



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

EFEITOS DA TOXINA A DO *Clostridium difficile* NA ATIVIDADE CONTRÁTIL DO
MÚSCULO LISO INTESTINAL DE COELHO

CRYSTIANNE CALADO LIMA

Fortaleza-CE

2003



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

EFEITOS DA TOXINA A DO *Clostridium difficile* NA ATIVIDADE CONTRÁTIL DO
MÚSCULO LISO INTESTINAL DE COELHO

CRYSTIANNE CALADO LIMA

Tese submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Orientador: Dr. José Henrique Leal Cardoso

Fortaleza-CE

2003

6-5-03
L. G. S. S.
2003

1

1000

L697e Lima, Crystianne Calado

Efeitos da toxina A do *Clostridium difficile* na atividade contrátil do músculo liso intestinal de coelho. / Crystianne Calado Lima. – Fortaleza, 2003.

211f. : il.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-graduação em Farmacologia.

1. Antiinflamatórios. 2. *Clostridium difficile*. 3. Contração muscular. 4. Ileus. 5. Músculo liso. I- Título.

CDD 615.73

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia outorgada pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central do Centro de Ciências da Saúde desta Instituição.

Crystianne Calado Lima

Data da Defesa: 08 /05/2003

Banca Examinadora:

José Henrique Leal-Cardoso (Orientador)
Prof. Titular da UECE

Aldo Angelo Moreira Lima (Co-orientador)
Prof. Titular da UFC

Armênio Aguiar dos Santos
Prof. Adjunto da UFC

Rosalvo Tadeu Hochmüller Fogaça
Prof. Adjunto da UFPR

Gloria Isolina Boente Pinto Duarte
Profa. Adjunta da UFPE

“Sou do tamanho daquilo que vejo,
Não do tamanho que me vê”

Você não sabe o quanto eu caminhei/
Pra chegar até aqui/
Percorri milhas e milhas antes de dormir/
Eu não cochilei/
Os mais belos montes escalei/
Nas noites escuras de frio chorei...

A vida ensina e o tempo traz o tom/
Pra nascer uma canção/
Com a fé no dia-a-dia/
Encontrar solução...

Meu caminho só meu Pai/
Pode mudar.

**A Estrada
Cidade Negra**

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua real presença em meu viver. Autor da fé do princípio ao fim de todos os momentos.

A minha família, meu canto de paz no mundo, meu aconchego da morada, fonte de descanso e renovação das minhas energias. Cujas doação e dedicação inexplicável fazem-me questionar se teria conseguido sem seu amor incondicional.

A João Luis Carvalho de Souza, cuja capacidade de servir é diretamente proporcional a grandeza de seu coração. Que nada teria sentido nesse momento se não reconhecesse a importância daquele que teimou em ser leal e dedicado, e cuja doação no sentido mais nobre do amor, o torna fundamental para a validade dos méritos desta conquista.

Ao Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso, mestre incondicional que me guia na segurança do aprender, mostrando quem sou hoje e quem posso ser amanhã.

Aos alunos Ingrid Gruber, Alisson Alves e Márcio Stênio Lemos que ficarão para sempre marcados em minhas lembranças, que nem o tempo, nem a distância possam desmanchar os valores aprendidos.

As Profas. Dras. Aline Alice Cavalcante Albuquerque e Andreлина Noronha Coelho de Souza que me ensinam a ser mulher guerreira, multitarefa, multifaceta, multi-acaso, multicorção.

Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima pelas lições de saber, pela co-orientação e por auxiliar a trilhar esse caminho.

Aos Profs. Drs. Rosalvo Tadeu Hochmüller Fogaça, Armênio Aguiar dos Santos e Gloria Isolina Boente Pinto Duarte pelas suas indispensáveis contribuições.

A Antônio Teles de Menezes pela vontade de repartir conhecimentos e não retê-los no egoísmo material da posse.

Aos amigos e colegas cuja convivência foi um aprendizado dado pelas diferenças e semelhanças.

Aos funcionários Silvia, Áurea, Jussie e Pedro Militão por dirimir os mais diversos problemas e duvidas tornando meu trabalho menos árduo.

Aos animais instrumento do meu trabalho, que me ensinaram que todos nós somos cobaias no laboratório de Deus.

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Ações Inflamatórias e Secretomotoras da Toxina A do <i>Clostridium difficile</i>	29
Figura 2	Patogênese da Diarréia Inflamatória causada pela Toxina A do <i>Clostridium difficile</i>	31
Figura 3	Estrutura da toxina A do <i>Clostridium difficile</i>	35
Figura 4	<i>Croton zehntneri</i> Pax et Hoff. (Euphorbiaceae) tipo anetol.....	41
Figura 5	Protocolo experimental.....	62
Figura 6	Sistema de contração.....	63
Figura 7	Sistema de contração com estimulação elétrica.....	65
Figura 8	Efeito do manuseio cirúrgico experimental na atividade contrátil do músculo liso intestinal.....	69
Figura 9	Efeito do manuseio cirúrgico experimental nas amplitudes médias das respostas máximas aos agonistas.....	70
Figura 10	Alteração da contratilidade intestinal induzida em 2 h de exposição à TxA.....	75
Figura 11	Alteração da contratilidade intestinal induzida em 6 h de exposição à TxA.....	76
Figura 12	Alteração da contratilidade intestinal induzida em 18 h de exposição à TxA.....	77
Figura 13	Alteração das movimentações espontâneas no curso temporal dos efeitos induzidos pela TxA.....	78
Figura 14A	Alteração das amplitudes médias das respostas máximas ao K ⁺ no curso temporal da TxA.....	79

	Pág.
Figura 14B	Alteração das amplitudes médias das respostas máximas a ACh no curso temporal da TxA..... 80
Figura 15	Atividade da dexametasona nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA..... 85
Figura 16	Atividade da dexametasona nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA..... 86
Figura 17A	Amplitudes médias das respostas máximas ao K ⁺ dos segmentos intestinais pré-tratados com dexametasona e expostos ao PBS ou a TxA..... 87
Figura 17B	Amplitudes médias das respostas máximas a ACh dos segmentos intestinais pré-tratados com dexametasona e expostos ao PBS ou a TxA..... 88
Figura 18	Atividade da quinacrina nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA..... 93
Figura 19	Atividade da quinacrina nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA..... 94
Figura 20A	Amplitudes médias das respostas máximas ao K ⁺ dos segmentos intestinais pré-tratados com quinacrina e expostos ao PBS ou a TxA..... 95
Figura 20B	Amplitudes médias das respostas máximas a ACh dos segmentos intestinais pré-tratados com quinacrina e expostos ao PBS ou a TxA..... 96
Figura 21	Atividade da indometacina nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA..... 104

		Pág.
Figura 22	Atividade da indometacina nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA.....	105
Figura 23	Atividade da celecoxibe nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA.....	106
Figura 24	Atividade da celecoxibe nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA.....	107
Figura 25	Atividade da montelucaste sódico nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA.....	108
Figura 26	Atividade da montelucaste sódico nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA.....	109
Figura 27A	Amplitudes médias das respostas máximas ao K ⁺ dos segmentos intestinais pré-tratados com bloqueadores dos derivados do ác. araquidônico e expostos ao PBS ou a TxA.....	110
Figura 27B	Amplitudes médias das respostas máximas a ACh dos segmentos intestinais pré-tratados com bloqueadores do ác. araquidônico e expostos ao PBS ou a TxA.....	111
Figura 28A	Amplitudes médias das respostas máximas ao K ⁺ dos segmentos intestinais pré-tratados com derivados do ác. araquidônico e expostos ao PBS ou a TxA.....	112
Figura 28B	Amplitudes médias das respostas máximas a ACh dos segmentos intestinais pré-tratados com bloqueadores do ác. araquidônico e expostos ao PBS ou a TxA.....	113

		Pág.
Figura 29	Atividade da talidomida nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA.....	120
Figura 30	Atividade da talidomida nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA.....	121
Figura 31	Atividade da quinacrina nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA.....	122
Figura 32	Atividade da quinacrina nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA.....	123
Figura 33A	Amplitudes médias das respostas máximas ao K^+ dos segmentos intestinais pré-tratados com bloqueadores da síntese de TNF- α e expostos ao PBS ou a TxA.....	124
Figura 33B	Amplitudes médias das respostas máximas a ACh dos segmentos intestinais pré-tratados com bloqueadores da síntese de TNF- α e expostos ao PBS ou a TxA.....	125
Figura 34	Atividade do OECz 1 mg/kg nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição a TxA.....	129
Figura 35	Atividade do OECz 1 mg/kg nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição a TxA.....	130
Figura 36	Atividade do OECz 30 mg/kg nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição a TxA.....	134
Figura 37	Atividade do OECz 30 mg/kg nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição a TxA.....	135

	Pág.
Figura 38A	Amplitudes médias das respostas máximas ao K^+ dos segmentos intestinais pré-tratados com OECz e expostos ao PBS ou a TxA..... 136
Figura 38B	Amplitudes médias das respostas máximas a ACh dos segmentos intestinais pré-tratados com OECz e expostos ao PBS ou a TxA..... 137
Figura 39	Atividade do hexametônio nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA..... 141
Figura 40	Atividade do hexametônio nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA..... 142
Figura 41A	Amplitudes médias das respostas máximas ao K^+ dos segmentos intestinais pré-tratados com hexametônio e expostos ao PBS ou a TxA..... 143
Figura 41B	Amplitudes médias das respostas máximas a ACh dos segmentos intestinais pré-tratados com hexametônio e expostos ao PBS ou a TxA..... 144
Figura 42	Efeito do hexametônio nas contrações induzidas por estimulação elétrica direta em segmentos expostos por 6 h ao PBS ou a TxA..... 148
Figura 43	Alteração da contratilidade do músculo circular intestinal induzida em 6 h de exposição à TxA..... 150
Figura 44	Amplitudes médias das respostas máximas ao K^+ e a ACh em músculo circular intestinal expostos ao PBS ou a TxA por 6 h..... 151

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Movimentação espontânea dos grupos controles.....	71
Tabela 2	Amplitudes máximas dos grupos controles e não tratados.....	81
Tabela 3	Médias das EC ₅₀ dos grupos controles.....	81
Tabela 4	Médias das EC ₅₀ dos grupos não tratados.....	81
Tabela 5	Médias das EC ₅₀ dos grupos tratados com dexametasona.....	89
Tabela 6	Médias das EC ₅₀ dos grupos tratados com quinacrina.....	97
Tabela 7	Médias das EC ₅₀ dos grupos tratados com indometacina.....	114
Tabela 8	Médias das EC ₅₀ dos grupos tratados com celecoxibe.....	114
Tabela 9	Médias das EC ₅₀ dos grupos tratados com montelucaste sódico.....	115
Tabela 10	Médias das EC ₅₀ dos grupos tratados com talidomida.....	126
Tabela 11	Médias das EC ₅₀ dos grupos tratados com pentoxifilina.....	126
Tabela 12	Médias das EC ₅₀ dos grupos tratados com o óleo essencial do <i>Croton zehntneri</i> 1mg/kg.....	131
Tabela 13	Médias das EC ₅₀ dos grupos tratados com o óleo essencial do <i>Croton zehntneri</i> 30mg/kg.....	138
Tabela 14	Médias das EC ₅₀ dos grupos tratados com hexametônio.....	145
Tabela 15	Movimentação espontânea do músculo circular....	152
Tabela 16	Amplitudes máximas do músculo circular.....	152
Tabela 17	Médias das EC ₅₀ do músculo circular.....	152

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
AA	Ácido Araquidônico
ACh	Acetilcolina
AMPc	Adenosinamonofosfatoíclico
AP-1	Fator de transcrição envolvido na carcinogênese
ATP	Adenosina trifosfato
cADPR	Difosforibose adenosina ciclase
CCFA	Agar contendo frutose, cefoxitina e cicloserina
CEL	Celecoxibe
CICR	Liberação de cálcio induzida pelo cálcio
CL-6B	Cromatografia de imunoafinidade
COX	Cicloxygenase
COX-2	Cicloxygenase induzível
DAG	Diacylglicerol
DEAE-sefarose	Cromatografia de troca iônica em coluna de dietilaminoetil sefarose
DEX	Dexametasona
DRG	Gânglio da raiz dorsal
EC ₅₀	Concentração efetiva capaz de causar 50% do efeito máximo
Em	Potencial de membrana
epm	Erro padrão da média
FRDE	Fator relaxante derivado do endotélio
GMPc	Guanina monofosfato
GSH	Glutatione
GST	Glutatione transferase
HA	Histamina
HEX	Hexametônio
ILs	Interleucinas
IND	Indometacina
IP ₃	Trifosfato de inositol

K ⁺	Altas concentrações de potássio
K _{ATP}	Canais de potássio ativados por ATP
K _{Ca}	Canais de potássio ativados por cálcio
LPS	Lipopolissacarídeo
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTs	Leucotrienos
MAPKK ou MEK	Proteína quinase quinase ativada miogenicamente
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófagos
MLC ₂₀	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina
MLCP	Fosfatase de cadeia leve de miosina
MON	Montelucaste
NAD	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato reduzido
NANC	Não colinérgico e não adrenérgico
NE	Noepinefrina
NO	Óxido Nítrico
OECn	Óleo essencial de <i>Croton nepetaefolius</i>
OECz	Óleo essencial de <i>Croton zehntneri</i>
OEMv	Óleo essencial de <i>Mentha villosa</i>
OP	Óxido de piperitenona
PAF	Fator de agregação plaquetária
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
PBS _p	Segmentos de alças intestinais isoladas expostas apenas ao PBS
PBS _{Px}	Segmentos de alças intestinais isoladas expostas apenas ao PBS, onde X representa o tempo de exposição dos segmentos ao PBS.
PBS _{Px,y}	Segmentos de alças intestinais isoladas expostas apenas ao PBS, onde X representa o tempo de exposição dos segmentos ao PBS e Y a substância utilizada para o pré-tratamento do animal.

PBS _T	Em um mesmo animal, segmentos de alças intestinais vizinhas às expostas a TxA, que foram injetadas com PBS.
PBS _{T_X}	Em um mesmo animal, segmentos de alças intestinais vizinhas às expostas a TxA, que foram injetadas com PBS, onde <u>X</u> representa o tempo de exposição dos segmentos ao PBS.
PBS _{T_X,Y}	Em um mesmo animal, segmentos de alças intestinais vizinhas às expostas a TxA, que foram injetadas com PBS, onde <u>X</u> representa o tempo de exposição dos segmentos ao PBS e Y a substância utilizada para o pré-tratamento do animal.
PEN	Pentoxifilina
PGs	Prostaglandinas
PIPS	Potencial inibitório pós-sináptico
PKC	Proteína quinase C
PLC, PLD e PLA ₂	Fosfolipases específicas de fosfatidilcolina
PLC β1 e PLC β3	Fosfolipases específicas de fosfatidilinositol
PMN	Polimorfonucleares
PPI	Proteína fosfatase tipo 1
PRGC	Gene da calcitonina
QUI	Quinacrina
SC	Conjunto de animais que não foram submetidos a cirurgia
SNE	Sistema nervoso entérico
TAL	Talidomida
TEA	Tetraetilamônio
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TxA	Toxina A do <i>Clostridium difficile</i>
TxA _T	Segmentos de alças intestinais isoladas de um animal as quais foram injetadas com TxA
TxA _{T_X}	Segmentos de alças intestinais isoladas de um animal as quais foram injetadas com TxA, onde <u>X</u> representa o tempo de exposição dos segmentos a TxA.

TxA _{Tx,y}	Segmentos de alças intestinais isoladas de um animal as quais foram injetadas com TxA, onde <u>X</u> representa o tempo de exposição dos segmentos a TxA e Y a substância utilizada para o pré-tratamento do animal.
TxB	Toxina B do <i>Clostridium difficile</i>
UDP	Uracildifosfato
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal

RESUMO

Há na literatura uma grande lacuna a respeito dos efeitos da toxina A (TxA) do *Clostridium difficile*, sobre as propriedades mecânicas da musculatura lisa intestinal. Neste estudo foram avaliados os efeitos da TxA sobre as propriedades mecânicas da musculatura lisa intestinal e o mecanismo de ação. Esses efeitos foram avaliados no curso temporal de 2, 6 e 18 h, quando alças intestinais isoladas de coelho foram injetadas com 1 µg/mL/alça de TxA. Como controle interno injetamos PBS em alças isoladas, vizinhas às injetadas com TxA. O efeito do manuseio cirúrgico do protocolo experimental foi avaliado utilizando alças isoladas de coelho injetadas apenas com PBS (controle externo). Alças intestinais de animais sacrificados não submetidos à cirurgia também foram utilizadas. Foram avaliados: a amplitude da movimentação espontânea e as amplitudes das contrações fásicas induzidas por K⁺ (7,5 a 120 mM) e ACh (0,1 a 300 µM). Em relação à movimentação espontânea, apenas no grupo PBS_{P6} observou-se um aumento significativo quando comparado ao grupo SC. A TxA alterou esses parâmetros da contratilidade de maneira bifásica em relação ao curso temporal. Para os grupos TxA_{T18} e PBS_{T18}, houve um escalonamento de efeitos: TxA_{T18} < PBS_{T18} < PBS_{P18}. As diferenças entre TxA_{T18} e PBS_{T18} foram definidas como efeito local (efeito da TxA na alça diretamente exposta) e entre PBS_{T18} e PBS_{P18}, como efeito sistêmico (efeito da TxA induzido nas alças vizinhas àquelas onde ela foi injetada). Dexametasona (2 mg/Kg) promoveu um bloqueio total dos efeitos depressores induzidos pela TxA na contratilidade intestinal, enquanto quinacrina (20 mg/kg) bloqueou apenas parcialmente. Indometacina (2 mg/Kg), Celecoxibe, (20 mg/Kg), Montelukaste sódico (10 mg/Kg), Talidomida (50 mg/kg) e Pentoxifilina (50 mg/kg) promoveram um bloqueio total para o mesmo efeito da TxA. A proteção da contratilidade intestinal contra os efeitos da TxA pelo hexametônio (10 mg/Kg) sugere ser o sistema nervoso entérico e, nele, a transmissão colinérgica nicotínica, uma via importante para os efeitos da TxA na contração muscular. O óleo essencial do *Croton zehntneri* (OECz) foi eficaz, em pequenas doses (comparadas a DL₅₀), em bloquear os efeitos da TxA na contratilidade intestinal. O presente estudo demonstrou que as alterações da contratilidade induzida por 1 µg/ml/alça da TxA do *C. difficile* estão associadas ao processo inflamatório e a alteração da atividade do sistema nervoso entérico em coerência com o fato de células do músculo longitudinal e circular não apresentarem receptor para esta toxina.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*, músculo liso intestinal e contratilidade.

ABSTRACT

The effects of the toxin A (TxA) of the *Clostridium difficile*, on the mechanical properties of the intestinal smooth muscle has been hitherto neglected. In this study the effects of the TxA on the mechanical properties of the intestinal smooth muscle and its underlying mechanisms of action were evaluated. The time course of these effects were evaluated to 2, 6 and 18 h, after rabbit isolated intestinal loops were injected with TxA (1 µg/ml/loop). Isolated loops injected with PBS were used as internal control, whereas their neighboring loops were injected with TxA. Surgical handling-induced effects were evaluated using rabbit isolated loops injected only with PBS (external control). Intestinal loops from sham-operated animals were also used. It was evaluated: amplitude of the spontaneous-, K^+ (7.5 - 120 mM) or ACh-induced (0.1 – 300 µM) phasic contractions. In relation to spontaneous contractions, only PBSP6 group showed a significant increase compared to SC group. The time course of these contractility parameters was altered by TxA in two phases. For TxAT18 and PBST18 groups, there were gradual effects: TxAT18 < PBST18 < PBSP18. The differences between TxAT18 and PBST18 were defined as local effects (effect of the TxA in the directly exposed loop) and between PBST18 and PBSP18, as systemic effects (TxA-induced effects in neighboring loops far from those where it was originally injected). Dexametasone (2 mg/Kg) fully blocked the depressor TxA-induced effects on the intestinal contractility. On the other hand, quinacrine (20 mg/kg)-induced blockade was only partial. Indometacine (2 mg/Kg), celecoxibe, (20 mg/Kg), sodium montelukast (10 mg/Kg), talidomide (50 mg/kg) and pentoxifiline (50 mg/kg) also fully blocked the TxA-induced effects. The hexamethonium (10 mg/Kg)-induced protection of the intestinal contractility against the TxA-induced effects strongly suggests an important enteric nervous system, as well as a cholinergic role in the TxA-induced effects on intestinal smooth muscle. The essential oil of *Croton zehntneri* (OECz) was efficient, in small doses (compared by the LD₅₀), in blocking the TxA-induced effects on intestinal contractility. The present study showed that the TxA (1 µg/ml/loop) of the *C. difficile* induced alterations on intestinal contractility, which were associated to inflammatory processes. Alterations of the enteric nervous system activity are in coherence with the absence of TxA receptors in longitudinal and circular smooth muscle cells.

Key Words: *Clostridium difficile*, ileum smooth muscle and contractility

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO	
1. <i>Clostridium difficile</i>	22
1.1. Marcos históricos.....	22
1.2. Microbiologia.....	23
1.3. Toxinas do <i>C. difficile</i>	24
1.3.1. Atividades Biológicas.....	25
1.3.1.1. Participação de Mediadores inflamatórios.....	26
1.3.1.2. Participação do Sistema Nervoso Entérico.....	28
1.3.1.3. Outras Atividades.....	32
1.3.2. Mecanismo de Ação.....	34
1.3.2.1. Estrutura das Toxinas.....	34
1.3.2.2. Receptor de Ligação e Internalização.....	36
1.3.2.3. Glicosilação das Proteínas Rho.....	37
2. Óleos Essenciais	39
2.1. <i>Croton zehntneri</i> (OECz).....	40
3. Músculo Liso Gastrointestinal	43
3.1. Anatomofisiologia.....	44
3.2. Acoplamento Excitação-Contração.....	47
3.3. Transdução do sinal.....	53
OBJETIVOS	
1. Gerais.....	56
2. Específicos.....	56
MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Preparação da Toxina A.....	58
2. Soluções.....	58
3. Óleo Essencial.....	59
4. Drogas.....	59
5. Animais.....	60
6. Procedimento <i>In Vivo</i>	60

	Pág.
6.1. Modelo de Alça Intestinal.....	60
7. Procedimento <i>In Vitro</i>	61
7.1. Atividade Contrátil.....	61
7.2. Estimulação Elétrica.....	64
8. Análise Estatística.....	66
RESULTADOS	
1. Efeito do manuseio cirúrgico experimental na atividade contrátil do músculo liso intestinal.....	67
2. Curso temporal da alteração da contratilidade intestinal induzida pela toxina A (TxA) do <i>C. difficile</i>	72
3. Participação de mediadores inflamatórios na depressão da contratilidade intestinal induzida pela TxA do <i>C. difficile</i>	82
3.1. Atividade da dexametasona na depressão da contratilidade induzida pela TxA do <i>C. difficile</i>	82
3.2. Efeito de um bloqueador da fosfolipase A ₂ sobre a depressão da contratilidade intestinal induzida pela TxA do <i>C. difficile</i>	90
3.3. Efeito de bloqueadores da ciclo- e da lipoxigenase sobre a depressão da contratilidade intestinal induzida pela TxA do <i>C. difficile</i>	98
3.3.1. Efeito da Indometacina.....	98
3.3.2. Efeito do Celecoxibe.....	99
3.3.3. Efeito do Montelukaste sódico.....	101
3.4. Efeito de bloqueadores de TNF- α e IL-1 sobre a depressão da contratilidade intestinal induzida pela TxA do <i>C. difficile</i>	116
3.4.1. Efeito da Talidomida.....	116
3.4.2. Efeito da Pentoxifilina.....	117

	Pág.
3.5. Efeito de um óleo essencial com propriedades antiinflamatórias na depressão da contratilidade intestinal induzida pela TxA do <i>C. difficile</i>	127
3.5.1. Efeito do OECz 1 mg/Kg.....	127
3.5.2. Efeito do OECz 30 mg/Kg.....	132
4. Participação do sistema nervoso entérico (SNE) no efeito da TxA do <i>C. difficile</i> sobre a contratilidade intestinal.....	139
4.1. Efeito do hexametônio na depressão da contratilidade intestinal induzida pela TxA do <i>C. difficile</i>	139
4.2. Efeito do hexametônio na resposta contrátil ileal à estimulação elétrica seletiva do SNE.....	146
5. Efeito da TxA do <i>C. difficile</i> na contratilidade de tiras circular intestinal.....	149
DISCUSSÃO	
1. Principais Descobertas.....	153
2. Características do Efeito.....	153
3. Mecanismos de Ação.....	155
3.1 O Mecanismo Contrátil Afetado.....	155
3.2 Participação de Mediadores Inflamatórios.....	157
3.3 Participação do Sistema Nervoso Entérico.....	163
4. Efeito do óleo essencial do <i>Croton zehntneri</i> sobre as alterações contráteis induzidas pela TxA do <i>C. difficile</i>	164
5. Efeito depressor da TxA sobre a contratilidade do músculo circular.....	166
6. Implicações terapêuticas.....	166
CONCLUSÕES	168
REFERÊNCIAS	169

INTRODUÇÃO

1. *Clostridium difficile*

1.1. Marcos Históricos

O trato gastrointestinal contém uma microbiota extremamente complexa que atua como uma barreira natural contra a colonização de enteropatógenos. Uma vez essa barreira alterada ou destruída, o homem se torna, mais susceptível a infecção por patógenos entéricos (Lyerly e Wilkins, 1995). Uma modificação da barreira natural do intestino decorrente da antibioticoterapia manifesta um dos mais importantes enteropatógenos hospitalares: o *Clostridium difficile* (Bartlett, 1984; Lyerly e cols, 1988; Pothoulakis, 1993; Kelly e cols, 1994; Lyerly e Wilkins, 1995).

Hall e O'Toole (1935) foram os primeiros a descreverem a natureza toxigênica deste organismo, denominando-o inicialmente de *Bacillus difficilis* devido à dificuldade de isolá-lo em cultura pura. No entanto nas décadas de 50 e 60, complicações comuns ao uso de antibióticos eram associadas ao *Staphylococcus aureus* e não ao *C. difficile* (Bartlett, 1988; Tedesco e cols, 1974). O papel deste organismo como um patógeno importante era obscuro, até que em meados da década de 70, pesquisadores utilizando diferentes técnicas, tais como um meio de cultura seletivo, foram capazes de detectar o *C. difficile* em espécimes de pacientes com colite pseudomembranosa associada a antibióticos (Larson e cols. 1977; Rifkin e cols. 1977; Bartlett e Gorbach, 1977; Bartlett e cols. 1978; George e cols. 1978).

Desde então o mesmo tem sido reconhecido com uma frequência cada vez maior, como o principal agente causador de doenças intestinais associadas ao uso indiscriminado de antimicrobianos, que variam desde uma simples diarreia a uma colite pseudomembranosa que muitas vezes pode ser fatal (Lyerly e cols. 1988; Kelly e cols. 1994; Settle e Wilcox, 1996; Ho e cols. 1996; Starr e cols. 1997). Lima e Lima (1993) demonstraram em estudo realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, que *C. difficile* é o principal agente causador de diarreia hospitalar daquele estabelecimento.

Nessa mesma época, acreditava-se que *C. difficile* produzira todos os seus diferentes efeitos devido a uma única toxina, até que em 1990, Dr. John Bartlett e colaboradores mostraram que *C. difficile* produzia duas diferentes toxinas: a toxina A, referida como

enterotoxina e a toxina B, freqüentemente referida como citotóxica (Taylor e cols. 1980). Acredita-se que a toxina A (TxA) é a causa mais comum dos sintomas das doenças associadas ao *C. difficile* desde que é altamente ativa no trato gastrointestinal onde a toxina B (TxB) não o é (Lyerly e Wilkins, 1995).

Em virtude do uso indiscriminado de antimicrobianos é importante ressaltar que as doenças relacionadas com o *C. difficile* têm se tornado cada vez mais freqüentes, aumentando o índice de mortalidade decorrente dessas doenças, com uma incidência anual estimada de mais de 3 milhões de casos nos Estados Unidos (Pothoulakis e Lamont, 2001).

1.2 . Microbiologia

O *C. difficile* é um bacilo anaeróbio gram-positivo que forma esporos subterminais. A habilidade de formar esporos torna esse organismo muito resistente a sua remoção do ambiente hospitalar. Essa produção de esporos não esta associada com a produção de toxina, mas a produção de toxina é muito alta durante a fase de crescimento estacionário (Lyerly e Wilkins, 1995). Durante a esporulação e subsequente lise celular TxA e TxB atuam intracelularmente ligando-se a superfície celular alterando a permeabilidade das células epiteliais, promovendo perda do fluido intracelular, resultando enfim na morte dos enterócitos (Florin e cols. 1983; Henriques e cols. 1987; Songer, 1996).

Algumas cepas produzem cápsulas, influenciadas provavelmente pelo nível de glicose no meio de cultura, entretanto não parece existir uma associação da cápsula com a virulência, bem como com a produção de toxina (Davies e Borriello, 1990; Strelau e cols. 1989; Baldassarri e cols. 1991).

A parede celular do *C. difficile* consiste de muitas proteínas que tem sido parcialmente caracterizada, como as proteínas M_r de 38 e 42 kDa. Antígenos como glicose, glicosamina, fosfatos e ácidos graxos constituem 40% do peso da parede celular. Se esses antígenos são ou não diferentes das proteínas de 38 e 42 kDa identificadas é desconhecido (Cerquetti e cols. 1992; Masuda e cols. 1989; Poxton e Byrne, 1981; Poxton e Cartmill, 1982). Um outro antígeno, proteína de 36 kDa, esta localizada na superfície celular envolvido com o recrutamento de anticorpos em pacientes com infecções com *C. difficile*. Sua função não é conhecida, mas não é tóxico e nem proteolítico e não se liga a imunoglobulinas como fazem alguns componentes de outros clostrídios (Cerquetti e cols. 1992; Pantosti e cols. 1989 a e b).

O *C. difficile* requer condições anaeróbias para seu crescimento, no entanto não é um anaeróbio restrito como o *Clostridium tetani*. Para o isolamento clínico do organismo e para condições de crescimento ótimo, entretanto, é importante que a bacteriologia anaeróbica seja usada. O organismo exibe diferentes características fenotípicas como fluorescência e odor de “estrupe de cavalo” que auxiliam a identificação, mas não o difere, devido outras cepas de clostrídios as exibir (Lyerly e Wilkins, 1995). O meio seletivo e diferencial mais tipicamente utilizado para o *C. difficile* é o ágar contendo frutose, cefoxitina e cicloserina (CCFA) originalmente descrito por George e cols. (1979). Vale salientar que atualmente várias técnicas são utilizadas para a identificação de bactérias anaeróbias, bem como métodos para identificação de toxinas como ELISA, cultura de células, contraímunoelctroforese e aglutinação pelo látex. Dentre essas, a cultura de células, considerado o método padrão, é utilizada como parâmetro para os outros testes na identificação de toxinas como as do *C. difficile* (Lyerly e cols. 1988).

1.3. Toxinas do *C. difficile*

A grande maioria das cepas toxigênicas do *C. difficile* produz duas potentes exotoxinas, a enterotoxina (TxA) e a citotoxina (TxB) que estão inseridas no processo de desenvolvimento das doenças diarréicas e de suas complicações clínicas (Titov e cols. 2000). Quanto mais toxigênica a cepa, maior a produção das toxinas, indicando uma variação na produção destas. O filtrado de cepas altamente toxigênicas pode compreender quase 5% da proteína bacteriana total, indicando que o organismo dispende uma enorme quantidade de energia produzindo toxinas (Lyerly e Wilkins, 1995). Tem sido descrito que apenas a cepa CCUG 8864 produz uma única toxina, que interessantemente é a TxB em altos níveis, não estando claro se o fragmento da TxA é produzido (Borriello e cols. 1992; Torres, 1991; Lyerly e cols. 1992).

Chaves-Olarte e cols. (1997) identificaram como três as principais diferenças entre as toxinas A e B do *C. difficile*: 1) a ligação específica das toxinas a superfície das células relaciona-se com a citotoxicidade de cada uma; 2) TxB possui atividade enzimática 100 vezes maior do que TxA; e 3) TxA modifica um substrato adicional (Rap).

Existem trabalhos mostrando que outros fatores biologicamente ativos são produzidos pelo *C. difficile*, mas estes não foram confirmados. A atividade desses fatores parece resultar a partir de uma contaminação com pequenas quantidades da TxA ou TxB (Justus e cols. 1982; Giuliano e cols. 1988).

Ainda a esse respeito, há relatos na literatura da existência de toxinas variantes de TxB (TxB-1470 e TxB-8864), isoladas de cepas de *C. difficile* TxA negativa (von Eichel-Streiber e cols. 1995; Torres, 1991). Essas variantes *in vitro* são capazes de produzir de alguma forma efeitos citopáticos diferentes das alterações morfológicas encontradas nas neurites clássicas (Torres, 1991; Chaves-Olarte e cols. 1999). O papel dessas variantes no processo patogênico é incerto embora tenham sido encontradas cepas de *C. difficile* TxA negativa produzindo patologias gastrointestinais (al-Barrak e cols. 1999; Limaye, e cols. 2000). Um recente estudo realizado na França com 334 pacientes mostrou cepas de TxA negativa produzindo diarreia associada ao *C. difficile* com uma prevalência de 2,7 % (Barbut e cols. 2002). Em todos os casos TxB foi apontada como a responsável em produzir esse efeito citopático atípico. Assim as citotoxinas dessas cepas podem ser fatores de virulência relevante que tomam para si funções geralmente apropriadas para TxA. Esse achado contradiz o dogma de que TxA seja a única responsável pelos efeitos patofisiológicos induzidos pelo *C. difficile*. (Chaves-Olarte e cols. 2002). A interpretação dessa hipótese através de experimentos *in vivo* poderia fornecer uma profunda compreensão de entidades clínicas relevantes como as diarreias associadas a antibióticos e a colite pseudomembranosa o que poderia implicar melhores opções de tratamento para essas doenças (Chaves-Olarte e cols. 2002).

1.3.1. Atividades Biológicas

TxA e TxB pertencem a família das grandes toxinas clostrídicas (aproximadamente 300 kDa) e são glicosiltransferases que modificam GTPases da subfamília RhoA (Just e cols. 1995 a e b). Ambas são de grande importância clínica por serem agentes causadores de diarreias associadas a antibióticos e de quase todos os casos de colite pseudomembranosa (Kelly e cols. 1994; Bartlett, 1994; Kelly e LaMont, 1998). As duas toxinas induzem as mesmas características citoesqueléticas e morfológicas (acompanhadas pela redistribuição do citoesqueleto de actina) e suas atividades citotóxicas diferem apenas na potência (Just e cols. 2000). Embora considerada cerca de mil vezes mais potente que a TxA no que diz respeito a citotoxicidade, a TxB é desprovida de efeitos enterotóxicos, ou seja, provocar secreção de fluidos, lesão morfológica e infiltrado inflamatório na mucosa intestinal (Taylor e cols. 1981; Lyerly e cols. 1982; Lyerly e cols. 1985; Triadafilopoulos e cols. 1987b). São letais quando injetadas parenteralmente em animais e possuem doses letais similares: aproximadamente 50 ng das duas toxinas são suficientes para matar um

camundongo de 25 g quando injetadas intraperitonealmente (Lyerly e Wilkins, 1995; Arnon e cols. 1984).

A atividade mais impressionante da TxA é sua atividade enterotóxica, que difere das de outras toxinas como a da cólera e a toxina lábil da *Escherichia coli*. A TxA promove um fluido hemorrágico viscoso diferente do fluido aquoso promovido por essas outras toxinas. A hemorragia decorrente do dano tecidual promovido pela TxA faz com que a mesma seja considerada uma histotoxina. Esta é a base da enteropatia observada em infecções com *C. difficile* e o porque dela ser considerada como a toxina primária destas infecções (Lima e cols. 1988; Rybolt e cols. 1989). Aproximadamente 1 µg de TxA é suficiente para promover esse tipo de resposta quando injetada em alças intestinais ligadas de coelhos. A TxA é pelo menos tão potente e efetiva quanto a toxina da cólera em promover uma resposta de fluido positivo nesse modelo (Lima e cols. 1988). Nesse mesmo modelo, TxB não apresentou atividade, o que não significa que a mesma, não tenha importância na doença, pois outros experimentos mostraram que a mesma quando administrada intragastricamente e com pequenas doses não tóxicas de TxA em hamsters, torna os animais letárgicos e os conduz ao êxito letal, intrigantemente sem apresentar patologia óbvia no trato intestinal. Foi sugerido que a TxB poderia deixar o intestino e agir distalmente em outros órgãos, bem como agir de forma sinérgica com a TxA. TxB não é capaz de induzir sintomas clínicos em modelos animais a menos que seja inoculada junto com quantidades sub-letais de TxA (Lyerly e cols. 1985).

1.3.1.1 Participação de Mediadores inflamatórios

A resposta inflamatória aguda induzida pela TxA decorre de complexos mecanismos que envolvem de alguma forma a participação de mediadores inflamatórios, tais como: prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), fator ativador de plaquetas (PAF), interleucinas (ILs), histamina (HA) e óxido nítrico (NO) por células residentes da lâmina própria intestinal (Triadafilopoulos e cols. 1987a; Triadafilopoulos e cols. 1989; Linevsky e cols. 1990; Miller e cols. 1990; Burakoff e cols. 1995; Fonteles e cols. 1995; Qiu e cols. 1996; Mahida e cols. 1996).

Estudos mostraram que macrófagos da lâmina própria são ativados durante o estágio inicial da enterite induzida pela TxA e liberam a proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2). Isso sugere que a infiltração neutrofílica na mucosa do cólon é uma característica proeminente dessa enfermidade (Castagliuolo e cols. 1997 e 1998). Em ratos, citocinas e

MIP-2 dividem a mesma habilidade em atrair e ativar neutrófilos tanto *in vitro* (Wolpe e cols. 1989; Ribeiro e cols. 1991) como *in vivo* (Wolpe e cols. 1989; Driscoll e cols. 1993; Feng e cols. 1995; Shanley e cols. 1997), mostrando que as células epiteliais colônicas respondam a infecções bacterianas, a agonistas inflamatórios, bem como ao Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) pela expressão de uma diversidade de citocinas pró-inflamatórias (Ribeiro e cols. 1991; Schuerer-Maly e cols. 1994; Jung e cols. 1995).

Alguns trabalhos mostram que alta dose de TxA exerce uma potente ação quimioatraente direta sobre neutrófilos humanos *in vitro* e estimula a liberação de citocinas (fator de necrose tumoral alfa [TNF- α], IL-1 e IL-6) a partir de monócitos humanos também *in vitro* (Miller e cols. 1990; Flegel e cols. 1991). A migração de neutrófilos *in vivo* induzida tanto por TxA quanto por TxB é mediada pela liberação de fatores quimioatraentes, tais como leucotrienos e citocinas (TNF- α e IL-1) a partir de macrófagos residentes, o que mostra que mastócitos e outros leucócitos estão envolvidos na fisiopatologia da TxA na mucosa intestinal (Rocha, 1994; Rocha e cols. 1997; Souza e cols. 1997). Macrófagos estimulados com TxA, mas não com a TxB, sintetizam IL-1 β , dependendo da ativação da proteína G e envolvendo a participação de PGs, PAF e TNF- α . Essa interleucina sintetizada é então capaz de promover secreção intestinal *in vitro* de maneira indireta, via ativação do sistema nervoso entérico (SNE) (Rocha, 1998; Rocha e cols. 1998).

Diferente dos macrófagos, os mastócitos armazenam TNF- α em grânulos e podem liberá-lo imediatamente após a exposição a TxA e participar da fase inicial da reação inflamatória, já que essa citocina causa necrose de células epiteliais e inibição da motilidade gástrica (Sartor, 1994; Malaviya, 1996). Estudos mostram que TxA induz a secreção de mediadores inflamatórios de mastócitos direta ou indiretamente através da liberação de substância P, um conhecido ativador de mastócitos na mucosa (Goyal e Hirano, 1996). Agindo diretamente sobre os mastócitos, a TxA induz ruptura de citoesqueleto o que pode alterar a habilidade dos mastócitos em liberar mediadores como HA e NO após a ativação dependente ou não de antígeno (Calderón e cols. 1998).

Molécula mediadora produzida por mastócitos e provavelmente envolvida na fisiopatologia de enterocolites, o NO potencializa mastócitos mediados por TNF- α , mas sua síntese a partir dos mastócitos não é estimulada pela TxA (Bissonnette e cols. 1991; Salvemini e cols. 1991). Qiu e cols (1996) demonstraram que o NO inibe a enterotoxicidade

da TxA em intestino delgado de ratos provavelmente por um mecanismo que não envolveria os mastócitos, mas talvez outras células de defesa.

Recentemente, Carneiro-Filho e cols. (2001) demonstraram a atividade edematogênica das toxinas A e B do *C. difficile* com diferente potência e curso de tempo. Eles mostraram ainda que essa atividade foi inibida apenas pela pentoxifilina, enquanto o recrutamento de neutrófilos, também induzido pelas toxinas, foi significativamente inibido tanto pela pentoxifilina quanto pela talidomida, dois inibidores da produção do TNF.

No que diz respeito a TxB, Souza e cols. (1997) demonstraram que em estudos experimentais *in vivo* a TxB foi capaz de induzir intensa migração neutrofílica, mediado por TNF- α derivado de macrófagos e por produtos da lipoxigenase. Estudos recentes desse mesmo grupo de pesquisa demonstraram que a TxB ao estimular macrófago *in vitro*, diferente de TxA (Rocha e cols. 1998), não foi capaz de induzir secreção intestinal, tampouco alterou o transporte iônico eletrogênico em íleo de coelho. (Rocha e cols. 2001).

1.3.1.2 Participação do Sistema Nervoso Entérico

As alterações das secreções intestinais causadas por enterotoxinas bacterianas geralmente envolvem o SNE (Cassuto e cols. 1981; Jodal e cols. 1993; Vanner e cols. 1993; Goyal e Hirano, 1996). A TxA do *C. difficile* é conhecida por causar uma resposta necro-inflamatória, com infiltração de neutrófilos e secreção de fluido aumentado no trato gastrointestinal. Os efeitos inflamatórios e secretórios dessa toxina, de forma semelhante aos da toxina colérica, envolvem vias neurais intrínsecas, mas com a participação de diferentes caminhos (**Fig 1**). São através desses caminhos que TxA promove degranulação de mastócitos e secreção de múltiplos mediadores inflamatórios, incluindo PGs, HA e serotonina (5-HT), os quais podem estimular reflexos secretomotores, incluindo a vasodilatação da submucosa (Vanne e cols. 1993). Acredita-se que esses efeitos envolvem a ativação de nervos por serem suprimidos por bloqueio neuronal (lidocaína, hexametônio e capsaicina) (Castagliuolo e cols. 1994) e, além disso, o pré-tratamento com capsaicina, a qual destrói seletivamente neurônios aferentes primários contendo substância P, bem como com antagonistas da substância P (Pothoulakis e cols. 1994; Fonteles e cols. 1995) também inibem a resposta secretória e inflamatória da TxA, sugerindo que a ação dessa toxina é transduzida por fibras aferentes esplênicas primárias contendo substância P (Pothoulakis e cols. 1994). Mantyh e cols. (1996) ainda demonstram que TxA é capaz de liberar substância P a partir de neurônios aferentes primários que atuam em neurônios entéricos e

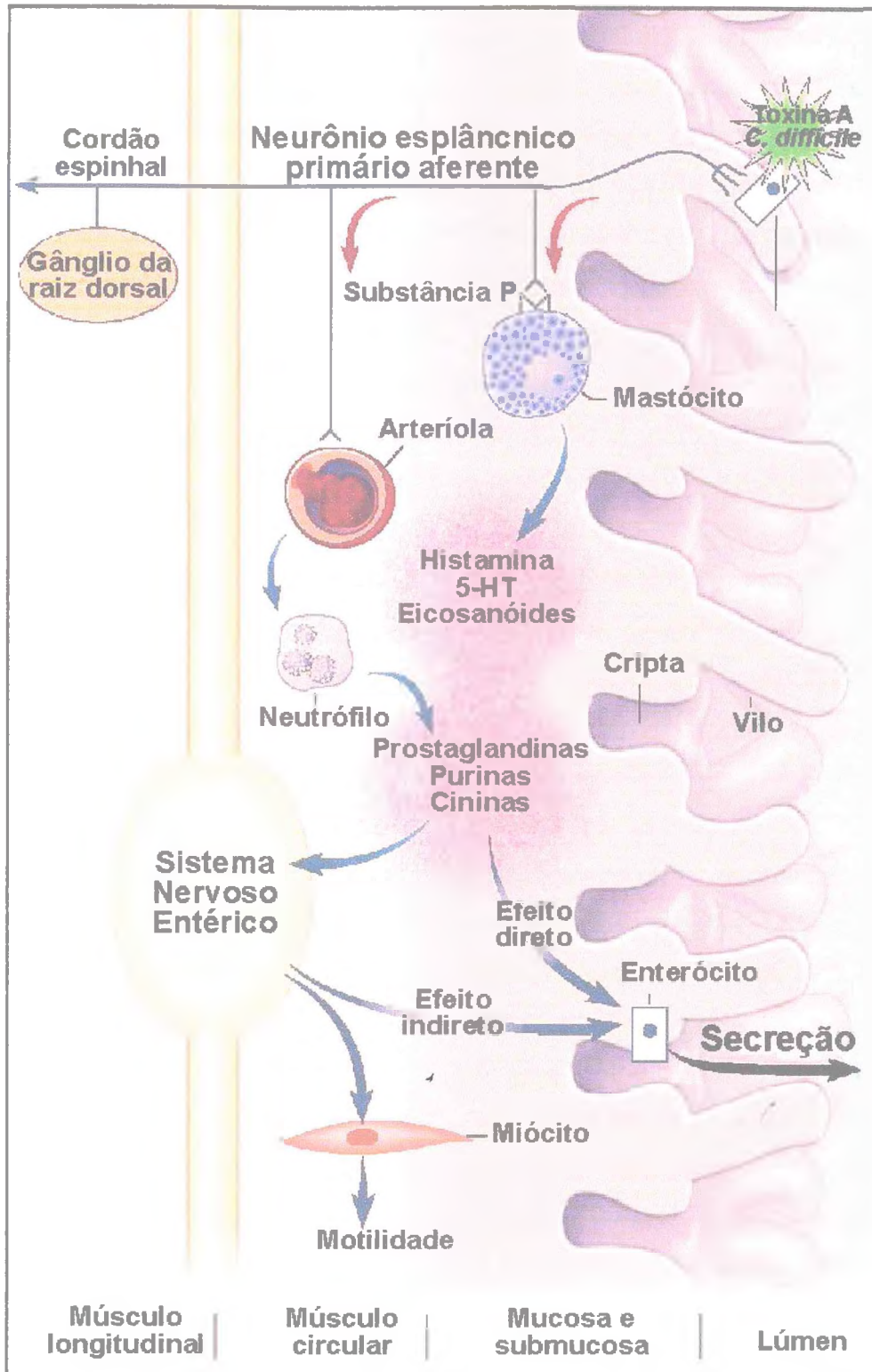
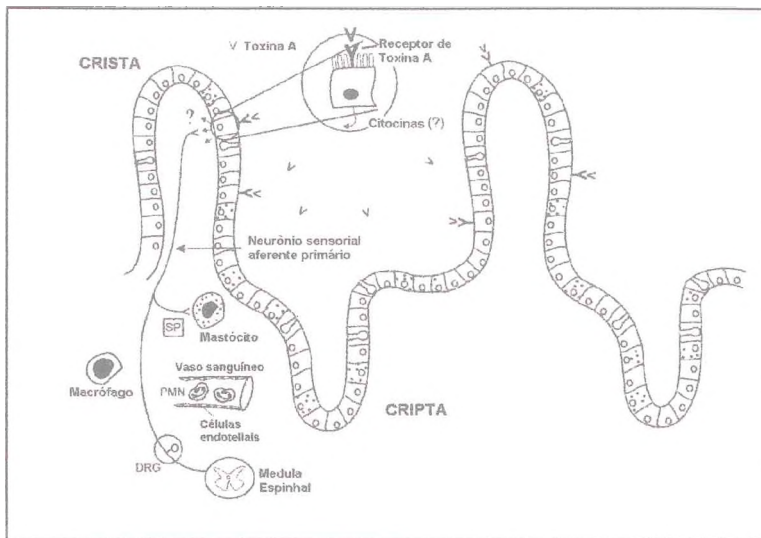


Fig. 1 - Ações inflamatórias e secretomotoras da Toxina A do *Clostridium difficile*. (Goyal, R. K., Hirano, I.: The Enteric Nervous System. In: Mechanisms of Disease. *The New England Journal of Medicine*, 1106-15, 1996).

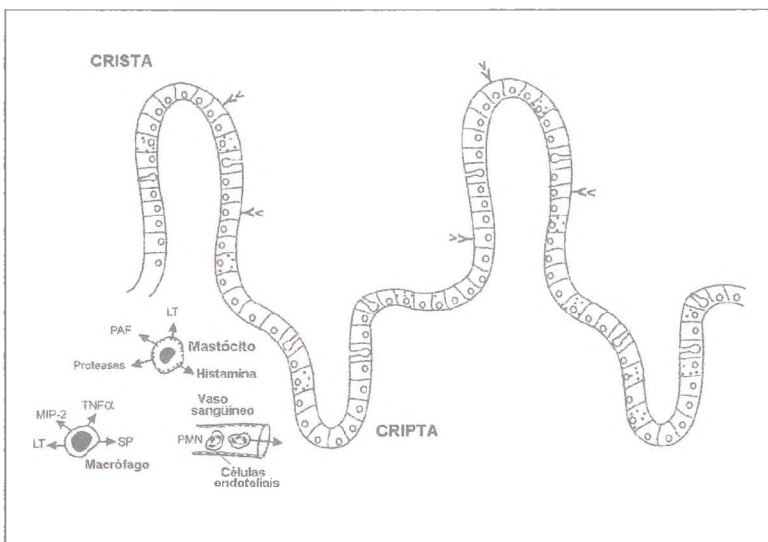
plexos mioentéricos. Segundo Pothoulakis e cols. (1998) a TxA ao ligar-se a seu receptor na célula epitelial intestinal leva a liberação de citocinas que se difundem para a lâmina própria e ativam neurônios aferentes sensoriais primários cujos corpos celulares estão no gânglio dorsal (DRG). Essa ativação libera substância P e peptídeo liberado pelo gene da calcitonina, os quais estimulam mastócitos da mucosa e outras células imunes residentes, tal como neutrófilos polimorfonucleares (PMN) a degranulação (**Fig. 2 A, B**). Muitos mediadores pró-inflamatórios [HA, PAF, LeucotrienoC₄ (LTC₄) e proteases] e potentes mediadores inflamatórios (MIP-2, TNF- α e Substância P) são liberados dessas células após a administração da TxA. Esses estimulam diretamente a secreção de fluido das células epiteliais, bem como a expressão de moléculas de adesão, levando a entrada de PMN para mucosa intestinal e liberação de mediadores pró-inflamatórios que levam a destruição aguda e necrose da crista dos enterócitos 2 à 3h após a exposição da TxA (**Fig. 2 B, C**). Recentemente Mantyh e cols (2000) mostraram que a desnervação cirúrgica extrínseca do íleo de ratos protege o mesmo da enterite induzida pela TxA, excluindo a participação de nervos entéricos intrínsecos desse efeito e sugerindo que neurônios sensoriais primários extrínsecos medeiam os efeitos da TxA intraluminal no íleo.

A TxA purificada possui ações diretas sobre neurônios do plexo submucoso do intestino delgado de coelhos, em concentrações relativamente baixas (Xia e cols. 2000). Inicialmente sua ação excitatória minimiza respostas excitatórias sinápticas caracteristicamente encontradas em neurônios entéricos (Wood, 1994) bem como minimiza efeitos excitatórios lentos produzidos pela liberação parácrina de HA de mastócitos da mucosa (Frieling e cols. 1994a e b; Frieling e cols. 1992; Wood, 1992) e uma outra ação seria sua capacidade de suprimir potenciais inibitórios pós-sinápticos (PIPS) evocados pela estimulação da liberação de noradrenalina a partir de fibras nervosas pós-ganglionares simpáticas. A excitação direta pela toxina dos neurônios secretomotores e/ou interneurônios que fornecem força sináptica excitatória para os neurônios secretomotores e a ação inibitória da toxina sobre a transmissão noradrenérgica para neurônios secretomotores e/ou interneurônios conectados sinápticamente, são as duas ações neuronais da TxA que parecem estar envolvidas na produção do estado secretório. Essas ações efetivamente invalidam qualquer ação de bloqueio sináptico em neurônios secretomotores para permitir disparos secretomotores máximos e hiper-estimulação da secreção mucosa (Xia e cols. 2000). Baseado na neurofisiologia da interface sináptica entre as divisões entéricas e sináptica do sistema nervoso autônomo (SNA), o significado do bloqueio induzido pela TxA da liberação de noradrenalina de sinapses excitatórias é a prevenção da

A



B



C

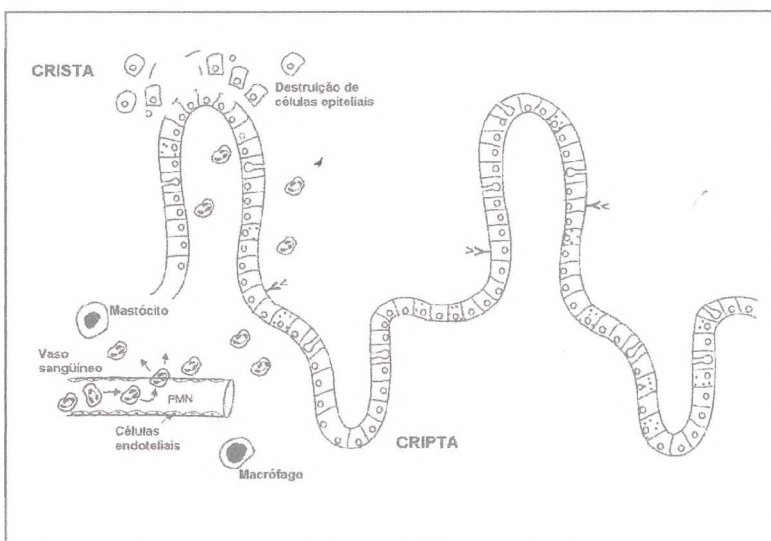


Fig. 2 - Patogênese da Diarréia Inflamatória causada pela Toxina A do *Clostridium difficile* (Pothoulakis, C. Castagliuolo, I. Lamont, J. T. Nerves and intestinal mast cells modulate responses to enterotoxins. *News in Physiological Sciences*. 13(2) : 58 – 63. 1998).

inativação sináptica de microcircuitos entéricos que geram a atividade motora intestinal e outros comportamentos intestinais durante a enterite associada ao *C. difficile* (Xia e cols. 2000).

Em adição aos seus efeitos secretórios, TxA também produz um padrão de motilidade intestinal que é caracterizado por seqüências de contrações representadas por repetidos disparos de potenciais de ação (Goyal e Hirano, 1996). Assim são muitas as evidências diretas e indiretas que fornecem um suporte para um possível papel do SNE na fisiopatogenia da doença intestinal associada a TxA.

1.3.1.3. Outras Atividades:

Além das atividades tóxicas, a TxA é uma lectina e aglutina eritrócitos de coelhos. A atividade hemaglutinante é específica e ocorre seguindo a ligação da toxina com resíduos de Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc (Krivan e cols. 1986). TxA também se liga a muitos antígenos carboidratos os quais são encontrados em células humanas e podem ser receptores biológicos para a toxina no cólon. TxB não se liga a tais receptores e isso parece ser uma das razões que TxB não causa dano direto ao epitélio intestinal (Tucker e Wilkins, 1991).

Estudos realizados por He e cols (2000) para avaliar os efeitos da TxA nos eventos de despolimerização de actina e na função mitocondrial antes do arredondamento celular, constataram, através da medida da concentração de ATP, uma redução no potencial de membrana mitocondrial como também um aumento nos radicais de oxigênio reativo, confirmando os efeitos citotóxicos dessa toxina.

TxA tem sido apontada como indutora de apoptose em células epiteliais intestinais, células da lâmina própria colônica e mastócitos, mas o mecanismo envolvido na ativação do sistema de caspase permanece incerto (Fiorentini e cols. 1989; Mahida e cols. 1996; Mahida e cols. 1998; Calderon e cols. 1998). A apoptose epitelial induzida pela TxA poderia explicar muito a respeito da patogênese da colite. A perda de células como macrófagos e linfócitos T por apoptose induzido pela TxA *in vivo* podem suprimir o sistema imune da mucosa do cólon e levar a quadros de severidade em infecções primárias ou secundárias (Mahida e cols. 1998). A indução de apoptose pela TxA tem sido relatada em células T84 (uma linhagem de células intestinais do cólon) e em culturas de espécimes de biópsia colônica de humanos, porém com mecanismo incerto (Mahida e cols. 1996). Recentemente Brito e cols. (2002) mostraram que TxA induz apoptose em células T84 através de um mecanismo dependente da inativação das proteínas Rho, ativação das

caspases 3, 6, 8, 9 e do Bid (um membro da família Bcl-2 pró-apóptica) e ainda dano mitocondrial seguido pela liberação de citocromo C. Essa atividade pró-apóptica da TxA pode contribuir para a destruição da mucosa vista na enterite induzida por essa toxina.

Fiorentini e cols. (1998) evidenciaram que células intestinais expostas a TxB exibiram características morfológicas típicas de apoptose.

Em estudos realizados por Ciesla-Jr e Bobak (1998) para avaliar as atividades enzimáticas das toxinas A e B do *C. difficile* observou-se que TxB, como uma glicosiltransferase, é cerca de cinco vezes mais potente do que TxA. Para a atividade hidrolítica as toxinas requeriam potássio para ativar suas funções através do aumento na velocidade máxima de reação com pequeno efeito na constante de Michaelis para a UDP-glicose. Ao contrário do potássio, o sódio não foi ativo para manter a atividade hidrolítica. TxA e TxB ainda necessitaram de manganês ou magnésio para otimizar a atividade hidrolítica, sendo o magnésio o mais potente ativador (Wedler, 1993; Schweins e cols. 1997).

As ações das toxinas do *C. difficile* na contratilidade e no controle das funções intestinais propriamente dita, ainda não estão bem esclarecidas. Estudos anteriores relataram que o sobrenadante de culturas não purificadas do *C. difficile* quando administrado a alças isoladas de íleo de coelho, promovia respostas mioelétricas e, devido a não reprodutibilidade destes resultados após a purificação, os autores acabaram atribuindo esta ação a um terceiro fator, diferente das toxinas A e B do *C. difficile* (Justus e cols. 1982).

Lima e cols. (1989) mostraram que a injeção de toxina A do *C. difficile* em alças intestinais de coelhos produz uma resposta inflamatória aguda onde, 2 h após a inoculação dessa toxina, houve uma significativa infiltração de células mononucleares e uma potente secreção intestinal semelhante àquela produzida pela toxina do *Vibrio cholerae*, mas sem causar prejuízos à mucosa intestinal.

No mesmo ano Gilbert e cols. (1989), mostraram que a inoculação por duas horas da toxina A (60 µg/ml) em alças intestinais de coelhos promoveu um grande incremento da motilidade intestinal, com aumento da amplitude e da regularidade temporal das contrações fásicas de músculo liso em resposta ao carbacol (0,01-1,0 µM). No entanto o componente tônico das respostas não foi significativamente afetado. Eles associaram a mediação deste fenômeno com substâncias liberadas por células do sistema imune.

Embora dados na literatura mostrem que o cólon de coelhos pareça ser consideravelmente mais resistente aos efeitos de TxA do que o íleo (Mitchell e cols. 1986;

Burakoff e cols. 1995; Lima e cols. 1988), experimentos *in vitro* mostram que tanto TxA quanto TxB alteram as características eletrofisiológicas do epitélio colônico (Riegler e cols. 1995) e *in vivo* *C. difficile* possui habilidades de alterar a função motora do cólon (Burakoff e cols. 1995).

1.3.2 Mecanismo de Ação

1.3.2.1. Estrutura das Toxinas

As toxinas do *C. difficile* são peptídeos de cadeia simples compreendendo três domínios enzimáticos (Fig. 3). O domínio enzimático o qual catalisa a reação de monoglicolisação está localizado na porção amino terminal de ambas toxinas (Hofmann e cols. 1997). A porção intermediária inclui um domínio transmembrana, o qual provavelmente é o mediador da translocação da toxina para o citosol, mas seu mecanismo ainda não foi comprovado. O domínio de ligação do receptor reside na porção carboxílica localizada em 1/3 da molécula de TxA a qual é construída de unidades peptídicas que se repetem. Essas unidades de repetição podem funcionar como uma proteção para as toxinas contra a proteólise. Elas representam a porção imunodominante da molécula, são altamente imunogênicas e recrutam muito dos anticorpos quando as toxinas são injetadas parenteralmente. São atóxicas, mas retêm a atividade hemaglutinante da molécula (Price e cols. 1987; Wren e cols. 1987). Embora ainda não tenha sido comprovado, essa porção também parece existir em TxB (Hofmann e cols. 1998; Hofmann e cols. 1997). Estudos mostram que a perda de unidades de repetição carboxílicas terminais da TxB induz uma redução de 10 vezes na potência citotóxica (Barroso e cols. 1994).

Três descobertas sugerem a idéia de que a porção carboxílica realmente abriga o domínio de ligação do receptor: 1) A organização modular dessa região (Wren 1991; von Eichel-Streiber e cols. 1992 b); 2) a homologia com os carboidratos do domínio de ligação das glicosiltransferases dos *Streptococos* (von Eichel-Streiber e cols. 1992 a,b); 3) a inibição da atividade citotóxica da TxA por um anticorpo monoclonal reconhecendo um epítipo deste domínio (Lyerly e cols. 1986; Frey e Wilkins, 1992) e a inibição da morbidade associada ao *C. difficile* em um modelo animal através de anticorpos direcionados para a porção carboxílica da TxA e TxB (Kink e Williams, 1998).

O domínio de ligação do receptor na TxA funciona como uma lectina multivalente com alta especificidade de ligação para um receptor intestinal (Krivan e cols. 1986).

Burakoff e cols. 1995; Lima e cols. 1988), experimentos *in vitro* mostram que tanto TxA quanto TxB alteram as características eletrofisiológicas do epitélio colônico (Riegler e cols. 1995) e *in vivo* *C. difficile* possui habilidades de alterar a função motora do cólon (Burakoff e cols. 1995).

1.3.2 Mecanismo de Ação

1.3.2.1. Estrutura das Toxinas

As toxinas do *C. difficile* são peptídeos de cadeia simples compreendendo três domínios enzimáticos (**Fig. 3**). O domínio enzimático o qual catalisa a reação de monoglicolisação está localizado na porção amino terminal de ambas toxinas (Hofmann e cols. 1997). A porção intermediária inclui um domínio transmembrana, o qual provavelmente é o mediador da translocação da toxina para o citosol, mas seu mecanismo ainda não foi comprovado. O domínio de ligação do receptor reside na porção carboxílica localizada em 1/3 da molécula de TxA a qual é construída de unidades peptídicas que se repetem. Essas unidades de repetição podem funcionar como uma proteção para as toxinas contra a proteólise. Elas representam a porção imunodominante da molécula, são altamente imunogênicas e recrutam muito dos anticorpos quando as toxinas são injetadas parenteralmente. São atóxicas, mas retêm a atividade hemaglutinante da molécula (Price e cols. 1987; Wren e cols. 1987). Embora ainda não tenha sido comprovado, essa porção também parece existir em TxB (Hofmann e cols. 1998; Hofmann e cols. 1997). Estudos mostram que a perda de unidades de repetição carboxílicas terminais da TxB induz uma redução de 10 vezes na potência citotóxica (Barroso e cols. 1994).

Três descobertas sugerem a idéia de que a porção carboxílica realmente abriga o domínio de ligação do receptor: 1) A organização modular dessa região (Wren 1991; von Eichel-Streiber e cols. 1992 b); 2) a homologia com os carboidratos do domínio de ligação das glicosiltransferases dos *Streptococos* (von Eichel-Streiber e cols. 1992 a,b); 3) a inibição da atividade citotóxica da TxA por um anticorpo monoclonal reconhecendo um epítipo deste domínio (Lyerly e cols. 1986; Frey e Wilkins, 1992) e a inibição da morbidade associada ao *C. difficile* em um modelo animal através de anticorpos direcionados para a porção carboxílica da TxA e TxB (Kink e Williams, 1998).

O domínio de ligação do receptor na TxA funciona como uma lectina multivalente com alta especificidade de ligação para um receptor intestinal (Krivan e cols. 1986).

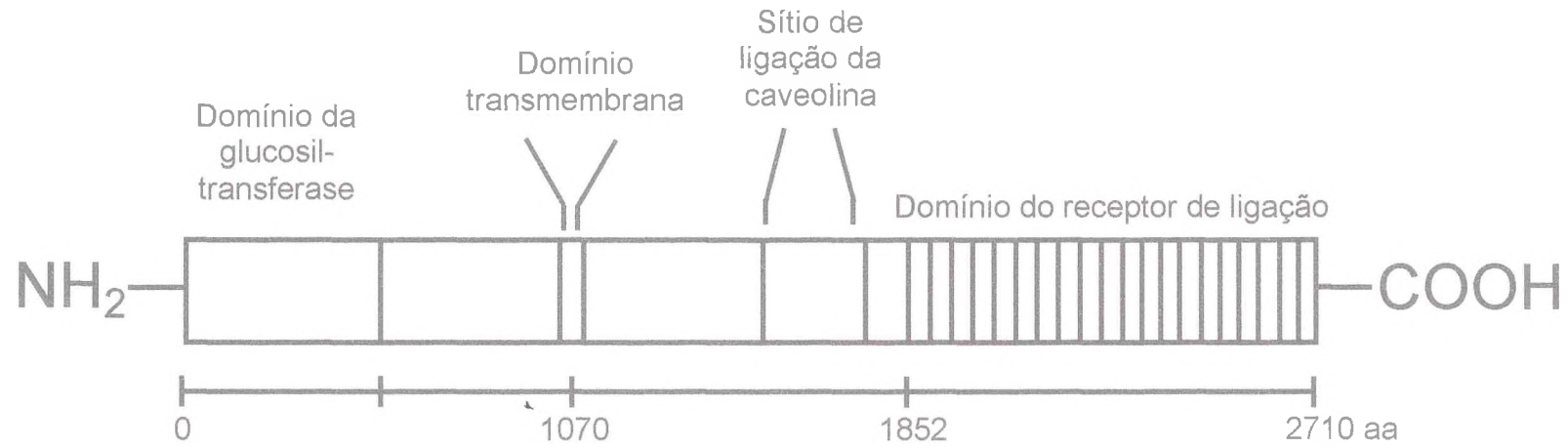


Fig. 3. Estrutura da toxina A do *Clostridium difficile*. (Just, I., Hofmann, F., Aktories, K. Molecular mode of action of the large clostridial cytotoxins . *Curr. Top. Microbial Immunol.* 250: 55-83, 2000.)

1.3.2.2. Receptor de Ligação e Internalização

TxA e TxB agem intracelularmente através de um processo sofisticado: entra na célula intacta via endocitose mediada por receptores. As toxinas ligam-se a receptores específicos de membrana os quais podem ser proteínas, glicoproteínas ou glicolipídeos (Just e Boquet, 2000).

A diferença na capacidade de ligação máxima para cada toxina e a diferença em ligar-se a carboidratos especiais indica que o sítio de ligação celular para as duas toxinas não é idêntico (Chaves-Olarte e cols. 1997; Tucker e Wilkins, 1991).

Elementos essenciais para a ligação da TxA na membrana celular são estruturas de carboidratos, enquanto que para TxB essas estruturas são completamente desconhecidas (Pothoulakis e cols. 1996). Estudos mostram que TxA liga-se diretamente a uma estrutura de carboidrato terminal: a Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc (Krivan e cols. 1986; Tucker e Wilkins, 1991) ausente em humanos (Larsen e cols. 1990), mas parece estar presente em roedores e outros animais. Isto implica que a ligação da TxA a enterócitos humanos envolve um oligossacarídeo diferente ou uma possível interação proteína-proteína (Pothoulakis e LaMont, 2001). O receptor celular da TxA tem sido caracterizado como uma glicoproteína de 106 kD (Rolf e Song, 1993).

Se as toxinas têm propriedades de lectinas, não pode ser excluído que as mesmas liguem-se a muitas estruturas relacionadas a carboidratos de maneira saturável, mas apenas um é o receptor específico que induz a endocitose das toxinas (Rolf e Song, 1995).

Uma vez que TxA se liga ao seu receptor de membrana plasmática, a internalização se inicia dentro de minutos. A ligação toxina-receptor torna-se irreversível dentro de poucos minutos onde a tentativa de resgatar as células com antitoxinas ou por lavagem é sem efeito. Após 5 - 10 min., a toxina está localizada na mitocôndria e sua ligação é acompanhada por uma queda na concentração de ATP intracelular, liberação de citocromo c mitocondrial e produção de espécimes de oxigênio reativo (He e cols. 2000). Não é ainda conhecido se as toxinas internalizadas requerem processamento em compartimentos ácidos, ou pela ativação de proteases ou se elas preferencialmente modificam as proteínas Rho, segregadas em uma organela específica ou no citoplasma (Pothoulakis e LaMont, 2001).

1.3.2.3. Glicosilação das Proteínas Rho

No citoplasma, TxA e TxB executam sua toxicidade pela atividade catalítica intracelular de monoglicosilares reguladores-chaves do citoesqueleto de actina – as GTPases Rho – resultando em sua inativação (Just e cols. 2000; Hall, 1998; Just e Hofmann, 2001).

As proteínas Rho são proteínas conhecidas como GTPases Rho, de baixo peso molecular e pertencente à superfamília Ras de pequenas proteínas G transdutoras de sinais intracelulares (Bongaerts e Lysterly, 1994). Os vários membros dessa família trabalham como interruptores moleculares que respondem a um estímulo externo (Wilkins e Lysterly, 1996).

As GTPases Rho (A, B, C, Rac e Cdc42) estão envolvidas na organização do citoesqueleto (manutenção da forma celular), na regulação da migração, adesão e polaridade celular, bem como no controle da transcrição, progressão e transformação do ciclo celular. Apresentam um papel-chave na regulação da secreção, fagocitose, endocitose e NADPH oxidase. Assim, envolvidas no controle da resposta celular para sinais extracelulares em seu amplo sentido (Aktories e cols. 2000).

Existem pelo menos três proteínas Rho (A, B e C) nos humanos as quais parecem ter diferentes sítios de localização em algumas células (Ridley e Hall, 1992). Entretanto essas proteínas apresentam suaves diferenças funcionais, embora sua principal função pareça ser a organização dos filamentos de actina pela ativação de enzimas como as fosfoinositol 3-quinase (Zhang e cols. 1993), fosfolipase D e tirosina quinase (Wilkins e Lysterly, 1996).

As toxinas do *C. difficile* dentro das células recrutam uma glicose do nucleotídeo uridina difosfato (UDP-glicose) como substrato e a transfere para um receptor do aminoácido treonina (Thr) em quase todas as subfamílias das GTPases Rho (Rho, Rac e Cdc42), inativando-as. O resíduo-aceptor da treonina está na posição 37 da Rho e na posição equivalente (Thr-35) da Rac e da Cdc42. (Just e cols, 1995b; Selzer e cols. 1996; Popoff e cols. 1996).

Há algum tempo, o grupo de Richard Gilbert tem confirmado que as duas toxinas glicosilam as GTPases Rho na mesma posição e que outros membros muito semelhantes da família Ras não são afetados. Eles mostram que a modificação das GTPases Rho pelo *C. difficile* drasticamente reduz a estabilidade dessas proteínas (Dillon e cols. 1995). Entretanto estudos mais recentes mostraram que TxA, mas não TxB modifica Rap2 (um

protótipo da superfamília Ras) em menor extensão, indicando uma diferença real na especificidade para o substrato das toxinas do *C. difficile* (Chaves-Olarte e cols. 1997).

A TxB catalisa a incorporação de mais de um mol de glicose por mol de RhoA. Foi demonstrado que a microinjeção de RhoA previamente glicolisada pela TxB em monocamadas de células causou desagregação de filamentos de actina, indicando uma atividade negativa dominante da RhoA glicolisada (Just e cols. 1995b).

Desde que Thr-37/35 é funcionalmente essencial para as GTPases Rho, sua glicolisação implica em muitas conseqüências: inabilidade de induzir polimerização dos filamentos de actina, induzindo com isso a retração e o arredondamento celular; citotoxicidade e alterações na sinalização celular (Thelestam e cols. 1997; Hall, 1998); destruição da função de barreira das junções fechadas com o aumento da permeabilidade paracelular, perda do anel actinmiosina perijuncional e resistência elétrica diminuída (Riegler e cols. 1995); redução da síntese protéica e da divisão celular, apoptose ou necrose (Fiorentini e cols. 1998; Calderón e cols. 1998; Pothoulakis e LaMont, 2001). Contudo TxA ainda é capaz de estimular uma dramática reação do hospedeiro, a qual exacerba os efeitos da toxina no cólon (Pothoulakis e LaMont, 2001).

Como a glicolisação não inibe apenas uma única função das GTPases Rho, mas muitas ou quase todas, coincidências ou achados inesperados após a intoxicação da célula podem ser observados. Por exemplo: a intoxicação com TxB, a qual pode levar a uma desagregação dos filamentos de actina, inibiu a degranulação estimulada, um efeito oposto daquele que era esperado (Prepens e cols. 1996).

A perda da organização do citoesqueleto é provavelmente suficiente para causar a diarreia e a colite observada, resultante da separação das células epiteliais da mucosa. No entanto permanece a possibilidade que essas grandes moléculas (TxA e TxB) possam ter mais de uma atividade enzimática (Pothoulakis e LaMont, 2001). Na ausência de uma proteína acceptora a TxA pode hidrolisar UDP-glicose em UDP e glicose, atividade essa similar àquela de certas ADP-ribosiltransferases microbianas, tais como a toxina colérica que ribosila ADP nas proteínas alvo, assim como hidrolisa NAD em nicotinamida e ADP-ribose na ausência de proteína acceptora (Moss e cols. 1997).

Atualmente muitos estudos apóiam a hipótese de que algumas importantes respostas celulares para as toxinas do *C. difficile* podem ocorrer antes e independentemente da glicolisação das GTPases Rho, como por exemplo, o dano mitocondrial: ocorre antes e pode ser um importante mecanismo para a liberação de IL-8 dos enterócitos (Warny e cols. 2000). Assim o ensinamento clássico de que o efeito enzimático das toxinas do *C. difficile*

é necessário para toxicidade pode não estar inteiramente correto, investigações futuras dessas vias serão necessárias para permitir elucidar este aspecto (Pothoulakis e LaMont, 2001).

2. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são princípios aromáticos, farmacologicamente ativos, de natureza fluida (alguns são sólidos em temperatura ambiente), oleosos e voláteis, extraídos de diversas plantas (Craveiro e cols. 1976; Matos e Fernandes, 1975-1978). Desempenham um papel fundamental na bioquímica da planta catalisando reações bioquímicas para protegê-las de parasitas e doenças e ajudar na fertilização atraindo insetos para polinização (Lavabre, 1993).

Sua composição varia durante o dia, ao longo do ano, e também com a parte da planta de onde é extraído. Recebe influência do solo e do clima. Devido algumas de suas características físico-químicas podem ser chamados de óleos voláteis ou óleos etéreos. Geralmente líquidos de aparência oleosa a temperatura ambiente são chamados de óleos. A volatilidade, sua principal característica, o difere dos óleos fixos que são uma mistura de substâncias lipídicas obtidas geralmente de sementes.

Devido a sua composição bastante complexa (terpenos, fenóis, aldeídos, álcoois, ácidos orgânicos, nitrogênio, enxofre, vitaminas, hormônios, antibióticos, antisépticos etc.), os óleos essenciais se tornam fonte de uma diversidade de ações farmacológicas o que desperta um grande interesse no seu melhor conhecimento científico para a formulação de novas hipóteses terapêuticas (Souza, 1993; Bezerra, 1994; Albuquerque e cols. 1995; Coelho-de-Souza, 1997; Magalhães, 1997 e 2002; Borges, 2002).

Há muitos anos os óleos essenciais apresentam uma grande importância econômica devido a sua utilização na indústria alimentícia como edulcorantes e aromatizantes (Itokawa e cols. 1980 e 1988) e em preparo de alimentos caseiros (Matos e Fernandes, 1975-1978; Craveiro e cols. 1978a; Albuquerque e cols. 1995). Na medicina popular sua utilização data desde a época antes de Cristo, nos antigos templos do Egito, berço da medicina e da farmácia há mais de seis mil anos (Lavabre, 1993). Essa forma de medicina esteve por muitos anos sob o domínio do conhecimento popular onde a contribuição é inestimável (Mendonça, 1989). Atualmente os inúmeros benefícios dos óleos essenciais estão sendo redescobertos enquanto se olha para a sabedoria das eras e civilizações passadas para restaurar o equilíbrio perdido na vida moderna (Mcgilvery e cols. 1996).

Neste parâmetro podemos citar a utilização de chás e infusatos como sedativos, estomáquicos, antiespasmódicos, antidiarréicos (Itokawa e cols. 1981; Kiuchi e cols. 1992; Alencar e cols. 1993), antiparasitários, antimicrobianos, analgésicos, diuréticos e hipotensores (Luz e cols. 1984; Mendonça e cols. 1991), antimaláricos (Klayman, 1985), anti-hemorroidários (Prudente e cols. 1993), anti-sifilíticos (Mendonça, 1989), antiedematogênicos e antinociceptivos (Oliveira, 2001) e para o tratamento da rinite alérgica (Bezerra, 1994). Dos constituintes fenólicos dos óleos essenciais muitos como o timol, o carvacol e o eugenol são empregados em formulações anti-sépticas especialmente para gargarejos ou incorporados a pastas dentais. Também podem ser utilizados como anestésicos locais na prática odontológica (Francis e Wood, 1961 e Sticher, 1971) e em pastas e cimentos para obstruir canais dentários (Frisch e Bhaskar, 1968; Leal-Cardoso e cols. 1994).

Atualmente vários são os estudos realizados com óleos essenciais na busca de uma explicação fisiofarmacológica para seus efeitos na medicina popular. Estudos com o óleo essencial do *Croton zehntneri* (OECz) mostraram que o mesmo foi eficaz em produzir um efeito antiespasmódico em íleo de cobaia (Coelho-de-Souza e cols. 1997 e 1998) e efetivo como agente antinociceptivo em ratos (Oliveira e cols. 2001). Esse último efeito foi também encontrado por Viana e cols. (2000) para o óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Com óleo essencial do *Croton nepetaefolius* (OECn) foi mostrado que o mesmo apresenta propriedades miorelaxante e antiespasmódica *in vitro* utilizando segmentos de íleo, esfíncteres gástricos (cárdia e piloro) e o íleo-cecal (Magalhães, 1997 e Magalhães e cols. 1998). O óleo essencial de *Mentha villosa* (OEMv) e seu constituinte óxido de piperitenona (OP) mostraram-se capazes de diminuir a pressão arterial média e a frequência cardíaca em ratos anestesiados (Sousa e cols. 1997; Lahloú e cols., 2002). Hiruma-Lima e cols. (2000) mostraram que o óleo essencial do *Croton cajucara* apresentou um efeito gastroprotetor, quando na medicina popular é utilizado no tratamento de sintomas gastrointestinais.

2.1. *Croton zehntneri*

O *Croton zehntneri* Pax. Et. Hoffm. (Fig. 4) popularmente conhecido como canela de cunhã, canelinha, catinga-de-mulata, catinga-de-crioula dentre outros, é nativo da caatinga do Nordeste brasileiro (Craveiro e cols. 1978a). É um arbusto pertencente à família das



Fig. 4. *Croton zehntneri* Pax et. Hoffm (Foto: José Henrique Leal Cardoso ano: 2004) coletado na cidade de Viçosa, Estado do Ceará. Identificação botânica confirmada pelo Dr. Francisco José de Abreu Matos (Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Federal do Ceará) e pelo Dr. Raymon Harley (*Royal Botanic Garden, Kew, Reino Unido*). Herbário Prisco Bezerra –UFC exsicata nº 27477.

euphorbiaceae e ao gênero *Croton* em geral apresentando ramos finos e longos e cresce mais frequentemente à sombra de outras plantas maiores. Uma de suas principais características é o odor forte e agradável semelhante ao anis (*Illicium verum*) ou ao cravo da índia (*Eugenia caryophyllata*) ou a mistura de ambos desprendido por todas as partes da planta (Fernandes e cols. 1971). Em nossa região suas cascas e folhas são usadas como aromatizantes de doces caseiros e aguardente de cana e nos chamados “banhos de limpeza”, rituais religiosos afro-brasileiros. A medicina popular ainda os utiliza, na forma de chás ou infusões, como sedativo, estomáquico, antiespasmódico e antidiarréico (Craveiro e cols. 1977a, 1978b e 1980). Anti-reumático e antiparasitário são outras propriedades que a medicina popular atribui ao óleo essencial do *Cróton zehntneri* (OECz), além de ser usado topicamente no tratamento de feridas infectadas (Braga, 1976), no tratamento de alguns comportamentos colinérgicos e dopaminérgicos relatados (Giorgi e cols. 1991) e no tratamento de distúrbios nervosos (Batatinha e cols. 1995).

O *Croton zehntneri* Pax et. Hoffm. Produz razoavelmente boa quantidade de óleo essencial com rendimento de 2,2% do peso de suas folhas (Craveiro e cols. 1980).

A constituição química desse óleo tem sido determinada e de acordo com sua análise, seus principais constituintes são: o anetol, o estragol e o eugenol podendo sua constituição variar dependendo do local e hora onde as folhas são coletadas (Craveiro e cols. 1978b; Craveiro e cols. 1981). Em algumas localidades do nordeste encontra-se com abundância o anetol (conhecido como variedade anetol do *Croton zehntneri*, contendo anetol 85,7% e estragol 4,8% do peso do óleo), o eugenol (variedade eugenol, 68% do peso do óleo) ou o estragol (variedade estragol, 80% do peso do óleo) (Craveiro e cols. 1981).

O anetol e o estragol são derivados fenilpropanos que ocorrem com bastante frequência nos óleos essenciais de um grande número de plantas (Dallmeier, 1981).

Foram descritos muitos efeitos bioquímicos e farmacológicos do anetol e do estragol e alguns efeitos farmacológicos de pseudo-hidrolatos obtidos do OECz (Caujolle e Meynier, 1958; Albuquerque, 1982; Albuquerque e cols. 1980 1981 e 1995). O estragol possui uma ação depressora sobre o SNC relativamente fugaz (Le Bourhis e Soenen, 1973); discreta potencialização do tempo de sono induzido pelo pentobarbital sódico (Seto e Keup, 1969); efeito anestésico, miorelaxante e anticonvulsivante (Dallmeier, 1981; Dallmeier e Carlini, 1981; Albuquerque e cols. 1981). Entre os vários efeitos do anetol podemos citar: inibição reversível da formação do glicogênio (Cote e cols. 1951); ação estrogênica em ratas (Zondex e Bergmann, 1938); ação depressiva sobre o SNC (Bossier e cols. 1967);

propriedades psicolépticas fugazes (somente o t-anetol em altas doses) no camundongo (Le Bourhis e Soenen, 1973); ligeiro efeito analgésico, anticonvulsivante e hipnótico (Le Bourhis e Soenen, 1973); atividade citotóxica sobre células HeLa (Stojcev e cols. 1967); ação inseticida (Marcus e Lichtenstein, 1979) e antimicrobiana (Capeck, 1956).

Trabalhos em nosso laboratório demonstraram que os pseudo-hidrolatos obtidos a partir do OECz, do anetol e do estragol bloquearam a resposta contrátil à estimulação indireta de frênico-diafragma e ciático-gastrocnêmio de sapo. Bloquearam também as contrações induzidas por acetilcolina (ACh) em músculo reto abdominal de sapo. Em coração isolado de sapo os pseudo-hidrolatos promoveram efeito cronotrópico negativo. Em duodeno isolado de coelho diminuíram o tônus e a amplitude dos movimentos rítmicos espontâneos (Albuquerque, 1982).

Dos efeitos do OECz muito já foi estudado: em íleo isolado de cobaio ele foi capaz de diminuir o tônus, mostrando um efeito miorrelaxante e antiespasmódico. Na bexiga de cobaio ele aumentou a atividade rítmica inerente à musculatura, e na veia porta ele inibiu a amplitude das contrações espontâneas, sem, no entanto, reduzir sua frequência (Coelho-de-Souza e cols. 1998). Mais recentemente, observou-se que o óleo possui também efeito antinociceptivo (Oliveira e cols. 2001). Estudos em músculo esquelético mostram que o OECz provavelmente possui dois sítios de ação nas fibras musculares: na membrana pós-juncional, bloqueando a transmissão neuromuscular, e no retículo sarcoplasmático, aumentando o Ca^{+2} mioplasmático (Albuquerque e cols. 1995).

3. Músculo Liso Gastrointestinal

O músculo liso há muito tempo tem sido estudado por fisiologistas, mas até o ano de 1960 poucos bioquímicos foram valentes o suficiente para usá-lo como material de partida para seus estudos. Desde então o músculo liso é um indispensável sistema de medida para o estudo de funções neuroanatômicas, ações de hormônios e drogas, e mecanismos de sistema de segundos-mensageiros (Kao e Carsten, 1997).

As células musculares lisas são amplamente distribuídas em diferentes órgãos em quantidades relativamente pequenas bem como usualmente associadas com grandes quantidades de tecido conectivo. São vitais para diversas funções do organismo e seu funcionamento anormal contribui para muitas doenças como hipertensão, arteriosclerose, coronariopatias, asma, distúrbios intestinais, apoplexia, dentre outras (Somlyo e Somlyo,

1994 e 2000). Seu mau funcionamento aflige mais doentes do que todas as disfunções dos músculos estriados juntos (Kao e Carsten, 1997).

3.1 Anatomofisiologia

No músculo liso gastrointestinal as células musculares se encontram organizadas em duas camadas dispostas longitudinal e circularmente. Na camada mais externa, relativamente fina, os feixes de células musculares se estendem paralelamente ao eixo longitudinal da víscera, e na camada interna espessa e mais vigorosa, esses feixes se estendem ao redor do referido eixo de forma circular. Contrações e relaxamentos alternados combinados dessas duas camadas propulsiona o conteúdo do intestino, embora a força maior seja fornecida pela camada circular (a longitudinal tem funções importantes de marcapasso e coordenação dos movimentos). Variações desse processo básico promovem diferentes tipos de movimentos como as segmentações e o peristaltismo (Rhoades e Tanner, 1992). Os feixes das diferentes camadas musculares bem como as fibras conectam-se através de estruturas de baixa resistência elétrica, denominadas de junções abertas (“gap junctions”) ou nexus, que permitem o movimento de íons de uma célula a outra (Uehara e Burnstock, 1970; Somlyo, 1985; Moss e Hofmann, 1992). Muitas fibras de um mesmo feixe não recebem terminações nervosas, segundo Hoyle e Burnstock (1989), na camada circular do tubo digestivo, existem de 2 a 8 junções neuromusculares para cada 100 células musculares de um feixe.

O sarcolema no músculo liso representa algo em torno de 2 a 6% do volume celular e possui uma bicamada lipídica com elementos protéicos inseridos. O retículo sarcoplasmático existe em forma rudimentar. Apesar disso apresentam uma organização intracelular ímpar que é à base de seu comportamento contrátil. Não há um sarcômero bem definido. Por outro lado, encontramos os chamados “corpos densos”, considerados análogos dos discos Z dos músculos estriados que unem os miofilamentos contráteis em série. Essas estruturas servem para transmitir forças mecânicas e proporcionar acoplamento entre miofilamentos e o estroma do tecido conectivo. Devido os miofilamentos contráteis que correm paralelos ao eixo longitudinal da célula parecerem formar um arranjo espiralado ao longo do comprimento da célula, a tensão desenvolvida por uma célula muscular lisa ocorre nas três dimensões, mas o comportamento primário da força é ao longo do eixo longitudinal (Gabella, 1976; Small e Foster, 1986; Moss e Hofmann, 1992; Kao e Carsten, 1997).

A membrana de músculo liso contém muitos tipos diferentes de proteínas receptoras que podem iniciar ou inibir o processo contrátil (Knot e cols. 1996). Dessa forma, os músculos lisos podem ser ativados por múltiplos tipos de sinais: sinais nervosos, estimulação hormonal, estiramento e por várias outras formas (Meiss, 1989; Saito e cols. 1994; Nixon e cols. 1994).

O controle dos movimentos e secreções gastrointestinais é realizado principalmente por um sistema nervoso cujos neurossomas residem no próprio intestino denominado SNE. Esse é constituído por um plexo mais externo situado entre as camadas musculares longitudinal e circulares denominado plexo mioentérico (plexo de Auerbach) e um plexo mais interno situado na submucosa, denominado plexo submucoso (plexo de Meissner). O plexo submucoso controla principalmente as secreções e o fluxo sanguíneo local e o plexo mioentérico controla principalmente os movimentos gastrointestinais (Lundgren e cols. 1989). Além desses dois plexos principais existem plexos menores, o subseroso, o muscular profundo e o mucoso, sendo este último, algumas vezes, considerado uma extensão do submucoso (Fang e cols. 1993).

Os plexos são formados por três componentes: um primário, formado por gânglios e feixes internodais; um secundário, representado pelos ramos mais finos que os do plexo primário e um terciário, cujos axônios formam as varicosidades que inervam as fibras diretamente. Essas varicosidades são junções neuro-efetoras que estão em proximidade com sítios receptores dos transmissores (Lundgren e cols. 1989).

Devido à existência do SNE fenômenos como o peristaltismo e outros padrões de comportamento motor intestinal ocorrem em segmentos isolados do tubo digestivo.

As contrações do músculo liso intestinal fisiologicamente visam principalmente à criação de padrões de movimentação apropriados a digestão, absorção e propulsão do conteúdo intraluminal. O peristaltismo é um desses padrões importantes. É seu comportamento motor complexo organizado que impulsiona o conteúdo intestinal na direção aboral. O peristaltismo pode ser dividido em duas fases: a preparatória – quando o intestino devido a um aumento na pressão intraluminal pela presença do bolo alimentar no lúmen, gera uma contração da musculatura longitudinal; e a do esvaziamento – o intestino radialmente distendido sofre contrações coordenadas da camada muscular circular que se propagam em direção ao ânus propulindo o conteúdo (Waterman e cols. 1992 e 1994).

Além do SNE, a divisão simpática e parassimpática do SNA e nervos sensoriais terminais originários do epitélio luminal e parede intestinal também participam na regulação neuronal das funções do trato gastrointestinal (Miolan e Neil, 1996;

Szurszewsky e King, 1989; Best & Taylor, 1990). Existem evidências, apesar de se saber que o mediador neuromuscular no simpático é principalmente noradrenalina e no parassimpático a acetilcolina, de que outras substâncias tais como neuropeptídeos e neurocininas atuam como transmissores ou moduladores (Loewi e Spyer, 1990; Van Nieuwstadt e cols. 1994; Venkova e Krier, 1993; Zhang e Lang, 1994). A liberação então dessas outras substâncias pelos neurônios entéricos faz surgir o conceito de co-transmissão e de uma outra via neuronal que não é de natureza adrenérgica nem colinérgica (NANC) (Hoyle e Burnstock, 1989). Muitos neurotransmissores NANC do trato gastrointestinal estão identificados e estudados: NO identificado como neurotransmissor inibitório NANC em diversas regiões do trato gastrointestinal (Boeckxstaens e cols. 1991; Lefebvre e cols. 1992; Kanada e cols. 1992; Bacari e cols. 1994; Orihata e Sarna, 1994; Smits e Lefebvre, 1996), porém em outras como excitatório NANC (Bartho e Lefebvre, 1994, 1995); polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) (Lefebvre e cols. 1992; Bacari e cols. 1994), HA e a neurotensina (Katsoulis e Conlon, 1988).

Outros estudos mostram a substância P como promotora de contração no estômago e íleo de cobaias atuando direta e também indiretamente sobre o músculo liso através da liberação de ACh (Nieber e cols. 1981; Hall e Morton, 1990); a colecistocinina e outras substâncias peptidérgicas como indutoras de respostas excitatórias no intestino e estômago de cobaias (Kuemerle e cols. 1992; Boyle e cols. 1993); as PGs como estimulantes ou inibidoras das funções gastrointestinais, inclusive através da modificação da liberação de substâncias neurotransmissoras gastrointestinais (Milenov e cols. 1983; Milenov e Rakovska, 1983; Katsoulis e Conlon, 1988); e a 5-HT como inibidora ou estimulante da contratilidade gastrointestinal (Kuemerle e cols. 1992; Buchheit e Buhl, 1994; Eberle-Wang e cols. 1994).

Dois tipos fundamentais de atividade elétrica periódica são apresentados pelo músculo liso gastrointestinal: 1) ondas lentas – oscilações em torno do potencial de repouso sem caráter regenerativo; normalmente não causam contração muscular exceto no estômago e excepcionalmente no cólon. Controlam principalmente o aparecimento de potenciais de ação limitando a sua frequência máxima. 2) potenciais de ação – despolarizações de grande amplitude que atingem caráter regenerativo e causam as contrações musculares. Geralmente ocorrem superpostos às ondas lentas (Christensen, 1971). Alguns músculos lisos possuem automatismo por serem auto-excitáveis (geram potenciais de ação dentro da própria membrana citoplasmática a partir da onda lenta sem estímulo extrínseco).

Geralmente o músculo liso mantém um estado mínimo basal de contração chamado tônus basal, a partir do qual pode contrair mais ou relaxar, dependendo da função fisiológica. Parte desse tônus é causada por mecanismos intrínsecos ou miogênicos e outra parte modulada por estímulos mecânicos e neuro-hormonais inibitórios e excitatórios (Knot e cols. 1996). Dessa forma os músculos lisos foram classificados em tônicos, aqueles que apresentam tônus intrínseco e respondem a estímulos com mudança graduada no potencial transmembrana, ou fásicos, aqueles que apresentam atividade de onda lenta e geram potenciais de ação que levam a contração. Inclui-se nessa classe o músculo liso gastrointestinal (Rembold, 1996).

3.2 Acoplamento Excitação-Contração

O acoplamento excitação-contração no músculo liso de uma forma geral pode ser do tipo eletromecânico e / ou farmacomecânico, a diferença está no estímulo que origina o processo contrátil. No primeiro, eletromecânico, a contração se origina em decorrência da despolarização da membrana (Em) e no segundo, farmacomecânico, ela ocorre através de estimulação com fármacos, neurotransmissores, autacóides e hormônios de receptores de membrana, sem necessitar de alterações do Em ou necessitando-as em valores mais baixos (Rembold, 1996). O desencadeamento da contração ainda pode ocorrer pela combinação dos dois mecanismos (Rasmussen e cols. 1987; Somlyo e Somlyo, 1968). Não somente segundos mensageiros do acoplamento farmacomecânico afetam canais iônicos, conseqüentemente o Em e o acoplamento eletromecânico, como o Em também pode modular a ativação da fosfolipase C pelos agonistas (Itoh e cols. 1992; Ganitkevich e Isenberg, 1993).

A contração e o relaxamento no músculo liso acontecem, em última análise, principalmente por um aumento e uma diminuição na concentração de cálcio (Ca^{2+}) livre no interior da célula, respectivamente (Bolton e cols. 1981; Somlyo e Somlyo, 1994 e 2000; Word e Kamm, 1997).

Seja no acoplamento eletro ou farmacomecânico o mediador final da contração é geralmente um aumento da concentração de Ca^{2+} no citoplasma, o qual é necessário para a fosforilação das cadeias leves de miosina que desencadeará o processo contrátil (Morgan e Morgan, 1984; Rembold e Murphy, 1988 a; Moss e Hofmann, 1992). Esse aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular pode ser decorrente de vários mecanismos: a) entrada de

Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes (canais lentos ou canais tipo L e canais rápidos ou canais tipo T); b) liberação do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (e de outros estoques intracelulares) através de canais iônicos presentes na membrana desse retículo que podem ser ativados por Ca^{2+} ou por trifosfato de inositol (IP_3) ou ambos; c) trocador sódio (Na^+) - Ca^{2+} operando de forma inversa; d) influxo por meio de canais iônicos operados por receptor, seletivos para Ca^{2+} ; e) inibição da bomba de Ca^{2+} -ATPase, levando a um incremento na concentração de Ca^{2+} intracelular; f) combinação de vários fatores acima mencionados (Sperelakis, 1993). Canais de Cl^- e canais catiônicos não seletivos, podem também estar envolvidos na elevação desse Ca^{2+} intracelular em músculo liso gastrointestinal (Kuemmerle e Makhlouf, 1994).

O Em das células do músculo liso varia entre -40 a -70 mV e alterações desse potencial a valores menos negativos (despolarização) pode abrir canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, causando influxo de Ca^{2+} e produzindo um aumento na concentração intracelular desse íon e iniciar a contração (Somlyo e Somlyo, 1994 e 2000).

As despolarizações induzidas por aumento da concentração de K^+ extracelular além de produzirem inicialmente influxo de Ca^{2+} por ativação de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes e de inativação rápida promovem também um influxo de Ca^{2+} mais lento e mais prolongado através de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes e de inativação lenta. O influxo inicial rápido promove um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular através do mecanismo de liberação de Ca^{2+} induzido por Ca^{2+} (CICR) enquanto o influxo deste de forma mais lenta, além de carregar o retículo sarcoplasmático ativa diretamente os filamentos contráteis. (Karakı e Weiss, 1988; Ausina e cols. 1996). Solução contendo altas concentrações de K^+ na maioria dos músculos lisos tanto induzem contrações completamente dependentes do Ca^{2+} extracelular, como são bloqueadoras de canais lentos de Ca^{2+} (como a nifedipina e verapamil) inibindo esta contração (D'Ocon e cols. 1991). Essas contrações podem ainda interferir com o nível de IP_3 aumentando-o e promovendo liberação de Ca^{2+} armazenado no retículo sarcoplasmático (Karakı e Weiss, 1988; Ausina e cols. 1996).

Existem muitos trabalhos demonstrando que substâncias como ATP e carbacol também são capazes de produzir despolarização e abrir canais inespecíficos para cátions promovendo influxo de Na^+ que ativam, por sua vez, canais lentos de Ca^{2+} (também chamados do tipo L) ou canais iônicos operados por receptor aumentando diretamente o influxo de Ca^{2+} e produzindo contração (Sims, 1992; Bolton, 1979; Benham e Tsien, 1987;

Ganitkevich e Isenberg, 1990). Outros agonistas como angiotensina II, tetraetilamônio (TEA) e ACh inibem atividade de canais de K^+ em células musculares lisas, o que também leva a despolarização e influxo de Ca^{2+} (Miyoshi e Nakaya, 1991; Bolton, 1979).

Algumas substâncias também podem produzir contração por mecanismos independentes de alterações no potencial transmembrana, elas o fazem ou através de alterações na concentração de Ca^{2+} intracelular ou alterando as respostas celulares ao Ca^{2+} . No primeiro caso, as alterações da concentração de Ca^{2+} no citoplasma podem ser alcançadas por mecanismos que envolvem a ativação de receptores acoplados ao sistema de proteínas G e ativação da fosfolipase $C_{\beta 1}$ com produção de IP_3 e liberação de Ca^{2+} dos seus estoques internos, por exemplo: receptor α_1 -adrenérgico na ativação por norepinefrina e receptor H_1 para histamina (Bárány e Bárány, 1996).

O mecanismo primário de ativação da contração do músculo liso é a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC_{20}) através da quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), enzima esta ativada pelo complexo Ca^{2+} -calmodulina (Kitazawa e cols. 1991a, b; Moss e Hofmann, 1992). Apesar da ativação da MLCK a regulação da contração do músculo liso é realizada também por alterações da sensibilidade dos elementos contráteis ao Ca^{2+} . Através do uso de indicadores da concentração de Ca^{2+} intracelular observou-se que a relação força / concentração de Ca^{2+} não era constante. Durante a ativação por agonistas esta relação era maior do que durante o acoplamento eletromecânico sugerindo uma maior sensibilidade dos elementos contráteis ao Ca^{2+} no acoplamento farmacomecânico (Hirano e cols. 1991; Rembold, 1992; Himpens e cols. 1995; Yanagisawa e Okada, 1994). Essa sensibilização influenciada por processos fisiológicos pode ser positiva ou negativa. Estímulos que ativam proteína G, por exemplo, HA, fenilefrina e endotelina, promovem alta sensibilidade ao Ca^{2+} por aumentarem IP_3 e liberarem Ca^{2+} dos estoques intracelulares (Kitazawa e Somlyo, 1990; Kitazawa e cols. 1991a, b; Gong e cols. 1992; Tang e cols. 1992; Droogmans e Missiaen, 1994; Himpens e cols. 1995; Yanagisawa e Okada, 1994). A baixa sensibilidade pode ser causada por agentes que somente promovem o influxo de Ca^{2+} , como a despolarização, o ATP, o estiramento e a inversão da troca $Na^+ - Ca^{2+}$ ocasionada pela baixa concentração de Na^+ extracelular (Rembold, 1992). Essa diminuição da sensibilidade ao Ca^{2+} parece ser causada por um balanço alterado entre a atividade da MLCK e da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), resultando em uma redução da relação fosforilação / desfosforilação modulada por proteínas G (Cohen 1992; Himpens e cols. 1995; Kitazawa e cols. 1991a, b). Há propostas de que a inibição da fosfatase que

desfosforila a serina 19 da MLC₂₀ seja talvez o principal mecanismo de sensibilização ao Ca²⁺ acoplado a proteína G (Somlyo e Somlyo, 1994).

Sugere-se que a proteína quinase C (PKC) e o ácido aracdônico (AA) sejam os possíveis mensageiros fisiológicos de sensibilização das proteínas contráteis ao Ca²⁺ em músculos lisos (Litten e cols. 1987; Chiu e cols. 1987; Fernandez e cols. 1993). Os ésteres de forbol, ativadores da PKC contraem o músculo liso e aumentam a sensibilidade ao Ca²⁺ intracelular tanto em relação ao desenvolvimento de força como em relação a fosforilação da miosina (Chatterjee e Tejada, 1986; Nishimura e cols. 1990; Rembold e Murphy, 1988b). A evidência que sugere o papel da PKC e a sensibilização dessas proteínas ao Ca²⁺ pelos ésteres de forbol é o fato de agonistas que promovem sensibilização ao Ca²⁺ também ativarem a PKC e liberarem diacilglicerol (DAG) que é o ativador natural da PKC. A PKC e AA, a nível celular, atuam por mecanismos diferentes: enquanto a PKC promove um aumento na fosforilação da serina 19 da MLC₂₀ (Somlyo e Somlyo, 1994), o AA aumenta a fosforilação da MLC₂₀ através da inibição da desfosforilação mesmo que na presença de uma concentração intracelular de Ca²⁺ constante (Gong e cols. 1994).

A fosforilação da tirosina também pode ser importante na regulação da sensibilidade ao Ca²⁺ intracelular, visto que algumas substâncias inibidoras de tirosina quinase (geldanomocina, tirfostina e genisteína) diminuíram respostas contráteis induzidas por agonistas em músculo liso intacto e em preparações desmembranadas de músculo liso longitudinal de íleo de cobaia (Di Salvo e cols. 1993). A tirfostina, por outro lado não teve efeito em contrações induzidas por altas concentrações de K⁺ em vasos intactos (Di Salvo e cols. 1993). Ausina e cols. (1996) descreveram que a adição hiperosmolar de K⁺ em útero de rata produz contrações que são pouco influenciadas pela alteração de volume celular devido ao estresse osmótico, são independentes de Ca²⁺ intra ou extracelular e de despolarização da membrana, e que não parecem ser mediadas pela ativação de PKC, quinases dependentes de Ca²⁺ / calmodulina ou tirosina quinases. Entretanto, envolvem a participação de alguma quinase sensível a estaurosporina.

Independentemente dos mecanismos iniciadores da contração serem relacionados às alterações do Em, à ativação de canais operados por receptor, ao deslocamento de Ca²⁺ de estoques intracelulares ou a uma combinação destes fatores, dentre outros, podemos considerar que as bases bioquímicas e estruturais da contração muscular lisa apresentam uma grande similaridade com os mecanismos conhecidos para a célula muscular estriada.

Estabelecida uma contração, o relaxamento das células musculares lisas pode acontecer por vários tipos de processos que, na maior parte dos casos, passa por redução da concentração de Ca^{2+} no interior da célula.

São relaxantes do músculo liso os denominados ativadores de canais de potássio. Eles constituem o grupo mais recente de fármacos capazes de relaxar o músculo liso vascular de artérias e veias. Eles atuam por mecanismo básico que é a ativação de diferentes tipos de canais de K^+ (dependentes de voltagem, ativados pelo Ca^{2+} , sensíveis ao ATP e retificadores retardados) e promover uma hiperpolarização da membrana plasmática quando o E_m é positivo em relação ao potencial de equilíbrio do K^+ . Além desse efeito os fármacos desse grupo, por exemplo, pinacidil, diazóxido, nicorandil, também promovem: a) diminuição ou bloqueio dos movimentos rítmicos espontâneos; b) diminuição do estoque intracelular de cálcio e c) redistribuição de cálcio dentro da célula do músculo liso; o qual pode contribuir em parte para o efeito vasorrelaxante independente do E_m (Erne e Hermsmeyer, 1991; Monos e cols. 1995; Knot e cols, 1996).

Substâncias como o fator relaxante derivado do endotélio (FRDE, óxido nítrico) e fator natriurético atrial aumentam a concentração intracelular de GMPc e relaxam o músculo liso por atenuação do aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular em isolados de células e tecidos intactos (Rapoport e cols. 1985; Word e cols. 1991; Karaki e cols. 1988; Mc Daniel e cols. 1992). A redução na concentração de Ca^{2+} citoplasmático mediada pelo GMPc pode ser produzida por alguns mecanismos como: abertura de canais de K^+ que produzirá hiperpolarização da célula e posterior diminuição do influxo de Ca^{2+} pelos canais L (Thornbury e cols. 1991; Robertson e cols. 1993); diminuição direta do influxo de Ca^{2+} através de canais do tipo L de forma independente das alterações do E_m (Ishikawa e cols. 1993); ativação da bomba Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático e da membrana plasmática, dependente de GMPc com conseqüente diminuição do Ca^{2+} livre no citoplasma (Twort e van Breemen, 1988; Popescu e cols. 1985); aumento da atividade trocadora $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ como evidenciado em aorta de rato isolada (Itoh e cols. 1983).

Também pode ocorrer relaxamento muscular liso por hiperpolarização celular devida a aumento da probabilidade de abertura de canais K_{Ca} e K_{ATP} mediada por aumento da concentração de AMPc (Anwer e cols. 1992; Quayle e cols. 1994). Assim como o GMPc, o AMPc também pode ser considerado capaz de diminuir a concentração de Ca^{2+} intracelular por diminuição do influxo de Ca^{2+} tanto por alteração do potencial transmembrana como por apresentar efeitos diretos sobre os canais de Ca^{2+} do tipo L

(Rembold, 1996). O mecanismo primário para a diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular provocada pela elevação do AMPc é a ativação da proteína quinase G (GMPc-dependente) (Lincoln e cols. 1990). Estímulos fisiológicos que aumentam AMPc incluem agonistas que ativam receptores adrenérgicos β_2 , purinérgicos P_1 ou receptores do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC). Outra ação do AMPc pode ser a diminuição da sensibilidade ao Ca^{2+} intracelular. A ativação de proteínas quinases dependentes de AMPc produz fosforilação da quinase de cadeia leve da miosina em determinados sítios *in vitro* e isso pode diminuir sua sensibilidade ao Ca^{2+} (McDaniel e cols. 1991).

Como vimos anteriormente, a fosforilação da MLC_{20} pode ser considerada como iniciador do processo contrátil. Existe uma aceitação geral também de que o relaxamento do músculo liso contraído está associado com a desfosforilação da MLC_{20} (Somlyo e Somlyo, 1994 e 2000; Stull e cols. 1991), onde a atividade da miosina fosfatase é necessária para reverter à ativação da miosina pela fosforilação da sua cadeia leve regulatória. À medida que há diminuição na concentração de Ca^{2+} intracelular, ocorre inativação da MLCK dependente de Ca^{2+} , desviando o balanço de atividade quinase para fosfatase, o que resultará em desfosforilação da cadeia leve da miosina e relaxamento muscular (Word e Kamm, 1997). As fosfatases de serina e treonina são classificadas em quatro categorias gerais (tipos 1, 2A, 2B e 2C) de acordo com ativadores e inibidores específicos. A responsável pela desfosforilação da miosina no músculo liso é a proteína fosfatase do tipo 1 (PP1), e a subunidade catalítica desta enzima também está associada com o aparelho contrátil em músculo esquelético e cardíaco (Word e Kamm, 1997).

A dependência direta entre a força e a quantidade de miosina fosforilada não descreve adequadamente todos os processos celulares envolvidos na contração do músculo liso, e este é um dos aspectos da fisiologia muscular que ainda se encontra no início de sua compreensão. Os baixos níveis de fosforilação da MLC_{20} estão associados com um forte aspecto do funcionamento do músculo liso que é a sua capacidade de desenvolver força a um baixo consumo de energia (ATP) (Siegman e cols. 1980; Rembold e Murphy, 1993). Ainda não se conhece o mecanismo responsável para este estado, num misto de alta força, baixa fosforilação e baixo consumo de energia, chamado de estado de trinco (*“latch state”*), mas acredita-se que envolva um aumento na proporção das pontes cruzadas ativadas / desativadas, ou mesmo uma separação temporal entre a velocidade de desfosforilação e a velocidade de desacoplamento entre actina e miosina ou mesmo uma lentificação da liberação de ADP pelas pontes cruzadas, mantendo desta forma a força por

mais tempo (Khromov e cols. 1995). Pode haver também um estado de cooperatividade onde pontes cruzadas fosforiladas promovem a ativação de outras pontes não fosforiladas (Vyas e cols. 1992).

De uma forma geral, o músculo liso envolve uma diversidade de mecanismos para a regulação de sua contração ou de seu relaxamento. Esses mecanismos incluem muitas formas da própria regulação do Ca^{2+} intracelular bem como alguns aspectos das respostas celulares às alterações da concentração de Ca^{2+} citoplasmático. Como pontos principais dos processos celulares temos a ativação da MLCK que leva a fosforilação da cadeia leve da miosina na posição da serina 19. Esta fosforilação está associada com a atividade lítica de ATP da miosina ativada pela actina. Em estímulos fisiológicos o desenvolvimento de força depende do aumento da quantidade de miosina fosforilada, mas existem exemplos de eventos que não associam força e fosforilação da miosina. Isto sugere que outros mecanismos regulatórios também podem modular a força contrátil em alguns músculos. Essa diversidade de mecanismos pode permitir ao músculo liso a manutenção de suas funções normais como uma compensação de alguma deficiência genética, algum estado patofisiológico ou terapia farmacológica.

3.3 Transdução do sinal

Para se compreender melhor a contração muscular lisa é importante se entender como receptores localizados na membrana das células transduzem os sinais que lhes chegam (Lambert, 1993). A transdução de um sinal externo (hormônios, neurotransmissores, autacóides) envolve a ativação seqüencial de receptores que transpõem a membrana e proteínas ligadas a guanosina trifosfato (GTP) (proteínas G), as quais acoplam o receptor a várias enzimas efetoras. Essas atuam sobre precursores citoplasmáticos ou ligados à membrana para gerar um ou mais mensageiros regulatórios (Gilman, 1987; Berridge, 1993).

Na transdução do sinal do músculo liso intestinal as várias enzimas efetoras incluem fosfolipases específicas de fosfatidilinositol (PLC- β 1 e PLC- β 3) e específicas de fosfatidilcolina (PLC, PLD e PLA₂). A ativação dessas enzimas é diferente em células do músculo longitudinal e circular, gerando a mobilização de Ca^{2+} (através do 1, 4, 5-trifosfato de inositol (IP₃), AA e difosforibose adenosina ciclase - cADPR) e de outros

mensageiros (diacilglicerol – DAG) responsáveis pela fase inicial e mantida da contração, respectivamente (Exton e cols. 1991; Rhee e Choi, 1992; Murthy e cols. 1992; Berridge, 1993; Makhlof e Murthy, 1997). A liberação de Ca^{2+} dependente de IP_3 ocorre apenas no músculo circular. A mobilização de Ca^{2+} no músculo longitudinal envolve uma cascata iniciada pela ativação transitória induzida por agonistas de PLA_2 e formação de AA (Makhlof e Murthy, 1997). O AA induz ativação dos canais de cloreto (Cl^-) resultando em despolarização da membrana e influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Kuemmerle e Makhlof, 1994).

Acredita-se que os estoques de Ca^{2+} dos músculos lisos não sejam homogêneos e mencionam-se um componente sensível ao IP_3 e outro sensível ao Ca^{2+} (liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} - CICR) (Karaki e Weiss, 1988; Burdiga e cols. 1995). A importância funcional destes estoques é variável nos diferentes tipos de músculos lisos (Burdiga e cols, 1995). Acredita-se que há uma comunicação entre os diferentes estoques de Ca^{2+} intracelular e que o influxo de Ca^{2+} independe de sua liberação dos estoques intracelulares (Chen, e cols. 1996; Endo, 1977). No músculo gastrointestinal o influxo de Ca^{2+} induz liberação de Ca^{2+} pela ativação dos receptores sarcoplasmático de rianodina (canais de cálcio desta organela) e estimulam formação de cADPR o qual aumenta CICR (Makhlof e Murthy, 1997).

Outros receptores também podem regular diferentes mecanismos de transdução pós-sinápticos no mesmo tecido. A estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos no músculo liso longitudinal de íleo de cobaia pode, por exemplo: a) tornar o Em mais positivo através de uma proteína G sensível à toxina pertussis que se liga a um canal catiônico não seletivo, b) aumentar os níveis de IP_3 e c) aumentar os níveis de GMPc (Prestwich e Bolton, 1995). No músculo circular do fundo gástrico de cobaia a ativação desses receptores promove contração através de um influxo de Ca^{2+} sensível e insensível a nifedipina e libera Ca^{2+} induzido por IP_3 . Esta diversidade de efeitos pode ser consequência da presença de três tipos de receptores muscarínicos (cada um ligado a três diferentes subtipos de receptores muscarínicos) ou um único subtipo ligado a três mecanismos de transdução com diferentes afinidades (Parekh e Brading, 1991). Através da estimulação nervosa colinérgica ficou constatado que em músculos lisos intestinais a contração ocorre devido a um aumento na condutância ao Na^+ e ao Ca^{2+} o que promove uma despolarização e aumento da descarga de potenciais de ação (Hoyle e Burnstock, 1989).

A respeito dos receptores adrenérgicos, eles pertencem à classe dos receptores acoplados a proteínas G intermediárias de sistemas efetores (Schwinn, 1993). A ativação

de receptores α (que no intestino é inibitório) e β pelo sistema simpático deprime a motilidade do trato gastrintestinal (Rang e Dale, 1993). Receptores α_{2D} localizados em neurônios colinérgicos controlam a contração do músculo circular em íleo de cobaia. Nas camadas circular e longitudinal, receptores α_1 pré-sinápticos estão envolvidos no efeito relaxante das duas camadas (Liu e Coupar, 1997). Nos músculos esfinterianos e no íleo terminal a estimulação nervosa adrenérgica e a aplicação exógena de noradrenalina (NE) promovem contração (Hoyle e Burnstock, 1989).

A ativação de receptores histaminérgicos no músculo liso do intestino produz contração através da ativação de receptores H_1 (Hill, 1990). No músculo liso intestinal a HA ao interagir com esses receptores aumenta a frequência de potenciais de ação, em pequenas concentrações e despolarização em concentrações maiores. Esses efeitos ocorrem em consequência da abertura de canais iônicos permissíveis ao Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , os quais são operados por receptores H_1 . A despolarização ativa canais de Ca^{2+} voltagem dependentes (Bolton e cols. 1981). Um outro mecanismo envolveria a contração dependente da formação de IP_3 em consequência da ativação da proteína G acoplada ao receptor H_1 (Kamm e Stull, 1985).

OBJETIVOS

Acredita-se que algumas funções do epitélio intestinal, tais como secreção de água e cloreto, constituem um mecanismo de defesa contra microrganismos e /ou suas toxinas, no lúmen do trato gastrointestinal. A literatura sugere que esses efeitos podem ser mediados pela ativação de células do sistema imune presentes na mucosa intestinal, as quais liberam mediadores inflamatórios que, de forma direta ou indireta, agem no epitélio intestinal (Triadafilopoulos e cols. 1987a; Triadafilopoulos e cols. 1989; Linevsky e cols. 1990; Miller e cols. 1990; Ribeiro e cols. 1991; Schuerer-Maly e cols. 1994; Rocha, 1994; Burakoff e cols. 1995; Fonteles e cols. 1995; Jung e cols. 1995; Qiu e cols. 1996; Mahida e cols. 1996; Rocha e cols. 1997; Souza e cols. 1997; Rocha e cols. 1998).

As células inflamatórias presentes na mucosa intestinal agem de forma interativa com o sistema nervoso entérico no sentido de eliminar o agente agressor.

No entanto, há uma grande lacuna na literatura a respeito dos efeitos das enterotoxinas de uma forma geral sobre as propriedades mecânicas e eletrofisiológicas da musculatura lisa intestinal bem como a identificação dos mediadores inflamatórios envolvidos em suas fisiopatologias que possam contribuir de maneira efetiva para a compreensão de seus efeitos na motilidade intestinal. Dessa forma o presente trabalho tem os seguintes objetivos:

1. Geral

Caracterizar o efeito sobre as propriedades mecânicas da musculatura lisa intestinal, da enterotoxina (TxA) do *C. difficile* e elucidar a participação de mediadores inflamatórios e do Sistema Nervoso Entérico envolvidos nesses efeitos.

2. Específicos

2.1. Determinar o efeito da TxA purificada sobre parâmetros da atividade contrátil do trato gastrointestinal no curso temporal de 2, 6 e 18 h;

- 2.2. Investigar, na alteração dos parâmetros contráteis causado pela exposição de alças intestinais isoladas a TxA, a ocorrência de efeito local ou sistêmico;
- 2.3. Investigar a participação de mediadores inflamatórios com o uso de diferentes bloqueadores farmacológicos e se esses exerceriam alguma proteção na alteração dos parâmetros contráteis induzida pela TxA;
- 2.4. Investigar a ação do óleo essencial do *Croton zehntneri* nas alterações da contratilidade intestinal induzida pela TxA como um possível recurso terapêutico alternativo;
- 2.5. Investigar a participação do SNE no efeito da TxA na musculatura lisa intestinal;

MATERIAL E MÉTODOS

1. Preparação da Toxina A

A TxA, purificada e caracterizada, foi fornecida por Dr. David Lyerly (Blacksburg, VA-USA) através do programa internacional de colaboração em doenças infecciosas entre a Universidade Federal do Ceará e University of Virginia. TxA foi obtida do *C. difficile* (VPI 10463) cultivado de acordo com o método descrito previamente (Sullivan e cols. 1982; Lyerly e cols. 1982). A purificação da TxA foi realizada por precipitação em sulfato de amônia, através de cromatografia de troca iônica em coluna de dietilaminoetil sefarose (DEAE-sefarose), cromatografia de imunoafinidade (CL-6B) e precipitação a pH 5,6. A homogeneidade da TxA foi demonstrada por imunoeletroforese cruzada e eletroforese de gel poliacrilamida (Lyerly e cols. 1982).

Aliquotas de TxA 1 µg/mL foram preparadas a partir de uma concentração estoque de 1,1 mg/mL armazenada entre 2 a 8°C. A toxina foi diluída em salina fosfatada tamponada (PBS) estéril e em ambiente estéril de fluxo laminar sempre imediatamente antes de ser utilizada nos experimentos.

2. Soluções

Todos os sais utilizados no preparo das soluções fisiológicas foram de grau de pureza analítica, obtidos das companhias Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Germany) ou Reagen (Rio de Janeiro, RJ, BR).

A solução fisiológica de Tyrode, modificada, tinha a seguinte composição em mM: NaCl - 136; KCl - 5; CaCl₂ - 2; MgCl₂ - 0,98; NaH₂PO₄ - 0,36; NaHCO₃ - 11,9; Glicose - 5,5. A solução de PBS estéril, pH 7,4, foi gentilmente preparada e fornecida pela Dra. M^a do Carmo Pinho (IBIMED, UFC-BR). PBS foi utilizado em todos os experimentos como veículo e controle para TxA. As soluções de acetilcolina (ACh, 0,1 – 300 µM) e de cloreto de potássio (KCl, 7,5 - 120mM) foram inicialmente preparadas nas concentrações de 10⁻⁴ a 10⁻¹ M e 2,5 M respectivamente, para posterior adição da substância diretamente à câmara de superfusão e obtenção da concentração final desejada.

3. Óleo Essencial

O óleo essencial do *Croton zehntneri* foi obtido no Departamento de Química da Universidade Estadual do Ceará e analisado no PADETEC da Universidade Federal do Ceará, pela Dra. Selene de Moraes. Sua extração seguiu a técnica por arraste de vapor d'água, a partir do material vegetal (folhas) colhido no município de Viçosa do Ceará, CE, pelos Drs. Pedro Jorge Caldas Magalhães e José Henrique Leal-Cardoso. Excicatas do *Croton zehntneri* estão depositadas no Herbário Prisco Bezerra sob os números 3087 e 5728. A análise de sua constituição química por cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa revelou: anetol - 85,7%, estragol - 4,8%, transcariofileno - 0,9%, anisaldeído - 1,22%, 1,8-cineol - 2,95%, β -mirceno - 2,2% e 2,23% de substâncias não identificadas.

As soluções de óleo essencial (concentrações de 1 e 30 mg/mL) foram preparadas pela adição direta dos mesmos em solução de Tyrode modificada e homogeneizada por agitação manual sempre imediatamente antes de cada pré-tratamento.

4. Drogas

O anestésico utilizado foi cloridrato de quetamina (anestésico dissociativo), 25 mg/Kg associado a cloridrato de xilazina (miorelaxante não-narcótico), 5 mg/Kg (Brander, 1991; Booth e McDonald, 1992; Massone, 1994).

Para a avaliação farmacológica foram utilizados os seguintes fármacos: um glicocorticóide (dexametasona, 2 mg/Kg); um bloqueador específico da fosfolipase A₂ (quinacrina, 20 mg/Kg); um bloqueador específico de ciclooxigenase (indometacina, 2 mg/kg); um bloqueador específico de COX-2 (celecoxibe, 20 mg/kg); um bloqueador de receptores de leucotrienos (montelucaste sódico, 10 mg/Kg); dois bloqueadores da síntese de TNF- α (talidomida, 50 mg/kg e pentoxifilina, 50 mg/kg) e cloridrato de hexametônio (10 mg/kg), um ganglioplégico bloqueador das sinapses colinérgicas nicotínicas do sistema nervoso autônomo. Todas as drogas foram administradas em tempos pré-estabelecidos antes de cada procedimento experimental, que serão mencionados logo abaixo.

O cloridrato de hexametônio (HEX) para experimentos *in vitro* foi adicionado diretamente à câmara de superfusão a partir de uma solução estoque (100 mM) para obtenção de uma concentração final de 0,5 mM. A solução estoque foi preparada semanalmente e mantida em freezer.

5. Animais

Coelhos albinos, variedade Nova Zelândia, de ambos os sexos pesando entre 1,5 e 2,5 Kg foram obtidos junto ao criatório da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará (UPC-UFC). Estes animais foram colocados em jejum, com água *ad libitum*, 24h antes do início de todos os procedimentos experimentais.

6. Procedimento *In Vivo*:

Após jejum de 24h, água *ad libitum*, os animais foram pesados e levados à cirurgia. No grupo dos animais pré-tratados, antes da cirurgia os mesmos receberam a droga referente ao pré-tratamento em tempos e por vias pré-estabelecidos: dexametasona: 30 min. s.c.; indometacina: 60 min. s.c.; celecoxibe: 60 min. v.o.; quinacrina: 30 min. s.c.; talidomida: 60 min. s.c.; pentoxifilina: 60 min. s.c.; montelucaste sódico: 60 min. v.o.; HEX: 30 min. i.p.; OECz: 30 min e 24h, v.o. (Fig. 5).

6.1 Modelo de Alça Intestinal

O modelo de alça intestinal seguiu o modelo descrito por De & Chatterje, (1953) para estudos *in vivo* do efeito secretório do *Vibrio cholerae*.

Depois de pesados (pré-tratados ou não) os animais eram anestesiados por via i.m. pela associação xilazina e quetamina, esta última administrada após um intervalo de 10 a 15 min da injeção de xilazina. Ao entrarem em plano cirúrgico foi feita uma laparotomia mediana de 10 a 15 cm incidindo-se pele e abdômen, para visualização do intestino. Tendo o ceco sido exposto e o íleo identificado, uma porção de aproximadamente 30 cm de íleo terminal foi lavada com um volume de 3 mL de PBS estéril para remoção do excesso de resíduo alimentar remanescentes do jejum. Em seguida, segmentos de 6 a 8 cm de íleo foram subdivididos em dupla ligadura para isolamento das alças intestinais (4 a 6), mantendo a integridade da irrigação sanguínea natural.

Em cada experimento, as primeiras alças intestinais receberam apenas PBS estéril (controle interno) e as outras alças subseqüentes receberam TxA 1 µg/mL (grupo experimental), em iguais volumes de 1 mL cada (Fig. 5). Em alguns animais, em todas as alças injetou-se apenas PBS estéril (controle) e em outros não foi realizada cirurgia antes

do sacrifício. Para cada alça tratada com TxA houve um controle interno (alça vizinha, tratada com PBS, no mesmo animal) e outro externo (alças de animais onde todas elas receberam apenas PBS).

Após períodos de 2, 6 ou 18 horas da injeção na última alça intestinal de TxA ou PBS, os animais foram anestesiados (0,5 mL de uma mistura 2 : 3 de xilazina e quetamina, i.v.) e em seguida sacrificados com uma injeção de 2 mL de solução saturada de cloreto de potássio por via intracardiaca. Após o sacrifício do animal as alças intestinais são removidas para análise *in vitro*.

7. Procedimento *In Vitro*:

7.1 Atividade Contrátil

Para análise da força de contração, usou-se a técnica do registro isométrico. As alças intestinais recuperadas foram subdivididas em segmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento e montadas em câmaras de superfusão de 10 mL, contendo uma solução de Tyrode pH 7,4 mantida a 37° C e borbulhada com ar. Nas câmaras de superfusão os segmentos intestinais foram presos pela extremidade inferior a uma peça fixa e pela superior, a um transdutor de força (GRASS, Modelo FT 03), os quais foram conectados, através de pré-amplificador (DATAQ Modelo PM 1000), a um computador Pentium com software (WINDAQ) para registro e análise de dados (Fig.6).

Para se avaliar e quantificar as alterações da contratilidade, os segmentos intestinais foram submetidos a estimulação com concentrações crescentes de KCl (7,5 - 120mM) ou ACh (0,1 - 300 µM), e na resposta contrátil a cada concentração de um dado agonista foi aferida a amplitude máxima da contração fásica (resposta contrátil com crescimento inicial rápido para um valor máximo) induzida. Na relação entre concentração do agonista e a resposta contrátil foram singularizadas, para cada curva concentração-resposta a amplitude da resposta máxima e o cálculo da EC₅₀ (concentração capaz de promover 50 % do efeito máximo). As EC₅₀ foram calculadas por interpolação semilogarítmica.

Após o período de equilíbrio e antes do início da estimulação com agonistas foi medida a amplitude da movimentação espontânea. O registro de tensão para cada protocolo experimental só ocorria após um período mínimo de 45 - 60 min, o qual se fazia necessário para o equilíbrio dos segmentos intestinais com a nova condição.

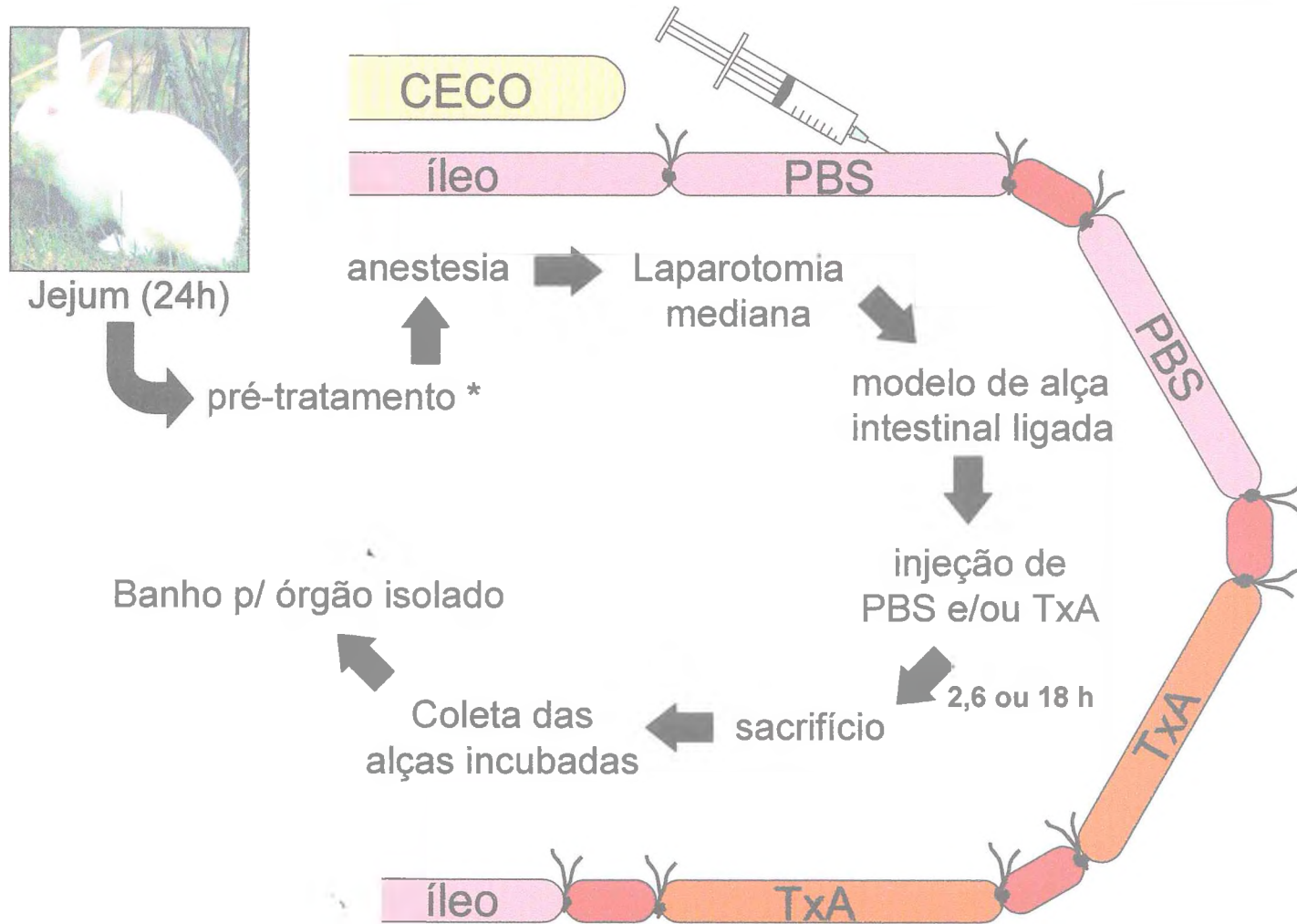
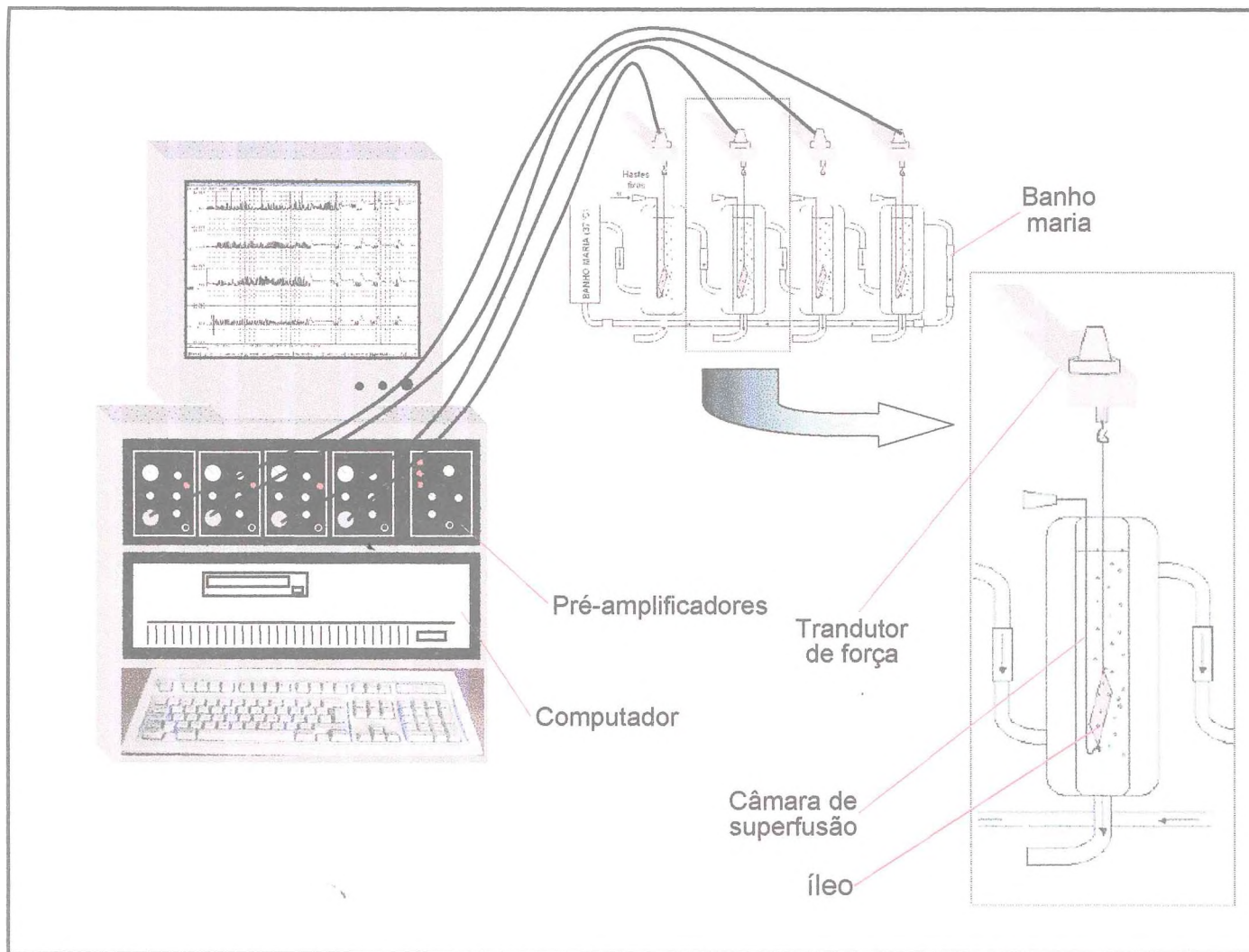


Fig.5. Protocolo experimental. *Somente nos animais que foram pré-tratados com um agente antiinflamatório ou hexametônio



João Luís Carvalho de Souza, 2003

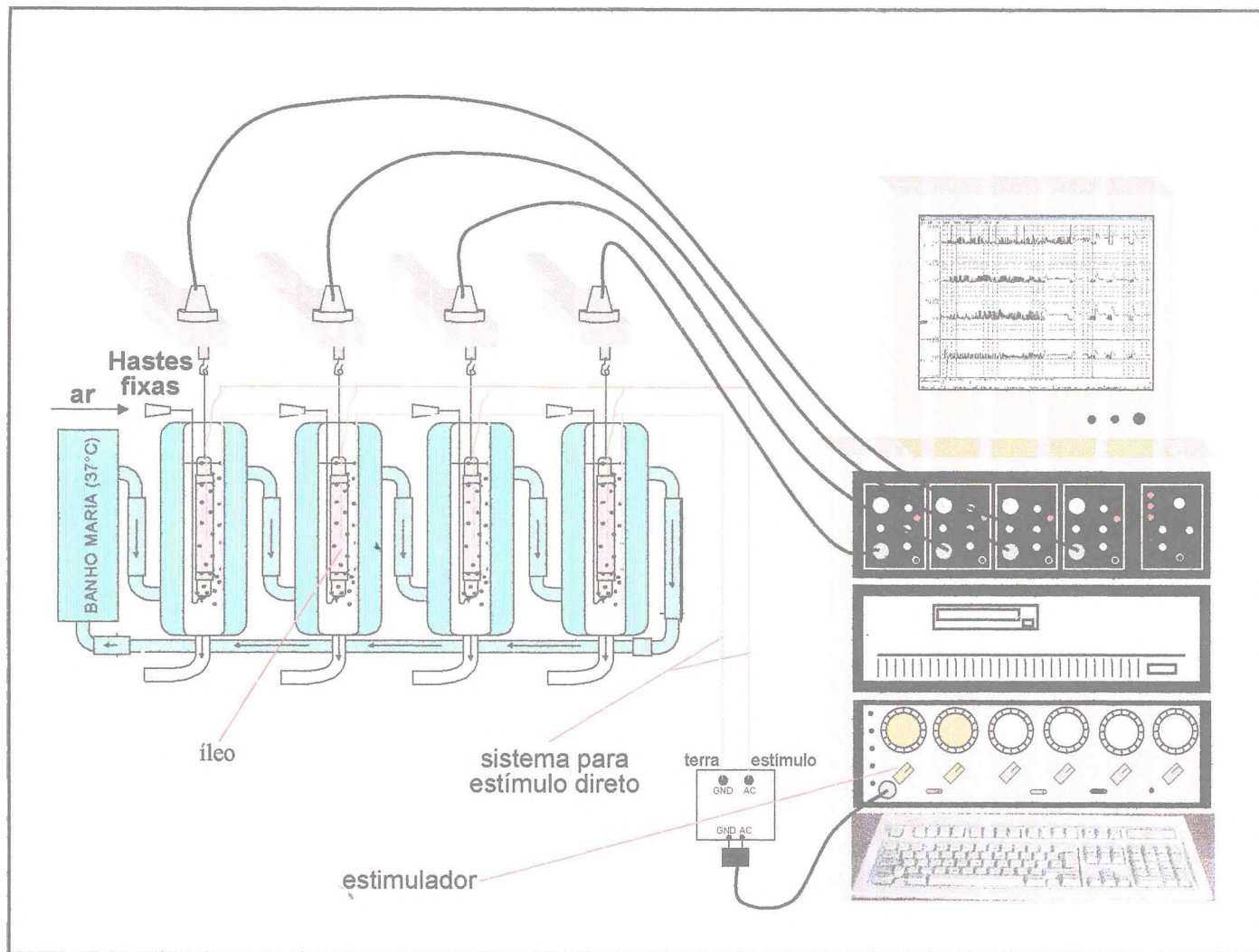
Fig. 6. Sistema para análise da atividade contrátil

Em algumas curvas concentração-efeito, mostradas em resultados, não fica claro pela mera inspeção da curva que se tenha atingido a resposta máxima. A aceitação da resposta máxima como tal, nesses casos, se baseou no critério de, em pelo menos a metade dos experimentos individuais que geraram o gráfico, já se haver atingido essa resposta (comprovado pelo fato de a resposta à maior concentração ser igual ou menor àquela da concentração inferior). E ao fato de em muitos outros gráficos desse estudo, que foram analisados, essa situação haver correspondido à resposta máxima. Nos gráficos mostrando relação concentração-efeito, optou-se por mostrar a amplitude total de contração atingida em resposta a uma dada concentração de um dado agonista, e nessa amplitude total está incluído o componente da movimentação espontânea. Para o cálculo da EC_{50} e da resposta máxima foi excluída a contribuição da movimentação espontânea. As contrações sucessivas induzidas por concentrações crescentes de qualquer um dos agonistas tiveram um grande efeito inibidor sobre a movimentação espontânea e, portanto a resposta máxima, com ou sem a inclusão da movimentação espontânea, são similares.

7.2 Estimulação Elétrica

Para os experimentos com estimulação elétrica, a técnica empregada foi à mesma usada para atividade contrátil, com modificações. Os segmentos intestinais, de 3 a 4 cm de comprimento, foram presos na extremidade inferior a uma haste fixa. Pela porção superior era colocado no interior do segmento intestinal um fio de prata isolado com cobertura de teflon exceto na extremidade que atuava como um eletrodo de estimulação. O estímulo elétrico foi gerado por um estimulador (GRASS, Modelo S 48). Para a análise dos parâmetros contráteis, foi utilizado a mesma técnica descrita no item 7.2 (Fig. 7). Um fio terra foi colocado por fora do segmento, imerso diretamente na solução da câmara de superfusão.

Após o período de equilíbrio, aplicaram-se trens de estímulos e registraram-se as respostas contráteis. Duas curvas estímulo-respostas (uma para voltagem e outra para frequência) foram realizadas para a escolha de um valor de voltagem dos pulsos e frequência dos trens que fossem capazes de induzir uma resposta submáxima (70 a 80% do efeito máximo). Nas duas curvas foi fixado em 30 o número de pulsos do trem e em 0,5 mseg. a duração de cada pulso. Em uma curva variou-se a voltagem (1 a 100 Volts) e a frequência foi fixada em 10 Hz. Em outra curva, variou-se a frequência (0,5 a 30 Hz) e a



João Luís Carvalho de Souza, 2003

Fig. 7. Sistema para análise da atividade contrátil com estimulação elétrica.

voltagem foi fixada em 60 Volts. O intervalo entre as duas curvas foi de 20 min. A duração do pulso do trem foi fixada em 0,5 ms porque pulsos em formato de onda quadrada com duração inferior a 1,0 ms estimulam diretamente apenas neurônios e não células musculares lisas (Percy, 1996). A partir dessas curvas escolheu-se uma combinação de frequência e voltagem com as quais os trens produziram uma resposta contrátil cuja amplitude foi sub-máxima.

Em alguns experimentos HEX era adicionado diretamente a câmara de superfusão 10 min antes da estimulação. Ainda em presença de HEX, logo após a estimulação elétrica submaximal, 60 mM de KCl e após a lavagem da alta concentração de potássio, 10^{-4} M de ACh, eram adicionados ao banho a fim de se induzir estímulos eletromecânico e farmacomecânico, respectivamente. Após lavagens sucessivas por um período mínimo de 30 a 60 min., uma nova série de estimulação com trens, K^+ e ACh era induzida a fim de ser observada a reversão do bloqueio pelo HEX.

8. Análise Estatística

Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média, com o número de experimentos (n) indicado entre parênteses. Para análise de significância estatística utilizou-se ANOVA seguida da técnica apropriada de contraste. Em alguns casos, em que um dado foi comparado apenas com outro se utilizou o teste - t de Student apropriado. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Comparações foram feitas entre um bloco constituído pelas respostas às várias concentrações de um dado agonista em um dado grupo e outro bloco, das respostas às várias concentrações desse agonista em outro grupo (p. ex.: todas as respostas ao K^+ em PBS_{p6} *versus* todas às respostas à esse íon em TxA_{T6}), descontando a contribuição das diferentes concentrações do agonista. Essas comparações, que denominaremos “comparação em bloco”, foram feitas pela ANOVA bidimensional (Two Way).

RESULTADOS

1. Efeito do manuseio cirúrgico experimental na atividade contrátil do músculo liso intestinal

Inicialmente investigou-se se o efeito do manuseio cirúrgico dos protocolos experimentais deprimiria a atividade contrátil. Dois conjuntos de animais foram utilizados: animais que não foram submetidos à cirurgia (grupo SC) e animais submetidos à cirurgia, nos quais as alças (segmentos) intestinais isoladas foram expostas apenas ao PBS. Desse segundo conjunto, foram retirados três grupos de acordo com o tempo em que os segmentos intestinais isolados no animal ainda vivo foram expostos ao PBS: PBS_{P2}, quando expostos por 2 h; PBS_{P6} quando expostos por 6 h e PBS_{P18} quando expostos por 18 h. Esses grupos por sua vez foram considerados controles para os outros experimentos, onde os animais tiveram as alças intestinais também expostas a TxA.

As amplitudes médias das movimentações espontâneas dos grupos PBS_{P2}, PBS_{P6} e PBS_{P18} foram $128,6 \pm 12,6$; $141,3 \pm 9,9$ e $164,3 \pm 35,1$ % respectivamente do controle (SC; **Tabela 1**) e dele diferiu significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA, Teste de Student-Newman-Keuls) apenas o grupo PBS_{P6} (**Fig. 8 A**). Quando comparados entre si, os grupos PBS_{P2}, PBS_{P6} e PBS_{P18} não mostraram diferença significativa entre as amplitudes de suas movimentações espontâneas (ANOVA, Teste de Student-Newman-Keuls).

As respostas contráteis a estimulação com diferentes concentrações dos dois agonistas (K^+ e ACh), nos grupos PBS_{P2}, PBS_{P6} e PBS_{P18} (**Fig. 8 B e C**) foram de uma maneira geral iguais ou de amplitudes maiores do que no controle (SC).

Nas respostas contráteis ao K^+ , em todos os grupos, as amplitudes médias das contrações em resposta a uma dada concentração do agonista variaram com o curso temporal do protocolo do manuseio cirúrgico apenas para algumas concentrações do agonista (20, 40, 100 e 120 mM) (**Fig. 8 B**). No entanto, não houve diferença significativa entre as amplitudes médias das respostas máximas em todos os grupos (PBS_{P2}, PBS_{P6} e PBS_{P18}) que foram $100,2 \pm 14,4$; $107,8 \pm 8,3$ e $118,7 \pm 3,4$ %, respectivamente do grupo SC (**Fig. 9**).

Comparados em blocos, em relação a resposta ao K^+ , os dados de todos os grupos (**Fig. 8 B**) não apresentaram diferenças significantes em relação ao grupo SC, exceto o grupo PBS_{P18} ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Quando comparados os dados desse

grupo (PBS_{P18}) com PBS_{P2} e PBS_{P6} também houve diferenças significantes entre eles ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

Quando a estimulação foi farmacomecânica, com o neurotransmissor ACh, as amplitudes médias das contrações em resposta a uma dada concentração do agonista foram para o grupo PBS_{P6}, de uma maneira geral, significativamente maiores ($p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) (**Fig. 8 C**) do que nos grupos SC e PBS_{P2}, sendo nesses dois últimos grupos muito similares. No grupo PBS_{P18} não houve diferenças estatísticas em relação a nenhum outro grupo. Comparados em blocos, os dados de todos os grupos apresentaram diferenças significantes em relação ao grupo SC ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional) exceto o grupo PBS_{P2}. Quando comparados entre si, todos os grupos foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

Quanto às respostas máximas, o grupo PBS_{P6} foi maior, atingindo $119,2 \pm 9,8$ % da amplitude média do grupo SC e diferindo significativamente do grupo PBS_{P2} que foi $80,6 \pm 5,8$ % do controle (grupo SC) (**Fig. 9**).

Apenas as EC₅₀ 49,4 mM de K⁺ para o grupo PBS_{P2} e 2,8 μM de ACh para o grupo PBS_{P18} foram estatisticamente diferente da EC₅₀ do grupo SC (ver **Tabela 3**).

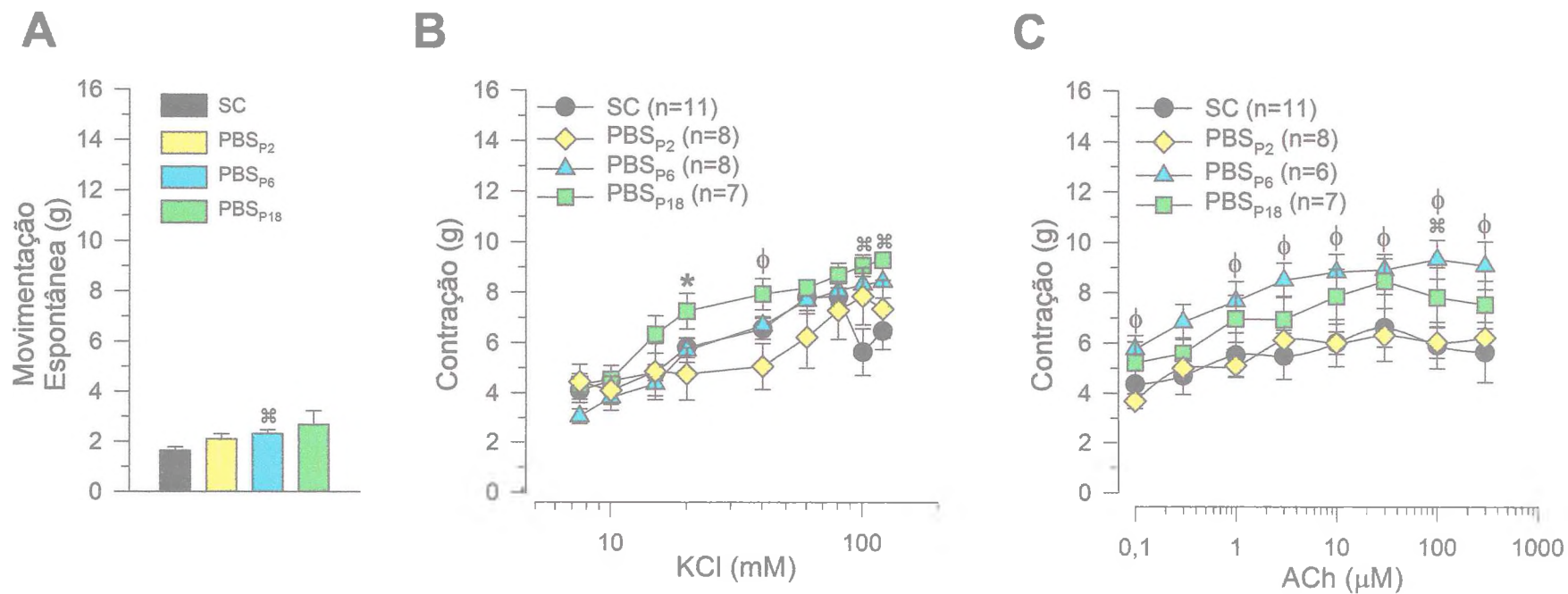


Fig. 8 - Efeito do manuseio cirúrgico experimental na atividade contrátil de segmentos de músculo liso intestinal.

A, amplitude (média \pm epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média \pm epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K^+ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média \pm epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μ M). *Significância em relação ao grupo SC; ^φSignificância em relação ao grupo PBS_{P2}; *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

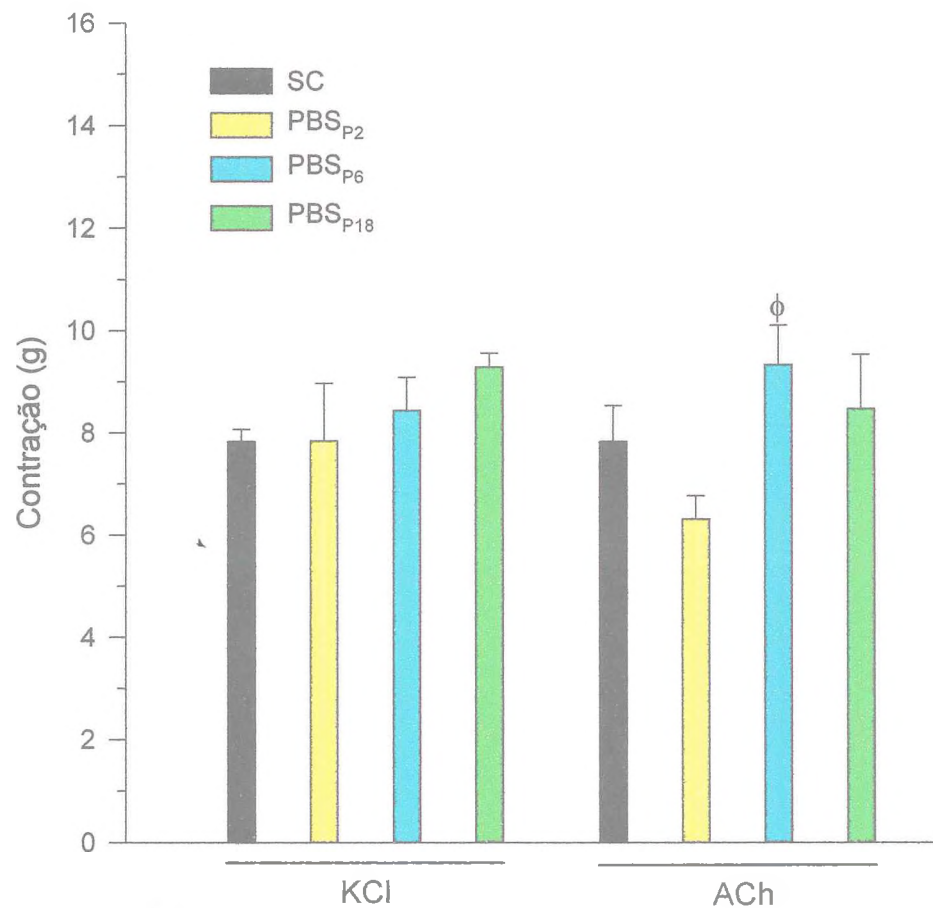


Fig. 9 - Efeito do manuseio cirúrgico experimental nas amplitudes (médias \pm epm) das respostas máximas aos agonistas. ^φSignificância em relação ao grupo PBS_{P2} ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

TABELA 1:MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DOS GRUPOS CONTROLES

TRATAMENTO	AMPLITUDE MÉDIA (g)
SC	1,636 ± 0,152 (n=11)
PBS _{P2}	2,104 ± 0,212 (n=12)
PBS _{P6}	^{ab} 2,313 ± 0,162 (n=8)
PBS _{P18}	2,688 ± 0,574 (n=8)

^{ab}Significância em relação ao grupo SC; $p \leq 0,05$; ANOVA com contraste.

2. Curso temporal da alteração da contratilidade intestinal induzida pela TxA do *C. difficile*.

Para caracterizar o curso temporal dos efeitos da TxA (1µg / segmento isolado) na contratilidade, segmentos intestinais isolados de um mesmo animal, ainda vivo, foram expostos individualmente a TxA ou ao PBS (controle interno). Em um conjunto de animais a exposição durou 2 h, em outro 6 h e em um terceiro grupo 18 h.

Os grupos de experimentos realizados em íleos expostos a TxA ou ao PBS por 2 h foram designados TxA_{T2} e PBS_{T2}, respectivamente. Similarmente, aqueles experimentos expostos a TxA ou ao PBS por 6 e 18 h foram designados TxA_{T6} e PBS_{T6} e TxA_{T18} e PBS_{T18}, respectivamente.

Experimentos *in vitro* realizados com os segmentos intestinais a partir destes grupos mostraram um incremento inicial, seguido de um declínio da contratilidade que manteve relação com o tempo de exposição dos segmentos intestinais a TxA tanto no grupo PBS_T quanto no TxA_T (Figs. 10, 11 e 12).

Em relação à movimentação espontânea (Fig. 13), PBS_{T2} e TxA_{T2} foram $194,0 \pm 26,3$ e $186,1 \pm 17,8$ % respectivamente do controle correspondente (PBS_{P2}) e dele diferiram significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) mostrando um incremento na exposição por 2 h. Uma depressão significativa da amplitude média dos grupos PBS_T foi observada durante exposições mais longas (PBS_{T18} foi apenas $57,4 \pm 7,0$ % do grupo PBS_{P18} e diferiu (foi menor) significativamente em relação PBS_{T2} e PBS_{T6}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). Nos grupos TxA_T, essa depressão foi proporcional ao período de exposição dos segmentos a TxA, significativo já a partir das 6 h (TxA_{T6} foi $47,8 \pm 3,9$ % do grupo TxA_{T2} e dele diferiu significativamente; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). É interessante observar que de uma forma geral a movimentação espontânea variou de um aumento (Fig. 10 A) a uma profunda depressão (Fig. 12 A) de suas amplitudes médias dentro do curso temporal escolhido, principalmente para os grupos TxA_T (Fig. 13).

A amplitude média das respostas contráteis tanto ao K⁺ (Fig. 10, 11 e 12 B) quanto a ACh (Fig. 10, 11 e 12 C) também apresentaram um padrão similar de alteração dentro dos três grupos (2, 6 e 18 h), tendo havido incremento para exposições mais curtas e inibição para as mais longas.

Em relação à resposta ao K^+ , mais especificamente, após 2 h de exposição, foram significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) apenas a amplificação da resposta a 10 mM no grupo PBS_{T2} em relação a PBS_{P2} atingindo $132,9 \pm 7,2 \%$ e a depressão da resposta a 10 e 15 mM no grupo TxA_{T2} em relação ao grupo PBS_{T2} que foi de $71,2 \pm 10,1$ e $69,1 \pm 6,0 \%$, respectivamente (**Fig. 10 B**). Para o tempo de exposição de 6 h, as alterações significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) observadas foram reduções das respostas a 20, 40 e 60 mM de K^+ no grupo TxA_{T6} , que foi $63,4 \pm 6,8$; $80,1 \pm 3,1$ e $66,8 \pm 4,4 \%$ da resposta do grupo PBS_{P6} e $58,1 \pm 6,2$; $72,8 \pm 2,8$ e $73,8 \pm 4,8 \%$ daquela do grupo PBS_{T6} . Observa-se ainda uma depressão significativa da resposta ao K^+ nas concentrações de 15 e 80 mM no grupo TxA_{T6} em relação ao grupo PBS_{T6} (**Fig. 11 B**). Para o tempo de exposição de 18 h, comparado aos tempos menores de exposição, houveram grandes diferenças. As respostas de 7,5; 10, 15 e 40 mM de K^+ diferiram entre si ($p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) para os três grupos. Para 20, 60 e 80 mM de K^+ as respostas dos grupos PBS_{T18} e TxA_{T18} diferiram significativamente do grupo PBS_{P18} , mas não diferiram entre si (**Fig. 12 B**).

Quando comparados em blocos os dados dos grupos TxA_T com PBS_T , em 2, 6 ou 18 h, em relação ao K^+ , houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Em relação aos grupos controles (PBS_P) correspondentes: PBS_{T2} e TxA_{T2} diferiram e foram maiores; PBS_{T6} e TxA_{T6} não diferiu e diferiu (foi menor) respectivamente; e PBS_{T18} e TxA_{T18} diferiram e foram menores (diferenças estatisticamente significantes. $p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

No que concerne às respostas máximas ao K^+ , para os tempos de exposição de 2 e 6 h não houveram diferenças significantes entre os três grupos. No entanto, para 18 h de exposição, às respostas máximas em PBS_{T18} e TxA_{T18} foram: $49,5 \pm 9,1$ e $38,6 \pm 4,0 \%$ da resposta máxima do grupo PBS_{P18} (**Tabela 2**; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) (**Fig. 14 A**). Em cada grupo, apresentado nas **Figs. 8, 10, 11 e 12** as respostas máximas diferiram das respostas a concentrações menores do agonista, ou seja, houve dependência da resposta em relação à concentração do agonista.

Para várias concentrações de ACh, no tempo de 2h, houve amplificação significativa das respostas contráteis nos dois grupos (PBS_{T2} e TxA_{T2}) em relação ao controle (PBS_{P2}) (**Fig. 10 C**). De maneira semelhante ao que ocorre com a amplitude média das movimentações espontâneas, a partir das 6 h (**Fig. 13**) de exposição, principalmente em relação aos grupos TxA_T , observa-se reduções significativas das

respostas contráteis a várias concentrações de ACh, principalmente nos grupos PBS_{T18} e TxA_{T18} (Figs. 11 C e 12 C).

Quando comparados em blocos os dados dos grupos TxA_T com PBS_T , em 2, 6 ou 18 h, em relação a ACh, também houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Em relação aos grupos controles (PBS_P) correspondentes: PBS_{T2} e TxA_{T2} diferiram e foram maiores; PBS_{T6} e TxA_{T6} diferiram (foram maior e menor, respectivamente); e PBS_{T18} e TxA_{T18} diferiram e foram menores (todas as diferenças foram estatisticamente significantes. $p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

As amplitudes médias das respostas máximas, em relação a ACh (Fig. 14 B), para os grupos PBS_{T2} e PBS_{T6} estão amplificadas, atingindo $177,7 \pm 17,0$ e $132,4 \pm 9,4$ %, respectivamente de seus controles (PBS_{P2} e PBS_{P6}) e deles diferindo significativamente (Tabela 2; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). No grupo PBS_{T18} ela está deprimida, atingindo apenas $46,9 \pm 9,0$ % de seu controle (PBS_{P18} ; Tabela 2; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). Nos grupos TxA_T : TxA_{T2} mostrou uma amplificação da resposta contrátil máxima que foi de $150,5 \pm 13,0$ % do seu controle (PBS_{P2} ; Tabela 2; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) enquanto TxA_{T6} e TxA_{T18} foram $74,2 \pm 3,4$ e $28,2 \pm 7,4$ %, respectivamente, mostrando uma depressão significativa dessa resposta em relação aos seus respectivos controles (PBS_P e PBS_T) já a partir das 6 h de exposição (Fig. 14 B; Tabela 2).

Em relação as EC_{50} , coerentemente com o que ocorreu com a movimentação espontânea e com a resposta ao K^+ e à ACh, no tempo de exposição de 2 h, em que se observou um aumento da contratilidade, houve uma diminuição das EC_{50} nos grupos PBS_{T2} e TxA_{T2} para 19,7 ($p \leq 0,05$; ANOVA) e 28,6 mM de K^+ e 0,6 e 0,8 μM de ACh, respectivamente, quando comparadas as EC_{50} dos grupos controles correspondentes (ver Tabela 4). Diferentemente, para os tempos de exposição de 6 e 18 h as EC_{50} apresentaram-se aumentadas em relação à dos controles correspondentes, embora tenha sido significativo estatisticamente apenas a EC_{50} de 4,2 μM de ACh do grupo PBS_{T6} e 39,4 mM de K^+ para o grupo TxA_{T18} (ver Tabela 4).

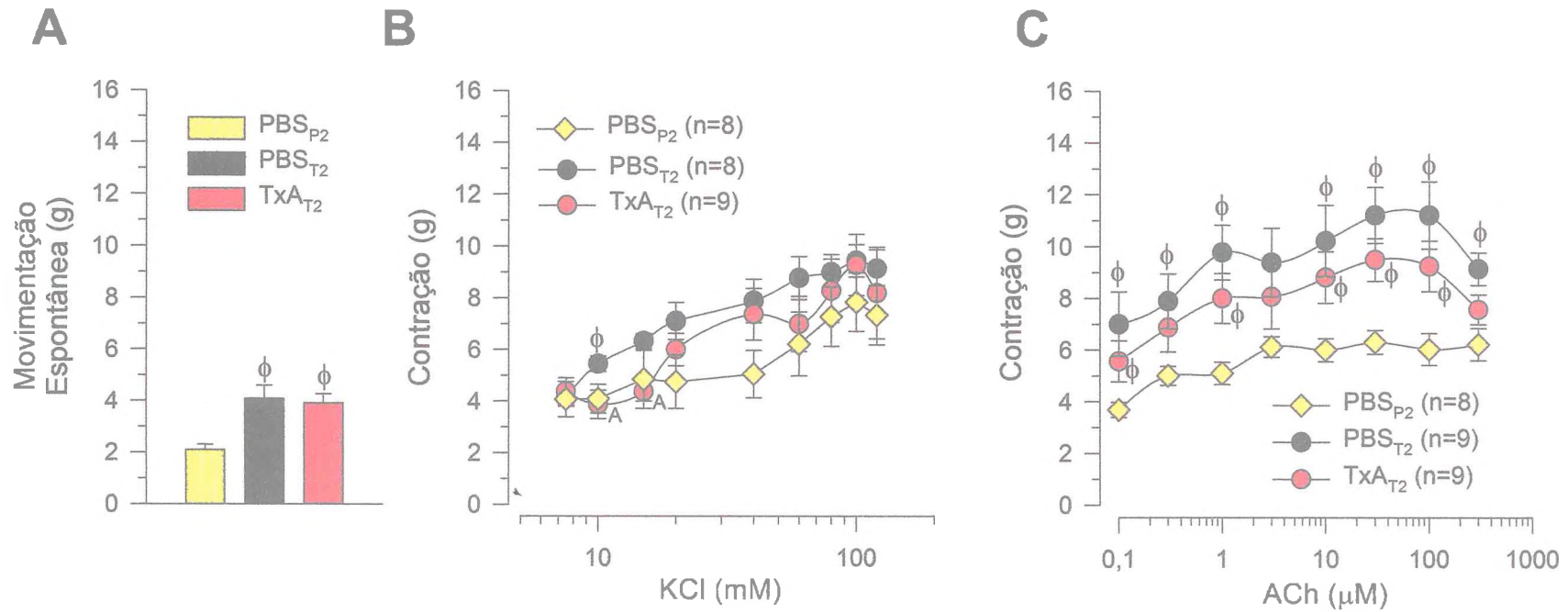


Fig. 10 – Alteração da contratilidade intestinal induzida em 2 h de exposição a TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K^+ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μ M); ϕ Significância em relação ao grupo PBS_{P2}; ^ASignificância em relação ao grupo PBS_{T2} ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

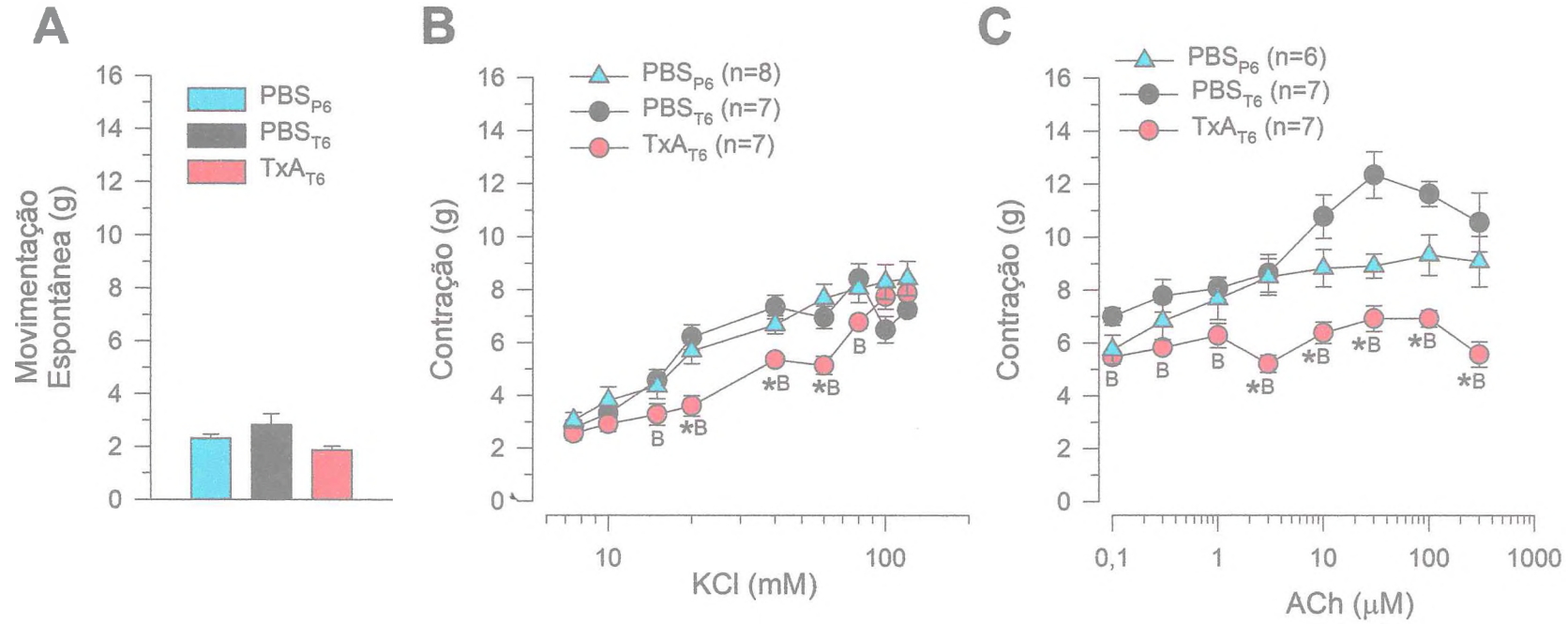


Fig. 11 – Alteração da contratilidade intestinal induzida em 6 h de exposição a TxA.

A, amplitude média \pm epm das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média \pm epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K^+ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média \pm epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μ M); *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6} ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

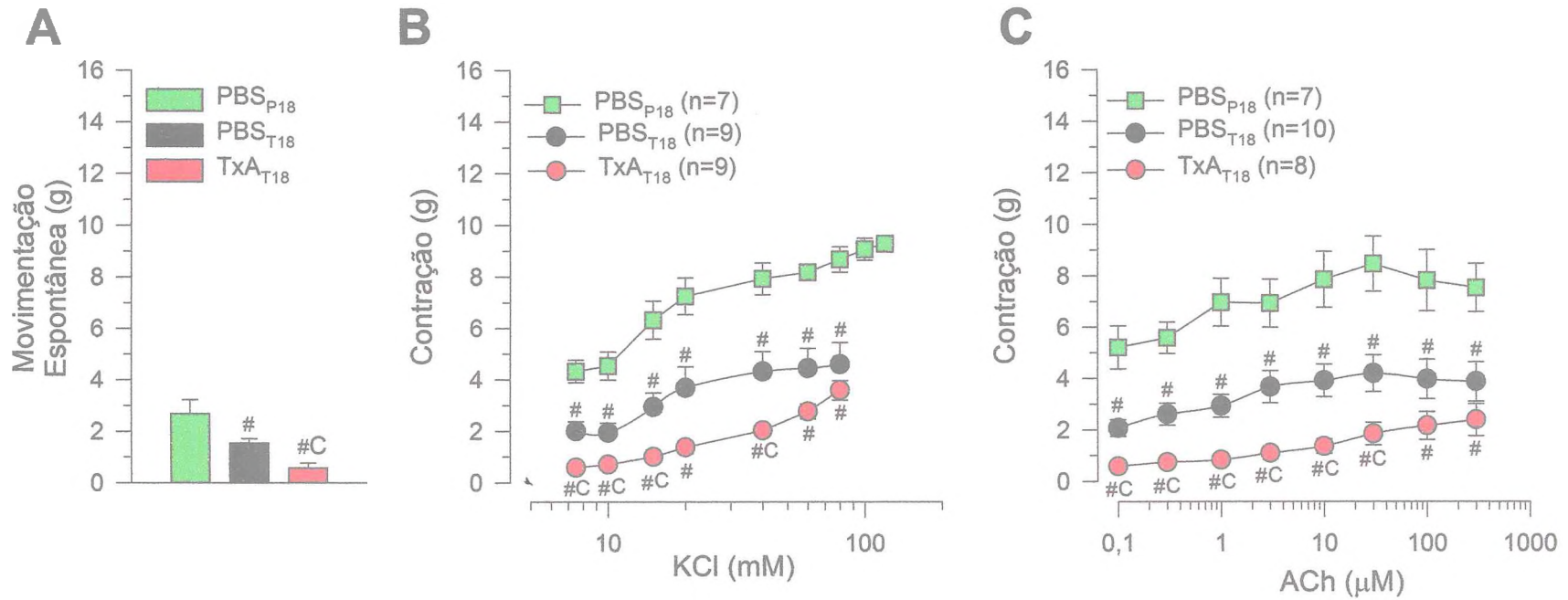


Fig. 12 – Alteração da contratilidade intestinal induzida em 18 h de exposição a TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μM). #Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; #C Significância em relação ao grupo PBS_{T18} (p<0,05; ANOVA com contraste).

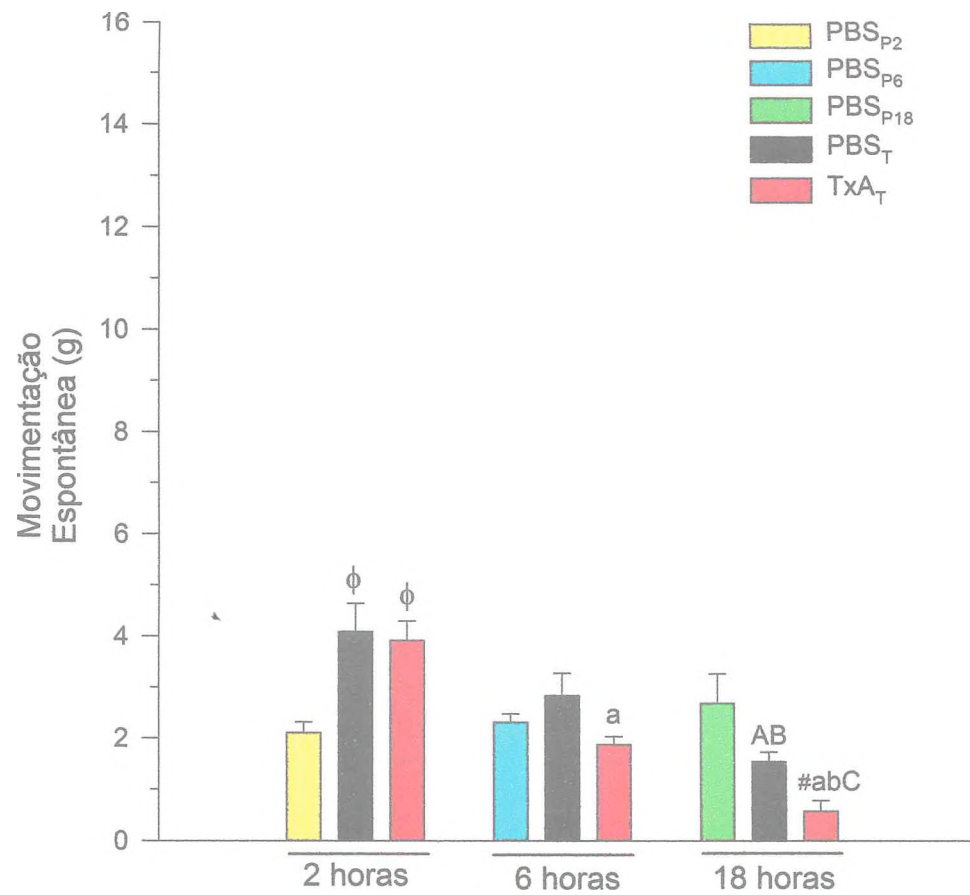


Fig. 13 – Alteração das movimentações espontâneas (média ± epm) no curso temporal dos efeitos induzidos pela TxA. ^φSignificância em relação ao grupo PBS_{P2}; ^ASignificância em relação ao grupo PBS_{T2}; ^aSignificância em relação ao grupo TxA_{T2}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18} (p≤0,05; ANOVA com contraste).

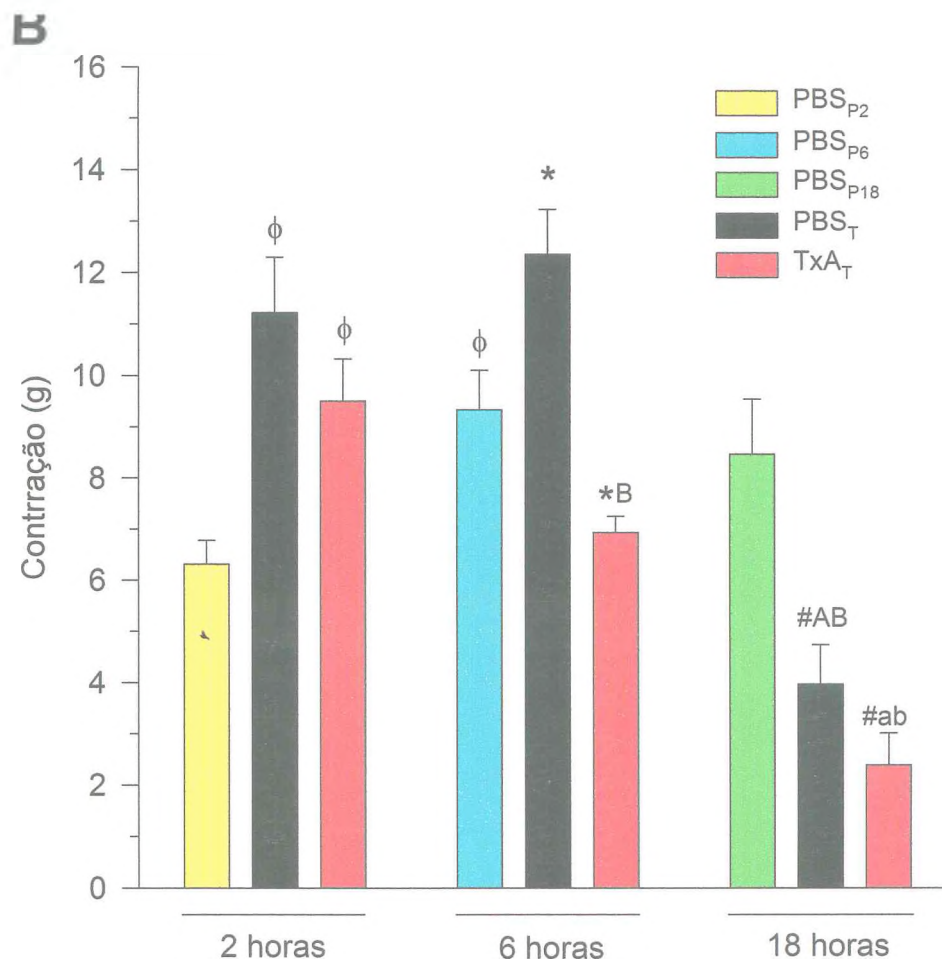


Fig. 14. B - Alteração das amplitudes (médias \pm epm) das respostas máximas a ACh no curso temporal da

TxA. ϕ Significância em relação ao grupo PBS_{P2}; *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; #Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^Significância em relação ao grupo PBS_{T2}; ^aSignificância em relação ao grupo TxA_{T2}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6} ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

TABELA 2:

AMPLITUDE DAS RESPOSTAS MÁXIMAS DOS GRUPOS CONTROLES E NÃO TRATADOS

TRATAMENTO	KCl (g)	ACh (g)
PBS _{P2}	7,281 ± 0,375 9 (n=8)	6,031 ± 0,620 (n=8)
PBS _{T2}	9,000 ± 0,571 (n=8)	^φ 11,222 ± 1,299 (n=9)
TxA _{T2}	8,375 ± 0,687 (n=9)	^φ 9,250 ± 0,977 (n=9)
PBS _{P6}	8,063 ± 0,490 (n=8)	^φ 10,214 ± 1,069 (n=6)
PBS _{T6}	8,429 ± 0,702 (n=7)	*11,643 ± 0,472 (n=7)
TxA _{T6}	6,786 ± 0,845 (n=7)	* ^B 6,929 ± 0,317 (n=7)
PBS _{P18}	8,679 ± 0,538 (n=7)	7,844 ± 1,031 (n=7)
PBS _{T18}	^{#AB} 4,597 ± 1,068 (n=9)	^{#AB} 3,971 ± 0,768 (n=10)
TxA _{T18}	^{#ab} 3,583 ± 1,152 (n=9)	^{#ab} 2,155 ± 0,542 (n=8)

^φSignificância em relação ao grupo PBS_{P2}; *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^ASignificância em relação ao grupo PBS_{T2}; ^aSignificância em relação ao grupo TxA_{T2}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; ^cSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^oSignificância em relação ao grupo TxA_{T18}; p<0,05; ANOVA com contraste.

TABELA 3:

MÉDIAS DAS EC₅₀ DOS GRUPOS CONTROLES

TRATAMENTO	KCl (mM)	ACh (μM)
SC	21,913 ± 1,169 (n=10)	0,721 ± 1,303 (n=10)
PBS _{P2}	[*] 49,464 ± 1,173 (n=7)	0,933 ± 1,826 (n=6)
PBS _{P6}	22,738 ± 1,159 (n=8)	1,255 ± 1,302 (n=6)
PBS _{P18}	17,655 ± 1,186 (n=7)	[*] 2,802 ± 1,740 (n=6)

^{*}: Significância em relação ao grupo SC; p<0,05; ANOVA com contraste.

TABELA 4:

MÉDIAS DAS EC₅₀ DOS GRUPOS NÃO TRATADOS

TRATAMENTO	KCl (mM)	ACh (μM)
PBS _{P2}	49,464 ± 1,173 (n=7)	0,933 ± 1,826 (n=6)
PBS _{T2}	^φ 19,699 ± 1,183 (n=9)	0,675 ± 1,188 (n=9)
TxA _{T2}	28,683 ± 1,224 (n=8)	0,812 ± 1,356 (n=8)
PBS _{P6}	22,738 ± 1,159 (n=8)	1,255 ± 1,302 (n=6)
PBS _{T6}	20,627 ± 1,145 (n=7)	*4,259 ± 1,357 (n=7)
TxA _{T6}	34,765 ± 1,118 (n=7)	1,399 ± 1,726 (n=6)
PBS _{P18}	17,655 ± 1,186 (n=7)	2,802 ± 1,740 (n=6)
PBS _{T18}	23,186 ± 1,113 (n=9)	1,960 ± 1,561 (n=10)
TxA _{T18}	[#] 39,423 ± 1,168 (n=8)	9,651 ± 1,580 (n=7)

^φSignificância em relação ao grupo PBS_{P2}; *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; p<0,05; ANOVA com contraste.

3. Participação de mediadores inflamatórios na depressão da contratilidade intestinal induzida pela TxA do *C. difficile*

Demonstrada a ação depressiva da exposição de segmentos intestinais durante 6 ou 18 h a TxA do *C. difficile*, procurou-se verificar se alguns tipos de agentes antiinflamatórios teriam efeito protetor em relação a essa atividade inibitória.

Foram quantificados em animais pré-tratados com agentes antiinflamatórios, os efeitos da exposição de segmentos intestinais a TxA durante 6 e 18 h. Os grupos tratados foram designados como nos exemplos: PBS_{T6, DEX} ou TxA_{T6, DEX}, referindo-se a uma exposição ao PBS ou a TxA de segmentos intestinais tratados com dexametasona, período de exposição de 6 h. Os resultados encontrados nos grupos TxA_T de animais tratados foram comparados aos resultados encontrados nos seus respectivos controles (grupos PBS_{P6} e PBS_{P18}) bem como aos grupos correspondentes TxA_T de animais não tratados.

A interpretação dos dados obedeceu à sistemática que segue: se para um dado efeito induzido pela TxA (por exemplo: valor da resposta máxima à ACh em TxA_{T18} foi significativamente diferente daquele em PBS_{P18}) e após um dado tratamento, aquele valor se reaproximou do controle e não houve mais diferença significativa em relação a esse controle (por exemplo: a resposta máxima à ACh em TxA_{T18, DEX} não foi significativamente diferente de PBS_{P18}) ou não apenas se reaproximou mas ultrapassou o valor controle, concluiremos que esse tratamento bloqueou esse efeito (no exemplo a dexametasona bloqueou o efeito depressor da TxA sobre a resposta máxima à ACh). No caso de existir essa ultrapassagem, diremos que houve um efeito adicional. Se, após um dado tratamento, o valor do parâmetro em consideração se aproxima do controle, mas ainda é significativamente diferente do valor desse controle, concluiremos que houve bloqueio parcial, (por exemplo: a resposta máxima à ACh em TxA_{T18, CZ30} foi significativamente maior que a mesma resposta em TxA_{T18}, porém essa resposta não foi suficiente para atingir níveis significativamente semelhantes do valor controle, ou seja PBS_{P18}).

3.1 Atividade da dexametasona na depressão da contratilidade induzida pela TxA do *C. difficile*.

As amplitudes médias das movimentações espontâneas dos segmentos intestinais pré-tratados com dexametasona (DEX) e expostos ao PBS ou a TxA durante 6 h (grupos PBS_{T6, DEX} e TxA_{T6, DEX}, respectivamente) foram $115,3 \pm 8,3$ e $108,1 \pm 11,4$ % do controle

(PBS_{P6}; **Tabela 1**) e dele não diferiram significativamente (**Fig. 15 A**). Nos grupos PBS_{T18}, DEX e TxA_{T18}, DEX (18 h de exposição a TxA) as amplitudes médias das movimentações espontâneas que foram $164,8 \pm 23,5$ e $118,5 \pm 17,5$ % do controle correspondente (PBS_{P18}; **Tabela 1**) também não apresentaram diferença significativa quando comparadas entre si (**Fig. 16 A**). Ainda em relação a PBS_{T18}, DEX e TxA_{T18}, DEX esses foram $287,2 \pm 41,1$ e $554,0 \pm 81,9$ %, respectivamente de PBS_{T18} e TxA_{T18}, diferindo significativamente (**Tabela 1**; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). PBS_{T6}, DEX e TxA_{T6}, DEX não diferem significativamente de PBS_{T6} e TxA_{T6}, respectivamente (**Tabela 1**).

As respostas contráteis a estimulação com diferentes concentrações dos dois agonistas (K⁺ e ACh), nos grupos PBS_{T6}, DEX e TxA_{T6}, DEX (**Fig. 15 B e C**) e PBS_{T18}, DEX e TxA_{T18}, DEX (**Fig. 16 B e C**) foram de uma maneira geral iguais ou de amplitudes maiores do que nos controles (PBS_{P6} e PBS_{P18}), respectivamente.

Quando comparada às amplitudes médias das respostas máximas ao K⁺ (**Fig. 17 A**), TxA_{T6}, DEX foi $82,2 \pm 6,5$ e $88,1 \pm 6,9$ % de PBS_{P6} e TxA_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significantes) e TxA_{T18}, DEX foi $126,9 \pm 6,6$ e $328,9 \pm 17,2$ % de PBS_{P18} e TxA_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações significativas, $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). Em PBS_{T6}, DEX a resposta máxima ao K⁺ foi $86,8 \pm 6,7$ e $86,9 \pm 6,8$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6}, respectivamente (alteração não significativa) e em PBS_{T18}, DEX foi $124,4 \pm 13,7$ e $251,4 \pm 27,6$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18}, respectivamente (alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T18}, $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, em relação ao K⁺, os dados dos grupos PBS_{T6}, DEX com TxA_{T6}, DEX (**Fig. 15 B**) não apresentaram diferenças significantes. No entanto, o grupo PBS_{P6} quando comparado ao grupo TxA_{T6}, DEX foi estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Quando comparados os dados dos grupos PBS_{T18}, DEX com TxA_{T18}, DEX, (**Fig. 16 B**) também não apresentaram diferenças significantes entre si, mas quando ambos foram comparados com os dados do grupo PBS_{P18}, diferiram (foram maiores) significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

As respostas máximas à estimulação com ACh (**Fig. 17 B**) nos grupos TxA_{T6}, DEX e TxA_{T18}, DEX foram $96,0 \pm 14,6$ e $110,2 \pm 13,1$ % daquela no grupo PBS_{P6} e PBS_{P18}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração não significativa) e $108,4 \pm 16,5$ e $390,6 \pm 46,5$ % de TxA_{T6} e TxA_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T18}, $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). No grupo PBS_{T6}, DEX a resposta a ACh foi $81,0 \pm 13,6$ e $50,9 \pm 8,6$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**;

alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T6} , $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e em $PBS_{T18, DEX}$ foi $137,9 \pm 12,7$ e $293,8 \pm 27,2$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T18} , $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, em relação à ACh, todos os dados dos grupos $PBS_{T6, DEX}$ com $TxA_{T6, DEX}$ (**Fig. 15 C**) não apresentaram diferenças significantes, no entanto quando comparados os dados dos grupos $PBS_{T6, DEX}$ com o do grupo PBS_{T6} , houve diferença significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Os dados dos grupos $PBS_{T18, DEX}$ e $TxA_{T18, DEX}$ (**Fig. 16 C**) quando comparados em blocos apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Ainda quando comparados em blocos os dados dos grupos $PBS_{T18, DEX}$ e $TxA_{T18, DEX}$ com os do controle correspondente (PBS_{P18}), os mesmos diferiram (foram maiores) significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

Das EC_{50} 30,1 mM de K^+ e 6,1 μM de ACh para o grupo $TxA_{T6, DEX}$ foi diferente das EC_{50} dos grupos correspondentes de TxA_{T6} , apenas a EC_{50} para a ACh. Já as EC_{50} de 22,6 mM de K^+ e 0,6 μM de ACh do grupo $TxA_{T18, DEX}$, diferiram significativamente das EC_{50} dos grupos correspondentes de TxA_{T18} (ver **Tabela 5**).

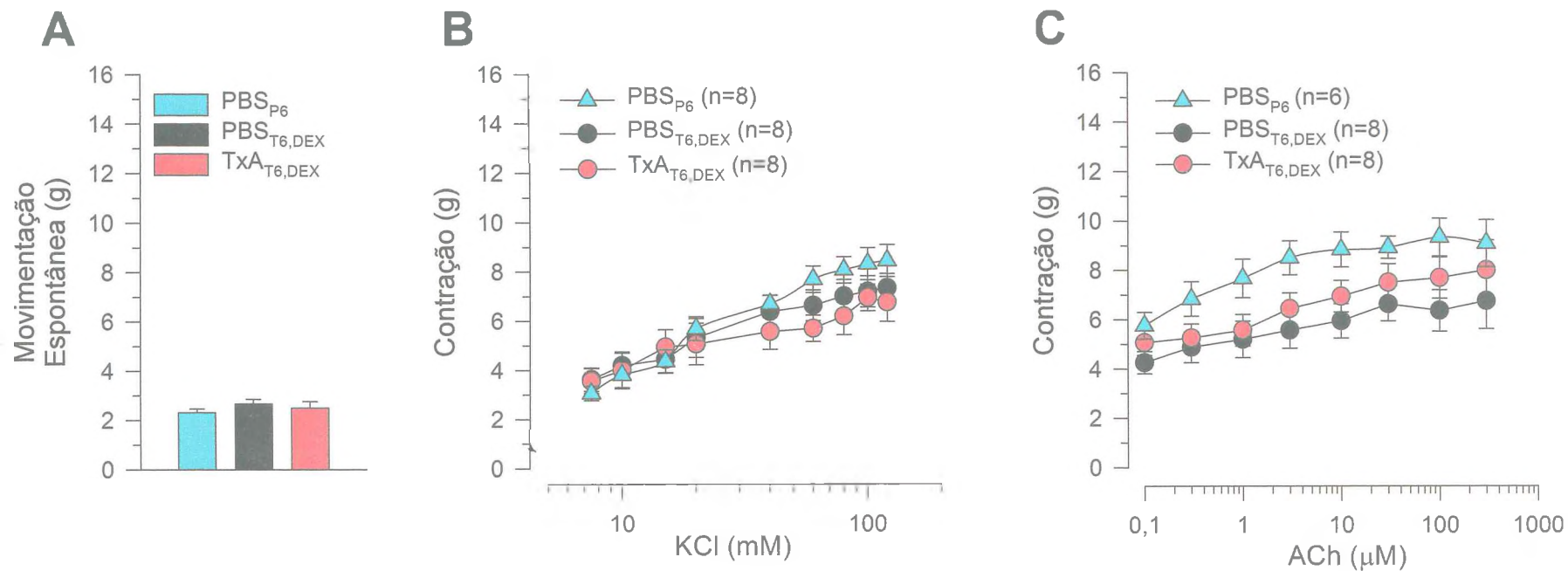


Fig. 15 – Atividade da dexametasona nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K^+ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μ M).

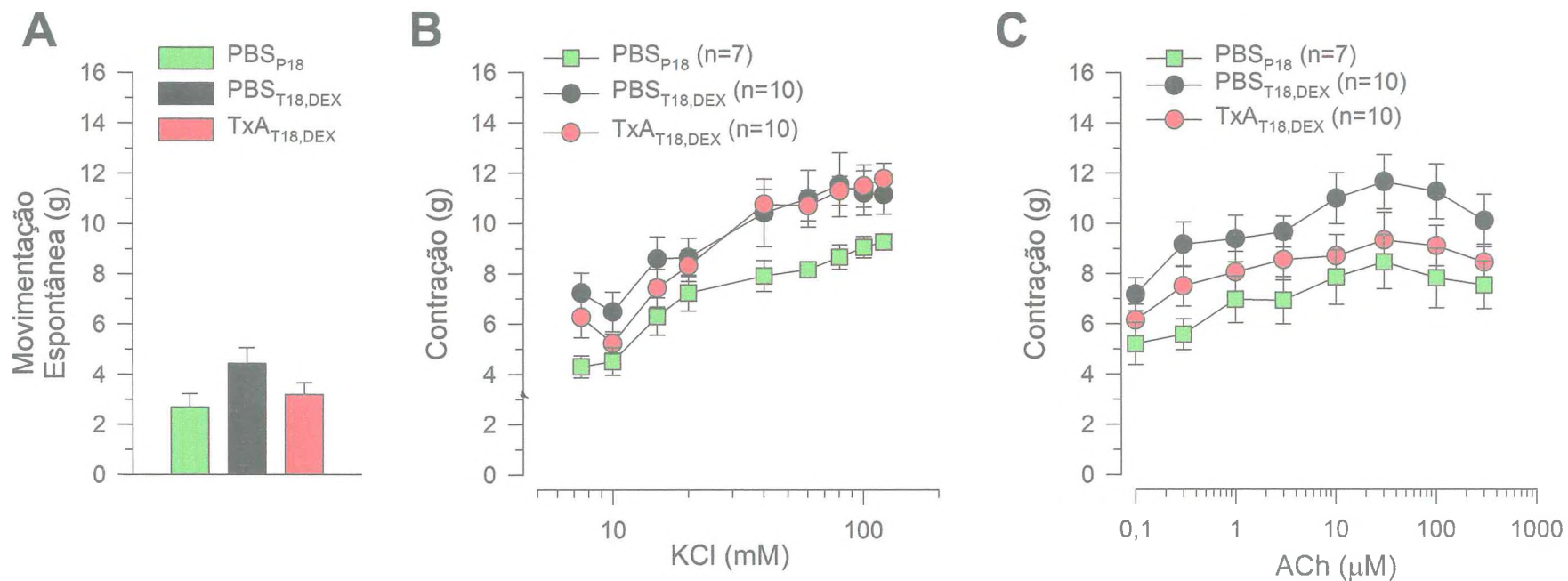


Fig. 16 – Atividade da dexametasona nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K^+ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 µM).

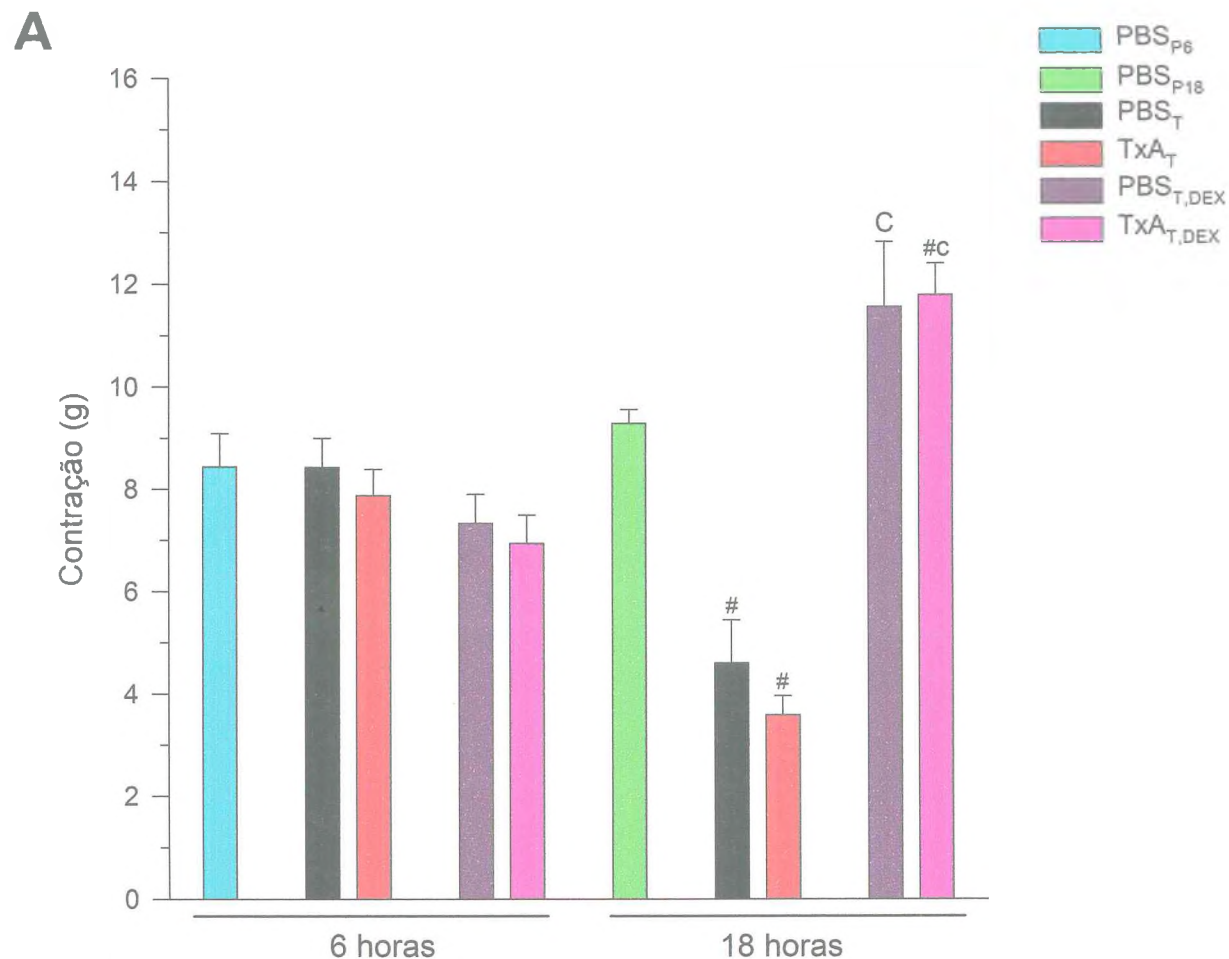


Fig. 17. A – Amplitudes (médias \pm epm) das respostas máximas ao K^+ dos segmentos intestinais pré-tratados com dexametasona e expostos ao PBS ou a TxA. #Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^CSignificância em relação ao grupo TxA_{T18} ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

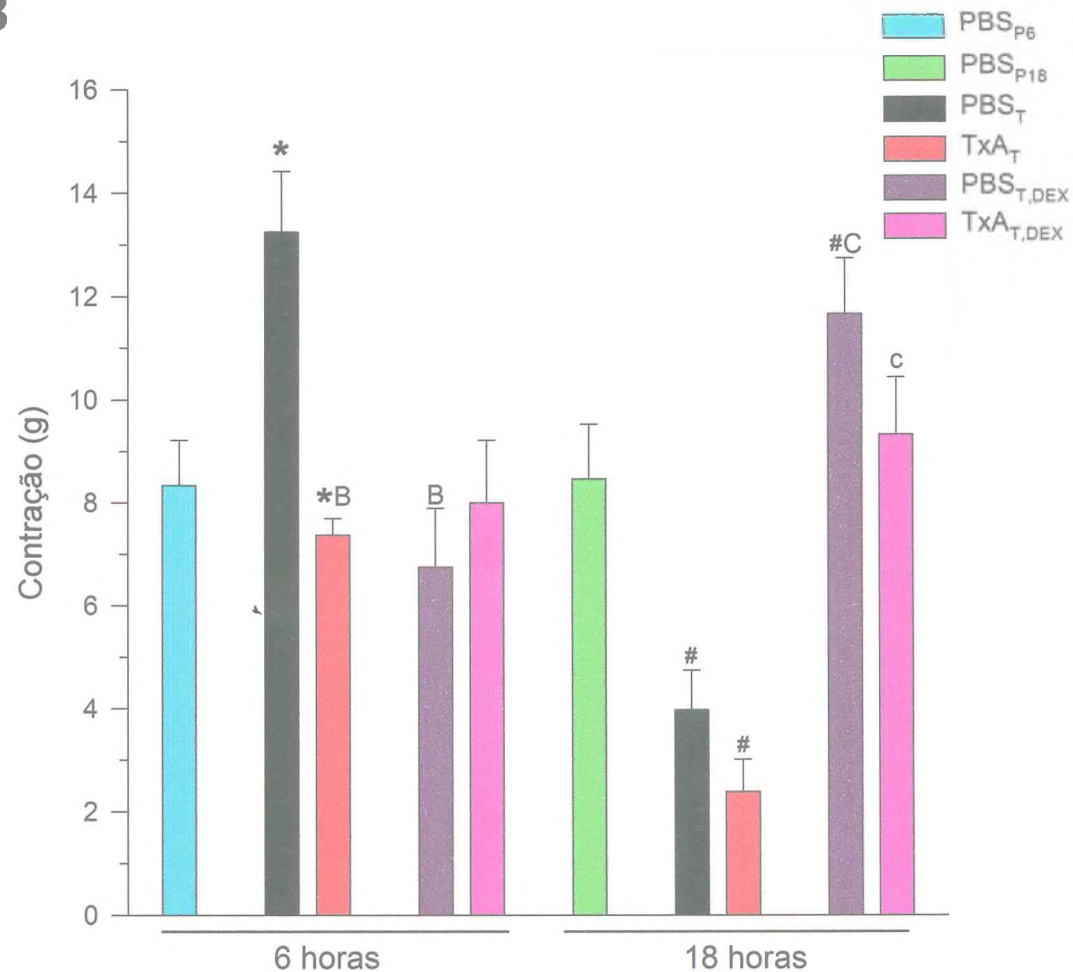
B

Fig. 17. B – Amplitudes (médias \pm epm) das respostas máximas à ACh dos segmentos intestinais pré-tratados com dexametasona e expostos ao PBS ou a TxA. *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; #Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^CSignificância em relação ao grupo TxA_{T18} ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

TABELA 5:
MÉDIAS DAS EC₅₀ DOS GRUPOS TRATADOS COM DEXAMETASONA

TRATAMENTO	KCl (mM)	ACh (μM)
PBS _{P6}	22,738 ± 1,159 (n=8)	1,255 ± 1,302 (n=6)
PBS _{T6}	20,627 ± 1,145 (n=7)	4,259 ± 1,357 (n=7)
TxA _{T6}	34,765 ± 1,118 (n=7)	1,399 ± 1,726 (n=6)
PBS_{T6,DEX}	24,224 ± 1,154 (n=8)	2,950 ± 1,732 (n=8)
TxA_{T6,DEX}	30,130 ± 1,247 (n=8)	^{*b} 6,131 ± 1,339 (n=8)
PBS _{P18}	17,655 ± 1,186 (n=7)	2,802 ± 1,740 (n=6)
PBS _{T18}	23,186 ± 1,113 (n=9)	1,960 ± 1,561 (n=10)
TxA _{T18}	39,423 ± 1,168 (n=8)	9,651 ± 1,580 (n=7)
PBS_{T18,DEX}	16,434 ± 1,149 (n=8)	1,601 ± 1,582 (n=9)
TxA_{T18,DEX}	^c 22,673 ± 1,081 (n=6)	^{#c} 0,640 ± 1,368 (n=10)

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^cSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^oSignificância em relação ao grupo TxA_{T18}; p<0,05; ANOVA com contraste.

3.2 Efeito de um bloqueador da fosfolipase A₂ sobre a depressão da contratilidade intestinal induzida pela TxA do *C. difficile*.

As amplitudes médias das movimentações espontâneas dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com quinacrina (QUI) e expostos ao PBS ou a TxA durante 6 h (grupos PBS_{T6, QUI} e TxA_{T6, QUI}, respectivamente) foram $165,7 \pm 8,3$ e $132,1 \pm 10,9$ % do controle (PBS_{P6}; **Tabela 1**) e dele diferiram (foram maiores) significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls; **Fig. 18 A**). Nos grupos PBS_{T18, QUI} e TxA_{T18, QUI} (18 h de exposição a TxA) as amplitudes médias das movimentações espontâneas que foram $44,7 \pm 5,3$ e $25,7 \pm 6,7$ % do controle correspondente (PBS_{P18}; **Tabela 1**) e dele também apresentaram diferença (foram menores) significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls; **Fig. 19 A**). Em relação aos grupos PBS_T e TxA_T, PBS_{T6, QUI} e TxA_{T6, QUI} foram $135,3 \pm 6,7$ e $162,9 \pm 13,5$ %, respectivamente de PBS_{T6} e TxA_{T6} (**Tabela 1**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T6}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Teste de Dunn) e PBS_{T18, QUI} e TxA_{T18, QUI} foram $78,0 \pm 9,2$ e $120,2 \pm 31,4$ % respectivamente de PBS_{T18} e TxA_{T18} (**Tabela 1**; alterações não significantes).

As respostas contráteis a estimulação com diferentes concentrações dos dois agonistas (K⁺ e ACh), nos grupos PBS_{T6, QUI} e TxA_{T6, QUI} (**Fig. 18 B e C**) e PBS_{T18, QUI} e TxA_{T18, QUI} (**Fig. 19 B e C**) foram de uma maneira geral iguais ou de amplitudes menores do que nos respectivos controles (PBS_{P6} e PBS_{P18}).

Quando comparada às amplitudes médias das respostas máximas ao K⁺ (**Fig. 20 A**), TxA_{T6, QUI} foi $102,7 \pm 6,6$ e $110,0 \pm 7,1$ % de PBS_{P6} e TxA_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significantes) e TxA_{T18, QUI} foi $52,6 \pm 6,3$ e $136,4 \pm 16,3$ % de PBS_{P18} e TxA_{T18}, respectivamente (diferença significativa (menor) em relação a PBS_{P18}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Teste de Dunn). Em PBS_{T6, QUI} a resposta máxima ao K⁺ foi $108,1 \pm 5,6$ e $108,2 \pm 5,6$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração não significativa) e em PBS_{T18, QUI} foi $49,0 \pm 10,6$ e $99,1 \pm 21,3$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa (menor) em relação ao grupo PBS_{P18}, $p \leq 0,05$; ANOVA, Teste de Dunn).

Comparados em blocos, em relação ao K⁺, todos os dados dos grupos PBS_{T6, QUI} com TxA_{T6, QUI} (**Fig. 18 B**) não apresentaram diferenças significantes. No entanto quando ambos foram comparados em blocos com os grupos PBS_{T6} e TxA_{T6}, respectivamente, diferiram significativamente. O grupo PBS_{T6, QUI} também diferiu significativamente de

PBS_{P6} ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Os dados dos grupos PBS_{T18, QUI} e TxA_{T18, QUI}, (**Fig. 19 B**) quando comparados entre si, também não apresentaram diferenças significantes, no entanto quando ambos foram comparados com os dados do grupo PBS_{P18}, diferiram (foram menores) significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Como PBS_{T18, QUI} e TxA_{T18, QUI} não diferiram entre si, mas ambos diferiram significativamente de PBS_{P18}, comparou-se em blocos, PBS_{T18, QUI} e TxA_{T18, QUI} com os grupos PBS_{T18} e TxA_{T18}, respectivamente. Constatou-se que PBS_{T18, QUI} (foi menor) e TxA_{T18, QUI} (foi maior) diferiram significativamente de PBS_{T18} e TxA_{T18}, respectivamente; ou seja, em presença de quinacrina o efeito depressivo de TxA aplicado localmente na alça foi bloqueado.

As respostas máximas à estimulação com ACh (**Fig. 20 B**) nos grupos TxAT_{6, QUI} e TxAT_{18, QUI} foram $57,3 \pm 10,4$ e $48,2 \pm 9,8$ % daquela no grupo PBS_{P6} e PBS_{P18}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações significativas, $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e $77,2 \pm 13,9$ e $170,7 \pm 34,5$ % de TxAT₆ e TxAT₁₈, respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significantes). No grupo PBS_{T6, QUI} a resposta a ACh foi $64,3 \pm 4,9$ e $48,6 \pm 3,7$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações significantes, $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e em PBS_{T18, QUI} foi $51,0 \pm 9,3$ e $108,8 \pm 19,8$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{P18}, $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, em relação a ACh, todos os dados dos grupos PBS_{T6, QUI} com TxAT_{6, QUI} (**Fig. 18 C**) diferiram significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional) enquanto PBS_{T18, QUI} com TxAT_{18, QUI} (**Fig. 19 C**) não foram estatisticamente diferentes. Quando comparado em blocos, os grupos PBS_{T6, QUI} e TxAT_{6, QUI} com PBS_{P6} e PBS_{T18, QUI} e TxAT_{18, QUI} com PBS_{P18}, houve diferença (foram menores) estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Quando PBS_{T6, QUI} e TxAT_{6, QUI} foram comparados em blocos com os grupos PBS_{T6} e TxAT₆, respectivamente, diferiram significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Como PBS_{T18, QUI} e TxAT_{18, QUI} não diferiram entre si, mas ambos diferiram significativamente de PBS_{P18}, comparou-se em blocos, PBS_{T18, QUI} e TxAT_{18, QUI} com os grupos PBS_{T18} e TxAT₁₈, respectivamente. Constatou-se que apenas TxAT_{18, QUI} diferiu e foi maior, significativamente de TxAT₁₈, ou seja, em presença de quinacrina o efeito depressivo de TxA aplicado localmente na alça foi bloqueado.

As EC₅₀ 33,1 mM de K⁺ e 4,4 μM de ACh para o grupo TxAT_{6, QUI} não foram diferentes das EC₅₀ dos grupos correspondentes de TxAT₆. As EC₅₀ de 29,7 mM de K⁺ e

12,5 μM de ACh para o grupo $\text{TxA}_{\text{T18, QU1}}$, também não diferiram significativamente quando comparadas a EC_{50} dos grupos correspondentes de TxA_{T18} (ver **Tabela 6**)

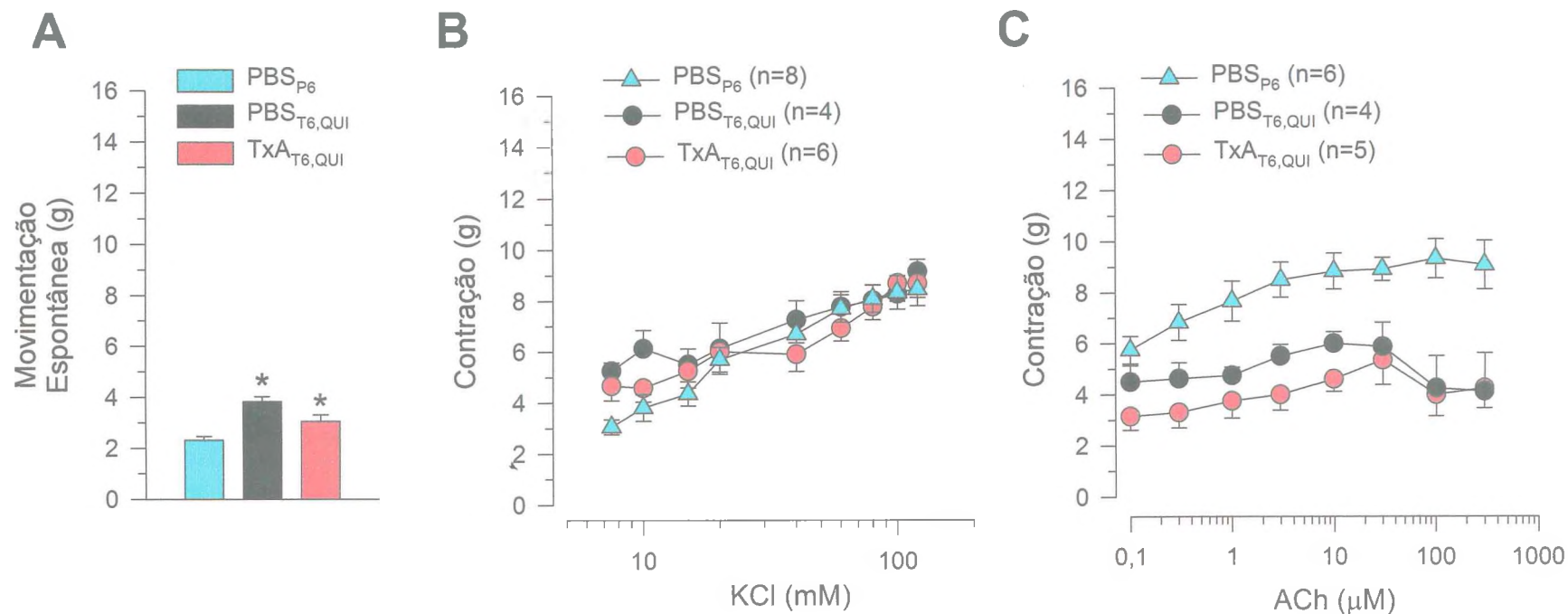


Fig. 18 – Atividade da quinacrina nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição a TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K^+ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μ M). *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

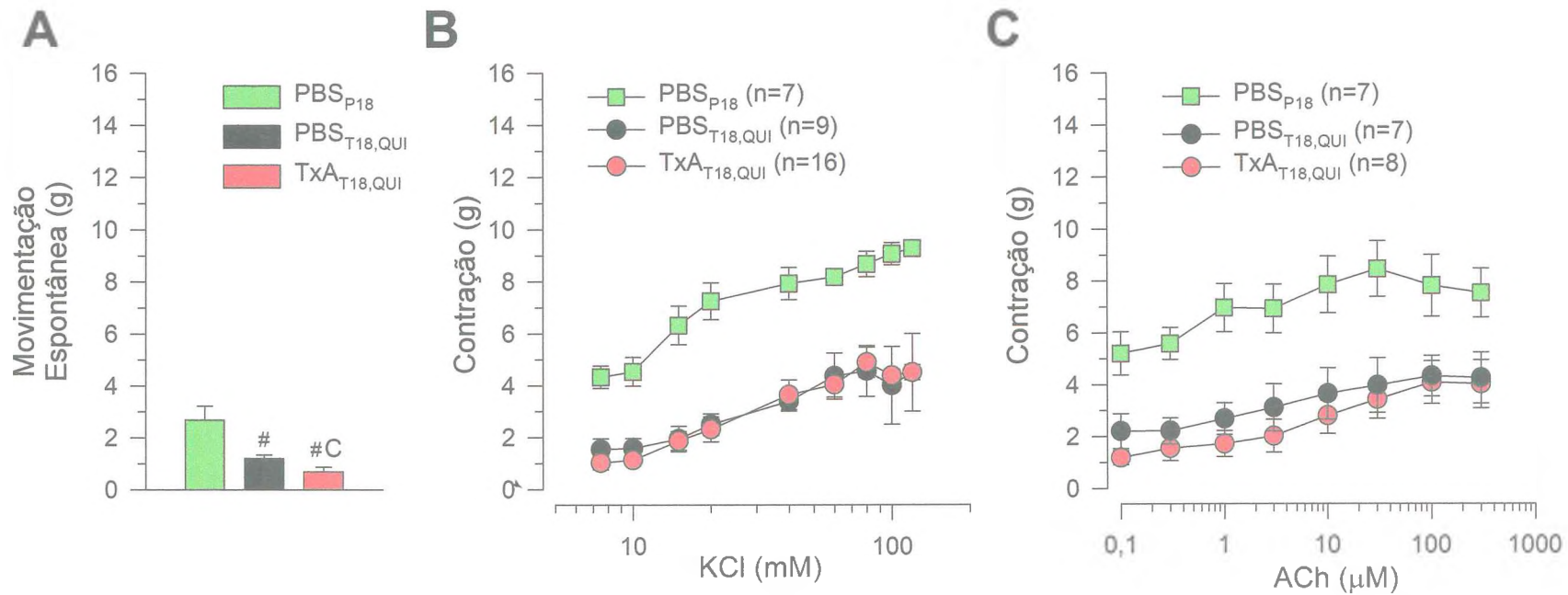


Fig. 19 – Atividade da quinacrina nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μM). [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18} (p≤0,05; ANOVA com contraste).

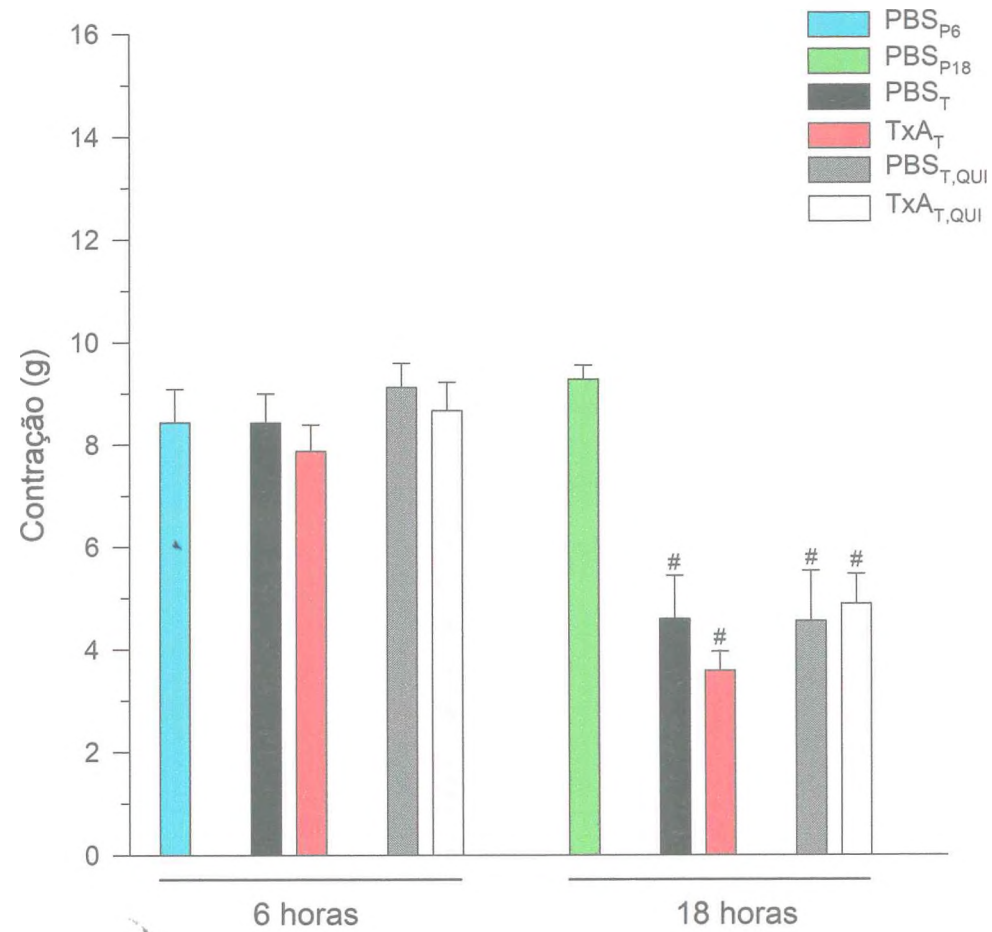
A

Fig. 20. A – Amplitudes (média ± epm) das respostas máximas ao K⁺ dos segmentos intestinais pré-tratados com quinacrina e expostos ao PBS ou a TxA.

#Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; (p<0,05; ANOVA com contraste).

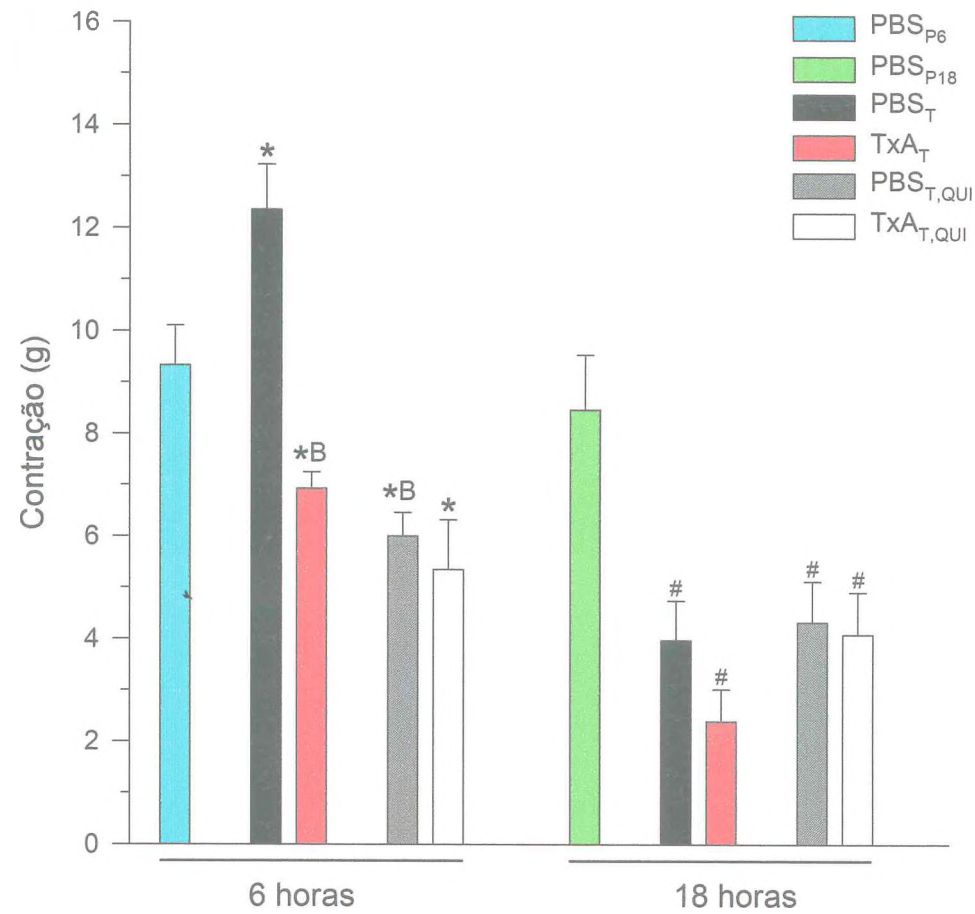


Fig. 20. B – Amplitudes (média ± epm) das respostas máximas à ACh dos segmentos intestinais pré-tratados com quinacrina e expostos ao PBS ou a TxA.

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; #Significância em relação ao grupo PBS_{P18};

^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6} ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

TABELA 6:
MÉDIAS DAS EC₅₀ DOS GRUPOS TRATADOS COM QUINACRINA

TRATAMENTO	KCl (mM)	ACh (μM)
PBS _{P6}	22,738 ± 1,159 (n=8)	1,255 ± 1,302 (n=6)
PBS _{T6}	20,627 ± 1,145 (n=7)	4,259 ± 1,357 (n=7)
TxA _{T6}	34,765 ± 1,118 (n=7)	1,399 ± 1,726 (n=6)
PBS_{T6,QUI}	32,118 ± 1,241 (n=4)	4,089 ± 1,449 (n=3)
TxA_{T6,QUI}	33,126 ± 1,253 (n=6)	*4,397 ± 1,338 (n=5)
PBS _{P18}	17,655 ± 1,186 (n=7)	2,802 ± 1,740 (n=6)
PBS _{T18}	23,186 ± 1,113 (n=9)	1,960 ± 1,561 (n=10)
TxA _{T18}	39,423 ± 1,168 (n=8)	9,651 ± 1,580 (n=7)
PBS_{T18,QUI}	26,330 ± 1,138 (n=9)	3,926 ± 1,562 (n=5)
TxA_{T18,QUI}	#29,712 ± 1,118 (n=16)	12,483 ± 1,130 (n=6)

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^CSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; [°]Significância em relação ao grupo TxA_{T18}; p<0.05: ANOVA com contraste.

3.3 Efeito de bloqueadores da ciclo- e da lipo-oxigenase sobre a depressão da contratilidade intestinal induzida pela TxA do *C. difficile*.

3.3.1 Efeito da Indometacina

As amplitudes médias das movimentações espontâneas dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com indometacina (IND) e expostos ao PBS ou a TxA durante 6 h (grupos $PBS_{T6, IND}$ e $TxA_{T6, IND}$, respectivamente) foram $108,1 \pm 6,6$ e $137,8 \pm 8,5$ % do controle (PBS_{P6} ; **Tabela 1**) e dele diferiram (foram maiores) significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls; **Fig. 21 A**). Nos grupos $PBS_{T18, IND}$ e $TxA_{T18, IND}$ (18 h de exposição a TxA) as amplitudes médias das movimentações espontâneas que foram $120,9 \pm 10,9$ e $123,2 \pm 22,3$ % do controle correspondente (PBS_{P18} ; **Tabela 1**) não apresentaram diferença significativa (**Fig. 22 A**). Em relação aos grupos PBS_T e TxA_T , $PBS_{T6, IND}$ e $TxA_{T6, IND}$ foram $88,2 \pm 5,4$ e $170,0 \pm 10,4$ %, respectivamente de PBS_{T6} e TxA_{T6} (**Tabela 1**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T6} ; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e $PBS_{T18, IND}$ e $TxA_{T18, IND}$ foram $210,8 \pm 19,0$ e $576,1 \pm 104,2$ % respectivamente de PBS_{T18} e TxA_{T18} (**Tabela 1**; alterações significantes, $p \leq 0,05$; ANOVA, Teste de Dunn).

As respostas contráteis a estimulação com diferentes concentrações dos dois agonistas (K^+ e ACh) nos grupos $PBS_{T6, IND}$ e $TxA_{T6, IND}$ (**Fig. 21 B e C**) e $PBS_{T18, IND}$ e $TxA_{T18, IND}$ (**Fig. 22 B e C**) foram de uma maneira geral iguais ou de amplitude maior do que nos respectivos controles (PBS_{P6} e PBS_{P18}).

Quando comparada às amplitudes médias das respostas máximas ao K^+ , $TxA_{T6, IND}$ foi $82,9 \pm 5,8$ e $88,8 \pm 6,2$ % de PBS_{P6} e TxA_{T6} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significantes) (**Fig. 27 A**) e $TxA_{T18, IND}$ foi $141,4 \pm 9,6$ e $366,4 \pm 24,8$ % de PBS_{P18} e TxA_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações significantes; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) (**Fig. 28 A**). Em $PBS_{T6, IND}$ (**Fig. 27 A**) a resposta máxima ao K^+ foi $85,9 \pm 9,4$ e $86,0 \pm 9,5$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração não significativa) e em $PBS_{T18, IND}$ (**Fig. 28 A**) foi $119,8 \pm 6,8$ e $242,1 \pm 13,7$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T18} , $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, todos os dados dos grupos $PBS_{T6, IND}$ com $TxA_{T6, IND}$ (**Fig. 21 B**) e $PBS_{T18, IND}$ com $TxA_{T18, IND}$ (**Fig. 22 B**) em relação ao K^+ , não apresentaram

diferenças significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Em relação aos grupos PBS_{T18} , IND e $TxA_{T18, IND}$, ambos foram estatisticamente diferentes (maiores) quando comparados em blocos com o controle (PBS_{P18}). Comparado $TxA_{T6, IND}$ com o respectivo grupo TxA_{T6} , também houve diferença estatística ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

As respostas máximas à estimulação com ACh nos grupos $TxA_{T6, IND}$ (**Fig. 27 B**) e $TxA_{T18, IND}$ (**Fig. 28 B**) foram $87,2 \pm 9,6$ e $111,2 \pm 19,0$ % daquela no grupo PBS_{P6} e PBS_{P18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significantes) e $117,4 \pm 12,8$ e $393,7 \pm 67,4$ % de TxA_{T6} e TxA_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T18} , $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). No grupo $PBS_{T6, IND}$ (**Fig. 27 B**) a resposta a ACh foi $96,2 \pm 7,6$ e $72,6 \pm 5,7$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T6} , $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e em $PBS_{T18, IND}$ (**Fig. 28 B**) foi $113,4 \pm 11,6$ e $241,5 \pm 24,7$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T18} , $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, todos os dados dos grupos $PBS_{T6, IND}$ com $TxA_{T6, IND}$ (**Fig. 21 C**) e $PBS_{T18, IND}$ com $TxA_{T18, IND}$ (**Fig. 22 C**) em relação a ACh, não apresentaram diferenças significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). No entanto quando comparado os dados em bloco desses grupos com PBS_{T6} e TxA_{T6} , respectivamente, houve diferenças significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Os grupos $PBS_{T18, IND}$ e $TxA_{T18, IND}$ comparados em blocos com PBS_{P18} diferiram significantemente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

As EC_{50} 24,9 mM de K^+ e 1,8 μM de ACh para o grupo $TxA_{T6, IND}$ não foram diferentes das EC_{50} dos grupos correspondentes de TxA_{T6} . No entanto, as EC_{50} de 22,6 mM de K^+ e 2,7 μM de ACh para o grupo $TxA_{T18, IND}$ diferiram de forma significativa quando comparadas as EC_{50} dos grupos correspondentes de TxA_{T18} (ver **Tabela 7**).

3.3.2 Efeito do Celecoxibe

As amplitudes médias das movimentações espontâneas dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com celecoxibe (CEL) e expostos ao PBS ou a TxA durante 6 h (grupos $PBS_{T6, CEL}$ e $TxA_{T6, CEL}$, respectivamente) foram $129,7 \pm 0,0$ e $169,4 \pm 22,9$ % do controle (PBS_{P6} ; **Tabela 1**) e dele diferiram significantemente ($p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls; **Fig. 23 A**). Nos grupos $PBS_{T18, CEL}$ e $TxA_{T18, CEL}$ (18 h de

exposição a TxA) as amplitudes médias das movimentações espontâneas que foram $151,5 \pm 14,5$ e $122,2 \pm 19,4$ % do controle correspondente (PBS_{P18}; **Tabela 1**) não apresentaram diferença significativa (**Fig. 24 A**). Em relação aos grupos PBS_T e TxA_T, PBS_{T6, CEL} e TxA_{T6, CEL} foram $105,8 \pm 0,0$ e $208,9 \pm 27,0$ %, respectivamente de PBS_{T6} e TxA_{T6} (**Tabela 1**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T6}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Teste de Dunn) e PBS_{T18, CEL} e TxA_{T18, CEL} foram $264,0 \pm 25,3$ e $571,4 \pm 90,7$ % respectivamente de PBS_{T18} e TxA_{T18} (**Tabela 1**; alterações significantes, $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls e Teste de Dunn).

As respostas contráteis a estimulação com diferentes concentrações dos dois agonistas (K⁺ e ACh), nos grupos PBS_{T6, CEL} e TxA_{T6, CEL} (**Fig. 23 B e C**) e PBS_{T18, CEL} e TxA_{T18, CEL} (**Fig. 24 B e C**) foram de uma maneira geral iguais ou de amplitude maior do que nos controles (PBS_{P6} e PBS_{P18}), respectivamente.

Quando comparada às amplitudes médias das respostas máximas ao K⁺, TxA_{T6, CEL} foi $106,6 \pm 8,0$ e $114,2 \pm 8,6$ % de PBS_{P6} e TxA_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significantes) (**Fig. 27 A**) e TxA_{T18, CEL} foi $115,3 \pm 19,4$ e $298,9 \pm 50,2$ % de PBS_{P18} e TxA_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T18}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) (**Fig. 28 A**). Em PBS_{T6, CEL} (**Fig. 27 A**) a resposta máxima ao K⁺ foi $109,9 \pm 9,5$ e $110,1 \pm 9,5$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6}, respectivamente (alteração não significativa) e em PBS_{T18, CEL} (**Fig. 28 A**) foi $144,6 \pm 16,4$ e $292,1 \pm 33,1$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18}, respectivamente (alterações significantes; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, em relação ao K⁺, todos os dados dos grupos PBS_{T6, CEL} com TxA_{T6, CEL} (**Fig. 23 B**), não apresentaram diferenças significantes, mas quando comparados aos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6}, respectivamente, houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Nos grupos PBS_{T18, CEL} e TxA_{T18, CEL} (**Fig. 24 B**) quando comparamos todos os dados em blocos observa-se que PBS_{T18, CEL} difere (foi maior) dos grupos TxA_{T18, CEL} e PBS_{P18}, significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional) e TxA_{T18, CEL} não difere de PBS_{P18}.

As respostas máximas à estimulação com ACh nos grupos TxA_{T6, CEL} (**Fig. 27 B**) e TxA_{T18, CEL} (**Fig. 28 B**) foram $107,7 \pm 6,7$ e $129,1 \pm 16,8$ % daquela no grupo PBS_{P6} e PBS_{P18}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significativas) e $145,0 \pm 9,0$ e $456,9 \pm 59,4$ % de TxA_{T6} e TxA_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações significantes; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). No grupo PBS_{T6, CEL} (**Fig. 27 B**) a resposta a ACh foi

95,2 ± 6,4 e 71,8 ± 4,8 % de PBS_{P6} e PBS_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T6}, $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e em PBS_{T18, CEL} (**Fig. 28 B**) foi 119,9 ± 16,6 e 255,4 ± 35,3 % de PBS_{P18} e PBS_{T18}, respectivamente (alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T18}, $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, em relação a ACh, todos os dados dos grupos PBS_{T6, CEL} com TxA_{T6, CEL} (**Fig. 23 C**), não apresentaram diferenças significantes, mas quando comparados aos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6}, respectivamente, houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Os dados dos grupos PBS_{T18, CEL} com TxA_{T18, CEL} (**Fig. 24 C**) também não apresentaram diferenças significantes, no entanto quando ambos foram comparados com o grupo PBS_{P18}, houve diferença (foram maiores) estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

Das EC₅₀ 18,6 mM de K⁺ e 6,5 μM de ACh para o grupo TxA_{T6, CEL} diferiu da EC₅₀ dos grupos correspondentes de TxA_{T6}, apenas a EC₅₀ para K⁺. Já as EC₅₀ de 23,4 mM de K⁺ e 2,9 μM de ACh para o grupo TxA_{T18, CEL} quando comparadas as EC₅₀ dos grupos correspondentes de TxA_{T18}, não foram diferentes estatisticamente (ver **Tabela 8**).

3.3.3 Efeito do Montelucaste sódico

As amplitudes médias das movimentações espontâneas dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com montelucaste de sódio (MON) e expostos ao PBS ou a TxA durante 6 h (grupos PBS_{T6, MON} e TxA_{T6, MON}, respectivamente) foram 165,7 ± 8,3 e 147,7 ± 14,7 % do controle (PBS_{P6}; **Tabela 1**) e dele diferiram significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls; **Fig. 25 A**). Nos grupos PBS_{T18, MON} e TxA_{T18, MON} (18 h de exposição a TxA) as amplitudes médias das movimentações espontâneas que foram 130,2 ± 15,8 e 148,8 ± 12,3 % do controle correspondente (PBS_{P18}; **Tabela 1**) não apresentaram diferença significativa (**Fig. 26 A**). Em relação aos grupos PBS_T e TxA_T, PBS_{T6, MON} e TxA_{T6, MON} foram 135,3 ± 6,7 e 182,2 ± 18,2 %, respectivamente de PBS_{T6} e TxA_{T6} (**Tabela 1**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T6}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e PBS_{T18, MON} e TxA_{T18, MON} foram 227,0 ± 27,5 e 695,6 ± 57,9 % respectivamente de PBS_{T18} e TxA_{T18} (**Tabela 1**; alterações significantes, $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

As respostas contráteis a estimulação com diferentes concentrações dos dois agonistas (K^+ e ACh), nos grupos $PBS_{T6, MON}$ e $TxA_{T6, MON}$ (**Fig. 25 B e C**) e $PBS_{T18, MON}$ e $TxA_{T18, MON}$ (**Fig. 26 B e C**) foram de uma maneira geral iguais ou de amplitude maior do que nos respectivos controles (PBS_{P6} e PBS_{P18}).

Quando comparada às amplitudes médias das respostas máximas ao K^+ , $TxA_{T6, MON}$ foi $119,2 \pm 6,2$ e $127,7 \pm 6,7$ % de PBS_{P6} e TxA_{T6} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T6} ; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) (**Fig. 27 A**) e $TxA_{T18, MON}$ foi $107,7 \pm 14,1$ e $279,1 \pm 36,4$ % de PBS_{P18} e TxA_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T18} ; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) (**Fig. 28 A**). Em $PBS_{T6, MON}$ a resposta máxima ao K^+ foi $134,8 \pm 10,6$ e $135,0 \pm 10,7$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações significativas; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e em $PBS_{T18, MON}$ foi $105,9 \pm 1,8$ e $213,9 \pm 3,6$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações significantes; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, em relação ao K^+ , todos os dados dos grupos $PBS_{T6, MON}$ com $TxA_{T6, MON}$ (**Fig. 25 B**), apresentaram diferenças (foram maiores) significantes em relação ao grupo PBS_{P6} , mas não diferiram entre si ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Nos grupos $PBS_{T18, MON}$ e $TxA_{T18, MON}$ (**Fig. 26 B**) quando comparados todos os dados em blocos não houve diferenças significantes estatisticamente, nem quando comparados com PBS_{P18} ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Comparados em blocos os grupos $PBS_{T6, MON}$ com $TxA_{T6, MON}$ respectivamente com PBS_{T6} e TxA_{T6} , apresentaram diferenças significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

As respostas máximas à estimulação com ACh nos grupos $TxA_{T6, MON}$ (**Fig. 27 B**) e $TxA_{T18, MON}$ (**Fig. 28 B**) foram $95,7 \pm 9,1$ e $99,0 \pm 7,4$ % daquela no grupo PBS_{P6} e PBS_{P18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significativas) e $128,9 \pm 12,2$ e $350,6 \pm 26,4$ % de TxA_{T6} e TxA_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T18} ; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). No grupo $PBS_{T6, MON}$ (**Fig. 27 B**) a resposta a ACh foi $114,4 \pm 8,0$ e $86,3 \pm 6,1$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significantes) e em $PBS_{T18, MON}$ (**Fig. 28 B**) foi $91,6 \pm 7,4$ e $195,2 \pm 15,8$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T18} ; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, todos os dados dos grupos $PBS_{T6, MON}$ com $TxA_{T6, MON}$ (**Fig. 25 C**) e $PBS_{T18, MON}$ com $TxA_{T18, MON}$ (**Fig. 26 C**) em relação a ACh, não apresentaram

diferenças significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). No entanto quando comparado em blocos o grupo $TxA_{T6, MON}$ com TxA_{T6} , houve diferenças significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

A EC_{50} de 18,7 mM de K^+ , mas não a EC_{50} de 3,1 μM de ACh para o grupo $TxA_{T6, MON}$ foi diferente da EC_{50} do grupo correspondente de TxA_{T6} . As EC_{50} de 17,6 mM de K^+ e 0,9 μM de ACh para o grupo $TxA_{T18, MON}$ diferiram de forma significativa quando comparadas as EC_{50} dos grupos correspondentes de TxA_{T18} (ver **Tabela 9**).

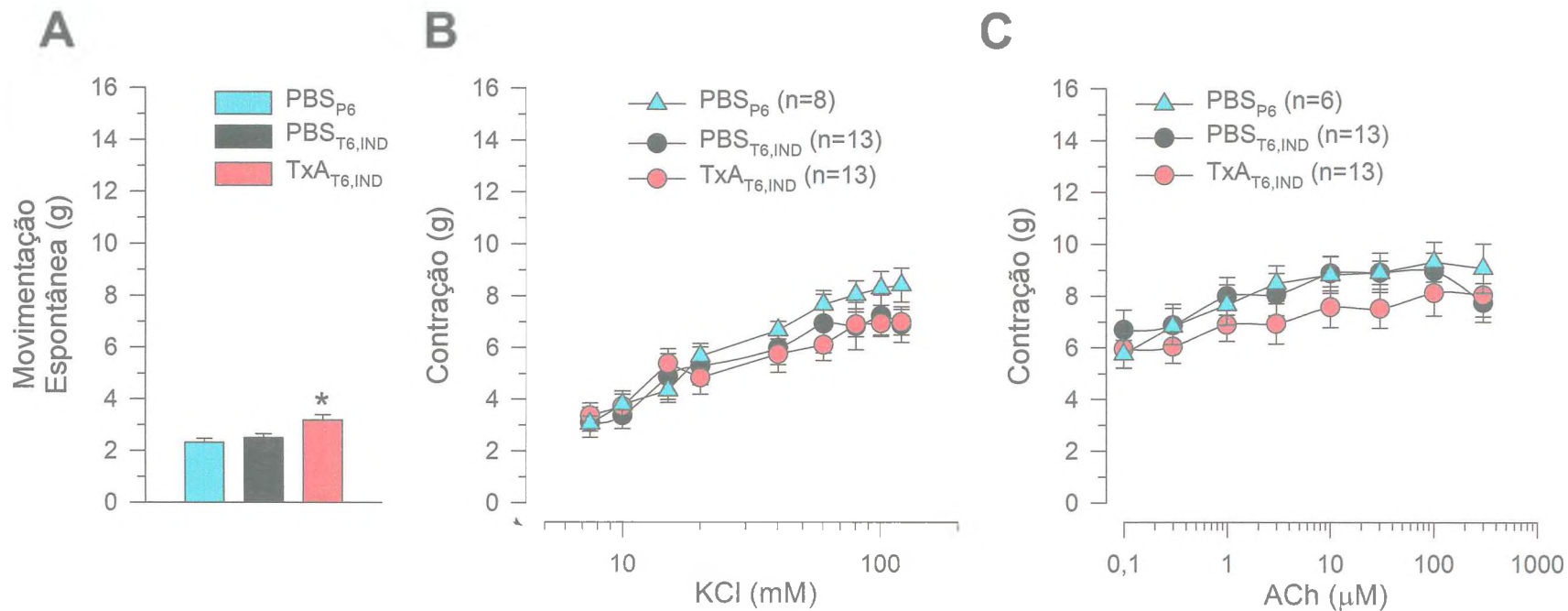


Fig. 21 – Atividade da indometacina nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 µM). *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; (p<0,05; ANOVA com contraste).

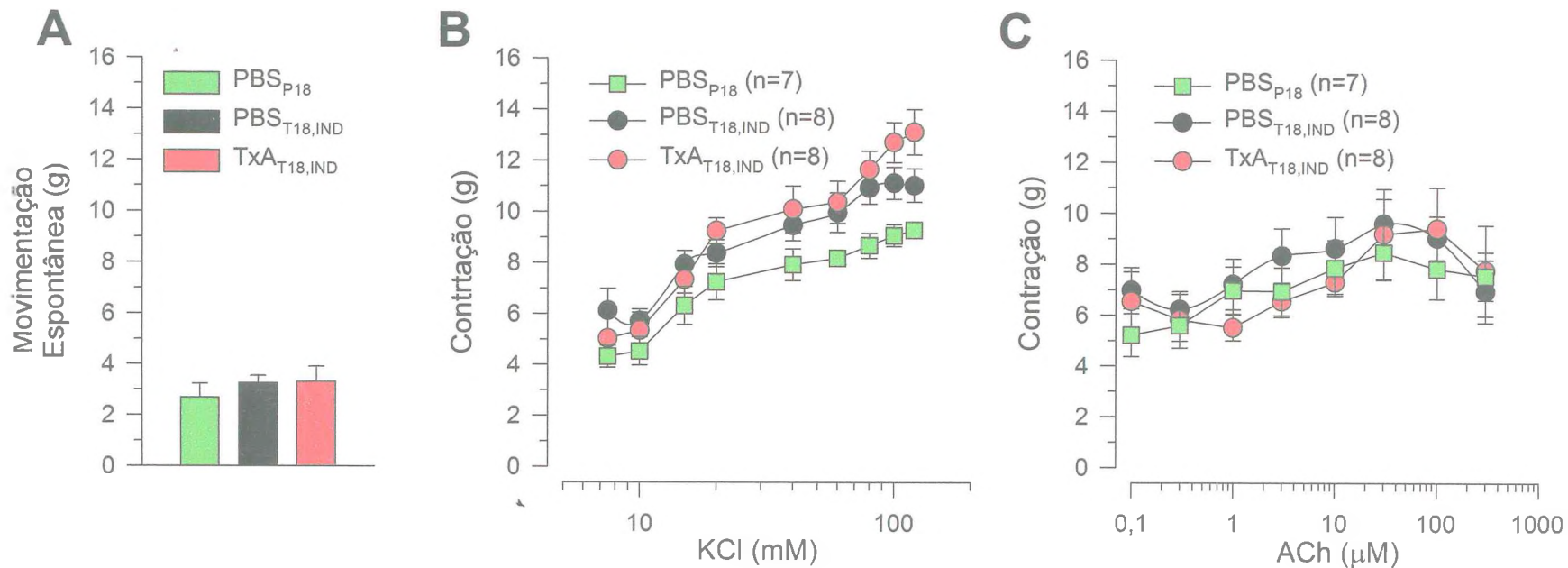


Fig. 22 – Atividade da indometacina nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K^+ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μ M)

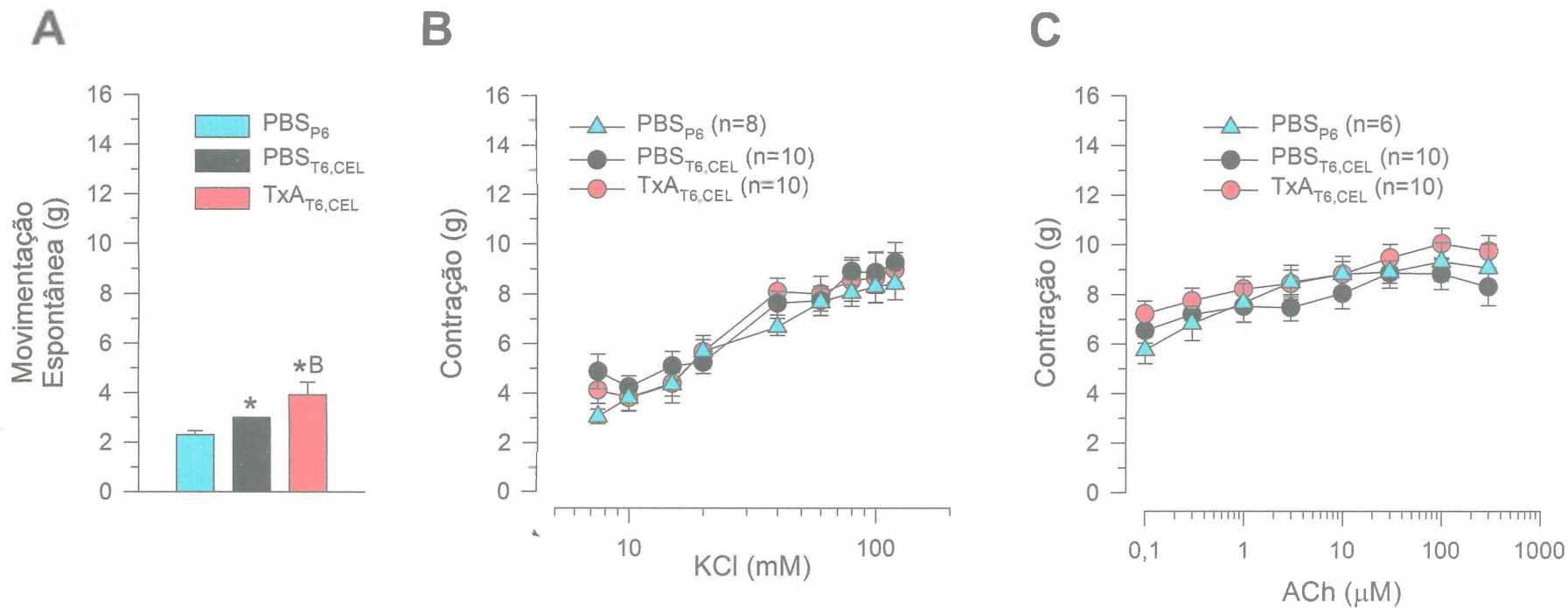


Fig. 23 – Atividade do celecoxibe nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μM). *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6} (p≤0,05; ANOVA com contraste).

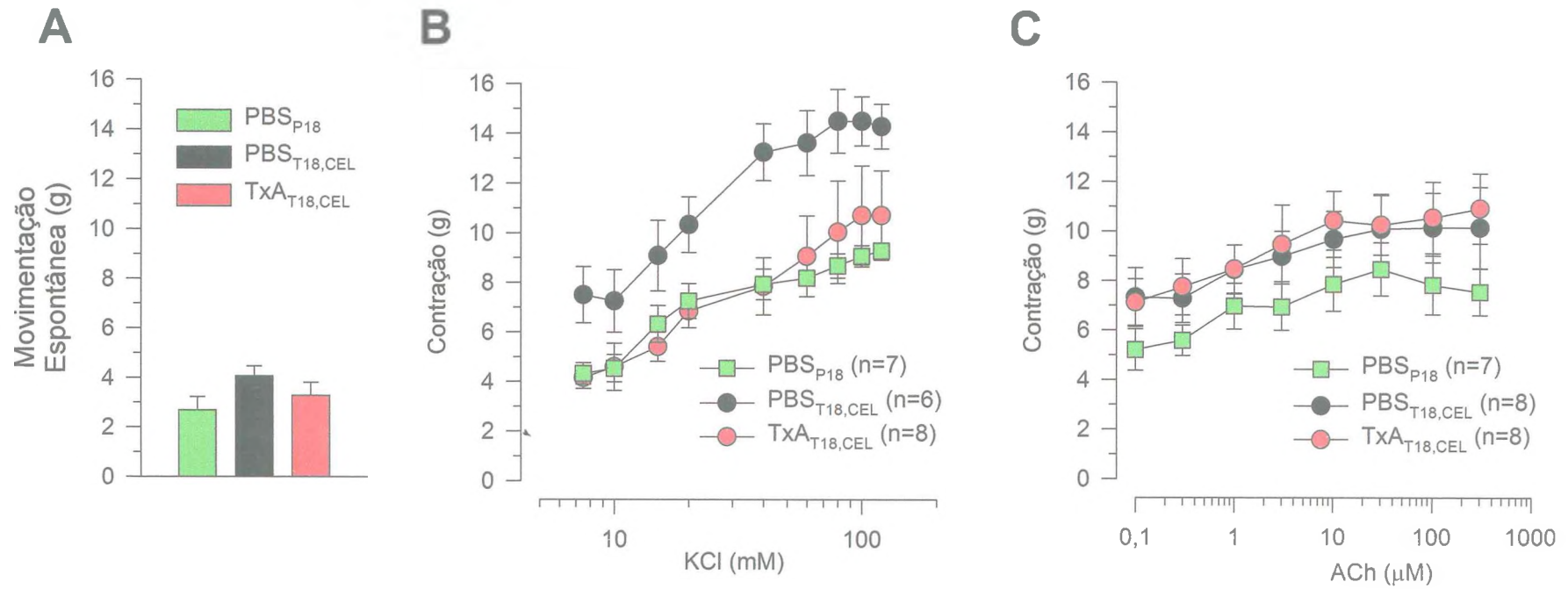


Fig. 24 – Atividade do celecoxibe nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μM).

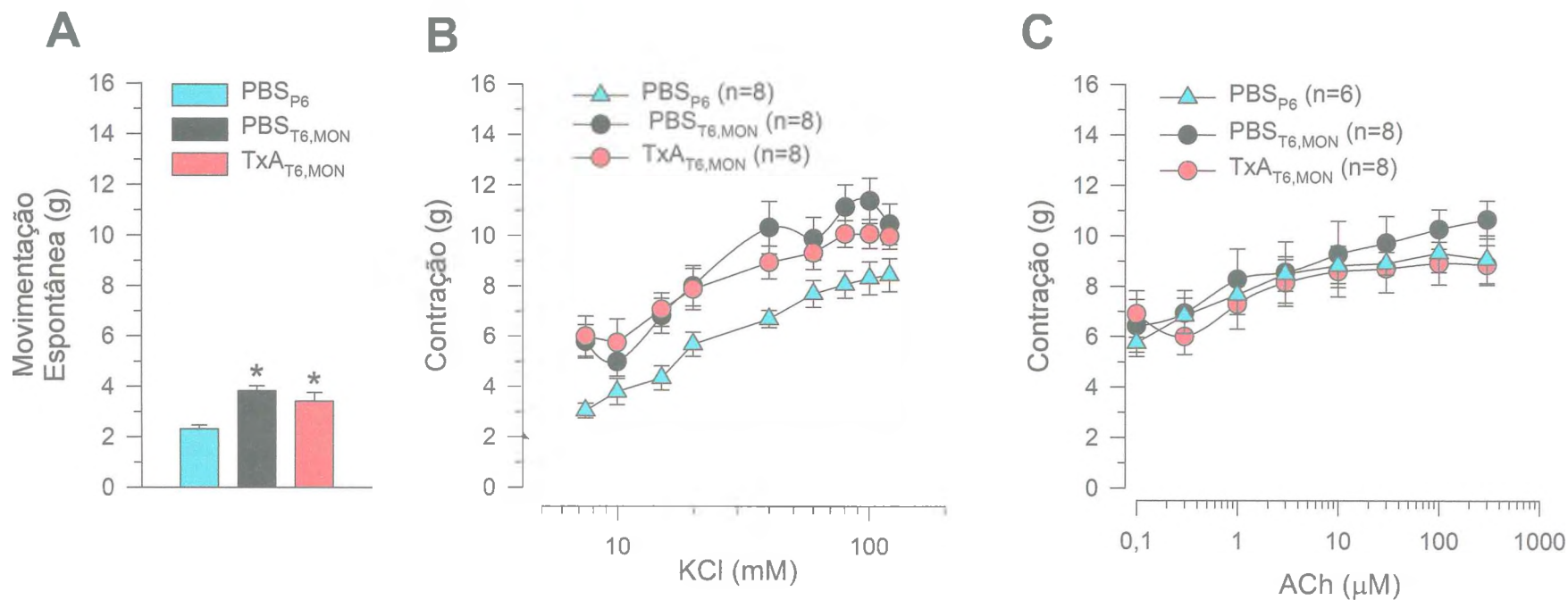


Fig. 25 – Atividade do montelucaste sódico nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K^+ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μ M). *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

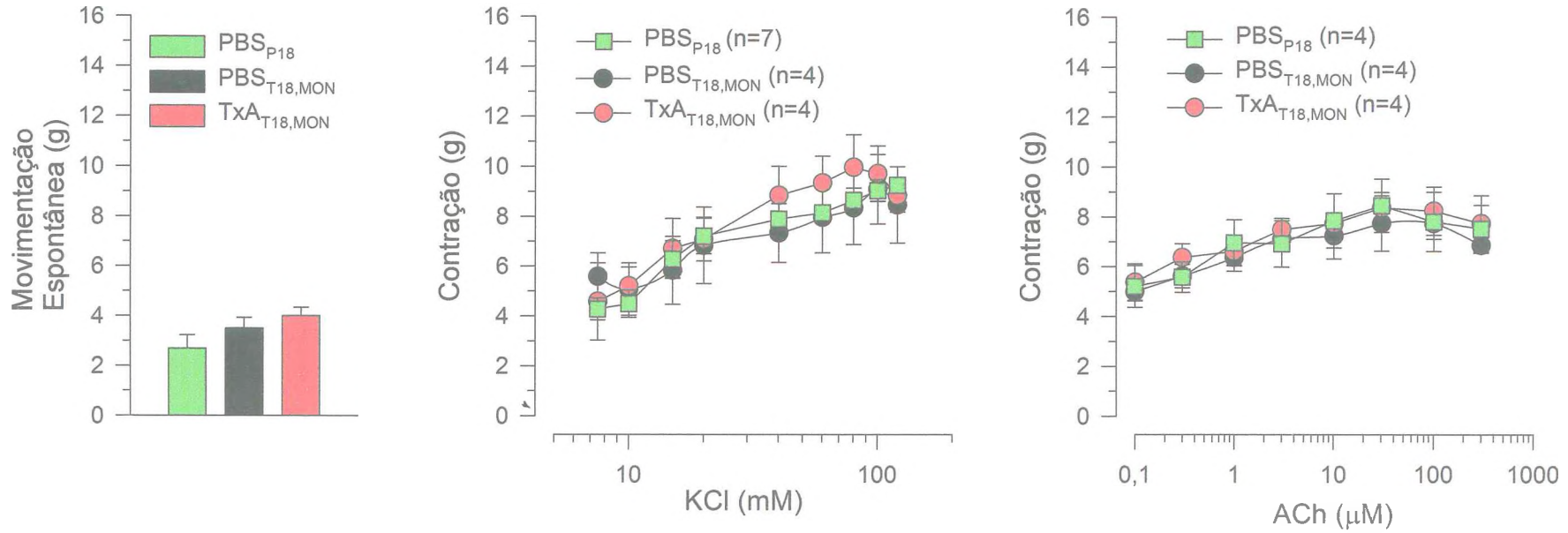


Fig. 26 – Atividade do montelucaste sódico nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K^+ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μM).

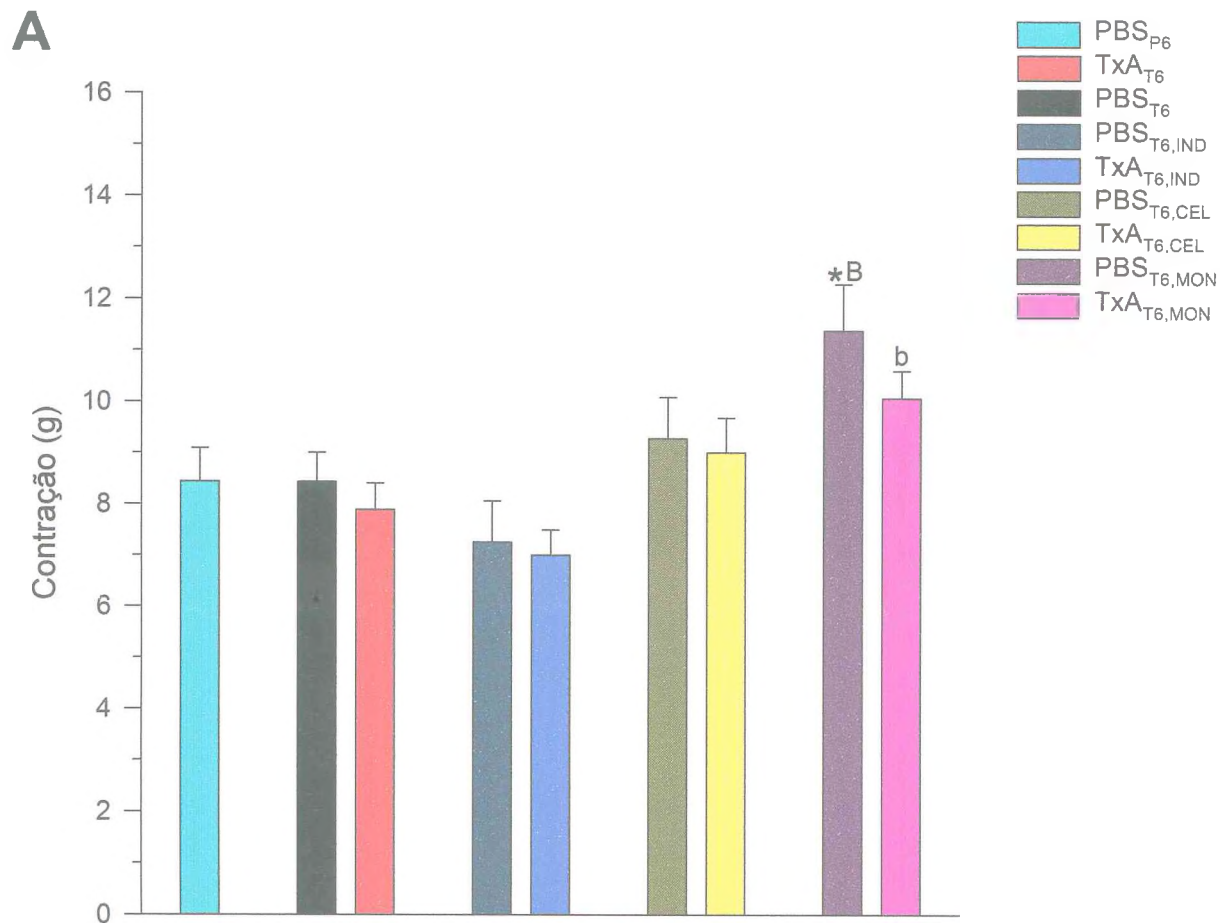


Fig. 27. A – Amplitudes (média ± epm) das respostas máximas ao K⁺ dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com IND, CEL ou MON e expostos por 6h ao PBS ou a TxA.

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6} (p≤0,05; ANOVA com contraste).

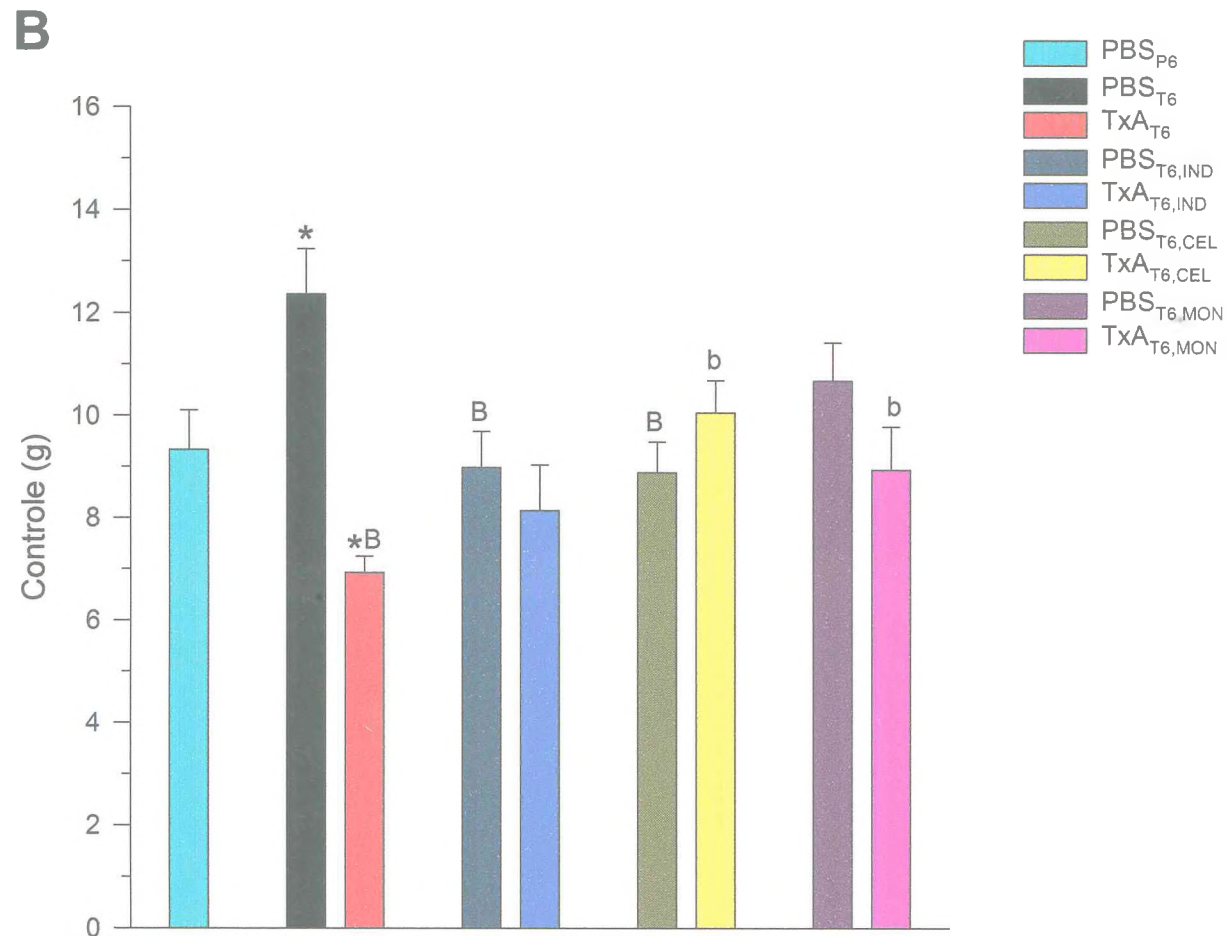


Fig. 27. B – Amplitudes (média ± epm) das respostas máximas à ACh dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com IND, CEL ou MON e expostos por 6h ao PBS ou a TxA.

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6} (p≤0,05; ANOVA com contraste).

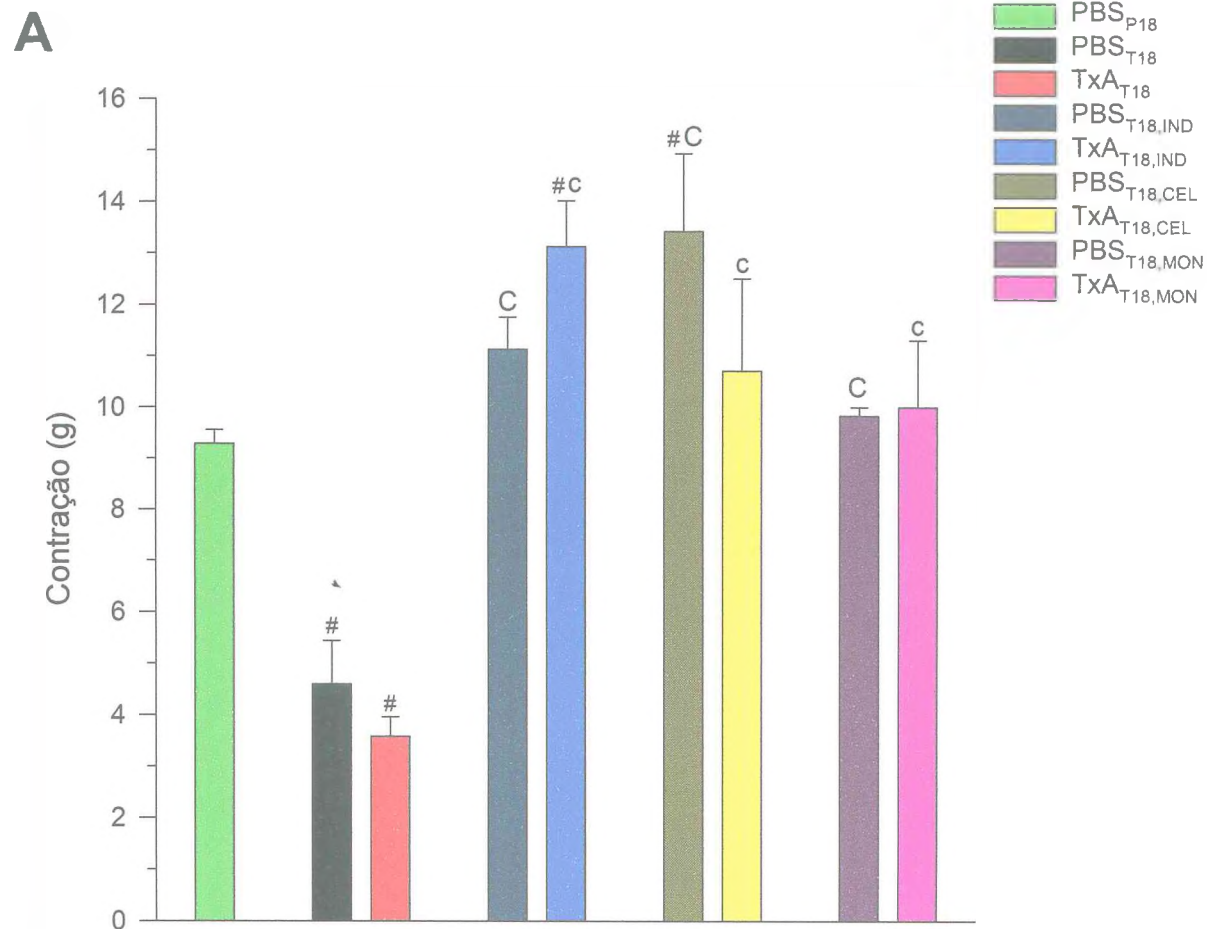


Fig. 28. A – Amplitudes (média ± epm) das respostas máximas ao K⁺ dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com IND, CEL ou MON e expostos por 18h ao PBS ou a TxA. #Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; °Significância em relação ao grupo PBS_{T18}; °Significância em relação ao grupo TxA_{T18} (p≤0,05; ANOVA com contraste).

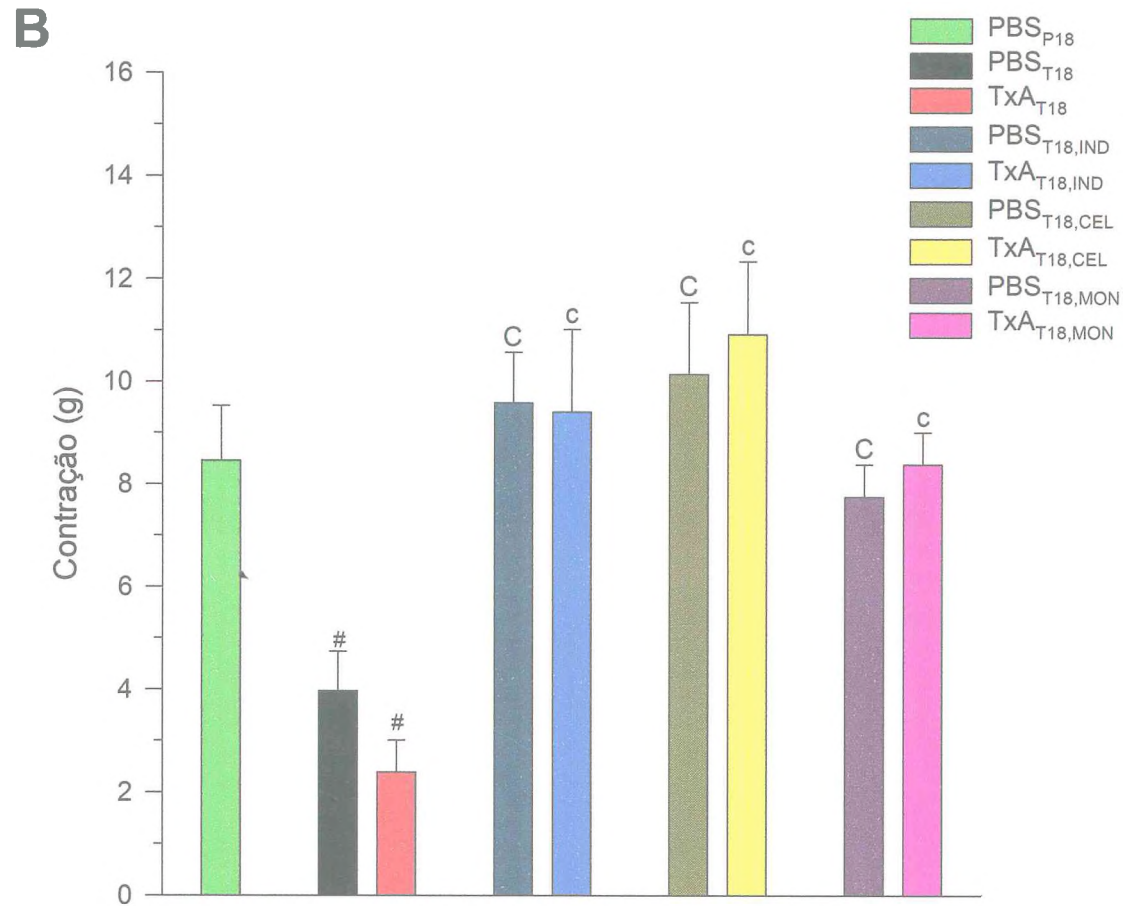


Fig. 28. B – Amplitudes (média ± epm) das respostas máximas à ACh dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com IND, CEL ou MON e expostos por 18h ao PBS ou a TxA. #Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^cSignificância em relação ao grupo TxA_{T18} ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

TABELA 7:

MÉDIAS DAS EC₅₀ DOS GRUPOS TRATADOS COM INDOMETACINA

TRATAMENTO	KCl (mM)	ACh (µM)
PBS _{P6}	22,738 ± 1,159 (n=8)	1,255 ± 1,302 (n=6)
PBS _{T6}	20,627 ± 1,145 (n=7)	4,259 ± 1,357 (n=7)
TxA _{T6}	34,765 ± 1,118 (n=7)	1,399 ± 1,726 (n=6)
PBS_{T6,IND}	26,198 ± 1,183 (n=11)	^B 1,595 ± 1,321 (n=11)
TxA_{T6,IND}	24,883 ± 1,148 (n=11)	1,814 ± 1,297 (n=11)
PBS _{P18}	17,655 ± 1,186 (n=7)	2,802 ± 1,740 (n=6)
PBS _{T18}	23,186 ± 1,113 (n=9)	1,960 ± 1,561 (n=10)
TxA _{T18}	39,423 ± 1,168 (n=8)	9,651 ± 1,580 (n=7)
PBS_{T18,IND}	20,929 ± 1,199 (n=8)	2,999 ± 1,430 (n=7)
TxA_{T18,IND}	^c 22,646 ± 1,162 (n=8)	^c 2,736 ± 1,270 (n=7)

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^cSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^cSignificância em relação ao grupo TxA_{T18}; p≤0,05; ANOVA com contraste.

TABELA 8:

MÉDIAS DAS EC₅₀ DOS GRUPOS TRATADOS COM CELECOXIBE

TRATAMENTO	KCl	ACh
PBS _{P6}	22,738 ± 1,159 (n=8)	1,255 ± 1,302 (n=6)
PBS _{T6}	20,627 ± 1,145 (n=7)	4,259 ± 1,357 (n=7)
TxA _{T6}	34,765 ± 1,118 (n=7)	1,399 ± 1,726 (n=6)
PBS_{T6,CEL}	32,591 ± 1,151 (n=10)	*5,793 ± 1,403 (n=9)
TxA_{T6,CEL}	^b 18,604 ± 1,369 (n=10)	*6,480 ± 1,604 (n=5)
PBS _{P18}	17,655 ± 1,186 (n=7)	2,802 ± 1,740 (n=6)
PBS _{T18}	23,186 ± 1,113 (n=9)	1,960 ± 1,561 (n=10)
TxA _{T18}	39,423 ± 1,168 (n=8)	9,651 ± 1,580 (n=7)
PBS_{T18,CEL}	22,690 ± 1,066 (n=6)	2,201 ± 1,515 (n=6)
TxA_{T18,CEL}	^c 23,422 ± 1,142 (n=8)	^c 2,289 ± 1,378 (n=6)

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^cSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^cSignificância em relação ao grupo TxA_{T18}; p≤0,05; ANOVA com contraste.

TABELA 9:
MÉDIAS DAS EC₅₀ DOS GRUPOS TRATADOS COM MONTELUCASTE SÓDICO

TRATAMENTO	KCl (mM)	ACh (μM)
PBS _{P6}	22,738 ± 1,159 (n=8)	1,255 ± 1,302 (n=6)
PBS _{T6}	20,627 ± 1,145 (n=7)	4,259 ± 1,357 (n=7)
TxA _{T6}	34,765 ± 1,118 (n=7)	1,399 ± 1,726 (n=6)
PBS_{T6,MON}	18,880 ± 1,085 (n=8)	*6,873 ± 1,488 (n=7)
TxA_{T6,MON}	^b18,761 ± 1,100 (n=8)	3,105 ± 1,278 (n=5)
PBS _{P18}	17,655 ± 1,186 (n=7)	2,802 ± 1,740 (n=6)
PBS _{T18}	23,186 ± 1,113 (n=9)	1,960 ± 1,561 (n=10)
TxA _{T18}	39,423 ± 1,168 (n=8)	9,651 ± 1,580 (n=7)
PBS_{T18,MON}	23,578 ± 1,217 (n=4)	1,972 ± 1,354 (n=4)
TxA_{T18,MON}	^c17,620 ± 1,136 (n=4)	^c0,968 ± 2,049 (n=4)

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^cSignificância em relação ao grupo TxA_{T18}; p≤0,05; ANOVA com contraste.

3.4 Efeito de bloqueadores de TNF- α e IL-1 sobre a depressão da contratilidade intestinal induzida pela TxA do *C. difficile*.

3.4.1 Efeito da Talidomida

As amplitudes médias das movimentações espontâneas dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com talidomida (TAL) e expostos ao PBS ou a TxA durante 6 h (grupos PBS_{T6, TAL} e TxA_{T6, TAL}, respectivamente) foram $154,4 \pm 18,0$ e $112,2 \pm 10,4$ % do controle (PBS_{P6}; **Tabela 1**) e dele não diferiram significativamente (**Fig. 29 A**). Nos grupos PBS_{T18, TAL} e TxA_{T18, TAL} (18 h de exposição a TxA) as amplitudes médias das movimentações espontâneas que foram $121,5 \pm 13,3$ e $96,7 \pm 11,5$ % do controle correspondente (PBS_{P18}; **Tabela 1**) e dele também não diferiram significativamente (**Fig. 30 A**). Em relação aos grupos PBS_T e TxA_T, PBS_{T6, TAL} e TxA_{T6, TAL} foram $126,0 \pm 14,7$ e $138,3 \pm 12,9$ %, respectivamente de PBS_{T6} e TxA_{T6} (**Tabela 1**; alterações não significantes) e PBS_{T18, TAL} e TxA_{T18, TAL} foram $211,9 \pm 23,3$ e $452,2 \pm 53,9$ % respectivamente de PBS_{T18} e TxA_{T18} (**Tabela 1**; alterações significantes; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

As respostas contráteis a estimulação com diferentes concentrações dos dois agonistas (K⁺ e ACh), nos grupos PBS_{T6, TAL} e TxA_{T6, TAL} (**Fig. 29 B e C**) e PBS_{T18, TAL} e TxA_{T18, TAL} (**Fig. 30 B e C**) foram de uma maneira geral iguais, de amplitude menor ou maior do que nos respectivos controles (PBS_{P6} e PBS_{P18}).

Quando comparada às amplitudes médias das respostas máximas ao K⁺ (**Fig. 33 A**), TxA_{T6, TAL} foi $83,3 \pm 8,2$ e $89,3 \pm 8,8$ % de PBS_{P6} e TxA_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração não significativa) e TxA_{T18, TAL} foi $117,8 \pm 10,2$ e $305,2 \pm 26,4$ % de PBS_{P18} e TxA_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T18}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). Em PBS_{T6, TAL} a resposta máxima ao K⁺ foi $103,7 \pm 10,9$ e $103,8 \pm 10,9$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significativas) e em PBS_{T18, TAL} foi $117,4 \pm 10,4$ e $237,1 \pm 21,0$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T18}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, em relação ao K⁺, todos os dados dos grupos PBS_{T6, TAL} com TxA_{T6, TAL} (**Fig. 29 B**), não apresentaram diferenças significativas, nem quando comparados aos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6}. O grupo PBS_{T18, TAL} comparado em blocos com

TxA_{T18, TAL} (**Fig. 30 B**) não diferiu significativamente deste, mas ambos comparados ao grupo PBS_{P18}, foram estatisticamente diferentes (maiores) ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

As respostas máximas à estimulação com ACh (**Fig. 33 B**) nos grupos TxA_{T6, TAL} e TxA_{T18, TAL} foram $73,1 \pm 6,5$ e $106,3 \pm 9,2$ % daquela no grupo PBS_{P6} e PBS_{P18}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações significativas; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e $98,4 \pm 8,9$ e $376,5 \pm 32,9$ % de TxA_{T6} e TxA_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações significativas; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). No grupo PBS_{T6, TAL} a resposta a ACh foi $99,8 \pm 10,4$ e $75,4 \pm 7,9$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações significantes em relação ao grupo PBS_{T6}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e em PBS_{T18, TAL} foi $102,6 \pm 13,5$ e $218,7 \pm 28,8$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significantes).

Comparados em blocos, em relação a ACh, todos os dados dos grupos PBS_{T6, TAL} com TxA_{T6, TAL} (**Fig. 29 C**) foram estatisticamente diferentes, até mesmo quando comparados aos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6}. Comparados com PBS_{P6}, foi diferente deste apenas o grupo TxA_{T6, TAL} significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Quando comparado agora, os grupos PBS_{T18, TAL} com TxA_{T18, TAL} (**Fig. 30 C**) não houve diferenças significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional), nem quando comparados ao grupo PBS_{P18}.

As EC₅₀ 28,7 mM de K⁺ e 5,8 μM de ACh para o grupo TxA_{T6, TAL} não foram diferentes das EC₅₀ dos grupos correspondentes de TxA_{T6}. No entanto, as EC₅₀ de 21,1 mM de K⁺ e 1,3 μM de ACh do grupo TxA_{T18, TAL} diferiram de forma significativa quando comparadas as EC₅₀ dos grupos correspondentes de TxA_{T18} (ver **Tabela 10**).

3.4.2 Efeito da Pentoxifilina

As amplitudes médias das movimentações espontâneas dos segmentos intestinais pré-tratados com pentoxifilina (PEN) e expostos ao PBS ou a TxA durante 6 h (grupos PBS_{T6, PEN} e TxA_{T6, PEN}, respectivamente) foram $182,4 \pm 18,6$ e $197,3 \pm 11,7$ % do controle (PBS_{P6}; **Tabela 1**) e dele diferiram significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls; **Fig. 31 A**). Nos grupos PBS_{T18, PEN} e TxA_{T18, PEN} (18 h de exposição a TxA) as amplitudes médias das movimentações espontâneas que foram $139,5 \pm 13,6$ e $99,2 \pm 8,4$ % do controle correspondente (PBS_{P18}; **Tabela 1**) não apresentaram diferença significativa (**Fig. 32 A**). Em relação aos grupos PBS_T e TxA_T, PBS_{T6, PEN} e TxA_{T6, PEN}

foram $148,9 \pm 15,2$ e $243,3 \pm 14,5$ %, respectivamente de PBS_{T6} e TxA_{T6} (**Tabela 1**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T6} ; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e $PBS_{T18, PEN}$ e $TxA_{T18, PEN}$ foram $243,2 \pm 23,8$ e $463,8 \pm 39,3$ % respectivamente de PBS_{T18} e TxA_{T18} (**Tabela 1**; alterações significantes, $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

As respostas contráteis a estimulação com diferentes concentrações dos dois agonistas (K^+ e ACh), nos grupos $PBS_{T6, PEN}$ e $TxA_{T6, PEN}$ (**Fig. 31 B e C**) e $PBS_{T18, PEN}$ e $TxA_{T18, PEN}$ (**Fig. 32 B e C**) foram de uma maneira geral de amplitude maior do que nos respectivos controles (PBS_{P6} e PBS_{P18}).

Quando comparada às amplitudes médias das respostas máximas ao K^+ , (**Fig. 33 A**) $TxA_{T6, PEN}$ foi $113,9 \pm 8,4$ e $122,1 \pm 8,9$ % de PBS_{P6} e TxA_{T6} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significantes) e $TxA_{T18, PEN}$ foi $128,3 \pm 16,6$ e $332,6 \pm 43,1$ % de PBS_{P18} e TxA_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações significativas; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). Em $PBS_{T6, PEN}$ a resposta máxima ao K^+ foi $117,8 \pm 6,9$ e $117,9 \pm 6,9$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significativas) e em $PBS_{T18, PEN}$ foi $120,5 \pm 11,1$ e $243,4 \pm 22,4$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações significantes; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, em relação ao K^+ , os dados dos grupos $PBS_{T6, PEN}$ com $TxA_{T6, PEN}$ (**Fig. 31 B**), não apresentaram diferenças significantes, mas quando ambos foram comparados a PBS_{P6} , diferiram (foram maiores) significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Nos grupos $PBS_{T18, PEN}$ e $TxA_{T18, PEN}$ (**Fig. 32 B**) quando comparados os dados em blocos, não houve diferença estatística, porém em relação ao grupo PBS_{P18} , houve diferenças (foram maiores) significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

As respostas máximas à estimulação com ACh (**Fig. 33 B**) nos grupos $TxA_{T6, PEN}$ e $TxA_{T18, PEN}$ foram $106,2 \pm 5,2$ e $108,1 \pm 3,2$ % daquela no grupo PBS_{P6} e PBS_{P18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significativas) e $143,0 \pm 7,0$ e $382,8 \pm 11,3$ % de TxA_{T6} e TxA_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações significantes; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). No grupo $PBS_{T6, PEN}$ a resposta a ACh foi $130,2 \pm 6,6$ e $98,3 \pm 4,9$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{P6} ; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e em $PBS_{T18, PEN}$ foi $155,4 \pm 18,9$ e $331,1 \pm 40,3$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações significantes; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, todos os dados dos grupos $PBS_{T6, PEN}$ com $TxA_{T6, PEN}$ (**Fig. 31 C**) e $PBS_{T18, PEN}$ com $TxA_{T18, PEN}$ (**Fig. 32 C**) em relação a ACh, houve diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Quando comparados aos respectivos controles (PBS_{P6} e PBS_{P18} , respectivamente) todos foram significativamente diferentes, exceto o grupo PBS_{P18} com $TxA_{T18, PEN}$ (**Fig. 32 C**).

A EC_{50} 22,4 mM de K^+ mas não a EC_{50} 2,2 μM de ACh para o grupo $TxA_{T6, PEN}$ diferiu da EC_{50} do grupo correspondente de TxA_{T6} . Já as EC_{50} de 12,8 mM de K^+ e 0,6 μM de ACh para o grupo $TxA_{T18, PEN}$ diferiram de forma significativa quando comparadas as EC_{50} dos grupos correspondentes de TxA_{T18} (ver **Tabela 11**).

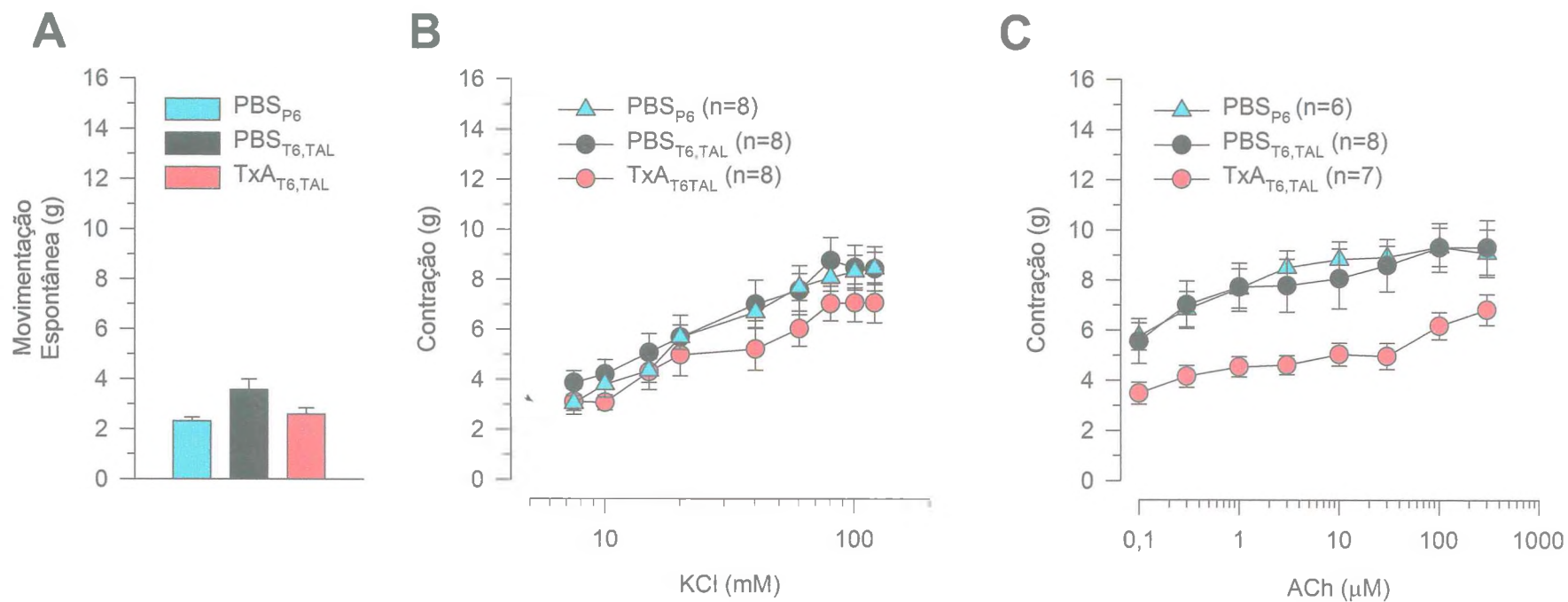


Fig. 29 – Atividade da talidomida nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μM).

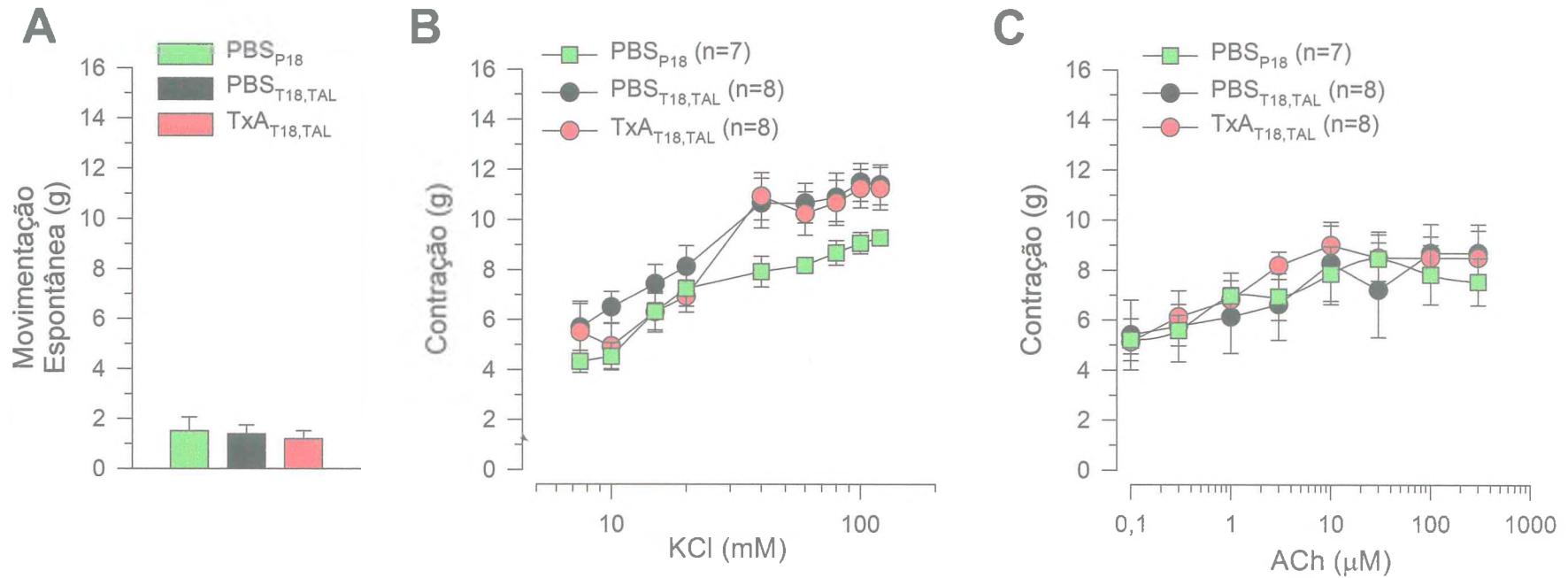


Fig. 30 – Atividade da talidomida nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μM).

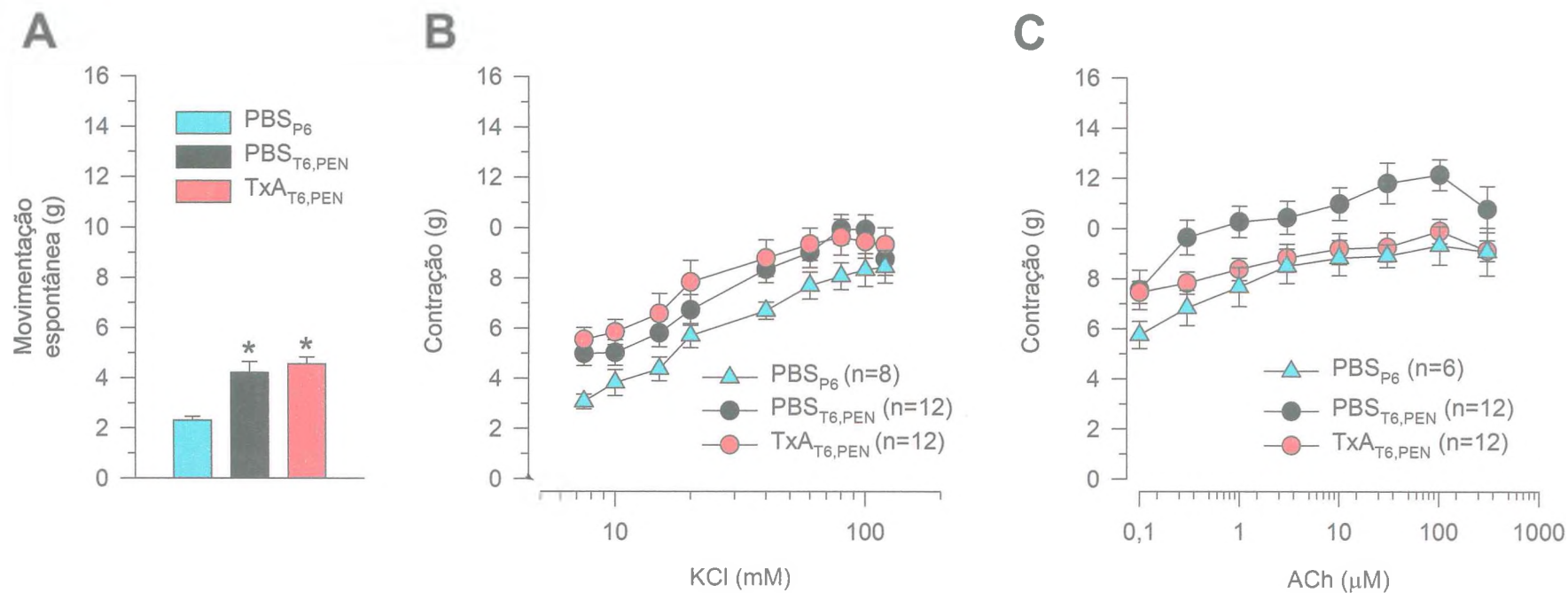


Fig. 31 – Atividade da pentoxifilina nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μM). *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; (p<0,05; ANOVA com contraste).

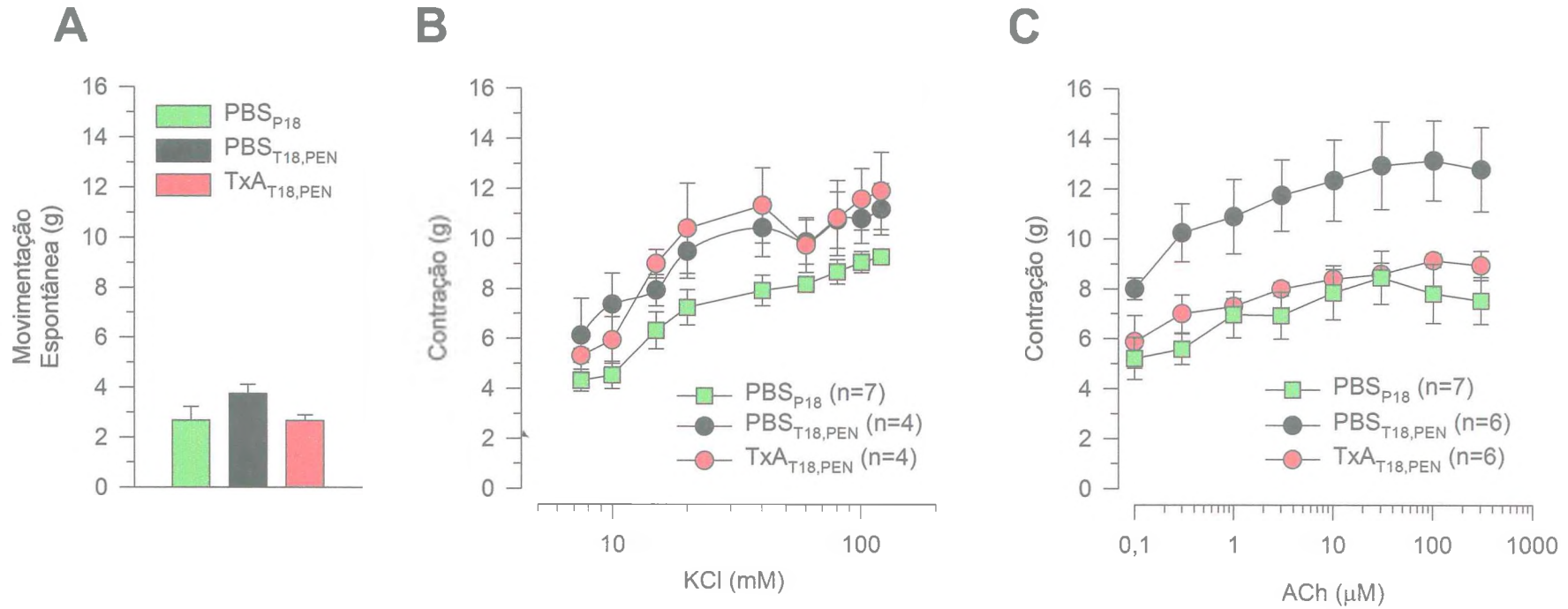


Fig. 32 – Atividade da pentoxifilina nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta;

B, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação

(média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 µM).

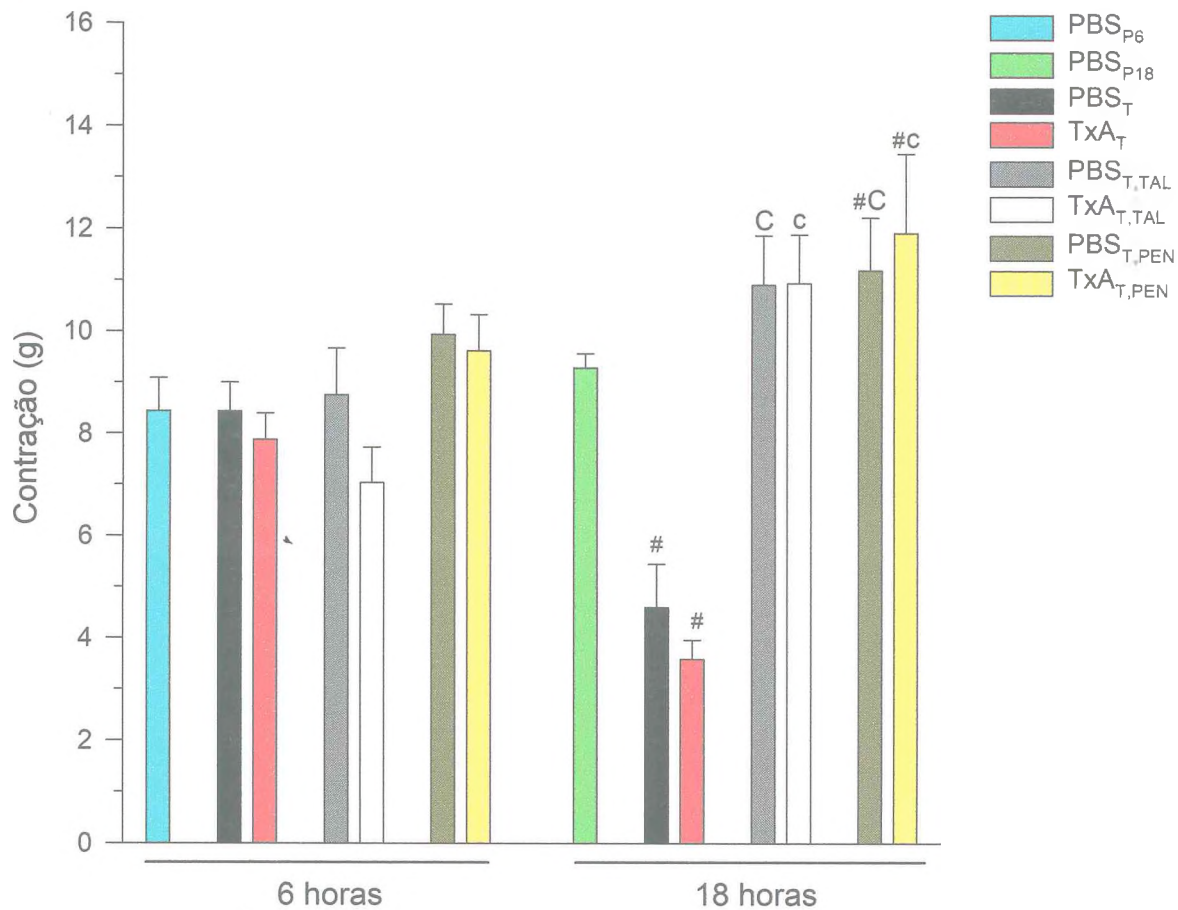
A

Fig. 33. A – Amplitudes (média ± epm) das respostas máximas ao K⁺ dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com bloqueadores da síntese de TNF- α ou IL-1 e expostos ao PBS ou a TxA. #Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^cSignificância em relação ao grupo TxA_{T18} (p<0,05; ANOVA com contraste).

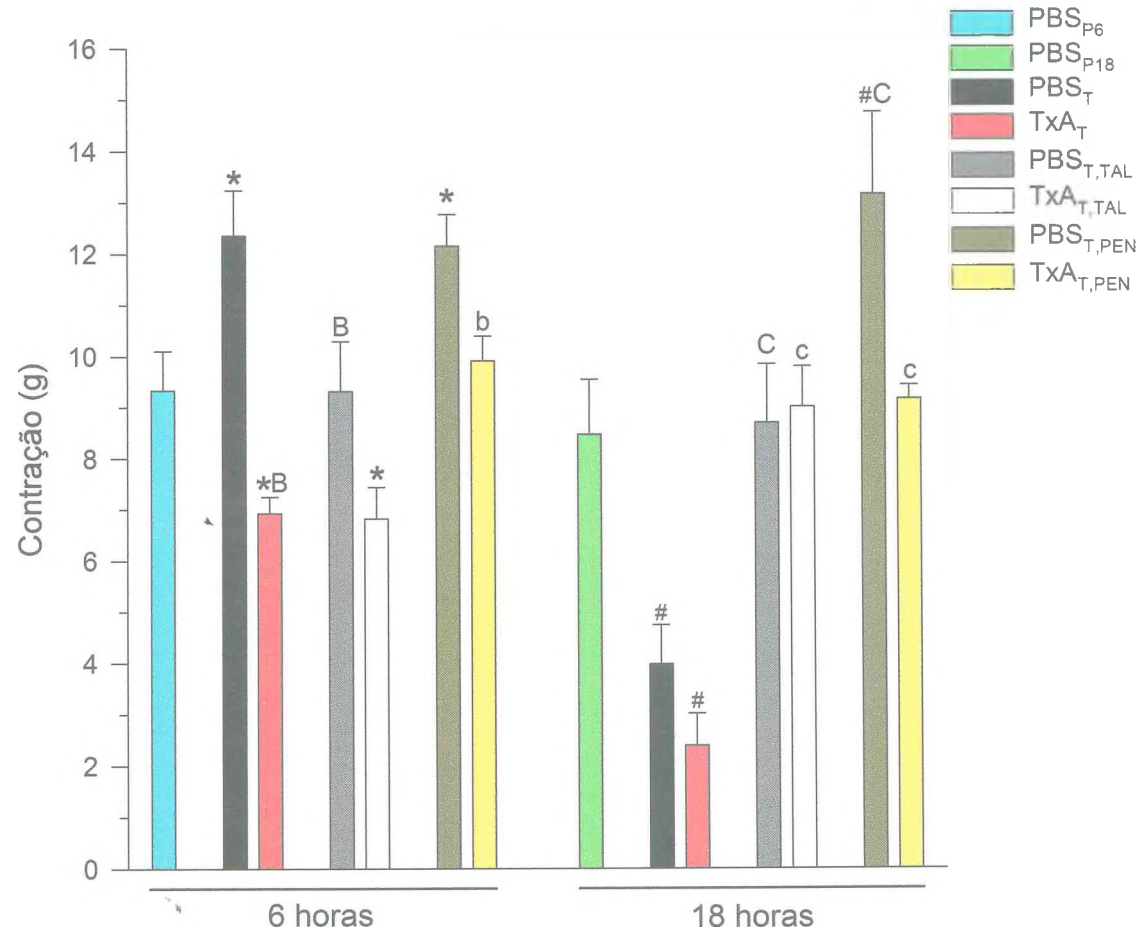
B

Fig. 33. B – Amplitudes (média \pm epm) das respostas máximas a ACh dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com bloqueadores da síntese de TNF- α ou IL-1 e expostos ao PBS ou a TxA. *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; #Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^cSignificância em relação ao grupo TxA_{T18} ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

TABELA 10:
MÉDIAS DAS EC₅₀ DOS GRUPOS TRATADOS COM TALIDOMIDA

TRATAMENTO	KCl (mM)	ACh (μM)
PBS _{P6}	22,738 ± 1,159 (n=8)	1,255 ± 1,302 (n=6)
PBS _{T6}	20,627 ± 1,145 (n=7)	4,259 ± 1,357 (n=7)
TxA _{T6}	34,765 ± 1,118 (n=7)	1,399 ± 1,726 (n=6)
PBS_{T6,TAL}	28,494 ± 1,182 (n=8)	2,087 ± 1,624 (n=7)
TxA_{T6,TAL}	28,733 ± 1,234 (n=8)	5,819 ± 1,981 (n=6)
PBS _{P18}	17,655 ± 1,186 (n=7)	2,802 ± 1,740 (n=6)
PBS _{T18}	23,186 ± 1,113 (n=9)	1,960 ± 1,561 (n=10)
TxA _{T18}	39,423 ± 1,168 (n=8)	9,651 ± 1,580 (n=7)
PBS_{T18,TAL}	18,844 ± 1,189 (n=6)	8,110 ± 1,568 (n=6)
TxA_{T18,TAL}	^c21,128 ± 1,063 (n=7)	^c1,337 ± 1,372 (n=6)

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^BSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; [°]Significância em relação ao grupo TxA_{T18}; p≤0,05; ANOVA com contraste.

TABELA 11:
MÉDIAS DAS EC₅₀ DOS GRUPOS TRATADOS COM PENTOXIFILINA

TRATAMENTO	KCl (mM)	ACh (μM)
PBS _{P6}	22,738 ± 1,159 (n=8)	1,255 ± 1,302 (n=6)
PBS _{T6}	20,627 ± 1,145 (n=7)	4,259 ± 1,357 (n=7)
TxA _{T6}	34,765 ± 1,118 (n=7)	1,399 ± 1,726 (n=6)
PBS_{T6,PEN}	24,481 ± 1,124 (n=12)	^B 1,083 ± 1,446 (n=11)
TxA_{T6,PEN}	^b 22,452 ± 1,133 (n=12)	2,182 ± 1,502 (n=11)
PBS _{P18}	17,655 ± 1,186 (n=7)	2,802 ± 1,740 (n=6)
PBS _{T18}	23,186 ± 1,113 (n=9)	1,960 ± 1,561 (n=10)
TxA _{T18}	39,423 ± 1,168 (n=8)	9,651 ± 1,580 (n=7)
PBS_{T18,PEN}	16,510 ± 1,097 (n=4)	0,633 ± 1,610 (n=5)
TxA_{T18,PEN}	^c 12,813 ± 1,039 (n=3)	^c 0,673 ± 1,355 (n=4)

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^BSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; [°]Significância em relação ao grupo TxA_{T18}; p≤0,05; ANOVA com contraste.

3.5 Efeito de um óleo essencial com propriedades antiinflamatórias na depressão da contratilidade intestinal induzida pela TxA do *C. difficile*.

3.5.1 Efeito do OECz 1 mg/Kg

Os segmentos intestinais de animais pré-tratados com OECZ 1 mg/Kg (CZ1) e expostos ao PBS ou a TxA durante 6 h (grupos PBS_{T6, CZ1} e TxA_{T6, CZ1}, respectivamente) apresentaram amplitudes médias das movimentações espontâneas que foram $77,8 \pm 5,2$ e $27,0 \pm 11,2$ % do controle (PBS_{P6}; **Tabela 1**) e dele diferiu (foi menor) significativamente TxA_{T6, CZ1} ($p \leq 0,05$; ANOVA, Teste de Dunn; **Fig. 34 A**). Nos grupos PBS_{T18, CZ1} e TxA_{T18, CZ1} (18 h de exposição a TxA) as amplitudes médias das movimentações espontâneas que foram $74,4 \pm 11,2$ e $66,9 \pm 13,5$ %, do controle correspondente (PBS_{P18}; **Tabela 1**) não apresentaram diferença significativa (**Fig. 35 A**). Em relação aos grupos PBS_T e TxA_T, PBS_{T6, CZ1} e TxA_{T6, CZ1} foram $63,5 \pm 4,3$ e $33,3 \pm 13,7$ %, respectivamente de PBS_{T6} e TxA_{T6} (**Tabela 1**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T6}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e PBS_{T18, CZ1} e TxA_{T18, CZ1} foram $129,7 \pm 19,6$ e $313,3 \pm 63,1$ %, respectivamente de PBS_{T18} e TxA_{T18} (**Tabela 1**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T18}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

As respostas contráteis a estimulação com diferentes concentrações dos dois agonistas (K⁺ e ACh), nos grupos PBS_{T6, CZ1} e TxA_{T6, CZ1} (**Fig. 34 B e C**) e PBS_{T18, CZ1} e TxA_{T18, CZ1} (**Fig. 35 b e c**) foram de uma maneira geral iguais, de amplitude maior ou menor do que nos respectivos controles (PBS_{P6} e PBS_{P18}).

Quando comparada às amplitudes médias das respostas máximas ao K⁺ (**Fig. 38 A**), TxA_{T6, CZ1} foi $91,2 \pm 10,8$ e $97,8 \pm 11,6$ % de PBS_{P6} e TxA_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração não significativa) e TxA_{T18, CZ1} foi $77,2 \pm 11,8$ e $200,0 \pm 30,5$ % de PBS_{P18} e TxA_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações significativas; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). Em PBS_{T6, CZ1} a resposta máxima ao K⁺ foi $105,8 \pm 14,6$ e $105,9 \pm 14,6$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significantes) e em PBS_{T18, CZ1} foi $102,3 \pm 24,6$ e $206,7 \pm 49,8$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T18}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, em relação ao K⁺, todos os dados dos grupos PBS_{T6, CZ1} com TxA_{T6, CZ1} (**Fig. 34 B**), não apresentaram diferenças significativas. No entanto quando

ambos foram comparados aos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6}, respectivamente houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Comparados os dados em blocos do grupo PBS_{T18, CZ1} com TxA_{T18, CZ1} (**Fig. 35 B**) houve diferenças significantes estatisticamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). No entanto, quando ambos foram comparados ao grupo PBS_{P18}, apenas TxA_{T18, CZ1} diferiu significante ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

As respostas máximas à estimulação com ACh (**Fig. 38 B**) nos grupos TxA_{T6, CZ1} e TxA_{T18, CZ1} foram $78,5 \pm 12,6$ e $102,4 \pm 17,1$ % daquela no grupo PBS_{P6} e PBS_{P18}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração não significativa) e $105,8 \pm 17,0$ e $362,8 \pm 60,8$ % de TxA_{T6} e TxA_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T18}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). No grupo PBS_{T6, CZ1} a resposta a ACh foi $94,2 \pm 14,5$ e $71,1 \pm 11,0$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T6}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e em PBS_{T18, CZ1} foi $141,7 \pm 11,8$ e $302,2 \pm 25,2$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T18}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, em relação a ACh, os dados dos grupos PBS_{T6, CZ1} com TxA_{T6, CZ1} (**Fig. 34 C**) foram estatisticamente diferentes, exceto quando comparado o grupo PBS_{P6} com PBS_{T6, CZ1} ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Ainda quando comparados (PBS_{T6, CZ1} e TxA_{T6, CZ1}) aos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6}, respectivamente, diferiram significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Comparados todos os dados em blocos dos grupos PBS_{T18, CZ1} e TxA_{T18, CZ1} (**Fig. 35 C**) houve diferenças significantes estatisticamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional), exceto entre os grupos PBS_{P18} e TxA_{T18, CZ1}.

Para as EC₅₀ 17,6 mM de K⁺ e 1,3 μM de ACh do grupo TxA_{T6, CZ1} diferiu de forma significativa quando comparada a EC₅₀ dos grupos correspondentes de TxA_{T6} apenas a EC₅₀ para o K⁺. As EC₅₀ de 50,6 mM de K⁺ e 6,7 μM de ACh para o grupo TxA_{T18, CZ1} não diferiram de forma significativa quando comparadas a EC₅₀ dos grupos correspondentes de TxA_{T18} (ver **Tabela 12**).

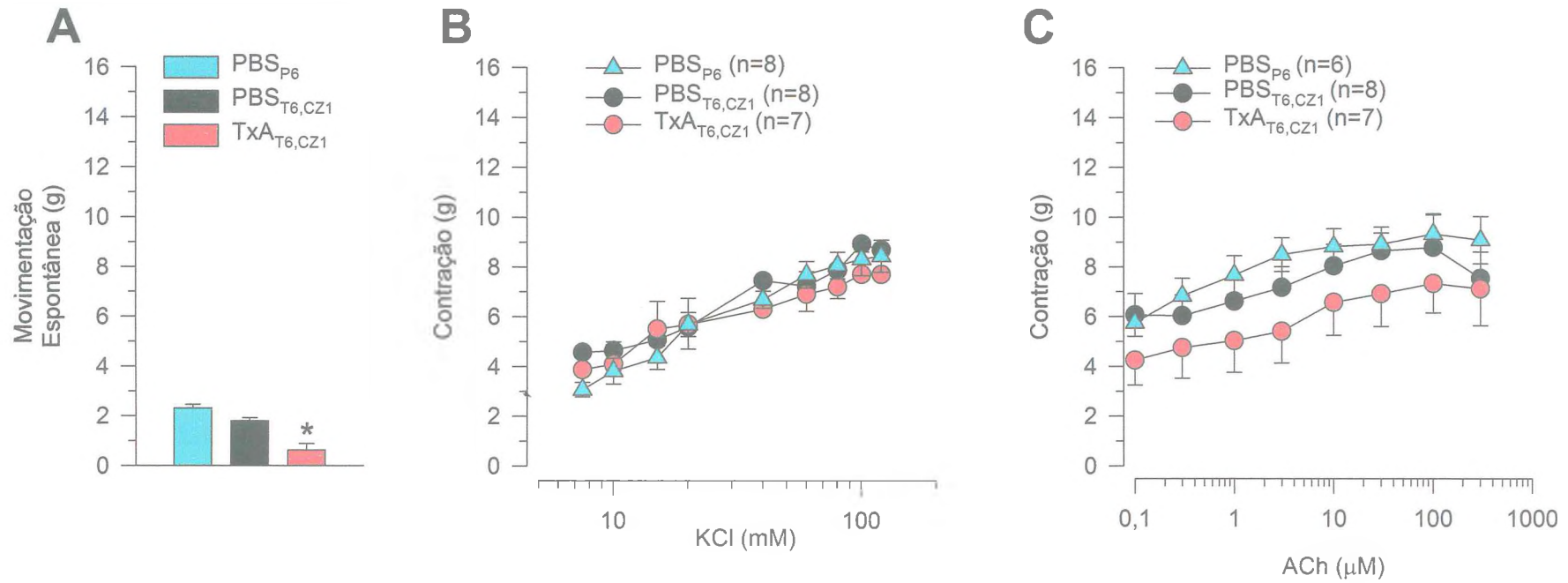


Fig. 34 – Atividade do OECz 1 mg/kg nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição a TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μM). *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; (p<0,05; ANOVA com contraste).

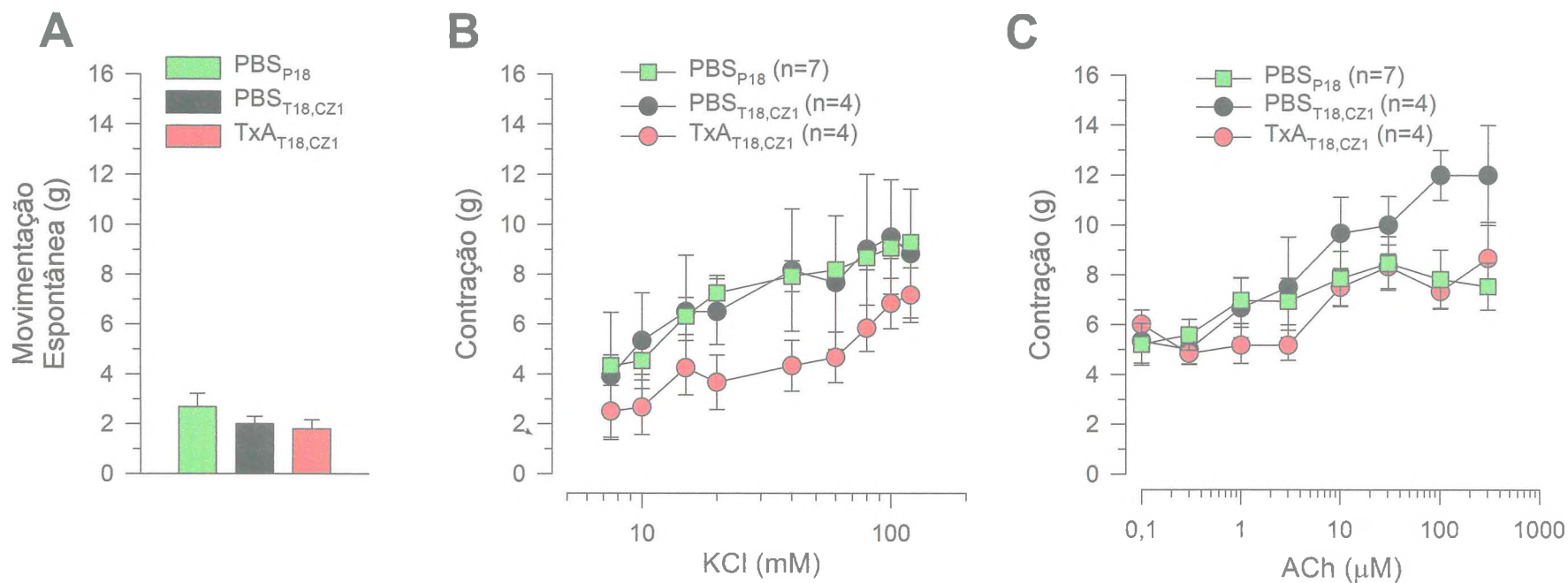


Fig. 35 – Atividade do OECz 1 mg/kg nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição a TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μM).

TABELA 12:
MÉDIAS DAS EC₅₀ DOS GRUPOS TRATADOS COM O ÓEO ESSENCIAL DO *Croton zehntneri* (1mg/Kg)

TRATAMENTO	KCl (mM)	ACh (μM)
PBS _{P6}	22,738 ± 1,159 (n=8)	1,255 ± 1,302 (n=6)
PBS _{T6}	20,627 ± 1,145 (n=7)	4,259 ± 1,357 (n=7)
TxA _{T6}	34,765 ± 1,118 (n=7)	1,399 ± 1,726 (n=6)
PBS_{T6,CZ1}	19,286 ± 1,077 (n=8)	2,190 ± 1,487 (n=6)
TxA_{T6,CZ1}	^b 17,573 ± 1,075 (n=7)	1,325 ± 1,421 (n=5)
PBS _{P18}	17,655 ± 1,186 (n=7)	2,802 ± 1,740 (n=6)
PBS _{T18}	23,186 ± 1,113 (n=9)	1,960 ± 1,561 (n=10)
TxA _{T18}	39,423 ± 1,168 (n=8)	9,651 ± 1,580 (n=7)
PBS_{T18,CZ1}	17,837 ± 1,138 (n=3)	2,502 ± 1,443 (n=3)
TxA_{T18,CZ1}	[#] 50,621 ± 1,178 (n=3)	6,735 ± 1,099 (n=3)

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^bSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^cSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; ^dSignificância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^eSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^fSignificância em relação ao grupo TxA_{T18}; p<0,05; ANOVA com contraste.

3.5.2 Efeito do OECz 30 mg/Kg

Os segmentos intestinais de animais pré-tratados com OECZ 30 mg/Kg (CZ30) e expostos ao PBS ou a TxA durante 6 h (grupos $PBS_{T6, CZ30}$ e $TxA_{T6, CZ30}$, respectivamente) apresentaram amplitudes médias das movimentações espontâneas que foram $119,4 \pm 12,7$ e $116,2 \pm 15,7$ % do controle (PBS_{P6} ; **Tabela 1**) e dele não diferiram significativamente (**Fig. 36 A**). Nos grupos $PBS_{T18, CZ30}$ e $TxA_{T18, CZ30}$ (18 h de exposição a TxA) as amplitudes médias das movimentações espontâneas que foram $81,3 \pm 20,9$ e $9,5 \pm 2,3$ %, do controle correspondente (PBS_{P18} ; **Tabela 1**) e dele diferiu (foi menor) significativamente o grupo $TxA_{T18, CZ30}$ ($p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls; **Fig. 37 A**). Em relação aos grupos PBS_T e TxA_T , $PBS_{T6, CZ30}$ e $TxA_{T6, CZ30}$ foram $97,5 \pm 10,4$ e $143,3 \pm 19,4$ %, respectivamente de PBS_{T6} e TxA_{T6} (**Tabela 1**; alterações não significantes) e $PBS_{T18, CZ30}$ e $TxA_{T18, CZ30}$ foram $141,8 \pm 39,4$ e $44,7 \pm 11,7$ %, respectivamente de PBS_{T18} e TxA_{T18} (**Tabela 1**; alterações não significantes).

As respostas contráteis a estimulação com diferentes concentrações dos dois agonistas (K^+ e ACh), nos grupos $PBS_{T6, CZ30}$ e $TxA_{T6, CZ30}$ (**Fig. 36 B e C**) e $PBS_{T18, CZ30}$ e $TxA_{T18, CZ30}$ (**Fig. 37 B e C**) foram de uma maneira geral iguais ou de amplitude menor do que nos respectivos controles (PBS_{P6} e PBS_{P18}).

Quando comparada às amplitudes médias das respostas máximas ao K^+ (**Fig. 38 A**), $TxA_{T6, CZ30}$ foi $82,9 \pm 9,9$ e $88,9 \pm 10,6$ % de PBS_{P6} e TxA_{T6} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração não significativa) e $TxA_{T18, CZ30}$ foi $81,4 \pm 27,9$ e $211,0 \pm 72,4$ % de PBS_{P18} e TxA_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significativas). Em $PBS_{T6, CZ30}$ a resposta máxima ao K^+ foi $72,2 \pm 6,4$ e $72,3 \pm 6,4$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações significantes; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e em $PBS_{T18, CZ30}$ foi $84,4 \pm 34,1$ e $170,4 \pm 68,9$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significativas).

Comparados em blocos, em relação ao K^+ , todos os dados dos grupos $PBS_{T6, CZ30}$ com $TxA_{T6, CZ30}$ (**Fig. 36 B**) e $PBS_{T18, CZ30}$ com $TxA_{T18, CZ30}$ (**Fig. 37 B**) não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). No entanto, $PBS_{T6, CZ30}$ e $TxA_{T6, CZ30}$ comparados respectivamente com PBS_{T6} e TxA_{T6} ; e $PBS_{T18, CZ30}$ e $TxA_{T18, CZ30}$ comparados ao controle PBS_{P18} , diferiram significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA

Bidimensional). $TxA_{T18, CZ30}$ também foi diferente estatisticamente do grupo TxA_{T18} correspondente.

As respostas máximas à estimulação com ACh (**Fig. 38 B**) nos grupos $TxA_{T6, CZ30}$ e $TxA_{T18, CZ30}$ foram $85,7 \pm 7,2$ e $57,8 \pm 9,7$ % daquela no grupo PBS_{P6} e PBS_{P18} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{P18} ; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e $115,4 \pm 9,7$ e $205,1 \pm 34,6$ % de TxA_{T6} e TxA_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T18} ; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). No grupo $PBS_{T6, CZ30}$ a resposta a ACh foi $68,3 \pm 8,9$ e $51,6 \pm 6,7$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações significantes; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e em $PBS_{T18, CZ30}$ foi $106,3 \pm 17,5$ e $226,6 \pm 37,3$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T18} ; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, em relação a ACh, todos os dados dos grupos $PBS_{T6, CZ30}$ com $TxA_{T6, CZ30}$ (**Fig. 36 C**) foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional), inclusive em relação ao controle correspondente (PBS_{P6}) e aos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6} , respectivamente. Comparado os grupos $PBS_{T18, CZ30}$ e $TxA_{T18, CZ30}$ (**Fig. 37 C**), todos os dados em blocos, apresentaram diferenças significantes estatisticamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional), exceto o grupo PBS_{P18} com o $PBS_{T18, CZ30}$. Comparados ($PBS_{T18, CZ30}$ e $TxA_{T18, CZ30}$) aos grupos PBS_{T18} e TxA_{T18} , respectivamente, diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

A EC_{50} $17,6$ mM de K^+ mas não a EC_{50} $1,5$ μ M de ACh para o grupo $TxA_{T6, CZ30}$, diferiu da EC_{50} do grupo correspondente de TxA_{T6} . Da mesma forma, a EC_{50} de $18,3$ mM de K^+ mas não a EC_{50} $34,0$ μ M de ACh para o grupo $TxA_{T18, CZ30}$, diferiu de forma significativa quando comparada a EC_{50} do grupo correspondente de TxA_{T18} (ver **Tabela 13**).

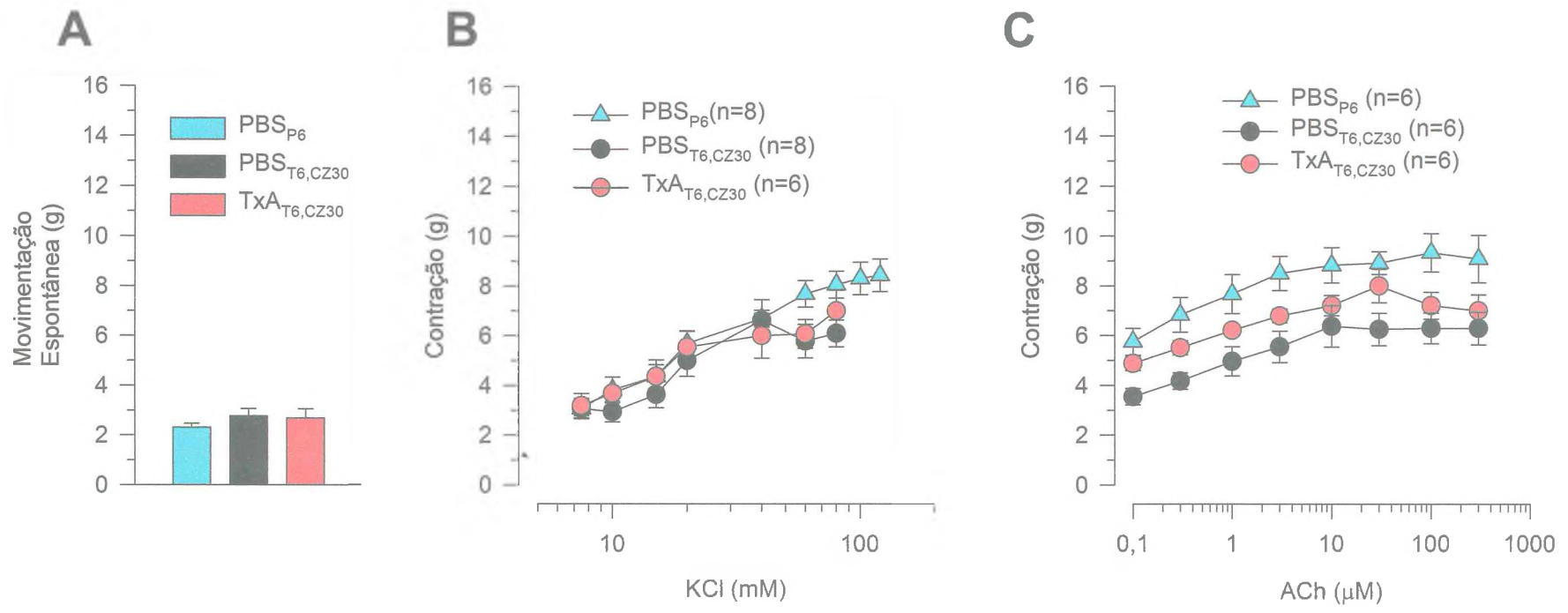


Fig. 36 – Atividade do OECz 30 mg/kg nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição a TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 µM).

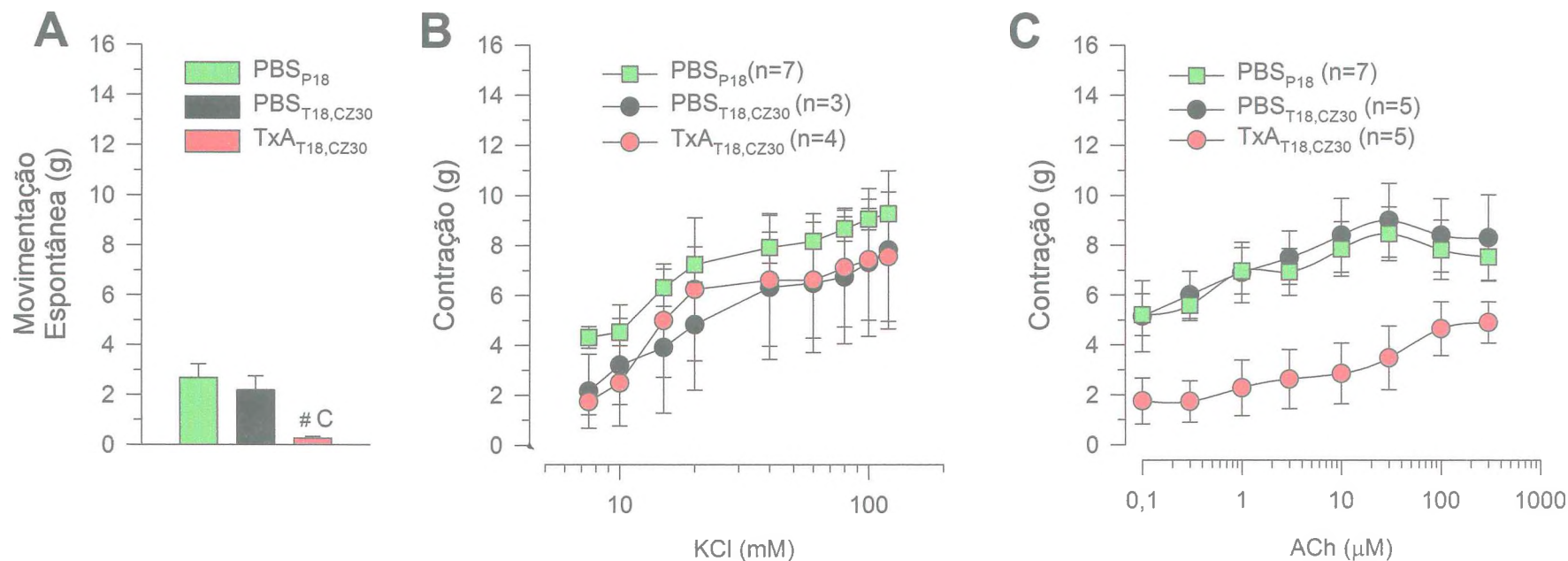


Fig. 37 – Atividade do OECz 30 mg/kg nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição a TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta;

B, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação

(média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 µM). #Significância em relação ao grupo

PBS_{P18}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18} (p≤0,05; ANOVA com contraste).

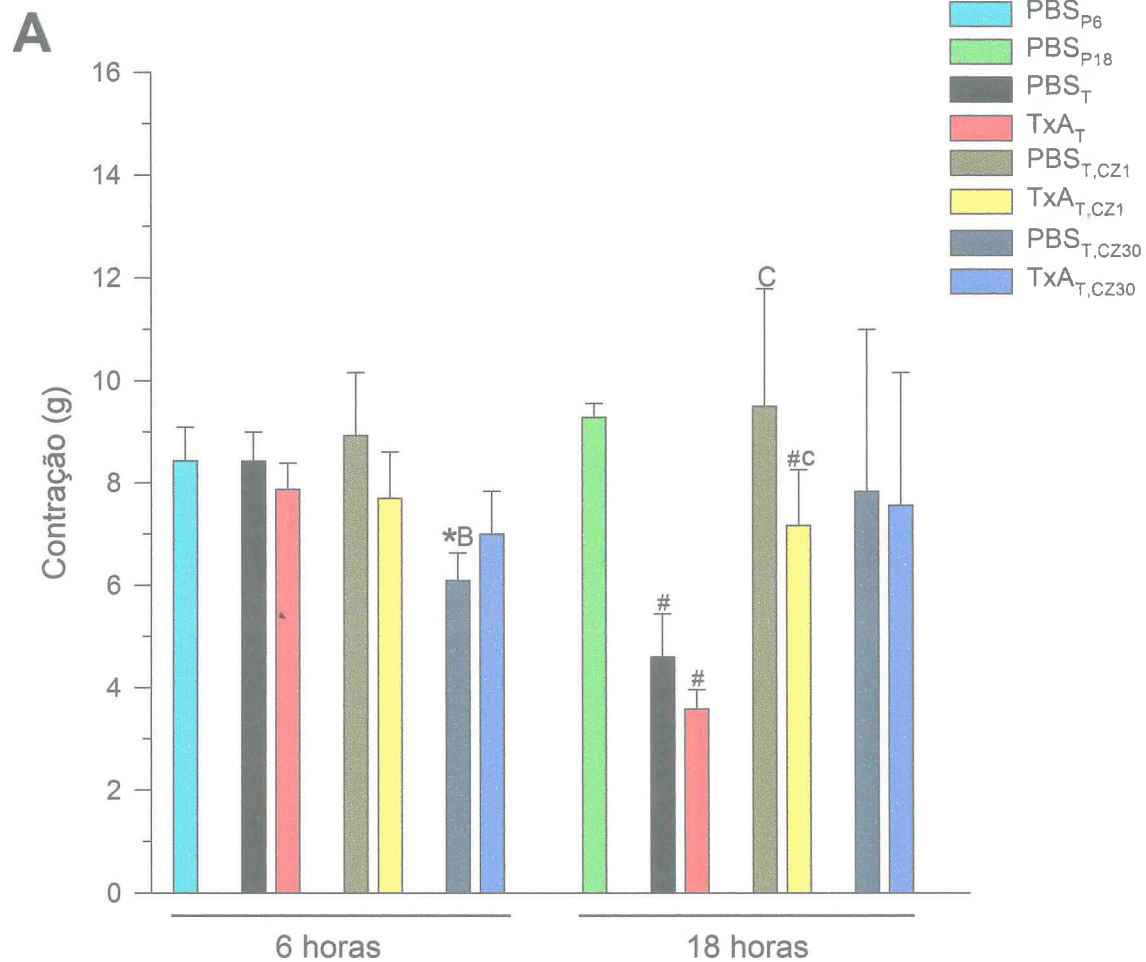


Fig. 38. A – Amplitudes (média \pm epm) das respostas máximas ao K^+ dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com OECz (nas doses de 1 ou 30 mg/Kg) e expostos ao PBS ou a TxA. *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^ASignificância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^CSignificância em relação ao grupo TxA_{T18} ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

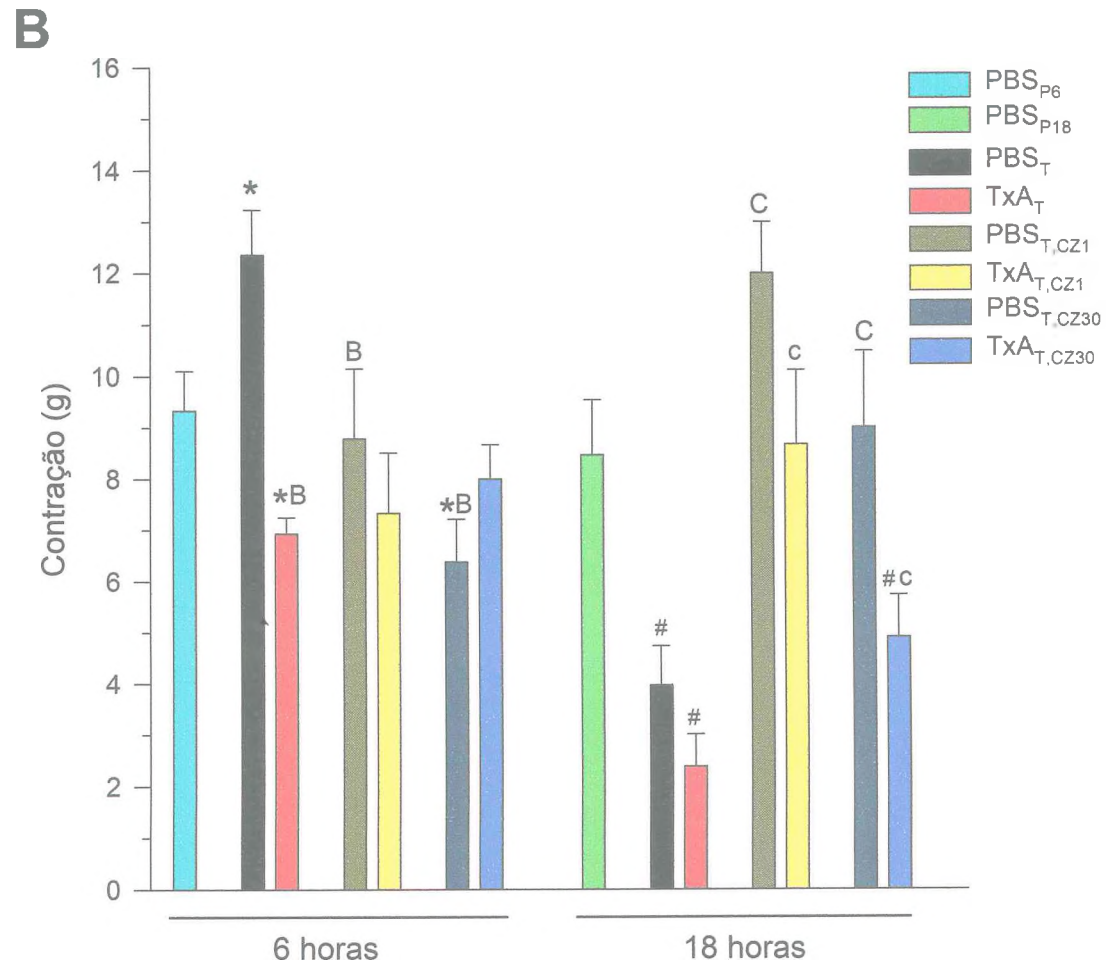


Fig. 38. B – Amplitudes médias das respostas máximas a ACh dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com OECz (nas doses de 1 ou 30 mg/Kg) e expostos ao PBS ou a TxA. *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^cSignificância em relação ao grupo TxA_{T18} (p<0,05; ANOVA com contraste).

TABELA 13:
MÉDIAS DAS EC₅₀ DOS GRUPOS TRATADOS COM O ÓLEO ESSENCIAL DO
Croton zehntneri (30mg/Kg)

TRATAMENTO	KCl (mM)	ACh (μM)
PBS _{P6}	22,738 ± 1,159 (n=8)	1,255 ± 1,302 (n=6)
PBS _{T6}	20,627 ± 1,145 (n=7)	4,259 ± 1,357 (n=7)
TxA _{T6}	34,765 ± 1,118 (n=7)	1,399 ± 1,726 (n=6)
PBS _{T6,CZ30}	19,137 ± 1,082 (n=8)	1,728 ± 1,155 (n=6)
TxA _{T6,CZ30}	^b 17,631 ± 1,077 (n=7)	1,468 ± 1,452 (n=6)
PBS _{P18}	17,655 ± 1,186 (n=7)	2,802 ± 1,740 (n=6)
PBS _{T18}	23,186 ± 1,113 (n=9)	1,960 ± 1,561 (n=10)
TxA _{T18}	39,423 ± 1,168 (n=8)	9,651 ± 1,580 (n=7)
PBS _{T18,CZ30}	22,979 ± 1,124 (n=3)	1,154 ± 1,619 (n=5)
TxA _{T18,CZ30}	^c 18,267 ± 1,242 (n=3)	[#] 34,080 ± 1,250 (n=4)

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^bSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^cSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^eSignificância em relação ao grupo TxA_{T18}; p<0,05; ANOVA com contraste.

4. Participação do sistema nervoso entérico (SNE) no efeito da TxA do *C. difficile* sobre a contratilidade intestinal.

4.1 Efeito do hexametônio na depressão da contratilidade intestinal induzida pela TxA do *C. difficile*.

Os segmentos intestinais de animais pré-tratados com hexametônio (HEX) e expostos ao PBS ou a TxA durante 6 h (grupos PBS_{T6, HEX} e TxA_{T6, HEX}, respectivamente) apresentaram amplitudes médias das movimentações espontâneas que foram $156,7 \pm 15,2$ e $183,8 \pm 15,1$ % do controle (PBS_{P6}; **Tabela 1**) e dele diferiram significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls; **Fig. 39 A**). Nos grupos PBS_{T18, HEX} e TxA_{T18, HEX} (18 h de exposição a TxA) as amplitudes médias das movimentações espontâneas que foram $93,0 \pm 44,9$ e $37,2 \pm 4,4$ %, do controle correspondente (PBS_{P18}; **Tabela 1**) e dele diferiu (foi menor) significativamente o grupo TxA_{T18, CZ30} (**Fig. 40 A**). Em relação aos grupos PBS_T e TxA_T, PBS_{T6, HEX} e TxA_{T6, HEX} foram $127,9 \pm 12,4$ e $226,7 \pm 18,6$ %, respectivamente de PBS_{T6} e TxA_{T6} (**Tabela 1**; alteração significante em relação ao grupo TxA_{T6}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e PBS_{T18, HEX} e TxA_{T18, HEX} foram $162,1 \pm 78,3$ e $173,9 \pm 20,5$ %, respectivamente de PBS_{T18} e TxA_{T18} (**Tabela 1**; alterações não significantes).

As respostas contráteis a estimulação com diferentes concentrações dos dois agonistas (K^+ e ACh), nos grupos PBS_{T6, HEX} e TxA_{T6, HEX} (**Fig. 39 B e C**) e PBS_{T18, HEX} e TxA_{T18, HEX} (**Fig. 40 B e C**) foram de uma maneira geral de amplitude maior ou menor do que nos respectivos controles (PBS_{P6} e PBS_{P18}).

Quando comparada às amplitudes médias das respostas máximas ao K^+ (**Fig. 41 A**), TxA_{T6, HEX} foi $132,7 \pm 6,1$ e $142,2 \pm 6,5$ % de PBS_{P6} e TxA_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações significantes; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e TxA_{T18, HEX} foi $120,1 \pm 24,4$ e $311,2 \pm 63,3$ % de PBS_{P18} e TxA_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo TxA_{T18}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). Em PBS_{T6, HEX} a resposta máxima ao K^+ foi $116,1 \pm 8,7$ e $116,2 \pm 8,7$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6}, respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significantes) e em PBS_{T18, HEX} foi $130,1 \pm 28,7$ e $262,8 \pm 58,1$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18}, respectivamente (**Tabela 2**; alteração significativa em relação ao grupo PBS_{T18}; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls).

Comparados em blocos, em relação ao K^+ , todos os dados dos grupos $PBS_{T6, HEX}$ com $TxA_{T6, HEX}$ (**Fig. 39 B**) apresentaram diferenças significativas entre si e em relação ao controle correspondente (PBS_{P6}). Também quando comparados aos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6} , respectivamente, diferiram significativamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Comparados em blocos os grupos $PBS_{T18, HEX}$ com $TxA_{T18, HEX}$ (**Fig. 40 B**) não diferiram entre si, mas foram significativamente diferentes (maiores) do controle correspondente (PBS_{P18}).

As respostas máximas à estimulação com ACh (**Fig. 41 B**) nos grupos $TxA_{T6, HEX}$ e $TxA_{T18, HEX}$ foram $115,1 \pm 7,8$ e $71,8 \pm 12,6$ % daquela no grupo PBS_{P6} e PBS_{P18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significativas) e $155,1 \pm 10,5$ e $254,6 \pm 44,7$ % de TxA_{T6} e TxA_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações significativas; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls). No grupo $PBS_{T6, HEX}$ a resposta a ACh foi $101,2 \pm 9,5$ e $76,4 \pm 7,1$ % de PBS_{P6} e PBS_{T6} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações significativas em relação ao grupo PBS_{T6} ; $p \leq 0,05$; ANOVA, Student-Newman-Keuls) e em $PBS_{T18, HEX}$ foi $73,8 \pm 16,1$ e $157,4 \pm 34,3$ % de PBS_{P18} e PBS_{T18} , respectivamente (**Tabela 2**; alterações não significativas).

Comparados em blocos, em relação a ACh, todos os dados dos grupos $PBS_{T6, HEX}$ com $TxA_{T6, HEX}$ (**Fig. 39 C**) foram estatisticamente diferentes, exceto quando comparado o grupo PBS_{P6} com $PBS_{T6, HEX}$ ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Em relação aos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6} , respectivamente também apresentaram diferenças significativas. Comparado os dados em blocos do grupo $PBS_{T18, HEX}$ com $TxA_{T18, HEX}$ (**Fig. 40 C**) não houve diferenças significativas estatisticamente, no entanto ambos diferiram (foram menores) do grupo PBS_{P18} e (foram maiores) dos grupos PBS_{T18} e TxA_{T18} , respectivamente ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional).

A EC_{50} 20,7 mM de K^+ mas não a EC_{50} 1,4 μM de ACh para o grupo $TxA_{T6, HEX}$ diferiu da EC_{50} do grupo correspondente de TxA_{T6} . Já as EC_{50} de 18,1 mM de K^+ e 1,6 μM de ACh para o grupo $TxA_{T18, HEX}$ diferiram de forma significativa quando comparadas as EC_{50} dos grupos correspondentes de TxA_{T18} (ver **Tabela 14**).

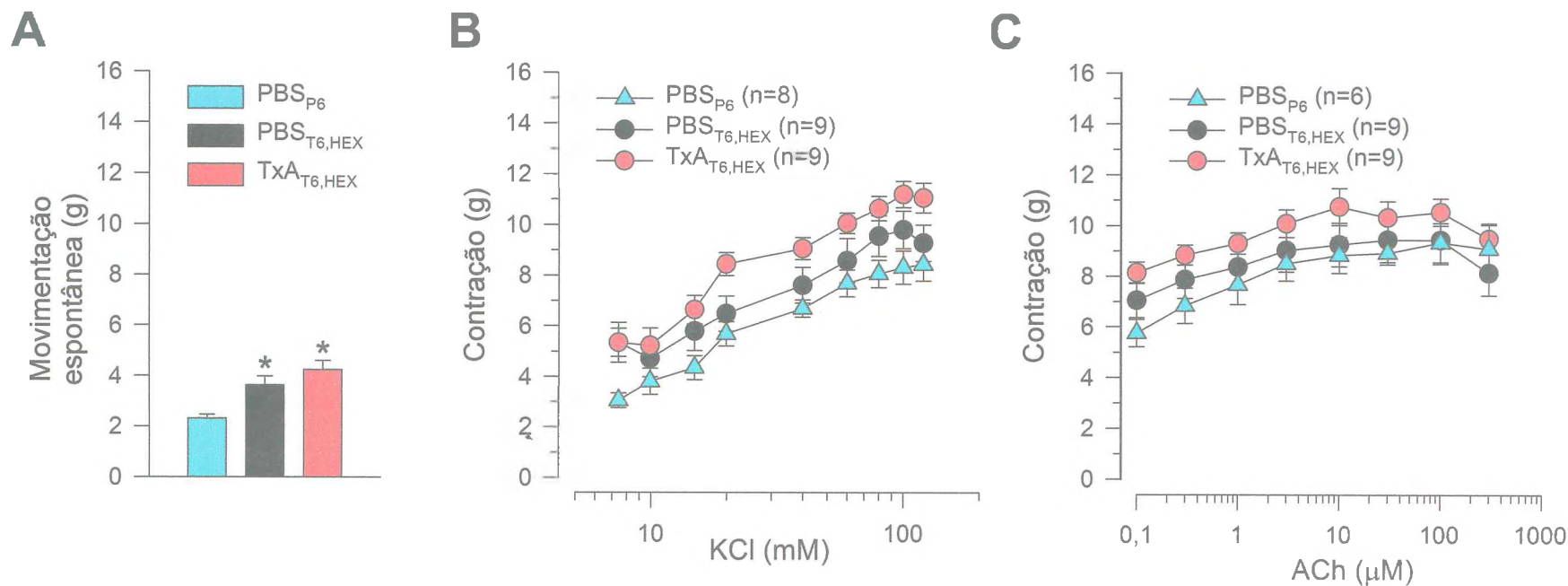


Fig. 39 – Atividade do hexametônio nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 6 h de exposição a TxA.

A, amplitude (média ± epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K⁺ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média ± epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μM). *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; (p≤0,05; ANOVA com contraste).

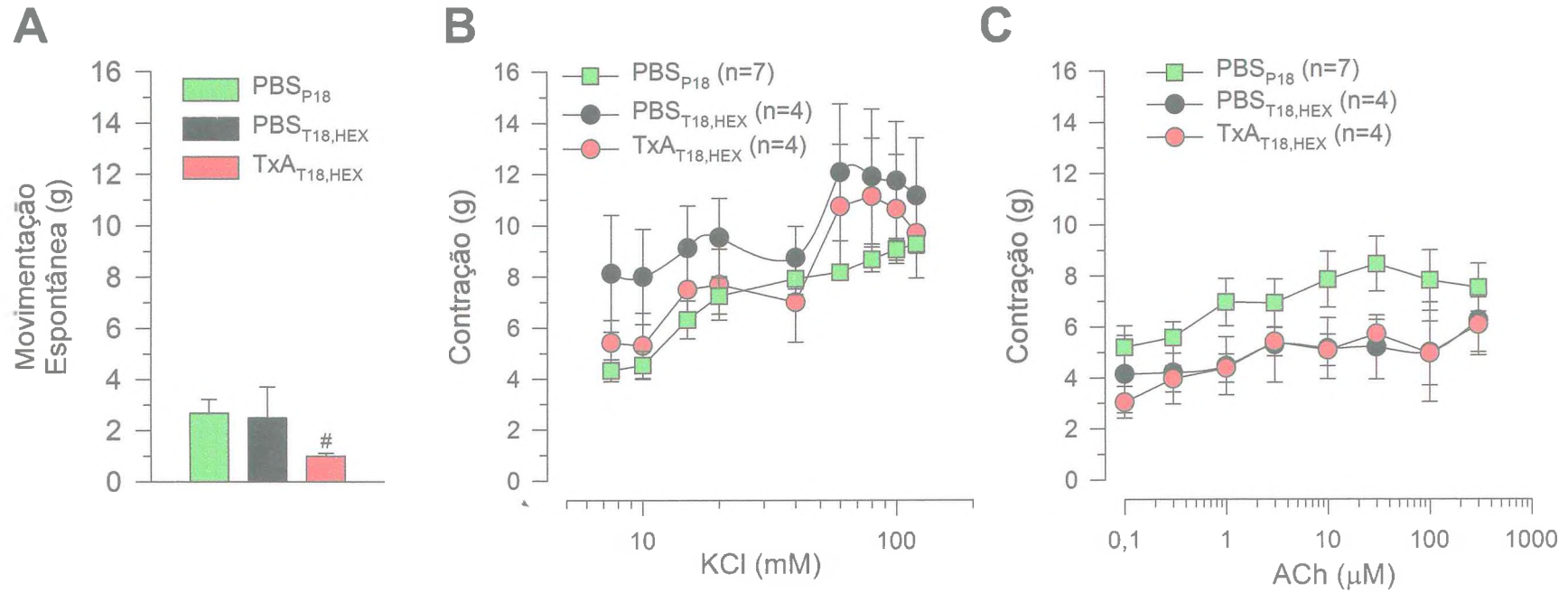


Fig. 40 – Atividade do hexametônio nos efeitos induzidos sobre a contratilidade intestinal em 18 h de exposição à TxA.

A, amplitude média (média \pm epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média \pm epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K^+ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média \pm epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μ M).

[#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

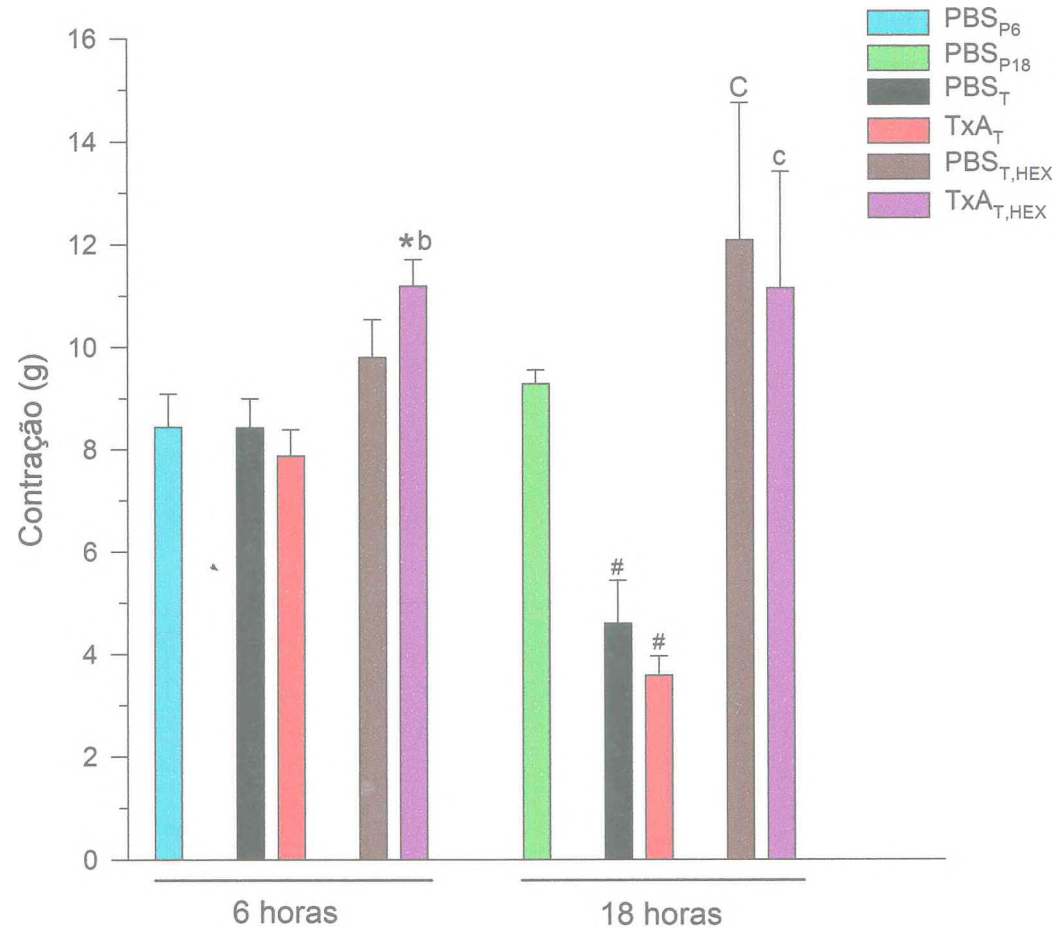
A

Fig. 41. A – Amplitudes (média \pm epm) das respostas máximas ao K^+ dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com hexametônio e expostos ao PBS ou a TxA. #Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; ^CSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^cSignificância em relação ao grupo TxA_{T18} ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

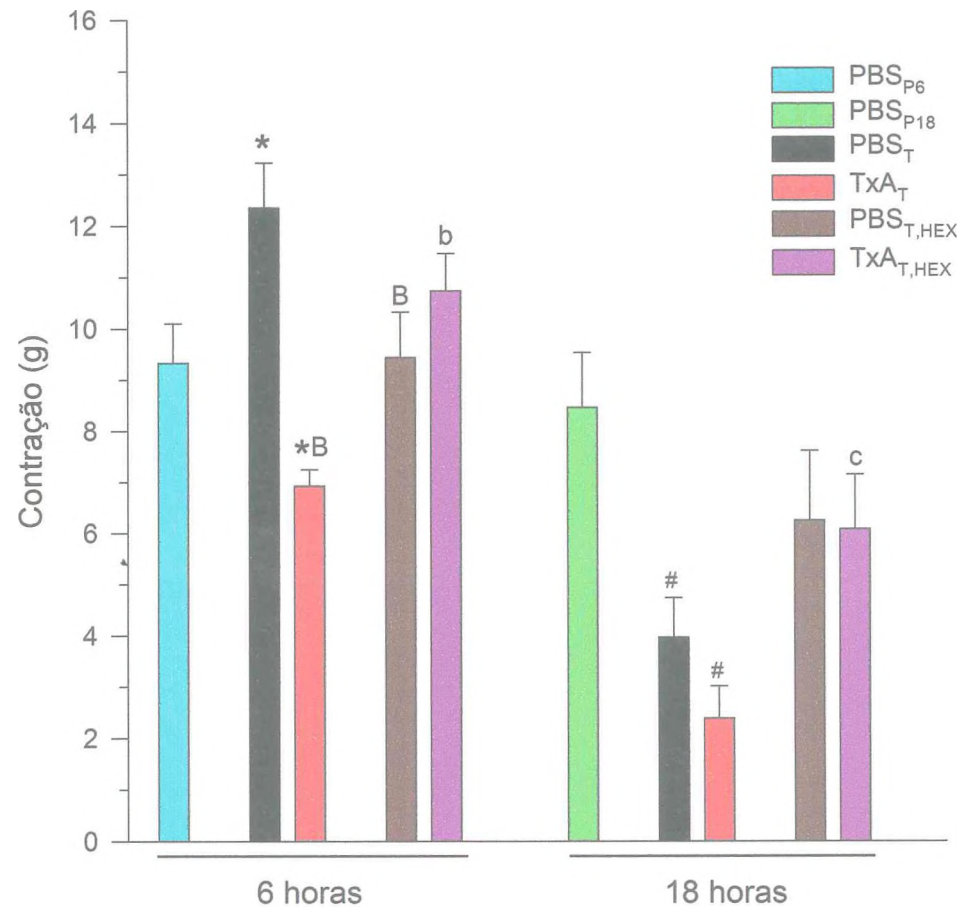
B

Fig. 41. B – Amplitudes médias das respostas máximas a ACh dos segmentos intestinais de animais pré-tratados com hexamatônio e expostos ao PBS ou a TxA. *Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^BSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; ^CSignificância em relação ao grupo TxA_{T18} (p≤0,05; ANOVA com contraste).

TABELA 14:
MÉDIAS DAS EC₅₀ DOS GRUPOS TRATADOS COM HEXAMETÔNIO

TRATAMENTO	KCl (mM)	ACh (μM)
PBS _{P6}	22,738 ± 1,159 (n=8)	1,255 ± 1,302 (n=6)
PBS _{T6}	20,627 ± 1,145 (n=7)	4,259 ± 1,357 (n=7)
TxA _{T6}	34,765 ± 1,118 (n=7)	1,399 ± 1,726 (n=6)
PBS_{T6,HEX}	23,763 ± 1,145 (n=10)	2,244 ± 1,382 (n=11)
TxA_{T6,HEX}	^b 20,691 ± 1,114 (n=9)	1,421 ± 1,267 (n=9)
PBS _{P18}	17,655 ± 1,186 (n=7)	2,802 ± 1,740 (n=6)
PBS _{T18}	23,186 ± 1,113 (n=9)	1,960 ± 1,561 (n=10)
TxA _{T18}	39,423 ± 1,168 (n=8)	9,651 ± 1,580 (n=7)
PBS_{T18,HEX}	18,880 ± 1,252 (n=6)	0,759 ± 2,268 (n=3)
TxA_{T18,HEX}	^c 18,072 ± 1,127 (n=5)	^c 1,612 ± 1,768 (n=6)

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; ^bSignificância em relação ao grupo PBS_{T6}; ^bSignificância em relação ao grupo TxA_{T6}; [#]Significância em relação ao grupo PBS_{P18}; ^cSignificância em relação ao grupo PBS_{T18}; ^cSignificância em relação ao grupo TxA_{T18}; p<0,05; ANOVA com contraste.

4.2 Efeito do hexametônio na resposta contrátil intestinal à estimulação elétrica seletiva do SNE.

Para determinar a participação do sistema de receptores colinérgicos nicotínicos na resposta contrátil à estimulação seletiva do sistema nervoso entérico, em presença e ausência de hexametônio realizamos a aplicação de trens de pulsos com frequência e duração de pulsos apropriados para estimular neurônios, mas não células musculares lisas (vide materiais e métodos). Além disso, nas mesmas preparações, em presença e ausência de hexametônio, realizamos a estimulação com K^+ (60 mM) e com ACh (100 μ M). Esses protocolos foram realizados em alças expostas a TxA ou ao PBS provenientes de animais em que segmentos foram expostos a TxA por 6 horas.

Nos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6} , em presença de 0,5 mM de hexametônio, a amplitude média da contração em resposta a um trem de estímulos de efeito sub-maximal foi $37,9 \pm 15,5$ (8) e $7,4 \pm 7,4$ (8) %, respectivamente, dos controles (grupos PBS_{T6} ($7,01 \pm 1,62$ g (8)) e TxA_{T6} ($5,81 \pm 0,62$ g (8)) em ausência de hexametônio; Fig. 42) e deles diferiram significativamente ($p \leq 0,05$, ANOVA, Teste de Bonferroni). A diferença entre os grupos PBS_{T6} e TxA_{T6} , em presença de hexametônio, também o foi ($p \leq 0,05$, ANOVA, Teste de Bonferroni). Nos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6} (das mesmas preparações da determinação anterior) em presença de 0,5 mM de hexametônio, a amplitude média da contração em resposta ao estímulo com K^+ (60 mM) foi $100,7 \pm 19,5$ (8) e $86,2 \pm 9,0$ (8) % e com ACh (100 μ M) foi $113,2 \pm 20,9$ (5) e $108,7 \pm 27,8$ (5) das respectivas respostas aos trens de estímulo nos controles (PBS_{T6} ($7,01 \pm 1,62$ (8)) e TxA_{T6} ($5,81 \pm 0,62$ g (8)) em ausência de hexametônio; Fig. 42) e deles não diferiram significativamente, bem como também não o foram entre si (ANOVA, Teste de Bonferroni). Ainda nos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6} , e nas mesmas preparações das determinações anteriores, após a lavagem do hexametônio (60 min) houve recuperação da resposta ao estímulo elétrico, que foi $60,6 \pm 10,7$ (4) e $111,8 \pm 8,6$ (4) %, respectivamente, do valor da resposta no respectivo trem de estímulo dos controles (Fig. 42). As amplitudes médias das contrações em resposta ao estímulo com K^+ (60 mM), após lavagem do hexametônio, nos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6} , foram $162,9 \pm 30,2$ (4) e $86,0 \pm 12,2$ (4) %, respectivamente, e para ACh (100 μ M) foram $139,7 \pm 5,7$ (5) e $131,4 \pm 16,7$ (5) %, respectivamente, dos valores em presença de hexametônio, não tendo

havido diferença estatisticamente significante em relação a esses valores (ANOVA, Teste de Bonferoni).

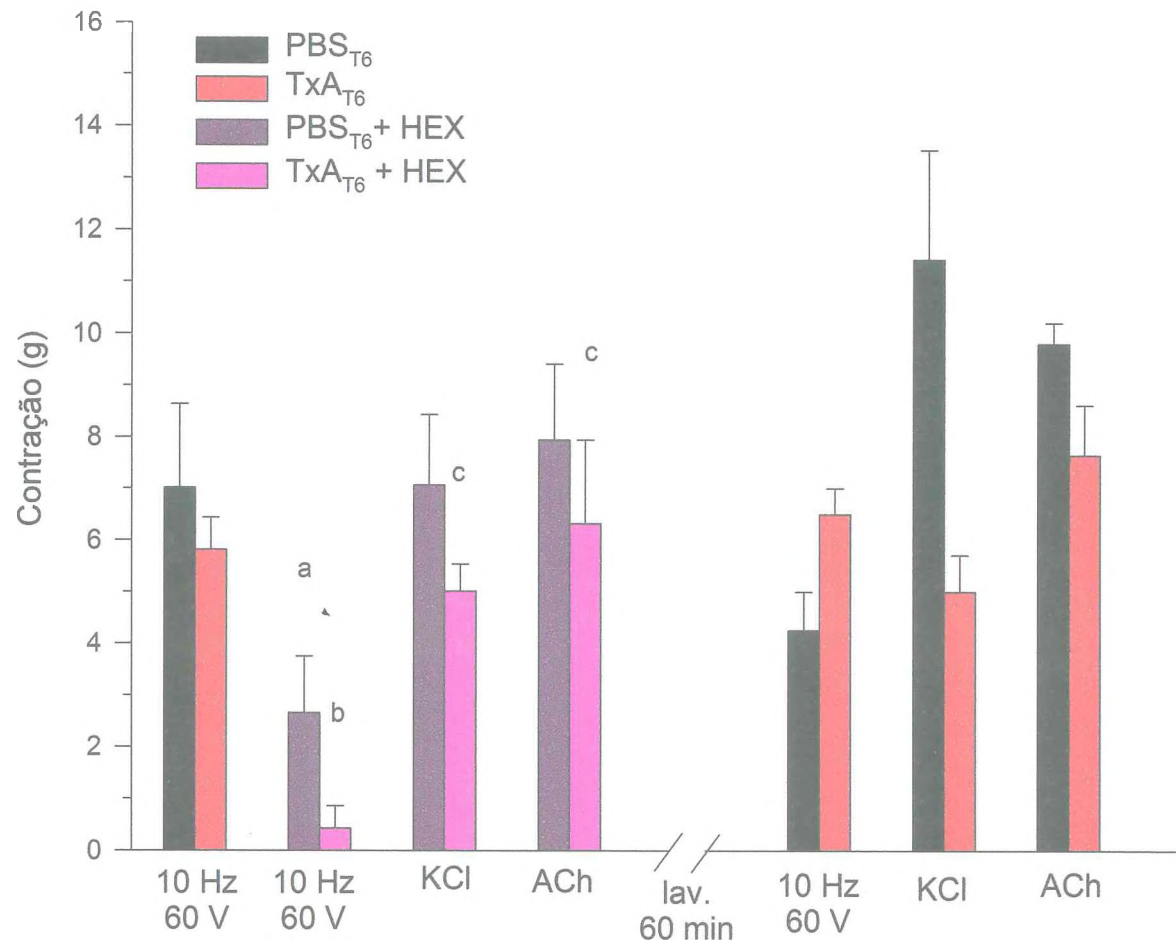


Fig. 42 – Efeito do hexametônio nas contrações induzidas por estimulação elétrica direta nos segmentos intestinais

de animais expostos por 6 h ao PBS ou a TxA . ^aSignificância estatística em relação a resposta ao estímulo submaximal no grupo PBS_{T6} na ausência de hexametônio; ^bSignificância estatística em relação a resposta ao estímulo submaximal no grupo TxA_{T6} na ausência de hexametônio; ^cSignificância estatística em relação a resposta ao estímulo submaximal no grupo PBS_{T6} na presença de hexametônio ($p \leq 0,05$; ANOVA, Teste de Bonferoni).

5. Efeito da TxA do *C. difficile* na contratilidade de tiras circular intestinal

Para caracterizar os efeitos da TxA (1 μ g / segmento) na contratilidade, do músculo circular de segmentos ileais usou-se um protocolo similar àquele usado para o músculo longitudinal. Alças isolados em um mesmo animal, ainda vivo, foram, durante 6 horas, duas expostas a TxA e duas outras apenas ao PBS (controle interno). Em seguida o animal foi sacrificado e os segmentos dessas alças foram montados *in vitro* para estudo da contratilidade. Os grupos de experimentos realizados em íleos provenientes desses animais e que foram expostos a TxA ou ao PBS por 6 h foram, como no caso do músculo longitudinal, designados TxA_{T6} e PBS_{T6}, respectivamente. Em outro conjunto de animais, todas as alças isoladas em um dado animal foram expostas apenas ao PBS e o grupo de experimentos em segmentos de alças provenientes desses animais foi designado PBS_{P6}.

Experimentos *in vitro* realizados com os segmentos intestinais a partir destes grupos mostraram uma depressão da contratilidade, evidenciada nos parâmetros movimentação espontânea e na comparação em bloco das respostas ao K⁺ e a ACh. (**Fig. 43 A, B e C**).

Em relação à amplitude média da movimentação espontânea (**Fig. 43 A**), os valores desse parâmetro nos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6} foram $47,4 \pm 15,5$ e $34,6 \pm 5,2$ %, respectivamente, do correspondente valor em PBS_{P6} (**Tabela 15**). Assim, PBS_{P6} foi maior que PBS_{T6} e PBS_{T6} foi maior que TxA_{T6}. Essas alterações da movimentação espontânea foram estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA, teste de Student-Newman-Keuls).

Em relação à amplitude média das respostas máximas ao K⁺ (**Fig. 44**), os valores desse parâmetro nos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6} foram $84,6 \pm 15,4$ e $68,0 \pm 8,8$ %, respectivamente, do correspondente valor em PBS_{P6} (**Tabela 16**). Essas alterações da resposta máxima ao K⁺ não foram estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA, teste de Student-Newman-Keuls). Quando o conjunto de todas as amplitudes das respostas contrateis às diferentes concentrações de K⁺ do grupo TxA_{T6} foi comparado com o conjunto dessas respostas no grupo PBS_{T6} (comparação em bloco), houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Também foram estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional) as respostas contrateis ao K⁺ nos grupos TxA_{T6} e PBS_{P6}, mas não para os grupos PBS_{T6} e PBS_{P6}, quando comparados todos em bloco. (**Fig. 43 B**)

Em relação à amplitude da resposta máxima à ACh (**Fig. 44**), os valores desse parâmetro nos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6} foram $75,7 \pm 12,6$ e $66,8 \pm 14,8$ %, respectivamente, do correspondente valor em PBS_{P6} (**Tabela 16**). De maneira similar ao que ocorreu em relação à resposta máxima ao K⁺, essas alterações da resposta máxima à ACh não foram estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$; ANOVA, teste de Student-Newman-Keuls). A comparação em bloco das amplitudes das respostas contráteis à ACh entre os grupos TxA_{T6} e o grupo PBS_{T6} mostrou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional). Também houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$; ANOVA Bidimensional) para a comparação em bloco das respostas contráteis à ACh entre os grupos TxA_{T6} e PBS_{P6} mas não para os grupos PBS_{T6} e PBS_{P6} (**Fig 43 C**).

Em relação à EC₅₀ de K⁺ para resposta contrátil (**Tabela 17**), os valores desse parâmetro nos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6} foram 29,5 e 24,4 mM, respectivamente, e não diferiram significativamente (ANOVA, teste de Student-Newman-Keuls) entre si nem do correspondente valor em PBS_{P6} (controle: 19,0 mM). Em relação à EC₅₀ de ACh para resposta contrátil (**Tabela 17**), os valores desse parâmetro nos grupos PBS_{T6} e TxA_{T6} foram 6,0 e 5,9 μM, respectivamente, e não diferiram significativamente (ANOVA, teste de Student-Newman-Keuls) entre si nem do correspondente valor em PBS_{P6} (controle: 1,3 μM).

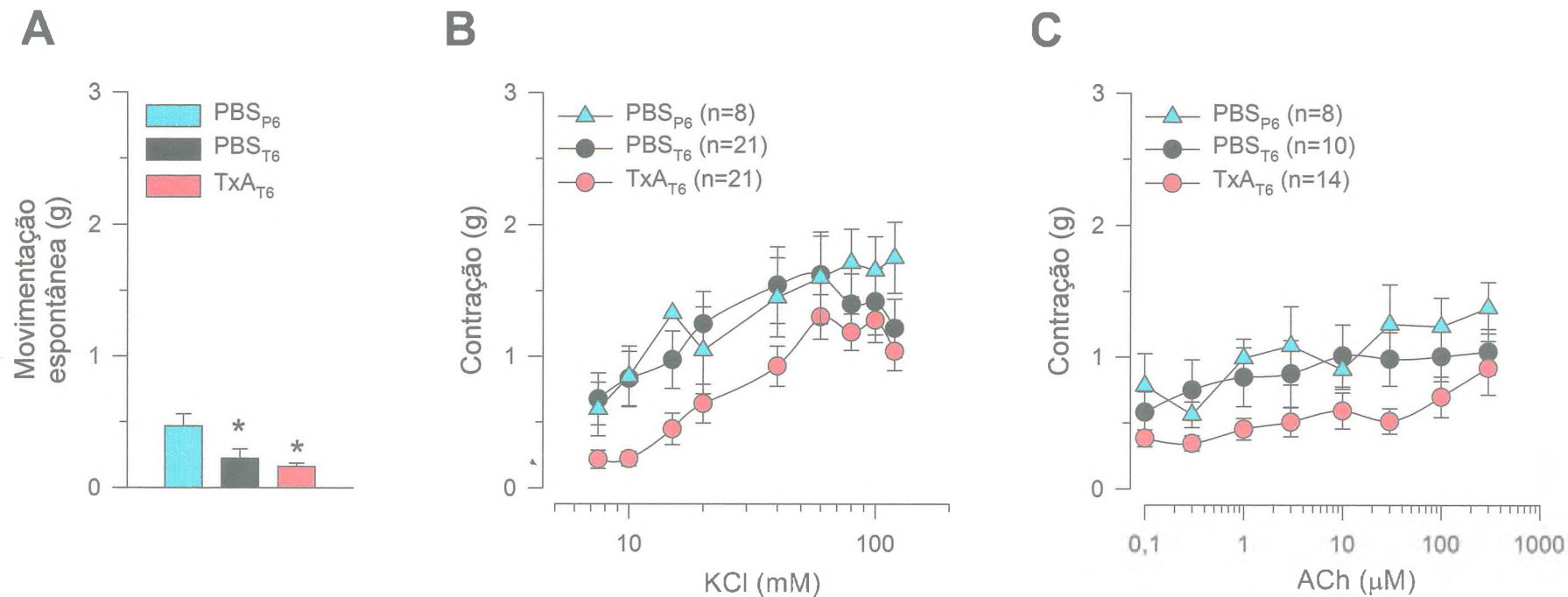


Fig. 43 – Alteração da contratilidade de tiras circular intestinal induzida em 6 h de exposição à TxA.

A, amplitude (média \pm epm) das movimentações espontâneas registradas antes do início de cada curva concentração-resposta; **B**, quantificação (média \pm epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por K^+ (7,5-120 mM); **C**, quantificação (média \pm epm) das amplitudes pico-a-pico das contrações induzidas por ACh (0,1-300 μ M); *Significância em relação ao grupo PBS_{P6} ($p \leq 0,05$; ANOVA com contraste).

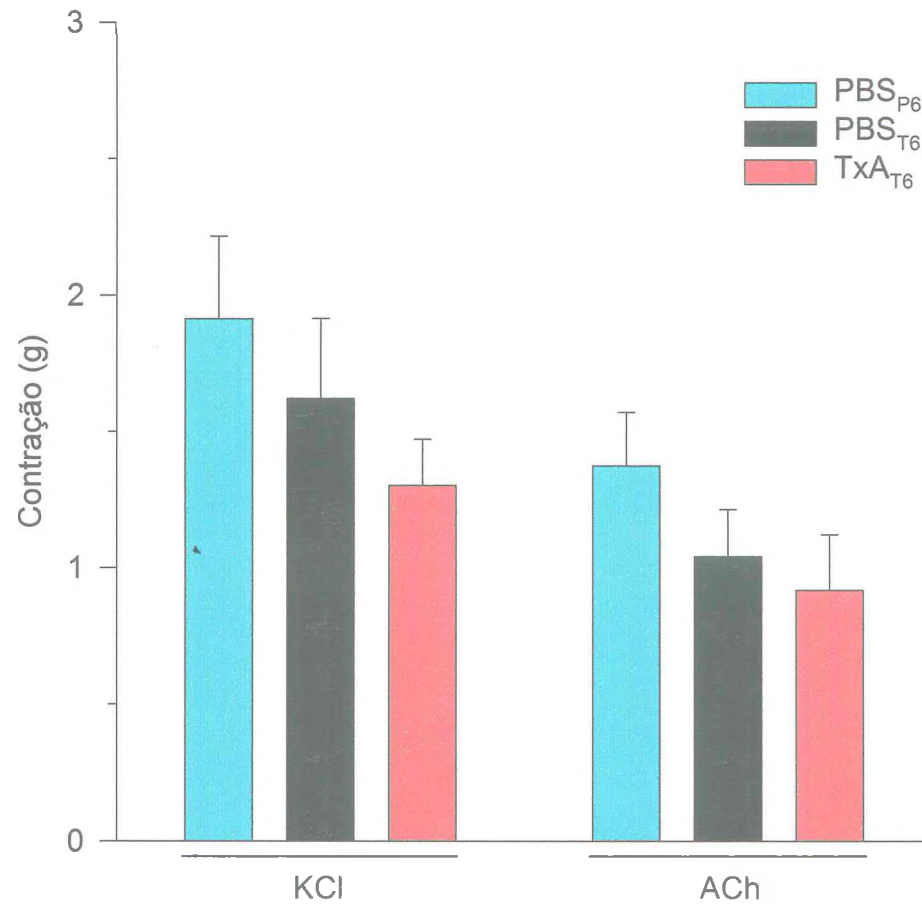


Fig. 44. – Amplitudes (média \pm epm) das respostas máximas ao K^+ e à ACh em tiras circular intestinal expostas ao PBS ou a TxA por 6 h.

TABELA 15:
MOVIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DO MÚSCULO CIRCULAR

TRATAMENTO	AMPLITUDE MÉDIA (g)
PBS _{P6}	0,468 ± 0,0916 (n=16)
PBS _{T6}	*0,222 ± 0,072 (n=15)
TxA _{T6}	*0,162 ± 0,024 (n=15)

*Significância em relação ao grupo PBS_{P6}; p<0,05; ANOVA com contraste.

TABELA 16:
AMPLITUDES MÁXIMAS DO MÚSCULO CIRCULAR

TRATAMENTO	KCl (g)	ACh (g)
PBS _{P6}	1,915 ± 0,301 (n=8)	1,374 ± 0,196 (n=8)
PBS _{T6}	1,621 ± 0,294 (n=14)	1,041 ± 0,173 (n=10)
TxA _{T6}	1,302 ± 0,169 (n=19)	0,918 ± 0,204 (n=14)

TABELA 17:
MÉDIAS DAS EC₅₀ DO MUSCULO CIRCULAR

TRATAMENTO	KCl (mM)	ACh (µM)
PBS _{P6}	19,005 ± 1,238 (n=8)	1,308 ± 1,418 (n=7)
PBS _{T6}	29,569 ± 1,207 (n=12)	6,012 ± 1,857 (n=7)
TxA _{T6}	24,417 ± 1,134 (n=19)	5,911 ± 1,737 (n=6)

DISCUSSÃO

1. Principais Descobertas

O presente estudo demonstra que a TxA do *Clostridium difficile* apresenta um efeito depressor sobre a contratilidade intestinal, que é de curso temporal bifásico. Esse efeito é inicialmente estimulante e posteriormente depressor de três parâmetros da contratilidade intestinal: a movimentação espontânea e as respostas contráteis à acetilcolina e a altas concentrações de K^+ . O efeito depressor, que é o mais duradouro, foi verificado tanto em músculo longitudinal quanto em músculo circular. Essas observações do curso temporal bifásico, bem como o do efeito sobre a contratilidade com pequenas concentrações de TxA (1 $\mu\text{g/mL/alça}$), comparadas com aquelas previamente utilizadas, conforme disponível na literatura [60 $\mu\text{g/mL/alça}$ (Gilbert e cols., 1989) ou 200 $\mu\text{g/mL/alça}$ (Burakoff e cols. 1995)], são originais.

O presente estudo também demonstra que agentes antitumorais, um agente bloqueador ganglionar, o hexametônio e um óleo essencial de planta nativa do Nordeste, o *Croton zehntneri*, protegem o íleo do efeito modificador da contratilidade da musculatura lisa longitudinal e circular induzida pela toxina A. Essas descobertas também são originais.

2. Características do Efeito

Estudos anteriores objetivando caracterizar os efeitos da TxA sobre a contratilidade do músculo liso intestinal foram realizados por Gilbert e cols. (1989), Burakoff e cols. (1995) e Percy e cols. (1998). Gilbert e cols. (1989), usando uma concentração de 60 $\mu\text{g/mL/alça}$ isolada de TxA demonstraram que essa toxina induz o aumento da atividade mioelétrica ileal responsável pela movimentação espontânea do músculo circular, porém esses resultados só foram encontrados em experimentos em que a TxA foi administrada *in vivo* e não *in vitro*. Burakoff e cols. (1995) mostraram que a TxA (200 $\mu\text{g/mL}$) aumenta significativamente, de 1 até 6 h, a frequência de “rajadas” de potenciais de ação responsáveis pela movimentação dos músculos longitudinal e circular de coelhos com o pico do aumento ocorrendo entre 2 e 3 h e depois diminuindo progressivamente. Percy e cols. (1998) utilizaram a TxA (100 $\mu\text{g/mL}$) e encontraram dois diferentes efeitos promovidos por essa toxina, administradas *in vitro* na *muscularis mucosae*: aumento na

freqüência das movimentações espontâneas seguida de uma pequena mas significativa contração e ainda diminuição na amplitude de resposta contrátil à altas concentrações de K^+ e à ACh. Nesse estudo Percy e cols. (1998) documentaram que a TxA atua apenas sobre a *muscularis mucosae*, camada essa que é a única camada muscular que apresenta receptores para TxA. Essas descobertas documentadas na literatura são coerentes com aquelas documentadas no presente estudo.

Gilbert e cols. (1989) demonstraram que a TxA aumenta a movimentação espontânea da musculatura circular de íleos de coelhos, por aumentar a amplitude da onda lenta intestinal. Gilbert e cols. (1989) usaram um protocolo diferente daquele usado neste estudo, pois expuseram os segmentos de íleo a concentrações de TxA bem mais altas (60 $\mu\text{g/mL/segmento}$) durante 2 h, em seguida ligaram os pedículos renais e lavaram os segmentos intestinais isolados durante 2 h com solução nutritora para, ao fim desse período, sacrificar o coelho e medir a atividade elétrica e a movimentação espontânea do músculo circular ileal. Apesar das diferenças de protocolos, os achados do presente estudo são largamente coerentes com os de Gilbert e cols. (1989) e com os de Percy e cols. (1998). O surpreendente no presente estudo é que se tenha obtido efeitos tão conspícuos com dose tão pequena de TxA, em tempo tão reduzido quanto 2 h, dose e tempo esses bem menores do que aquelas empregadas nos estudos anteriores. É também interessante observar que nos experimentos de Burakoff e cols. (1995) o aumento da atividade mioelétrica induzida pela TxA foi máxima entre 2 e 3 h e depois decaiu progressivamente, em um tempo de observação de 6 h para valores próximos ao controle, uma característica de efeito que apresenta similaridade com os nossos dados. Os tempos de 2 e 6 h para estabelecimento de efeito estimulante e depressor, respectivamente, da contratilidade intestinal, são também pequenos comparados com aqueles dos estudos de Menezes (2002) que demonstraram que são necessários tempos de exposição à TxA superiores a 6 h para que haja significativa indução de aumento de secreção intestinal pela TxA.

Outra importante característica do efeito da TxA é que ele provavelmente apresenta um componente local, nas alças expostas à TxA, e outro sistêmico, que afeta as alças intestinais vizinhas às àquelas expostas à TxA. Essa hipótese é sugerida pelo fato de nos animais que sofreram o mesmo tratamento cirúrgico daqueles que foram expostos à TxA, sem que nenhuma de suas alças intestinais ligadas tenha sido exposta à toxina, não houve depressão da contratilidade (como mostrado pela comparação entre os vários parâmetros em animais que sofreram cirurgia (grupos $\text{PBS}_{\text{P}2}$, $\text{PBS}_{\text{P}6}$, e $\text{PBS}_{\text{P}18}$.) e aqueles que foram diretamente sacrificados sem passarem pela etapa cirúrgica (grupo SC)). Mas, nos animais

em que algumas alças foram expostas a TxA, nas alças intestinais expostas apenas ao PBS houve um efeito de depressão da contratilidade intestinal, que foi significativa, embora essa depressão tenha sido menor do que aquela observado em alças diretamente expostas à TxA (como evidenciado pela comparação entre os grupos PBS_{P18} , PBS_{T18} e TXA_{T18}).

3. Mecanismos de Ação

3.1. O Mecanismo Contrátil Afetado

Para as preparações, tanto de segmentos diretamente expostos à TxA, como daqueles vizinhos que foram expostos apenas ao PBS, houve depressão da movimentação espontânea, e da resposta contrátil ao K^+ e à ACh. Algumas hipóteses concernentes a mecanismo de ação são sugeridas por esses fatos.

Uma importante hipótese é que a TxA atua também por mecanismo sistêmico, no sentido de que atua em alças não diretamente expostas a ela (efeito sistêmico, como designamos em resultados). Várias vias de atuação podem ser sugeridas para estabelecimento desse componente sistêmico da atuação: vias neurais, vias endócrinas, via mediadores inflamatórios, via miogênica.

A via miogênica é sugerível como meio de propagação do componente indireto por ser o músculo liso ileal longitudinal um sincício funcional (Kellow, 1996). Contudo, considerando-se o protocolos experimental utilizado, essa via é altamente improvável, pois as extremidades das alças foram delimitadas por ligadura, o que impede a propagação da atividade elétrica de uma alça ligada para outra através do sincício muscular.

Pela mesma razão, pode-se considerar improvável a propagação da atividade de alça a alça pelo componente intramural do plexo entérico. No entanto, devido aos efeitos do hexametônio, há que se postular uma importante participação do sistema nervoso nos efeitos depressivos da contratilidade intestinal promovida pela TxA. Muito provavelmente esse efeito envolve a participação de uma via nervosa que possa conectar as alças expostas à TxA com aquelas expostas apenas ao PBS. A divisão simpática e/ou parassimpática do sistema nervoso autônomo são os candidatos naturais a exercerem esse papel.

A participação da via mediadores inflamatórios foi pesquisada no presente estudo. Para se demonstrar a sua participação faz-se necessária à demonstração de que há reação inflamatória com liberação de mediadores inflamatórios, identificação desses mediadores e demonstração da participação dos mesmos.

Estudos de Lima e cols. (1989), demonstraram que já a partir das 2 h iniciais após a injeção da TxA em alças intestinais de coelho, há uma significativa infiltração de células mononucleares e uma potente secreção intestinal. Outros pesquisadores desse mesmo grupo mostraram que esta secreção vem acompanhada por uma excessiva reação inflamatória, as quais foram bloqueadas por alguns agentes antiinflamatórios (Fang e cols. 1994; Fonteles e cols, 1995). Essa resposta inflamatória da TxA envolve a liberação de vários mediadores com destaque para os mediadores lipídicos (prostaglandinas e leucotrienos) e citocinas como TNF- α e interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) (Triadafilopoulos e cols. 1987a; Triadafilopoulos e cols. 1989; Linevsky e cols. 1990; Miller e cols. 1990; Ribeiro e cols. 1991; Rocha, 1994; Mahida e cols. 1996; Rocha e cols. 1997; Souza e cols. 1997; Rocha e cols. 1998).

No presente estudo foram utilizados bloqueadores da síntese e liberação desses mediadores, quais sejam dexametasona, bloqueador de múltiplas vias da cascata de reações do processo inflamatório (Auphan e cols. 1995 e Wilckens e de Rijk, 1997, Goodman e Gilman, 1996 e Wilckens e de Rijk, 1997), quinacrina, bloqueador de fosfolipase A₂ (Struhar e cols. 1992), indometacina, bloqueador de ciclooxigenase (Higgs e Vane, 1983), celecoxibe, bloqueador de COX-2 (Alcântara e cols., 2001), motelucaste sódico, bloqueador de leucotrienos (Keam e cols. 2003), talidomida e pentoxifilina, bloqueadores da síntese de TNF- α (Sampaio e cols. 1991 ; Moreira e cols. 1993; LeMay e cols. 1990; Schandené e cols. 1992; Tilg e cols. 1993). A grande maioria desses fármacos oferece proteção contra a depressão da contratilidade promovida pela TxA, como discutiremos em mais detalhes logo abaixo, o que demonstra a participação da via mediadores inflamatórios. Essa descoberta está em coerência com os dados de outros estudos que demonstraram a importância dos fenômenos inflamatórios na alteração dos processos secretórios intestinais promovidas pela TxA.

Outro dado com implicações concernentes a mecanismo de atuação é que a TxA inicialmente amplificou e depois deprimiu as resposta contráteis à ACh e ao K⁺. Xia e cols. (2000) demonstraram que a TxA administrada *in vitro*, nas dezenas de minutos iniciais que se seguem à sua administração no banho, atua diretamente nos neurônios entéricos de intestino de cobaia, promovendo aumento da excitabilidade desses neurônios, com aparecimento de atividade espontânea, e inibindo a transmissão noradrenérgica inibitória. Como essas duas ações resultam, ao nível do músculo liso efetor, em aumento da contratilidade, torna-se fácil explicar o aumento da contratilidade nos momentos iniciais da exposição do íleo à toxina, como aquele observado neste estudo, com 2 h de atuação da

TxA, e em outros estudos (Percy e cols., 1998). No caso da depressão da contratilidade ileal, ela foi mais acentuada para a resposta ao neurotransmissor. Como a resposta contrátil ao K^+ não depende de receptores de membrana para neurotransmissores e autacóides, concluímos que parte do bloqueio da resposta à ACh foi por via inespecífica em relação a esses receptores de membrana, talvez por bloqueio do acoplamento excitação-contração e/ou outros efeitos sobre as etapas intracelulares do mecanismo da contração (interação das proteínas contráteis; sensibilidade das proteínas contráteis à $[Ca^{++}]$ no mioplasma, compartimentação do Ca^{++} intracelular, etc.). Nesse componente inespecífico (em relação a receptores da membrana sarcoplasmática para neurotransmissores) do bloqueio da contração possivelmente estão, portanto, envolvidas uma ou muitas das várias etapas da cascata de reações químicas e de processos de compartimentação do Ca^{++} envolvidos no controle da contração do músculo liso (Rembold, 1996). Parte do bloqueio à ACh parece ter sido específico para o acoplamento farmacomecânico. Muitas hipóteses podem ser aventadas para explicar esse componente específico. Como a presença da toxina nas alças leva o animal a uma situação prolongada de hiperestimulação dos neurônios entéricos e dos efetores, e a um bloqueio do sistema adrenérgico e/ou essa hiperestimulação prolongada pode levar a uma fadiga do sistema colinérgico e/ou dos efetores como diminuição da contratilidade. Essa fadiga, ao nível simpático, poderá envolver uma regulação inibitória (down regulation) ou dessensibilização dos receptores colinérgicos (Krivor e Willis, 1956; Ginsborg e Guerrero, 1964; Kuba e Minota, 1986). Está documentado na literatura que a TxA não apresenta efeito direto sobre as células musculares lisas dos músculos circular e longitudinal (Burakoff e cols., 1995). Assim, tornam-se hipóteses também atraentes aquelas que incluem a mediação de células imunológicas, através dos mediadores e autacóides por elas liberadas.

3.2. Participação de Mediadores Inflamatórios

Muitos estudos têm demonstrado que a TxA do *Clostridium difficile* induz seus efeitos intestinais decorrente de mecanismos indiretos, mediados em parte através da estimulação de células residentes, particularmente macrófagos, com conseqüente síntese e liberação de seus mediadores inflamatórios (Soares e cols. 1991; Rocha e cols. 1997; Souza e cols. 1997 e Rocha e cols. 1998). Dentre esses potentes mediadores inflamatórios envolvidos na atividade enterotóxica (secreção de fluidos, lesão morfológica e infiltrado inflamatório) atribuída a TxA podemos destacar: PGs (PGE_2), LTs (LTB_4 e LTC_4) e citocinas (IL-1 e

TNF- α) dentre outros como o PAF, NO e HA (Triadafilopoulos e cols. 1987a; Triadafilopoulos e cols. 1989; Linevsky e cols. 1990; Miller e cols. 1990; Burakoff e cols. 1995; Fonteles e cols. 1995; Qiu e cols. 1996; Mahida e cols. 1996). Passos iniciais na cascata dessa reação, como as enzimas fosfolipase A₂ e as cicloxigenases (principalmente a induzível: COX-2), também estão envolvidas na mediação da secreção aumentada de água e eletrólitos e resposta inflamatória induzida pela TxA (Fang e cols. 1994; Alcântara e cols. 2001).

Baseado na relevância desses achados foi elaborado o rastreamento farmacológico utilizado no presente estudo, na tentativa de se investigar se um ou mais desses produtos estaria envolvido com os efeitos da TxA sobre a contratilidade intestinal

O glicocorticóide (dexametasona), utilizado por ser um bloqueador da transcrição do RNA mensageiro de determinadas citocinas (ex: TNF- α , IL-1 e IL-8) impedindo dessa forma a síntese e conseqüentemente a liberação dessas citocinas por macrófagos (Auphan e cols. 1995 e Wilckens e de Rijk, 1997), por ter atividade inibitória (através da produção de lipocortina) sobre a produção dos derivados do ácido aracdônico e fosfolipase A₂ (Goodman e Gilman, 1996 e Wilckens e de Rijk, 1997) e por haver apresentado potente inibição aos efeitos da TxA na contratilidade intestinal, sugere enfaticamente a participação de todos ou de parte dos mecanismos inflamatórios, que são bloqueáveis por esse glicocorticóide.

Encontramos que em uma exposição de 6 h a TxA, dexametasona já oferece uma proteção significativa aos efeitos da toxina na contratilidade ileal, o que é condizente com as alterações induzidas por glicocorticóides tornarem-se máximas dentro de 6 h.

Em nossos resultados, a proteção induzida pela dexametasona em preparações expostas a TxA durante 6 ou 18 h foi verificável através das comparações dos dados em blocos bem como das respostas máximas dos grupos (PBS_{T, DEN}, TxA_{T, DEN}, PBS_T, TxA_T e PBS_P nos respectivos tempos de 6 ou 18 h).

Em 6 h de exposição, a proteção ocorreu tanto para o efeito sistêmico (amplificação da resposta a ACh no grupo PBS_{T6}) como para o efeito local (depressão da resposta contrátil no grupo TxA_{T6}) induzido pela TxA. Em relação ao efeito local, a proteção foi parcial para a depressão da resposta ao K⁺ e total para a depressão da resposta a ACh, nos respectivos grupos TxA_{T6}. Para preparações expostas a TxA durante 18 h, houve proteção total tanto para depressão da movimentação espontânea como para o efeito sistêmico (depressão das respostas ao K⁺ e à ACh nos grupos PBS_{T18}) e local (depressão das respostas ao K⁺ e à ACh nos grupos TxA_{T18}) induzidos pela TxA. Além da proteção houve um efeito

adicional, ou seja, um aumento da resposta para níveis superiores ao controle (PBS_{P18}), para a movimentação espontânea e para as respostas contráteis aos dois agonistas. Esse efeito adicional para as respostas contráteis aos dois agonistas sugere uma tendência da proteção oferecida pela dexametasona em preparações expostas por 18 h a TxA ser mais significativa do que em preparações expostas por 6 h, onde o efeito adicional aparece apenas na proteção à amplificação da resposta a ACh no grupo $PBS_{T6, DEX}$ (efeito sistêmico). A causa desse efeito adicional da dexametasona não foi investigada no presente estudo. É possível sugerir que essa substância atue interativamente com os efeitos da TxA ou que ela retarde toda a evolução do curso temporal dos efeitos dessa toxina, de tal maneira que os efeitos que normalmente apareceriam com 2 h ficariam procrastinados para 18 h.

Castagliuolo e cols. (2001) mostraram que a TxA não é capaz de induzir aumento da síntese e liberação de glicocorticóides endógenos na quantidade necessária para bloquear os efeitos da TxA mas a dexametasona administrada em alças intestinais de coelhos 30 min. antes da TxA ($5\mu\text{g} / 0,4 \text{ mL}$) foi capaz de bloquear os efeitos intestinais. Esses achados são coerentes com os do presente estudo, onde a administração de glicocorticóide exógeno (dexametasona), mas não o endógeno presumivelmente liberado, promoveu grande bloqueio dos efeitos da TxA sobre a contratilidade.

Quando a membrana de células inflamatórias é danificada por um agente infeccioso como uma toxina bacteriana, por exemplo, frações de fosfolipídeos do tipo ácido araquidônico, são liberadas através da atividade da enzima fosfolipase A_2 , originando alguns dos mediadores químicos de origem lipídica (Higgs e Vane, 1983). Assim fez-se importante verificar se a quinacrina, um inibidor específico da enzima fosfolipase A_2 (Struhar e cols. 1992), modificaria os efeitos da TxA sobre a contratilidade intestinal.

Semelhante ao que foi feito para analisar a proteção pela dexametasona em preparações expostas a TxA durante 6 ou 18 h, foram utilizadas as comparações dos dados em blocos bem como das respostas máximas dos grupos ($PBS_{T, QUI}$, $TxA_{T, QUI}$, PBS_T , TxA_T e PBS_P nos respectivos tempos de 6 ou 18 h).

Em segmentos expostos por 6 h a TxA, quinacrina foi capaz de proteger da depressão da resposta ao K^+ no grupo TxA_{T6} (efeito local) e da amplificação da resposta à ACh no grupo PBS_{T6} (efeito sistêmico) de forma total, mas não foi capaz de alterar a depressão da resposta à ACh no grupo TxA_{T6} . Em 18 h de exposição a TxA, quinacrina não foi tão eficaz em proteger os efeitos locais e sistêmicos induzidos pela toxina na contratilidade intestinal quando protegeu apenas de maneira parcial o efeito local encontrado em resposta

tanto ao K^+ quanto à ACh e não foi capaz de alterar o efeito sistêmico para as mesmas respostas. Quinacrina além de não ter protegido a depressão das movimentações espontâneas induzida pela TxA em 18 h ainda permitiu a depressão das movimentações espontâneas dos segmentos vizinhos expostos apenas ao PBS.

Esse resultado, encontrado com a quinacrina, mostrou-se surpreendente devido à importância da atividade da fosfolipase A_2 na secreção e na lesão intestinal induzida pela TxA em alças intestinais como demonstrada em estudos anteriores (Fang e cols. 1994). A razão do efeito encontrado com a quinacrina nesse estudo não foi investigada, mas várias hipóteses de trabalho podem ser aventadas para explicá-lo, como por exemplo, um efeito próprio da quinacrina em deprimir a contratilidade intestinal ou a fosfolipase A_2 ser de importância secundária nas alterações contrateis induzidas pela TxA. Um efeito próprio da quinacrina, depressor da contratilidade intestinal, não seria surpreendente, devido à atividade da fosfolipase A_2 na contração, já mencionado na introdução.

É sabido que o ácido araquidônico serve como substrato para as enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase relacionadas à síntese de PGs, tromboxanos e LTs (Higgs e Vane, 1983). A importante participação desses produtos no processo inflamatório induzido pela TxA, bem como o fato de a TxA também ser capaz de induzir a expressão de Cox-2 (Alcântara e cols., 2001), tornou relevante o rastreamento da participação de derivados lipídicos, com o uso de bloqueadores farmacológicos tais como a indometacina (um inibidor específico da enzima ciclooxigenase; Higgs e Vane, 1983), o celecoxibe (inibidor específico da COX-2; Alcântara e cols., 2001) e o montelucaste sódico (inibidor da lipoxigenase; Keam e cols. 2003).

A indometacina, foi capaz de bloquear totalmente os efeitos depressores da TxA sobre a contratilidade intestinal, como demonstrado através da análise das comparações dos dados em blocos bem como das respostas máximas dos grupos $PBS_{T, IND}$, $TxA_{T, IND}$, PBS_T , TxA_T e PBS_P nos respectivos tempos de 6 ou 18 h. A proteção para os efeitos sistêmico e local induzidos pela TxA a 18 h, semelhante ao que ocorreu com a dexametasona, também foi acompanhada por um efeito adicional, mas somente para as respostas ao K^+ .

É interessante ressaltar que mesmo a indometacina sendo capaz de promover um efeito inibitório da síntese de prostaglandinas constitutivas da mucosa (as quais produzem um efeito citoprotetor), que leva à indução de quadros de enterocolites (Wallace e cols. 1992 e Reuter e cols. 1996), o pré-tratamento de segmentos intestinais com a indometacina foi capaz de conferir uma proteção bastante satisfatória da contratilidade intestinal, inclusive à depressão da movimentação espontânea induzida pela TxA as 18 h.

O celecoxibe, similarmente a dexametasona e a indometacina, também bloqueou totalmente os efeitos depressores da resposta contrátil ao K^+ e ACh, bem como a depressão da movimentação espontânea a 18 h, induzidos pela TxA. O efeito adicional encontrado anteriormente também foi visto para o pré-tratamento com o celecoxibe nos efeitos sistêmicos sobre a resposta ao K^+ , tanto para 6 quanto para 18 h de exposição a TxA, e nos dois efeitos (local e sistêmico) induzidos pela TxA a 18 h sobre a resposta a ACh.

Os dados desse estudo são coerentes com os de Alcântara e cols. (2001), que mostraram que a administração de TxA (20 $\mu\text{g} / \text{mL}$) em alças intestinais de coelhos, é capaz de induzir a expressão de COX-2 na população de células da lâmina própria (provavelmente macrófagos) como um efeito direto da toxina sobre essas células, já que o bloqueio da COX-2 inibiu os efeitos da TxA sobre a contratilidade. Esse efeito demonstrado por Alcântara e cols. (2001), no entanto, aumenta os níveis de PGs intestinais que em parte medeia o aumento da secreção de água e eletrólitos e a resposta inflamatória induzida pela TxA. Esses mesmos autores também constataram que o celecoxibe por ter sido capaz de inibir a resposta inflamatória e a injúria epitelial induzida pela TxA, decorrente do bloqueio específico da COX-2, pode oferecer uma alternativa à terapia antibiótica empregada para reduzir a diarreia e a resposta inflamatória das colites (inclusive a pseudomembransosa) do *C. difficile*, o que também é coerente com dados desse estudo.

Há relato de que o celecoxibe pode apresentar efeito direto sobre o acoplamento excitação-contração, aumentando a concentração de Ca^{++} no mioplasma e a contratilidade do músculo liso (Johnson e cols., 2002). De posse dos resultados obtidos e levando em consideração o exemplo da indometacina que não interfere na contratilidade, celecoxibe provavelmente bloqueou a alteração da contratilidade induzida pela TxA através do seu efeito sobre a COX-2 e esse seu efeito sobre o acoplamento excitação-contração apenas tenha contribuído para a existência do efeito adicional encontrado nas respostas ao K^+ e a ACh, como relatado anteriormente. Esse questionamento poderá ser esclarecido experimentalmente usando-se outros bloqueadores de COX-2, como o nimesulide e o meloxicam, (Slattery e cols., 2001), no entanto, essa experimentação não foi realizada no presente estudo.

Embora Menezes (2002) tenha mostrado que montelucaste sódico não foi capaz de promover uma proteção significativa ao aumento da secreção intestinal induzida pela TxA (bloqueio percentual de apenas 32 %), no presente estudo este bloqueou totalmente os efeitos da TxA sobre a contratilidade intestinal. Os resultados mostram que montelucaste sódico não foi só eficaz em bloquear a depressão das respostas ao K^+ (grupos TxAT6,MON e

TxA_{T18, MON}) e a ACh (grupo TxA_{T18, MON}) como também foi eficaz em bloquear totalmente a depressão das movimentações espontâneas induzidas a 18 h de exposição a TxA. Montelukaste sódico ainda promoveu um efeito adicional semelhante ao celecoxibe nos grupos PBS_{T6, MON} e TxA_{T6, MON} em resposta ao K⁺. A comparação entre os dados do presente estudo e aqueles de Menezes (2002) sugerem que talvez os leucotrienos antagonizados pelo montelocaste talvez tenham uma atividade diferente sobre os efeitos secretórios da TxA em relação àqueles sobre a contratilidade.

Assim, os resultados dessa série de experimentos envolvendo bloqueadores de derivados lipídicos, de uma maneira geral, em corroboração aos achados farmacológicos para os efeitos inflamatórios da TxA, demonstraram fortes evidências de que a síntese de PGs e LTs esteja envolvida na gênese dos efeitos da TxA sobre a contratilidade intestinal. Por outro lado, se esses bloqueadores atuam de forma direta ou indireta na musculatura lisa intestinal auxiliando a exacerbação (efeito adicional) da proteção encontrada, ainda não foi investigado.

Pentoxifilina, uma droga com propriedades antiinflamatórias relacionadas à redução da síntese e liberação de importantes mediadores da resposta inflamatória tais como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-2 (LeMay e cols. 1990; Schandené e cols. 1992; Tilg e cols. 1993) e talidomida, um inibidor seletivo da produção de TNF- α (Sampaio e cols. 1991 e Moreira e cols. 1993) foram utilizadas em nossos protocolos e bloquearam os efeitos da TxA sobre a contratilidade intestinal. Esses achados, em corroboração com outros estudos mostrando o envolvimento dessas citocinas em várias atividades inflamatórias e edematogênicas induzido pela TxA (Rocha, 1997 e 1998; Carneiro-Filho e cols. 2001), sugerem que assim como PGs e LTs, essas citocinas, particularmente TNF- α e IL-1, também sejam participantes da gênese dos efeitos da TxA sobre a contratilidade intestinal. Essa observação se faz pertinente principalmente para as 18 h de exposição à TxA, onde foi encontrado para as duas drogas, um efeito adicional ao bloqueio total dos efeitos sistêmico e local em resposta ao K⁺ e a ACh. Em segmentos intestinais expostos por 6 h à TxA, talidomida não foi capaz de exercer qualquer bloqueio ao efeito depressor da contratilidade em resposta ao K⁺ no grupo TxA_{T6, TAL}. A causa desse resultado da talidomida em relação às exposições por 6h a TxA não foi pesquisada.

Existem trabalhos na literatura mostrando que PGs e TNF- α podem atuar, de maneira autócrina, na gênese de outros mediadores da inflamação resultando na amplificação de

suas ações (Schreiber e cols. 1992; Dinarello e Wolff, 1993 e Eberhart e Dubois, 1995). Essa hipótese não é incoerente com os dados do presente estudo.

3.3. Participação do Sistema Nervoso Entérico

O presente estudo demonstrou que o bloqueio, pelo hexametônio, da principal via de comunicação inter-neuronal do sistema nervoso entérico, a sinapse colinérgica nicotínica (Kellow, 1996), protege a contratilidade intestinal contra os efeitos depressores da TxA. Essa observação não é surpreendente, posto que já esteja bem firmada a importante participação do sistema nervoso entérico nos fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos contráteis e secretórios (Goyal e Hirano, 1996), inclusive nas alterações secretórias induzidas pela TxA (Goyal e Hirano, 1996).

A demonstração da participação do sistema nervoso entérico na depressão da contratilidade promovida pela TxA foi feita mediante a utilização de um agente farmacológico, o hexametônio. Como não há na literatura estudos da avaliação da via colinérgica nicotínica como modulador da contratilidade do músculo liso ileal de coelho após efeito da TxA, fez-se relevante a demonstração de que: i) a transmissão colinérgica nicotínica é uma via importante para que a estimulação do sistema nervoso entérico leve à contração do músculo longitudinal ileal de coelho e ii) o hexametônio bloqueia as contrações originárias primariamente de um funcionamento neuronal, envolvendo a transmissão colinérgica nicotínica das sinapses inter-neuronais, e apenas essas contrações, ou seja, o hexametônio não bloqueia de maneira significativa os receptores colinérgicos muscarínicos nem a contratilidade do músculo liso por efeito direto sobre o acoplamento excitação-contração desse tipo de célula. Julgamos que os resultados do presente estudo demonstram esses dois fatos tanto na condição controle quanto nas preparações expostas a TxA. Como o hexametônio bloqueou apenas a resposta contrátil à estimulação elétrica, mas não bloqueou a resposta ao K^+ , que estimula diretamente o acoplamento excitação-contração da célula muscular lisa, conclui-se que o hexametônio não teve efeito direto sobre esse acoplamento nesse tipo de célula. Como, nessas mesmas preparações, o hexametônio não interferiu com a resposta contrátil à ACh, conclui-se que o hexametônio bloqueou apenas os receptores colinérgicos nicotínicos. É interessante observar que nas preparações diretamente expostas a TxA (grupo TxA_{T6}) o efeito bloqueador do hexametônio para a contração em resposta ao trem de estímulos aumentou. Isso sugere que a preparação ficou mais dependente da mediação colinérgica nicotínica para a contração a

partir da estimulação do sistema nervoso entérico. A demonstração aqui apresentada de que o hexametônio bloqueia totalmente os efeitos de 6 e 18 h de exposição da alça à TxA, para os vários parâmetros analisados documentam a importante participação do sistema nervoso entérico nos efeitos da TxA. Foi exceção a essa afirmação apenas a comparação em bloco das respostas à ACh em TxA_{T18, DEX} com PBS_{P18} e TxA_{T18}, em que a exerceu proteção apenas parcial. Essa proteção, apesar de haver sido parcial pelo critério estatístico adotado (TxA_{T18, DEX} significativamente maior que TxA_{T18} e menor do que PBS_{P18}), quantitativamente foi muito relevante, pois a resposta máxima à ACh em TxA_{T18, DEX} foi 254 % dessa resposta em TxA_{T18}.

O fato de os bloqueadores da síntese e liberação dos mediadores inflamatórios e também o hexametônio haver bloqueado as alterações da contratilidade induzidas da TxA sugere a hipótese de que esses dois tipos de agentes atuam em série, ou seja, a atuação se daria através de uma cascata de fenômenos, cuja interrupção de uma etapa levaria à interrupção total ou parcial do efeito resultante ao nível do efector, o músculo liso.

4 Efeito do óleo essencial do *Croton zehntneri* sobre as alterações contráteis induzidas pela txa do *C. difficile*

Diversos estudos na literatura têm demonstrado a atividade antiinflamatória de diferentes óleos essenciais (Menezes e cols. 1990; Santos e cols. 1997 e Bighetti e cols. 2000). A atividade antinociceptiva e antiedematogênica do óleo essencial do *Croton zehntneri* (OECz) foi recentemente demonstrada, sendo o OECz mais potente na promoção do efeito antiedematogênico que ocorreu com doses iguais ou superiores a 0,3 mg/kg (Oliveira, 2001). Os dois efeitos ocorreram com doses muito abaixo da dose tóxica (DL₅₀ = 3,5g/kg) configurando um bom índice terapêutico (Oliveira, 2001 e Oliveira e cols. 2001)

Em nossos experimentos o OECz mostrou ser capaz de promover um bloqueio das alterações contráteis induzidas pela TxA. Essa proteção induzida pelo OECz com doses muito pequenas (1 e 30 mg/Kg) comparadas à DL₅₀, comprova a sua eficácia e potência em um modelo de alteração mórbida onde é muito importante o componente inflamatório. A eficácia do efeito protetor do OECz foi determinada através das comparações dos dados em blocos bem como das respostas máximas dos respectivos grupos (PBS_{T, CZ1}, TxA_{T, CZ1}, PBS_{T, CZ30}, TxA_{T, CZ30}, PBS_T, TxA_T e PBS_P nos respectivos tempos de 6 ou 18 h).

Na dose de 1 mg/Kg OECz foi capaz de bloquear totalmente, em 6 h de exposição a TxA, o efeito sistêmico (amplificação da resposta à ACh no grupo PBS_{T6}). Quanto ao

efeito local (depressão da resposta contrátil no grupo TxA_{T6}) OECz 1 mg/Kg bloqueou totalmente a depressão das respostas ao K⁺, mas parcialmente as respostas a ACh. Em preparações expostas por 18 h a TxA, essa dose de OECz bloqueou totalmente o efeito sistêmico (depressão das respostas ao K⁺ e a ACh nos grupos PBS_{T18}) e ao contrário das 6 h, bloqueou parcialmente o efeito local (depressão da contratilidade no grupo TxA_{T18}) em resposta ao K⁺, mas totalmente em resposta a ACh.

Além desse bloqueio, surpreendentemente, OECz deprimiu a movimentação espontânea dos segmentos intestinais expostos por 6 h a TxA, mas bloqueou totalmente a depressão dessa mesma movimentação espontânea nos segmentos agora expostos por 18 h a TxA.

OECz 30 mg/Kg, em preparações expostas por 6 h a TxA, apresentou o mesmo padrão de bloqueio para os efeitos sistêmicos e locais em resposta ao K⁺ e a ACh do que OECz 1 mg/Kg. Em preparações expostas por 18 h, OECz 30 mg/Kg bloqueou parcialmente a depressão das respostas contráteis ao K⁺ nos grupos PBS_{T18} e TxA_{T18} (efeito sistêmico e local) e para a resposta à ACh, o bloqueio foi total para o efeito sistêmico, mas parcial para o efeito local.

A causa dessas pequenas alterações no padrão de atuação concernentes a 6 e 18h de exposição à TxA e resposta ao K⁺ ou ACh, bem como a razão do efeito surpreendente sobre a movimentação espontânea não foram investigadas. Como o óleo essencial é uma mistura de muitas substâncias, é possível que as diferentes potências farmacológicas dos vários constituintes do óleo essencial estejam contribuindo para este fenômeno. Nessas atividades farmacológicas, possivelmente, estarão incluídos os efeitos antiinflamatórios e miogênicos sobre a contratilidade do músculo liso intestinal que já esta documentada (Coelho-de-Souza, 1997; Coelho-de-Souza e cols., 1997 e 1998). O que é surpreendente é que o OECz tenha demonstrado um efeito, com relevante potencialidade de utilização terapêutica, em doses tão pequenas quando comparadas a sua DL₅₀. Acrescenta-se a essa relevância o fato de *C. zehntneri* ser uma planta nativa da caatinga nordestina e a extração do óleo essencial ser um processo simples (extração por arraste a vapor) e de baixo custo financeiro.

Embora haja sido surpreendente que o OECz tenha apresentado eficácia em doses tão pequenas comparadas com a sua DL₅₀, não foi surpreendente o tipo de efeito. Isto porque, é razoável sugerir-se que pelo menos parte do efeito da TxA sobre a contratilidade advém do seu efeito pró-inflamatório, e a constituição do OECz é rica em anetol, um bloqueador

dos efeitos celulares do TNF, uma importante citocina pró-inflamatória. (Chainy e cols., 2000)

5 Efeito depressor da TxA sobre a contratilidade do músculo circular

Os dados do presente estudo mostram que 6 h de exposição da alça à TxA deprimem a contratilidade também no músculo liso circular. Essa descoberta é muito relevante por várias razões. Estudos anteriores do efeito da TxA sobre a contratilidade da musculatura lisa intestinal, utilizaram principalmente o músculo circular (Gilbert e cols., 1989) e relataram aumento da contratilidade. Como já mencionado anteriormente, Gilbert e cols. (1989) utilizaram um protocolo bem diferente daquele aqui utilizado. Inclusive, no que concerne ao músculo circular, quanto ao tempo de exposição a TxA nos estudos deles a exposição foi 2 h. Os dados desse estudo, demonstraram um efeito estimulante para 2 h de exposição à TxA em músculo longitudinal, semelhante portanto aos de Gilbert e cols. (1989), e depressor para 6 h de exposição, sugerindo que os dados aqui apresentados estão de acordo com o do estudo anterior e que, apesar de algumas diferenças no mecanismo de acoplamento excitação-contração entre os músculos circular e longitudinal do intestino delgado (Rembold, 1996; Makhoulf e Murthy, 1997), os efeitos locais da TxA não diferem nos dois tipos de músculo.

6 Implicações terapêuticas

O presente estudo demonstrou que a TxA aumenta a contratilidade, nas primeiras h de seu efeito, e a deprime, nas h posteriores. Acredita-se que o aumento da contratilidade nas diarreias resultantes de entidades mórbidas com acometimento alérgico e/ou infeccioso exerça um papel defensivo para o organismo (Wood, 1992). O aumento da contratilidade, acelerando o trânsito intestinal, apressaria a remoção do agente etiológico da luz intestinal. Assim, a dificuldade de fixação e colonização de agentes infecciosos e a eliminação de toxinas e/ou alérgenos, exerceria um efeito benéfico. Dentro desse enfoque, o aumento da contratilidade nos momentos iniciais da ação da TxA poderá representar um efeito benéfico a ser preservado e a depressão da contratilidade nas h que se seguem àquelas primeiras, um efeito prejudicial a ser corrigido. Esses argumentos sobre os efeitos benéficos ou prejudiciais de alteração da contratilidade intestinal parecem intuitivamente

corretos à primeira vista, mas numa entidade mórbida como a infecção pelo *C. difficile*, tornam-se questionáveis. Por exemplo, o grande aumento da contratilidade nos momentos iniciais se transforma necessariamente em um aumento de propulsão intestinal? Para que haja aumento na velocidade de propulsão é necessário que haja aumento do gradiente de pressão hidrostática entre as porções mais proximais e as mais distais, ou que haja uma diminuição na resistência luminal ao fluxo, ou ambos (Kellow, 1996). No presente estudo, bem como nos anteriores disponíveis na literatura, não foram investigados esses aspectos ligados ao aumento da contratilidade. Os dados desse estudo, contudo, demonstra que alguns agentes antiinflamatórios bloqueiam totalmente as alterações da contratilidade, o que tem uma dupla relevância. Em primeiro lugar, demonstra que as alterações contráteis não são fisiopatologicamente independentes das outras alterações induzidas pela TxA, como secreção e alterações da mucosa, e aponta o processo inflamatório como uma importante origem comum das outras alterações. Segundo aponta a apropriada prevenção dos processos inflamatórios como um dos recursos terapêuticos muito importantes, pois, contrariamente ao que provavelmente se obteria tentando modular a contratilidade com agentes específicos para tal, a modulação do processo inflamatório combateria a causa comum, e assim, não só as alterações de contratilidade, mas muitas outras que constituem o quadro de efeitos da TxA. É importante afirmar que as alterações da contratilidade poderiam ser independentes e dissociadas do processo inflamatório e a demonstração do papel central do processo inflamatório nessas alterações da contratilidade está em coerência com o fato de as células musculares dos músculos circular e longitudinal do intestino não terem receptores para a TxA (Burakoff e cols., 1995; Gilbert e cols., 1989). Em relação a uma possível utilização terapêutica do hexametônio, que também bloqueou os efeitos da TxA sobre a contratilidade, achamos que não haveria indicação para tal, até mesmo por ser essa substância um agente ganglioplégico, com múltiplos efeitos colaterais. Contudo, a descoberta do importante papel do sistema nervoso entérico nos efeitos da TxA pode levar a importantes desdobramentos farmacoterapêuticos.

CONCLUSÕES

1. A TxA apresenta sobre a contratilidade intestinal, efeitos com um curso temporal bifásico, estimulante no início (2 horas de exposição da víscera a essa toxina) e depressor posteriormente (exposições mais duradouras, 6 e 18 h);
2. Esses efeitos se verificam tanto para o acoplamento farmacomecânico quanto eletromecânico, embora tenham sido mais pronunciados para o farmacomecânico, o que sugere que as alterações envolvem o acoplamento excitação-contração e/ou outras etapas intracelulares do mecanismo da contração;
3. Os efeitos da TxA sobre a contratilidade foram totalmente bloqueados pelos agentes antiinflamatórios: dexametasona, glicocorticóide; indometacina, bloqueador específico de COX; celecoxibe, bloqueador específico de COX-2; montelucaste sódico, bloqueador de leucotrienos; talidomida e pentoxifilina, bloqueadores da síntese de TNF- α . Esses efeitos ainda foram bloqueados parcialmente pela quinacrina, um bloqueador de fosfolipase A₂;
4. O óleo essencial de *Croton zehntneri* bloqueou os efeitos da TxA sobre a contratilidade;
5. O presente estudo sugere que a TxA (1 $\mu\text{g/ml/alça}$) atua por um mecanismo indireto associado primariamente a um processo inflamatório e a uma alteração da atividade do Sistema Nervoso Entérico, em coerência com o fato de células do músculo longitudinal e circular não apresentarem receptor para esta toxina.

BIBLIOGRAFIA

1. AKTORIES, K., SCHMIDT, G., JUST, I. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem.* 381(5-6):421-6, 2000.
2. AL-BARRAK, A. EMBIL, J. DYCK, B. OLEKSON, K. NICOLL, D. ALFA, M. KABANI, A. An outbreak of toxin A negative, toxin B positive *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital *Can. Comm. Dis. Rep.* 25(7):65-69. 1999.
3. ALBUQUERQUE, A.,A.C., LEMOS, T.L.G., VIANA, G.S.B. Efeitos farmacológicos do pseudo-hidrolato do óleo essencial de *Croton Zehntneri*. *Cienc. Cult*, 32:751, 1980.
4. ALBUQUERQUE, A.,A.C., VIANA, G.S.B., SILVA, E.A.T. et. al. Efeitos farmacológicos dos princípios ativos do óleo essencial de *Croton Zehntneri* em nervo isolado. *Cienc. Cult*,33:722, 1981.
5. ALBUQUERQUE, A.A.C., Efeitos farmacológicos do óleo essencial do *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. Vel. Aff. *Tese (Mestrado em Farmacologia)*. Fortaleza: Universidade Feredal do Ceará, 1982.
6. ALBUQUERQUE, A.A.C., SORENSON, A.L., LEAL-CARDOSO, J.H. Effects of essential oil of *Croton Zehntneri* and of Anethole and Estragole of skeletal muscle. *J. Pharmacol.* 49: 41-49, 1995.
7. ALCANTARA, C., STENSON, W. F., STEINER, T. S., GUERRANT, R. L. Role of Inducible Cyclooxygenase and Prostaglandins in *Clostridium difficile* Toxin A-Induced Secretion and Inflammation in an Animal Model. *The Journal of Infectious Disease.* 184: 648-652, 2001.

8. ALENCAR, J.W., CRAVEIRO, A.A, MATOS, F.J.A , et al . Constituintes químicos do óleo essencial de marmeleiro vermelho (*Crton sp* 33) .Resumos da XVI reunião anual da SBQ, PN-43, Caxambu, MG, 1993.
9. ANWER, K., TORO, L., OBERTI, C., STEFANI, E., SANBORN, B.M. Calcium activated potassium channels in pregnant rat myometrium: modulation by β -adrenergic agents. *Am J Physiol* 263(32):C1049-C1056, 1992.
10. ARNON, S.S., MILLS, D.C., DAY, P.A., HENRICKSON, R.V., SULLIVAN, N. M., WILKINS, T.D. Rapid death of infant rhesus monkeys injected with *Clostridium difficile* toxins A and B: physiologic and pathologic basis. *J. Pediatr.* 104:34-40, 1984.
11. AUPHAN, N., DIDONATO, J. A., ROSETTE, C., HELBERG, A., KARINS, M. Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ Bsynthesis. *Sciences*, 270 286-289, 1995.
12. AUSINA, P., SAVINEAU, J.P., PINTO, F.M., MARTIN, J.D., CANDENAS, L. Ca⁺²-independent contraction induced by hyperosmolar K⁺-rich solutions in rat uterus. *Eur. J. Pharmacol.* 312:309 – 318. 1996.
13. BACCARI, M. C. CALAMAI, F. STADERINI, G. Modulation of cholinergic transmission by nitric oxide, VIP and ATP in the gastric muscle. *Neuroreport.* 5(8):905 – 908. 1994.
14. BALDASSARRI, L., DONELLI, G., CERQUETTI, M., MASTRANTONIO, P. Capsule-like structures in *Clostridium difficile* strains. *Microbiologica.* 14:295-300. 1991.
15. BÁRÁNY & BÁRÁNY. Inositol 1,4,5-triphosphate production. In: Biochemistry of smooth muscle contraction. Academic Press,Inc., San Diego, 1996

6. BARBUT, F. LALANDE, V. BURGHOFFER, B. THIEN, F. V. GRIMPREL, E. PETIT, J. Prevalence and genetic characterization of toxin A variant strains of *Clostridium difficile* among adults and children with diarrhea in France. *C. J. Clin. Microbiol.* 40(6):2079-2083, 2002.
17. BARROSO, L.A., MONCRIEF, J.S., LYERLY, D.M., WILKINS, T.D. Mutagenesis of the *Clostridium difficile* toxin B gene and effect on cytotoxic activity. *Microb. Pathog* 16:297-303, 1994.
18. BARTHÓ, L., LEFEBVRE, R. A. Nitric oxide causes contraction in the rat isolated small intestine. *Eur. J. Pharmacol.* 259(1):101-104, 1994.
19. BARTHÓ, L., LEFEBVRE, R. A. Nitric oxide-mediated contraction in enteric smooth muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 329(1): 53-66, 1995.
20. BARTLETT, J.G. *Clostridium difficile*: clinical considerations. *Rev. Infect. Dis.* 12 (Suppl. 2): 243s-251s, 1990.
21. BARTLETT, J.G. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clin Infect Dis.* 18: 265-272, 1994.
22. BARTLETT, J.G. GORBACH, S.L. Pseudomembranous enterocolitis (antibiotic-related colitis) *Adv. Intern. Med.* 22: 455-476, 1977.
23. BARTLETT, J.G. Introduction. In: Rolfe, P. E. Finegold, S. M. Eds. *Clostridium difficile*: its role in intestinal disease. Academic Press. New York, 1-13, 1988.
24. BARTLETT, J.G. Treatment of antibiotic associated pseudomembranous colitis. *Rev. Infect. Dis.* 6 :S235, 1984.
25. BARTLETT, J.G., CHANG, T.W., GURWITH, M., GORBACH, S.I., ONDERDONK, A.B. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N. Engl. J. Med.* 298 (10):531-534, 1978.

26. BATATINHA, M.JM., SOUZA-SPINOSA, H, BERNARDINI, M. M. Croton zehntneri: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. *J. Ethnop.* 45(1): 53-57, 1995.
27. BENHAM, C.D., & TSIEN, R.W. A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature(London)* 328(6127):275-278, 1987.
28. BERRIDGE, M. J. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361:315-325. 1993.
29. BEST, C., TAYLOR, N. Physiological basis of medical practice. 12 ed. Baltimore: Williams e Wilkins. 1990.
30. BEZERRA, M. A. C. *Alpina Speciosa Schum*: Estudo das frações fixas e do óleo essencial. *Tese (Mestrado em Farmacologia)* Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1994.
31. BIGHETTI EJ, HIRUMA-LIMA CA, GRACIOSO JS, BRITO AR. 2000. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. *J. Pharm Pharmacol.* 51(12): 1447-1453.
32. BISSONNETTE, E.Y., HOGABOAM, C.M., WALLACE, J.L., BEFUS, A. D. Potentiation of tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity of mast cells by their production of nitric oxide. *J. Immunol.* 147:3060-3065, 1991.
33. BOECKXSTAENS, G.E., PELCKMANS, P.A., RUYTJENS, I.F., BULT, H. DEMAN, J.G., HERMAN, A.G., VAN-MAERCKE, Y.M. Bioassay of nitric oxide released upon stimulation of non-adrenergic non-cholinergic nerves in the canine ileocolonic junction. *Br. J. Pharmacol.* 103(1): 1085-1091, 1991.
34. BOSSIER, J.R., SIMON, P. Le BOURHIS, B., Action psychotrope du trans-anethole et de l'ethanol administrés conjointement à la souris. *Ann. Nutr. Alim.* 23:215-222, 1967.

35. BOLTON, T. B., TOMITA, T., VASSORT, G. Voltage clamp and the measurement of ionic conductances in smooth muscle. In: BÜLBRING, E., BRADING, A. F., JONES, A. W., TOMITA, T. *Smooth muscle: an assessment of current knowledge*. London: Arnold, 47-63, 1981.
36. BOLTON, TB. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 59(3):606-718, 1979
37. BONGAERTS, G.P., LYERLY, D.M. Role of toxins A and B in the pathogenesis of *Clostridium difficile* disease. *Microb. Pathog.* 54(1): 1-12. 1994.
38. BOOTH, N. H. & MCDONALD, L.E. *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. 168 – 218. 6ª ed. R. J. Guanabara Koogan. 1992.
39. BORGES, A.P.P. Efeito do óleo essencial de *Croton zehntneri* em músculo detrusor de rato. *Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas)*, Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 2002.
40. BORRIELLO, S.P., WREN, B.W., HYDE, S. et al. Molecular, immunological, and biological characterization of a toxina A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 60:4192-4199. 1992.
41. BOYLE, S.J., TANG, K.W., WOODRUFF, G.N., MCKNIGHT, A.T. Characterization of CCK receptors in a novel smooth muscle preparation from the guinea-pig stomach by use of the selective antagonists CI 988, L365 and devazepide. *Br. J. Pharmacol.*, 109(4):913-917, 1993.
42. BRAGA, R. *Plantas do Nordeste especialmente do Ceará*. 3ª ed., Mossoró, 1976.
43. BRANDER, G.C., PUGH, D.M., BYWATR, R.J., JENKINS, W.L. *Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics*. 370 – 371. 5ª ed. Bailliere Tindall. 1991.

44. BRITO, G.A.C, FUJII, J., CARNEIRO-FILHO, B.A, LIMA, A.A.M, OBRIG, T., GUERRANT, R. L. Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A induced apoptosis in T84 cells. *J. Infect. Dis.* 186(10):1438 – 1447. 2002.
45. BUCHHEIT, K.H., BUHL, T. Stimulation effects of 5-hydroxytryptamine on guinea-pig stomach preparations in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 262(1/2): 91-97. 1994.
46. 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.
47. BURDIGA, T.H., TAGGART, M.J., WRAY, S. Major difference between rat and guinea-pig ureter in the ability of agonists and caffeine to release Ca^{+2} and influence force. *J. Physiol.* 489(2):327 – 335. 1995.
48. CALDERÓN, G.M., TORRES-LOPEZ, J., LIN, T.J., CHAVEZ, B., HERNÁNDEZ, M., MUNOZ, O., BEFUS, A.D., ENCISO, J.A. Effects of toxin A from *Clostridium difficile* on mast cell activation and survival. *Infect Immun.* 66:2755 – 2761. 1998.
49. CAPECK, A., Phytoncides of anise and fennel. *Prumysl. Potravin,* 7:260-262, 1956.
50. CARNEIRO-FILHO, B.A., SOUZA, M.L., LIMA, A.A., RIBEIRO, R. A. The effect of tumor necrosis factor (TNF) inhibitors in *Clostridium difficile* toxin-induced paw oedema and neutrophil migration. *Pharmacol. Toxicol.* 88(6): 313 – 318. 2001.
51. CASSUTO, J., FAHRENKRUG, J., JODAL, M., TUTTLE, R., LUNDGREN, O. Release of vasoactive intestinal polypeptide from the cat small intestine exposed to cholera toxin. *Gut* 22:958-963. 1981.
52. CASTAGLIUOLO I, KARALIS K, VALENICK L, PASHA A, NIKULASSON S, WLK M, POTHOUKAKIS C. Endogenous corticosteroids modulate *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280(4):G539-45, 2001.

53. CASTAGLIUOLO, I., KEATES, A.C., QIU, B., KELLY, C.P., NIKULASSON, S.T., LEEMAN, S.E., POTHOUKAKIS, C. Substance P responses in dorsal root ganglia and intestinal macrophages during *Clostridium difficile* toxin A enteritis in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 4788-4793, 1997.
54. CASTAGLIUOLO, I., KEATES, A.C., WANG, C.C., PASHA, A., VALENICK, L., KELLY, C.P., NIKULASSON, S.T., LAMONT, J.T., POTHOUKAKIS, C. *Clostridium difficile* toxin A stimulates macrophages inflammatory-2 production in rat intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 160(12): 6039-6045. 1998.
55. CASTAGLIUOLO, 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.
56. CAUJOLLE, M. F & MEYNIER, D. Toxicite de l'estragole et des anétholes (cis et trans). *C. R. Acad.Sci.(Paris)*, 246:1465-1468, 1958.
57. CERQUETTI, M., PANTOSTI, A., STEFANELLI, P., MASTRANTONIO, P. Purification and characterization of an immunodominant 36 kDa antigen present on the cell surface of *Clostridium difficile*. *Microb. Pathog.* 13:271-279, 1992.
58. CHAINY, G.B.N., MANNA, S.K., ÇHATUVERDI, M.M., AGGARWAL, B.B. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-kB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. *Oncogene*, 19:N2943-N2950, 2000.
59. CHATTERJEE, M., TEJADA, M. Phorbol ester-induced contraction in chemically skinned vascular smooth muscle. *Am J Physiol.* 251:C356-C361, 1986.
60. CHAVES-OLARTE, E., FREER, E., PARRA, A., GUZMÁN-VERRI, C., MORENO, E., THELESTAM, M. R-Ras glucosylation and transient RhoA activation determine the cytopathic effect produced by toxin B variants from toxin A-negative strains of *Clostridium difficile*. *J. Biol. Chem.* 19:epub ahead of print. 2002.

61. CHAVES-OLARTE, E., LOW, P., FREER, E., NORLIN, T., WEIDMANN, M., VON EICHEL-STREIBER, C., THELESTAM, M. A novel cytotoxin from *Clostridium difficile* serogroup F is a functional hybrid between two other large clostridial cytotoxins *J. Biol. Chem.* 274(16): 11046-11052. 1999.
62. CHAVES-OLARTE, E., WEIDMANN, M., EICHEL-STREIBER, C., THELESTAM, M. Toxins A e B from *Clostridium difficile* differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells. *J. Clin. Invest.* 100(7):1734 – 1741. 1997.
63. CHEN, T.H., LEE, B., YANG, C., HSU, W.H. Effects of caffeine on intracellular calcium release and calcium influx in a clonal β -Cell line RINm5F. *Life Sci.* 58: 983 – 990. 1996.
64. CHIU, A.T., BOZARTH, J.M., FORSYTHE, M.S., TIMMERMANS, P.B.M.W.M. Ca^{2+} utilization in the constriction of rat aorta to stimulation of protein kinase C by phorbol dibutyrate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242(30): 934-939, 1987.
65. CHRISTENSEN, J. The controls of gastrointestinal movements: some old and new views. *N. Engl. J. Med.* 285: 85-98, 1971.
66. CIESLA-JR, W.P., BOBAK, D.A. *Clostridium difficile* toxins A e B are cation-dependent UDP-glucose hydrolases with differing catalytic activities. *J. Biol. Chem.* 273(26):16021 – 16026. 1998.
67. COELHO-DE-SOUZA, A.N, BARATA, E.L, MAGALHÃES, P.J.C, LIMA C.C., LEAL-CARDOSO, J.H. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri* and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. *Phytother Res* 11:299-304, 1997.
68. COELHO-DE-SOUZA, A.N., CRIDDLE, D.N., LEAL-CARDOSO, J.H. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea-pig. *Phytother Res* 12:189-194, 1998.

69. COELHO-DE-SOUZA, A. N. Estudo dos efeitos do óleo essencial do *Croton zehntneri* e de seus principais constituintes, anetol e estragol, sobre parâmetros contráteis de músculo liso. *Tese (Doutorado em Farmacologia)*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1997.
70. COHEN, P. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem. Sci.* 171:408 – 413. 1992.
71. COTÉ, L., OLENSON, J. J., Antagonism of anethole and adrenal extract on glycogen formation in adrenalectomized rats. *Fed Proc*, 10:175-176, 1951.
72. CRAVEIRO, A.A, ALENCAR, J.W., MATOS, F.J.A et al Estudo de óleos essenciais de plantas do nordeste brasileiro. *Cienc.Cult.*, 28:180, 1976.
73. CRAVEIRO, A.A, ALENCAR, J.W., MATOS, F.J.A. et al. Projeto integrado de Química e Farmacologia, Relatório de Atividades. 227. Mimeografado, 1980
74. CRAVEIRO, A.A, ALENCAR, J.W., MATOS, F.J.A. et al. Volatile constituents of brazilian Euphorbiaeace genus *Croton*. *J Nat Prod.*, 4(5):509-632, 1981.
75. CRAVEIRO, A.A., ALENCAR, J.W., MATOS, F.J.A et al. Composição química dos Óleos essenciais de espécies nordestinas de *Croton*. *Cienc.Cult* 30:326-327, 1978a
76. CRAVEIRO, A.A., ANDRADE, C.H.S., MATOS, F.J.A. et al. Anise like flavor of *Croton zehntneri* Pax et Hoff vet aff. *J. Agric. Food Chem.*, 26:772-773, 1978b
77. CRAVEIRO, A.A., FERNANDES, A.G., ANDRACE, C.H.S. et al. Óleos essenciais de canelas silvestres egionais. *Cienc.Cult.*, 29:445, 1977a
78. CRAVEIRO, A.A., LEMOS, T.L.G, Fitolise do transanetol. *Cienc.Cult.* 29:446, 1977b.
79. DALLMEIER, K., CARLINI, E.A., Anesthetic, Hypothermic, Myorelaxant and Anticonvulsivant Effects of Sinthetic Eugenol Derivates and Natural Analogues. *Pharmacology*, 22:113-127, 1981.

80. DALLMEIER, K.R.Z. Central nervous system effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. São Paulo, *Tese(Doutorado)*, Escola Paulista de Medicina. 1-77, 1981.
81. DAVIES, H.A., BORRIELLO, S.P. Detection of capsule in strains of *Clostridium difficile* of varying virulence and toxigenicity. *Microb. Pathog* 9:141-146. 1990.
82. 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.
83. DI SALVO, J., STEUSLOFF, A., SEMENCHUK, L., SATOH, S., KOLQUIST, K., PFITZER, G. Tyrosine kinase inhibitors suppress agonist-induced contraction in smooth muscle. *Biochem Biophys Res Comm* 190 (3):968-974, 1993.
84. 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 toxin B. *Infect. Immun.* 63(4): 1421-1426. 1995.
85. DINARELLO, C.A., WOLF, S.M. The role of interleukin-1 in disease. *N. Engl. j. Med.* 328:106-113, 1993.
86. D'OCÓN, P., BLASCO, R., CANDENAS, L., IVORRA, D., LOPEZ, S., VILLAVARDE, C., CASTEDO, L., CORTES, D. Inhibition of calcium entry induced by colarines and isocrasifoline in uterine smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 196:183-187, 1991.
87. DRISCOLL, K.E., HASSENBEIN, D.G., CARTER, J., POYNTER, J., ASQUITH, T.N., GRANT, R.A., WHITTEN, J., PURDON, M.P., TAKIGIKU, R. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: expression by alveolar macrophages, fibroblasts and

- epithelial cells and in rat lung after mineral dust expose. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8: 311-319, 1993.
88. DROOGMANS, G., MISSIAEN, I. Electromechanical and pharmacomechanical in vascular smooth muscle. In: Sperelakis, N. (Ed.). *Physiology and physiopatology Kluwer*. 867-879, 1994.
89. EBERHART, C.E., DUBOIS, R.N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 109:285-301, 1995
90. EBERLE-WANG, K., BRAUN, B.T., SIMANSKY, K.J., Serotonin contracts the isolated rat pylorus via a 5-HT₂-like receptor. *Am. J. Physiol.* 266, 1(2):284-291, 1994.
91. ENDO, M., Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiological Reviews*, 57:71-108, 1977
92. ERNE, P., HERMSMEYER, K. Modulation of intracellular calcium by potassium channel openers in vascular muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 344(6):706-15, 1991.
93. EXTON, J.H., TAYLOR, S.J., AUGERT, G., BOCKKINO, S.B., Cell signalling through phospholipid breakdown. *Mol. Cell. Biochem.* 104:81-86, 1991.
94. FANG, G., LIMA A. A. M., THIELMAN, N., FONTELES, M., YOTSEFF, P., LYERLY, D., GUERRANT, R. L. Role of phospholipase A₂ in the histologic, epithelial and secretory responses to *Clostridium difficile*. *Biomed. J.*, 1: 1-5, 1994.
95. FANG, S., WU, R., CHRISTENSEN, J. Intramucosal nerve cell in human small intestine. *J. Auton. Nerv. Syst.* 44:152-157, 1993.

96. FENG, L., XIA, Y., YOSHIMURA, T., WILSON, C.B. Modulation of neutrophil influx in glomerulonephritis in the rat with anti-macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) antibody. *J. Clin. Invest.* 95:1009-1018, 1995.
97. FERNANDES, A.G., ALENCAR, J.W., MATOS, F.J.A. et al. Canelas silvestres nordestinas: Aspectos botânicos, químicos e farmacológicos. *Cienc. Cult.* 32:26-33, 1971.
98. FERNANDEZ, A.I., CANTABRANA, B., HIDALGO, A., Effects of phorbol12,13-dibutyrate and H-7 in extravascular smooth muscle contraction. *Pharmacol*, 47:152-157, 1993.
99. FIORENTINI, C., FABBRI, A., FALZANO, L., FATTOROSSO, A., MATARRESE, P., RIVABENE, R., DONELLI, D. *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. *Infect Immun.* 66(6): 2660-2665, 1998.
100. FLEGEL, W.A., MULLER, F., DAUBENER, W., FISCHER, H.G., HADDING, U., NORTHOFF, H.C. Cytokine response by human monocytes to *Clostridium difficile* toxin A and toxin B. *Infect. Immun.* 59: 3659-3666, 1991.
101. FLORIN, I., THELESTAM, M. Internalization of *Clostridium difficile* cytotoxin into cultured human lung fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 763: 383-392, 1983.
102. FONTELES, M., FANG, G., THIELMAN, N.M., YOTSEFF, P.S.; GUERRANT, R.L. Role of platelet activating factor in the inflammatory and secretory effects of *Clostridium difficile* toxin A. *J. Lipid Mediators Cell Signalling* 11: 133-143. 1995
103. FRANCIS, J., WOOD, D.R. Dental pharmacology and therapeutics In: Saunders, W.B., Philadelphia, 53, 1961.
104. 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.

105. FRIELING, T., COOKE, H.J., WOOD, J.D. Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea-pig colon after sensitization to milk antigen. *Am. J. Physiol.* 267: G1087-G1093, 1994a.
106. FRIELING, T., COOKE, H.J., WOOD, J.D., Histamine receptors on submucous neurones in the guinea-pig colon. *Am. J. Physiol.* 264:G74-G80, 1992.
107. FRIELING, T., PALMER, J.M., COOKE, H.J., et al. Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea-pig colon after infection with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology*. 107:1602 – 1609. 1994b.
108. FRISCH, J., BHASKAR, S.N. Tissue response to eugenol containing periodontal dressings. *J. Periodont.* 38:402-408, 1968.
109. GABELLA G. Structural changes in smooth muscle cells during isotonic contraction. *Cell Tissue Res* 170(2):187-201, 1976.
110. GANITKEVICH, V., ISEMBERG, G. Isolated guinea pig coronary smooth muscle cells. Acetylcholine induces hyperpolarization due to sarcoplasmic reticulum calcium release activating potassium channels. *Circ Res* 67(2):525-528, 1990.
111. GANITKEVICH, V.Y., ISEMBERG, G. Ca^{+2} entry through Na^{+} - Ca^{+2} exchange can trigger Ca^{+2} release from Ca^{+2} stores in Na^{+} loaded guinea-pig coronary myocytes. *J. Physiol. (London)*, 468:225-243, 1993.
112. 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.
113. GEORGE, W.L., SUTTER, V.L., CITRON, D., FINEGOLD, S.M. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J.Clin. Microbiol.* 9:214-219.1979.

114. GILBERT, R.J., TRIADAFILOPOULOS, G., POTHOUKAKIS, C., GIANPAOLO, C., LAMONT, J.T. Effect of purified *Clostridium difficile* toxins on intestinal smooth muscle. I. Toxin A. *Am. J. Physiology*. 256: G759-G766, 1989.
115. GILMAN, A.G.G., Proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56:615-649, 1987.
116. GINSBORG, B. L., and GUERRERO, S. On the action of despolarizing drugs on sympathetic ganglion cells of the frog. *Journal of Physiology (London)*. 172: 189-206, 1964.
117. GIORGI, R., BATATINHA. M.T.M., BERNARDI, M.M., DE SOUSE-SPINOSA, A., SPINOSA, F.R.N., PALERMO, J.N. Effects of *Croton zehntneri* aqueous extracts on cholinergic and dopaminergic related behaviours of laboratory rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. 34:189-193, 1991.
118. GIULIANO, M., PIEMONTE, F., GIANFRILLI, P.M. Production of an enterotoxin different from toxin A by *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett.* 50:191-194, 1988.
119. GONG, M.C., COHEN, P., KITAZAWA, T., IKEBE, M., MASUO, M., SOMLYO, A., SOMLYO, A. Myosin light chain phosphatase activities and the effects of phosphatase inhibitors in tonic and phasic smooth muscle. *J. Biol. Chem.* , 25:14662-14668, 1992.
120. GONG, M.C., SOMLYO, A.V., SOMLYO, A.P., *Biophys. J.* , 66:A409, 1994.
121. GOODMAN & GILMAN. The pharmacological basis of therapeutics. In: HARDMAN, J.G., GILMAN, A.G., LIMBIRD, L.E. (Eds) 9th ed. International Edition, 1996.
122. GOYAL, R.K., HIRANO, I. The Enteric Nervous System. In: Mechanisms of Disease. *The New England Journal of Medicine*, 1106-1115, 1996.

123. HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514, 1998.
124. HALL, J. C. O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobic, *Bacillus difficilis*. *Am. J. Dis. Chil.* 49 : 390-402, 1935.
125. HALL, J.M., MORTON, I.K., Mechanism of action of substance P in guinea-pig ileum longitudinal smooth muscle: a re-evaluation. *J. Physiol. (Lond.)*. 431, 529-541, 1990.
126. HE, D., HAGEN, S.J., POTHOUKAKIS, C., CHEN, M., MEDINA, N.D., WARNY, M., LAMONT, J.T. *Clostridium difficile* toxin A causes early damage to mitochondria in cultured cells. *Gastroenterology* 119:139-150, 2000.
127. HENRIQUES, B., FLORIN, I., THELESTAM, M. Cellular internalisation of *Clostridium difficile* toxin A. *Microb Pathog.* 2(6):455-63, 1987.
128. HIGGS, G.A., VANE, J.R. Inhibition of cyclooxygenase and lipooxygenase. *Br. Med. Bull.*, 39: 265-268, 1983.
129. HILL, J.H., Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol. Rev.*42(1):45-83, 1990.
130. HIMPENS. B., MISSIAEN, L., CASTEELS, R., Ca⁺² homeostasis in vascular smooth muscle. *Review*, 32:207-219, 1995.
131. HIRANO, K., KANAIDE, H., ABE, S., NAKAMURA, M. Temporal change in the calcium-force relation during histamine-induced contractions of strips of the coronary artery of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.*, 102:27-34, 1991.
132. HIRUMA-LIMA, C.A., GRACIOSO, J.S., RODRIGUEZ, J.A., HAUN, M., NUNES, D.S., SOUZA-BRITO, A.R. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth (Euforbiaceae). *J. Ethnop.* 63 (3):229-34, 2000.

133. 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.
134. HOFMANN, F. BUSCH, C. PREPENS, U. JUST, I. AND 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.
135. HOFMANN, F., BUSCH, C., AKTORIES, K. Chimeric clostridial cytotoxins: identification of the N-terminal region involved in protein substrate recognition. *Infect. Immun.* 66:1076-1081, 1998.
136. HOYLE, C.H.V., BURNSTOCK, G., Neuromuscular transmission in the gastrointestinal tract. In:Schultz, S.G., Wood, J.D., et. al. (Eds) Handbook of physiology. Baltimore:American Physiological Society, 13:435-463, 1989.
137. ISHIKAWA H, EVANS ML. The role of the distal elongation zone in the response of maize roots to auxin and gravity. *Plant Physiol.* 102(4):1203-10, 1993.
138. ITOH, T., KURIYAMA, H., UENO, H. Mechanisms of the nitroglycerine-induced vasodilation in vascular smooth muscles of the rabbit and pig. *J Physiol (London)* 343:233-252, 1983.
139. ITOH, T., SEKI, N., SUZUKI, S., ITO, S., KAJIKURI, J., KURIYAMA, H., Membrane hiperpolarization inhibs agonist-induced sinthesis of inositol1,4,5-triphosphate in rabbit mesenteric artery. *J. Physiol (London)*, 451:307-328, 1992
140. ITOKAWA, H., MORITA, M., MISHASHIS, S. Two New Diarylheptanoids from *Alpinia officinarum*. Hance. *Chem. Pharm. Bull.*, 29(8):2383-2385, 1981.
141. ITOKAWA, H., WATANABLE, K., MISHASHI, S., IITAKA, Y. Isolation of Agarofurantype Sesquiterpenes from *Alpinia japonica* (Thunb) Miq. *Chem. Pharm. Bull.*, 28(2):1-682, 1980.

142. ITOKAWA, H., YOSHIMOTO, S., MORITA, H. Diterpenes from the rhizomes of *Alpinia formosa*. *Phytochemistry*, 27(2):435-438, 1988
143. JODAL, M., HOLMGREN, S., LUNDGREN, O., SJOQVIST, A. Involvement of the myoenteric plexus in the cholera toxin-induced net fluid secretion in the rat small intestine. *Gastroenterology*. 105:1286-1293. 1993.
144. JOHNSON, A.J., HSU, A.L., LIN, H.P., SONG, X., CHEN, C.S., The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic Ca^{++} -ATPases: A plausible link with its anti-tumor effect and cardiovascular risks. *Biochemical Journal*. 366: 831-837, 2002.
145. JUNG, H.C., ECKMANN, L., YANG, S.K., PANJA, A., FIERER, J., MORZYCKA-WROBLEWSKA, E., KAGNOFF, M.F.A. Distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 95: 55. 1995.
146. JUST, I., BOQUET, P. Large clostridial cytotoxins as tools in cell biology. *Curr Top Microbiol Immunol.* 250:97-107, 2000.
147. JUST, I., HOFMANN, F., AKTORIES, K., Molecular mode of action of the large clostridial cytotoxins. *Curr. Top. Microbiol Immunol.* 250 : 55-83, 2000.
148. JUST, I., HOFMANN, F., GENTH, H., GERHARD, R. Bacterial protein toxins inhibiting low-molecular-mass GTP-binding proteins. *Int. J. Med. Microbiol.* 291: 243-250. 2001.
149. JUST, I., SELZER, J., WILM, M., EICHEL-STREIBER, C.V., MANN, M., AKTORIES, K. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J. Biol. Chem.* 270 (23): 13932 – 13936. 1995a.

150. JUST, I., WILM, M., SELZER, J., REX, G., EICHEL-STREIBER, C.V., MANN, M., AKTORIES, K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*. 375 : 500 – 503. 1995b.
151. JUSTUS, P.G., MARTIN, J.L., GOLDBERG, D.A., TAYLOR, N.S., BARTLETT, J.G., ALEXANDER, R.W., MATHIAS, J.R. Myoelectric effects of *Clostridium difficile*: motility-altering factors distinct from its cytotoxin and enterotoxin in rabbits. *Gastroenterology*. 83:836-843. 1982.
152. KAMM, K.E., STULL, J.T. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*,25:593-620, 1985.
153. KANADA, A., HATA, F., SUTHAMNATPONG, N., MAEHARA, T., ISHII, T., TAKEUSHI, T., YAGASAKI, O., Key roles of nitric oxide and cyclic GMP in noradrenergic and noncholinergic inhibition in rat ileum. *Eur. J. Pharmacol.*, 216(2):287-292, 1992.
154. KAO, C.Y., CARSTEN, M.E. Cellular aspects of smooth muscle function. 1 ed. Cambridge University Press, 1997.
155. KARAKI, H., SATO, K., OZAKI, H., MURAKAMI, K., Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 156(2):259-266, 1988.
156. KARAKI, H., WEISS, G.B., Calcium release in smooth muscle. *Life Sci.*42:11-122, 1988.
157. KATSOUULIS, S., CONLON, J.M., Neurotensin and prostaglandin interactions in smooth muscle of the guinea-pig stomach. *Eur. J. Pharmacol.*158(3):251-256, 1988.
158. KEAM S, LYSENG-WILLIAMSON K, GOA K. Pranlukast: A Review of its Use in the Management of Asthma. *Drugs*, 63(10): 991-1019, 2003.

159. KELLOW, J. E. Gastrintestinal motility and defecation. In.: ed.: Greger, R & Windhost, U. *Compreensive Human Physiology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany. 1289-1308, 1996.
160. KELLY, C.P., LAMONT, J.T. *Clostridium difficile* Infection. *Annu. Rev. Med*, 49 : 375-390. 1998.
161. KELLY, C.P., POTHOUKAKIS, C., LAMONT, J.T. *Clostridium difficile* colitis. *New Eng. J. Med.* 330: 257-262, 1994.
162. KHROMOV, A., SOMLYO, A.V, TREMTHAM, D.R, ZIMMERMMAN, B, SOMLYO, A.P. The role of MgADP in force maintenance by dephosphorylated cross-bridges in smooth muscle: a flash photolysis study. *Biophys J* 69:2611-2622, 1995.
163. KINK, J.A., WILLIAMS, J.A. Antibodies to recombinant *Clostridium difficile* toxins A and B are an effective treatment and prevent relapse of *C. difficile*-associated disease in a hamster model of infection. *Infect Immun.* 66(5):2018-25, 1998.
164. KITAZAWA, T., GAYLINN, B.D., DENNEY, G.H., SOMLYO, A.P., G-protein-mediated Ca^{+2} sensitization of smooth muscle contraction trough myosin light chain phosphorylation. *J. Biol. Chem.*,226: 1708-1715, 1991a.
165. KITAZAWA, T., MASUO, M., SOMLYO, A., G-protein-mediated inhibition of myosin light chain phosphatase in vascular smooth muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88(20):9307-9310, 1991b.
166. KITAZAWA, T., SOMLYO, A.P., Desensitization and muscarinic re-sensitization of force of myosine light chain phosphorylation to cytoplasmic Ca^{+2} in smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*172:1291-1297, 1990.

167. KIUCHI, F., IWAKAMIS,S., SHIBUIA,M. et al. Inhibition of prostaglandin and leucotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chem.Pharm.Bull.*, 40(2):387-391, 1992.
168. KLAYMAN, D.L., Qinghaousu (artemisinin) na antimalarial drug from China. *Science*,228:1049-1055, 1985.
169. KNOT,H. J., BRAYDEN, J.E., NELSON,M.T. Calcium Channels and Potassium Channels.In: Biochemistry of smooth muscle contraction. BARANY,M. (Ed). Academic Prees. New York.NY. cap.16, 1996.
170. KRIVAN, H.C., CLARK, G.F., SMITH, D.F., WILKINS, T.D., Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc. *Infect. Immun.* 53:573-581, 1986.
171. KRIVOR, W. A. And WILLIS, J. H. Adaptation to constant concentration of acetylcholine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 116: 220-226, 1956.
172. KUBA, K., and MINOTA, S. General characteristics and mechanisms of nicotinic transmission in simpathetic ganglia. In: Ed.: Karczmar, A., G.; Koketsu, K. and Nishi, S. Autonomic and Enteric ganglia: Transmission and Pharmacology. Plenum Press, 107-135, 1986.
173. KUEMERLE, A., MAKHLOUF, G.M., Activation of Cl⁻ channels by contractile agonists depolarises longitudinal muscle and triggers Ca⁺² influx via voltage-sensitive Ca⁺² channels.*Gastroenterology*, 106:A525, 1994
174. KUEMERLE, A., MARTIN, D.C., MURTHY, K.S., KELLUM, J.M., GRIDER, J.R., MAKHLOUF, G.M., Coexistence of contractile and relaxant 5-hydroxytryptamine receptors coupled to distinct signalling pathways in intestinal muscle cells: convergence of the pathways on Ca⁺² mobilization. *Mol.Pharmacol.*42(6):1090-1096, 1992

175. LAHLOU S, LEAL-CARDOSO, J. H., MAGALHÃES, P. J. essential oil of *Croton nepetaefolius* decreases blood pressure through an action upon vascular smooth muscle: studies in DOCA-Salt hipertensive rats. *Planta Médica*. 66(2):138-143, 2000.
176. LAMBERT, D. Signal transduction: G. proteins and second messengers. *Br.J. Anaesth.* 71:86-95, 1993.
177. LARSEN, R.D., RIVERA-MARRERO, C.A., ERNST, L.K., CUMMINGS, R.D., LOWE, J.B., Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:b-D-Gal(1,4)-D-GlcNAc a(1,3)-galactosyltransferase cDNA. *J. Biol. Chem.* 265:7055-7061, 1990.
178. LARSON, H. E. PARRY J. V. PRICE A. B. DAVIES, D. R. DOLBY, J. TYRRELL, D. A. Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. *Br. Med. J.* 1:1246-1248, 1977.
179. LAVABRE, M., Aromoterapia: a cura pelos óleos essenciais. 2ed. Rio de Janeiro.RECORD, 1993.
180. LE BOURHIS, B., SOENEN, A.M. Recherchers sur l'action psychotrope de quelques substancias aromatiques utiliseés en alimentation. *Food Cosmet. Toxicol.*, 11:1-9, 1973.
181. LEAL-CARDOSO, JH., COELHO-DE-SOUZA, A.N., SOUZA, I.T., FIGUEIREDO, I.M. Effects of eugenol on excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 327(1):113-24, 1994.
182. LEFEBVRE, R.A., BAERT, E., BARBIER, A.J., Influence of NG-nitro-L-arginine on non-adrenergic non-cholinergic relation in the guinea-pig gastric fundus. *Br. J. Pharmacol.* 106(1): 173-179, 1992.
183. LeMAY, L.G., VANDER, A.J., KLUGER, M.J. The effects of pentoxifyline on lipopolysaccharide (LPS) fever, plasma interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor (TNF) in teh rat. *Cytokine*.2:300-306, 1990.

184. LIMA, A.A.; INNES, D.J.; 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. Invest.* 56: 419-425. 1989.
185. 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.
186. 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 rabbits small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. *Infect. Immun.* 56: 582-588, 1988.
187. LIMAYE, A. TURGEON, D. COOKSON, B. FRITSCHKE, T. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A(-) B(+) strain of *Clostridium difficile* *J. Clin. Microbiol.* 38(4):1696-1697, 2000.
188. LINCOLN, T.M., CORNWELL, T.L., TAYLOR, A.E. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca^{2+} by cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 258:C399-C407, 1990.
189. 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.
190. LITTEN, R.Z., SUBA, E.A., ROTH, P.L., Effects of a phorbol ester on rat aortic contraction and calcium influx in the presence and absence of BAY k 864. *Eur.J.Pharmacol.* 144: 185-191, 1987.
191. LIU, L., COUPAR, I.M., Characterization of pre- end post-synaptic α -adrenoceptors in modulation of the rat ileum longitudinal and circularis muscles activities. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 365: 248-256, 1997.

192. LOEWY, A.D., SPYER, K.M., Central regulation of autonomic function. Oxford University, 1990.
193. LUNDGREEN, O., SVANVIK, J., JIVEGARD, L., Enteric nervous system physiology and pathophysiology of the intestinal tract. *Dig. Dis. Sci.* 34(2):264-283, 1989.
194. LUZ, A.I.R., ZOGHBI, M.G.B., RAMOS, L.S., et. al . Essentials oils of some Amazonian zingiberaceae, 3 genera alpinia and rengalmia. *J.Nat.Prod.*47(5): 907-908, 1984.
195. LYERLY, D.M. WILKINS, T.D. *Clostridium difficile*. In: Blaser, M. J. Smith, P. D. Ravdin, J. I. Greenberg, H. B. and Guerrant, R. L. Eds. Infections of the Gastrointestinal Tract. Raven Press. Ltd. New York, 867-891, 1995.
196. LYERLY, D.M., BARROSO, L.A., WILKINS, T.D., DEPITRE, CORTHER, G. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive of *Clostridium Difficile*. *Infect. Immun.* 60 (11): 4633-4639. 1992
197. LYERLY, D.M., KRIVAN, H.C., WILKINS, T.D. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin. Microbiol.*, 1: 1-18, 1988
198. 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.
199. LYERLY, D.M., PHELPS, C.J., TOTH, J., WILKINS, T.D. Characterization of toxin A and B of *Clostridium difficile* with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 54:70-76. 1986
200. 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.

201. MAGALHÃES, P.J.C., Ações do óleo essencial do marmeleiro sabiá (*Croton nepetaefolius*) na musculatura intestinal de cobaio. *Tese (Mestrado em Farmacologia)*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1997
202. MAGALHÃES, P.J.C., CRIDLE, D.N., TAVARES, R.A., MELO, E. M.; MOTA, T.L., LEAL-CARDOSO, J. H. Intestinal myorelaxant and antiespasmotic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. *Phytotherapy Research*. 12: 172-177, 1998.
203. MAGALHÃES, P.J.C., Estudo farmacológico do óleo essencial do *Croton nepetaefolius* Baill sobre músculo liso traqueal e vascular e sobre as propriedades eletrofisiológicas de neurônios fásicos do gânglio celíaco. *Tese (Doutorado em Farmacologia)*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2002.
204. MAHIDA, Y.R., GALVIN, A., MAKH, S., HYDE S., SANFILIPPO, L., BORRIELLO, S.P., SEWELL, H.F. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human colonic lamina propria cells: early loss of macrophages followed by T-cell apoptosis. *Infect Immun*. 66(11):5462-9, 1998.
205. 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.
206. MAKHLOUF, G.M., MURTHY, K.S. Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. *Cell Signal*. 9(3-4):269-76. 1997.
207. MALAVIYA, R., IKEDA, T., ROSS, E., ABRAHAM, S.N. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature*. 381:77-79, 1996.
208. MANTYH, C.R., MCVEY, D.C., VIGNA, S.R., Extrinsic surgical denervation, inhibits *Clostridium difficile* toxin A- induced enteritis in rats. *Neuroscience Letters*. 292: 95-98, 2000.

209. MANTYH, C.R., PAPPAS, T.N., LAPP, J.A., WASHINGTON, M.K., NEVILLE, L.M., GHILARDI, J.R., ROGERS, S.D., MANTYH, P.W. Substance P activation of enteric neurons in response to intraluminal *Clostridium difficile* toxin A in the rat ileum. *Gastroenterology* 111:1272-1280, 1996.
210. MARCUS, C., LICHTENSTEIN, P., Biologically active components of anise: Toxicity and interactions with insecticides in insects. *J. Agric. Food Chem.*, 27:1217-1223, 1979.
211. MASSONE, F. Anestesiologia Veterinária - Farmacologia e Técnicas. 107 - 110, 2ª ed. Guanabara Koogan, 1994.
212. MASUDA, K., ITOH, M., KAWATA, T. Characterization and reassembly of a regular array in the cell wall of *Clostridium difficile* GAI 4131. *Microbiol Immunol.* 33:287-298, 1989.
213. MATOS, M.J.A., FERNANDES, A., Relatórios de excursões do programa estudo químico de óleos essenciais de plantas nativas e cultivadas no nordeste. Convênio BNB-CNPq-UFC, Mimeografados, 1975-1978.
214. MCDANIEL, N.L., CHEN, X.L., SINGER, H.A., MURPHY, R.A., REMBOLD, C.M. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing $[Ca^{2+}]_i$ and uncoupling stress from myosin phosphorylation. *Am J Physiol* 263:C461-C467, 1992.
215. MCDANIEL, N.L., REMBOLD, C.M., RICHARD, H.M., MURPHY, R.A.. Cyclic AMP relaxes swine arterial smooth muscle predominantly by decreasing cell Ca^{2+} concentration. *J Physiol (London)* 439:147-160, 1991
216. MCGILVERY, C., REED, J., MEHTA, M. Enciclopédia de Aromaterapia, Massagem e Ioga. Ed. Edelbra, 1996.

217. MEISS, R.A., Mechanical properties of gastrointestinal smooth muscle. In: SCHULTZ, S.G., WOOD, J.D., et al (ed) Handbook of physiology. Baltimore: American Physiological Society, cap.8, 273-329, 1989.
218. MENDONÇA, V.L.M., OLIVEIRA, C.L.A., CRAVEIRO, A.A. et al. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86: 93-97, 1991.
219. MENDONÇA, V.L.M., Estudo farmacológico e toxicológico de *Alpinia speciosa* Schum. *Tese (Mestrado em Farmacologia)* Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, p 152, 1989.
220. MENEZES, A.M.S., ALMEIDA, F.R.C., RAO, V.S., MATOS, M.E.O. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Vanillosperma arborea*. *Fitoterapia*.61(3):252-254. 1990.
221. MENEZES, A.T. estudo da modulação farmacológica do efeito enterotóxico induzido pela toxina A do *Clostridium difficile* em íleo de coelho. *Tese (Mestrado em Farmacologia)* Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2002.
222. MILENOV, K., NICOLOV, R., RAKOVSKA, A., Effect of prostacyclin (PGI-2) on the mechanical activitie of isolated longitudinal and circular muscle strips of guinea-pig stomach. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol*.5(6):369-374, 1983.
223. MILENOV, K., RAKOVSKA, A., The role of prostaglandins in the spontaneous and cholinergic nerve-mediated motility of guinea-pig gastric muscle. *Methods. Find. Exp. Clin. Pharmacol*. 5(2):121-126, 1983
224. MILLER, P.D., POTHOUKAKIS, C., BAEKER, T.R., LAMONT, J.T., ROTHSTEIN, T.L. Marophage-dependent stimulation of T cell-depleted spleen cells by *Clostridium difficile* toxin A and calcium ionophore 1. *Cell. Immunol* 126: 153 - 163.1990.

225. MIOLAN, J.P., NEIL, J.P. The mammalian sympathetic pre vertebral ganglia: integrative properties and role in the nervous control of digestive tract motility. *J. Auton. Nerv. Syst.* 58:125-138, 1996.
226. MITCHEL, T.J., KETLEY, J.M., HASLAM, S.C., STEPHEN, J., BURDON, D.W., CANDY, D.C.W., DANIEL, R. Effect of toxin A and B of *Clostridium difficile* on rabbit ileum and colon. *Gut.* 27:78-85. 1986.
227. MIYOSHI, Y. & NAKAYA, Y. Angiotensin II blocks ATP-sensitive K⁺ channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181(2):700-706, 1991.
228. MONOS, E., BÉRCI, V., NÁDASY, G., Local control of veins: biomechanical metabolic and humoral aspects. *Physiol. Rev.* 75(3):611-666, 1995.
229. MOREIRA, A.L, SAMPAIO, E.P., ZMUIDZINAS, A., FRINDT, P., SMITH, K.A., KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor α by enhancing mRNA degradation. *J.Exp. Med.* 177:1675-1680, 1993.
230. MORGAN, J.P., MORGAN, K.G., Stimulus- specific patterns of intracellular calcium levels in smooth muscle of ferret portal vein, *J. Physiol (London)*, 351:155-167, 1984.
231. MOSS, J., VAUGHAN, M. Mechanism of action of cholera toxin. Evidence for ADP-ribosyltransferase activity with arginine as an acceptor. *J. Biol. Chem.* 252(7): 2455-2457, 1977.
232. MOSS, R., HOFMANN, P. Cellular and molecular basis of muscle contraction. *In: Fundamentals of medical cell biology.* JAI press. 5B:185-273, 1992.
233. MURTHY, K.S., GRIDER, J.R., MAKHLOUF, G.M. Receptor-coupled G proteins mediate contraction and Ca⁺² mobilization in isolated intestinal muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260: 90-97, 1992.

234. NIEBER, K., MILENOV, K., BERGMANN, J., OEHME, P. Contractile response of longitudinal and circular smooth muscles of guinea-pig stomach and ileum to substance P. *Acta. Biol. Med. Ger.*40(2):209-216, 1981.
235. NISHIMURA, J., KHALIL, R.A., DRENTH, J.P., Van BREEMEN, C. Evidence for increased myofilament Ca^{2+} sensitivity in norepinephrine-activated vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 259:H2-H8, 1990.
236. NIXON, G.F., MIGNERI, G.A., SOMLYU, A.V., Immunogold localization of inositol 1,4,5-triphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle. *J.Muscle Res. Cell Motil.*, 15:682-700, 1994.
237. OLIVEIRA AC. Estudo da atividade antiedematogênica e antinociceptiva do óleo essencial do *Croton zehntneri* Pax et Hoff Velalf. Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2001.
238. OLIVEIRA, A.C., LEAL-CARDOSO, J.H., SANTOS, C.F., MORAIS, S.M., COELHO-DE-SOUSA, A.N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34(11): p.1471-1474, 2001.
239. ORIHATA, M., SARNA, S.K., Inhibition of nitric oxide synthase delays gastric emptying of solid meals. *J. Pharmacol.Exp.Ther.*271(2):660-670, 1994
240. PANTOSTI, A., CERQUETTI, M. VITI F. ORTISI, G. MASTRANTONIO, P. Immunoblot analysis of serum immunoglobulin G response to surface proteins of *Clostridium difficile* in patients with antibiotic-associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 27:2594-2597. 1989a

241. PANTOSTI, A., CERQUETTI, M., VITI, F., ORTISI, G., MASTRANTONIO, P. Antibody response to *Clostridium difficile* determined by Western body analysis. *Microecol. Ther.* 18:303-309. 1989b.
242. PAREKH, A.B., BRADING, A.F., The sources of calcium of carbachol-induced contraction in the circular smooth muscles of guinea-pig stomach. *Br. J.Pharmacol.*104(2):412-418, 1991.
243. PERCY, W. H. In vitro techniques for the study of gastrointestinal motility. In: methods in gastrointestinal pharmacology. 189-224, 1996.
244. PERCY, W.H., BURAKOFF, R., ROSE, K., DESAI, H.P., POTHOUKAKIS, C., EGLOW, R. In vitro evidence that rabbit distal colonic muscularis mucosae has a *Clostridium difficile* toxin A receptor. *Am J Physiol.* 275(3 Pt 1):G402-9, 1998.
245. POPESCU, L.M., FORIL, C.P., HINESCU, M., PANOIU, C., CINTEZA, M., GHERASIM, L. Nitroglycerin stimulates the sarcolemmal Ca^{++} -extrusion ATPase of coronary smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 34(10):1857-1860, 1985.
246. POPOFF, M.R., CHAVES-OLARTE, E., LEMICHEZ, E., VON EICHELSTREIBER, C., THELESTAM, M., CHARDIN, P., CUSSAC, D., ANTONNY, B., CHAVRIER, P., FLATAU, G., GIRY, M., DE GUNZBURG, J., BOQUET, P. Ras, Rap, and Rac small GTP-binding proteins are targets for *Clostridium sordellii* lethal toxin glucosylation. *J Biol Chem.* 271(17):10217-24, 1996.
247. POTHOUKAKIS, C., CASTAGLIUOLO, I., LAMONT, J.T., JAFFER, A., O'KEANE, J.C., SNYDER, 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. USA.* 91: 947-951.1994.
248. POTHOUKAKIS, C., CASTAGLIUOLO, I., LAMONT, J.T., Nerves and intestinal mast cells modulate responses to enterotoxins. *News in Physiological Sciences.* 13(2):58-63. 1998.

249. POTHOUKAKIS, C., GILBERT, R.J., CLADARAS, C., CASTAGLIUOLO, I., SEMENZA, G., HITTI, Y., MONTERIEF, J.S., LINEVSKY, J., KELLY, C.P., NIKULASSON, S., DESAI, H.P., WILKINS, T.D., LAMONT, J.T. Rabbit sucrase-isomaltase contains a functional intestinal receptor for *Clostridium difficile* toxin A. *J. Clin. Invest.* 98:641 – 649. 1996.
250. POTHOUKAKIS, C., LAMONT, J.T. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)*: 280:G178-G183. 2001
251. POTHOUKAKIS, C., LAMONT, J.T., *Clostridium difficile* colitis and diarrhea. *Gastr. Clin. N. Am.* 22: 623-637; 1993.
252. POXTON, I.R., BYRNE, M.D. Immunological analysis of the EDTA-soluble antigens of *Clostridium difficile* and related species. *J. Gen. Microbiol.* 12:41-46.1981.
253. POXTON, I.R., CARTMILL, T.D.I. Immunochemistry of the cell-surfacecarbohydrate antigens of *Clostridium difficile*. *J. Gen. Microbiol.* 128:1365-1370.1982.
254. PREPENS, U., JUST, I., Von EICHEL-STREIBER, C., AKTORIES, K. Inhibition of FcIRI-mediated activation of rat basophilic leukemia cells by *Clostridium difficile* toxin B (monoglucosyltransferase). *J. Biol. Chem.* 271:7324 – 7329. 1996.
255. PRESTWICH, S.A, BOLTON, T.B. G-protein involvement in muscarinic receptor stimulation of inositol phosphates in longitudinal smooth muscle from the small intestine of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 114: 119-126, 1995.
256. PRICE, S.B., PHELPS, C.J., WILKINS, T.D., JOHNSON, J.L., Cloning of the carbohydrate-binding portion of the toxin A gene *Clostridium difficile*. *Curr. Microbiol.* 16:55-60.1987.

257. PRUDENTE, D., PERINEAU, F., BESSIERE, J.M., et. al. Chemical analysis, bacteriostatic and fungistatic properties of the essential oil of the atouman from Martinique (*Alpinia speciosa* K.Schum). *J. Essen. Oil Res.*, 5(3):255-264, 1993.
258. 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.
259. QUAYLE, J.M., BONEV, A.D., BRAYDEN, J.E., NELSON, M.T. Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K⁺ currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. *J Physiol (London)* 475:9-13, 1994.
260. RANG, H.P., DALE, M.M., *Farmacologia*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p595, 1993.
261. RAPOPORT, R.M., WALDMAN, S.A., SCHWARTZ, K., WINQUIST, R.J., MURAD, F. Effects of atrial natriuretic factor, sodium nitroprusside, and acetylcholine on cyclic GMP levels and relaxation in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 115:219-229, 1985.
262. RASMUSSEN, H., TAKUWA, Y., PARK, S., Proteine kinase c in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J*. 1:177-185, 1987.
263. REMBOLD, C.M., Electromechanical and pharmacomechanical coupling in: biochemistry of smooth muscle contraction. *Academic Press*, 18:227-240, 1996
264. REMBOLD, C.M., MURPHY, R. Myoplasmic [Ca⁺²] determines myosin phosphorylation in agonist-simulated swine arterial smooth muscle. *Circ. Res*. 63(3):593-603, 1988a.

265. REMBOLD, C.M., MURPHY, R.A. $[Ca^{+2}]$ -dependent myosin phosphorylation in phorbol diester stimulated smooth muscle contraction. *Am.J. Physiol.*, 225(6):C719-723, 1988b.
266. REMBOLD, C.M., MURPHY, R.A. Models of the mechanism for crossbridge attachment in smooth muscle. *J Musc Res Cell Motil* 14(3):325-334, 1993
267. REMBOLD, C.M., Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension*, 20(2):129-137, 1992.
268. REUTER, B. K., ASFAHA, S., BURET, A., SHARKEY, K. A., WALLACE, J. L. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* 98: 2076-2085, 1996.
269. RHEE, S.G., CHOI, K.D., Regulation of inositol phospholipide specific phospholipase C isozymes. *J. Biol.Chem.* 267:12393-12396, 1992
270. RHOADES, R.A., TANNER, G.A., Medical physiology, 1992
271. 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.
272. RIDLEY, A.J., HALL, A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70(3): 401-410, 1992
273. RIEGLER, M., SEDIVY, R., POTHOUKAKIS, C., HAMILTON, G., ZACHERI, 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.
274. RIFKIN, G.D., FEKETY, F.R., SILVA, J., SACK, R.B. Antibiotic-induced colitis implication of a toxin neutralized by *Clostridium sordellii* antitoxin. *Lancet* 2:1103-1106, 1977.

275. ROBERTSON, B.E., SCHUBERT, R., HESCHELER, J., NELSON, M.T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265:C299-C303, 1993.
276. ROCHA, M.F.G. Efeito secretório intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com a toxina A do *Clostridium difficile*: papel da interleucina-1 β . *Tese (Doutorado em Farmacologia)*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1998.
277. 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 release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1 β , tumor necrosis factor alpha and leukotrienes. *Infection and Immunity* 65(7): 2740-2746. 1997.
278. 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*. *Dissertação (Mestrado em Farmacologia)* Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1994.
279. ROCHA, M.F.G., SOARES, A.M., FLORES, C.A., STEINER, T.S., LYERLY, D.M., GUERRANT, R.L., RIBEIRO, R.A., LIMA, A.A.M. Intestinal secretory factor release by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxina A: role of interleukin-1 β . *Infection and Immunity* 66(10): 4910-4916, 1998.
280. ROCHA, M.F.G., SOARES, A.M., RIBEIRO, R.A., LIMA, A.A.M. Absence of intestinal secretion on supernatants from macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin B on rabbit ileum. *Toxicon*. 39:335-340, 2001.
281. ROCHA, M.G.F., 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 α , Tumor Necrosis Factor Alpha, and leukotrienes. *Infect. Immun.*, 65: 2740-2746, 1997.
282. ROLF, R.D., SONG, W. Purification of a functional receptor for *Clostridium difficile* toxin A from intestinal brush border membranes of infant hamsters. *Clin. Infect. Dis.* 16:219-227, 1993.
283. ROLFE, R.D., SONG, W. Immunoglobulin and non-immunoglobulin components of human milk inhibit *Clostridium difficile* toxin A-receptor binding. *J. Med. Microbiol.* 42:10-19, 1995.
284. ROMPELBERG, C.J., VERHAGEN, H., VAN BLADEREN, P.J., Effects of the naturally occurring alkenylbenzenes eugenol and trans-anethole on drug-metabolizing enzymes in the rat liver. *Food Chem. Toxicol.*, 31:637-646, 1993
285. RYBOLT, A.H., LAUGHON, B.E., GREENOUGH, W.B. III. BENNETT, R.G., THOMAS, D.R., BARTLETT, J.G. Protein-losing enteropathy associated with *Clostridium difficile* infection. *Lancet.* 1:1353-1355, 1989.
286. SAITO, M., WEIN, J., LEVIN, R.M., Biphasic response of the rabbit detrusor muscle to changing the extracellular concentrations of potassium and calcium. *Gen. Pharmac.*, 25(6):1101-1107, 1994.
287. SALVEMINI, D., MASINI, E., PISTELLI, A., MANNAIONI, P.F.; VANE, J. Nitric oxide: a regulatory mediator of mast cell reactivity. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17:258-265, 1991.
288. SAMPAIO, E.P., SARNO, E.N., GALILLY, R., COHN, Z.A., KAPLAN, G., Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor α production by stimulated human monocytes. *J.Exp.Med.*, 173:699-703, 1991
289. SANTOS, F.A., RAO, V.S., SILVEIRA, E.R.. Anti-inflammatory and analgesic activities of the essential oil of *Psidium guyanensis*. *Fitoterapia.* 68 (1): 65-68. 1997.

290. SARTOR, R. B. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 106:533 – 541, 1994.
291. SCHANDENÉ, L., VANDENBUSSCHE, P., CRUSIAUX, A., ALÈGRE, M.L., ABRAMOWICZ, D., DUPONT, E., CONTENT, J., GOLDMAN, M. Differential effects of pentoxifyline on the production of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) by monocytes and T cells. *Immunology*, 76:30-34, 1992.
292. 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.
293. SCHUERER-MALY, C.C., ECKMANN, L., KAGNOFF, M.F., FALCO, M.T., MALY, F.E. Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammation cytokin and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology* 81:85, 1994.
294. SCHWEINS, T., SCHEFFZEK, K., ASSHEUER, R., WITTINGHOFER, A. The role of the metal ion in the p21ras catalysed GTP-hydrolysis: Mn²⁺ versus Mg²⁺. *J Mol Biol.* 7;266(4):847-56, 1997.
295. SCHWINN, D.A., Andrenoceptors as models for G-coupled receptors: structure, function and regulation. *Br. J. Anaesth.* 71: 77-85, 1993
296. SELZER, J., HOFMANN, F., REŞ, G., WILM, M., MANN, M., JUST, I., AKTORIES, K. *Clostridium novyi* α-toxin-catalyzed incorporation of GlcNAc into Rho subfamily proteins. *J. Biol. Chem.* 271: 25173-25177, 1996.
297. SETO, T.A., KEUP, W., Effects of alkylmethoxybenzene and alkylmethylbenzene essentials oils on pentobarbital sleeping-time. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 180:232-240, 1969
298. SETTLE, C.D. E WILCOX, M.H. Review article: Antibiotic induced *Clostridium difficile* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 10: 835-841, 1996.

299. SHANLEY, T. P. SCHMAL, H. WARNER, R. L. SCHMID, R. E. FRIEDL, H. P. WARD, P. A. Requirement for C-X-C chemokines (macrophage inflammatory protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant) in IgG immune complex-induced lung injury. *J. Immunol.* 158:3439 – 3450. 1997.
300. SIEGMAN, MJ, BUTLER, TM, MOERS, SU AND DAVIES, RE. Chemical energetics of force development, force maintenance, and relaxation in mammalian smooth muscle. *J Gen Physiol* 76(5):609-629, 1980.
301. SIMS, SM. Cholinergic activation of a non-selective cation current in canine gastric smooth muscle is associated with contraction. *J Physiol (London)* 449:377-398, 1992.
302. SLATTERY, M.M., FRIER, A.M., HEALY, D.G., MORRISON, J.J. Uterine relaxant effects of cyclooxygenase-2 inhibitors *in vitro*. *Obstetrics and gynecology.* 98:563-569 , 2001.
303. SMALL, R.C., FOSTER, R.W., Airways smooth muscle: an overview of morphology, electrophysiology and aspects of the pharmacology of contraction and relaxation. In: Kay, A.B. (ed) *Asthma: Clinical Pharmacology and Therapeutic Progress.* London: Blackwell Scientific., 101-113, 1986.
304. SMITS, G.J., LEFEBVRE, R.A. ATP and nitric oxide: inhibitory NANC neurotransmitters in the longitudinal muscle – myenteric plexus preparation of the rat ileum. *Br. J. Pharmacol.* 118 (3): 695-703, 1996.
305. 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.
306. SOMLYO, A. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Circ.Res.* 57:479-507, 1985.
307. SOMLYO, A., SOMLYO, A., Signal transduction and regulation in smooth muscle *Nature.* 372:231-236, 1994.

308. SOMLYO, A.P., & SOMLYO, A.V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle miosin II. *J Physiol* 522(2):177-185, 2000.
309. SOMLYO, A.V. & SOMLYO, A.P. Electromecanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 159:129-145, 1968.
310. SONGER, J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Ver.* 9:216-234. 1996.
311. SOUSA, P.C.J., MAGALHAES, P.C.J., OLIVEIRA, V.S., LEAL-CARDOSO, J.H., Effects of piperitenone oxide on intestinal smooth muscle of the guinea-pig. *Brazilian Journal of Medical ad Biological Research.* 30:787-791, 1997.
312. SOUZA, M.F., Atividade anti-inflamatória, antitrombótica e anti-anafilática da Ternatina, um novo flavonóide de *Egletes viscosa*, Less. Tese (Mestrado em farmacologia) Fortaleza:Universidade Federal do Ceará, 1993.
313. 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 tumour necrosis factor and lipoxygenase products on the neutrophil recruitment induced by *Clostridium difficile* toxin B. *Immunology.* 91: 281-288. 1997.
314. SPERELAKIS, N., Excitation-contraction coupling in cardiac muscle and smooth muscle. In: Sperelakis, N., Banks R.O. (Eds). *Physiology.* Boston: little brown, c.15: 223-241, 1993.
315. STARR, J.M., ROGERS, T.R., IMPALLOMENI, M. Hospital-acquired *Clostridium difficile* diarrhea and herd immunity. *Lancet*, 349: 426-428. 1997.

316. STICHER, F.D., SMITH, R.M., Eugenol:some pharmacological observations. *J. Dental. Res.*, 50:1531-1535, 1971.
317. STOJCEV, S.T., ZOLOTOVICH, G., NACHEU, T.C.H. et. al . Cytotoxic effects of phenols, phenol ethers, furan derivates and oxides isolated from essential oils. *C.R. Acad. Bulg. Sci.*, 20:1341-1344, 1967.
318. STRELAU, E., WAGNER, B., WAGNER, M., KARSH, W. Demonstration of capsules on *Clostridium difficile*. *Zentral Bakteriol Hyg* 270:456-461.1989.
319. STRUHAR, D., KIVITY, S., TOPILSKY, M. Quinacrine inhibits oxigen radicals from human alveolar macrophages. In: *J. Immunopharmacol.*, 14: 275-277, 1992.
320. STULL, J.T., GALLAGHER, P.J., HERRING, B.P., KAMM, K.E. Vascular smooth muscle contractile elements. *Cellular regulation. Hypertension* 17:723-732, 1991.
321. SULLIVAN, N.M., PELLET, S., WILKINS, T.D. Purification of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 35: 1032-1040, 1982.
322. SWHWEINS, T., SCHEFFZEK, K., ASSHEUER, R., WITTINGHOFER, A. The role of the metal ion in the p21ras catalysed GTP-hydrolysis: Mn^{-2} versus Mg^{+2} . *J. Mol. Biol.* 7(4):847-856, 1997.
323. SZURSZZEWSKY, J.H., KING, B.K., Physiology of prevertebral ganglia in mammals with special reference to inferior mesenteric ganglion. In: SCHULTZ, S.G., WOOD,J.D., et. al (Eds). *Handbook of Physiology*. Baltimore: American Physiological Society, 6:519-592, 1989
324. TANG, D.C., STULL, J.T., KUBOTA, Y., KAMM, K.E. Regulation of the calcium dependence of smooth muscle contraction. *J. Biol.Chem.*. 267:11839-11845, 1992.
325. TAYLOR, N.S., THORNE, G.M., BARTLETT, J.G. Comparison of to toxins produced by *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 34: 1036 - 1043. 1981.

326. TAYLOR, N.S., THORNE, G.M., BARTLETT, J.G. Separation of an enterotoxin from the cytotoxin of *Clostridium difficile*. *Clin. Res.* 28:285, 1980.
327. TEDESCO, F.J., BARTON, R.W., ALPERS, D.H. Clindamycin-associated colitis. *Ann Intern Med* 81:429-433, 1974.
328. THELESTAM, M., FLORIN, I., OLARTE, E.C. Review: *Clostridium difficile* toxins. In: Aktories, K. (Ed), *Bacterial toxins: a laboratory companion*. 141 – 158, 1997.
329. THORNBURY, K.D., WARD, S.M., DALZIEL, H.H, CARL A., WESTFALL, D.P., SANDERS, K.M.. Nitric oxide and nitrosocysteine mimic nonadrenergic, noncholinergic hyperpolarization in canine proximal colon. *Am J Physiol* 261:G553-G557, 1991.
330. TILG, H., EIBL, B., PICHL, M., GÄCHTER, A., HEROLD, M., BRANKOVA, J., HUBER, C., NIEDERWIESSER, D., Immune response modulation by pentoxifyline *in vitro*. *Transplantation*. 56:196-201, 1993.
331. TITOV, L., LEBEDKOVA, N., SHABANOV, A., TANG, Y.J., COHEN, S. H., SILVA, J.R.J. Isolation and molecular characterization of *Clostridium difficile* strains from patients and the hospital environment in belarus. *J. Clin. Microbiol.* 38(3): 1200-1202, 2000.
332. TORRES, J.F. Purification and characterization of toxin B from a strain of *Clostridium difficile* that does not produce toxin A *J. Med. Microbiol.* 35(1):40-4, 1991.
333. TRIADAFILOPOULOS, G. POTHOUKAKIS, C. WEISS, R. GIAMPAOLO, C. AND LAMONT, J.T. Comparative study of *Clostridium difficile* toxin A and cholera toxin in rabbit ileum. *Gastroenterology*. 97:1186-1192, 1989

334. TRIADAFILOPOULOS, G., POTHOUKAKIS, C., LAMONT, J.T. *In vivo* production of leukotriene B₄ and prostaglandin E₂ in experimental *C. difficile* colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 82: A950, 1987a.
335. TRIADAFILOPOULOS, G., POTHOUKAKIS, C., O'BRIEN, M.J., LAMONT, J.T. Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. *Gastroenterology.* 93:273-279. 1987b.
336. TUCKER, K.D., WILKINS, T.D., Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. *Infect. Immun.* 59:73-78, 1991.
337. TWORT, C.H., Van BREEMEN, C. Cyclic guanosine monophosphate-enhanced sequestration of Ca²⁺ by sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle. *Circ Res* 62(5):961-964, 1988.
338. UEHARA, Y., BURNSTOCK, G., Demonstration of "GAP-junctions" between smooth muscle cells. *J. Cell. Biol.* 44: 215-217, 1970.
339. Van NIEUWSTADT, R.A., HAJER, R., BREUKNINK, H.J., Autonomic innervation of the airways. *Vet. Quart.* 16:110-114, 1994.
340. VANNER, S., JIANG, M.M., SURPRENANT, A. Mucosal stimulation evokes vasodilatation in submucosal arterioles by neuronal and non-neuronal mechanisms. *Am. J. Physiol.* 264: G202-G212, 1993.
341. VENKOVA, K., KRIER, J., Stimulation of lumbar sympathetic nerves evokes contractions of cat colon circular muscle mediated by ATP and Noradrenaline. *Br. J. Pharmacol.* 110:1260-1270, 1993.
342. VIANA, G.S.B., VALE, T.G., PINHO, R.S.N., MATOS, F.J.A. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cybopogon citratus* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 70:323-327, 2000.

343. Von EICHEL-STREIBER C., LAUFENBERG, I., ELDMANN, R., SARTINGEN, S., SCHULZE, J., SAUERBORN, M. Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. *Mol. Gen. Genet.* 233:260-268, 1992a.
344. Von EICHEL-STREIBER, C., MEYER, Z.U., HERINGDORF, D., HABERMANN, E., SARTINGEN, S. Closing in on the toxic domain through analysis of a variant *Clostridium difficile* cytotoxin B. *Mol. Microbiol.* 17(2): 313-321, 1995.
345. Von EICHEL-STREIBER, C., SAUERBORN, M., KURAMITSU, H.K. Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding sites of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *J. Bacteriol.* 174:6707-6710, 1992b.
346. VYAS, *et al.*, Cooperative activation of myosin by light chain phosphorylation in permeabilized smooth muscle. *Am J Physiol* 263:C210-C219, 1992
347. WALLACE, J.L., KEENAN, C.M., GALE, D. SHOUBE, T.S. Exacerbation of experimental colitis by NSAIDs is not related elevated leukotriene B4 synthesis. *Gastroenterology.* 102: 18-27, 1992
348. WARNY, M., KEATES, A.C., KEATES, S., CASTAGLIUOLO, I., ZACKS, J.K., ABOUDOLA, S., QAMAR, A., POTHOUKAKIS, C., LAMONT, J.T., KELLY, C.P., p38 MAP kinase activation by *C. difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production and enteritis. *J. Clin. Invest.* 105:1147-1156, 2000.
349. WATERMAN, S.A., COSTA, M., TONINI, M. Accommodation mediated by energetic inhibitory reflexes in the isolated guinea-pig small intestine. *J.Physiol.*474(3):539-546, 1994
350. WATERMAN, S.A., COSTA, M., TONINI, M. Modulation of peristalsis in the guinea-pig isolated small intestine by exogenous and endogenous opioids. *Br. J. Pharmacol.* 106:1004-1010, 1992

351. WEDLER, F.C. Biological significance of manganese in mammalian systems. *Prog Med Chem*.30:89-133, 1993.
352. WILCKENS, T., De RIJK, R. Glucocorticoids and immune function: Unknown dimensions and new frontiers. *Immun. Today*, 18: 418-423, 1997.
353. WILKINS, T.D., LYERLY, D.M. Clostridium difficile toxins attack Rho. *Trends Microbiol.* 4(2):49-51, 1996.
354. WOLPE, S.D., SHERRY, B., JUERS, D., DAVATELIS, G., YURT, R.W. CERAMI, A. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:612, 1989.
355. WOOD, J. D. Physiology of the enteric nervous system. In: Johnson L. R. ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 3rd. ed. New York: Raven Press, 423-482, 1994.
356. WOOD, J.D. Histamine signals in enteric neuroimmune interactions. *Ann. New York Acad Sci.* 664:275-283, 1992
357. WORD, R.A, KAMM, K.E. Regulation of smooth muscle contraction by myosin phosphorylation. In: Cellular aspects of smooth muscle function, Cambridge University Press, 1997
358. WORD, R.A., CASEY, M.L., KAMM, K.E., STULL, J.T. Effects of cGMP on $[Ca^{2+}]_i$, myosin light chain phosphorylation, and contraction in human myometrium. *Am J Physiol* 260:C861-C867, 1991.
359. WREN, B.W. A family of clostridial and streptococcal ligand-binding proteins with conserved C-terminal repeat sequences. *Mol. Microbiol.*5:797-803, 1991.

360. WREN, B.W., CLAYTON, C.L., MULLANY, P.P., TABAQCHALI, S. Molecular cloning and expressing of *Clostridium difficile* toxin A in *Escherichia coli* K12. *FEBS*. 225:82-86, 1987.
361. XIA, Y., HU, H.Z., LIU, S., POTHOUKAKIS, C., WOOD, J.D. *Clostridium difficile* toxin A excites enteric neurones and suppresses sympathetic neurotransmission in the guinea-pig. *Gut*. 46(4): 481-486, 2000.
362. YANAGISAWA, T., OKADA, Y., KCl depolarisation increases Ca^{+2} sensivity of contractile elements in coronary arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 276(36): H614-H621, 1994.
363. ZHANG, J., KING, W.G., DILLON, S., HALL, A., FEIG, L., RITTENHOUSE, S.E. Activation of platelet phosphotidylinositide 3-kinase requires the small GTP-binding protein Rho. *J. Biol. Chem.* 268(30): 22251 – 22254, 1993.
364. ZHANG, Y., LANG, R.J., Effects of intrinsic prostaglandins on the spontaneous contractile and electrical activity of the proximal renal pelvis of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.*, 113:431-438, 1994.
365. ZONDEX, B., BERGMANN, E., Phenol methyl ethers as oestrogenic agents. *Biochem. J.*, 32:641-645, 1938.