e epitélio intestinal, com a conseqüente liberação de outros agentes, tais como citocinas, derivados lipídicos, enzimas, oxidantes e neurotransmissores, muitos dos quais, por sua vez, são capazes de provocar secreção e lesão na mucosa intestinal (Berschneider & Goralska, 1992; Kandil e cols., 1992; McKay & Perdue, 1994).

Especificamente quanto a secreção intestinal, o efeito secretagogo do fator de necrose tumoral, ainda, é pouco explorado. Contudo, foi demonstrado que o TNF- $\alpha$  induz esta atividade, tanto na mucosa ileal, *in vitro*, como em células T-84 colocadas em cultura com fibroblastos, por mecanismos dependentes da síntese de prostaglandinas (Kandil e cols., 1992).

Dentre as células imunocompetentes que compõem a mucosa intestinal, os macrófagos têm se destacado por sua elevada capacidade de sintetizar e liberar rapidamente a interleucina-1 que, por sua vez, possui uma influência marcante na fisiopatologia da lesão e secreção intestinal (Cominelli e cols., 1989; Cominelli e cols., 1990; Chang e cols., 1990; Chiossone e cols., 1990; Morteau e cols., 1993; Theodorou e cols., 1994). Uma boa evidência que demonstra a contribuição da IL-1 na patogênese da inflamação intestinal pode ser observada em animais com colite aguda, induzida por imunocomplexo, na qual o bloqueio da atividade desta citocina, com o IL-1ra, reduz drasticamente a lesão e a síntese de eicosanóides (Cominelli e cols., 1992; Dinarello & Wolff, 1993; Ferreti e cols., 1994).

Em adição, a habilidade da interleucina-1 em estimular a síntese e liberação de outros mediadores com propriedades quimioatraentes para neutrófilos, do tipo leucotrieno B<sub>4</sub> e interleucina-8, tem sido apontada como um mecanismo importante na fisiopatologia da lesão associada às doenças inflamatórias intestinais (Baggiolini e cols., 1989; Dinarello & Wolff, 1993; Sartor, 1994).

Existem dois trabalhos clássicos demonstrando que a IL-1 produz uma intensa secreção intestinal, em mucosa ileal de coelho ou galinha montada em câmaras de Üssing, por um mecanismo sensível à ação da indometacina, sugerindo, portanto, que as prostaglandinas, provavelmente de fontes subepiteliais, são os mediadores finais da atividade secretória dessa citocina (Chang e cols., 1990; Chiossone e cols., 1990).

Os resultados obtidos por Chiossone e cols., 1990, evidenciaram que a adição de IL-1 $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  humana no lado seroso, mas não no mucoso, provoca um aumento na corrente de curto circuito, de forma concentração-dependente, com o efeito máximo na dose de 5 ng/ml e no tempo de 40 minutos. Também demonstraram que a atividade secretória intestinal dessas citocinas foi similar, tanto na magnitude do efeito quanto na cinética, sugerindo, pois, que as duas formas de IL-1 se ligam ao mesmo receptor no íleo de coelho.

Algumas evidências têm indicado que a interleucina-6 participa da amplificação da resposta inflamatória intestinal. Nesse contexto, tem sido evidenciados elevados níveis de IL-6 no intestino de indivíduos com colite ulcerativa. Observou-se, ainda, que os macrófagos residentes, presentes na lâmina própria intestinal de pacientes com doenças inflamatórias, são aptos a sintetizar grandes quantidades dessa citocina (Kusagami e cols., 1991; Schreiber e cols., 1992; Reinecker e cols., 1993).

A produção de IL-8, por células epiteliais e macrófagos residentes, é capaz de amplificar o processo inflamatório agudo no intestino, através de seus mecanismos relacionados com atividade quimiotática para neutrófilos. (McCain e cols., 1993; Eckmann e cols., 1993). Ratificando essa afirmação, foi evidenciado experimentalmente que a exposição do intestino a determinadas citocinas, dentre elas a interleucina-8, reproduz muitas características da inflamação intestinal, tais como ativação de células imunes, endoteliais e epiteliais e recrutamento de células inflamatórias circulantes (Sartor, 1994).

Por fim, tem se tornado cada vez mais evidente que a habilidade de determinadas células da lâmina própria intestinal em produzir mediadores pró-inflamatórios é extremamente importante na infiltração celular, lesão tecidual, ulceração, secreção, motilidade e fibrose intestinal. Não obstante, a compreensão da complexa interação dessas células com seus mediadores e/ou sistema nervoso entérico, ainda, se encontra em fase bastante superficial (Schreiber e cols., 1992; Perdue & McKay, 1994; Sartor, 1994).

## 2- OBJETIVOS

A partir dos resultados obtidos por Lima e cols., 1989, evidenciando que a injeção de toxina A no intestino de coelho produz um infiltrado de células mononucleares na lâmina própria e superfície do epitélio, com a conseqüente lesão e secreção intestinal; bem como pelo fato de se haver demonstrado que ambas as toxinas do *C. difficile* são potentes indutoras da migração de neutrófilos em cavidades peritoneais e bolsas de ar subcutâneas, dependentemente da liberação de fatores quimiotáticos, por macrófagos residentes (Rocha e cols., 1997; Souza e cols., 1997), levantou-se a hipótese de que os efeitos intestinais das toxinas A e B resultam de mecanismos indiretos mediados, em parte, pela estimulação de células residentes, em especial macrófagos que, por sua vez, participam da fisiologia e imunofarmacologia do epitélio intestinal através da síntese e liberação de mediadores inflamatórios.

Por conseguinte, o objetivo geral dessa pesquisa foi investigar a importância dos mediadores inflamatórios, produzidos por macrófagos estimulados com as toxinas A ou B, na secreção intestinal. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1- Determinar o efeito secretório do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ou B no íleo de coelho, montado em câmaras de Üssing.

2- Investigar a participação de G proteína na síntese do(s) possível(is) fator(es) de secreção intestinal presente(s) neste material biológico.

3- Avaliar o efeito de diferentes bloqueadores farmacológicos na produção do(s) referido(s) fator(es) oriundo das culturas de macrófagos estimulados com as toxinas A ou B.

4- Identificar o(s) fator(es) de secreção intestinal presente(s) no sobrenadante de macrófagos estimulados com as toxinas A ou B.

5- Determinar o mecanismo de ação dess(e)s fatores na mucosa ileal de coelho, em câmaras de Üssing.

### 3- MATERIAIS & MÉTODOS

#### 3.1-Animais

##### 3.1.1- Ratos

Foram utilizados ratos wistar, *Ratus norvegicus*, de ambos os sexos, pesando entre 170 e 220 g, provenientes do Biotério Central da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará. Estes animais eram mantidos em caixas de plástico, com livre acesso à ração e à água.

##### 3.1.2- Coelhos

Coelhos albinos, variedade Nova Zelândia, de ambos os sexos, pesando entre 1,5 e 2,5 kg, provenientes do criatório da Universidade Federal do Ceará, localizado no Campus do Pici. Estes animais foram mantidos em jejum durante 24 h, antes do experimento, com livre acesso à água.

#### 3.2. Toxinas

As toxinas A e B do *Clostridium difficile* foram gentilmente cedidas pelo Dr. David M. Lyerly (TECLAB, VA-USA). Essas toxinas foram obtidas do *C. difficile* (VPI strain 10463), mantido anaerobicamente em recipiente apropriado, contendo infusão de caldo cérebro-coração, de acordo com o método pré-estabelecido (Lyerly e cols., 1982; Sullivan e cols., 1982). A purificação das toxinas A e B foi realizada por precipitação em sulfato de amônia, através de cromatografia de troca iônica em coluna de dietilaminoetil sefarose e cromatografia de imunoafinidade. A

homogeneidade dessas toxinas foi demonstrada por imunoeletroforese cruzada e eletroforese de gel poliacrilamida (Lyerly e cols., 1982).

Por outro lado, as toxinas ativa e mutante da *Bordetella pertussis* foram doadas pelo Dr. E. L. Hewlett (Universidade da Virgínia, VA-USA). A toxina pertussis ativa e a toxina pertussis mutante foram purificadas a partir do meio de cultura da *Bordetella pertussis* 165 e 165-9K/129G, respectivamente. Para tanto, usaram-se cromatografia de hidroxiapatita e cromatografia de afinidade com fetuína (Pizza e cols., 1989).

### 3.3. Drogas

Os agentes cicloheximida, inibidor de tripsina, fluoreto de fenilmetilsulfonil, indometacina, quinacrina, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), pentoxifilina, RPMI 1640, anticorpos monoclonais anti-IL-1 $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ , tetrodotoxina, e azul de tripan foram adquiridos na companhia Sigma (St Louis, MO, USA). O BN 52021 foi cedido pelo Dr. Boris Vargaftig (Instituto Pasteur, Paris, França). Ademais, o IL-1-ra, thioglicolato, talidomida, dexametasona, MK 886 e bumetanida foram obtidos junto à Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA, USA), Difco (Detroit, MI, USA), ICN Biomedical Inc. (Aurora, OH, USA), Merck Sharp & Dohme (São Paulo, SP, Brasil) Merck Sharp & Dohme (NJ, USA) e Sintofarma (São Paulo, SP, Brasil), respectivamente.

### 3.4- Composição das soluções e meio de cultura

Esse tópico demonstra, através das tabelas 1, 2, 3, 4 e 5, as soluções e meio de cultura utilizados na fase experimental desta pesquisa, dando ênfase a composição, concentração e companhia fornecedora de cada elemento.

**Tabela-1 Meio de cultura RPMI**

Composição	Concentração	Companhia
RPMI 1640	10,4 g	<sup>a</sup> Sigma
Bicarbonato de sódio	2,2 g	<sup>b</sup> Gibco
Tampão Hepes	2,381 g	Sigma
Água destilada e deionizada	1,0 l	--

\* O pH foi corrigido para 7,4

<sup>a</sup>Sigma: St. Louis, MO, USA; <sup>b</sup>Gibco: Gaithersburg, MD, USA

**Tabela-2 Solução de tioglicolato 3%**

Composição	Concentração	Companhia
Meio tioglicolato desidratado	3,0 g	<sup>a</sup> Difco
Água destilada e deionizada	0,1 l	--

\* O pH foi corrigido para 7,4

<sup>a</sup>Difco: Detroit, MI, USA

**Tabela-3 Solução salina tamponada com fosfato (PBS)**

Composição	Concentração	Companhia
Cloreto de sódio	8,0 g	<sup>a</sup> Reagen
Cloreto de potássio	0,2 g	Reagen
Fosfato de sódio dibásico	1,15 g	<sup>b</sup> Fisher
Fosfato de sódio monobásico	0,2 g	Reagen
Água destilada	1,0 l	--

\* O pH foi corrigido para 7,4

<sup>a</sup>Reagen: Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>b</sup>Fisher: Springfield, NJ, USA

**Tabela-4 Líquido de Turk**

Composição	Concentração	Companhia
Ácido acético glacial	20,0 ml	<sup>a</sup> Reagen
Violeta genciana	2,0 ml	Reagen
Água destilada	1,0 l	--

<sup>a</sup>Reagen: Rio de Janeiro, RJ, Brasil



**Tabela-5 Composição da solução de Ringer**

Composição	Concentração (mEq/l)	Companhia
Na <sup>+</sup>	145,0	<sup>a</sup> Sigma
K <sup>+</sup>	4,6	Sigma
Ca <sup>++</sup>	3,4	Sigma
Mg <sup>++</sup>	0,8	Sigma
Cl <sup>-</sup>	119,0	Sigma
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25,0	Sigma
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0,8	Sigma

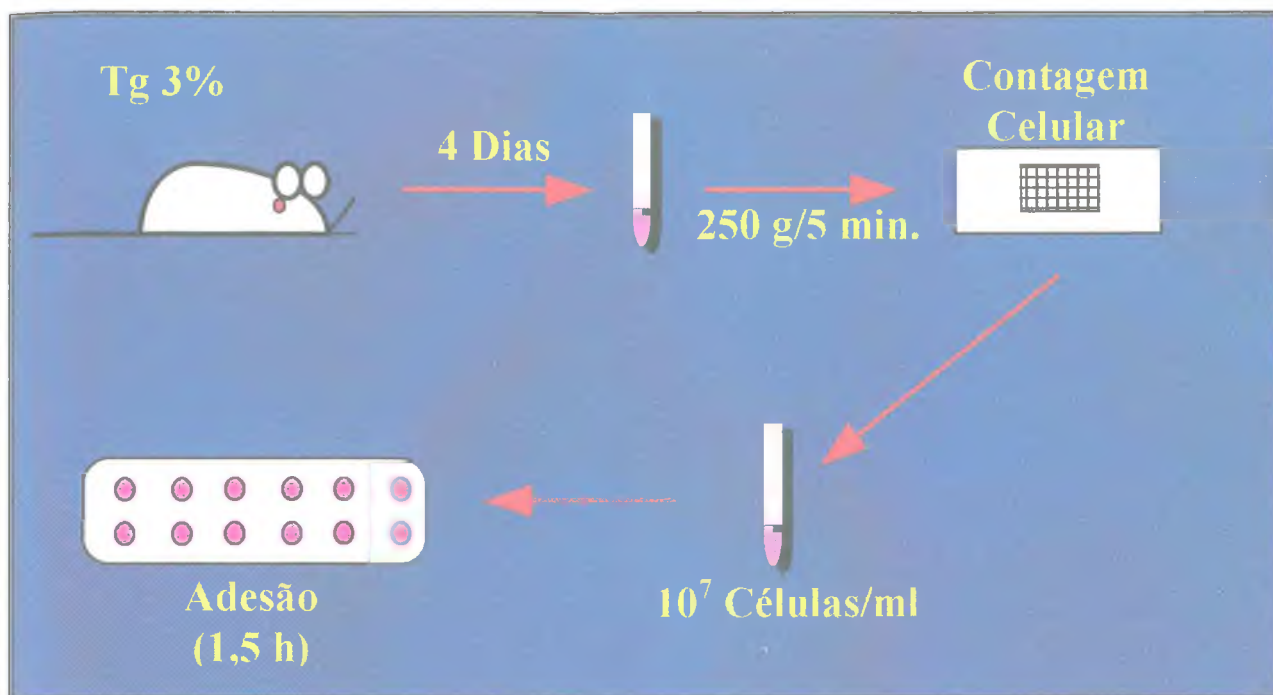
\* O pH foi corrigido para 7,4

<sup>a</sup>Sigma: St. Louis, MO, USA

### 3.5- Cultura de macrófagos

#### 3.5.1- Obtenção dos macrófagos

Esse protocolo foi executado de forma semelhante ao descrito em Ribeiro e cols., 1991. Portanto, Os macrófagos foram obtidos de cavidades peritoneais de ratos que receberam, 4 dias antes, 10 ml de uma solução de tioglicolato a 3%, intraperitonealmente. Para a coleta dos macrófagos, os ratos foram sacrificados com éter etílico e imediatamente injetados por via intraperitoneal, com 10 ml de meio de cultura RPMI, contendo heparina na proporção de 0,1 ml de heparina/100 ml de meio. Após leve massagem, com auxílio de seringas (10 ml) e agulhas (40x12) fenestradas, eram retirados em torno de 70% do volume injetado, que era acondicionado em tubos Falcon.



**Figura-1. Obtenção da monocamada de macrófagos.** Esse esquema demonstra o isolamento dos macrófagos, passando pela injeção do tioglicolato, coleta do exsudato peritoneal, ajuste celular e etapa da adesão.

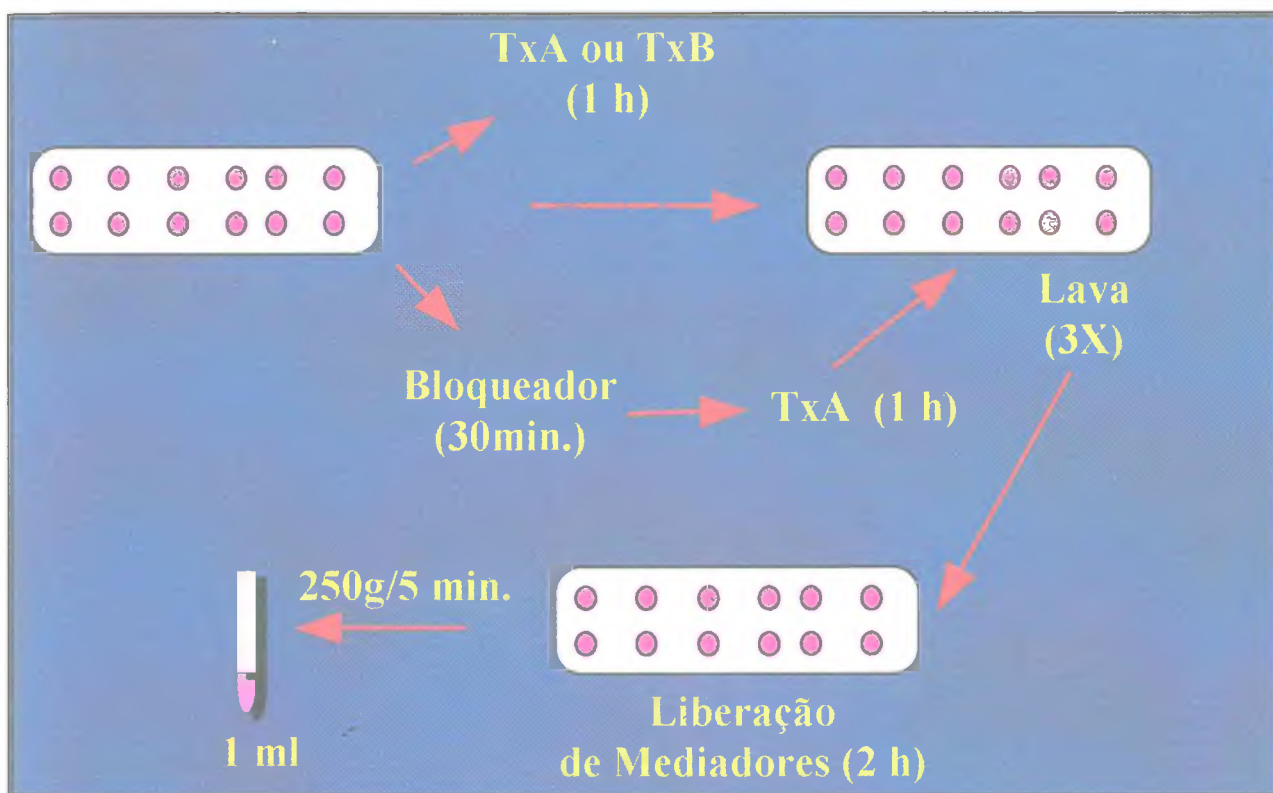
### 3.5.2- Manuseio dos macrófagos *in vitro*

Após a coleta do exsudato peritoneal, as células presentes neste material foram lavadas duas vezes por centrifugação, 250g por cinco minutos, em centrífuga refrigerada. Logo em seguida, as células foram ressuspensas em RPMI, de forma a se obter, com base na contagem total em câmaras de Neubauer, uma suspensão celular com  $10^7$  células/ml.

A seguir, essa suspensão foi distribuída em placas de 12 poços, em um volume de 2,0 ml por poço, as quais foram incubadas, em estufa a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>, por um período de uma hora e meia, a fim de que os macrófagos pudessem aderir ao fundo das placas. Ao final deste período, o sobrenadante da cultura foi descartado e as células aderidas foram lavadas três vezes com RPMI. Este

procedimento elimina as demais células presentes no lavado peritoneal, considerando que normalmente elas não aderem ao plástico, sendo, portanto, esta uma propriedade exclusiva dos macrófagos.

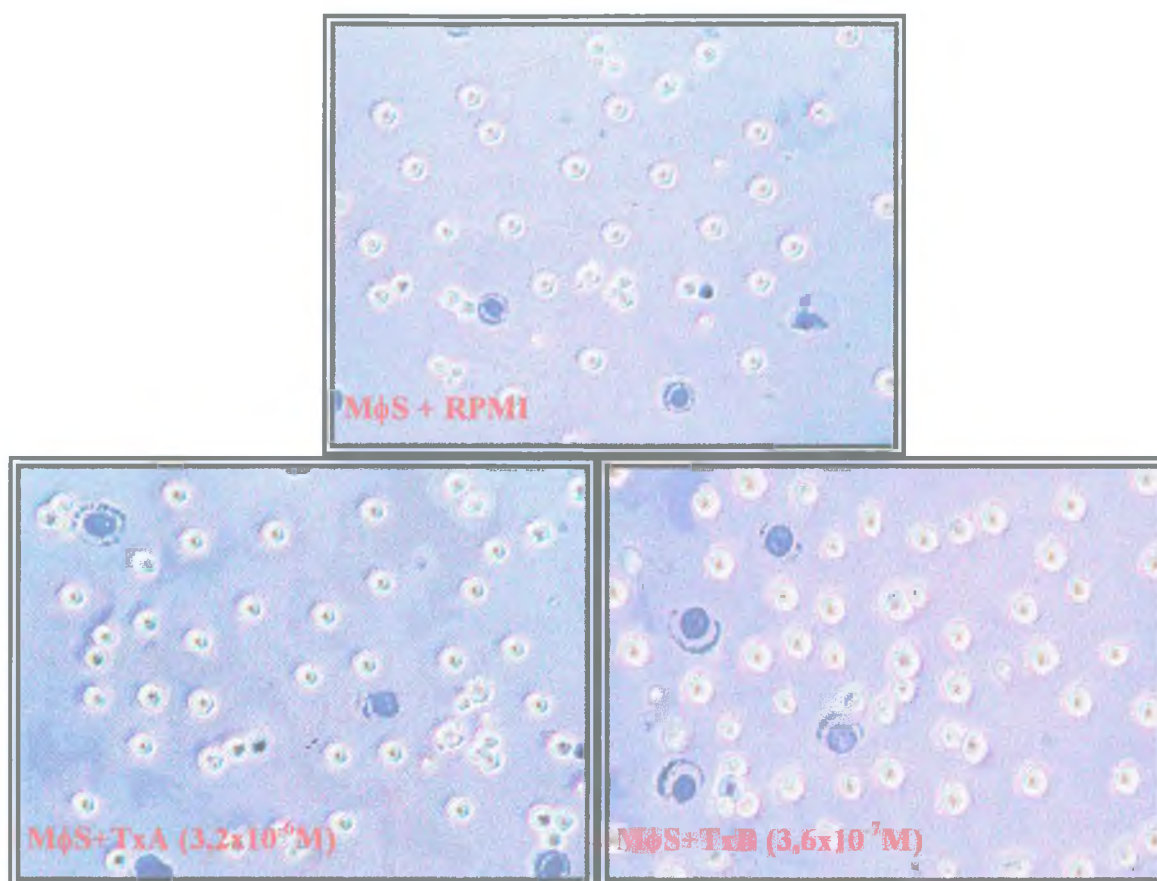
Os macrófagos aderidos eram estimulados ou não com toxina A ou toxina B durante uma hora. Após esta etapa, o sobrenadante era descartado e as monocamadas de macrófagos novamente lavadas, por mais três vezes. A seguir, adicionava-se 1,0 ml de RPMI, contendo soro fetal bovina a 10%, sem estímulo, por poço da placa de cultura, e duas horas depois os sobrenadantes eram colhidos, centrifugados e imediatamente utilizados para os ensaios em câmaras de Üssing.



**Figura-2. Manuseio dos macrófagos.** Esse painel mostra a cultura de macrófagos, enfocando o protocolo experimental, etapa da liberação de mediadores e obtenção do sobrenadante.

### 3.5.3 Análise da viabilidade celular

A viabilidade celular era analisada, através da técnica do corante azul de tripam, ao final de cada cultura de macrófagos. Para tanto, era feita uma raspagem das células aderidas na placa de cultura, em seguida adicionavam-se 200  $\mu\text{l}$  de meio RPMI e, desta suspensão, eram retirados 20  $\mu\text{l}$  que, por sua vez, eram adicionados a 5  $\mu\text{l}$  do corante azul de tripam, em uma lâmina de microscopia. A análise era feita através da microscopia óptica, com base na morfologia celular e na impregnação ou não do corante, conforme a **Figura-3**. O percentual da viabilidade celular observado nos diferentes protocolos experimentais encontra-se demonstrado na **Tabela-6**.



**Figura-3. Análise da viabilidade celular.** Esse procedimento baseava-se na impregnação ou não do azul de tripam. Assim, as células com aspecto fluorescente e às coradas em azul representam as viáveis e não viáveis, respectivamente.

**Tabela-6 Percentual da viabilidade dos macrófagos**

Protocolo	Diluição	Dose	Viabilidade (%)
M $\phi$ S+RPMI	RPMI	--	97
M $\phi$ S+TxA	RPMI	3,2x10 <sup>-7</sup> M	95
M $\phi$ S+TxA	RPMI	9,6x10 <sup>-7</sup> M	96
M $\phi$ S+TxA	RPMI	3,2x10 <sup>-6</sup> M	92
M $\phi$ S+TxB	RPMI	3,6x10 <sup>-7</sup> M	94
M $\phi$ S+TxA+TxP	RPMI	9,5x10 <sup>-7</sup> M	91
M $\phi$ S+TxA+TxPm	RPMI	9,5x10 <sup>-7</sup> M	93
M $\phi$ S+TxA+CHX	PBS	10 <sup>-5</sup> M	91
M $\phi$ S+TxA+I. PROT.	PBS	1mg/ml	97
M $\phi$ S+TxA+DEXA	RPMI	10 <sup>-5</sup> M	91
M $\phi$ S+TxA+QUINAC.	PBS	10 <sup>-5</sup> M	93
M $\phi$ S+TxA+INDO	NaHCO <sub>3</sub> 5%	10 <sup>-5</sup> M	90
M $\phi$ S+TxA+MK886	Metilcelulose 0,1%	10 <sup>-5</sup> M	92
M $\phi$ S+TxA+NDGA	Etanol	10 <sup>-6</sup> M	91
M $\phi$ S+TxA+ BN52021	Etanol	10 <sup>-5</sup> M	93
M $\phi$ S+TxA+PTF	DMSO	5X10 <sup>-4</sup> M	89
M $\phi$ S+TxA+TALID	DMSO	1,5X10 <sup>-5</sup> M	92

A **Tabela-6** demonstra parte das estratégias experimentais utilizadas nessa pesquisa, enfocando cada protocolo, forma de diluição, concentração das drogas e toxinas e percentual da viabilidade celular. É importante salientar que a partir do protocolo M $\phi$ S+TxA+TxP, a toxina A foi usada na dose de 3,2x10<sup>-6</sup>M. Portanto, a partir daí, as doses observadas nesta tabela representam as concentrações dos bloqueadores farmacológicos utilizados em cada experimento.

### 3.6- Dosagem de citocinas

#### 3.6.1- Ensaio para detecção de IL-1 $\beta$

Os sobrenadantes foram obtidos de forma análoga à descrita na seção 3.5.2. Contudo, as amostras foram estocadas a -70 °C até o uso. A concentração de IL-1 $\beta$  foi determinada através de um ELISA específico (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; Rat IL-1 $\beta$ ; Biosource International, Camarillo, Califórnia, USA).

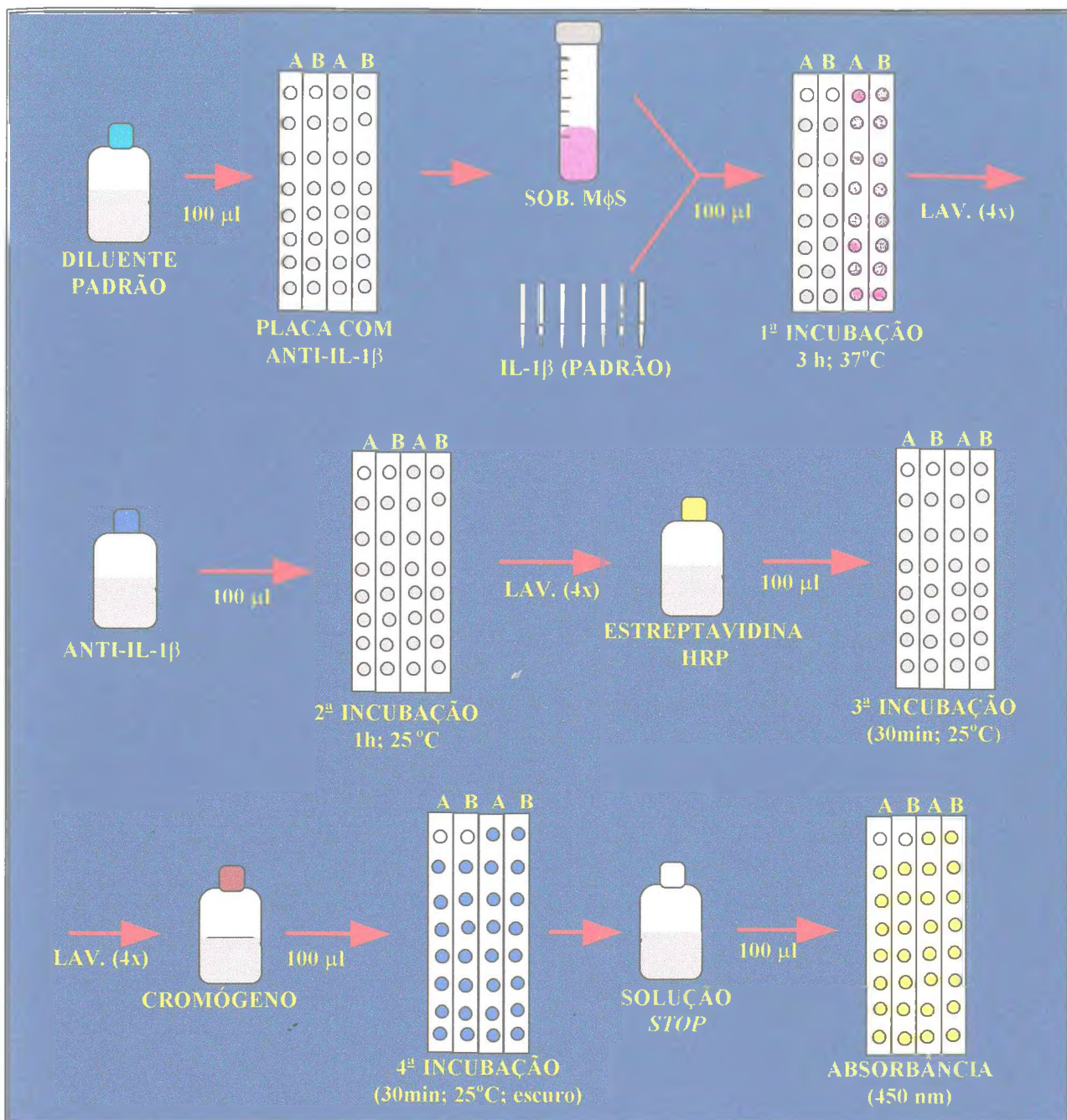
O *kit* para IL-1 $\beta$  foi usado de acordo com as especificações do fabricante. Dessa forma, 100  $\mu$ l do diluente-padrão foram distribuídos em cada poço, contendo um anticorpo para IL-1 $\beta$ . A seguir, distribuíram-se 100  $\mu$ l da amostra/poço, sendo a placa imediatamente coberta e incubada por 3 h, a 37 °C. Após esse período, o material foi descartado e os poços lavados, quatro vezes, com uma solução tampão.

Na etapa seguinte, 100  $\mu$ l de anti-IL-1 $\beta$  foram adicionados a cada poço e aí permaneceram por 1 h, a temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, as soluções foram desprezadas e os poços novamente lavados, por mais quatro vezes, com o líquido-tampão. Após este procedimento, 100  $\mu$ l de streptavidina-HRP foram distribuídos em cada poço. A placa foi coberta e deixada por mais um período de 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, essa placa foi esvaziada e lavada de acordo com o método há pouco descrito.

A fase subsequente consistiu na adição de 100  $\mu$ l de cromógeno a cada poço. Nessa etapa, a placa foi incubada, por 30 minutos, a temperatura ambiente (25 °C), em local escuro. Logo em seguida, 100  $\mu$ l da solução bloqueadora de reação foram adicionados aos poços. Por fim, a leitura da absorbância foi realizada a 450 nm, sendo os níveis de IL-1 $\beta$  expressos em picogramas por ml.

As curvas do padrão foram construídas para cada experimento de forma análoga à descrição feita há pouco. Contudo, inicialmente foram adicionados aos

poços 100  $\mu$ l dos padrões de IL-1 $\beta$  nas respectivas diluições (46,9, 93,7, 187, 375, 750, 1500 e 3000 pg/ml), em substituição aos sobrenadantes de macrófagos.



**Figura-4.** Ensaio para detecção de interleucina-1 $\beta$ . Nesse esquema, evidenciam-se as etapas do ELISA para IL-1 $\beta$  desde a distribuição das amostras até a leitura da absorbância.

### 3.6.2- Ensaio para detecção de TNF- $\alpha$

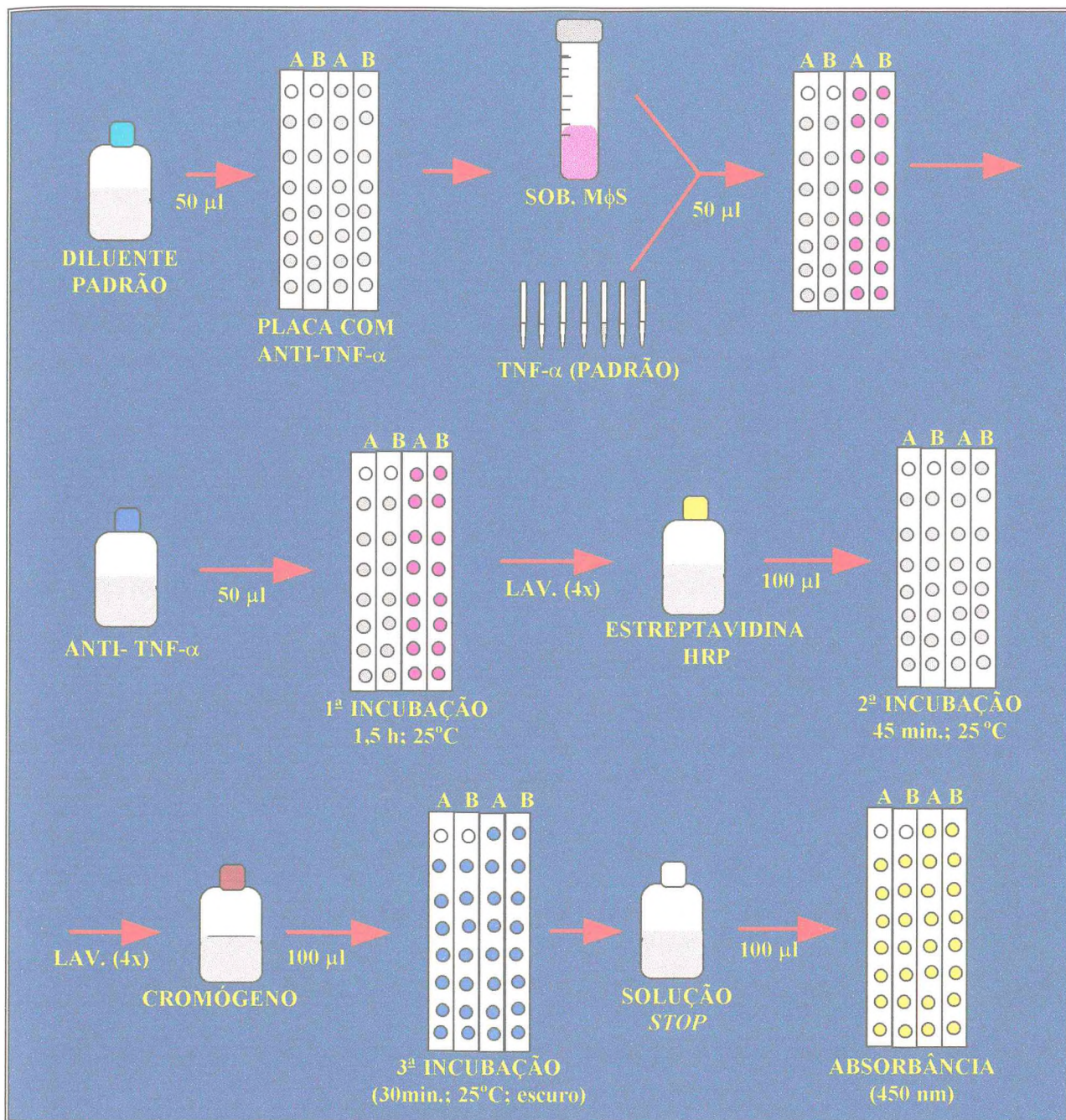
Os níveis de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de macrófagos estimulados com as toxinas A ou B foram analisados por meio de um *kit* de ELISA, específico para essa citocina (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; Rat TNF- $\alpha$ ; Biosource International, Camarillo, Califórnia, USA).

Para tanto, inicialmente colocaram-se 50  $\mu$ l do diluente padrão em cada poço que continha um anticorpo específico para TNF- $\alpha$  de rato. A seguir, 50  $\mu$ l das amostras, assim como 50  $\mu$ l dos padrões, nas respectivas diluições (15,6, 31,2, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 pg/ml), foram distribuídos em cada poço da placa. A etapa subsequente constou da adição de 50  $\mu$ l do segundo anticorpo anti- TNF- $\alpha$ . Após esse procedimento, a placa foi incubada a temperatura ambiente (25 °C), por 1,5 h. Passado esse período, as amostras e padrões foram descartados e os poços lavados, quatro vezes, com uma solução-tampão fornecida pelo próprio fabricante.

Em outra etapa, foram distribuídos 100  $\mu$ l de estreptavidina-HRP, por poço, e logo em seguida, a placa foi incubada por mais 45 minutos, a 25 °C. Posteriormente, o conteúdo dessa placa foi descartado e repetiu-se o procedimento da lavagem, consoante a metodologia descrita.

Por último, foram adicionados 100  $\mu$ l de cromógeno a cada poço e, subsequentemente, a placa foi incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente (25 °C), no escuro. Logo após essa etapa, colocaram-se 100  $\mu$ l/poço da solução bloqueadora de reação. A leitura da absorbância foi realizada imediatamente, a 450 nm, sendo os níveis de TNF- $\alpha$  expressos em picogramas por ml.





**Figura-5.** Ensaio para detecção de TNF- $\alpha$ . Esse painel representa um desenho esquemático das várias etapas do ELISA para TNF- $\alpha$ , passando pelas etapas da distribuição do diluente-padrão, das amostras do sobrenadante de macrófagos e do anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , incubações e leitura da absorvância.

### 3.7- Câmaras de Üssing

#### 3.7.1- Preparação da solução de Ringer

A solução de Ringer utilizada nos experimentos com câmaras de Üssing foi elaborada de acordo com a fórmula preconizada por Field e cols., 1971. Portanto, sua constituição química encontra-se sumariada na **Tabela-5**. Após a adição dos componentes da solução, o Ringer era saturado durante 15 minutos com uma mistura carbogênica, contendo 95% O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo em seguida o seu pH corrigido para 7,4. Por fim, adicionavam-se D(+) glicose (100mg/dl; Sigma; St. Louis, MO) na solução perfusora do lado seroso e D(+) manitol (100mg/dl; Sigma; St. Louis, MO) na solução do lado mucoso (Soares e cols., 1991).

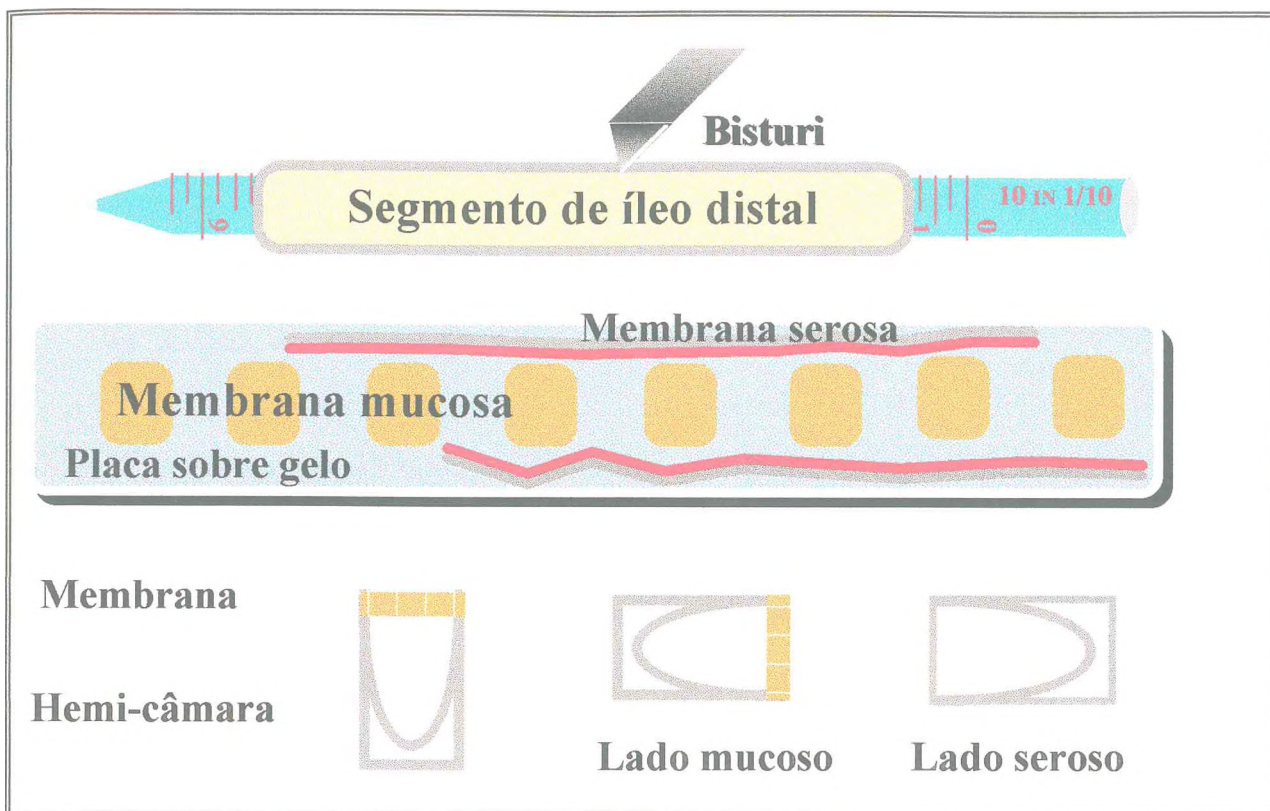
#### 3.7.2- Preparação e montagem do íleo

Os coelhos foram sacrificados e logo em seguida, o abdome foi aberto, através de uma incisão na linha mediana, sendo o íleo identificado pela junção íleo-cecal.

Após esta identificação, aproximadamente 25 cm de íleo distal foi seccionado e colocado em solução de Ringer a 4 °C. A seguir, introduzia-se uma pipeta, de 10 ml, no segmento ileal e, logo após, era feita uma incisão superficial ao longo da margem da linha mesentérica para posterior retirada da camada serosa. Essa incisão era aprofundada, e desta forma, a superfície mucosa era exposta e posteriormente lavada com PBS, para retirada de eventual conteúdo intestinal.

Por fim, o íleo era dividido em fragmentos de  $\pm 3$  cm e colocado entre duas hemi-câmaras de acrílico, com 1cm<sup>2</sup> de área circular interna. Todos estes procedimentos foram executados em uma placa de petri, sobre uma superfície com

gelo, de acordo com a metodologia descrita anteriormente (Üssing & Zerahn, 1951; Schultz & Zalusky, 1964).



**Figura-6. Preparação do íleo.** Essa figura mostra a montagem do íleo de coelho, desde a etapa da retirada da camada serosa até a disposição das membranas nas câmaras de Üssing.

### 3.7.3- Montagem e funcionamento das câmaras

Cada câmara era fixada no suporte e simultaneamente preenchida com 0,8 ml de solução de Ringer glicosado e Ringer manitol nos lados seroso e mucoso, respectivamente, sendo em seguida, liberada a circulação dos 9,2 ml de perfusado, contidos nos tubos de circulação, previamente aquecidos e aerados, de acordo com o método relatado por Soares e cols., 1991.

A circulação e a aeração dos 10 ml do perfusado, em cada hemi-câmara e seu tubo de circulação correspondente, foram mantidas através do borbulhamento com uma mistura carbogênica, composta por 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico.

A temperatura do perfusato era mantida a 37,8 °C, através da circulação de água entre as paredes da camisa dos tubos de circulação. Para tanto, o aquecimento e a circulação eram produzidos por meio de uma bomba de circulação termo-estável.

As pontes de ringer-ágar eram confeccionadas, por meio do preenchimento das cânulas de polietileno (PE 205 e PE 280 com 1,57 e 2,15 mm de diâmetro interno, respectivamente), com uma solução de Ringer-ágar composta por 2,4 g de ágar (Sigma, St. Louis, MO, USA) em 50 ml de Ringer. Essa solução era aquecida durante 30 minutos e, logo em seguida, era injetada nas cânulas relatadas linhas atrás. A confecção das pontes de ringer-ágar era realizada de acordo com a técnica descrita por Soares e cols., 1991.

Cada uma das pontes de polietileno de 1,57 mm de diâmetro interno foi conectada no orifício central de cada uma das hemi-câmaras, sendo o outro extremo imerso numa solução saturada de KCl, juntamente com o eletrodo de calomel. Por outro lado, a ponte, de 2,15 mm de diâmetro interno, foi conectada ao orifício distal da hemi-câmara e o outro extremo foi imerso na solução saturada de cloreto de potássio, com o eletrodo de prata. A seguir, os pares de eletrodos, dois de calomel e dois de prata, foram conectados ao clampeador automático de voltagem (Soares e cols., 1991).

Após todo esse aparato técnico, os clampeadores foram ligados e o amperímetro zerado a fim de ser medido e registrado o potencial elétrico espontâneo, gerado pelo sistema. Caso o potencial espontâneo ultrapassasse os limites, +1,0 a -1,0 mV, o sistema elétrico era desmontado e imediatamente refeito.

As medidas elétricas, corrente de curto-circuito, diferença de potencial e resistência transmembrana, eram realizadas em intervalos regulares de 10 minutos, durante todo o tempo de experimento.

O funcionamento das câmaras de Üssing era dividido nos seguintes períodos:

- período inicial. As medidas elétricas monitoradas durante este período foram usadas como critério de triagem das condições do tecido. Caso estas medidas ultrapassassem muito a média das outras câmaras, a membrana era imediatamente substituída.

- período de estabilização (30 min.). Nesse período, foi dada uma atenção especial às variações da corrente de curto-circuito; se houvesse variações maiores que 20%, entre o final deste período e as leituras anteriores, a câmara era automaticamente eliminada do experimento.

- período de adição (60min.). Após o período de estabilização, as câmaras eram divididas de acordo com cada protocolo experimental. A seguir, era retirado 1,0 ml do perfusado. Os sobrenadantes de macrófagos, testes e controles, eram adicionados no volume de 1,0 ml, de tal maneira que o volume perfusado retornasse aos 10 ml.

- período de teste funcional (20 min.). Independentemente do protocolo experimental, no início deste período, eram retirados 200µl do perfusado e adicionado o mesmo volume de uma solução de teofilina,  $10^{-3}$  M, no lado seroso, com o objetivo de testar o estado elétrico final da membrana. Caso o clampeador de voltagem apresentasse uma sobrecarga de corrente, *over-load*, os dados obtidos nesta câmara eram eliminados dos resultados experimentais.

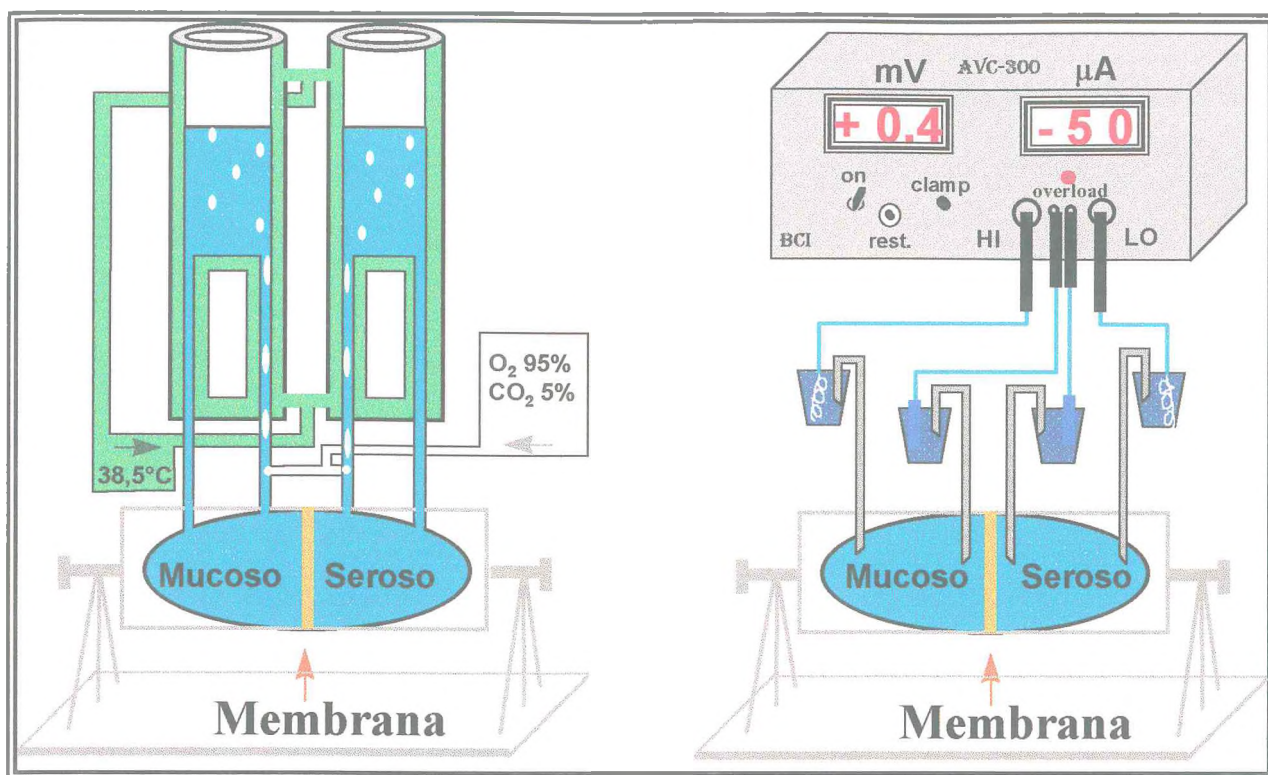


Figura-7. Funcionamento das câmaras de Ussing. A primeira figura desse painel representa os mecanismos de circulação e aeração das câmaras de Ussing, enquanto a segunda mostra o sistema elétrico.

### 3.8- Protocolos Experimentais

#### 3.8.1- Atividade secretória intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com as toxinas A e B do *Clostridium difficile*

A obtenção das monocamadas de macrófagos, nestes experimentos, foi realizada de maneira semelhante à descrita anteriormente em outra seção deste trabalho. Contudo, os macrófagos foram estimulados durante uma hora com toxina A ( $3,2 \times 10^{-7} \text{M}$ ,  $9,6 \times 10^{-7} \text{M}$  e  $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) ou toxina B ( $3,6 \times 10^{-7} \text{M}$ ). Na etapa subsequente, os sobrenadantes foram desprezados, as monocamadas foram lavadas três vezes com meio de cultura RPMI, e um novo meio enriquecido com soro fetal

ino a 10 % foi adicionado. A seguir, os macrófagos foram deixados em liberação sem estímulo, por mais duas horas, para liberação de mediadores inflamatórios. Por fim, os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados e imediatamente testados nas câmaras de Üssing.

## **3.2- Efeito da toxina A na secreção intestinal**

A toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) foi adicionada diretamente nas câmaras de Üssing, após o período de estabilização, e as medidas de corrente de curto-circuito, resistência tecidual e diferença de potencial foram registradas a cada 10 minutos, conforme o descrito na seção materiais e métodos desta dissertação.

## **3.3- Efeito do anticorpo PCG<sub>4</sub> na síntese do fator de secreção intestinal produzido por macrófagos estimulados com toxina A**

A toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) foi pré-incubada com PCG<sub>4</sub> (1:10), durante 30 minutos. Em seguida, essa solução foi adicionada às monocamadas de macrófagos e permaneceu por um período de uma hora. Após esta etapa, os sobrenadantes foram desprezados e as culturas de macrófagos manipuladas de forma semelhante à descrita no item 3.5.2.

## **3.4- Atividade das toxinas da *Bordetella pertussis* sobre a liberação do fator de secreção intestinal**

As monocamadas de macrófagos foram obtidas de maneira similar à metodologia aqui descrita. Contudo, a toxina pertussis ativa ( $9,5 \times 10^{-7} \text{M}$ ) e pertussis inativada ( $9,5 \times 10^{-7} \text{M}$ ) foram adicionadas separadamente às culturas, uma hora antes da estimulação dos macrófagos com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) e aí permaneceram

durante todo o tempo do estímulo, ou seja, uma hora. Após este período, os sobrenadantes foram descartados, as monocamadas foram lavadas três vezes com RPMI e os macrófagos deixados em incubação sem estímulo, por mais duas horas, para liberação de seus mediadores. A seguir, os sobrenadantes foram testados nas câmaras de Üssing.

### **3.8.5- Efeito do inibidor de síntese protéica na liberação do fator de secreção intestinal**

As monocamadas de macrófagos foram obtidas de maneira semelhante à descrita linhas atrás. Entretanto, a cicloheximida ( $10^{-5}\text{M}$ ; inibidor de síntese protéica) foi adicionada às culturas trinta minutos antes da estimulação dos macrófagos com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}\text{M}$ ) e permaneceu durante todo o tempo do estímulo com esta toxina. Após este período, os sobrenadantes eram desprezados, as monocamadas lavadas, três vezes, e os macrófagos deixados em incubação, sem estímulo, por mais duas horas, para liberação de seus produtos. Em seguida, os sobrenadantes eram recolhidos, centrifugados e testados nas câmaras de Üssing, de acordo com o método descrito em outra seção deste trabalho.

### **3.8.6. Ação dos inibidores de proteases sobre a liberação do fator de secreção intestinal**

Os macrófagos, *in vitro*, foram estimulados durante uma hora com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}\text{M}$ ). Após este período, os sobrenadantes foram desprezados, as monocamadas lavadas, e um novo RPMI contendo soro fetal bovino a 10 % foi adicionado. A seguir, os macrófagos foram deixados em incubação por um período de duas horas, sem toxina A, para liberação de seus mediadores. No início dessa



fase, os inibidores de proteases, fluoreto de fenilmetilsulfonil (1,0 mg/ml) e inibidor de tripsina (1,0 mg/ml), foram adicionadas às monocamadas de macrófagos, permanecendo aí até o final da cultura. Por fim, os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados e imediatamente testados nas câmaras de Üssing.

### **3.8.7- Efeito de inibidores de fosfolipase A<sub>2</sub>, ciclooxigenase, lipoxigenase e antagonista de PAF na síntese do fator de secreção intestinal**

Os macrófagos foram isolados de forma similar à técnica descrita em outra seção deste trabalho. Entretanto, as drogas dexametasona ( $10^{-5}$ M; inibidor de síntese protéica e fosfolipase A<sub>2</sub>), quinacrina ( $10^{-5}$ M; inibidor seletivo de fosfolipase A<sub>2</sub>), indometacina ( $10^{-5}$ M; inibidor de ciclooxigenase), NDGA ( $10^{-6}$ M, inibidor dual de ciclo e lipoxigenase), MK 886 ( $10^{-5}$ M; inibidor de lipoxigenase) e BN52021 ( $10^{-5}$  M; antagonista do fator de agregação plaquetária) foram adicionadas às culturas trinta minutos antes da estimulação dos macrófagos com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}$ M) e permaneceram durante todo o tempo do estímulo, uma hora, com esta toxina. A seguir, os sobrenadantes eram desprezados, as monocamadas lavadas, três vezes, com RPMI e novo RPMI, enriquecido com soro fetal bovino a 10 %, era adicionado e os macrófagos deixados em incubação, sem toxina A, por mais duas horas. Por fim, os sobrenadantes eram recolhidos, centrifugados e ensaiados nas câmaras de Üssing.

### **3.8.8- Efeito de inibidores da síntese de TNF- $\alpha$ na gênese do fator de secreção intestinal**

A obtenção das monocamadas de macrófagos, nestes experimentos, foi realizada de forma semelhante à descrita na seção materiais e métodos. Entretanto,

farmacos pentoxifilina ( $5,0 \times 10^{-4} \text{M}$ ; inibidor da síntese de  $\text{TNF-}\alpha$ ) e talidomida ( $10^{-5} \text{M}$ ; inibidor da síntese de  $\text{TNF-}\alpha$ ) foram adicionados às culturas trinta minutos antes da estimulação dos macrófagos com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) e permaneceram durante todo o período do estímulo. Após esta etapa, os sobrenadantes eram desprezados, as monocamadas lavadas e os macrófagos lavados em incubação, sem estímulo, por mais duas horas, para liberação de seus fatores inflamatórios. A seguir, os sobrenadantes eram recolhidos, centrifugados e utilizados nas câmaras de Üssing.

#### **3.5.2- Dosagem de $\text{TNF-}\alpha$ no sobrenadante de macrófagos estimulados com as toxinas A e B**

O sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-7} \text{M}$ , e  $10^{-6} \text{M}$ ) ou B ( $3,6 \times 10^{-7} \text{M}$ ) foi obtido de forma semelhante à descrita na seção 3.5.1. Contudo, as amostras desse sobrenadante foram estocadas a  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  até o uso. A concentração de  $\text{TNF-}\alpha$  foi determinada através de um ELISA específico para citocina.

#### **3.5.3- Ação do antagonista do receptor de interleucina-1 na secreção intestinal**

O procedimento com as monocamadas de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) foi idêntico ao descrito no item 3.5.2 deste trabalho. Todavia, o sobrenadante obtido nesse protocolo experimental foi testado na mucosa ileal pré-colelitomizada, trinta minutos antes, com o antagonista do receptor de interleucina-1 ( $\text{IL-1Ra}$ ,  $4,5 \times 10^{-6} \text{M}$ ) adicionado no lado seroso das câmaras de Üssing.

### **8.11- Efeito dos anticorpos monoclonais anti-IL-1 $\alpha$ e anti-IL-1 $\beta$ na secreção testinal**

O sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A foi incubado com os anticorpos anti-IL-1 $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  isolados ou associados, na concentração de 250  $\mu$ g/ml, durante 30 minutos, e logo em seguida, foi ensaiado em câmaras de Üssing. As medidas elétricas foram executadas de acordo com descrição prévia, na seção 3.7.3.

### **8.12- Identificação da IL-1 $\beta$ como fator de secreção intestinal**

O sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-7}$ M,  $6 \times 10^{-7}$ M e  $3,2 \times 10^{-6}$ M) ou B ( $3,6 \times 10^{-7}$ M) foi obtido de maneira análoga à metodologia descrita na seção 3.5.2. Entretanto, amostras desse sobrenadante foram armazenadas a  $-70$  °C até o uso. A concentração de interleucina-1 $\beta$  foi determinada através de um ELISA específico para IL-1 $\beta$  de rato, de acordo com a metodologia relatada no item 3.6.1.

### **8.13- Atividade da interleucina-1 $\beta$ na secreção intestinal**

Subseqüentemente ao período de estabilização, testou-se efeito secretório intestinal da IL-1 $\beta$  ( $10^{-7}$ M), adicionada no lado seroso das câmaras de Üssing, comparando-o com a atividade do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}$ M), de acordo com a metodologia descrita neste estudo.

### **3.8.14- Ação da bumetanida na atividade secretória intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com a toxina A**

O sobrenadante foi obtido de forma análoga à descrita em outra seção desta pesquisa, e imediatamente testado nas câmaras de Üssing. Este protocolo experimental seguiu o método preconizado por Chang e cols., 1990. Por conseguinte, a bumetanida ( $10^{-5}$ M) foi adicionada na porção serosa da câmara de Üssing, 10 minutos antes da adição do sobrenadante. As medidas de corrente de curto-circuito, diferença de potencial e resistência transmembrana, foram realizadas a cada 10 minutos, de acordo com o descrito na seção 3.7.3.

### **3.8.15- Efeito do pré-tratamento da mucosa ileal com tetrodotoxina e indometacina sobre a secreção intestinal**

A mucosa ileal montada nas câmaras de Üssing foi pré-tratada com indometacina ( $10^{-6}$ M) e tetrodotoxina ( $10^{-7}$ M), 20 minutos antes da adição do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}$  M). Os parâmetros elétricos, tais como, corrente de curto-circuito, diferença de potencial e resistência transmembrana, foram registradas de acordo com o método descrito no item 3.7.3.

## **3.9- Análise estatística**

A significância estatística das diferenças na corrente de curto-circuito dos vários grupos ensaiados, assim como dos resultados da dosagem de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , por ELISA, foi analisada por ANOVA (teste de Bonferroni). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Efeito secretório intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A

Os dados desse trabalho evidenciaram que o sobrenadante de macrófagos estimulados com doses crescentes de toxina A ( $3,2 \times 10^{-7} \text{M}$ ,  $9,6 \times 10^{-7} \text{M}$  e  $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) induz uma potente secreção intestinal, de forma concentração-dependente, no modelo experimental de câmaras de Üssing ( $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA}(3,2 \times 10^{-7} \text{M})} = 41,00 \pm 3,90 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 06$ ,  $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA}(9,6 \times 10^{-7} \text{M})} = 52,00 \pm 6,94 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 06$  e  $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA}(3,2 \times 10^{-6} \text{M})} = 90,00 \pm 8,63 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 09$  vs  $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{RPMI}(\text{CONTROLE})} = 20,00 \pm 3,14 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 09$ ;  $p < 0,05$ ) (**Figura-8**).

### 4.2- Cinética tempo-efeito da secreção intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ou B

Os resultados apresentados na **Figura-9** demonstram que o sobrenadante de macrófagos estimulados com a toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) provoca secreção intestinal no íleo de coelho, de maneira tempo-dependente. Dessa forma, a atividade secretória inicia-se 30 minutos após o seu uso nas câmaras de Üssing ( $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA}} = 44,00 \pm 8,12 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 08$ ;  $p < 0,05$ ) e alcança o efeito máximo em torno de 1 hora ( $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA}} = 91,00 \pm 15,15 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 08$   $p < 0,05$ ).

Por outro lado, o sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina B ( $3,6 \times 10^{-7} \text{M}$ ) não foi capaz de provocar secreção intestinal ( $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxB}} = 28,00 \pm 9,18 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 08$  vs.  $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{RPMI}} = 20,00 \pm 3,14 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 09$ ) (**Figura-9**).

### 4.3- Efeito da toxina A nas câmaras de Üssing

Nesse protocolo experimental, demonstrou-se que a adição de toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ), diretamente nas câmaras de Üssing, ao contrário do observado com o sobrenadante de macrófagos estimulados com essa enterotoxina ( $\text{Isc}_I = 66,00 \pm 7,71 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  vs.  $\text{Isc}_F = 142,00 \pm 13,76 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 10$ ;  $p < 0,01$ ), não foi capaz de provocar secreção no íleo de coelho ( $\text{Isc}_I = 60,00 \pm 5,29 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  vs.  $\text{Isc}_F = 62,00 \pm 6,82 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 05$ ;  $p > 0,05$ ) (**Figura -10**).

### 4.4- Efeito do anticorpo PCG<sub>4</sub> na síntese do fator de secreção intestinal produzido por macrófagos estimulados com toxina A

A pré-incubação da toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) com o anticorpo monoclonal PCG<sub>4</sub> (1:10), durante 30 minutos, bloqueou de forma significativa a liberação do fator de secreção intestinal produzido por macrófagos estimulados com essa toxina ( $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA}} = 91,00 \pm 15,15 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 08$  vs.  $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA} + \text{PCG}_4} = 18,00 \pm 4,54 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 06$ ;  $p < 0,05$ ) (**Figura -11**).

### 4.5- Atividade das toxinas da *Bordetella pertussis* sobre a liberação do fator de secreção intestinal

A atividade secretória intestinal, produzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ), foi inibida pelo tratamento prévio das monocamadas de macrófagos com a toxina ativa da *Bordetella pertussis* ( $9,5 \times 10^{-7} \text{M}$ ), que, por sua vez, é uma importante ferramenta farmacológica no estudo dos eventos envolvendo transdução de sinal, em virtude da sua capacidade de promover

ADP-ribosilação ( $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} = 62,00 \pm 7,62 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 06$  vs.  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} + T_{xP} = 24,00 \pm 6,56 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 06$ ;  $p < 0,01$ ) (**Figura -12**).

Por outro lado, a toxina pertussis mutante ( $9,5 \times 10^{-7} M$ ), que é desprovida dessa atividade de ADP-ribosilação, não alterou significativamente este efeito secretório intestinal ( $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} = 62,00 \pm 7,62 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 06$  vs.  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} + T_{xPm} = 52,00 \pm 8,67 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 06$ ;  $p > 0,05$ ) (**Figura -12**).

#### 4.6- Efeito do inibidor de síntese protéica na liberação do fator de secreção intestinal

A liberação do fator de secreção intestinal, produzida por macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} M$ ), foi bloqueada significativamente pelo uso do inibidor de síntese protéica, cicloheximida ( $10^{-5} M$ ) ( $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} = 91,00 \pm 15,15 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 08$  vs.  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} + CHX = 30,00 \pm 8,93 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 07$ ;  $p < 0,01$ ) (**Figura -13**).

#### 4.7- Papel de proteases na síntese do fator de secreção intestinal

A **Figura -14** evidencia que o uso de inibidores de proteases (1,0 mg/ml), do tipo inibidor de tripsina e fluoreto de fenilmetilsulfonil, nas duas horas finais da cultura, bloqueou a síntese do fator de secreção intestinal, presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} M$ ) ( $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} = 91,00 \pm 15,15 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 08$  vs.  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} + I. \text{ PROT.} = 39,00 \pm 7,43 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 07$ ;  $p < 0,01$ ).

#### 4.8- Atividade da dexametasona e quinacrina na liberação do fator de secreção intestinal

O uso de dexametasona ( $10^{-5}M$ ); bem como de quinacrina ( $10^{-5}M$ ), 30 minutos antes e durante a estimulação das monocamadas de macrófagos com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}M$ ), bloqueou de forma significativa a liberação do fator de secreção intestinal ( $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} = 91,00 \pm 15,15 \mu A \cdot cm^{-2}$ ;  $n = 08$  vs.  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} + DEXA = 36,00 \pm 7,13 \mu A \cdot cm^{-2}$ ;  $n = 07$ ;  $p < 0,01$  e  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} + QUINAC. = 42,00 \pm 6,14 \mu A \cdot cm^{-2}$ ;  $n = 06$ ;  $p < 0,05$ ) (Figuras -15 e 16, respectivamente).

#### 4.9- Efeito dos inibidores de ciclo e lipoxigenase na síntese do fator de secreção intestinal

A adição de NDGA ( $10^{-6}M$ ), inibidor dual de ciclo e lipoxigenase, assim como de indometacina ( $10^{-5}M$ ), inibidor de ciclooxigenase, às culturas de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}M$ ), reduziu a capacidade dos sobrenadantes, procedentes dessas culturas, em provocar secreção intestinal no íleo de coelho, em câmaras de Üssing ( $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} = 91,00 \pm 15,15 \mu A \cdot cm^{-2}$ ;  $n = 08$  vs.  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} + INDO = 35,00 \pm 6,12 \mu A \cdot cm^{-2}$ ;  $n = 06$  e  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} + NDGA = 47 \pm 3,6 \mu A \cdot cm^{-2}$ ;  $n = 05$ ;  $p < 0,05$ ) (Figuras -17 e 18, respectivamente).

Por outro lado, o MK 886 ( $10^{-5}M$ ), inibidor específico da enzima lipoxigenase, não foi capaz de modificar de maneira significativa a atividade secretória intestinal desse sobrenadante ( $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} = 91,00 \pm 15,15 \mu A \cdot cm^{-2}$ ;  $n = 08$  vs.  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. } M\phi s + T_{xA} + MK 886 = 81,00 \pm 18,06 \mu A \cdot cm^{-2}$ ;  $n = 08$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura -19). Vale salientar que a secreção, em ambos os protocolos experimentais, foi significativa em relação ao controle (sobrenadante procedente de monocamadas



de macrófagos que não receberam nenhum tratamento) ( $\Delta I_{sc} \text{ SOB. M}\phi\text{s} + \text{RPMI} = 20,00 \pm 3,14 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 09$ ;  $p < 0,05$ )

#### 4.10- Envolvimento do fator de agregação plaquetária na gênese do fator de secreção intestinal

A **Figura-20** demonstra que a adição de BN52021 ( $10^{-5}\text{M}$ ), antagonista do receptor de PAF, às monocamadas de macrófagos cultivados na presença de toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}\text{M}$ ) provocou um bloqueio parcial na síntese do fator de secreção intestinal ( $\Delta I_{sc} \text{ SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA} = 91,00 \pm 15,15 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 08$  vs.  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA} + \text{BN 52021} = 41,00 \pm 9,73 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 06$ ;  $p < 0,05$ ).

#### 4.11- Efeito de inibidores da síntese de TNF- $\alpha$ na gênese do fator de secreção intestinal

Esse protocolo evidenciou que o uso da pentoxifilina ( $5,0 \times 10^{-4}\text{M}$ ) ou talidomida ( $1,5 \times 10^{-5}\text{M}$ ), inibidores da síntese de TNF- $\alpha$ , nas culturas de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}\text{M}$ ), produz um bloqueio parcial na síntese do fator de secreção intestinal ( $\Delta I_{sc} \text{ SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA} = 91,00 \pm 15,15 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 08$  vs.  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA} + \text{PTF} = 47,00 \pm 7,22 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 06$  e  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA} + \text{TALID.} = 48,00 \pm 11,23 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 06$ ;  $p < 0,05$ ) (**Figuras -21 e 22**, respectivamente).

#### 4.12- Dosagem de TNF- $\alpha$ no sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ou B

A análise dos sobrenadantes, por meio da técnica de ELISA, evidenciou que ambas as toxinas do *Clostridium difficile* são capazes de estimular a síntese de TNF-

$\alpha$  por macrófagos, *in vitro* (SOB M $\phi$ s + TxA $_{(3,2 \times 10^{-7} \text{ M})}$ ) = 803,00  $\pm$  17,40 pg/ml; n = 04, SOB M $\phi$ s + TxA $_{(3,2 \times 10^{-6} \text{ M})}$  = 1040,00  $\pm$  13,72 pg/ml; n = 05 e SOB M $\phi$ s + TxB $_{(3,6 \times 10^{-7} \text{ M})}$  = 555,00  $\pm$  37,94 pg/ml vs SOB M $\phi$ s + RPMI = 182,00  $\pm$  39,87 pg/ml; n = 04) (**Figura -23**).

#### 4.13- Ação do antagonista do receptor de interleucina-1 na secreção intestinal

A adição do IL-1ra (4,5X10<sup>-6</sup>M), antagonista do receptor de interleucina-1, no lado seroso das câmaras de Üssing, trinta minutos antes do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A (3,2x10<sup>-6</sup>M), bloqueou de forma significativa a secreção intestinal no íleo de coelho produzida pelo fator secretório intestinal, presente nesse sobrenadante ( $\Delta\text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA}} = 76,00 \pm 8,36 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; n = 10 vs.  $\Delta\text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA} + \text{IL-1ra}} = 15,00 \pm 6,25 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; n = 06 e  $\Delta\text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{RPMI (CONTROLE)}} = 20,00 \pm 3,14 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; n = 09; p < 0,01) (**Figura -24**).

#### 4.14- Efeito dos anticorpos anti-IL-1 $\alpha$ e anti-IL-1 $\beta$ na secreção intestinal

Os resultados desse experimento demonstraram que a adição do anticorpo monoclonal anti-IL-1 $\beta$  (250  $\mu\text{g/ml}$ ), ao sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A (3,2x10<sup>-6</sup>M), 30 minutos antes do ensaio em câmaras de Üssing, neutraliza a atividade secretória intestinal presente nesse sobrenadante ( $\Delta\text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA}} = 76,00 \pm 8,36 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; n = 10 vs.  $\Delta\text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA} + \text{ANTI-IL-1}\beta} = 21,00 \pm 6,75 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; n = 06 e  $\Delta\text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{RPMI (CONTROLE)}} = 20,00 \pm 3,14 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; n = 09; p < 0,01) (**Figura -25**).

Além do mais, o anticorpo monoclonal anti-IL-1 $\alpha$  (250  $\mu\text{g/ml}$ ), nas mesmas condições experimentais do anti-IL-1 $\beta$ , não interferiu de maneira significativa na atividade secretória do sobrenadante acima referido ( $\Delta\text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA}} = 76,00 \pm$

$8,36 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 10$  vs.  $\Delta\text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA} + \text{ANTI-IL-1}\alpha} = 44,00 \pm 3,50 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 05$  e  $\Delta\text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{RPMI}(\text{CONTROLE})} = 20,00 \pm 3,14 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 09$ ) (**Figura -25**).

Por fim, o efeito da associação dos anticorpos monoclonais anti-IL-1 $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  (250  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre a atividade secretória intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}\text{M}$ ) não diferiu estatisticamente daquele observado com o anti-IL-1 $\beta$  isolado ( $\Delta\text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA}} = 76,00 \pm 8,36 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 10$  vs.  $\Delta\text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA} + \text{ANTI-IL-1}\alpha \text{ e } \beta} = 25,00 \pm 6,63 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 06$ ,  $\Delta\text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA} + \text{ANTI-IL-1}\beta} = 21,00 \pm 6,75 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 06$  e  $\Delta\text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{RPMI}(\text{CONTROLE})} = 20,00 \pm 3,14 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 09$ ;  $p < 0,01$ ) (**Figura -25**).

#### 4.15- Identificação da interleucina-1 $\beta$ como fator de secreção intestinal

A análise das amostras, pela técnica de ELISA, detectou elevados níveis de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de macrófagos estimulados com doses crescentes de toxina A (SOB M $\phi$ s + TxA $_{(3,2 \times 10^{-7}\text{M})}$ ) =  $665,00 \pm 131,96 \text{ pg/ml}$ ;  $n = 05$ , SOB M $\phi$ s + TxA $_{(9,6 \times 10^{-7}\text{M})}$ ) =  $413,00 \pm 92,15 \text{ pg/ml}$ ;  $n = 05$ , SOB M $\phi$ s + TxA $_{(3,2 \times 10^{-6}\text{M})}$ ) =  $3477,00 \pm 199,74 \text{ pg/ml}$ ;  $n = 04$  vs SOB M $\phi$ s + RPMI(CONTROLE) =  $40,00 \pm 14,47 \text{ pg/ml}$ ;  $n = 04$ ;  $p < 0,05$ ) (**Figura -26**).

#### 4.16- Estudo comparativo dos níveis de interleucina-1 $\beta$ no sobrenadante de macrófagos estimulados com doses equimolares de toxina A e B

Esse protocolo experimental demonstrou que, diferentemente do observado com a toxina A do *C. difficile* (SOB M $\phi$ s + TxA $_{(3,2 \times 10^{-7}\text{M})}$ ) =  $665,00 \pm 131,96 \text{ pg/ml}$ ;  $n = 05$ ;  $p < 0,05$ ), o estímulo das monocamadas de macrófagos com a toxina B não promoveu, de forma significativa, a síntese de interleucina-1 $\beta$  (SOB M $\phi$ s +

$TxB_{(3,6 \times 10^{-7} M)} = 28,00 \pm 7,54 \text{ pg/ml}$  vs SOB M $\phi$ s + RPMI =  $40,00 \pm 14,47 \text{ pg/ml}$ ; n = 04) (**Figura -27**).

#### 4.17- Atividade da interleucina-1 $\beta$ na secreção intestinal

Ademais, os dados desse trabalho demonstraram que a adição de IL-1 $\beta$  no lado seroso da câmaras de Üssing, de maneira análoga (tempo efeito e eficácia) ao sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $\Delta I_{sc} \text{ SOB. M}\phi\text{s} + TxA_{(3,2 \times 10^{-6} M)} = 90,00 \pm 8,63 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ ; n = 09 vs  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. M}\phi\text{s} + \text{RPMI}(\text{CONTROLE}) = 20,00 \pm 3,14 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ ; n = 09; p < 0,05), provoca uma intensa secreção intestinal no íleo de coelho ( $\Delta I_{sc} \text{ IL-1}\beta_{(10^{-7} M)} = 80,00 \pm 12,00 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ ; n = 06 vs  $\Delta I_{sc} \text{ RINGER}(\text{CONTROLE}) = 28,00 \pm 4,90 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ ; n = 08; p < 0,01) (**Figura -28**). É importante salientar que o Ringer (controle) representa as alterações basais na corrente de curto-circuito da mucosa ileal, montada em câmara de Üssing, que não recebeu nenhum tratamento.

#### 4.18- A bumetanida bloqueia a secreção intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulado com toxina A

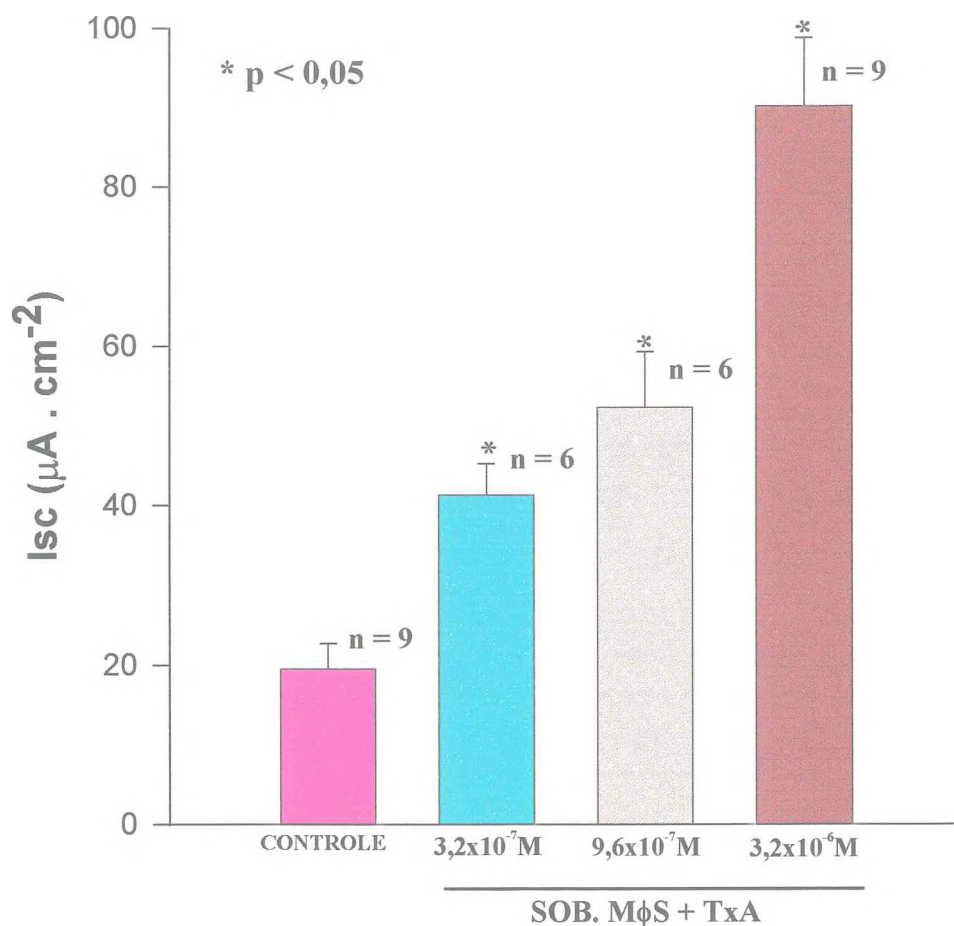
Nessa etapa foi evidenciado que a atividade secretória do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} M$ ) é fortemente bloqueada, em torno de 83 %, através do tratamento prévio da mucosa ileal, montada em câmaras de Üssing, com bumetanida ( $10^{-5} M$ ) ( $\Delta I_{sc} \text{ SOB. M}\phi\text{s} + TxA = 76,00 \pm 8,36 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ , n = 10 vs.  $\Delta I_{sc} \text{ SOB. M}\phi\text{s} + TxA + \text{BUMET} = 15,00 \pm 5,64 \mu A \cdot \text{cm}^{-2}$ ; n = 06; p < 0,01). (**Figura -29**).

#### 4.19- Participação de prostaglandinas na atividade secretória intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulado com toxina A

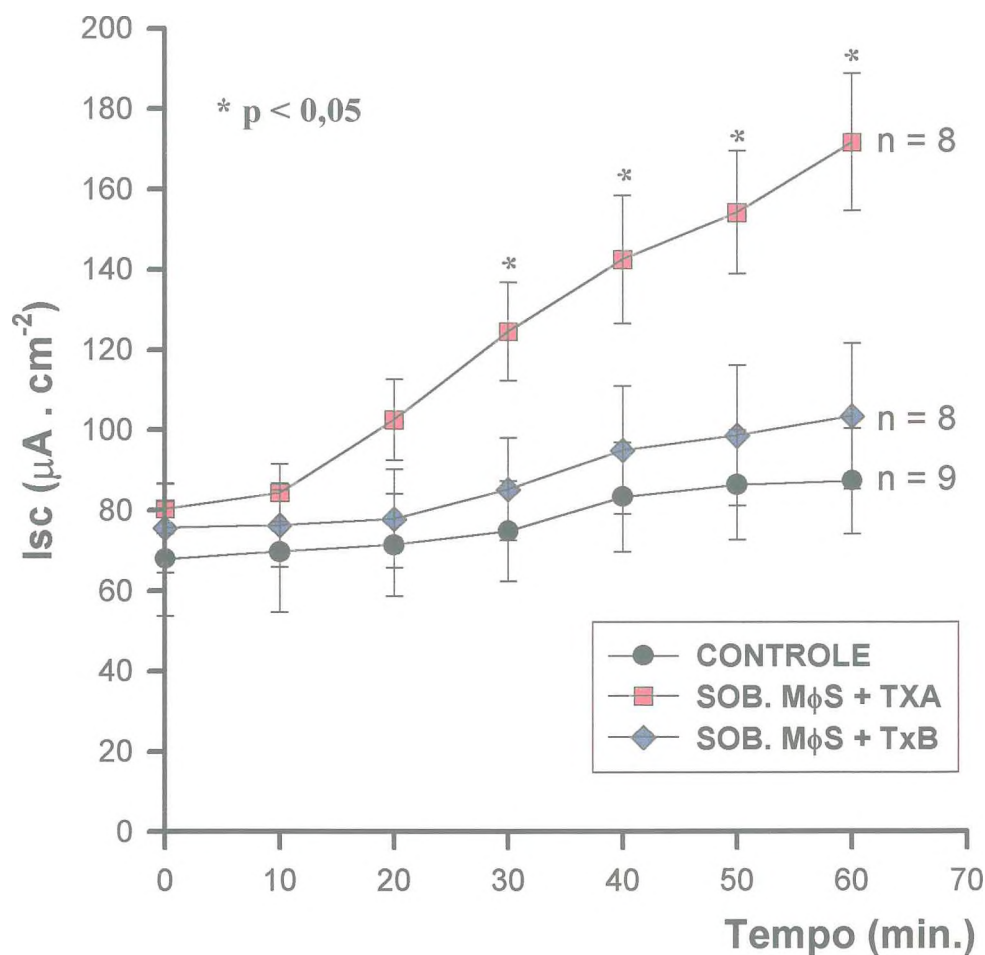
Observou-se, ainda, que a atividade secretória intestinal, presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ), foi bastante reduzida pelo tratamento prévio da mucosa ileal, montada em câmara de Üssing, com indometacina ( $10^{-6} \text{M}$ ) ( $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA}} = 76,00 \pm 8,36 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 10$  vs.  $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA} + \text{INDO}} = 9,00 \pm 2,78 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 05$ ;  $p < 0,01$ ). (**Figura -30**).

#### 4.20- Envolvimento do sistema nervoso entérico na secreção intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulado com toxina A

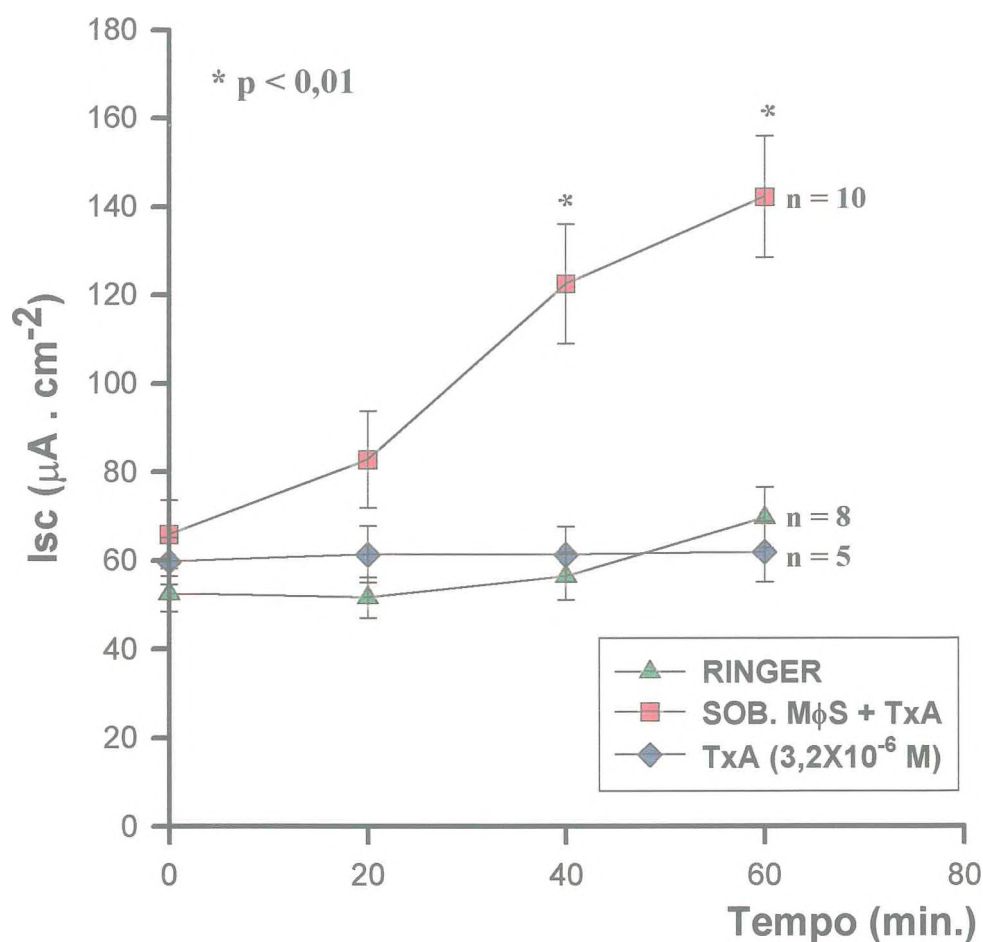
Por último, seguindo o mesmo protocolo experimental da indometacina, o tratamento prévio da mucosa ileal com tetrodotoxina ( $10^{-7} \text{M}$ ) produziu um potente bloqueio na secreção intestinal, provocada pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) ( $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA}} = 76,00 \pm 8,36 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 08$  vs.  $\Delta \text{Isc}_{\text{SOB. M}\phi\text{s} + \text{TxA} + \text{TTX}} = 12,00 \pm 2,89 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $n = 06$ ;  $p < 0,01$ ) (**Figura-31**).



**Figura-8. Efeito secretório intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A.** O sobrenadante de macrófagos estimulados com doses crescentes de toxina A ( $3,2 \times 10^{-7} \text{M}$ ,  $9,6 \times 10^{-7} \text{M}$  e  $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) provoca secreção no íleo de coelho, de forma concentração-dependente. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais. O controle representa o sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam nenhum tratamento.

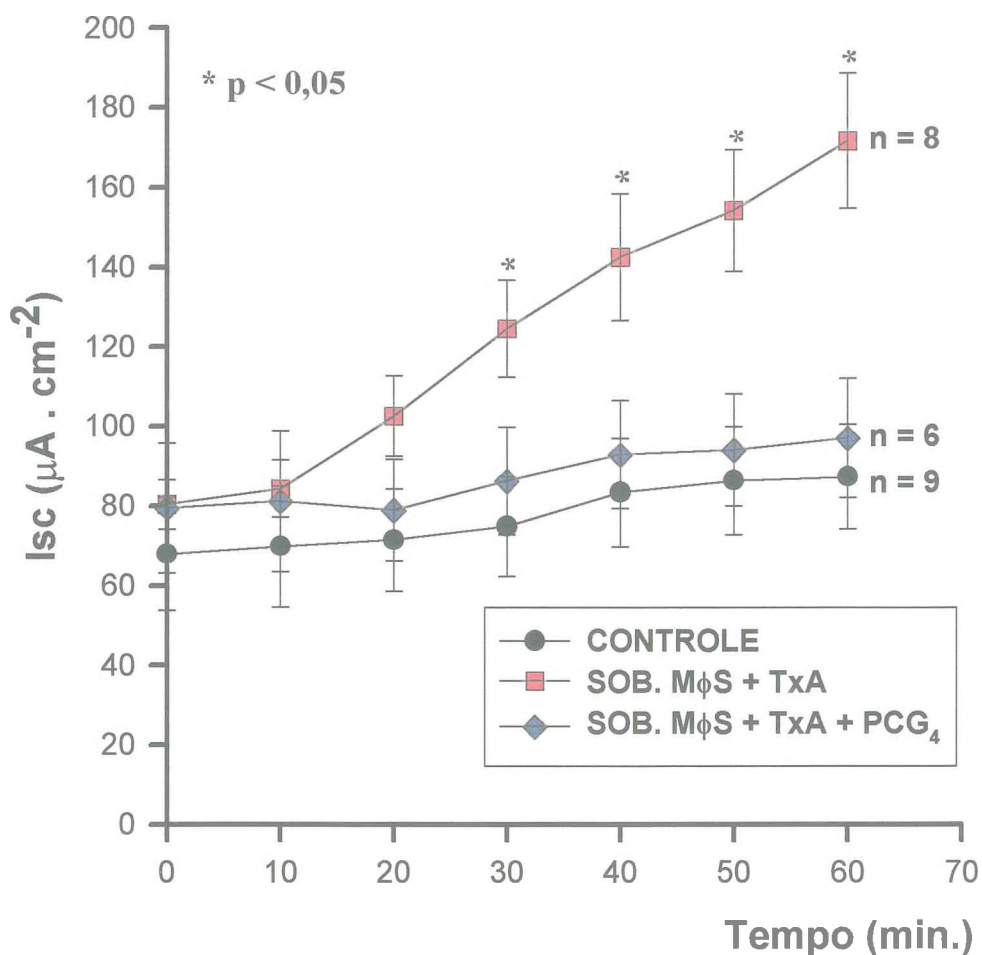


**Figura-9.** Cinética tempo-efeito da secreção intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ou B. Os dados demonstram que o sobrenadante de macrófagos estimulados com a toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ), mas não com toxina B ( $3,6 \times 10^{-7} \text{M}$ ), provoca secreção intestinal de maneira tempo-dependente. Essa atividade inicia-se aos 30 min. e atinge efeito máximo em 1 h. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.

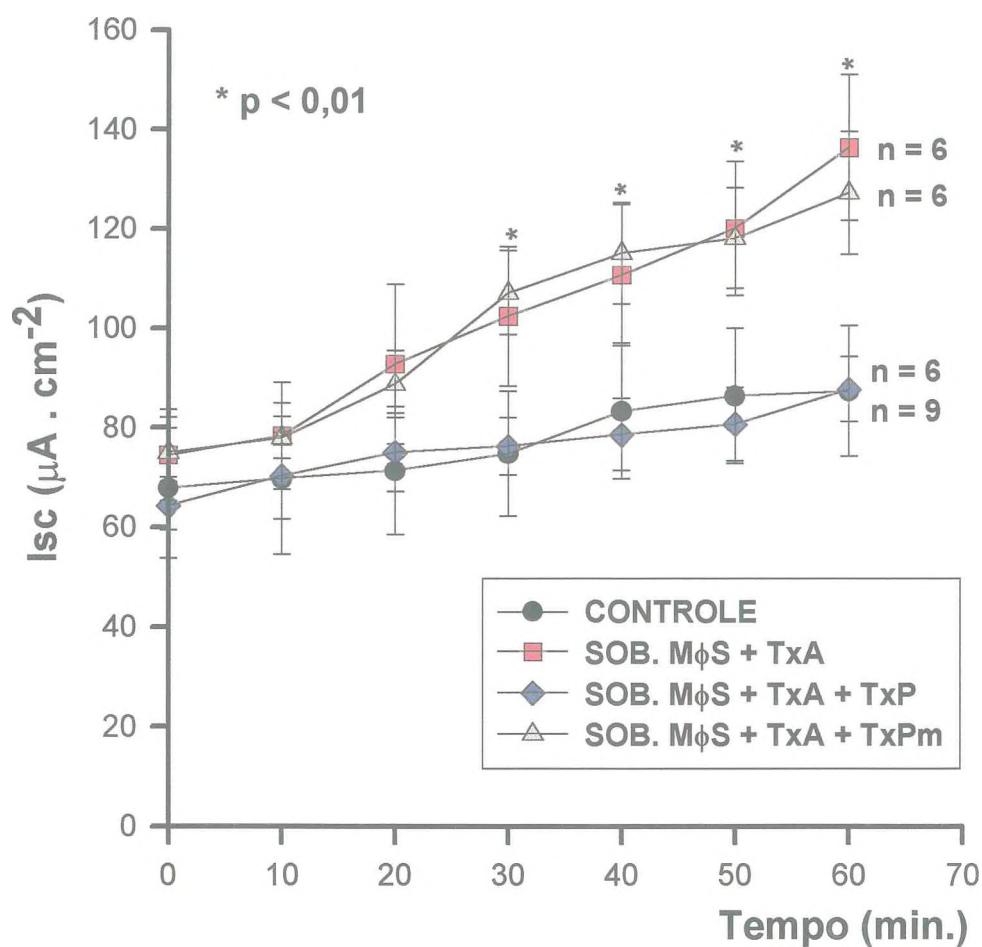


**Figura-10.** Efeito da toxina A nas câmaras de Üssing. Após o período de estabilização, a toxina A ( $3 \times 10^{-6} \text{M}$ ) foi testada diretamente no lado seroso das câmaras de Üssing. Contudo, esse procedimento não foi capaz de provocar secreção no íleo de coelho, *in-vitro*. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais. O Ringer representa as alterações basais na corrente de curto-circuito da mucosa ileal, montada em câmara de Üssing, que não recebeu nenhum tratamento.

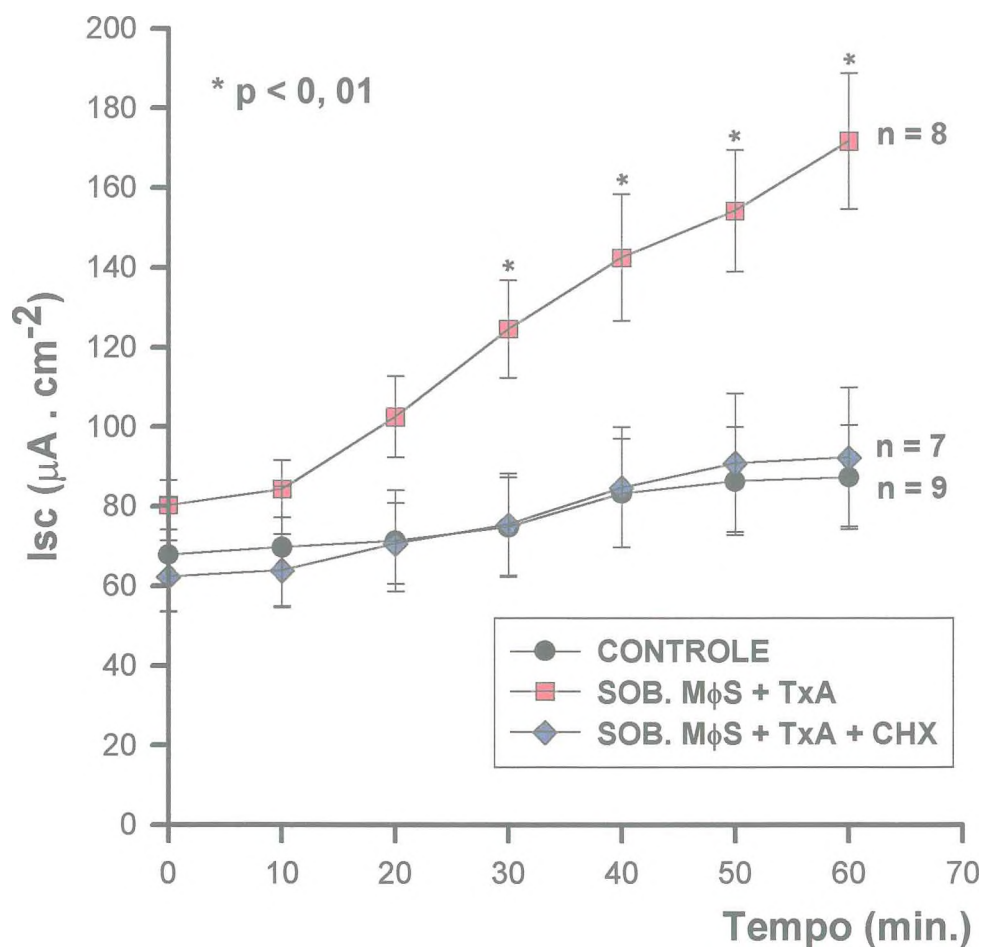




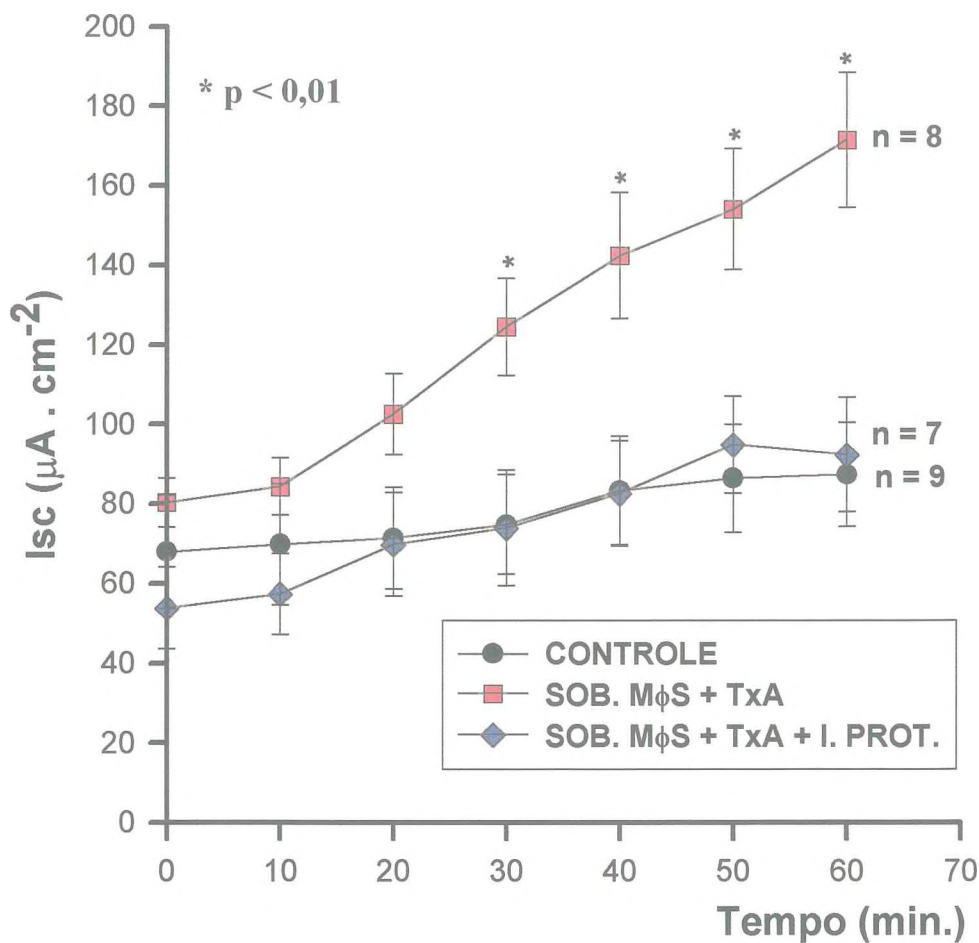
**Figura-11.** Efeito do anticorpo PCG<sub>4</sub> na síntese do fator de secreção intestinal produzido por macrófagos estimulados com toxina A. A pré-incubação da toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) com o anticorpo monoclonal PCG<sub>4</sub> (1:10), durante 30 minutos, bloqueou (80%) a síntese do fator de secreção intestinal. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.



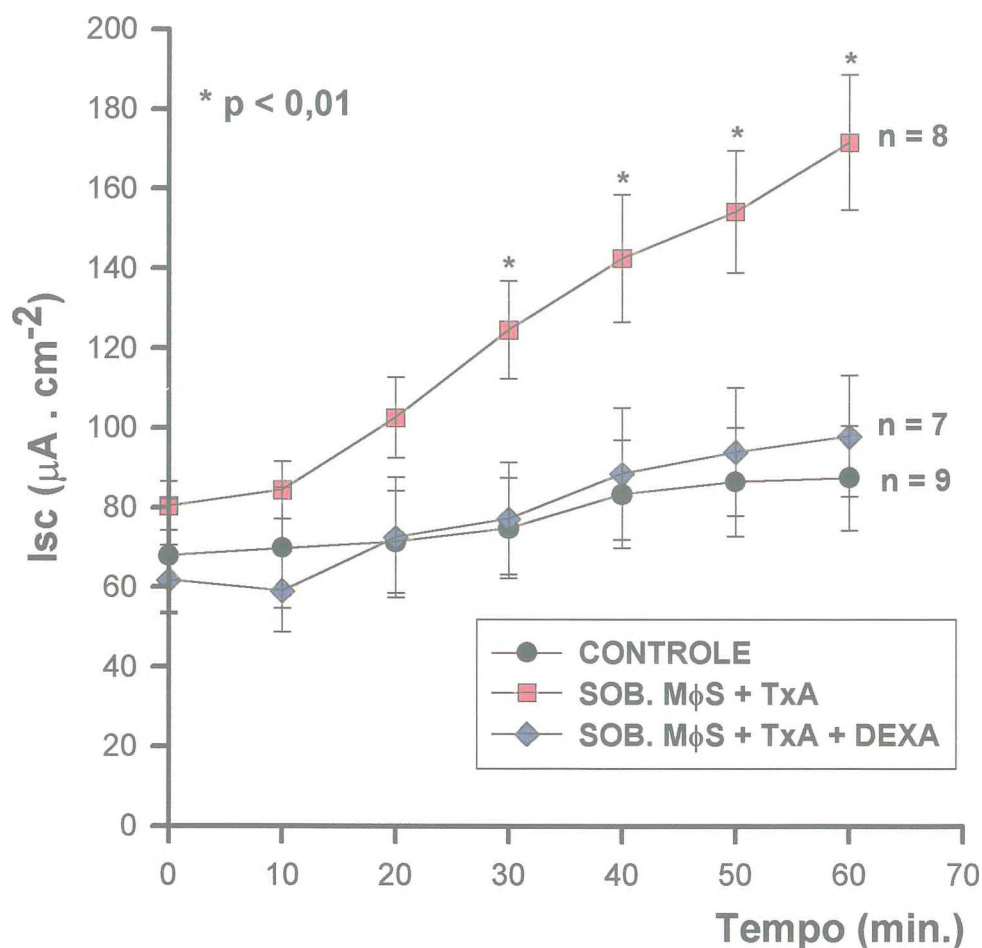
**Figura-12.** Atividade das toxinas da *Bordetella pertussis* sobre a liberação do fator de secreção intestinal. A gênese do fator de secreção intestinal, produzido por macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ), foi reduzida (61%) pelo pré-tratamento das monocamadas de macrófagos, com a toxina pertussis ativa (TxP;  $9,5 \times 10^{-7} \text{M}$ ). Entretanto, a toxina pertussis mutante (TxPm;  $9,5 \times 10^{-7} \text{M}$ ) não alterou esse efeito. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.



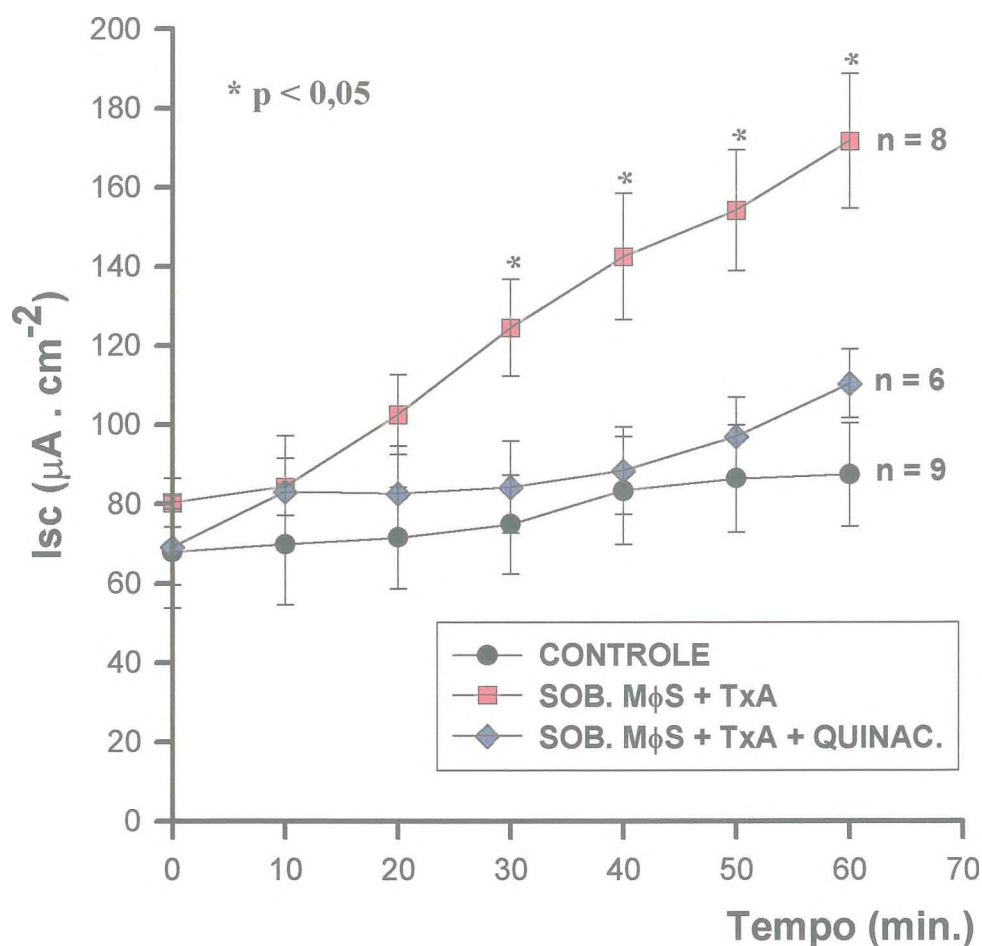
**Figura-13. Efeito do inibidor de síntese protéica na liberação do fator de secreção intestinal.** A síntese do fator de secreção intestinal, produzida por macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} M$ ), foi bloqueada pelo uso prévio da cicloheximida (CHX;  $10^{-5} M$ ). Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.



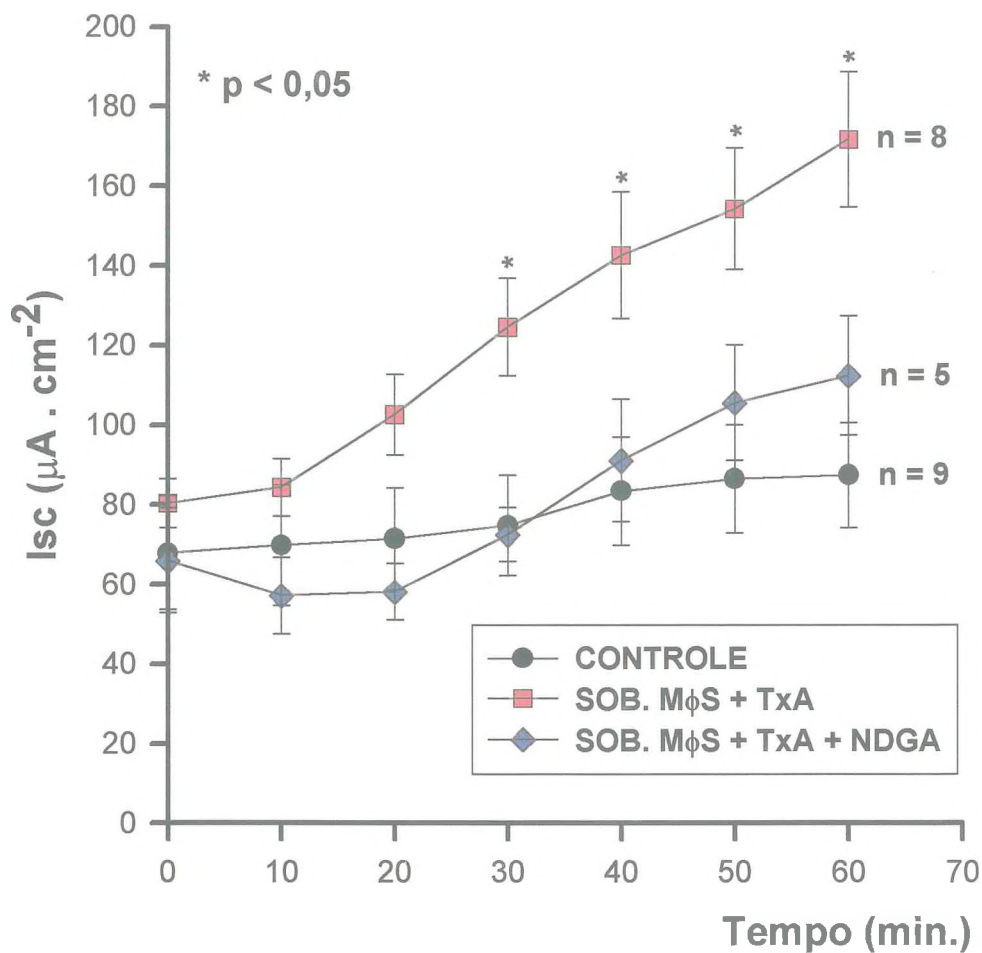
**Figura-14. Papel de proteases na síntese do fator de secreção intestinal.** Os macrófagos foram estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ), por 1 h. Após essa etapa, as células foram lavadas e colocadas em incubação com os inibidores de proteases (fluoreto de fenilmetilsulfonil e inibidor de tripsina; 1,0 mg/ml). O sobrenadante procedente desse protocolo foi incapaz de produzir secreção intestinal no íleo de coelho, em câmaras de Üssing. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.



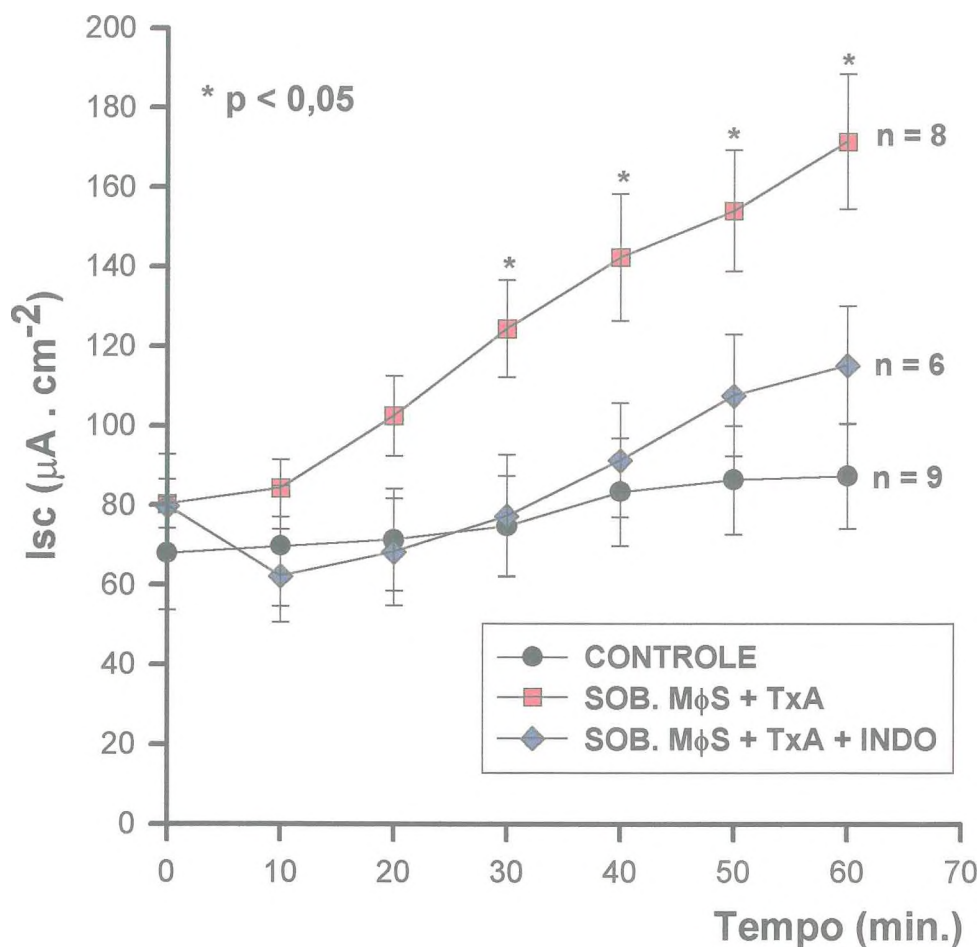
**Figura-15.** Ação da dexametasona na gênese do fator de secreção intestinal. A adição de dexametasona (DEXA;  $10^{-5}$ M) às culturas de macrófagos, 30 minutos antes e durante a estimulação com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}$ M), bloqueou de forma significativa a gênese do fator de secreção intestinal. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.



**Figura-16.** Efeito do bloqueador de fosfolipase  $A_2$  sobre a síntese do fator de secreção intestinal. A quinacrina (QUINAC.;  $10^{-5}M$ ) foi adicionada às culturas, antes e durante a estimulação com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}M$ ). A seguir, os macrófagos foram lavados e deixados em incubação por mais 2 h. Por fim, testou-se o efeito secretório do sobrenadante. Essa conduta bloqueou a gênese do fator de secreção intestinal. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.

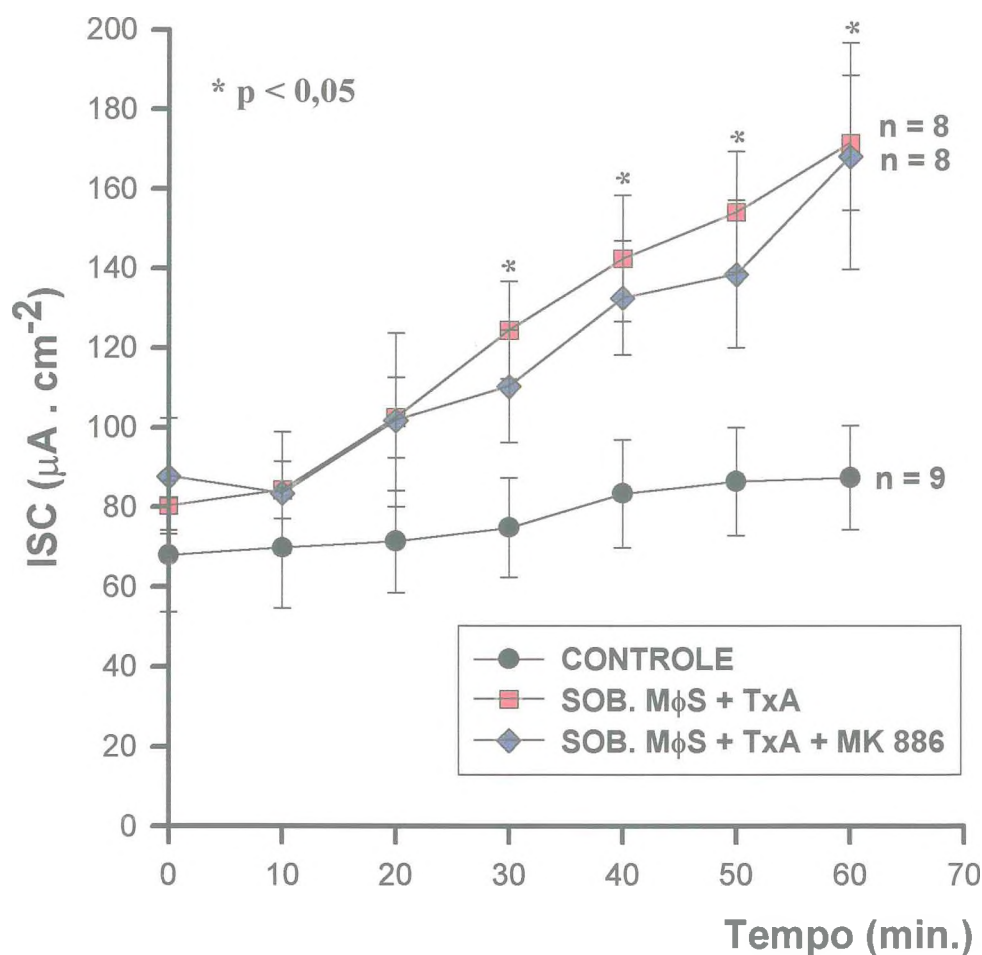


**Figura-17. Efeito do bloqueador dual de ciclo e lipoxigenase sobre a síntese do fator de secreção intestinal.** A gênese do fator de secreção intestinal, produzida por macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ), foi bloqueada em torno de 48% pelo uso prévio do NDGA ( $10^{-5} \text{M}$ ). Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.

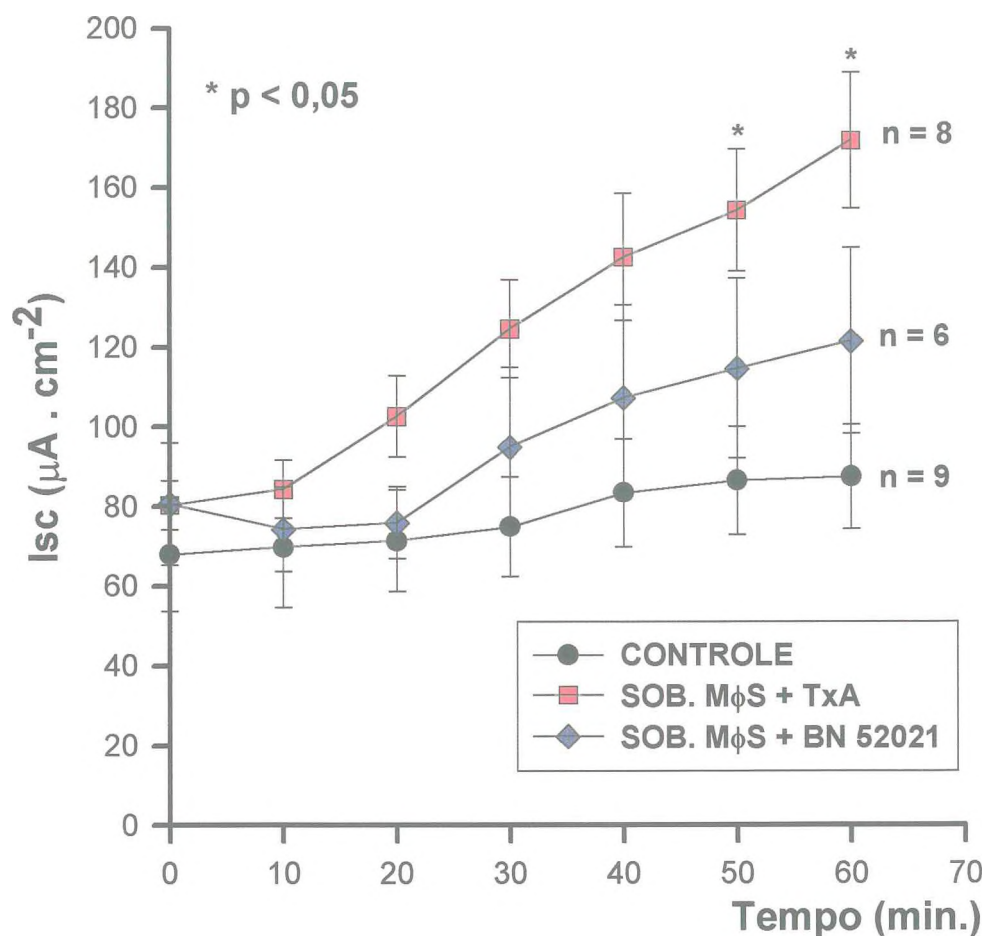


**Figura-18. Ação do inibidor de ciclooxigenase na síntese do fator de secreção intestinal.** O tratamento prévio com indometacina (INDO;  $10^{-5}$ M) bloqueou de forma significativa a síntese do fator secreção intestinal, produzido por macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}$ M). Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.

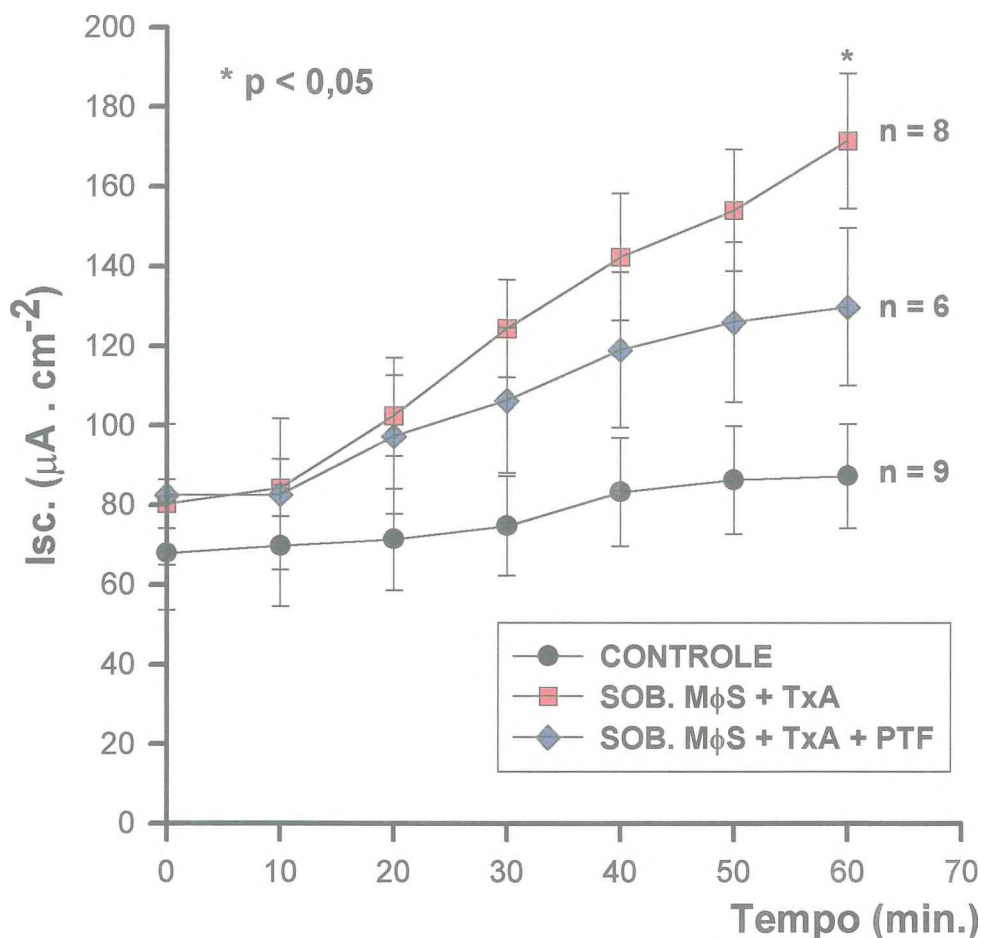




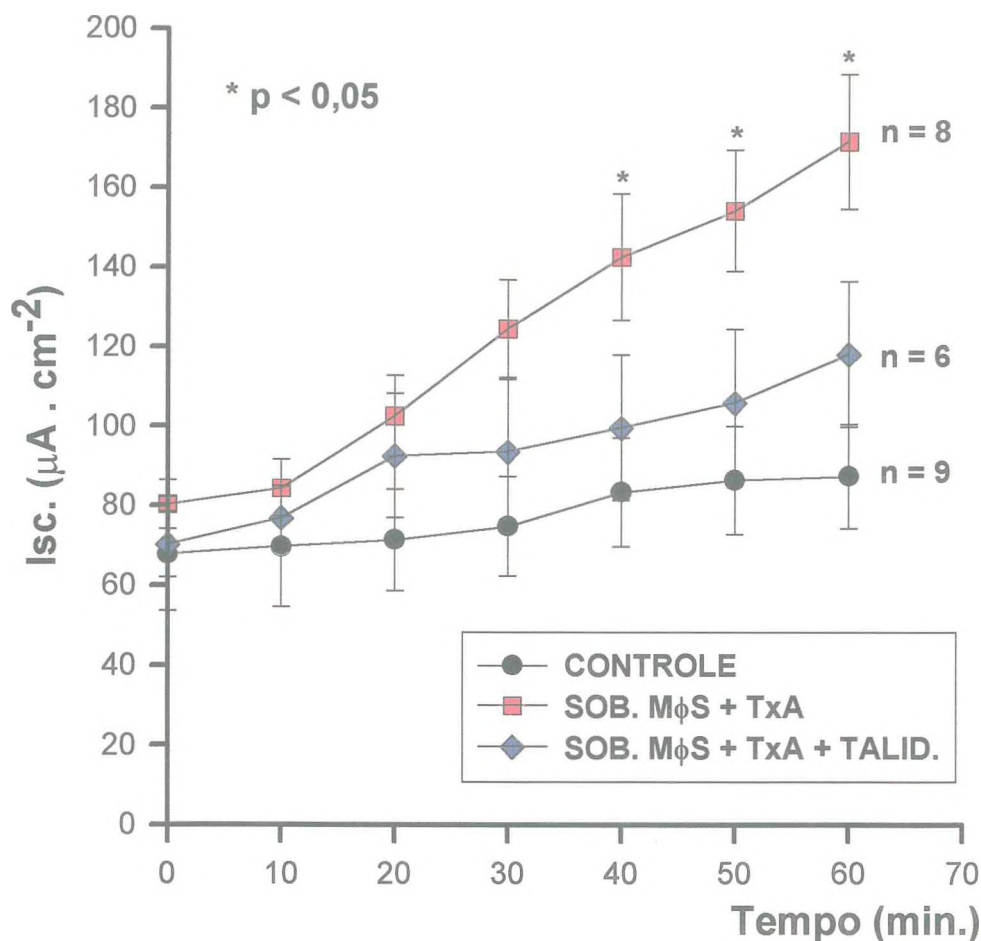
**Figura-19. Efeito do inibidor de lipoxigenase na liberação do fator de secreção intestinal.** O MK 886 ( $10^{-5}M$ ) foi adicionada às culturas, antes e durante a estimulação com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}M$ ). Em seguida, os macrófagos foram lavados e deixados em incubação por mais 2 h. Por último, avaliou-se o efeito secretrio do sobrenadante. Esse procedimento não alterou a liberação do fator de secreção intestinal. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da mdia e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo ileo de, no mínimo, quatro animais.



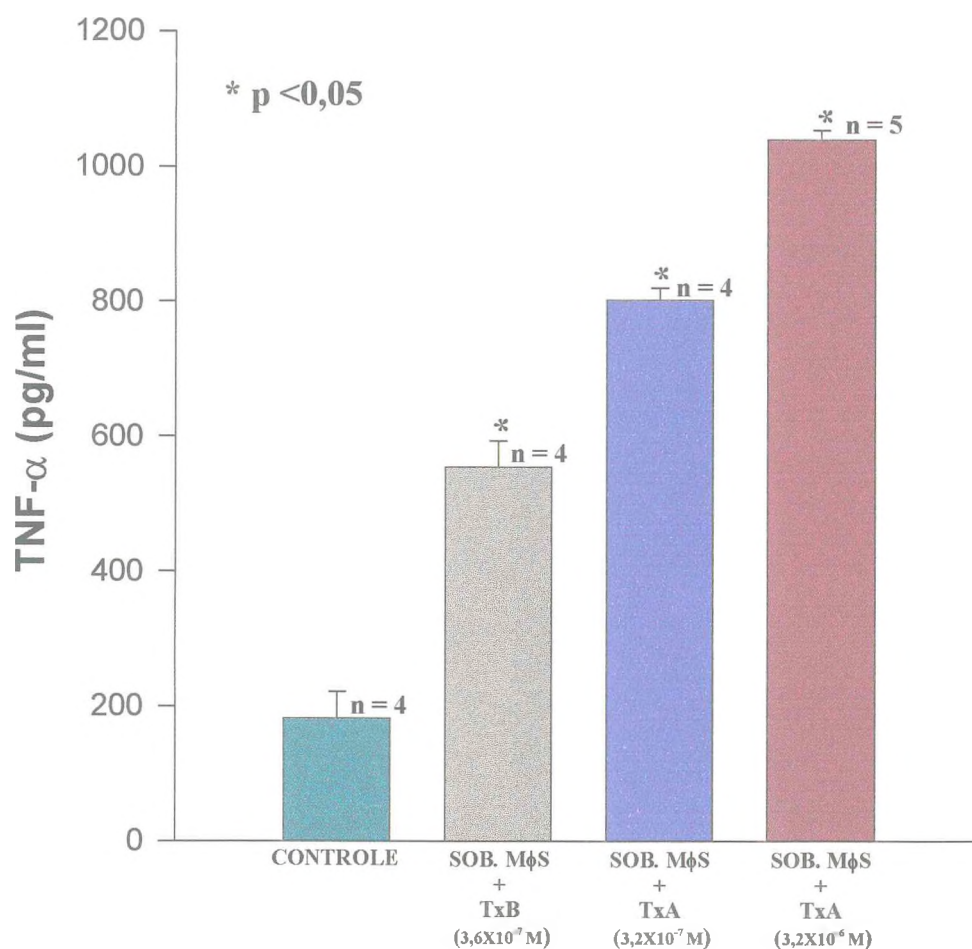
**Figura-20. Envolvimento do fator de agregação plaquetária na gênese do fator de secreção intestinal.** O pré-tratamento com BN52021 ( $10^{-5}$ M) provocou um bloqueio parcial (55%) na síntese do fator de secreção intestinal, produzido por macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}$ M). Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.



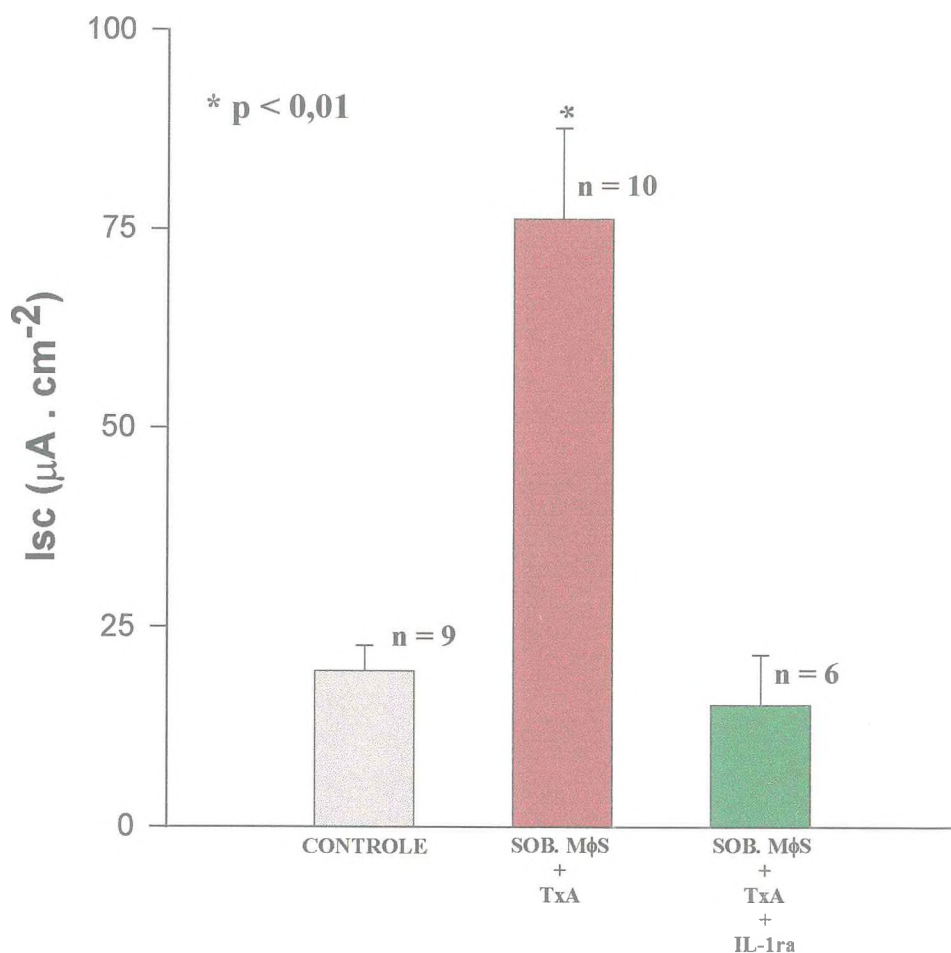
**Figura-21. Efeito da pentoxifilina sobre a síntese do fator de secreção intestinal.** A pentoxifilina (PTF;  $5,0 \times 10^{-4} \text{M}$ ) foi adicionada às culturas, antes e durante a estimulação com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ). Em seguida, os macrófagos foram lavados e deixados em incubação por mais 2 h. Por fim, testou-se o efeito secretório do sobrenadante dessas culturas. Esse procedimento provocou um bloqueio parcial (48%) na liberação do fator de secreção intestinal. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.



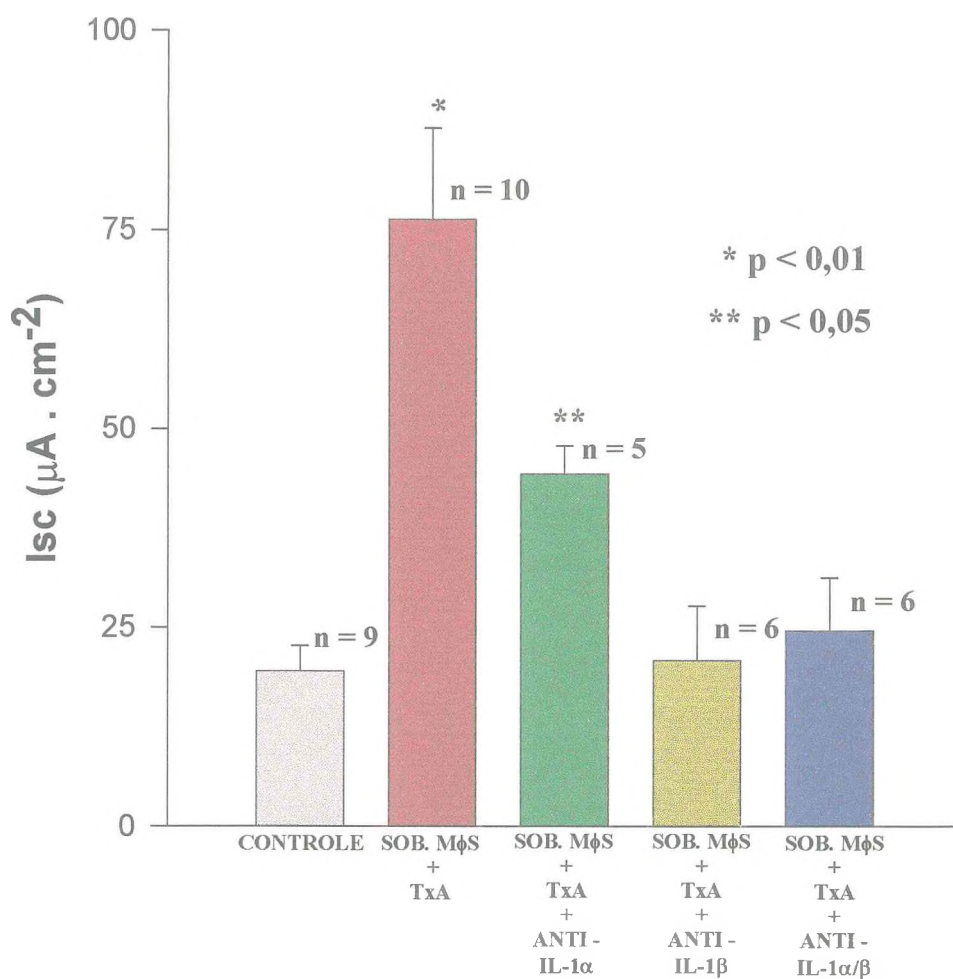
**Figura-22.** Ação da talidomida sobre a gênese do fator de secreção intestinal. A adição de talidomida (TALID.,  $1,5 \times 10^{-5} \text{M}$ ) às culturas de macrófagos, antes e durante a estimulação com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) bloqueou parcialmente a síntese do fator de secreção intestinal. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.



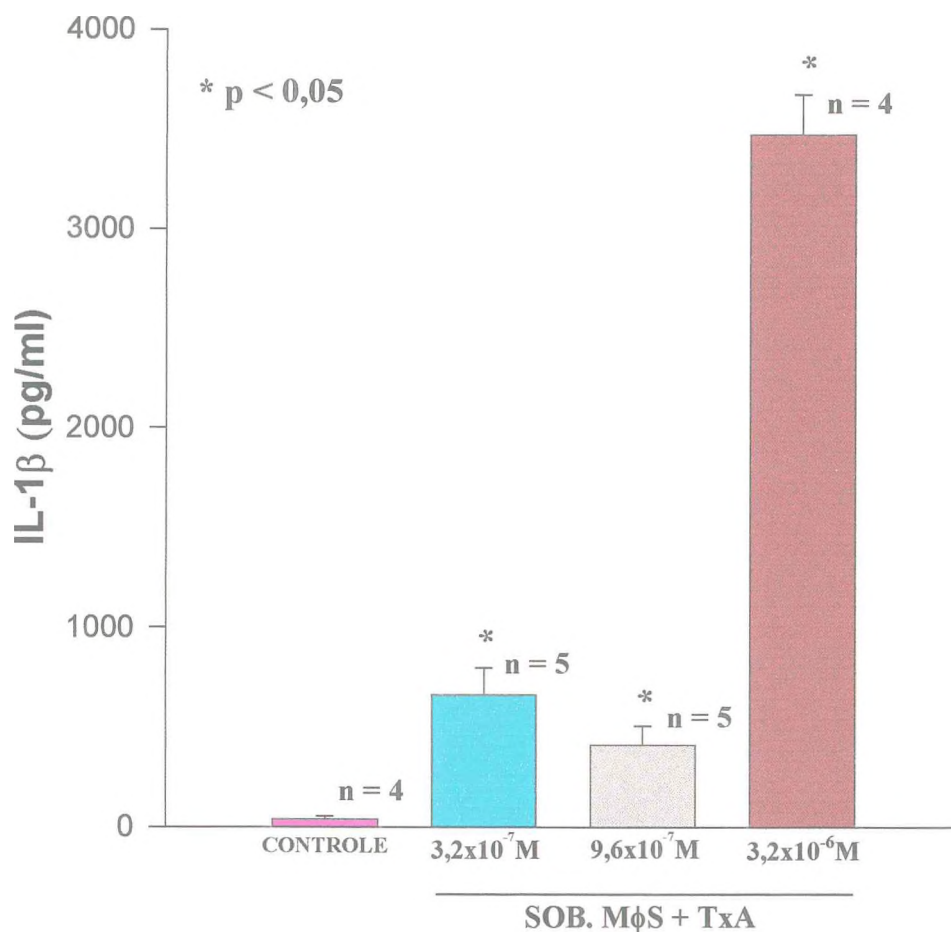
**Figura-23. Dosagem de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ou B.** A análise dos sobrenadantes, por meio da técnica de ELISA, evidenciou que as toxinas A ( $3,2 \times 10^{-7} \text{M}$  e  $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) e B ( $3,6 \times 10^{-7} \text{M}$ ) são capazes de estimular a síntese de TNF- $\alpha$  por macrófagos, *in vitro*. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n representa o número de amostras testadas em duplicata.



**Figura-24.** Ação do antagonista do receptor de interleucina-1 na secreção intestinal. A adição do IL-1ra ( $4,5 \times 10^{-6} \text{M}$ ) no lado seroso das câmaras de Üssing, trinta minutos antes do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ), bloqueou (80%) o evento da secreção produzida pelo fator secretório intestinal, presente nesse sobrenadante. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.

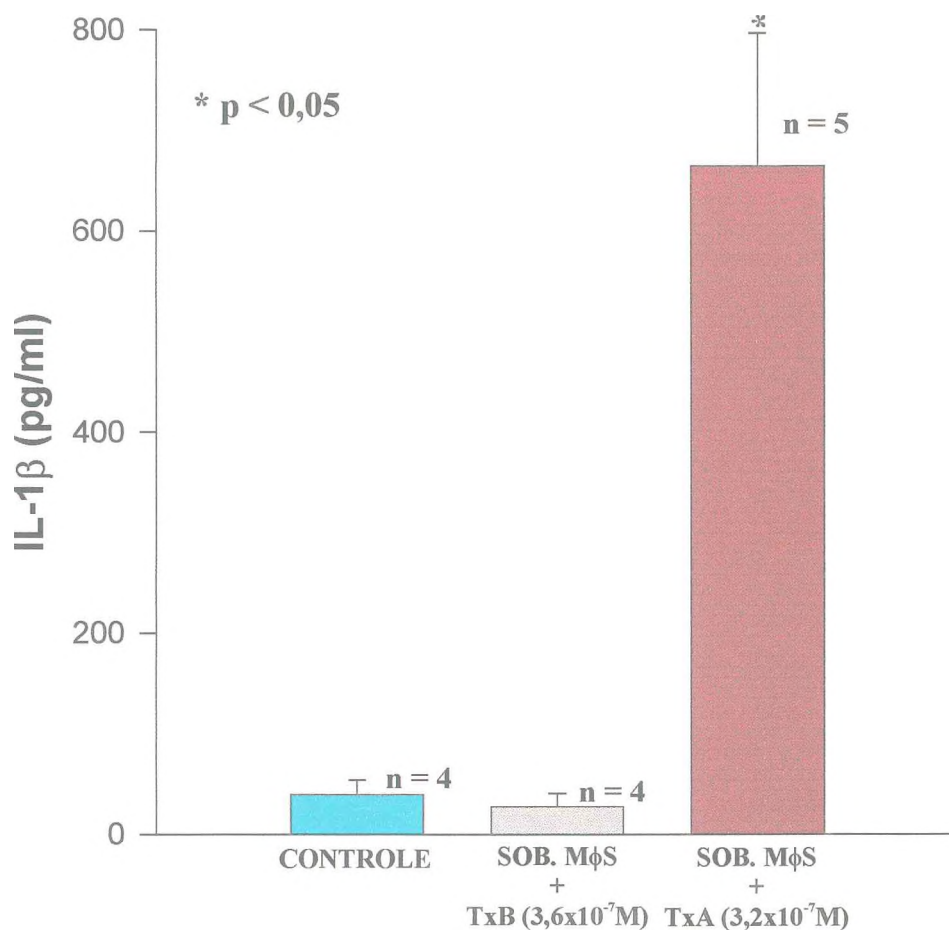


**Figura-25. Efeito dos anticorpos anti-IL-1α e anti-IL-1β na secreção intestinal.** A incubação do sobrenadante de macrófagos com anti-IL-1β ou anti-IL-1α+anti-IL-1β (250 μg/ml) bloqueou a atividade do fator de secreção intestinal. Contudo, o anti-IL-1α não interferiu significativamente nessa propriedade. Os dados estão plotados como média ± erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras. \* p < 0,01 (SOB.MφS+TxA vs. demais grupos) e \*\* p < 0,05 (SOB.MφS+TxA vs.CONTROLE).

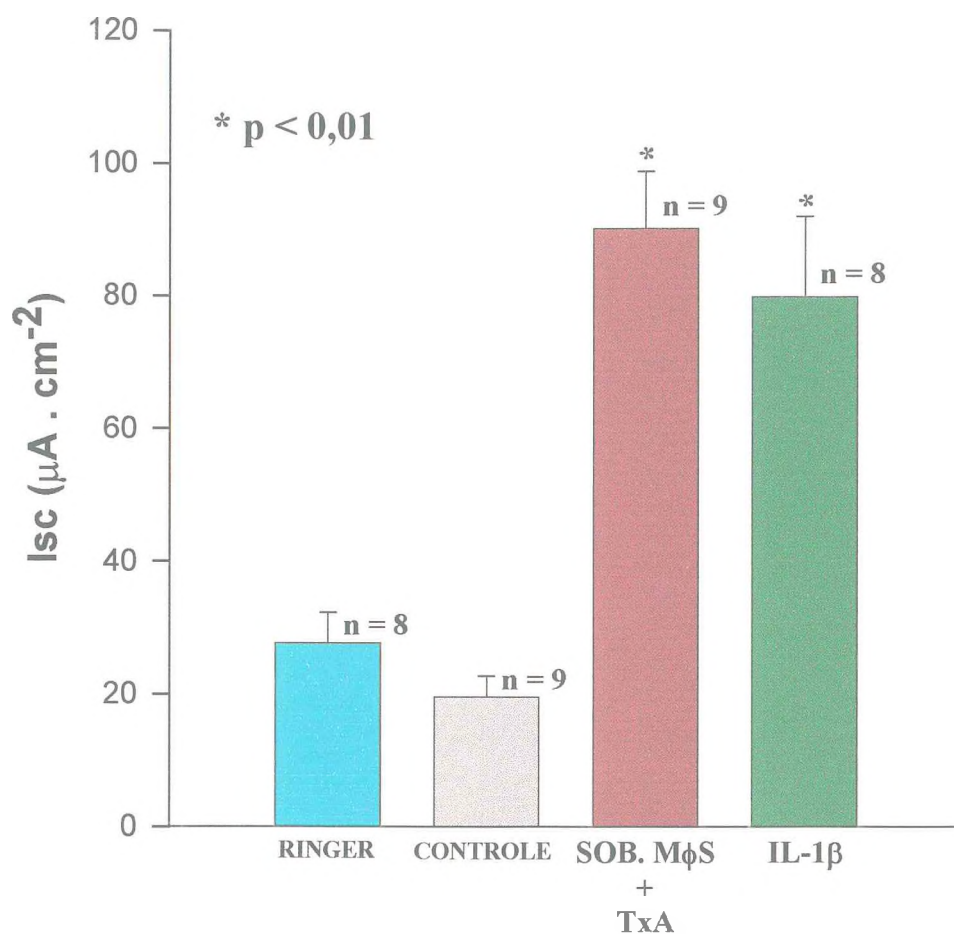


**Figura-26. Identificação da interleucina-1 $\beta$  como fator de secreção intestinal.** A análise das amostras, por ELISA, detectou elevados níveis de interleucina-1 $\beta$  no sobrenadante de macrófagos estimulados com diferentes concentrações de toxina A ( $3,2 \times 10^{-7} M$ ,  $9,6 \times 10^{-7} M$  e  $3,2 \times 10^{-6} M$ ). Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n representa o número de amostras testadas em duplicata.

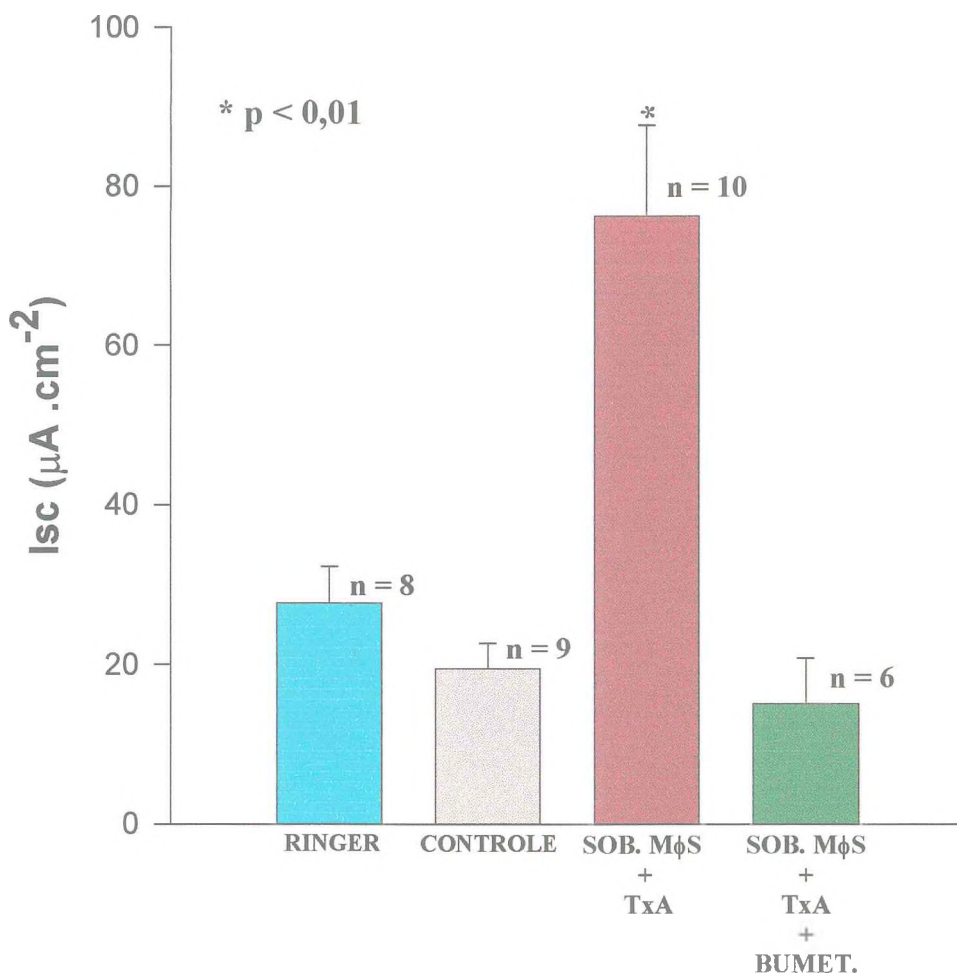




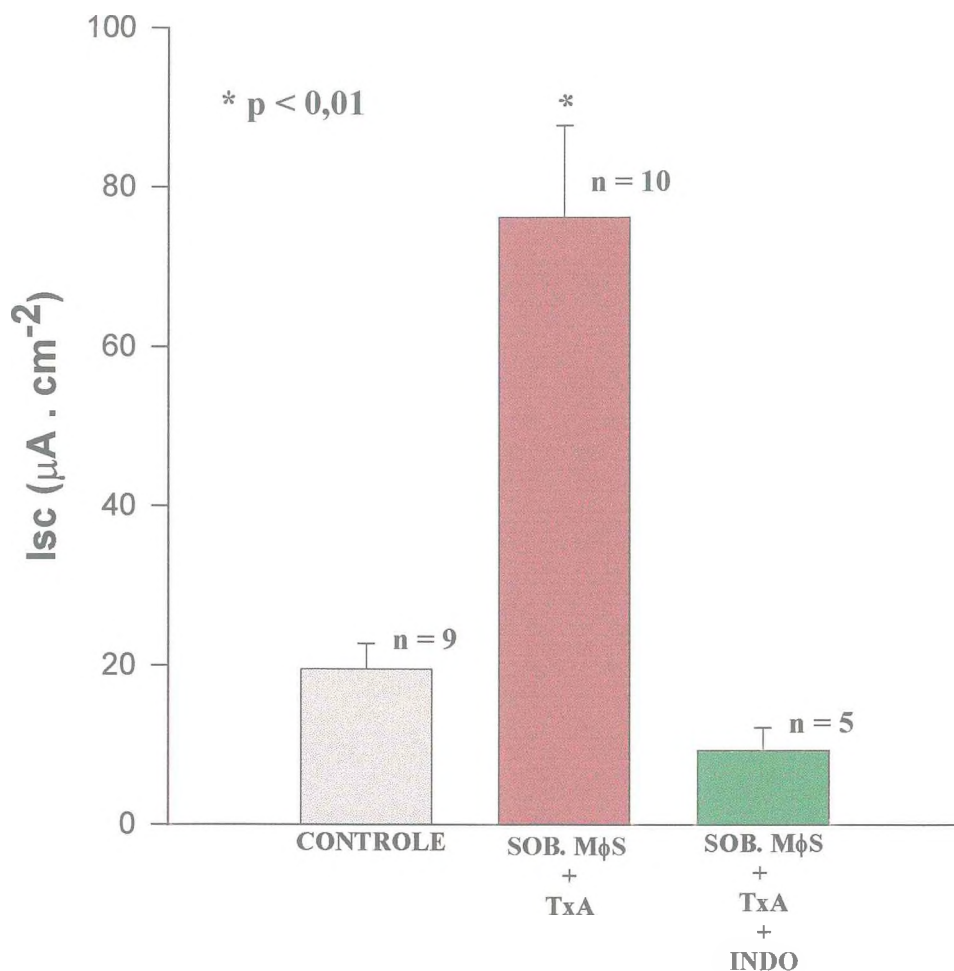
**Figura-27.** Estudo comparativo dos níveis de interleucina-1 $\beta$  no sobrenadante de macrófagos estimulados com doses equimolares de toxina A e B. As concentrações de IL-1 $\beta$  foram detectados por ELISA. Dessa forma, esse protocolo experimental demonstrou que, diferentemente do observado com toxina A (3,2x10<sup>-7</sup> M), o estímulo das monocamadas de macrófagos com toxina B (3,6X10<sup>-7</sup>M) não foi capaz de promover a síntese de IL-1 $\beta$ . Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n representa o número de amostras analisadas em duplicata.



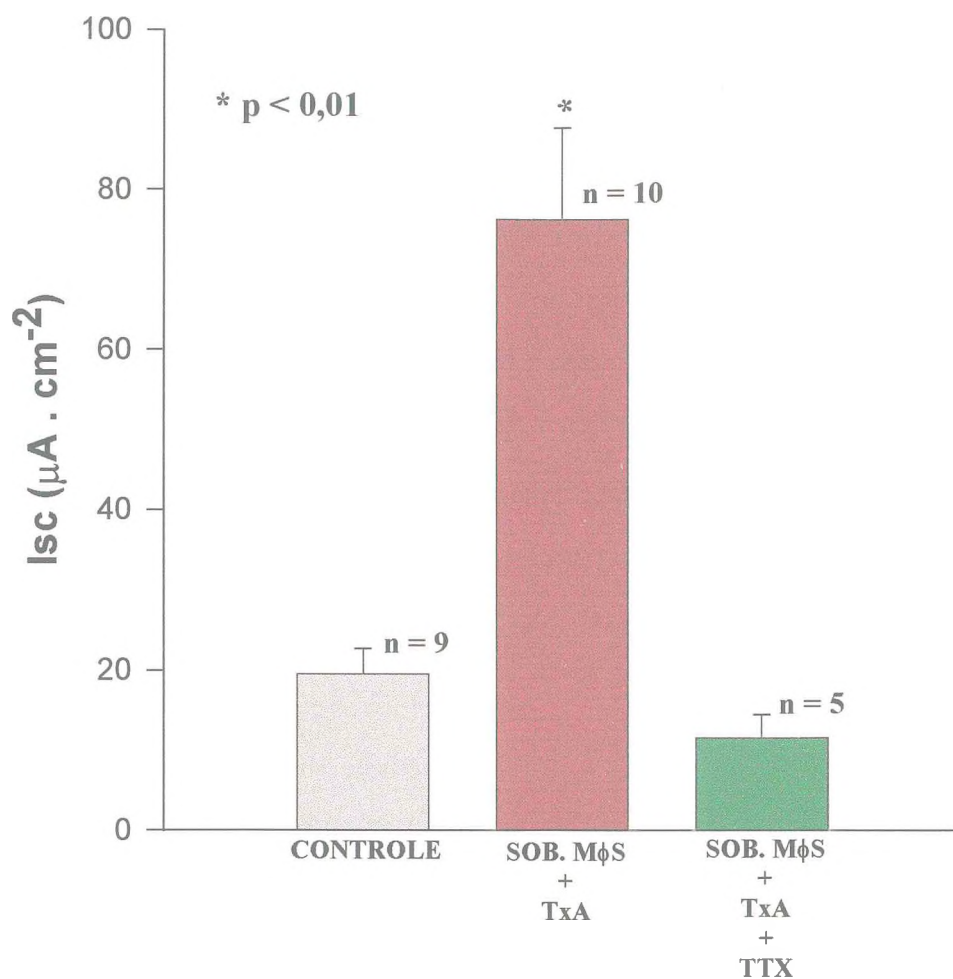
**Figura-28. Atividade da interleucina-1 $\beta$  na secreção intestinal.** A adição de IL-1 $\beta$  ( $10^{-7}$ M), no lado seroso das câmaras de Üssing, provoca uma potente secreção intestinal, de forma similar ao sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}$ M). Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras. O Ringer representa as alterações basais na corrente de curto-circuito da mucosa ileal em câmaras de Üssing. Por fim, entende-se por controle o sobrenadante da cultura de macrófagos que não receberam tratamento.



**Figura-29.** A bumetanida bloqueia a secreção intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulado com toxina A. A atividade secretória do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) foi bloqueada (83 %), através do pré-tratamento da mucosa ileal em câmaras de Üssing, com bumetanida ( $10^{-5} \text{M}$ ). Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.



**Figura-30. Participação de prostaglandinas na atividade secretória intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulado com toxina A.** A secreção intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) foi bastante reduzida (88%) pelo pré-tratamento da mucosa ileal com indometacina (INDO;  $10^{-6} \text{M}$ ). Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.



**Figura-31. Envolvimento do sistema nervoso entérico na secreção intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulado com toxina A.** O uso de tetrodotoxina ( $10^{-7}\text{M}$ ) no lado seroso das câmaras de Üssing, vinte minutos antes do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ( $3,2 \times 10^{-6}\text{M}$ ), produziu um bloqueio de 84% na secreção intestinal produzida por esse sobrenadante. Os dados estão plotados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n significa o número de câmaras contendo íleo de, no mínimo, quatro animais.

## 5- DISCUSSÃO

O *Clostridium difficile* tem sido largamente apontado como um importante agente causador de doenças inflamatórias intestinais associadas ao uso de antimicrobianos. Contudo, em razão da sua complexidade, até o momento, a fisiopatologia dessas doenças ainda se encontra apenas parcialmente esclarecida (Pothoulakis & LaMont, 1993; Kelly e cols., 1994; Sears & Kaper, 1996; Mahida e cols., 1996; Bartlett, 1997), muito embora, uma série de trabalhos científicos demonstrem a importância das toxinas A e B na patogênese da diarreia inflamatória induzida por esse microrganismo. Tanto é verdade, que cepas de *C. difficile* que não produzem toxinas são incapazes de desenvolver doenças, tanto no homem como em animais experimentais (Lyerly e cols., 1988; Kelly e cols., 1994; Pothoulakis, 1996; Bartlett, 1997).

Os mecanismos inflamatórios envolvidos nas atividades biológicas das toxinas A e B do *Clostridium difficile* são bastante complexos e algumas vezes contraditórios. Por exemplo, existem alguns estudos relatando que a toxina B é desprovida de efeitos enterotóxicos, assim como é incapaz de provocar infiltrado de células inflamatórias na mucosa intestinal (Taylor e cols., 1981; Lyerly e cols., 1982; Lyerly e cols., 1988; Bette e cols., 1991; Baldacini e cols., 1992). No entanto, essa mesma toxina estimula a síntese de potentes mediadores inflamatórios, do tipo citocinas e leucotrienos, por monócitos e macrófagos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Flegel e cols., 1991; Rocha, 1994; Souza e cols., 1997; Melo Filho e cols., 1997). Em adição, foi demonstrado que a toxina B é capaz de provocar, de forma dose-dependente, alterações eletrofisiológicas e morfológicas na mucosa colônica humana, montada em câmaras de Üssing (Riegler e cols., 1995).

Os efeitos deletérios provocados pela toxina A sobre a mucosa intestinal são bastante evidentes e caracterizam-se por uma intensa secreção de fluidos e por um grande acúmulo de células inflamatórias, do tipo macrófagos, mastócitos, linfócitos e neutrófilos, com a conseqüente liberação de seus mediadores, tais como prostaglandinas, leucotrienos, PAF, óxido nítrico, citocinas etc (Triadofilopoulos e cols., 1989; Lima e cols., 1989; Linevsky e cols., 1990; Pothoulakis & LaMont, 1993; Qiu e cols., 1996; Mahida e cols., 1996; Castagliuolo e cols., 1997).

Corroborando essas informações, em uma pesquisa anterior demonstramos que as toxinas A e B do *Clostridium difficile* são potentes indutoras da migração de neutrófilos em cavidades peritoneais e bolsas de ar subcutâneas de ratos, dependentemente da liberação de fatores quimiotáticos, por macrófagos residentes (Rocha e cols., 1997; Souza e cols., 1997).

Quanto à atividade funcional dos macrófagos, desde a década de 1970, esses fagócitos vêm sendo invocados como uma das células mais relevantes do processo inflamatório. Atuando como células de "alarme", elas rapidamente respondem a sinais celulares e/ou hormonais e eliminam a presença de estímulos lesivos para o organismo, através da síntese e liberação de inúmeras substâncias, dentre as quais citocinas, derivados do ácido araquidônico, enzimas, intermediários reativos do oxigênio, componentes do sistema complemento, entre outros (LeFevre & Hammer, 1979; Ferreira, 1980; Nathan, 1987; Ogle e cols., 1994; Laskin & Pendino, 1995). Além do mais, a capacidade dos macrófagos em sintetizar mediadores, aliada a sua potencialidade como células apresentadoras de antígenos têm implicado esses fagócitos na imunofisiologia e farmacologia intestinal (McKay & Perdue, 1993; Perdue & McKay, 1994; Castagliuolo e cols., 1997).

Considerando-se o exposto, assim como os resultados obtidos por Lima e cols., 1989, demonstrando que, a partir das duas horas, após a inoculação da toxina

A, em alça intestinal de coelho, há um grande infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria e superfície do epitélio, com conseqüente destruição da mucosa intestinal, surgiu a idéia de que os efeitos intestinais das toxinas do *Clostridium difficile* resultam de mecanismos indiretos, mediados, pelo menos em parte, via estimulação de células residentes, particularmente macrófagos, com conseqüente a síntese e liberação de seus mediadores inflamatórios.

Com a finalidade de comprovar essa hipótese, inicialmente foi avaliada a capacidade da toxina A em estimular macrófagos, *in vitro*, a sintetizar e liberar mediador(es) pró-inflamatório(s) com atividade secretória intestinal no íleo de coelho, montado em câmaras de Üssing.

Os resultados preliminares dessa investigação demonstraram que macrófagos, *in vitro*, estimulados com doses crescentes de toxina A ( $3,2 \times 10^{-7} \text{M}$ ,  $9,6 \times 10^{-7} \text{M}$  e  $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ) liberam no sobrenadante da cultura, de forma concentração-dependente, fator(es) com propriedade secretória intestinal. Esta atividade de secreção no intestino foi determinada por alterações no transporte iônico que, por sua vez, foram analisadas através das variações na corrente de curto-circuito da mucosa íleal de coelho montada em câmaras de Üssing (Üssing & Zerahn., 1951; Schultz & Zalusky, 1964; Field e cols., 1971; Soares e cols., 1991).

Em uma outra série de experimentos, foi investigado se a toxina B, a exemplo do observado com a enterotoxina A, era capaz de estimular macrófagos a produzir mediadores inflamatórios com atividade secretória intestinal. Contudo, logo se observou que o sobrenadante de macrófagos estimulados com essa toxina não foi capaz de induzir, de forma significativa, alterações na corrente de curto circuito no íleo de coelho, em câmaras de Üssing. Essa afirmativa fundamenta-se no fato de que essas variações não diferiram estatisticamente daquelas produzidas pelo controle, ou



seja, pelo sobrenadante procedente de monocamadas de macrófagos que não receberam essa toxina.

Portanto, a partir desses resultados, os protocolos experimentais foram conduzidos somente com a toxina A, na dose de  $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ . Não obstante, algumas amostras do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina B, a exemplo dos experimentos envolvendo toxina A, foram estocados ( $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ ) para posterior dosagem de mediadores inflamatórios, do tipo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , por ELISA.

Partindo do princípio de que ambas as toxinas do *Clostridium difficile* apresentam propriedades citotóxicas (Lyerly e cols., 1988; Fiorentine & Thelestam, 1991; Melo Filho e cols., 1997), ao final de cada cultura, rotineiramente era realizado o teste de viabilidade celular por meio da técnica do corante azul de trypan, conforme o método descrito no item 3.5.3. Dessa maneira, observou-se que a toxina A nas três doses testadas não foi prejudicial para os macrófagos, visto que a viabilidade desses fagócitos se mostrou bastante elevada, variando de 92-96%.

Por outro lado, sabendo-se que a toxina B é várias vezes mais citotóxica do que a toxina A (Lyerly e cols., 1982; Banno e cols., 1984; Fiorentine & Thelestam, 1991; Melo Filho e cols., 1997), esta toxina foi inicialmente utilizada na dose de  $3,6 \times 10^{-7} \text{M}$ , produzindo, dessa forma, uma viabilidade semelhante àquela observada com a toxina A. Entretanto, quando a toxina B foi avaliada na concentração de  $3,6 \times 10^{-6} \text{M}$ , a viabilidade dos macrófagos diminuiu significativamente. Por essa razão, os experimentos envolvendo essa toxina foram realizados somente com a dose de  $3,6 \times 10^{-7} \text{M}$ . Contudo, vale salientar, recentemente foi demonstrado que a toxina B, nessa mesma concentração, é capaz de estimular macrófagos, *in vitro*, a liberar fatores quimiotáticos para neutrófilos, do tipo leucotrienos e TNF- $\alpha$  (Souza e cols., 1997; Melo Filho e cols., 1997).

Com o andamento da pesquisa, o anticorpo monoclonal PCG<sub>4</sub> foi utilizado com duas finalidades básicas: (1) ratificar a presença de receptores para toxina A em macrófagos; e (2) comprovar que o efeito da toxina A sobre essas células, com a consequente liberação de fator(es) de secreção intestinal, era exclusividade sua e não decorrente de uma contaminação com outros agentes.

Com efeito, tem sido descrito que o PCG<sub>4</sub> atua neutralizando a atividade enterotóxica da toxina A, através da sua interação com epitopos específicos, presentes na seqüência repetida de aminoácidos (ARU), localizados no terminal carboxílico dessa enterotoxina. Por conseguinte, esse anticorpo bloqueia o acoplamento da toxina A no seu respectivo receptor. (Lyerly e cols., 1986; Frey & Wilkins, 1992). Corroborando essa idéia, Lima e cols., 1988, demonstraram que o PCG<sub>4</sub> inibe completamente os efeitos enterotóxicos, tais como secreção e lesão, produzidos pela toxina A do *C. difficile* em íleo de coelho, *in vivo*.

Na presente pesquisa, foi observado que a pré-incubação desse anticorpo monoclonal, na titulação de 1:10, com a toxina A ( $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ ), provocou um bloqueio, em torno de 80 %, na liberação do fator de secreção intestinal. Ademais, em uma pesquisa anterior, demonstramos também que o PCG<sub>4</sub> foi capaz de inibir potentemente a migração de neutrófilos induzida pela toxina A, em cavidades peritoneais de ratos (Rocha, 1994).

Os fatos ora comentados são novos e merecedores de maiores investigações, visto que demonstram, de forma inédita, a presença de receptores para toxina A em células inflamatórias, especialmente macrófagos. Além do mais, reforçam a idéia de que o efeito da toxina A sobre a gênese de mediadores com propriedade secretória intestinal, por macrófagos, seja exclusiva dessa enterotoxina, excluindo, portanto, uma possível contaminação com outras toxinas e/ou agentes secretagogos.

No decorrer dessa investigação, observou-se, ainda, que, diferentemente do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, a adição dessa toxina diretamente no lado seroso das câmaras de Üssing não foi capaz de provocar secreção no íleo de coelho, por conseguinte, reforçando a hipótese inicial de que a atividade secretória intestinal da enterotoxina A ocorre de forma indireta, pelo menos em parte, via liberação de mediador(es) inflamatórios por macrófagos.

Ademais, pelo fato do agente secretagogo intestinal produzido por macrófagos estimulados com toxina A não ter sido caracterizado de imediato, ele foi denominado a princípio de fator de secreção intestinal (FSI).

Com a confirmação da hipótese de que os macrófagos desempenham um papel relevante na resposta secretória intestinal da toxina A, procurou-se investigar os mecanismos moleculares de liberação do FSI. Para tanto, as toxinas ativa e mutante da *Bordetella pertussis* foram utilizadas nesse protocolo experimental, trinta minutos antes e durante a estimulação dos macrófagos com a toxina A.

No tocante ao mecanismo de ação da toxina pertussis ativa, tem sido referido que os efeitos biológicos dessa toxina se devem à ação da unidade  $S_1$  em catalisar a transferência de uma molécula de ADP-ribose do  $NAD^+$  para a subunidade  $\alpha$  de várias proteínas G. Dessa forma, a ADP-ribosilação geralmente leva a um desacoplamento da proteína G do receptor correspondente. Portanto, a toxina pertussis ativa tem sido reconhecida como uma potente ferramenta farmacológica no estudo dos eventos envolvendo transdução de sinal (Gierschik, 1992).

A partir desse protocolo experimental, demonstrou-se que a atividade secretória intestinal, presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, foi inibida em torno de 61% pela adição da toxina pertussis ativa ( $9,5 \times 10^{-7}$  M) às monocamadas de macrófagos. Por outro lado, a toxina pertussis mutante, que é desprovida de atividade enzimática de ADP-ribosilação (Gierschik, 1992), não foi

capaz de alterar significativamente essa atividade. Portanto, os dados desse experimento evidenciam o fato de que a regulação da síntese e liberação do fator de secreção intestinal é dependente da ativação de uma proteína G, sensível à toxina pertussis. Vale salientar que essa evidência também foi observada em outras ações biológicas da toxina A, como, por exemplo, no efeito quimiotático para neutrófilos (Pothoulakis e cols., 1988) e na atividade enterotóxica (Pothoulakis e cols., 1991; Fang e cols., 1993).

Na literatura mundial, existe uma série de estudos evidenciando que vários mediadores sintetizados por macrófagos, como, por exemplo, interleucina-1 (Chang e cols., 1990; Chiossone e cols., 1990; Hinterleitner e cols., 1991; Hinterleitner e cols., 1996), fator de necrose tumoral (Kandil e cols., 1992), fator de agregação plaquetária (Hanglow e cols., 1989; Hinterleitner e cols., 1997), leukotrienos (Smith e cols., 1988; Smith e cols., 1990) e prostaglandinas (Kimberg e cols., 1971; Racusen & Binder, 1980; Ciancio & Chang, 1992), são capazes de induzir, direta ou indiretamente, secreção intestinal *in vivo* e/ou *in vitro*.

Com base nas informações ora referidas, foi planejado um rastreamento farmacológico, através da utilização de bloqueadores farmacológicos e anticorpos monoclonais específicos, na tentativa de investigar se um ou mais destes produtos era o fator responsável pela atividade secretória intestinal, presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com a toxina A.

Para tanto, inicialmente, foram utilizados alguns bloqueadores de síntese protéica, sendo o primeiro deles a cicloheximida, um inibidor clássico dessa atividade (Wiebke e cols., 1994; Ohh & Takei, 1995). Nesse protocolo experimental, observou-se que o uso dessa droga, antes e durante a estimulação das monocamadas de macrófagos com toxina A, produziu um bloqueio significativo, por volta de 67 %, na liberação do fator de secreção intestinal, evidenciando, dessa

forma, que a atividade secretória intestinal do referido sobrenadante era dependente da síntese protéica.

Um suporte adicional para esta evidência, baseou-se no fato de que a dexametasona, também, interferiu de forma significativa na liberação do fator de secreção intestinal. Nesse contexto, vale ressaltar, os glicocorticóides, como, por exemplo, a dexametasona, bloqueiam a transcrição do RNA mensageiro de determinadas citocinas, do tipo TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8, com a conseqüente inibição da síntese destes fatores protéicos, por macrófagos (Beutler e cols., 1986; Barnes & Adcock, 1993; Auphan e cols., 1995; Wilckens & De Rijk, 1997).

Portanto, a utilização da cicloheximida, assim como da dexametasona, deu suporte para a conclusão inicial de que o fator de secreção intestinal, presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, é um agente de natureza protéica, provavelmente uma citocina, com atividade pró-inflamatória.

A etapa subsequente da tentativa de caracterização do fator de secreção intestinal constou do uso de determinados bloqueadores farmacológicos que, direta ou indiretamente, estão relacionados com a gênese dos derivados lipídicos que, por sua vez, são os mediadores químicos da inflamação originados dos fosfolipídios da membrana celular, a partir da ação de enzimas específicas, tais como fosfolipase A<sub>2</sub>, ciclooxigenase, lipoxigenase e liso-PAF-acetiltransferase (Higgs & Vane, 1983; Camussi e cols., 1990).

Vale salientar, um determinado agente injuriante que danifique a membrana das células inflamatórias, como do macrófago, por exemplo, é capaz de liberar frações de fosfolipídeos, do tipo ácido araquidônico, através da atividade da enzima fosfolipase A<sub>2</sub>. Por conseguinte, o ácido araquidônico serve de substrato para as enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase que estão relacionadas com a síntese de prostaglandinas/tromboxanos e leucotrienos, respectivamente (Higgs & Vane,

1983). Ademais, parte dos fosfolípidos da membrana celular pode sofrer uma acetilação, pela enzima liso-PAF-acetiltransferase, e originar o fator de agregação plaquetária (Camussi e cols., 1990; Lacasse & Rola-Pleszczynski, 1991).

A partir da modulação farmacológica dos derivados lipídicos, foi demonstrado, inicialmente, que a adição de quinacrina, inibidor específico da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (Otamiri, 1988; Struhar e cols., 1992), produziu um bloqueio de 54 % na atividade secretória do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, evidenciando, dessa forma, a importância dos eicosanóides na síntese do fator de secreção intestinal. Este dado é bastante interessante, pois ratifica a importância da atividade da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> na secreção e lesão intestinal induzidas pela toxina A do *Clostridium difficile*, em alça intestinal de coelho, relatada anteriormente por Fang e cols., 1994.

Além do mais, o bloqueio produzido pela dexametasona na liberação do fator de secreção intestinal corrobora a idéia ora mencionada, considerando que adicionalmente ao seu efeito sobre a transcrição do RNA mensageiro de determinadas citocinas, essa droga tem um efeito marcante sobre a produção dos derivados do ácido araquidônico, através da produção da lipocortina que, por sua vez, possui também uma atividade inibitória sobre a enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (Flower, 1990; Barnes & Adcock, 1993; Wilckens & De Rijk, 1997).

Dando continuidade ao rastreamento farmacológico dos derivados lipídicos, foram utilizados alguns bloqueadores da síntese de prostaglandinas e leucotrienos, como, por exemplo, indometacina, inibidor específico da enzima ciclooxigenase (Higgs & Vane, 1983), NDGA, inibidor dual de ciclo e lipoxigenase (Higgs & Vane, 1983) e MK 886, inibidor específico de lipoxigenase (Gillard e cols., 1989; Ménard e cols., 1990), adicionados ao meio de incubação, antes e durante a estimulação dos macrófagos com a toxina A. Partindo desses protocolos

experimentais, evidenciou-se que a síntese do FSI, presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com a toxina A, foi bloqueada pelo pré-tratamento com indometacina (62 %) e NDGA (48 %). Entretanto, o MK 886 não foi capaz de modificar de maneira significativa esse efeito.

Ademais, a exemplo do observado com os bloqueadores da síntese de prostaglandinas, a adição do antagonista do receptor de PAF, BN 52021 (Lacasse & Rola-Pleszczynski, 1991; Poubelle e cols., 1991), às monocamadas de macrófagos estimulados com toxina A produziu um bloqueio parcial (55 %) na liberação do fator de secreção intestinal. Esta evidência corrobora os resultados descritos por Fonteles e cols., 1995, demonstrando que a utilização de determinados antagonistas do fator de agregação plaquetária, tais como BN 52021, WEB 2170 e SR 27417, é capaz de modular a secreção e a inflamação intestinal produzidas pela toxina A do *Clostridium difficile*, *in vivo*.

Os resultados obtidos nessa série de experimentos envolvendo a modulação da síntese e liberação dos derivados lipídicos demonstraram fortes evidências de que as prostaglandinas e o fator de agregação plaquetária desempenham um papel importante, muito provavelmente de maneira autócrina, na gênese do fator de secreção intestinal.

Por outro lado, parece que os leucotrienos não participam desse evento, visto que o uso do MK 886 não foi capaz de inibir a atividade secretória intestinal presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A. Observou-se, ainda, que o inibidor dual de ciclo e lipoxigenase (NDGA), ao contrário do esperado, produziu um bloqueio, na síntese do fator de secreção intestinal, inferior àquele observado com o inibidor seletivo da ciclooxigenase, indometacina, sugerindo, portanto, que esse efeito do NDGA ocorreu exclusivamente em razão do seu mecanismo de ação relacionado com a inibição da síntese das prostaglandinas.

Dessa forma, esse experimento forneceu um suporte adicional, evidenciando que os leucotrienos realmente não participam da formação do fator de secreção intestinal.

Conforme comentado em seção anterior desse trabalho, a toxina A é capaz de provocar uma potente migração de neutrófilos em bolsas de ar subcutâneas de ratos, via liberação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , por macrófagos residentes (Rocha, 1994; Rocha e cols., 1997). Portanto, diante desse fato, juntamente com dados preliminares dessa investigação, evidenciando que o fator de secreção intestinal é um agente de natureza protéica com atividade pró-inflamatória, levantou-se a hipótese de que uma dessas citocinas pudesse ser o FSI.

Com a finalidade de investigar essa probabilidade, foram utilizadas, em um primeiro momento, a talidomida e a pentoxifilina que, por sua vez, estão diretamente relacionadas com a síntese de TNF- $\alpha$  (Schade, 1990; Sampaio e cols., 1991., Schandené e cols., 1992; Moreira e cols., 1993., Tilg e cols., 1993). Além do mais, em outra série de experimentos foram usados o antagonista do receptor da interleucina-1 (IL-1ra) e anticorpos monoclonais anti-IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , que se encontram correlacionados com a inibição das atividades biológicas da interleucina-1 (Cominelli e cols., 1990; Cominelli e cols., 1991; Arend, 1991; Cominelli e cols., 1992; Dinarello, 1991; Towbin e cols., 1994).

A literatura relata que a pentoxifilina é capaz de inibir o aparecimento de TNF- $\alpha$  no soro de camundongos e ratos tratados com LPS (Schade, 1990., Noel e cols., 1990). Em adição, estudos que relacionam as propriedades antiinflamatórias dessa droga indicam que ela reduz a síntese e liberação de importantes mediadores da resposta inflamatória, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-2 (LeMay e cols., 1990; Schandené e cols., 1992; Tilg e cols., 1993). Quanto ao seu mecanismo de ação, tem sido descrito que a pentoxifilina atua diminuindo a quantidade de RNA mensageiro para TNF- $\alpha$ , através da inibição da transcrição genética dessa citocina



(Han e cols., 1990; Doherty e cols., 1991; Moreira e cols., 1995; Bergese e cols., 1995).

A talidomida é utilizada atualmente com sucesso no tratamento do eritema nodoso, que representa um estado inflamatório agudo observado na lepra. Nessa perspectiva, tem sido relatado que os indivíduos portadores desta enfermidade apresentam elevados níveis de TNF- $\alpha$  que, por sua vez, são reduzidos com a utilização desse fármaco (Sampaio e cols., 1993). No tocante ao mecanismo de ação da talidomida, ela inibe de forma seletiva a síntese de TNF- $\alpha$  por monócitos humanos, *in vitro*, estimulados com LPS, por meio da degradação do RNA mensageiro dessa citocina (Sampaio e cols., 1991; Moreira e cols., 1993).

Vale salientar que, de forma análoga ao efeito observado com os bloqueadores dos derivados lipídicos (indometacina, NDGA e BN 52021), o tratamento prévio das monocamadas de macrófagos com pentoxifilina e talidomida também promoveu bloqueios parciais, por volta de 48 e 47 %, respectivamente, na liberação do fator de secreção intestinal produzido por macrófagos estimulados com toxina A.

Portanto, os resultados experimentais obtidos com pentoxifilina e talidomida sugerem que, assim como as prostaglandinas e o fator de agregação plaquetária, o fator de necrose tumoral, também, possui uma função importante na liberação do referido fator de secreção intestinal, atuando possivelmente como um elemento amplificador dessa atividade biológica da toxina A.

Ratificando esta hipótese, existem vários trabalhos na literatura mundial demonstrando que as prostaglandinas, o PAF e o TNF- $\alpha$  podem atuar, de maneira autócrina, levando a gênese de outros mediadores da inflamação, com a conseqüente amplificação de suas ações biológicas (Camussi e cols., 1990;

Schreiber e cols., 1992., Dinarello & Wolf, 1993; McKay & Perdue, 1993; Eberhart & Dubois, 1995).

No tocante aos efeitos biológicos do TNF- $\alpha$  no intestino, há alguns trabalhos mostrando que essa citocina induz um aumento na corrente de curto-circuito em mucosa ileal, *in vitro*, e em monocamadas de células T-84 postas em cultura com fibroblastos (Berschneider & Goralska, 1992; Kandil e cols., 1992). Entretanto, há dados em nosso laboratório evidenciando que a adição de TNF- $\alpha$ , no lado seroso do íleo de coelho montado em câmaras de Üssing, produz uma discreta variação na corrente de curto-circuito, de forma similar àquela induzida pelo Ringer/controle.

Ademais, é importante salientar, a análise do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina B, por meio da técnica de ELISA, a exemplo do observado com o terminal carboxílico da toxina A (ARU; dado não mostrado), evidenciou elevados níveis de TNF- $\alpha$ . Contudo, esse sobrenadante foi incapaz de provocar secreção intestinal no íleo de coelho, *in vitro*. Portanto, esse fato corrobora com a idéia ora aventada, apontando o fator de necrose tumoral como um possível amplificador e não como agente desencadeador da atividade secretória intestinal.

Por conseguinte, concorda-se com a hipótese de que o TNF- $\alpha$  esteja atuando no efeito secretório do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, não como um agente secretagogo intestinal direto, mas, sim, como um importante fator modulador autócrino e parácrino da síntese e liberação do FSI, relacionado com a propriedade secretória desse sobrenadante.

Na etapa seguinte dessa pesquisa, analisou-se o possível envolvimento da interleucina-1 na atividade secretória intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A. Para tanto, foram delineados determinados protocolos experimentais, utilizando-se inibidores de proteases, o antagonista do receptor de

interleucina-1 (IL-1ra), anticorpos monoclonais (anti-IL-1 $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$ ) e um ELISA específico para IL-1 $\beta$  de rato.

Os resultados dessa investigação evidenciando que alguns inibidores de proteases, do tipo inibidor de tripsina e fluoreto de fenilmetilsulfonil, bloqueiam a síntese e liberação do FSI forneceram um suporte científico importante, apontando a interleucina-1 como o provável fator de secreção intestinal presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A. Essa hipótese encontra-se fundamentada nos fatos de que, conforme demonstrado inicialmente, este fator se trata de um agente protéico e que, a exemplo do observado com IL-1 (Dinarello, 1991; Dinarello & Wolff, 1993), paradoxalmente, a sua gênese é dependente da expressão de proteases.

Portanto, essa evidência baseia-se em relatos da literatura que demonstram serem ambas as moléculas de IL-1,  $\alpha$  e  $\beta$ , sintetizadas na forma de peptídeos precursores, de 31,0 kDa, que, ao sofrerem processo de clivagem por proteases intra e extra celulares, originam as moléculas maduras de IL-1 com peso molecular de 17,5 kDa (Dinarello, 1991; Thornberry e cols., 1992; Dinarello & Wolff, 1993).

Nessa perspectiva, o precursor de IL-1 $\alpha$  permanece principalmente no interior da célula ou se expressa na superfície da membrana celular, atuando como mensageiro autócrino e parácrino, respectivamente. Contudo, parte desse precursor é liberado para o exterior da célula, onde sofre ação de proteases para originar a forma madura de interleucina-1 $\alpha$  (Dinarello, 1991; Dinarello & Wolff, 1993). Por outro lado, a IL-1 $\beta$ , somente após o processo de clivagem enzimática, intra e extra-celular, é capaz de desempenhar as suas atividades biológicas (Beucher e cols., 1990; Dinarello, 1991; Thornberry e cols., 1992; Dinarello & Wolff, 1993).

Encontra-se bem documentado na literatura que a família da interleucina-1 consiste de três polipeptídeos, denominados de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1ra, identificados e caracterizados pela técnica de clonagem gênica (Auron e cols., 1984; Gubler e cols., 1986; Eisenberg e cols., 1990; Cominelli e cols., 1990; Cominelli e cols., 1994). As duas moléculas de IL-1 $\alpha$  e  $\beta$  estão correlacionadas estruturalmente, agem através dos mesmos receptores, possuem atividades biológicas semelhantes e são sintetizadas e liberadas rapidamente por células mononucleares, em especial monócitos e macrófagos. Contudo, são bioquimicamente distintas, visto que apresentam um seqüenciamento diferente de aminoácidos (Auron e cols., 1984; Dinarello, 1988; Dinarello, 1991; Dinarello & Wolff, 1993).

O potente bloqueio da atividade secretória intestinal do FSI, através do pré-tratamento da mucosa ileal com o antagonista do receptor de IL-1, forneceu mais uma evidência científica que corrobora a hipótese do fator de secreção intestinal ser a interleucina-1. Nesse sentido, vale ressaltar, o IL-1ra tem sido bastante utilizado em diversos protocolos experimentais relacionados com as ações da IL-1, pois este agente farmacológico tem habilidade de neutralizar, tanto *in vivo* como *in vitro*, os efeitos biológicos da IL-1  $\alpha$  e  $\beta$ , por meio de um mecanismo de ação competitivo com estas citocinas, pelos receptores do tipo I e II (Cominelli e cols., 1990; Cominelli e cols., 1994; Dinarello & Thompson, 1991; Dinarello, 1991; Towbin e cols., 1994).

Em adição, os experimentos com os anticorpos monoclonais anti-IL-1 demonstraram resultados extremamente interessantes, no tocante à identificação da interleucina-1 $\beta$  como o fator de secreção intestinal. Nessa perspectiva, foi evidenciado de forma bastante clara que o efeito secretório intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A ocorria de maneira dependente da atividade dessa citocina. Essa evidência baseia-se no fato de que a

pré-incubação do referido sobrenadante com anticorpo monoclonal anti-IL-1 $\beta$ , antes e durante o ensaio em câmaras de Üssing, promoveu um bloqueio significativo na secreção intestinal.

Além do mais, é importante ressaltar, se for levado em consideração o fato de que o sobrenadante-controle, por si só, induz uma pequena variação na corrente de curto-circuito ( $\Delta I_{sc} = 19,56 \mu A.cm^{-2}$ ), o bloqueio do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  foi total, visto que as alterações na corrente produzidas pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, pré-incubado com o anti-IL-1 $\beta$  ( $\Delta I_{sc} = 21,00 \mu A.cm^{-2}$ ), permaneceram no mesmo nível desse controle.

Por outro lado, o anticorpo monoclonal anti-IL-1 $\alpha$ , nas mesmas condições experimentais do anti-IL-1 $\beta$ , não foi capaz de inibir de forma significativa a atividade secretória intestinal produzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A. Portanto, comparando-se as alterações na corrente de curto-circuito nos protocolos com os anticorpos anti-IL-1 $\beta$  e anti-IL-1 $\alpha$ , pode ser observado que o bloqueio produzido pelo segundo anticorpo foi inferior e que apesar de ter produzido uma redução de 42 % no efeito secretório do sobrenadante, essa atividade do anticorpo anti-IL-1 $\alpha$  não foi significativo nos testes estatísticos, como, por exemplo, teste de Dunnett, Student-Newman-Keuls ou Bonferroni, usados nessa pesquisa.

Por fim, o efeito da associação de anti-IL-1 $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  sobre a atividade secretória intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A não diferiu estatisticamente daquele observado com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  isolado. Dessa forma, essa evidência confirma que as ações biológicas da interleucina-1 $\beta$ , mas não da IL-1 $\alpha$ , têm um papel de fundamental importância nesse efeito secretório. Além do mais, esses resultados obtidos nos protocolos com os

anticorpos monoclonais, em conjunto, apontam esta citocina como o provável fator de secreção intestinal, presente no referido sobrenadante de macrófagos.

Estes resultados mostraram-se bastante coerentes com os dados da literatura, visto que, conforme comentado, boa parte da IL-1 $\alpha$  sintetizada permanece no citosol e superfície da membrana celular, na sua forma precursora, e somente uma pequena quantidade dessa citocina é liberada para fora do compartimento celular. Portanto, esse fato explica por que, apesar de ambas as formas de interleucina-1 serem produzidas concomitantemente e possuírem atividades biológicas semelhantes (Dinarello, 1991; Dinarello & Wolff, 1993), o anticorpo anti-IL-1 $\alpha$  não bloqueou significativamente a secreção intestinal. Por outro lado, a IL-1 $\beta$  é secretada como precursor biologicamente inativo, sofre ação de proteases, e, por último, é transformada na sua forma madura, que se encontra presente principalmente no meio extracelular (Beuscher e cols., 1990; Dinarello, 1991), sendo, portanto, a molécula de interleucina-1 presente em maior concentração nos fluidos biológicos (Hazuda e cols., 1988; Dinarello & Wolff, 1993). Daí a explicação para a potente eficácia do anticorpo anti-IL1 $\beta$  sobre a atividade secretória, provocada pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A. Logo, essa é mais uma evidência que corrobora a probabilidade de a interleucina-1 $\beta$  ser o fator de secreção intestinal.

Outro importante achado que aflui à probabilidade aventada foi o fato de que o uso da interleucina-1 $\beta$ , no lado seroso da câmara de Üssing, provocou uma intensa secreção intestinal, de forma bastante similar àquela produzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A. Nesse contexto, observou-se que as alterações na corrente de curto-circuito provocadas por essa citocina foram semelhantes, tanto na magnitude como na cinética do efeito, às induzidas por esse sobrenadante.

Vale a pena comentar que os resultados ora discutidos mostraram-se de maneira análoga aos descritos por Chiossone e cols., 1990, evidenciando que as interleucinas- $1\alpha$  e  $\beta$  humana, indistintamente, mesmo em baixas concentrações, induzem uma potente secreção intestinal em mucosa ileal de coelho, *in vitro*. Além do mais, no tocante à cinética desse efeito, esses pesquisadores observaram também que, a exemplo do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, o período necessário para o aparecimento da resposta secretória intestinal provocada por essas citocinas situou-se em torno de 30-40 minutos após o uso destas no lado seroso das câmaras de Üssing.

Por último, uma pista fundamental para a conclusão de que o fator de secreção intestinal se tratava realmente da interleucina- $1\beta$  foi obtida a partir das dosagens das amostras, pela técnica do ELISA, evidenciando níveis elevados dessa citocina no sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A. Ademais, corroborando esse achado, recentemente, demonstramos que o uso de toxina A, no modelo de alça intestinal de rato isolada, preconizada por De & Chatterje, 1953, é capaz de promover uma reação inflamatória na mucosa intestinal e uma intensa secreção de fluidos que, por sua vez, apresenta altas concentrações de IL- $1\beta$ .

Por outro lado, as concentrações de IL- $1\beta$  no sobrenadante procedente da cultura de macrófagos tratados com a toxina B, não diferiram estatisticamente daquelas observadas com o grupo-controle. Portanto, este fato, em conjunto com a demonstração anterior, evidenciando que o soro anti-IL- $1\beta$  não bloqueia a migração de neutrófilos produzida por essa toxina (Rocha, 1994), sugere que a interleucina- $1\beta$  parece não desempenhar um papel importante na fisiopatologia das atividades biológicas da toxina B. Portanto, dessa forma, se explica por que o sobrenadante de macrófagos estimulados com essa toxina foi incapaz de causar secreção no íleo de coelho, montado em câmaras de Üssing.

Além do mais, apesar de não fazer parte dos objetivos desse trabalho, avaliou-se o efeito secretório intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS e exotoxina do *Vibrio cholerae* e microcistina da *Microcystis aeruginosa*, no íleo de coelho montado em câmaras de Üssing. Entretanto, dentre essas toxinas, somente a microcistina foi capaz de estimular a síntese de fator(es) com propriedade secretória intestinal. A análise desse sobrenadante, por ELISA, evidenciou que tanto o LPS como a microcistina foram capazes de induzir a síntese de TNF- $\alpha$ . Contudo, somente a microcistina foi capaz estimular a gênese de IL-1 $\beta$ . Dessa forma, esses resultados forneceram mais um subsídio científico, apontando a importância da interleucina-1 $\beta$  no efeito secretório intestinal de algumas toxinas, ratificando, assim, o papel dessa citocina na secreção induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com a toxina A do *C. difficile*.

Na etapa subsequente, após a identificação da IL-1 $\beta$  como o fator de secreção intestinal, realizou-se uma busca ativa em vários trabalhos científicos, na tentativa de correlacionar os dados obtidos na modulação farmacológica dos derivados lipídicos, com as atividades biológicas dessa citocina. A partir daí, foi encontrado que a síntese e liberação de interleucina-1 pode ser bloqueada por inibidores de ciclooxigenase (Dinarello, 1991) e por inibidores dual de ciclo e lipoxigenase (Sirko e cols., 1991; Dinarello, 1991). Contudo, esses eventos permanecem inalterados pelo uso de bloqueadores específicos de lipoxigenase (Dinarello, 1991). Ademais, foi evidenciado que a IL-1 é capaz de estimular a produção de PAF, por monócitos e macrófagos, que, por sua vez, pode regular autocrinamente a gênese de IL-1, IL-2 e TNF- $\alpha$  (Camussi e cols., 1990).

Portanto, fazendo-se um paralelo entre os dados da literatura e os resultados obtidos nessa investigação, onde se observou um bloqueio na liberação do fator de secreção intestinal com indometacina, NDGA e BN 52021, bem como uma ausência



de efeito com o bloqueador seletivo de lipoxigenase (MK 886), os dados observados na modulação dos derivados lipídicos ficam justificados e, ao mesmo tempo, ratificam que a IL-1 $\beta$  é o fator de secreção intestinal, presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A.

Quanto às atividades biológicas da interleucina-1 a no intestino, existe uma série de trabalhos evidenciando que esta citocina age de maneira indireta, via estimulação de células da lâmina própria, com a conseqüente síntese de outros mediadores inflamatórios, principalmente prostaglandinas (Chang e cols., 1990; Chiossone e cols., 1990; Berschneider & Goralska, 1992; Theodorou e cols., 1994; Hinterleitner e cols., 1996); bem como através da ativação do sistema nervoso entérico (Theodorou e cols., 1994).

Com efeito, foi evidenciado que a interleucina-1 $\alpha$  ou  $\beta$  provoca secreção de cloreto, no intestino de coelho ou galinha em câmaras de Üssing, assim como em células T-84, através da síntese de prostaglandinas por células residentes da lâmina própria intestinal, como fibroblastos por exemplo (Chang e cols., 1990; Chiossone e cols., 1990; Hinterleitner e cols., 1991; Berschneider & Goralska, 1992; Theodorou e cols., 1994).

Em adição, demonstrou-se que a IL-1 $\beta$  causa uma potente secreção no intestino de rato, *in vivo*, via liberação de prostaglandinas e ativação do sistema nervoso entérico (Theodorou e cols., 1994). Por último, existem ainda vários estudos relatando que a interleucina-1 induz a síntese de PDE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> e IL-8 que, por sua vez, estão implicados na secreção, edema e necrose da mucosa intestinal inflamada (Cominelli e cols., 1989; Cominelli e cols., 1990; Dinarello & wolff, 1993; Theodorou e cols., 1994).

Em muitas circunstâncias, a produção de interleucina-1 é um fator determinante no aparecimento de doenças. Contudo, em algumas situações a sua

síntese pode ser apenas uma etapa intermediária. Por exemplo, no choque séptico, a IL-1 age diretamente nos vasos sangüíneos produzindo uma potente vasodilatação. Por outro lado, nas doenças auto-imunes, essa citocina atua estimulando a síntese de outros mediadores e/ou enzimas que interagem em tecidos-alvo específicos desencadeando o processo patológico (Dinarello & Wolff, 1993). Por sua vez, no tocante ao envolvimento da IL-1 nas doenças relacionadas com *Clostridium difficile*, conforme será discutido adiante, parece que essa citocina participa de forma indireta na fisiopatologia dos efeitos enterotóxicos provocados pela toxina A.

A partir dessa breve revisão relatando as atividades da IL-1 no intestino, levantou-se a hipótese de que, a exemplo dessa interleucina, a secreção intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, poderia estar relacionada com o transporte de cloreto e que esse efeito secretório ocorria por mecanismos indiretos, via estimulação de células da lâmina própria e/ou ativação do sistema nervoso entérico.

Corroborando esta hipótese, foi demonstrado inicialmente em modelos experimentais, para secreção de eletrólitos, em células epiteliais humanas *in vitro* (Dharmasathaphorn & Madara, 1990), que esta atividade secretória provavelmente dependia de outros componentes da mucosa intestinal, uma vez que o referido sobrenadante de macrófagos não foi capaz de induzir um efeito secretagogo significativo nas células T-84 e CaCo-2, dispostas em câmaras de Üssing modificadas (Flores e cols., 1996).

Com base nesses resultados descritos por Flores e cols., 1996, investigou-se o possível envolvimento de células residentes da lâmina própria intestinal, bem como do sistema nervoso entérico no efeito secretório sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A. Além do mais, foi avaliada a participação dos íons Cl<sup>-</sup> nessa atividade de secreção intestinal.

Para tanto, foram traçados protocolos experimentais utilizando-se indometacina, inibidor da síntese de prostaglandinas (Higgs & Vane, 1983), que medeiam a secreção intestinal de vários agentes pró-inflamatórios, tetrodotoxina, bloqueador dos canais de  $\text{Na}^+$  (Barchi, 1982; Miller, 1989), que tem sido uma ferramenta farmacológica importante na avaliação do componente nervoso da secreção intestinal (Zimmerman & Binder, 1983) e bumetanida, um clássico bloqueador do cotransporte de Na-K-Cl (O'Grady e cols., 1987; Stack e cols., 1995).

Os dados obtidos nessa investigação evidenciaram que as alterações na corrente de curto-circuito, provocadas pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, ocorrem em consequência da secreção eletrogênica de cloreto, visto que o bloqueador do cotransporte de Na-K-Cl produziu uma significativa inibição (84 %) na atividade secretória intestinal desse sobrenadante.

A utilização da bumetanida, no lado seroso da câmara de Üssing, tem sido largamente adotada em protocolos experimentais de secreção, envolvendo a participação dos íons cloreto. Nesse sentido, foi demonstrado que o efeito secretório de determinados estímulos, como, por exemplo, anti-IgE, fMLP, monocloramina, carbacol, IL-1 e IL-3 que, reconhecidamente provocam secreção no intestino, via transporte de  $\text{Cl}^-$ , é potentemente bloqueado pelo uso prévio da bumetanida (Chang e cols., 1990; Colgan e cols., 1992; Tamai e cols., 1992; Crowe & Perdue, 1993; Stack e cols., 1995).

Convém salientar que, na grande maioria desses trabalhos, observou-se, ainda, que o efeito da bumetanida sobre as alterações na corrente de curto-circuito é tão potente quanto a retirada dos íons  $\text{Cl}^-$  da solução de perfusão. Portanto, o significativo bloqueio (84 %) com a bumetanida reforça a afirmação inicial de que o efeito secretório intestinal induzido pelo referido sobrenadante de macrófagos se

encontra relacionado com o transporte de cloreto. Em adição, corroborando essa idéia demonstrou-se, ainda, que esse sobrenadante é capaz de reduzir a absorção de água e eletrólitos, especialmente  $\text{Cl}^-$ , no modelo de perfusão intestinal de ratos, *in vivo* (Santos Neto e cols., 1996).

Ademais, partindo do princípio de que a estimulação do metabolismo do ácido araquidônico promove uma potente secreção de cloreto em intestino de animais experimentais, mediada pela ativação da via ciclooxigenase (Calderaro e cols., 1991), e que as prostaglandinas medeiam o efeito secretório de uma série de agentes secretagogos, tais como  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-3}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$ ,  $\text{LTE}_4$ , PAF, histamina e fMLP (Hanglow, 1989; Smith e cols., 1990; Chang e cols., 1990; Berchneider, 1992; McKay & Perdue, 1993; Hinterleitner e cols., 1996), foi investigada a probabilidade de a secreção intestinal, produzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, ser mediada por esses eicosanóides.

Nesse contexto, foi observado que o pré-tratamento da mucosa ileal com indometacina promoveu um potente bloqueio na atividade secretória intestinal, mostrando, assim, que o referido sobrenadante atua por um mecanismo indireto, dependente da síntese de prostaglandinas, por células da lâmina própria intestinal. Portanto, esses resultados mostraram-se muito semelhantes àqueles descritos com a  $\text{IL-1}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ , em modelos experimentais de secreção intestinal, tanto *in vitro* como *in vivo* (Chang e cols., 1990, Chiossone e cols., 1990 Theodorou e cols., 1994; Hinterleitner e cols., 1996).

Os resultados demonstraram, ainda, que o pré-tratamento da mucosa ileal com tetrodotoxina produz um significativo bloqueio (84 %) nas alterações da corrente de curto-circuito, induzidas pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, evidenciando, portanto, que este efeito sobre a secreção intestinal é, em parte, dependente da liberação de neurotransmissores por nervos subepiteliais.

Essa afirmativa está baseada no mecanismo de ação da TTX, que age bloqueando os canais de  $\text{Na}^+$  voltagens sensíveis e, assim, tornando mais difícil a produção de um potencial de ação (Barchi, 1982). Vale salientar, a tetrodotoxina é inadequada para uso clínico, pois é bastante dispendiosa e de penetração difícil nos tecidos, por causa da sua baixa lipossolubilidade. Entretanto, tem sido muito importante, como instrumento experimental, para o estudo de canais de  $\text{Na}^+$ . Dessa forma, o uso da TTX possibilitou o isolamento, purificação e seqüenciamento da proteína do canal de sódio (Barchi, 1982; Miller, 1989).

Um fato bastante interessante foi que os resultados obtidos no protocolo experimental com tetrodotoxina mostraram-se bastante similares àqueles descritos por Theodorou e cols., 1994, *in vivo*, evidenciando que a rhIL-1 $\beta$  induz uma potente secreção intestinal por um mecanismo sensível à ação da tetrodotoxina, e, por conseguinte, mediado pelo sistema nervoso entérico. Por outro lado, a atividade secretória intestinal da rhIL-1 $\alpha$ , *in vitro*, independe da atividade dos nervos entéricos, conforme o demonstrado por Chiossone e cols., 1990.

Os dados deste trabalho em conjunto demonstram que macrófagos estimulados com a toxina A, mas não com a toxina B do *Clostridium difficile*, sintetizam interleucina-1 $\beta$  que, por sua vez, é capaz de provocar secreção intestinal em íleo de coelho montado em câmaras de Üssing. Demonstram, ainda, que a modulação da síntese desta citocina é dependente da ativação de proteína G, sensível à toxina pertussis. Em adição, prostaglandinas, PAF e TNF- $\alpha$  também estão envolvidos na liberação da IL-1 $\beta$ . Por fim, foi demonstrado que a atividade secretória intestinal da interleucina-1 $\beta$ , presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com a toxina A, ocorre de maneira indireta, via síntese de prostaglandinas e ativação do sistema nervoso entérico.

## 6- CONCLUSÕES

1- O sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, mas não com toxina B, do *Clostridium difficile* produz uma potente secreção intestinal em íleo de coelho, montado em câmaras de Üssing.

2- O processo de síntese do fator de secreção intestinal produzido por macrófagos estimulados com toxina A, é dependente da ativação de uma proteína G, sensível a toxina pertussis.

3- Prostaglandinas, PAF e TNF- $\alpha$  participam, de maneira autócrina, na gênese do fator de secreção intestinal.

4- A interleucina-1 $\beta$  é o fator de secreção intestinal implicado na resposta secretória do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A.

5- A secreção intestinal provocada pela IL-1 $\beta$ , presente no sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, é dependente da secreção de cloreto.

6- O efeito secretório intestinal desta IL-1 $\beta$  ocorre, de forma indireta, via estimulação de células residentes, com a conseqüente síntese de prostaglandinas, bem como da ativação do sistema nervoso entérico.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, D.O., HAMILTON, T.A. Molecular transductional mechanisms by which IFN- $\gamma$  and other signals regulate macrophage development. **Immunolog. Rev.**, 97: 5-15, 1987.
2. AKTORIES, K. Bacterial toxins that target Rho proteins. **J. Clin. Invest.**, 99: 827-829, 1997a.
3. AKTORIES, K. Clostridial ADP-ribosylating toxins: Effects on ATP and GTP-binding proteins. **Mol. Cell. Biochem.**, 138: 167-176, 1994.
4. AKTORIES, K. Rho proteins: Targets for bacterial toxins. **Trends Microbiol.**, 5: 282-288, 1997b.
5. ANGLIM, A.M., FARR, B.M. Nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, 7: 602-608, 1994.
6. AREND, W.P. Interleukin- 1 receptor antagonist: A new member of the interleukin 1 family. **J. Clin. Invest.**, 88: 1445-51, 1991.
7. AUPHAN, N., DIDONATO, J.A., ROSETTE, C., HELMBERG, A., KARINS, M. Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NF- $\kappa$ B activity through induction of I $\kappa$ B synthesis. **Science**, 270: 286-289, 1995.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, D.O., HAMILTON, T.A. Molecular transductional mechanisms by which IFN- $\gamma$  and other signals regulate macrophage development. **Immunolog. Rev.**, 97: 5-15, 1987.
2. AKTORIES, K. Bacterial toxins that target Rho proteins. **J. Clin. Invest.**, 99: 827-829, 1997a.
3. AKTORIES, K. Clostridial ADP-ribosylating toxins: Effects on ATP and GTP-binding proteins. **Mol. Cell. Biochem.**, 138: 167-176, 1994.
4. AKTORIES, K. Rho proteins: Targets for bacterial toxins. **Trends Microbiol.**, 5: 282-288, 1997b.
5. ANGLIM, A.M., FARR, B.M. Nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, 7: 602-608, 1994.
6. AREND, W.P. Interleukin- 1 receptor antagonist: A new member of the interleukin 1 family. **J. Clin. Invest.**, 88: 1445-51, 1991.
7. AUPHAN, N., DIDONATO, J.A., ROSETTE, C., HELMBERG, A., KARINS, M. Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NF- $\kappa$ B activity through induction of I $\kappa$ B synthesis. **Science**, 270: 286-289, 1995.



8. AURON, P.E., WERB, A.C., ROSENWASSER, L.J., MUCCI, S.F., RICH, A., WOLFF, S.M., DINARELLO, C.A. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81: 7907-7911, 1984.
9. AVERY, R.M., SHELTON, A.P., BEARDS, G.M., OMOTADE, O.O., OYEJIDE, O.C., OLALEYE, D.O. Viral agents associated with infantile gastroenteritis in Nigeria: relative prevalence of Adenovirus Serotypes 40 and 41, Astrovirus, and Rotavirus Serotypes 1 to 4. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, 10: 105- 108, 1992.
10. BAGGIOLINI, M., WALZ, A., KUNKEL, S.L. Neutrophil-activating peptide-1/ interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **J. Clin. Invest.**, 84: 1045-1049, 1989.
11. BALDACINI, O., GIRARDOT, R., GREEN, G.A.; RIHN, B., MONTEIL, H. Comparative study of immunological properties and cytotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin B and *Clostridium sordellii* toxin L. **Toxicon**, 30: 129-40, 1992.
12. BANNO, Y, KOBAYASHI, T., KONO, H., WATANABE, K., VENO, K., NOZAWA, Y. Biochemical characterization and biologic actions of two toxins (D-1 and D-2) from *Clostridium difficile*. **Rev. Infec. Dis.**, 6: S11-S20, 1984.

BARCHI, R.L. Biochemical studies of the excitable membrane sodium channel. **Int. Rev. Neurobiol.**, 263: 69-101, 1982.

BARNES, P.J., ADCOCK, I. Antiinflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol. Sci.**, 14: 436-441, 1993.

BARRET, T.A., MUSCH, M.W, CHANG, E.B. Chemotactic peptide effects on intestinal eletrolyte transtport. **Am. J. Physiol.**, 259: G947-G954, 1990.

BARRETT, KE. Mechanisms of inflammatory diarrhoea. **Gastroenterology**, 103: 710-711, 1992.

BARROSO, L.A., WANG, S.Z., PHELPS, C.J., JOHNSON, J.L., WILKINS, T.D. Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene. **Nucleic Acids Res.**, 18: 4004, 1990.

BARTLETT, J.G. *Clostridium difficile* infection: pathophysiology and diagnosis. **Semin. Gastrointest. Dis.**, 8: 12-21, 1997.

BARTLETT, J.G. *Clostridium difficile*: Clinical considerations. **Rev. Infec. Dis.**, 12: 243-251, 1990.

BARTLETT, J.G., MOON, N., CHANG, T.W., TAYLOR, N., ONDERDONK, A.B. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-

associated pseudomembranous colitis. **Gastroenterology**, 75: 778-782, 1978.

21. BERN, M.J., STURBAUM, C.W., KARAYALCIN, S.S., BERSCHNEIDER, H.M., WACHSMAN J.T., POWELL, D.W. Immune system control of rat and rabbit colonic electrolyte transport: role of prostaglandins and enteric nervous system. **J. Clin. Invest.**, 83: 1810-1820, 1989.
22. BERSCHNEIDER, H. M., GORALSKA, M. Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF) enhance the paracrine modulation of intestinal epithelial Cl<sup>-</sup> secretion by fibroblasts. **Gastroenterology**, 102: A201, 1992.
23. BERSCHNEIDER, H.M. Fibroblast modulation of intestinal secretory responses. **Ann N.Y Acad. Sci.**, 664: 140-147, 1992.
24. BETTE, P., OKSCHE, A., MAULER, F.V., EICHEL-STREIBER, C., POPOFF, M.R., HABERMANN, E. A comparative biochemical, pharmacological and immunological study of *Clostridium novyi*  $\alpha$ -toxin, *C. difficile* toxin B and *C. sordellii* lethal toxin. **Toxicon**, 29: 877-87, 1991.
25. BEUSCHER, HU., GUENTHER C, ROELLINGHOFF M: IL-1 beta is secreted by activated murine macrophages as biologically inactive

precursor. **J. Immunol.**, 144: 2179-2183, 1990.

26. BEUTLER, B., KROCHIN, N., MILSARK, I.W., LUEDKE, C., CERAMI, A. Control of cachetin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. **Science**, 232: 977-980, 1986.
27. BINDER, H.J. Pathophysiology of acute diarrhea. **Am. J. Med.**, 88: 2S-4S, 1990.
28. BOBAK, D.A. & GUERRANT, R.L. New developments in enteric bacterial toxins. **Adv. Pharmacol.**, 23: 85-108, 1992.
29. BURAKOFF, R., ZHAO, L., CELIFARCO, A.J., ROSE, K.L., DONOVAN, V., POTHOUKAKIS, C., PERCY, W.H. Effects of purified *Clostridium difficile* toxin A on rabbit distal colon. **Gastroenterology**, 109: 348-354, 1995.
30. CALDERARO, V., GIOVANI, A., DE SIMONE, B., CAMUSSI, G., ROSSIELLO, R., QUAGLIUOLO, L., SERVILLO, L., TACCONE, W., GIORDANO, C., BALESTRIERI, C. Arachidonic acid metabolites and chloride secretion in rabbit distal colonic mucosa. **Am. J. Physiol.**, 261: G443-G450, 1991.
31. CAMUSSI, G., TETTA, C., BAGLIONE, C. The role of platelet-activating factor in inflammation. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, 57: 331-338,

1990.

32. CASTAGLIULO, I., LaMONT, J.T., LETOURNEAU, R., KELLY, C., O'KEANE, J.C., JAFFER, A., THEOHARIDES, T.C. Neuronal involvement in the intestinal effects of *Clostridium difficile* toxin A and *Vibrio cholerae* enterotoxin in rat ileum. **Gastroenterology**, 107: 657-665, 1994.
33. CASTAGLIUOLO, I., KEATES, A.C., QIU, B., KELLY, C.P., NIKULASSON, S., LEEMAN, S.E., POTHOUKAKIS, C. Increased substance P responses in dorsal root ganglia and intestinal macrophages during *Clostridium difficile* toxin A enteritis in rats. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, 94: 4788-4793, 1997.
34. CHANG, E. B., M. W MUSCH & L. MAYER. Interleukins 1 and 3 stimulate anion secretion in chicken intestine. **Gastroenterology**, 98: 1518-1524, 1990.
35. CHIOSSONE DC, SIMON PL, SMITH PL. Interleukin-1 effects on rabbit ileal mucosa ion transport *in vitro*. **Eur. J. Pharmacol.**, 180: 217-228, 1990.
36. CIANCIO, M.J., CHANG, E.B. Epithelial secretory response to inflammation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 664: 210-221, 1992.

37. COHN, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes: Fact, fancy and future. **J. Immunol.**, 121: 813-816, 1978.
38. COLGAN, S., P., MATTHEWS, J., B., PARKOS, C., A., DELP, C., AWTREY, C., S., MADARA, J., L. The myeloid leukemia cell line HL-60 produces a factor that induces chloride secretion in cultured epithelial cells. **J. Leuk. Biol.**, 52: 183-187, 1992.
39. COMINELLI, F., BORTOLAMI, M., PIZARRO, T.T., MONSACCHI, L., FERRETI, M., BREWER, M.T., EISENBERG, S.P. Rabbit interleukin-1 receptor antagonist. Cloning, expression, functional characterization, and regulation during intestinal inflammation. **J. Biol. Chem.**, 269: 6962-6971, 1994.
40. COMINELLI, F., NAST, C.C., CLARK, B.D., SCHINDLER, R., LIERENA, R., EYSSELEIN, V.E., THOMPSON, R.C., DINARELLO, C.A. Interleukin-1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. **J. Clin. Invest.**, 86: 972-980, 1990.
41. COMINELLI, F., NAST, C.C., DINARELLO, C.A., GENTILINI, P., ZIPSER, R.D. Regulation of eicosanoid production in rabbit colon by interleukin-1. **Gastroenterology**, 97: 1400-1405, 1989.
42. COMINELLI, F., NAST, C.C., DUCHINI, L.M. Recombinant interleukin-1

receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. **Gastroenterology**, 103:365-371, 1992.

43. CROWE, S.E., PERDUE, M.H. Anti-immunoglobulin E stimulated ion transport in human large and small intestine. **Gastroenterology**, 105: 764-772, 1993.
44. CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: Inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol.**, 129: 65-76, 1986.
45. DE, S.N., CHATTERJE, D.N. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. **J. Path. Bact.**, 66: 559-562, 1953.
46. DENHARDT, D.T. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: The potential for multiplex signalling. **Biochem J.**, 318: 729-747, 1996.
47. DHARMSATHAPHORN, K., MADARA, J.L. Established intestinal cell lines as model systems for electrolyte transport studies. **Methods Enzymol.**, 192: 354-376, 1990.
48. DILLON, S.T., RUBIN, E.J., YAKUBOVICH, M., POTHOUKAKIS, C.,

LaMONT, J.T., FEIG, L.A., GILBERT, R.J. Involvement of Ras-related Rho proteins in the mechanisms of action of *Clostridium difficile* toxin A and B. **Infect. Immun.**, 63: 1421-1426, 1995.

49. DINARELLO, C. A., WOLFF, S. M. The role of interleukin- 1 in disease. **N. Engl. J. Med.**, 328: 106-113, 1993.
50. DINARELLO, C.A. Biology of interleukin 1. **FASEB J.** 2: 108-115, 1988.
51. DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and Interleukin-1 Antagonism. **Blood**, 77:1627-1652, 1991.
52. DINARELLO, C.A., THOMPSON, R.C. Blocking IL-1: Interleukin-1 receptor antagonist in *vivo* and in *vitro*. **Immunol. Today**, 12: 404-410, 1991.
53. DOHERTY, G.M., JENSEN, J.C., ALEXANDER, H.R., BURESH, C.M., NORTON, J.A. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. **Surgery**, 110: 192-198, 1991.
54. DOVE, C.H., WANG, S.Z., PRICE, S.B., PHELPS, C.J., LYERLY, D.M., WILKINS, T.D., JOHNSON, J.L. Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. **Infect. Immun.**, 58: 480-488, 1990.
55. EBERHART, C.E., DUBOIS, R.N. Eicosanoids and the gastrointestinal



tract. **Gastroenterology**, 109: 285-301, 1995.

56. ECKMANN, L., JUNG, H.C., SCHURER-MALY, C., PANJA, A., MORZYCKA-WROBLEWSKA, E., KAGNOFF, M.F. Differential Cytokine Expression by Human Intestinal Epithelial Cell Lines: Regulated Expression of Interleukin-8. **Gastroenterology**, 105: 1689-1697, 1993.
57. EISENBERG, S.P., EVANS, R.J., AREND, W.P., VERDERBER, E., BREWER, M.T., HANNUM, C.H., THOMPSON, R.C. Primary structure and functional expression from complementary DNA of human IL-1ra. **Nature**. 343: 341-346, 1990.
58. ELTON . E., D. C. CHIOSSONE. G. P MCCAFFERTY, F.M RYAN & P. L SMITH. SK&F 104353: Selective antagonism of peptidoleukotriene-induced changes in electrolyte transport by rat ileal mucosa *in vitro*. **J. Pharmacol. Exp Ther.**, 251: 484-489, 1989.
59. FACCIOLI, L.H., SOUZA, G.E.P., CUNHA, F.Q., POOLE, S., FERREIRA, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "*in vivo*" by indirect mechanisms. **Agents Actions**. 30: 344-349, 1990.
60. FANG, G., LIMA, A.A.M., THIELMAN, N., FONTELES, M., YOTSEFF, P., LYERLY, D., GUERRANT, R.L. Role of phospholipase A<sub>2</sub> in the

histologic, epithelial and secretory responses to *Clostridium difficile*.  
**Biomed. J.**, 1: 1-5, 1994.

61. FANG, G.D., YOTSEFF, P., LYERLY, D.M., HEWLETT, E.L., GUERRANT, R.L. Pertussis toxin (PT) inhibits the secretory effect of *C. difficile* toxin. **Clin. Res.**, 41: A175, 1993.
62. FERREIRA, S.H. Are macrophages the body's alarm cells ? **Agents Actions**, 10: 229-230, 1980.
63. FERRETI, M., CASINI-RAGGI, V., PIZARRO, T.T., EISENBERG, S.P., NAST, C.C., COMINELLI, F. Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. **J. Clin. Invest.**, 94: 449-453, 1994.
64. FIELD, M., FROMM, D., McCOLL, I. Ion transport in rabbit ileal mucosa. I. Na and Cl fluxes and short-circuit current. **Am. J. Physiol.**, 220: 1388-1396, 1971.
65. FIELD, M., RAO, M.C., CHANG, E.B. Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease. **N. Engl. J. Med.**, 321: 879-883, 1989.
66. FINLEY, R. B., SMITH, P.L. Stimulation of intestinal Cl<sup>-</sup> secretion: similarities between fMLP and LTD<sub>4</sub>. **Gastroenterology**, 96: A151, 1989.

67. FIORENTINI, C., THELESTAM, M. *Clostridium difficile* toxin A and its effects on cells. **Toxicon**, 29: 543-567, 1991.
68. FLEGEL, W.A., MÜLLER, F., DAUBENER, W., FISCHER, H.G., HADDING, U., NORTHOFF, H. Cytokine response by human monocytes to *Clostridium difficile* toxin A and toxin B. **Infect. Immun.**, 59: 3659-3666, 1991.
69. FLORES, C.A., ROCHA, M.F.G., SOARES, A.M., STEINER, T., GUERRANT, R.L., RIBEIRO, R.A., LIMA, A.A.M. Papel de monócitos/macrófagos na resposta secretória da toxina A do *Clostridium difficile* no íleo isolado de coelhos e monocamadas de células epiteliais humanas- T-84 e CaCo-2. **FESBE**, A12.078, p. 203, 1996.
70. FLORIN, I., THELESTAM, M. Polyphosphate-mediated protection from cellular intoxication with *Clostridium difficile* toxin B. **Biochem. Biophys. Acta.** 85: 131-136, 1984.
71. FLOWER, R.J., Lipocortin. **Prog. Clin. Biol. Res.**, 349: 11-25, 1990.
72. FONTELES, M.C., FANG, G., THIELMAN, N.M., YOTSEFF, P.S., GUERRANT, R.L. Role of platelet activating factor in inflammatory and secretory effects of *Clostridium difficile* toxin A. **J. Lip. Med.**

**Cell Sign.**, 11: 133-143, 1995.

73. FREY, S.M., WILKINS, T.D. Localization of two epitopes recognized by monoclonal antibody PCG-4 on *Clostridium difficile* toxin A. **Infect. Immun.**, 60: 2488-2492. 1992.
74. GEORGE, R.H., SYMONDS, J.M., DIMOCK, F., BROWN, J.D., ARABI, Y., SHINEGAWA, N., KEIGHLEY, M.R.B., ALEXANDE-WILLIAMS, J., BURDON, D.W. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. **Br. Med. J.**, 1: 695, 1978.
75. GIERSCHIK, P. ADP-ribosylation of signal-transducing guanine nucleotide-binding proteins by pertussis toxin. **Microbiol. Immunol.**, 175: 69-96, 1992.
76. GILLARD, J., FORD-HUTCHINSON, A.W., CHAN, C., CHARLESON, S., DENIS, D., FOSTER, A., FORTIN, R., LEGER, S., McFARLANE, CS., MORTON, H. L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 67: 456-464, 1989.
77. GIRY, M., POPOFF, M.R., VON EICHEL-STREIBER, C., BOQUET, P. Transient expression of RhoA, B and C GTPases in HeLa cells potentiates resistance to *Clostridium difficile* toxins A and B but not to

- Clostridium sordellii* lethal toxin. **Infect. Immun.**, 63: 4063-4071, 1995.
78. GRÖSCHEL, D.H. *Clostridium difficile* infection. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, 33: 203-245, 1996.
79. GUBLER, U., CHUA, A.O., STERN, A.S., HELLMANN, C.P., VITEK, M.P., DeCHIARA, T.M., BEJAMIN, W.R., COLLIER, K.J., DUROVICH, M., FAMILLETTI, P.C. Recombinant human interleukin-1 alpha: Purification and biological characterization. **J. Immunol.**, 136: 2492-2497, 1986.
80. GUERRANT, R.L. Lessons from diarrheal diseases: Demography to molecular pharmacology. **J. Infect. Dis.**, 169: 1206-1218, 1994.
81. GUERRANT, R.L., ARAUJO, V., SOARES, E., KOTLOFF, K., LIMA, A.A.M., COOPER, W.H., LEE, A.G. Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 1238-42, 1992.
82. GUERRANT, R.L., BOBAK, D. Bacterial and protozoal gastroenteritis. **N. Engl. J. Med.**, 325: 327-340, 1991.
83. HALL, I.C., O'TOOLE, E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. **Am. J.**

**Dis. Child.**, 49: 390-402, 1935.

84. HALM, D.R., RECHKEMMER, G.R., SCHOUMACHER, R.A., FRIZZELL, R.A. Apical membrane chloride channels in a colonic cell line activated by secretory agonists. **Am. J. Physiol.**, 254: C505-511, 1988.
85. HAN, J., THOMPSON, P., BEUTLER, B. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. **J. Exp. Med.**, 172: 391-394, 1990.
86. HANGLOW, A.C., BIENENSTOCK, J., PERDUE, M.H. Effects of platelet-activating factor on ion transport in isolated rat jejunum. **Am. J. Physiol.**, 257: G845-G850, 1989.
87. HARRIS, J.C., DuPONT, H.L., HORNICK, R.B. Fecal leukocytes in diarrheal disease. **Ann. Intern. Med.**, 72: 697-703, 1972.
88. HAZUDA, D.J., LEE, J.C., YOUNG, P.R. The kinetics of interleukin-1 secretion from activated monocytes. Differences between interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta. **J. Biol. Chem.**, 263: 8473-8479, 1988.
89. HEINTZE, K., STEWART, C.P., FRIZZELL, R.A. Sodium-dependent chloride secretion across rabbit descending colon. **Am. J. Physiol.**,

244: G357-G365, 1983.

90. HIGGS, G.A., VANE, J.R. Inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase. **Br. Med. Bull.**, 39: 265-268, 1983.
91. HINTERLEITNER, T.A., BERSCHNEIDER, H.M., POWELL, D.W. Fibroblast-mediated Cl<sup>-</sup> secretion by T84 cells is amplified by interleukin-1 $\beta$ . **Gastroenterology**, 100: A690, 1991.
92. HINTERLEITNER, T.A., POWELL, D.W. Immune system control of intestinal ion transport. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 197: 249-260, 1991.
93. HINTERLEITNER, T.A., SAADA, J.I., BERSCHNEIDER, H.M., POWELL, D.W., VALENTICH, J.D. IL-1 stimulates intestinal myofibroblast COX gene expression and augments activation of Cl<sup>-</sup> secretion in T84 cells. **Am. J. Physiol.**, 271: C1262-C1268, 1996.
94. HINTERLEITNER, T.A., VALENTICH, J.D., CHA, J.H., WILL, P., WELTON, A., POWELL, D.W. Platelet-activating factor contributes to immune cell and oxidant-mediated intestinal secretion. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 281: 1264-1271, 1997.
95. HO, M., YANG, D., WYLE, F.A., MULLIGAN, M.E. Increase incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea following decrease restriction

of antibiotic use. **Clin. Infect. Dis.**, S102-106, 1996.

96. HOFMANN, F., BUSCH, C., PREPENS, U., JUST, I., AKTORIES, K. Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. **J. Biol. Chem.**, 272: 11074-11078, 1997.
97. HYAMS, J.S., FITZGERALD, J.E., TREEM, W.R., WYZGA, N., KREUTZER, D.L. Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 104:1285-1292, 1993.
98. ISAACS, K.L., SARTOR, R.B, HASKILL, J.S. Cytokine mRNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by PCR amplification. **Gastroenterology**, 103:1587-1595, 1992.
99. JOHNSTON Jr., R.B. Monocytes and macrophages. **New Eng. J. Med.**, 318: 747-752, 1988.
100. JUST, I., FRITZ, G., AKTORIES, K., GIRY, M., POPOFF, M.R., BOQUET, P., HEGENBARTH, S., VON EICHEL-STREIBER, C. *Clostridium difficile* toxin B acts on the GTP-binding protein Rho. **J. Biol. Chem.**, 269:10706-107012, 1994.
101. JUST, I., SELZER, J., VON EICHEL-STREIBER, C., AKTORIES, k. The



low molecular mass GTP-binding protein Rho is affected by toxin A from *Clostridium difficile*. **J. Clin. Invest.**, 95: 1026-1031, 1995.

102. KANDIL, H., BERSCHNEIDER, H., ARGENZIO, A. TNF- $\alpha$  alters intestinal ion transport through a paracrine mechanism involving prostaglandins. **Gastroenterology**, 102: A217, 1992.
103. KARAYALCIN, S.S., STURBAUM, C.W., WACHSMAN, J.T., CHA, J., POWELL, D.W. Hydrogen peroxide Stimulates rat colonic prostaglandin production and alters electrolyte transport. **J. Clin. Invest.**, 886: 60-68, 1990.
104. KATZ, D.A., BATES, D.W., RITTENBERG, E., ONDERDONK, A., SANDS, K., BAREFOOT, L.A., SNYDMAN, D. Predicting *Clostridium difficile* stool cytotoxin results in hospitalized patients with diarrhea. **J. Gen. Intern. Med.**, 12: 57-62, 1997.
105. KAZMIEROWSKI, J.A., GALLIN, J.I., REYNOLDS, H.Y. Mechanism for the inflammatory response in primate lungs. Demonstration and partial characterization of an alveolar macrophage - derived factor with preferential activity for polymorphonuclear leukocytes. **J. Clin. Invest.**, 59: 273-281, 1977.
106. KELLY, C.P., BECKER, S., LINEVSKY, J.K., JOSHI, M.A., O'KEANE, J.C., DICKEY, B.F., LAMONT, J.T., POTHOUKAKIS, C. Neutrophil

recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. **J. Clin. Invest.**, 93: 1257-1265, 1994.

107. KELLY, C.P., POTHOUKAKIS, C., LAMONT, J.T. *Clostridium difficile* colitis. **New Eng. J. Med.**, 330: 257-262, 1994.
108. KIMBERG, D.V., FIELD, M., JOHNSON, J., HENDERSON, A., GERSHON, E. Stimulation of intestinal mucosal adenylate cyclase by cholera toxin and prostaglandins. **J. Clin. Invest.**, 50: 1218-1230, 1971.
109. KUSAGAMI, K., KUROIWA, A., HARUTA, J. Interleukin-6 activities in lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis. **Gastroenterology**, 100:A591, 1991.
110. LACASSE, C., ROLA-PLESZCZYNSKI, M. Immune regulation by platelet-activating factor: II. Mediation of suppression by cytokine-stimulated endothelial cells *in vitro*. **J. Leukoc Biol.**, 49: 245-252, 1991.
111. LASKIN, D.L., PENDINO, K.J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 35: 655-677, 1995.
112. LeFEVRE, M.E., HAMMER, R., JOEL, D.D. Macrophages of the mammalian small intestine: A review. **J. Reticuloendothel. Soc.**, 26: 553-573, 1979.

113. LeMAY, L.G., VANDER, A.J., KLUGER, M.J. The effects of pentoxifylline on lipopolysaccharide (LPS) fever, plasma interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor (TNF) in the rat. **Cytokine**, 2: 300-306, 1990.
114. LIMA, A.A.M. Cholera: molecular epidemiology, pathogenesis, immunology, treatment and prevention. **Curr. Op. Infect. Dis.**, 7: 592-601, 1994.
115. LIMA, A.A.M., INNES, D.J., CHADEE, K., LYERLY, D.M., WILKINS, T.D., GUERRANT, R.L. *Clostridium difficile* toxin A interactions with mucus and early sequential histopathologic effects in rabbit small intestine. **Laborat. Investig.**, 61: 419-425, 1989.
116. LIMA, A.A.M., LIMA, N.L. Epidemiology, therapy and prevention of infection with *Shigella* organisms and *Clostridium difficile*. **Curr. Op. Infect. Dis.**, 6: 63-71, 1993.
117. LIMA, A.A.M., LYERLY, D.M., WILKINS, T.D., INNES, D.J., GUERRANT, R.L. Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine *in vivo* and on cultured cells *in vitro*. **Infect. Immun.**, 56: 582-588, 1988.
118. LINEVSKY, J., BECKER, S., POTHOUKAKIS, C., HOLDRIDGE, M.,

THEOHARIDES, T.C., LaMONT, J.T. *Clostridium difficile* toxin A stimulates release of mast cell mediators in rabbit ileal loops. **Gastroenterology**, 98: A459, 1990.

119. LYERLY, D.M., KRIVAN, H.C., WILKINS, T.D. *Clostridium difficile*: Its Disease and Toxins. **Clin. Microbiol. Rev.**, 1: 1-18, 1988.
120. LYERLY, D.M., LOCKWOOD, D.E., RICHARDSON, S.H., WILKINS, T.D. Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. **Infect Immun.**, 35: 1147-1150, 1982.
121. LYERLY, D.M., PHELPS, C.J., TOTH, J., WILKINS, D. Characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile* with monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, 54: 70-76, 1986.
122. LYERLY, D.M., SAUM, K.E., MacDONAD, D.K., WILKINS, T.D. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. **Infect. Immun.**, 47: 349-352, 1985.
123. MAHIDA, Y.R., MAKH, S., HYDE, S., GRAY, T., BORRIELLO, S.P. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: Induction of interleukin-8 production and apoptosis after cell detachment. **Gut**, 38: 337-347, 1996.
124. MANTYH, C.R., PAPPAS, T.N., LAPP, J.A., WASHINGTON, M.K.,

- NEVILLE, L.M., GHILARDI, J.R., ROGERS, S.D., MANTYH, P.W., VIGNA, S.R. Substance P activation of enteric neurons in response to intraluminal *Clostridium difficile* toxin A in the rat ileum. **Gastroenterology**, 111: 1272-1280, 1996.
125. McCAIN, R.W., DESSYPRIS, E.N., CHRISTMAN, J.W. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates human polymorphonuclear leukocytes to produce interleukin-8 *in vitro*. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, 8: 28-34, 1993.
126. McFARLAND, L.V., MULLIGAN, M.E., KWOK, R.Y.Y., STAMM, W.E. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. **N. Engl. Med.**, 320: 204-210, 1989.
127. McKAY, D. M., PERDUE, M. H. Intestinal epithelial function: The case for immunophysiological regulation. Cells and mediators. **Dig. Dis. Sci.**, 38: 1377-1387, 1993.
128. MEENAM, J., GROOL, T.A., HOMMES, DW., DIJKHUIZEN, S., TEN KATE, F.J., WOOD, M., WHITTAKER, M., TYTGAT, G.N., VAN DEVENTER, S.J. Lexipafant (BB-882), a platelet activating factor receptor antagonist, ameliorates mucosal inflammation in an animal model of colitis. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, 8: 569-573, 1996.
129. MELO FILHO, A.A., SOUZA, M.H.L.P., LYERLY, D.M., CUNHA, F.Q.,

- LIMA, A.A.M., RIBEIRO, R.A. Role of tumor necrosis factor and nitric oxide in the cytotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B on macrophages. **Toxicon**, 35: 743-752, 1997.
130. MÉNARD, L., PILOTE, S., NACCACHE, P.H., LAVIOLETTE, M., BERGEAT, P. Inhibitory effects of MK-886 on arachidonic acid metabolism in human phagocytes. **Br. J. Pharmacol.**, 100: 15-20, 1990.
131. MILLER, C. Genetic manipulation of ion channels: A new approach to structure and mechanism. **Neuron**, 2: 1195-1205, 1989.
132. MILLER, P.D., POTHOUKAKIS, C., BAEKER, T.R., LAMONT, J.T., ROTHSTEIN, T.L. Macrophage - dependent stimulation of T cell - depleted spleen cells by *Clostridium difficile* toxin A and calcium ionophore 1. **Cell. Immunol.**, 126: 153-163, 1990.
133. MOREIRA, A.L., SAMPAIO, E.P., ZMUIDZINAS, A., FRINDT, P., SMITH, K.A., KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor  $\alpha$  by enhancing mRNA degradation. **J. Exp. Med.**, 177: 1675-1680, 1993.
134. MORTEAU, O., PONS, L., BUENO, L. Platelet-activating factor and interleukin-1 are involved in colonic dysmotility in experimental colitis in rats. **Gastroenterology**, 104: 47-56, 1993.

135. MUSCH, M.W., FIELD, M., MILLER, R.J., STAFF, J.S. Homologous desensitisation of prostaglandins in rabbit ileum. **Am. J. Physiol.**, 252: G120-G127, 1987.
136. NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, 79: 319-326, 1987.
137. NOEL, P., NELSON, S., BOKULIC, R., BAGBY, G., LIPPTON, H., LIPSCOMB, G., SUMMER, W. Pentoxifylline inhibits lipopolysaccharide-induced serum tumor necrosis factor and mortality. **Life Sci.**, 47: 1023-1029, 1990.
138. NORTH, R.J. The concept of the activated macrophage. **J. Immunol.**, 121: 806-809, 1978.
139. O'GRADY, S.M; PALFREY, H.C; FIELD, M. Characteristics and functions of the Na- K-Cl cotransporter in epithelial tissues. **Am. J. Physiol.**, 253: 177-192, 1987.
140. OGLE, C.K., WU, JUN-ZHEN., MAO, X., SZCZUR, K., ALEXANDER, J.W., OGLE., J.D. Heterogeneity of kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for the production of TNF , IL-1, and IL-6. **Inflammation**, 18: 511-523, 1994.

141. OHH, M., TAKEI, F. Regulation of ICAM-1 mRNA stability by cycloheximide: role of serine/threonine phosphorylation and protein synthesis. **J. Cell Biochem.**, 59: 202-13, 1995.
142. OTAMIRI, T. Quinacrine prevention of intestinal ischaemic mucosal damage is partly mediated through inhibition of intraluminal phospholipase A<sub>2</sub>. **Agents Actions**, 25: 378-384, 1988.
143. PERDUE, M. H., McKAY, M.M. Integrative immunophysiology in the intestinal mucosa. **Am. J. Physiol.**, 267: G151-G165, 1994.
144. PIZZA, M., COVACCI, A., BARTOLONI, A., PERUGINE, M., NENCIONE, L., DE MAGISTRIS, M.T., VILLA, L., NUCCI, D., MANETTI, R., BUGNOLI, M., GIOVANNONI, F., ROBERTO, O., BARBIERI, J.T., SATO, H., RAPPUOLI, R. Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. **Science**. 246: 497-500, 1989.
145. POTHOUKAKIS, C. Pathogenesis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, 8: 1041-1047, 1996.
146. POTHOUKAKIS, C., CASTAGLIULO, I., LaMONT, J.T., JAFFER, A., O'KEANE, J.C., SNIDER, R.M., LEEMAN, S.E. CP-96,345, a substance P antagonist, inhibits rat intestinal responses to *Clostridium difficile* toxin A but not cholera toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 91: 947-951, 1994.



147. POTHOUKAKIS, C., KARMELI, F., KELLY, C.P., ELIAKIM, R., JOSHI, M.A., O'KEANE, C.J., CASTAGLIULO, I., LaMONT, J.T., RACHMILEWITZ, D. Ketotifen inhibits *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in rat ileum. **Gastroenterology**, 105: 701-707, 1993.
148. POTHOUKAKIS, C., LaMONT, J.T. *Clostridium difficile* colitis and diarrhea. **Gastr. Clin. N. Am.**, 22: 623- 637, 1993.
149. POTHOUKAKIS, C., LaMONT, J.T., EGLOW, R., GAO, N., RUBINS, J.B., THEOHARIDES, T.C., DICKEY, B.F. Characterization of rabbit ileal receptors for *Clostridium difficile* toxin A: Evidence for a receptor-coupled G protein. **J. Clin. Invest.**, 88: 119-125, 1991.
150. POUHELLE, P.E., GINGRAS, D., DEMERS, C., DUBOIS, C., HARBOUR, D., GRASSI, J., ROLA-PLESZCZYNSKI, M. Platelet-activating factor (PAF-acether) enhances the concomitant production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 by subsets of human monocytes. **Immunology**, 72: 181-187, 1991.
151. POWELL, D. W. Epithelial secretory responses to inflammation: Platelet Activating Factor and Reactive Oxygen Metabolites. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 664: 232-247, 1992.
152. QIU, B., POTHOUKAKIS, C., CASTAGLIULO, I., NIKULASSON, Z.,

LaMONT, J.T. Nitric oxide inhibits rat intestinal secretion by *Clostridium difficile* toxin A but not *Vibrio cholerae* enterotoxin. **Gastroenterology**, 111: 409-418, 1996.

153. RACUSEN, L.C., BINDER, H.J. Effect of prostaglandins on ion transport across isolated colonic epithelium. **Dig. Dis. Sci.**, 25:900-904, 1980.
154. RACUSEN, L.C., BINDER, H.J. Effect of prostaglandins on ion transport across isolated colonic epithelium. **Dig. Dis. Sci.**, 25:900-904, 1980.
155. REINECKER, H.C., STEFFEN, M., WITTHOEFT, T., PFLUEGER, I., SCHREIBER, S., McDERMOTT, R.P., RAEDLER, A. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. **Clin. Exp. Immunol.**, 94: 174-181, 1993.
156. RIBEIRO, R.A., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of macrophage neutrophil chemotactic factor. **J. Exp. Path.**, 71: 717-725, 1990.
157. RIBEIRO, R.A., FLORES, C.A., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, 73: 472-477, 1991.

158. RIEGLER, M., SEDIVY, R., POTHOUKAKIS, C., HAMILTON, G., ZACHERL, J., BISCHOF, G., COSENTINI, E., FEIL, W., SCHIESSEL, R., LaMONT, J.T., WENZL, E. *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium *in vitro*. **J. Clin. Invest.**, 95: 2004-2011, 1995.
159. ROCHA, M.F.G. **Papel de citocinas e derivados da lipoxigenase, liberados por macrófagos, na infiltração neutrofílica induzida pelas toxinas A e B do *Clostridium difficile***. Fortaleza, 1994. Tese (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 1994.
160. ROCHA, M.F.G., MAIA, M.E.T., BEZERRA, L.R.P.S, LYERLY, D.M., GUERRANT, R.L., RIBEIRO, R.A., LIMA, A.A.M. *Clostridium difficile* toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: Role of Interleukin-1 $\beta$ , Tumor Necrosis Factor Alpha, and leukotrienes. **Infect. Immun.**, 65: 2740-2746, 1997.
161. SACK, R.B., RAHMAN, M., YUNUS, M., KHAN, E.H. Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease. **Clin. Infect. Dis.**, 24:(Suppl 1) S102-S105, 1997.
162. SAMORE, M.H., VENKATARAMAN, L., DeGIROLAMI, P.C., ARBEIT, R.D., KARCHMER, A.W. Clinical and molecular epidemiology of

sporadic and clustered cases of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. **Am. J. Med.**, 100: 32-40, 1996.

163. SAMPAIO, E.P., KAPLAN, G., MIRANDA, A., NERY, J.A., MIGUEL, C.P., VIANA, S.M., SARNO, E.N. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. **J. Infect. Dis.**, 168: 408-414, 1993.
164. SAMPAIO, E.P., SARNO, E.N., GALILLY, R., COHN, Z.A., KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$  production by stimulated human monocytes. **J. Exp. Med.**, 173: 699-703, 1991.
165. SANTOS-NETO, M.S., SILVA, A.C., ROCHA, M.F.G., RIBEIRO, R.A., LIMA, A.A.M. O sobrenadante de macrófagos estimulados com a toxina A do *Clostridium difficile* reduz a absorção de água e eletrólitos no modelo *in vivo* de perfusão intestinal de rato. **FESBE**, A12.079, p. 203, 1996.
166. SARTOR, R. B. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology**, 106:533-539, 1994.
167. SARTOR, R. B., CHAPMAN, E. J., SCHWAB, J.H. Increased interleukin- $1\beta$  concentrations in resected inflammatory bowel disease (IBD) tissue. **Gastroenterology**, 94: A399, 1988.

168. SCHADE, U.F. Pentoxifylline increases survival in murine endotoxin shock and decreases formation of tumor necrosis factor. **Circ. Shock.**, 31: 171-181, 1990.
169. SCHANDENÉ, L., VANDENBUSSCHE, P., CRUSIAUX, A., ALÈGRE, M.L., ABRAMOWICZ, D., DUPONT, E., CONTENT, J., GOLDMAN, M. Differential effects of pentoxifylline on the production of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) by monocytes and T cells. **Immunology**, 76: 30-34, 1992.
170. SCHMIDT, M., RÜMENAPP, U., BIENEK, C., KELLER, J., VON EICHEL-STREIBER, C., JACOBS, K.H. Inhibition of receptor signaling to phospholipase D by *Clostridium difficile* toxin B. Role of Rho proteins. **J. Biol. Chem.**, 271: 2422-2426, 1996.
171. SCHREIBER, S., RAEDLER, A., STENSON, W. F., MACDERMOTT, R.P. The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. **Gastr. Clin. N. Am.**, 21: 451-502, 1992.
172. SCHULTZ S.G., ZALUSKY, R. Ion transport in isolated rabbit ileum. I. Short-circuit current and sodium fluxes. **J. Gen. Physiol.**, 47: 567-583, 1964.
173. SEARS, C., L., KAPER., J. B. Enteric Bacterial Toxins: Mechanisms of Action and Linkage to Intestinal Secretion. **Microbiol. Rev.**, 60: 167-

215, 1996.

174. SETTLE, C.D. *Clostridium difficile*. **Br. J. Hosp. Med.**, 56: 398: 400, 1996.
175. SETTLE, C.D., WILCOX, M.H. Review article: Antibiotic-induced *Clostridium difficile* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 10: 835-841, 1996.
176. SIRKO, S.P., SCHINDLER, R., DOYLE, M.J., WEISMAN, SM., DINARELLO, C.A. Transcription, translation and secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor: Effects of tebufelone, a dual cyclooxygenase/5-lipoxygenase inhibitor. **Eur. J. Immunol.**, 21: 243-250, 1991.
177. SMITH, P, L., D. P. MONTZKA, G. P. MCCAFFERTY, M. A. WASSERMAN & J. D. FONDACARO. Effect of sulfidopeptide leukotrienes D4 and E4 on ileal ion transport *in vitro* in the rat and rabbit. **Am. J. Physiol.**, 255: G175-G183, 1988.
178. SMITH, P. L., D. C. CHIOSSONE & G. P. MCCAFFERTY. Characterization of LTC4 effects on rabbit ileal mucosa *in vitro* **Arch. Pharmacol.**, 341: 94-100, 1990.
179. SMITH, P.L. Effects of the neuroimmune mediators, peptidoleukotrienes,

- endothelin, and interleukin-1 on intestinal ion transport. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 664: 260-274, 1992.
180. SMITH, P.L., BLUMBERG, J.B., STOFF, J.S., FIELD, M. Antisecretory effects of indomethacin on rabbit ileal mucosa *in vitro*. **Gastroenterology**: 80: 356-365, 1981.
181. SNYDER, F. Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. **Am. J. Physiol.**, 259: C697-C708, 1990.
182. SOARES, A.M., FREIRE, J.E.Jr., LIMA, A.A.M. Transport of glutamine, alanine and glucose by rabbit intestinal membrane. **Br. J. Med. Biol. Res.**, 24: 111-113, 1991.
183. SOUZA, G.E.P., CUNHA, F.Q., MELLO, R., FERREIRA, S.H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions**, 24: 377-380, 1988.
184. SOUZA, G.E.P., FERREIRA, S.H. Blockade by anti-macrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, 17: 97-103, 1985.
185. SOUZA, M. H. L. P., MELO-FILHO, A.A, ROCHA, M.F.G., LYERLY, D.M., CUNHA, F.Q., LIMA, A.A.M., RIBEIRO, R.A. The

involvement of macrophage-derived tumor necrosis factor and lipoxygenase products on the neutrophil recruitment induced by *Clostridium difficile* toxin B. **Immunology**, 91: 281-288, 1997.

186. STACK, W A, KEELY, S J, O'DONOGHUE, D P, BAIRD, A W. Immune regulation of human colonic electrolyte tranporte *in vitro*. **Gut**, 36: 395-400, 1995.
187. STACK, W.A., KEELY, S.J., O'DONOGHUE, D.P., BAIRD, A.W. Immune regulation of human colonic eletrolyte transport in vitro. **Gut**, 36: 395-400, 1995.
188. STARR, J.M., ROGERS, T.R., IMPALLOMENI, M. Hospital-acquired *Clostridium difficile* diarrhoea and herd immunity. **Lancet**, 349: 426-428, 1997.
189. STEAD, R. H., TOMIOKA, M., QUINONEZ, G., SIMON, G.T., FELTEN, S.Y., BIENENSTOCK, J. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 84: 2975-2979, 1987.
190. STRUHAR, D., KIVITY, S., TOPILSKY, M. Quinacrine inhibits oxygen radicals release from human alveolar macrophages. **Int. J. Immunopharmacol.**, 14: 275-277, 1992.



191. SULLIVAN, N.M., PELLET, S., WILKINS, T.D. Purification of toxins A and B of *Clostridium difficile*. **Infect. Immun.**, 35: 1032-1040, 1982.
192. SWARTZBERG, J.E., MARESCA, R.M., REMINGTON, J.S. Clinical study of gastrointestinal complications associated with clindamycin therapy. **J. Infect. Dis.**, 135: S99-S103, 1977.
193. TAKEMURA, R., WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am. J. Physiol.**, 246: C1-C9, 1984.
194. TAMAI, H., GAGINELLA, T.S., KACHUR, J.F., MUSCH, M.W., CHANG, E.B. Ca-mediated stimulation of Cl secretion by reactive oxygen metabolites in human colonic T84 cells. **J. Clin Invest.**, 89: 301-307, 1992.
195. TAYLOR, N.S., THORNE, G.M., BARTLETT, J.G. Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. **Infect. Immun.**, 34: 1036 - 1043, 1981.
196. TEDESCO, F.J. Clindamycin - associated colitis. Review of the clinical spectrum of 47 cases. **Digest. Dis.**, 21: 26 - 32, 1976.
197. TEDESCO, F.J., BARTON, R.W., ALPERS, D.H. Clindamycin-associated colitis: A prospective study. **Ann. Inter. Med.**, 81: 429 - 433, 1974.

198. THEODOROU, V., EUTAMENE, H., FIORAMONTI, J., JUNIEN, J.L., BUENO, L. Interleukin 1 induces a neurally mediated colonic secretion in rats: Involvement of mast cells and prostaglandins. **Gastroenterology**, 106: 1493-1500, 1994.
199. THEODOROU, V., FIORAMONTI, J., BUENO, L. Integrative neuroimmunology of the digestive tract. **Vet. Res.**, 27: 427-442, 1996.
200. THORNBERRY, N.A., BULL, H.G., CALAYCAY, J.R., CHAPMAN, K.T., HOWARD, A.D., KOSTURA, M.J., MILLER, D.K., MOLINEAUX, S.M., WEIDNER, J.R., AUNINS, J. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. **Nature**, 356: 768-774, 1992.
201. TILG, H., EIBL, B., PICHL, M., GÄCHTER, A., HEROLD, M., BRANKOVA, J., HUBER, C., NIEDERWIESER, D. Immune response modulation by pentoxifylline *in vitro*. **Transplantation**, 56: 196-201, 1993.
202. TOMAI, H., GAGINELLA, T.S., KACHUR, J.F., MUSCH, M.W., CHANG, E.B. Mechanisms of inflammatory diarrhea. **Gastroenterology**, 103: 710-11, 1992.
203. TOWBIN, H., SCHMITZ, A., VANOOSTRUM, J., SEITZ, M., DEWALD, B., ZINGEL, O., MOTZ, J., VOSBECK, K., RORDORF, C.

- Monoclonal antibody based enzyme-linked and chemiluminescent assays for the human interleukin-1 receptor antagonist. Application to measure hIL-1ra levels in monocyte cultures and synovial fluids. **J. Immunol. Methods**, 170: 125-135, 1994.
204. TRIADAFILOPOULOS, G., POTHOUKAKIS, C., LaMONT, J.T. In vivo production of leukotriene B<sub>4</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> in experimental *C. difficile* colitis. **Am. J. Gastroent.**, 82: A950, 1987.
205. TRIADAFILOPOULOS, G., POTHOUKAKIS, C., WEISS, R., GIAMPAOLO, C., LaMONT, J.T. Comparative Study of *Clostridium difficile* toxin A and cholera toxin in rabbit ileum. **Gastroenterology**, 97: 1186-1192, 1989.
206. UNANUE, E.R., ALLEN, P.M. The basis for the immunoregulatory: Role of macrophages and other accessory cells. **Science**, 236: 551-557, 1987.
207. ÜSSING, H.H., ZERAHN, K. Active transport of sodium as the source of electrical current in the short circuited frog skin. **Acta Physiol. Scan.**, 23: 110-117, 1951.
208. VAN FURTH, R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. **Cur. Top. Pathol.**, 79: 125, 1988.
209. WIEBKE, J.L., QUINLAN, W.M., GRAHAM, L., DOERSCHUK, C.M.

Effect of protein synthesis inhibition by cycloheximide on lymphocyte circulation. **Lab. Invest.**, 70: 392-398, 1994.

210. WILCKENS, T., De RIJK, R. Glucocorticoids and immune function: Unknown dimensions and new frontiers. **Immun. Today**, 18: 418-423, 1997.
211. YOUNGMAN, K.R., SIMON, P.L., WEST, G.A., COMINELLI, F., RACHMILEWITZ, D., KLEIN, J.S., FIOCCHI, C. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. **Gastroenterology**, 104:749-758, 1993.
212. ZIMMERMAN, T.W., BINDER, H.J. Effect of tetrodotoxin on cholinergic agonist-mediated colonic electrolyte transport. **Am. J. Physiol.**, 244: 386-391, 1983.