



C.754374
R.1544179
02/10/02
18320

02/10/02

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ESTUDO DA MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO
EFEITO ENTEROTÓXICO INDUZIDO PELA TOXINA A DO
CLOSTRIDIUM DIFFICILE EM ÍLEO DE COELHO**

ANTONIO TELES DE MENEZES

FORTALEZA-CEARÁ

2002

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ESTUDO DA MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO
EFEITO ENTEROTÓXICO INDUZIDO PELA TOXINA A DO
CLOSTRIDIUM DIFFICILE EM ÍLEO DE COELHO**

ANTONIO TELES DE MENEZES

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

Fortaleza-Ceará

2002



M51e Menezes, Antonio Teles de

Estudo da modulação farmacológica do efeito enterotóxico induzido pela toxina A do *Clostridium difficile* em ileo de coelho / Antonio Teles de Menezes. – Fortaleza, 2002

124 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Diarréia inflamatória. 2. *Clostridium difficile*. 3. Toxina A.
4. Secreção Intestinal. 5. Modulação farmacológica. I Título

CDD 616.3427

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

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



Antonio Teles de Menezes

Defesa formal aprovada em 15/03/2002, pela Banca Examinadora constituída por:



Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, *PhD*

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles, *PhD*



Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, *PhD*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeira instância, a **DEUS** que, durante meu percurso durante este período, deu-me condições para que eu prosseguisse meu caminho em paz e cedeu-me a saúde para contemplar esta árdua intentona.

À minha mãe, **Joana Celi de Menezes Teles**, que sempre orientou e supervisionou meus passos desde os primeiros momentos de vida até minha graduação e concedeu seu peito amigo e confortável nos momentos de angústia e compartilhou as vivências de alegria comigo.

Ao meu pai, **Raimundo de Queiroz Teles**, exemplo imediato de perseverança e luta contra as adversidades, principalmente aquelas as quais a vida o pôs em xeque, assim como pregando a humildade e honestidade, contribuiu de forma ímpar para minha formação de minha personalidade.

Aos meus irmãos **Gerardo Cristino e Ruth Teles** pelos momentos de convivência em família.

Aos meus avós **Gerardo Cristino de Menezes e Maria “Ruth” de Menezes Cristino** que são o perfeito sentido da palavra *humanidade* e que souberam, com extrema sapiência, ser a extensão do amor dos meus pais. Como também, agradeço aos meus tios e tias, maternos e paternos, e parentes outros cujas provas de amizade e solidariedade são deveras indiscutíveis.

À pequena cidade de **COREAÚ-CE**, pátria amada que tem neste orgulhoso rebento um de seus mais ferrenhos admiradores.

À **Universidade Estadual do Ceará** por tudo que contribuiu para minha formação profissional e intelectual, bem como agradeço a todo o corpo de funcionários desta universidade que colaboraram e prestaram grandes serviços a mim e meus colegas durante minha caminhada.

À **Universidade Federal do Ceará** o qual ofereceu condições estruturais e humanas para o desenvolvimento pleno deste trabalho.

Ao Professor **Bóris Nogueira Menezes**, amigo e irmão, que sempre esteve do meu lado compartilhando momentos de alegria e dor, exalando seu companheirismo e fraternidade sob forma de atitudes de amizade e humildade onde os homens deveriam espelhar-se na construção de um mundo cada vez melhor.

Aos meus AMIGOS: **Yleen Acioly Mesquita**, companheiro e tradutor fiel do ofício de ser veterinário; **Paulo Roberto Pires dos Santos**, cuja solidariedade e provas de amizade, orgulham-me de considerá-lo como amigo certo nas horas impróprias; **Paulo Henrique Coutinho de Araújo Chaves**, que repassou um pouco sua vivência sob forma de bom humor e sabedoria, **Israel Moreira Lima**, colaborador e colega.

Ao professor **Marcos Fábio Gadelha Rocha** que iniciou-me no intrigante, mas gratificante mundo da curiosidade científica e que acresceu sua experiência na elaboração deste trabalho tal qual em minha formação humanística nesta empreitada

Ao Magnífico Reitor da UECE **Manassés Claudino Fonteles**, homem visionário que revolucionou a forma de se administrar uma universidade, sempre visando ao futuro científico de uma Instituição de Educação Superior, como também homem sábio na busca de desabrochar novos

valores científicos e humanos, respaldados em sua larga e frutífera experiência de vida. *Só Deus compartilha da eternidade de seus nomes.*

Ao professor **Aldo Ângelo Moreira Lima** que prestou suma contribuição de forma soberba e competente para o aprimoramento de minha formação não somente científica, como também no sentido de fazer-me ver a Ciência sob o aspecto aplicado em prol da humanidade tão pobre de espírito.

Ao professor **Nilberto Robson Falcão do Nascimento** que comprometeu-se a colaborar como supervisor o período do meu Estágio Supervisionado, consolidando, portanto, uma amizade sincera e fraterna, contínua na Pós-Graduação e na grandeza de sermos veterinários.

Ao professor **Geraldo de Sousa Tomé**, ícone de homem dedicado à Ciência cujos conhecimentos foram essenciais na leitura e interpretação das lâminas de histopatologia, bem como nos conselhos e intercâmbio de experiências tão valiosas.

Aos professores da Faculdade de Veterinária: **José Eduardo Cabral Maia, Célio Pires Garcia, Antônio Walter Fernandes, Antônio Amaury Oriá Fernandes, Antônio Sérgio Pessoa Evangelista, Francisco Jadir Jucá Nogueira, Lúcia de Fátima Lopes dos Santos, Marilac Maria Arnaldo Alencar, José Mário Girão Abreu, Raimundo Bezerra Costa, Diana Célia Nunes Pinheiro e Célia Maria de Souza Sampaio.**

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia pelo grande apoio e transmissão de conhecimentos: **Francisca Cléa Florenço de Sousa, Francisco Hélio Rola, Gerly Anne de Castro Brito, Gisela Costa Camarão, Helena Serra Azul Monteiro, Manoel Odorico**

Morais, Maria Elisabete Amaral Carvalho, Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, Vietla Satyanarayana Rao, Talapa Govindaswamy Naidu (o qual referendo uma especial admiração) e Rosa Maria Salani.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia da UECE: José Henrique Leal Cardoso, Krishnamurti Moraes Carvalho e David Neil Criddle.

Aos colegas de Pós-graduação (Mestrado e Doutorado) os quais tive o privilégio de compartilhar momentos inesquecíveis nas disciplinas cursadas: Crystianne Calado Lima, Francisco Werlames Landim, Lúcio Flávio Gonzaga Silva, Maria Lurdemiler Sabóia Mota, Marta Regina Kerntopf, Paulo Ferdinando Melo, Pedro Jorge Caldas Magalhães, Regina Fátima Feitosa, Sônia Leite Silva, Valéria Goés Pinheiro, Antero Gomes Neto, Aurenívea Maria Almeida, Cristiano Teles Sousa, Francisco Romero Cabral, José Alves Gurgel, Karina Moreira Cunha, Lissiana Magna Vasconcelos, Maria das Graças Roriz Fonteles (grande figura humana, mãe e poetisa), Núbia Mota Luna, Regilane Matos Silva, Renata Ferreira Leitão, Vera Moreira Lobo.

Aos colegas da Escola Superior de Agricultura de Mossoró: José Fernando Gomes Albuquerque, Carlos Campos Câmara, Nilza Dutra Alves, Frederico Ozanan Barros Monteiro, Regina Maria Werneck Santiago, Marcelo Barbosa Bezerra, Raimundo Alves Barreto Júnior, Valéria Veras de Paula, Francisco Marlon Feijó, Alexandro Íris Leite, Jael Soares Batista, Maria Gláucia Barbosa.

Aos **animais de produção** que saciam a fome dos homens, aos **animais de estimação** que acalentam as pessoas solitárias e deficientes, aos

animais silvestres que enaltecem a beleza da Natureza e necessitam de nossa ajuda para sobreviver à incompreensão de nossos irmãos “racionais”, enfim a todos os **ANIMAIS** existentes neste planeta e que nos enchem de orgulho em sermos veterinários.

Ao ***Rattus norvegicus***, cepa **Wistar**, e ao ***Oryctolagus cuniculus***, raça **Nova Zelândia**, que cederam suas preciosas vidas em prol de minha caminhada científica, em nome da realização da parte experimental de minha dissertação e em nome do progresso da Ciência como um todo, assim como a **Bento Francisco de Oliveira**, e **Jociê Andrade Silva**, responsáveis pelo bem-estar animal no biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas.

Aos funcionários e técnicos da Unidade de Pesquisas Clínicas que muito me ajudaram durante o curso de Pós-graduação, em especial a **Domingos Barreto de Oliveira**, **Kátia Maria Lima Nogueira**, **José Amadeus Souza (com sua inconfundível e peculiar penca de chaves)**, **Terezinha F. França**, **Maria do Carmo N. Pinho**.

À **Sílvia Maria de A. Lima** e **Aura Rhanes Farias**, pelo grande apoio na Coordenação do Curso de Pós-graduação em Farmacologia.

À **Roberta Ribeiro Coelho** pelo companheirismo e cumplicidade em momentos os quais um homem se abriga e fragiliza perante a imagem de uma mulher.

Aos acadêmicos de Medicina Veterinária **João Luís Carvalho de Sousa** e **Francisco Atualpa Soares Júnior** pelo auxílio nos experimentos e na convivência fraterna na UECE.

Aos meus alunos das disciplinas de **Farmacologia Veterinária e Toxicologia Veterinária da ESAM** com os quais aprendi muitas lições e fizeram-me orgulhoso do exercício prazeroso do ofício do magistério.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo suporte financeiro durante o curso do mestrado em Farmacologia

REFLEXÕES

“Não há nada melhor do que despertar o prazer e o amor pelo estudo; caso contrário, só se formam bons carregadores de livros.”

(Michel de Montaigne)

“Não existe nada de tão errado no mundo. Um relógio parado consegue estar certo pelo menos duas vezes ao dia” (Paulo Coelho)

“Vanita, vanitatum et omnia vanitas”

“As pessoas são solitárias porque constróem paredes ao invés de pontes” (Joseph F. Newton)

“Leais são as feridas feitas pelo que ama, mas os beijos do que odeia são enganosos” (Salomão; Pv.27: 6)

“O perdão é catalisador que cria a ambiência necessária para uma nova partida, para um reinício” (Martin Luther King)

“Para o triunfo do mal, basta que os bons fiquem de braços cruzados” (Albert Camus)

“A terra quanto mais tratada, mais produz: o homem é a terra” (Coelho Netto)

“Ouve o conselho de quem muito sabe; sobretudo, porém, ouve o conselho de quem muito te estima”(A. Graf)

“Se tiveres paciência num momento de raiva, cem dias de pesar evitarás” (Provérbio Chinês)

“Deus me estima quando trabalho, mas me ama quando canto”
(Tagore)

“Ter medo de amar é ter medo da vida; só os mortos são completamente coerentes” (Aldous Huxley)

“Nem sacrificar a liberdade para assegurar a justiça, nem renunciar à justiça para salvar a liberdade”(Cardeal Saliège)

“O rio só atinge seus objetivo porque aprendeu a contornar os obstáculos” (André Luís)

“Dois terços da humanidade não comem e um terço não dorme com medo da revolta daqueles que não comem” (Josué de Castro)

“Se teus filhos são preguiçosos, não merecem tua herança. Se são trabalhadores, não precisam dela. Então, use-a para dar os prazeres da velhice” (Li Yi-King)

“Quem pergunta é bobo por cinco minutos. Quem não pergunta é bobo para sempre” (Confúncio)

“ Memento, homo, in pulveris es est in pulverin reverteris”

“Aquele que entre vós for o menor de todos, esse é que é o grande.
(Lucas, 9:48)

SUMÁRIO

Agradecimentos	iv
Reflexões	ix
Lista de Figuras	xvii
Lista de Abreviaturas	xx
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 DIARRÉIA NOSOCOMIAL	01
1.1.1 Aspectos gerais	01
1.2 DIARRÉIA INFECCIOSA NA MEDICINA VETERINÁRIA	07
1.3 <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	08
1.3.1 Histórico	08
1.3.2 Epidemiologia	09
1.3.3 Microbiologia	11
1.3.4 Caracterização molecular dos genes das toxinas do <i>Clostridium difficile</i>	12

1.3.5 Caracterização bioquímica das toxinas do <i>Clostridium difficile</i>	13
1.3.6 Fisiopatologia	15
1.4 EFEITOS BIOLÓGICOS DAS TOXINAS DO <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	17
1.4.1 Mecanismos de ação das toxinas do <i>C. difficile</i>	17
1.4.2 Estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> das atividades biológicas das toxinas do <i>C. difficile</i> .	19
1.4.3 Participação de células inflamatórias na fisiopatologia diarreica induzida pelo <i>C. difficile</i>	22
1.4.4 Efeito monoglicolizante sobre Rho proteínas	26
1.4.5 Atividade da toxina A no sistema nervoso entérico	27
2. OBJETIVOS	30
2.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO	30
2.2 OBJETIVOS GERAIS	31
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	33
3.2 TOXINAS	33

3.3. DROGAS E REAGENTES	34
3.4 ALÇA INTESTINAL ISOLADA DE COELHO	35
3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	36
3.5.1 Curvas dose-resposta e tempo-efeito	37
3.5.2 Modulação farmacológica	37
3.6 HISTOPATOLOGIA	39
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4. RESULTADOS	41
4.1 CURVA DOSE-RESPOSTA	41
4.2 CURVA TEMPO-EFEITO	41
4.3 MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA	42
4.3.1 Efeito do inibidor de fosfolipase A ₂ e de citocinas sobre a secreção intestinal induzida pela toxina A do <i>C. difficile</i> em íleo de coelho	42
4.3.2 Efeito do inibidor específico de fosfolipase A ₂ sobre a secreção intestinal induzida pela toxina A do <i>C. difficile</i> em íleo de coelho	43
4.3.3 Participação de mediadores inflamatórios derivados da lipooxigenase no evento secretório promovido pela toxina A do <i>Clostridium difficile</i> em íleo de coelho, <i>in vivo</i>	43
4.3.4 Investigação do envolvimento de ambas as isoformas da enzima ciclooxigenase (COX 1 e 2) sobre a secreção intestinal induzida pela toxina a do <i>c. difficile</i> em alça isolada de coelho	44
4.3.5 Ação inibitória de drogas antagonistas da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) sobre a secreção intestinal induzida pela toxina A do <i>C. difficile</i> em íleo de coelho	44
4.3.7 Pré-tratamento concomitante entre um inibidor de COX-2 (celecoxibe) e um antagonista de TNF- α (pentoxifilina) sobre a secreção	

intestinal induzida pela toxina A do <i>C. difficile</i> em íleo de coelho.	45
4.3.8 Associação farmacológica entre um inibidor específico de COX-2 (celecoxibe) e um bloqueador de ciclooxigenase (indometacina) sobre a secreção intestinal induzida pela toxina A do <i>C. difficile</i> em íleo de coelho	46
4.4 HISTOPATOLOGIA	57
4.4.1 Efeito da solução controle (PBS) na morfologia ileal sem tratamento com toxina A.	57
4.4.2 Alterações morfológicas, em íleo de coelho, induzidas pelo pré-tratamento de toxina A (1,0 µg/ml) do <i>Clostridium difficile</i> .	57
4.4.3 Ação da dexametasona (0,5 mg/kg; s.c.) no efeito secretório induzido pela toxina A (1,0 µg/ml) em íleo de coelho.	57
4.4.4 Efeito de um inibidor específico de fosfolipase A ₂ sobre a morfologia ileal após exposição à toxina A	58
4.4.5 Alterações histológicas no íleo de coelho sob pré-tratamento com indometacina (inibidor de COX-1 e COX-2) com exposição posterior à toxina A (1,0 µg/ml)	58
4.4.6 Ação histopatológica da toxina A com tratamento prévio dos animais experimentais com meloxicam (droga antiinflamatória específica a COX-2)	58
4.4.7 Efeito de um inibidor seletivo de ciclooxigenase-2, celecoxibe, na constituição morfológica de íleo de coelho injetado com toxina A	59
4.4.8 Alterações na morfologia normal de íleo de coelho diante de uma associação farmacológica entre celecoxibe e uma droga inibidora de transcrição para TNF-alfa (pentoxifilina)	59
4.4.9 Modulação farmacológica no efeito enterotóxico da toxina A (1,0 µg/ml) foi realizada pela associação de duas drogas antiinflamatórias celecoxibe e indometacina	59

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Gráfico demonstrativo da curva dose-resposta da toxina A do *Clostridium difficile* em íleo de coelho em tempo de 18 horas. 47
- FIGURA 2.** Gráfico da cinética tempo-efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na dose de 1,0µg/ml em íleo de coelho. 48
- FIGURA 3.** Modulação farmacológica com antiinflamatório esteróide (dexametasona) 49
- FIGURA 4.** Pré-tratamento com bloqueador específico de fosfolipase A₂ (quinacrina) em alça isolada de coelho 50
- FIGURA 5.** Grupo de animais pré-tratados com inibidor de lipooxigenase (montelucaste sódico). 51
- FIGURA 6.** Estudo da participação de ambas as isoformas de ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) nos eventos inflamatórios induzidos pela toxina A em íleo de coelho. 52
- FIGURA 7.** Efeito inibidor de antagonistas específicos (celecoxibe e meloxicam) da COX-2 em íleo de coelho, *in vivo*. 53
- FIGURA 8.** Estudo da participação de TNF- α nos fenômenos secretórios promovidos pela toxina A do *C. difficile* em alça isolada de coelho. 54
- FIGURA 9.** Pré-tratamento concomitante de drogas inibidoras, em diferentes graus de especificidade, de COX na secreção intestinal induzida pela toxina A do *C. difficile*. 55

leucotrienos, nas modificações na estrutura ileal no intuito de investigar possível citoproteção induzida pela droga

5. DISCUSSÃO	71
5.1 ATIVIDADE ENTEROTÓXICA DA TOXINA A DO <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	71
5.2 CURVAS DOSE-RESPOSTA E TEMPO EFEITOS DA TxA EM ÍLEO DE COELHO	72
5.3 MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA COM DROGAS ANTIINFLAMATÓRIAS EM ALÇA ISOLADA DE COELHO	73
5.4 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DO EFEITO ENTEROTÓXICO DA TOXINA A EM ÍLEO DE COELHO	80
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
8. ANEXOS	124

- FIGURA 10. Modulação farmacológica do pré-tratamento com um inibidor específico de COX-2 e de TNF- α em alça intestinal isolada de coelho. 56
- FIGURA 11. . Íleo de coelho tratado com solução controle (PBS) sem a presença da toxina A 61
- FIGURA 12. Íleo de coelho com injeção apenas de toxina A do *Clostridium difficile* com recuperação das alças após 18 horas 62
- FIGURA 13. Lâminas de íleo de coelho após pré-tratamento com antiinflamatório esteróide (dexametasona; 0,5 mg/kg; s.c.) 63
- FIGURA 14. Corte histológico de alça de coelho onde os animais foram pré-tratados com um inibidor específico de fosfolipase A₂ (quinacrina; 20 mg/kg; s.c.) 64
- FIGURA 15. Íleo de coelho submetido ao pré-tratamento com inibidor inespecífico de ciclooxigenase (indometacina; 2,0 mg/kg; s.c.) e após injeção intraluminal de toxina A (1,0 μ g/ml; 18 horas) 65
- FIGURA 16. Alça intestinal de coelho pré-tratado com droga antiinflamatória inibidora seletiva de COX-2 (meloxicam; 20 mg/kg; v.o.) com posterior exposição à toxina A (1,0 μ g/ml; 18 horas) 66
- FIGURA 17. Íleo de coelho pré-tratado com inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe (20 mg/kg; v.o.) a após exposição à toxina A (1,0 μ g/ml; 18 horas). 67
- FIGURA 18. Alça intestinal mostrando corte histológico ileal com

tratamento prévio antiinflamatório adotando associação entre um inibidor específico de COX-2 (celecoxibe; 20mg/kg; v.o.) e inibidor de transcrição de RNAm para TNF- α (pentoxifilina; 50mg/kg; s.c.), após exposição à toxina A (1,0 μ g/ml; 18 horas) 68

FIGURA 19. Íleo após pré-tratamento antiinflamatório com associação entre um inibidor específico de COX-2 (celecoxibe) e indometacina), após exposição à toxina A (1,0 μ g/ml; 18 horas) 69

FIGURA 20. Íleo de coelho pré-tratado com inibidor de síntese de leucotrienos (montelucastesódico) a fim de se saber a participação de derivados da lipooxigenase no processo de secreção intestinal 70

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l	microlitros
ATP	Adenosina Tri-Fosfato
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CELOX	Celecoxibe
Cl ⁻	Cloreto
COX	Ciclooxygenase
DAINEs	Drogas Antiinflamatórias não-esteróides
DEXA	Dexametasona
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
i.c.	Intracardiaca
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-8	Interleucina-8
INDO	Indometacina
K ⁺	Íon potássio
kDa	kilo Daltons
LPS	Lipopolissacarídeo
LOX	Lipooxygenase
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MELOX	Meloxicam
mEq/l	Miliequivalente/litro
MIP-2	Proteína Inflamatória do Macrófago-2
MONTE	Montelucaste sódico
Na ⁺	Íon sódio
PAF	Fator de Agregação Plaquetária
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PENTOX	Pentoxifilina
pH	Potencial de hidrogênio iônico
QUINA	Quinacrina
r.p.m.	Rotações por minuto
RNA _m	RNA mensageiro
TxA	Toxina A
TxB	Toxina B
UDP	Uridina di fosfato
UDP-Glc	Uridina difosfoglicose
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

RESUMO

O *Clostridium difficile* é um bacilo anaeróbio presente na microbiota intestinal tanto do homem quanto de animais domésticos. Tal microrganismo é responsável por doenças diarreicas (notoriamente um quadro de colite pseudomembranosa), associadas ao uso indiscriminado de antimicrobianos, principalmente em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva por períodos prolongados. Vários eventos pró-inflamatórios induzidos por suas duas toxinas (A e B), ainda não estão completamente elucidados. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos enterotóxicos induzidos pela toxina A do *Clostridium difficile* em íleo de coelho. O modelo experimental utilizado foi o de alça isolada onde coelhos Nova Zelândia, de ambos os sexos, pesando 1,5-2,5 kg, foram mantidos em jejum de 24 horas, com água *ad libitum*. Os animais foram sacrificados para a recuperação do fluido intestinal e determinação da taxa de secreção ($\mu\text{l}/\text{cm}$) dada pela razão entre o volume do fluido recuperado (μl) e o comprimento da alça (cm). Após a obtenção das curvas dose e tempo-efeito, outros grupos de animais foram submetidos à modulação farmacológica através do tratamento prévio com várias drogas antiinflamatórias. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média e analisados por ANOVA, teste de Bonferroni. Os resultados evidenciaram que o aumento na secreção intestinal mostrou-se significativa a partir da dose de $1,0\mu\text{g}/\text{ml}$ da toxina A ($\text{TxA}=1070,7 \pm 122,9 \mu\text{l}/\text{cm}$ Vs $\text{PBS}=95,9 \pm 44,9 \mu\text{l}/\text{cm}$; $p<0,05$; $n=16$) e do tempo de 12 horas após a sua administração ($\text{TxA}= 673,6 \pm 118,11 \mu\text{g}/\text{ml}$; $n= 10$; $p<0,05$), obtendo efeito máximo em 18 horas ($\text{TxA}= 1070,7 \pm 122,90 \mu\text{l}/\text{cm}$, $n=12$; $p<0,05$). Um antiinflamatório clássico, dexametasona, inibiu de maneira mais significativa as taxas de secreção intestinal, perfazendo 83% de bloqueio ($\text{DEXA}= 172,3 \pm 37,0$ Vs. $\text{TxA} 1034,9 \pm 93,0 \mu\text{l}/\text{cm}$; $n = 15$; $p<0,05$). O celecoxibe, por sua vez, sendo uma droga mais seletiva para COX-2, proporcionou um bloqueio de 56% da secreção

intestinal: CELOX= $451,0 \pm 91,6$ Vs. TxA $1034,9 \pm 93,0$ $\mu\text{l}/\text{cm}$; n = 20; $p < 0,05$. Foi demonstrado, também, que os leucotrienos não participam de modo efetivo dos eventos secretórios, já que o pré-tratamento com montelucaste sódico não alterou, significativamente, a taxa de secreção quando comparada ao grupo não tratado (MONTE= $702,2 \pm 106,4$ Vs TxA $1034,9 \pm 93,0$ $\mu\text{l}/\text{cm}$). O pré-tratamento com a associação entre drogas antiinflamatórias não contribuiu no aumento do sinergismo farmacológico esperado, levando somente a um bloqueio parcial nos grupos estudados com indometacina + celecoxibe (INDO + CELOX= $421,7 \pm 60,0$ Vs. TxA $1034,9 \pm 93,0$ $\mu\text{l}/\text{cm}$; n = 13) e celecoxibe + pentoxifilina (PENTOX + CELOX= $539,7 \pm 76,5$ Vs. TxA $1034,9 \pm 93,0$ $\mu\text{l}/\text{cm}$; n = 23). Alterações morfológicas intensas foram observadas na estrutura da mucosa ileal sob diversos graus de severidade, variando de acordo com a inibição enzimática para COX-2. Os resultados sugerem, pois, que a atividade secretória da toxina A do *Clostridium difficile* seja dose e tempo dependente. É proposto, também, a participação efetiva de prostaglandinas, comprovada pelos bloqueios parciais de antiinflamatórios mais seletivos para COX-2, mas não de leucotrienos, na indução da atividade secretória induzida pela toxina A. Esta toxina é responsável por causar lesões teciduais na mucosa intestinal como destruição das vilosidades, infiltração neutrofílica e aumento considerável na secreção intestinal.

ABSTRACT

Clostridium difficile is an anaerobic bacterium present at human and domestic animals intestinal microbiota. This microorganism is recognized to be responsible for an antibiotic-associated pseudomembranous colitis commonly in patients under an intense long-term antimicrobial therapy. Several proinflammatory events induced by its toxins A and B are not clear yet. On the other hand, many reports have been demonstrated a better comprehension about those mechanisms. The aim of this work was to investigate the enterotoxic effects induced by *Clostridium difficile* toxin A in rabbit ileum. The experimental model used was ligated intestinal loops, *in vivo* which male and female New Zeland rabbits (1.5-2.5 kg) were fasted 24 hours before the experiments with water *ad libitum* only. Animals were euthanized to recover the intestinal fluid and determine the intestinal secretion rate by fluid volume (μl) over loop length (cm), expressed in $\mu\text{l}/\text{cm}$. After dose and time-effect curves plotting, other groups of animals were pretreated using many anti-inflammatory drugs. The data has been shown as mean \pm SEM and analyzed by ANOVA (Bonferroni test). Results demonstrated increase in intestinal secretion rates since the dose of $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ (TxA= $1070,7 \pm 122,9 \mu\text{l}/\text{cm}$ Vs PBS= $95,9 \pm 44,9 \mu\text{l}/\text{cm}$; $p<0,05$; $n=16$) as well as in time of 12 hours (TxA= $673,6 \pm 118,11 \mu\text{g}/\text{ml}$; $n=10$; $p<0,05$) after toxin A injection, it obtaining maximal effect in 18 hours (TxA= $1070,7 \pm 122,90 \mu\text{l}/\text{cm}$, $n=12$; $p<0,05$). Dexametasone, a classical anti-inflammatory drug was able to block secretion significantly (DEXA= $172,3 \pm 37,0$ Vs. TxA $1034,9 \pm 93,0 \mu\text{l}/\text{cm}$; $n=15$; $p<0,05$; 83%). Celecoxib, on the other hand, blocked 56% of intestinal secretion rate. It was also demonstrated that leukotriens do not participate, effectively, in the secretory events because the treatment with monteluçaste sodico did not alter the secretion rate (MONTE= $702.2 \pm 106,4$ Vs TxA $1034.9 \pm 93,0 \mu\text{l}/\text{cm}$). The

pretreatment with association involving two anti-inflammatory drugs did not contribute to pharmacological synergism increase hoped. It had driven to partial blockage in the studied groups with indomethacin and celecoxib (INDO + CELOX= $421,7 \pm 60,0$ Vs. TxA $1034,9 \pm 93,0$ $\mu\text{l}/\text{cm}$; n = 13) and celecoxib + pentoxifyline (PENTOX + CELOX= $539,7 \pm 76,5$ Vs. TxA $1034,9 \pm 93,0$ $\mu\text{l}/\text{cm}$; n = 23). Severe tissue-damaging changes were observed into the ileal mucosa structure under many degrees of severity according to the COX-2 selective enzymatic inhibition. Therefore, these data suggest that secretory activity of *Clostridium difficile* toxin A was a dose and time-dependent process. It was also proposed the effective participation of prostaglandins (as showed in partial blockage featured by COX-2 most selective anti-inflammatory drugs), but not leukotriens, in the secretory activity induced by toxin A. This toxin is capable to promote several damages in intestinal mucosa as villi destruction, neutrophil infiltration and intense increase in the intestinal secretion.

1. INTRODUÇÃO

1.1 DIARRÉIA NOSOCOMIAL

1.1.1 ASPECTOS GERAIS

A alta taxa de doenças diarreicas no nosso meio, principalmente em ambientes populosos, sem rede de saneamento básico e educação sanitária adequadas, levanta questões sobre o diagnóstico etiológico, fisiopatologia e tratamento efetivo. A diarreia torna-se, então, ameaçadora à vida quando fatores do hospedeiro e do ambiente impedem o pronto estabelecimento de terapêutica e profilaxia adequadas, sendo, também, uma das principais causas de morbidade e mortalidade no nordeste brasileiro (LIMA e cols., 1993; GUERRANT, 1994; SEARS & KAPER, 1996).

Diante de sua magnitude, os fenômenos diarreicos são alvos de constantes e incansáveis pesquisas que visam a estabelecer um diagnóstico eficaz e a traçar um plano terapêutico que venha a restabelecer o equilíbrio fisiológico, tanto no homem quanto em animais domésticos.

A incidência de doenças diarreicas em leitos hospitalares alcança índices que podem variar de 2,3 a 6,8%, dependendo de inúmeros fatores intrínsecos a esta problemática (longos períodos de internação, aspectos alimentares, terapia medicamentosa), os quais têm sido alvo de pesquisas envolvendo várias classes de profissionais de saúde, tornando-se um sério agravo à saúde pública mundial. (KELLY e cols., 1983; CAINES e cols., 1997).

É estimado que de apenas 5 a 10% dos leitos hospitalares encontrem-se destinados a Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), onde os altos índices de infecções nosocomiais em pacientes alojados nestas unidades alcançam cerca de 20% dos casos de infecção adquiridas em hospitais (BROWN e

cols., 1995). As infecções adquiridas em hospitais mais frequentes incluem pneumonia, infecção do trato urinário, e, principalmente, doenças diarreicas, principalmente as de cunho persistente, de diversas etiologias e de diferentes aspectos epidemiológicos (LIMA e cols., 1988; WEINSTEIN, 1991; LIMA., 2000).

Esse alto índice estatístico reflete as diferentes definições de diarreia empregadas nos vários estudos realizados nos últimos anos. Cerca de 1/3 dos pacientes que se encontram internados em UTIs desenvolvem diarreia a qual estão atreladas as condutas médicas, tanto na administração indiscriminada de medicamentos quanto nas condições gerais de manejo e de higiene das instalações hospitalares (RINGEL e cols., 1995; BURKE & CUNHA, 1998; MILLER e cols., 1998).

Pacientes muito idosos encabeçam o grupo de indivíduos que apresentam o maior risco para o acometimento de doença diarreica nosocomial. Diante deste fato, vários estudos revelaram relativo risco de acometimento de diarreia associada ao *Clostridium difficile*, por exemplo, em pacientes entre 41 e 60 (5.8%), e entre pacientes de 61 a 95 anos (9.6%) (TREOLAR e cols., 1987; McFARLAND e cols., 1990; TALLEY e cols., 1994; DUPONT, 1997).

As causas infecciosas de diarreia nos hospitais são comumente associadas ao *Clostridium difficile*, diferentes das etiologias de outros patógenos diarreicos não-nosocomiais tais como *Escherichia coli* enterotoxigênica e enteropatogênica, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, dentre outros (FEKETY e cols., 1993; PETERSON e cols., 1993; GERDING e cols., 1993; LIMA e cols., 1997).

Contudo, os índices de infecção nosocomial também alcançam dados que denotam a participação de *Salmonella* como agente causador de

diarréia em âmbitos hospitalares nos surtos reportados de gastroenterite nosocomial (STAMM e cols., 1981; HUGHES & JARVIS, 1987).

Outros agentes infecciosos constituem agravos a pacientes hospitalizados, como por exemplo o gênero *Cryptosporidium* ao qual podem estar associados casos de diarréia nosocomial envolvendo doenças de caráter crônico, pacientes muito idosos e pacientes soropositivos ao HIV. Em crianças e em indivíduos imunocomprometidos, os agentes virais (rotavirus, adenovirus, coxsackievirus, dentre outros) freqüentemente alimentam problemáticos dados acerca de etiologias referentes à diarréia nosocomial não associadas ao *Clostridium difficile* (WELLIVE & McLAUGHLIN, 1984; ALPERT e cols., 1984; GUERRANT e cols., 1990; NEILL e cols., 1996).

Um longo período de internação em leitos hospitalares constitui um sério risco ao aumento na probabilidade do desenvolvimento de infecção nosocomial, assim como a uma maior exposição a medicações, incluindo antibióticos (McFARLAND, 1993).

Para propósitos práticos, parâmetros de duração das doenças diarreicas nas UTIs, bem como as características das fezes podem ser usadas para aplicar um diagnóstico diferencial e para direcionar, através da história médica, a avaliação de pacientes com diarréia (SILLETTI e cols., 1996; LAWRENCE & SCHILLER, 2000). Baixas taxas de albumina refletem a severidade da doença e provavelmente contribuem para o aumento nos índices de diarréia pela diminuição da absorção de nutrientes (BRINSON & KOLTS, 1987).

Em pacientes internados em UTIs, a alimentação enteral vem sendo apontada como uma significativa causa de diarréia nosocomial. A diarréia, neste caso, é secundária ao aumento da osmolaridade das fórmulas alimentares administradas. O manejo do paciente acometido de diarréia relacionado à alimentação enteral pode se tornar, particularmente,

problemático. Mudanças na osmolaridade das fórmulas, taxa de administração, conteúdo de gordura, temperatura, quantidade de lactose, peptídeos, aminoácidos e de fibra, assim como as técnicas de preparo, podem ser alternativas viáveis a fim de amenizar as incidências de diarreia derivadas deste tipo de alimentação (RINGEL e cols., 1995; THOMPSON e cols., 1999).

Várias medicações desempenham um importante papel ao causar diarreia. Por exemplo, o sorbitol, comumente usado como um ingrediente em medicações livres de açúcar, como o elixir de teofilina, pode causar diarreia (HYAMS, 1983; HILL e cols., 1991). Outras drogas associadas à diarreia comumente encontradas nos prontuários de pacientes internados em UTIs são antagonistas de receptores histamínicos H₂, antiácidos contendo magnésio, beta bloqueadores, digoxina, inibidores da ECA, hidralazina, teofilina e antibióticos (TERDIMAN, 1996).

Dentre as medicações, os antibióticos desempenham um papel-chave na gênese da doença diarreica associada ao *Clostridium difficile*, assim como outros tipos de enterites, sendo responsáveis por cerca de 20 a 50% dos casos de diarreia nosocomial (VICENT e cols., 1995).

Pacientes hospitalizados, especialmente aqueles sob terapia antibiótica, são os alvos primários para infecção provocada pelo *C. difficile*. Um percentual variando entre 5 a 38 % de pacientes recebendo antibioticoterapia foi acometido por diarreia associada a antibióticos, sendo o *C. difficile* o agente etiológico presente em cerca de 15 a 20 % desses casos (AL-EIDAN, 2000).

Além dos clássicos antibióticos de largo espectro causadores de diarreia nosocomial, como por exemplo, vancomicina, tetraciclina, a infecção do *C. difficile* também tem sido causada por inibidores de β-lactamase (ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam) e agentes administrados por via intravenosa que atingem substanciais concentrações

intraluminais no cólon (cefalosporinas, nafcilina, oxacilina); fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, vancomicina e trimetoprim são, também, associados à infecção por *C. difficile* (FEKETY e cols., 1997; SPENCER, 1998; CHURCH, 1998).

Alguns antibióticos (eritromicina, claritromicina, ou amoxicilina/ácido clavulânico) causam diarreia de cunho irritativo, devido às altas concentrações intraluminais, por serem pobremente absorvidos, ou por mudanças na flora intestinal. A associação amoxicilina/ácido clavulânico resulta frequentemente em alterações gastrointestinais, bem como em diarreia causada pelos componentes individuais dessa associação antibiótica. Ceftriaxona altera significativamente a flora em indivíduos e leva à diarreia em mais de 50% das crianças, mas em menor frequência em adultos (PETERSON e cols., 1993; BUKE & CUNHA, 1998).

Os casos de diarreia nosocomial que não se relacionam com *C. difficile* são provavelmente causados por um efeito direto de antibióticos sobre a motilidade intestinal e por redução na fermentação de carboidratos no intestino (CLAUSEN e cols., 1991; EHERER & FORDTRAN, 1992).

O *C. difficile* forma esporos resistentes ao calor que podem persistir no ambiente por meses ou anos. A ingestão desses esporos, que são abundantes nos leitos hospitalares, leva a colonização através da via fecal-oral (TABIBIAN, 1989).

O espectro da infecção do *C. difficile* inclui portadores assintomáticos, diarreia autolimitada, usualmente aquosa de média a moderada nos estágios iniciais da doença (KELLY e cols., 1994). A doença, no entanto, pode progredir a colite, especialmente se a antibioticoterapia for contínua ou se agentes antimotilidade forem administrados. Colite pode ocorrer com profusa diarreia que normalmente não é sanguinolenta. Quadros de leucocitose, alcançando níveis de uma reação do tipo leucose,

pode ser observada e às vezes como manifestação sistemática da infecção (LYERLY & WILKINS, 1995; HYLAND e cols., 1998).

Cerca de 15 a 70% dos neonatos são portadores de *C. difficile*, porcentagem esta que varia como resultado do grau de exposição hospitalar, nascimento no meio onde *C. difficile* é abundante, ou se o neonato obteve anticorpos maternos através da amamentação. Embora neonatos sejam portadores mais freqüentes de *C. difficile*, geralmente não desenvolvem quadros intestinais, exceto quando desordens de motilidade gastrointestinal ou outras condições (severa neutropenia com leucemia) estejam presentes para aumentar os fatores de risco. A resistência neonatal ao *C. difficile* pode ser devido à inabilidade das toxinas se ligarem à mucosa do recém-nascido, por causa dos imaturos receptores de membrana para as toxinas, ou pela proteção adquirida por anticorpos maternos (REINKE e cols., 1994).

Cerca de 50% dos neonatos têm seus intestinos colonizados por *C. difficile*, porém com uma proteção inerente à toxina A; uma vez que a flora intestinal esteja estabelecida, *C. difficile* não é prevalente. Seu achado em fezes atinge índices de apenas 3% em adultos normais, contudo, quando um quadro infeccioso é instaurado, e o uso de antibióticos é imperativo, tem-se como resultante um estado que pode variar de assintomático, diarreia de média magnitude que pode culminar em colite pseudomembranosa, podendo levar o indivíduo a sepse ou à morte (SILVA, 1994; CONLY, 2000).

Um procedimento-chave na avaliação de um paciente internado em UTI com diarreia seria determinar se a diarreia é de caráter infeccioso ou não-infeccioso. Nenhum sinal ou sintoma é confiável nesta condição, cabendo ao exame de fezes uma confirmação diagnóstica mais precisa. De pacientes que têm sido tratados, há pelo menos três meses com antibióticos, ou aqueles que desenvolveram diarreia em leitos hospitalares devem ser

enviadas amostras de fezes para mensuração de toxina de *Clostridium difficile* (BOBAK, & GUERRANT, 1992; BRAR, 2000).

A prevenção de infecções nosocomiais, principalmente aquelas provocadas pelo *C. difficile*, requer redução da doença associada a antibióticos, minimizando as terapias que requerem altas doses, longa duração ou concomitância de antibióticos. A redução da transmissão da doença depende do isolamento dos portadores, pacientes sintomáticos e minimização da transmissão paciente-a-paciente. A desinfecção dos equipamentos de endoscopia com glutaraldeído alcalino por 20 minutos, destrói os esporos bacterianos, diminuindo a população desses microrganismos (GROSCHER e cols., 1996; BARBUT, 1996).

1.2. DIARRÉIA INFECCIOSA NA MEDICINA VETERINÁRIA

Na Medicina Veterinária, as doenças diarreicas podem ser causadas por microrganismos invasivos, tais como, *Salmonella sp* (*S. dublin* em bezerros; *S. typhisuis*, em leitões; *S. typhimurium* nas outras espécies domésticas e no homem), *Shigella sp* e *Campylobacter sp* (*C. jejuni* em cães novos; *C. hyointestinalis*, agente etiológico da “ileíte proliferativa”, em suínos) ou por agentes que elaboram e secretam toxinas lesivas para o epitélio intestinal, como por exemplo, o *Clostridium difficile* e a *Escherichia coli* enterohemorrágica que de uma forma ou de outra, promovem uma destruição do revestimento mucoso do intestino com o conseqüente aparecimento de sangue, serosidade e leucócitos nas fezes (BARRET, 1992; CORRÊA & CORRÊA, 1992; GUERRANT, 1994; SEARS & KAPER, 1996; SACK e cols., 1997).

As clostridioses diarreicas, mais especificamente aquelas causadas pelo *Clostridium difficile*, são importantes agentes etiológicos de diarréia em cavalos adultos e em potros, assim como em outras espécies de animais

domésticos, como cães e gatos, por exemplo. Além disso, mudanças na flora intestinal de cavalos acometidos com cólica podem favorecer a proliferação de *C. difficile*, assim como de *Clostridium perfringens*, com posterior elaboração de enterotoxinas ao desenvolvimento do quadro de diarreia, associada à intensa antibioticoterapia (SAVILLE e cols., 1996; BAVERUD e cols., 1997; EAST e cols., 1998; DONALDSON & PALMER, 1999).

A diarreia não-inflamatória acomete usualmente o intestino delgado e, em geral, é provocada por vírus (*Rotavirus*, *Coronavirus*, *Pestivirus* e *Parvovirus*), protozoários (*Eimeria stiedae*, *Isospora sp*, *Giardia canis*, *Entoameba*, *Cryptosporidia*, ou *Cyclospora*) ou por bactérias produtoras de enterotoxinas, onde se tem como exemplo, o *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens* (enterite necrótica hemorrágica por *C. perfringens* tipo C em bezerros e suínos; desintéria dos cordeiros, *C. perfringens* tipo B e tipo D), *Bacillus cereus* e *E. coli* enterotoxigênica (neonatos, bezerros, potros, borregos, leitões e cães) (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Esses microrganismos aderem ao epitélio do intestino, mas não o rompem nem causam lesões importantes, não havendo assim, uma destruição comprometedora na mucosa intestinal nem a presença de leucócitos nas fezes (AVERY e cols., 1992; BOBAK & GUERRANT, 1992).

1.3 CLOSTRIDIUM DIFFICILE

1.3.1 HISTÓRICO

Historicamente, sua primeira evidência fora relatada, por Finney, em uma paciente a qual apresentara um quadro de colite fatal, em meados de 1893. Posteriormente, em 1935, Hall e O'Toole ao estudarem a flora

intestinal de recém-nascidos, descreveram um microrganismo desconhecido o qual recebera a denominação inicial de *Bacillus difficilis* e conseqüentemente de *Clostridium difficile* (LYERLY e cols., 1988).

O *Clostridium difficile* possui seu nome cunhado deste modo devido ao fato de sua dificuldade de isolamento e manutenção em meios de cultura puros. Sua importância, porém, tornara-se mais evidente após o aparecimento de casos de colite pseudomembranosa em pacientes submetidos a planos terapêuticos antimicrobianos às custas de antibióticos ativos contra anaeróbios, tendo a lincomicina, um agente bastante focado nessa casuística (GEORGE e cols., 1978; LARSON e cols., 1978; LYERLY e cols., 1988; KELLY & POUTHOLAKIS, 1994).

A partir do final da década de setenta, o processo fisiopatológico desencadeado pelo *C. difficile*, notadamente o quadro de colite pseudomembranosa, tornou-se uma problemática indigesta à saúde pública mundial onde nos Estados Unidos, cerca de 25% de pacientes hospitalizados em leitos de terapia intensiva são hospedeiros desta bactéria (RUBIN e cols., 1995; STARR e cols., 1997).

Atualmente, há numerosos trabalhos relatando a questão de doenças intestinais associadas ao uso de antimicrobianos as quais o *C. difficile* enquadra-se na principal vertente etiológica, variando desde diarréia leve até colite severa e fatal. No Brasil, estudos símiles desenvolvidos por Lima e colaboradores atestam esta condição em estudos realizados no Hospital Universitário Walter Cantídio, em Fortaleza, Ceará, relatando a existência de uma freqüência quase que endêmica de diarréia nosocomial em pacientes hospitalizados (LIMA e cols., 1993; SEARS & KAPER, 1996).

1.3.2 EPIDEMIOLOGIA

O *Clostridium difficile* tem sido isolado do solo, areia, feno, e estrume animal, reconhecido como a mais importante causa de diarreia infecciosa que ocorre em pacientes hospitalizados em países desenvolvidos. No entanto outros fatores estão envolvidos, tais como idade, e infecções secundárias. A introdução de métodos de tipificação do *C. difficile* tem demonstrado a existência da aquisição hospitalar e infecção cruzada por esse bacilo, sendo importante para compreensão geral de sua epidemiologia no contexto das doenças diarreicas (LYERLY e cols., 1988; BARBUT e cols., 1996; JUMAA, 1996; SAMORE, 1999).

O *C. difficile* é alvo de incansáveis investigações, principalmente em países desenvolvidos e em desenvolvimento onde há engajamento de muitos pesquisadores no sentido de estudar os aspectos imunológicos, microbiológicos, e epidemiológicos desse patógeno, assim como de outros microrganismos anaeróbios maculadores da saúde pública mundial (BERN, 1992; HIRSCHHORN e cols., 1994; BIANCHINI, 1997).

Outros fatores de risco devem ser considerados no tocante aos aspectos epidemiológicos da infecção por *C. difficile*, tais como: idade avançada, severidade de doenças subclínicas, procedimentos gastrointestinais não-cirúrgicos, presença de tubo nasogástrico, medicações antiulcerativas, permanência por longos períodos em UTIs hospitalares, duração da antibioticoterapia, administração de múltiplos e concomitantes antibióticos. Por outro lado, antibióticos associados ao baixo risco de contaminação pelo *C. difficile* devem ser considerados especialmente quando se tenta controlar um surto de diarreia via *C. difficile* ou quando se prescreve um paciente com outros fatores de risco para diarreia por *C. difficile* (BIGNARDI, 1998; SHEK e cols., 2000).

O diagnóstico diferencial de enfermidades que acometem o trato gastrointestinal levando a doenças diarreicas precisa ser considerado. Nesse contexto, o *C. difficile* vem sendo descrito como agente crítico no processo

de disseminação dessas doenças, principalmente do tipo nosocomial, acometendo crianças e adultos (MANABE e cols., 1995).

A mais implicante severidade é a evolução de diarreia de média magnitude a uma colite pseudomembranosa desenvolvida após tratamento com a maioria dos antibióticos de rotina: penicilina, amoxicilina, eritromicina e trimetoprim-sulfametoxazole. Portanto, faz-se mister a mensuração de ambas as toxinas (A e B) elaboradas e liberadas pelo *C. difficile* por serem capazes de induzir graus diversos de complicações tanto ao homem quanto a animais domésticos (KADER e cols., 1998).

1.3.3 MICROBIOLOGIA

O *Clostridium difficile*, um bacilo anaeróbio, obrigatório, Gram - positivo, formador de esporos, é uma das principais causas de diarreia associada a antibioticoterapia, tanto no homem quanto em animais domésticos. Esse microrganismo, encontrado no solo, em ambientes hospitalares e em fezes, é responsável por uma variável gama de síndromes diarreicas, incluindo diarreia inflamatória, colite associada a antibióticos e colite pseudomembranosa, todas as quais variando enormemente em severidade (SETTLE e cols., 1996; STARR e cols., 1997; CASTAGLIOULO & LAMONT, 1999).

A distinção entre o *Clostridium difficile* e outros enteropatógenos até o final dos anos 70 era complicada, contudo George e colaboradores, 1978, desenvolveram uma técnica de isolamento em meio de cultura contendo cicloserina e cefoxitima e frutose em ágar. Métodos outros, como ELISA, cultura de células, contraímuno-eletoforese e aglutinação pelo látex comportam-se como ferramentas essenciais ao diagnóstico do microrganismo e detecção de suas toxinas A e B (VISCIDI e cols., 1981; LYERLY e cols., 1988)

1.3.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES DAS TOXINAS DO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

Embora a toxina A tenha um efeito tóxico direto na mucosa intestinal, a toxina B não causa uma resposta significativa quando administrada intragastricamente em hamsteres. Tais resultados são consistentes com a ligação inicial e dano primário tecidual causado pela toxina A ou pelo mecanismo de injúria, seguidos da ação citotóxica da toxina B (LYERLY e cols., 1985).

Dove e colaboradores (1990) clonaram e sequenciaram o código genético da proteína da toxina A do *Clostridium difficile*. A região de codificação de 8.133 pares de bases possui uma porcentagem de guanina + citosina em torno de 26,9 e codifica 2.710 aminoácidos onde o possível peptídeo tem peso molecular de 308 kDa.

Aproximadamente 1/3 do gene consiste em 38 seqüências repetidas. Tais unidades repetidas foram agrupadas em duas classes, I e II, baseadas no tamanho e nos baixos níveis de seqüências de DNA similares entre elas. O dipeptídeo tirosina-fenilalanina foi encontrado nas 38 unidades repetidas. Na toxina A essas unidades de repetição funcionam como porção de ligação que reconhece o receptor, bem como representam a porção imunodominante da molécula (PRICE e cols., 1987; LYERLY e cols., 1989).

Embora as seqüências repetidas da toxina A não possuam qualquer seqüência símile a organismos patógenos, tais como *Plasmodium*, *Bordetella pertussis* ou *Bacillus thuringiensis*, a localização do terminal carboxílico dessas proteínas é comum onde algumas podem possuir papel semelhante no alvo de ligação à célula do hospedeiro (MILLER e cols.,

1986; FELMLEE & WELCH, 1988; GLASER e cols., 1988; WIDNER & WHITELEY, 1989).

Em um trabalho desenvolvido por Phelps e colaboradores (1990), todas as atividades biológicas da toxina A estudadas- hemoaglutinação, citotoxicidade, enterotoxicidade, e letalidade- foram direcionadas por um simples peptídeo codificado pelo gene 8.1-kb da toxina A.

Banno e colaboradores (1984) determinaram a composição de aminoácidos tanto na toxina A quanto na toxina B onde as quantidades de aspartato, ácido glutâmico e glicerina mostraram-se altas (em %Mol), enquanto que histidina e metionina estavam baixas. As unidades de repetição, na estrutura da toxina B, parecem exercer atividade semelhante à toxina A, embora receptores específicos à toxina B não estejam ainda identificados (BISSERET e cols., 1989; BARROSO e cols., 1990).

Os genes das toxinas os quais estão localizados no cromossomo, parecem ter um controle análogo de expressão. A regulação na produção da toxina é pobremente compreendida, embora pareça envolver uma região de domínio da toxina B onde pode ser a correlação entre as duas toxinas. Cepas que produzam altos níveis de uma toxina, produzem altos níveis da outra; cepas que são fracamente toxigênicas produzem baixos níveis de ambas as toxinas (LYERLY e cols., 1983; TORRES, 1991;).

1.3.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS TOXINAS DO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

O *Clostridium difficile* produz duas toxinas, A e B que compartilham as mesmas características moleculares, refletidas pela alta homologia, em torno de 63%, em suas seqüências de aminoácidos e pelos pesos moleculares similares, 308 kDa e 269 kDa, respectivamente. As moléculas estão estruturalmente organizadas de modo semelhante com, no mínimo,

três domínios de reconhecimento: *a)* o terceiro terminal amino, o qual contém o sítio ativo, *b)* o domínio do terminal carboxílico que contém as unidades repetidas as quais são responsáveis pela ligação à superfície celular e *(c)* um domínio hidrofóbico importante para o processo de translocação. Essa organização molecular parece comum àquela de muitas citotoxinas clostridiais, tais como: a toxina do *Clostridium sordellii*, a qual realiza reação cruzada com a toxina B (FREY e cols., 1992; MARTINEZ e cols., 1992; von EICHEL-STREIBER e cols., 1996).

Ambas as toxinas foram identificadas como hidrolases de uridina difosfoglicose (UDP-Glc) e glicosiltransferases. Em células tratadas com toxinas, uma fração de glicose é liberada da UDP-Glc e se liga covalentemente a aminoácidos nas moléculas-alvo das células (von EICHEL-STREIBER e cols., 1992; JUST e cols., 1995).

As toxinas A e B são responsáveis pelos principais determinantes de virulência do *Clostridium difficile*, *in vivo* e *in vitro*. Além disso, possuem idênticos mecanismos de ação em suas características citotóxicas em vários ensaios *in vitro* (DILLON e cols., 1995).

Uma intrínseca característica dessas toxinas é a natureza de repetições da seqüência de aminoácidos no terminal carboxílico da proteína (BARROSO e cols., 1990; DOVE e cols., 1990). No caso da toxina A, essa região é composta de 38 seqüências repetidas de aminoácidos as quais codificam o domínio e ligação do receptor da toxina A (PRICE e cols., 1987; LYERLY e cols., 1990;).

Uma dessas seqüências repetidas, a classe IIB, é de particular interesse, pois um decapeptídeo conservado nessa repetição, foi demonstrado promover quimiotaxia celular, *in vitro* (WREN e cols., 1991). A toxina A tem sido demonstrada ser o principal mediador do dano tecidual no trato gastrointestinal em experimentos onde a toxina induziu destruição epitelial, característica da infecção por *C. difficile*, através da ligação a

receptores nas células epiteliais do cólon humano, em modelos de câmaras de Üssing (LYERLY e cols., 1985; MITCHELL e cols., 1987; SMITH e cols., 1997).

1.3.6 FISIOPATOLOGIA

A maioria das cepas de *C. difficile* produz toxinas A e B que estão implicadas no processo de desencadeamento das doenças diarreicas e de suas complicações clínicas (TITOV, e cols., 2000).

A flora intestinal uma vez alterada, promove a colonização por *C. difficile* toxigênico, principalmente devido à baixa resistência do organismo do paciente durante terapia indiscriminada de antibióticos, especialmente aquelas representadas por clindamicina, amino-penicilinas, cefalosporinas de segunda e terceira gerações, claritromicina, pristinamicina, e quimioterápicos antineoplásicos com atividade antibiótica. Outros fatores de risco corroboram para o incremento de diarreia induzida por *C. difficile*, tais como: períodos prolongados de internação hospitalar, idade avançada, ou doenças debilitantes e imunossupressoras (JOHNSON e cols., 1998; CLIMO e cols., 1998).

Outros fatores, como a produção de enzimas proteolíticas e hidrolíticas, expressão de fimbrias e flagelos, quimiotaxia e adesão a receptores do intestino, e produção de cápsulas, são fatores de virulência e sobrevivência desenvolvidas pelo *C. difficile*, a fim de facilitar sua colonização e contribuir para o dano tecidual ao enterócito (BORRIELLO, 1998).

Há uma crescente evidência na qual o aumento na permeabilidade intestinal possa ser um mecanismo comum por onde o *C. difficile* penetra no epitélio intestinal. O *C. difficile* induz alterações na barreira intestinal,

facilitando a penetração microbiana no epitélio intestinal, o que viabiliza a translocação das bactérias intestinais (FELTIS, 1999).

A toxina A do *Clostridium difficile* causa, também, uma aguda infiltração neutrofílica e injúria na mucosa intestinal e, em culturas de células, inativa proteínas Rho por um mecanismo de monoglicolisação (DILLION e cols., 1995; POTHOUKAKIS, 1996).

A mais severa expressão clínica de *C. difficile* é a colite pseudomembranosa, uma complicação da diarreia por este patógeno podendo resultar em um quadro de megacólon tóxico, possibilitando levar à perfuração do cólon e resultar em morte. Práticas de controle da infecção são importantes para limitar a disseminação de esporos de *C. difficile*, nos leitos hospitalares, já que são altamente resistentes às condições adversas do ambiente e persistem no hospital por períodos prolongados (KERR e cols., 1990; FEKETTY e cols., 1993; MACLAREN e cols., 1997).

A colite pseudomembranosa é um processo inflamatório caracterizado pela presença de inúmeras lesões, ou pseudomembranas, na superfície da mucosa intestinal. Portanto, o *C. difficile* é responsável pela maioria dos casos de colite pseudomembranosa registrados na literatura (KELLY e cols., 1994; REINKE e cols., 1994; GROSCHEL e cols., 1996).

Quando a necrose e a ulceração se espalham, áreas maiores de fibrina, neutrófilos e restos de células se desenvolvem e formam pseudomembranas. Uma vez que o diagnóstico clínico seja sugestivo, uma confirmação laboratorial é requerida, através da coleta das fezes, preferencialmente aquelas aquosas ou moles. Métodos de detecção direta incluem imuno-ensaios, ensaios de PCR, métodos utilizando sondas moleculares para a presença de toxina A, como também aglutinação reversa passiva em látex (JACOBS e cols., 1996; KATO e cols., 1998; TOMA e cols., 1999; SULTANA e cols., 2000).

O diagnóstico clínico do *C. difficile* é baseado na observação de diarreia inflamatória, e às vezes, sanguinolenta, e evidências endoscópicas de colite pseudomembranosa, porém, detecta apenas uma margem de 50-55% dos casos de colite. Histologicamente, a inflamação aguda resulta em necrose epitelial com um exsudado fibrinoso e neutrofílico que forma uma lesão semelhante a um cogumelo (STANECK e cols., 1996; TYSK, 2000; LUDOLPH & SCHMIDT-WILCKE, 2000;).

1.4 EFEITOS BIOLÓGICOS DAS TOXINAS DO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

1.4.1 MECANISMOS DE AÇÃO DAS TOXINAS DO *C. DIFFICILE*

A toxina A do *Clostridium difficile* é uma potente enterotoxina com peso molecular de 308 kDa, constituída por 2710 aminoácidos, mas com fraca atividade citotóxica, mas que causa uma resposta secretória intestinal significativa, afetando a viabilidade celular pela ruptura de seu citoesqueleto. Também possui um efeito quimiotático sobre neutrófilos, assim como também promove liberação de prostaglandinas e leucotrienos, mediadores contribuintes para o processo inflamatório dessa enfermidade (LIMA e cols., 1988; ROCHA, 1994; ROCHA e cols., 1997; BARTLETT, 1997).

A toxina B, por sua vez, possui peso molecular de 279 kDa, destacando-se como potente agente citotóxico em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Não obstante, essa toxina é incapaz de provocar infiltração de células inflamatórias na mucosa intestinal (LYERLY e cols., 1982, 1988; TAYLOR e cols., 1981; BALDACINI e cols., 1992;).

A toxina B do *Clostridium difficile* é uma toxina monoglicolizante tendo como alvo substratos dentro do citosol das células de mamíferos. Toxina B demonstrou uma variável susceptibilidade à protease V8 do *Staphylococcus aureus*, em pH neutro e ácido, também sugerindo que o pH é agente modificador da estrutura da toxina B (QA'DAN e cols., 2000).

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

As toxinas A e B alteram o citoesqueleto da célula epitelial do intestino através do mecanismo de ruptura dos microfilamentos de actina F. Embora a toxina B seja, 1000 vezes, mais potente em experimentos de cultura de tecidos do que toxina A, não possui atividade secretória em experimentos de alça intestinal em roedores. Portanto, muitos investigadores têm atribuído a colite pseudomembranosa humana à toxina A, porém dados recentes dão conta de que a doença diarreica e suas complicações clínicas se devem a ambas as toxinas A e B, por causa de suas atividades enterotóxicas e citotóxicas, respectivamente (RIEGLER, 1995; GROSSMAN e cols., 2000).

Durante a esporulação do *Clostridium difficile* e subsequente lise celular, as toxinas A e B atuam intracelularmente, ligando-se à superfície celular, alterando a permeabilidade das células epiteliais, promovendo perda do fluido intracelular, resultando, enfim, na morte do enterócito (FLORIN e cols., 1983; HENRIQUES e cols., 1987; SONGER, 1996). A estrutura mínima de receptor para a ligação da toxina A é constituída por α -galactose-N-acetilglicosamina, porém nenhuma estrutura de receptor para toxina B foi ainda identificada (WILKINS & TUCKER, 1989; TENEBERG e cols., 1996; CASTAGLIUOLO e cols., 1996).

A ligação das toxinas A e B a receptores de membrana induz a uma inflamação na mucosa intestinal, promovendo eventos de secreção de um rico exsudado composto de neutrófilos, monócitos e enterócitos descamados, assim como são responsáveis pela ativação de citocinas de monócitos e macrófagos (JOHNSON & GERDING, 1998).

O mecanismo de ação da toxina A inicia-se pela ligação da toxina a receptores no enterócito luminal da borda em escova do íleo de coelho. Glicoproteínas, constituintes de uma proteína, e um trissacarídeo contendo α -d-galactose no domínio de ligação da toxina, são estruturas as quais estão ligadas à proteína G sensível à toxina pertussis (POUTHOULAKIS, 1991).

Foi, também, demonstrado que a isoenzima sucrase-isomaltase da borda em escova do íleo de coelho, se liga especialmente à toxina A em suas cadeias laterais de carboidratos e medeiam efeitos relacionados à toxina em cultura de células e em intestino de coelho, *in vivo*. A toxina A se liga aos domínios de carboidratos da sucrase-isomaltase, e tal ligação é relevante para os mecanismos de sinalização de transdução que medeiam a toxicidade *in vitro* e *in vivo* (POUTHOULAKIS e cols., 1996).

1.4.2 ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS TOXINAS DO *C. DIFFICILE*.

A toxina A interfere no citoesqueleto das células epiteliais intestinais e causa infiltração neutrofílica e dano severo na mucosa em ensaios experimentais com alça intestinal (KETLEY e cols., 1987).

Em modelos experimentais utilizando animais, a administração de toxina A causa intensa secreção de fluido no lúmen intestinal, ruptura das células epiteliais, e uma intensa reação inflamatória (LIMA e cols., 1989). O mecanismo pelo qual essas toxinas causam diarreia não está completamente elucidado, mas foi recentemente descoberto que os maiores

alvos das toxinas são a família de pequenas proteínas G transdutoras de sinais conhecidas como GTPases Rho (BONGAERTS & LYERLY, 1994).

A toxina A, quando administrada em modelos experimentais de alças intestinais isoladas, tanto em ratos quanto em coelhos, leva à liberação de mediadores inflamatórios, tais como: leucotrieno B₄, fator agregador de plaquetas (PAF) e protease de mastócitos de mucosa de ratos II (LAURITSEN e cols., 1988; CASTAGLIOULO e cols., 1994; FONTELES e cols., 1995).

Em estudos experimentais, a toxina A quando administrada intragastricamente, causou secreção hemorrágica de fluidos, inflamação de mucosa, necrose do tecido intestinal e morte dos animais. Por outro lado, a toxina B, também administrada por esta via, não teve efeito intestinal significativo (LYERLY e cols., 1985).

Fiorentini e cols. (1998) evidenciaram que células intestinais expostas à toxina B exibiram características morfológicas típicas de apoptose que é uma forma fisiológica de morte da célula que desempenha um papel chave na homeostase e desenvolvimento celular, mantendo o correto número de células no organismo animal pelo balanceamento no crescimento e morte celulares (MARTINS & EARNSHAW, 1997).

Essas características são alterações morfológicas distintas (diferentes daquelas que caracterizam necrose), tais como: condensação nuclear e fragmentação, redução celular e ausência de inflamação (KRAMER e cols., 1995).

O maquinário bioquímico responsável pela morte apoptótica da célula parece ser constitutivamente expresso na maioria das células, mas não em todas, podendo ser desencadeada por sinais externos e internos. (RICHTER e cols., 1996; EARNSHAW, 1997). De fato, *in vivo*, a apoptose ocorre espontaneamente com mais facilidade no intestino delgado do que

no cólon, provavelmente por causa da ausência de expressão da Bcl-2 (um gene antiapoptótico) no primeiro (POTTEN, 1997).

Rocha e colaboradores (1997) demonstraram que a toxina A é um potente indutor de migração neutrofílica na cavidade peritoneal de ratos e em bolsas de ar subcutâneas, via liberação de IL-1 β , TNF- α e LTB₄. Outros trabalhos também relatam a participação de mediadores importantes no processo inflamatório, tais como TNF- α , fator de agregação plaquetária (PAF), leucotrienos e prostaglandinas, liberados pelos macrófagos (SMITH e cols., 1988; HANGLOW e cols., 1989; CHANG e cols., 1990; CHIOSSONE e cols., 1990; SMITH e cols., 1990; CALDERARO e cols., 1991; KANDIL E COLS., 1992).

Souza e colaboradores (1997) demonstraram que a toxina B, por outro lado, em estudos de estimulação em cavidade peritoneal e bolsas de ar subcutâneas em ratos, foi capaz de induzir intensa migração neutrofílica. Tal evento foi mediado por TNF-alfa derivado de macrófagos e por produtos da lipooxigenase (LOX) onde os grupos de animais foram tratados com drogas inibidoras de lipooxigenase (MK 886), inibidor tanto de COX quanto de LOX (NDGA) e glicocorticóide (dexametasona).

Em outro trabalho deste grupo de pesquisadores, Rocha e colaboradores (2001) demonstraram que a toxina B, ao estimular macrófagos, em experimentos *in vitro*, utilizando câmaras de Üssing, ao contrário da toxina A (ROCHA e cols., 1998), não foi capaz de induzir secreção intestinal, tampouco alterou o transporte iônico eletrogênico em íleo de coelho.

Em um estudo recente, Ciesla Jr. e Bobak (1998), acharam que a atividade enzimática da toxina B, como glicosiltransferase, foi aproximadamente cinco vezes maior do que a da toxina A. Além disso, também concluíram que as toxinas requeriam potássio para atividade hidrolítica e que o potássio ativava a função desta toxina pelo aumento na

velocidade máxima de reação com pequeno efeito na constante de Michaelis para a UDP-glicose. O sódio não foi ativo para sustentar atividade hidrolítica. Essas toxinas também requerem manganês ou magnésio para otimizar a atividade hidrolítica, sendo o Mg^{++} o mais potente ativador (WEDLER, 1993; SCHWEINS e cols., 1997).

HE e colaboradores (2000) estudaram os efeitos da toxina A quanto aos eventos de despolimerização da actina, após sua internalização, e da função mitocondrial antes do arredondamento celular. Para tanto, mensuraram as concentrações de ATP e constataram uma redução no potencial de membrana mitocondrial, como também um aumento nos radicais de oxigênio reativo, confirmando, assim, as propriedades citotóxicas desta toxina bacteriana.

1.4.3. PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NA FISIOPATOLOGIA DIARREICA INDUZIDA PELO *C. DIFFICILE*

Os macrófagos são importantes células atuantes no processo inflamatório, caracteristicamente neste induzido pela toxina A do *Clostridium difficile*. Através da ativação de células de alarme, esses fagócitos sinalizam a presença de corpos estranhos através da elaboração e liberação de muitas substâncias, incluindo citocinas e metabólitos do ácido araquidônico (FERREIRA, 1980; NATHAN, 1987; LASKIN & PENDINO, 1995).

A infiltração neutrofílica na mucosa intestinal em resposta a estímulos inflamatórios é um evento marcante na patogênese de lesões teciduais agudas como, por exemplo, isquemia e infecção. O mecanismo pelo qual os neutrófilos são recrutados para os sítios de inflamação é um fenômeno complexo que envolve expressão de leucócitos, dentre os quais

destacando-se os próprios neutrófilos, e de moléculas de adesão, seguido de ligação e adesão destes neutrófilos às células endoteliais, e, por final, transmigração de neutrófilos ao tecido injuriado (KELLY, 1993; SPRINGER, 1994).

Em ratos, a quimiotaxia de neutrófilos induzida por citocinas e a proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2) dividem a mesma habilidade em atrair e ativar neutrófilos, *in vitro* (WOLPE e cols., 1989; RIBEIRO e cols., 1991) e *in vivo* (WOLPE e cols., 1989; DRISCOLL e cols., 1993; FENG e cols., 1995; SHANLEY e cols., 1997). Com isso, as células epiteliais colônicas respondem a infecções bacterianas, a LPS, e a agonistas inflamatórios pela expressão de uma diversidade de citocinas pró-inflamatórias (RIBEIRO e colaboradores, 1991; SCHUERER-MALY e cols., 1994; JUNG e cols., 1995).

Pelo fato de que as células epiteliais do intestino funcionam como componentes do sistema imune da mucosa (KAGNOFF & ECKMANN, 1997), Castagliuolo e colaboradores (1997) mostraram que macrófagos da *lamina propria* são ativados durante o estágio inicial da enterite induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* e liberam, conseqüentemente, MIP-2, ressaltando que fibroblastos e células endoteliais também liberam essa quimiocina (DRISCOLL e cols., 1993).

Castagliuolo e colaboradores (1998) demonstraram que a MIP-2 é liberada de células epiteliais de ratos durante a enterite causada pela toxina A, sugerindo que a infiltração neutrofílica na mucosa do cólon é uma característica proeminente dessa enfermidade. Anticorpos anti-MIP-2 levaram à inibição da secreção intestinal, em modelos experimentais de alça intestinal isolada.

É possível que a ação intracelular da toxina A leve, por si mesma, a apoptose de leucócitos intestinais. Linfócitos T e macrófagos da *lamina propria* ligam-se à superfície do epitélio e são fenotípica e funcionalmente

distintas das outras células sanguíneas periféricas (JAMES e cols., 1994; MAHIDA e cols., 1996). Essas células são, portanto, componentes importantes no sistema imune, mediando funções de apresentação de antígeno e de produção de citocinas (ANAYA-VELAZQUEZ e cols., 1995). Após a degeneração do epitélio pela toxina A, as células T da *lamina propria*, macrófagos e eosinófilos são expostos às toxinas do *C. difficile* por meio de discretos poros na membrana basal (MAHIDA e cols., 1997).

Mahida e colaboradores (1998) mostraram, ainda, que a toxina A do *C. difficile* induz um rápido aporte de macrófagos residentes da *lamina propria* do cólon, seguido de células T e eosinófilos, onde as duas últimas sofreram apoptose. Foi demonstrado, também, que a perda de macrófagos e células T por apoptose pela toxina A, *in vivo*, pode suprimir o sistema imune da mucosa do cólon e levar a quadros de severidade em infecções primárias ou secundárias.

Tem sido relatado que a toxina A 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 & HIRANO, 1996). Mastócitos e outros leucócitos estão implicados na fisiopatologia da toxina A na mucosa intestinal, onde muitos estudos, tanto em modelos experimentais *in vivo* quanto *in vitro*, demonstraram que a interação da toxina A com macrófagos peritoneais de ratos induziu a liberação de interleucina-1 β e TNF- α , os quais atraem e ativam neutrófilos (ROCHA e cols., 1997).

Ao contrário dos macrófagos, os mastócitos armazenam TNF- α em grânulos e podem, portanto, liberá-lo imediatamente após exposição à toxina A e participar da fase inicial da reação inflamatória, já que é sabido que o TNF- α causa necrose de células epiteliais, assim como inibição da motilidade gástrica (SARTOR, 1994; MALAVIYA, 1996).

Em um estudo recente, os resultados de Calderón e cols. (1998) sugeriram que mastócitos participariam na reação inflamatória inicial pela liberação de TNF- α em resposta à toxina A. Por outro lado, nem histamina nem óxido nítrico participam desses fenômenos quando a toxina A age diretamente em mastócitos. A ruptura do citoesqueleto causado pela toxina A pode alterar a habilidade dos mastócitos em secretar histamina e óxido nítrico após ativação dependente ou não de antígeno. Em contrapartida, a ação necrótica da toxina A, em outras células, induz apoptose em mastócitos. Durante uma prolongada exposição à toxina A, a função e a viabilidade de células inflamatórias intestinais diminui, impedindo a infecção que provavelmente favorece casos severos e duradouros de colite pseudomembranosa.

O óxido nítrico também é uma molécula mediadora produzida por mastócitos e que poderia estar envolvido na fisiopatologia de enterocolite. O óxido nítrico, interessante, potencializa mastócitos mediados por TNF- α , porém, a toxina A não estimula a síntese de óxido nítrico por mastócitos (BISSONNETTE e cols., 1991; SALVEMINI e cols., 1991). Qiu e cols. (1996) demonstraram que o óxido nítrico inibe a enterotoxicidade da toxina A em intestino delgado de ratos, se o óxido nítrico atua como um mecanismo de defesa, isso, poderia advir de outras células que não mastócitos.

A toxina B modifica, de modo marcante, a morfologia de células em meios de cultura e aumenta sua área de superfície da membrana, sugerindo uma possível alteração na distribuição de receptores de membrana. A toxina B e o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) podem atuar sinergicamente na produção de TNF- α por fagócitos mononucleares. Com isso, o efeito da toxina B contribui para a expressão de células CD14. Foi demonstrado, também, que monócitos exacerbam a expressão de CD14 após 5 h de tratamento com toxina B. No entanto, após 24 h de tratamento, a

percentagem de monócitos CD14 diminuiu, embora mais freqüentemente, as células permaneceram positivas para a expressão de CD14 em comparação a células não-tratadas. Macrófagos tratados por 5 h com toxina B expressaram CD14, no mínimo por 24 h. Portanto, a toxina B pode modular a expressão de CD14 e essa modulação depende dos estados de diferenciação ativação em monócitos estimulados pela toxina B (SIFPERT e cols., 1999).

1.4.4 EFEITO MONOGLICOLIZANTE SOBRE PROTEÍNAS RHO

Ambas as toxinas, A e B, são os principais fatores de virulência do *Clostridium difficile*. Em culturas celulares, suas potentes citotoxicidades, mais evidente na toxina B, são resultados de induzir desagregação do microfilamento do citoesqueleto. A toxina B atua sobre uma GTPase RhoA de baixa massa molecular que está envolvida na regulação do citoesqueleto de actina. A toxina B catalisa a incorporação de mais de um mol de glicose por mol de RhoA. Foi demonstrado que uma microinjeção de RhoA previamente glicolisada pela toxina B em monocamadas de células causou desagregação de filamentos de actina, indicando uma atividade negativa dominante da RhoA glicolisada (JUST e cols., 1995).

As proteínas Rho regulam uma variedade de funções celulares, incluindo organização citoesquelética, crescimento e diferenciação celular, apoptose e sinalização celular. Usando a glicose- uridina difosfato (UDP) como doador de glicose, as toxinas A e B glicolisam alguns membros da família Rho de GTPases (HOFMAN e cols., 1997).

Três subfamílias constituem a família de proteínas Rho: a subfamília Rho, Rac e Cdc42. A subfamília Rho induz a formação de fibras de sustentação de actina; a subfamília Rac, controla a consistência estrutural da

membrana, assim como a atividade de NADPH-oxidase em neutrófilos; e Cdc42 regula a formação de filamentos de actina F. As toxinas do *C. difficile* inativam, por monoglicosilação, as proteínas Rho que perdem a habilidade de induzir a polimerização de filamentos de actina, provocando, com isso, a retração e arredondamento celulares. Essa monoglicosilação rompe a função normal das GTPases e causa uma variedade de efeitos, incluindo desregulação no citoesqueleto de actina, arredondamento celular, citotoxicidade, e alterações na sinalização celular (THELESTAM e cols., 1997; HALL, 1998).

Em monócitos, a toxina A induz a produção de IL-8 e necrose por mecanismos ainda desconhecidos. Há evidências do papel de proteínas quinases do tipo MAP nesses eventos. Em monócitos, a toxina A ativa as cascatas de três principais quinases MAP a partir de aproximadamente 1 a 2 minutos; a glicosilação das proteínas Rho se torna evidente após 15 minutos e a expressão IL-8 foi reduzida em torno de 70%. Portanto, em monócitos expostos à toxina A, a ativação da quinase MAP parece preceder a glicosilação das proteínas Rho e é requerida para transcrição de IL-8 e células de necrose (WARNY e cols., 2000).

A monoglicosilação de Rho GTPases não é a única atividade enzimática descrita para a toxina A. Na ausência de uma proteína aceptora a toxina A pode hidrolisar glicose-UDP em glicose e UDP; essa atividade é similar àquela de certas ADP-ribosiltansferases microbianas, tais como a da toxina da cólera que ribolisa ADP nas proteínas-alvo, assim como hidrolisa NAD em nicotinamida e ADP-ribose na ausência de proteína aceptora (MOSS e cols., 1977).

1.4.5 ATIVIDADE DA TOXINA A NO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

Há evidências de que as ações intestinais sob estímulo da toxina A do *C. difficile* quanto à secreção e motilidade, e uma resposta inflamatória aguda têm um componente neuronalmente mediado. A toxina A afeta tanto o comportamento elétrico (despolarização e aumento na excitabilidade) quanto à inibição da transmissão noradrenérgica para os corpos celulares das células neuronais. Foi demonstrado, ainda, que um dos mecanismos de ação da toxina A, na neurotransmissão, relacionou-se com a supressão dos potenciais pós-sinápticos inibitórios no corpo celular das células neuronais pelo estímulo de fibras nervosas simpáticas (MANTHY e cols., 1996).

Portanto, o componente neuronal da ação da toxina A envolve a excitação direta de neurônios entéricos, assim como a supressão da liberação de norepinefrina de fibras nervosas simpáticas pós-ganglionares no sistema nervoso entérico (XIA e cols., 2000).

Nos últimos anos, um dos grandes ideais da pesquisa vem sendo a tentativa de se elucidar as vias pelas quais neuropeptídeos controlam a função das células epiteliais no intestino, como também eventos inflamatórios. Um dos peptídeos envolvidos na inflamação intestinal é a substância P, um aminoácido membro da família das taquicininas (CHANG e cols., 1971), sendo seus sítios de ligação abundantes em pacientes com quadros de colite ulcerativa (MANTYH e cols., 1995).

Muitos estudos têm mostrado que o pré-tratamento de animais com antagonistas do receptor de neurocinina-1 inibe a inflamação colônica, assim como a administração de substância P em intestino de animais causa secreção de Cl^- das células epiteliais intestinais (YEO e cols., 1989; KUWAHARA e cols., 1990; RANGACHARI e cols., 1990; PANJA e cols., 1995). A substância P também é um dos maiores mediadores de diarreia inflamatória causada pela toxina A do *C. difficile* (POTHOULAKIS e cols., 1998).

Além disso, macrófagos da *lamina propria*, ativados como resultado da enterite por *C. difficile*, secretam, por si, suficientes quantidade de substância P para incrementar a liberação de TNF- α (CASTAGLIOULO e cols., 1997). Com isso, a substância P liberada de neurônios sensoriais primários, durante a enterite induzida pela toxina A, medeia seus efeitos pela ultra-regulação de receptores da substância P em células epiteliais intestinais e em neurônios entéricos (MANTYH e cols., 1996), como também de outras células da *lamina propria* intestinal, incluindo macrófagos.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

As diarreias inflamatórias representam a faixa mais grave das doenças diarreicas e requerem tratamento e avaliação mais intensivos. Partindo deste princípio, as pesquisas envolvendo o *Clostridium difficile*, têm se tornado cada vez mais importantes, tendo em vista que esse microrganismo tem sido considerado o patógeno hospitalar, causador de diarreia inflamatória, especialmente em países subdesenvolvidos da América latina, particularmente o Brasil, mais prevalente e comumente associado com superinfecção, resultante do uso de antimicrobianos e/ou antineoplásicos (POTHOULAKIS & LAMONT, 1993, KELLY e cols., 1994; ANGLIM & FARR, 1994; COSTA RIVERO E COLS., 1996).

Diante dessa perspectiva, a doença diarreica provocada pelo *Clostridium difficile* tanto em humanos quanto em animais domésticos possui peculiar relevância em Saúde Pública no tocante à importância das complicações clínicas e sanitárias atreladas a este bacilo, em especial na indução de uma potente diarreia inflamatória nosocomial associada a antibioticoterapia indiscriminada em leitos hospitalares (STARR e cols, 1997; ROCHA e cols., 1999).

Em estudos *in vitro*, Rocha e colaboradores (1998) demonstraram que macrófagos estimulados com toxina A foram capazes de liberar IL-1 β a qual fora responsável pelo aumento na secreção intestinal. Foi demonstrado, também que os metabólitos do ácido araquidônico estão envolvidos no evento fisiopatológico desencadeado pela toxina A, tal fato comprovado através da modulação farmacológica (LIMA e cols., 1988; FONTELES e cols., 1995).

O processo inflamatório induzido pela toxina A permanece, ainda, sob obscuridade de elucidação de seus eventos mais diretos. Portanto, a investigação acerca da participação de outros mediadores inflamatórios faz-se mister ao propósito do presente trabalho, pois através do mapeamento farmacológico das vias bioquímicas (protéicas e lipídicas) da cascata do processo inflamatório, bem como a participação das duas isoformas da COX(COX-1 e 2), induzido pela toxina A do *Clostridium difficile*, a clarividência de mecanismos intrínsecos deste processo inflamatório poderia estar mais contemplativa (CROFFORD, 1997).

2.2 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo geral elaborar um estudo farmacológico (*screening*), *in vivo*, a fim de se pesquisar as vias mais importantes dos mecanismo fisiopatológicos pró-inflamatórios associados à toxina A do *Clostridium difficile* em íleo de coelho.

Além do mais, estudar, através da determinação das curvas dose-resposta e tempo-efeito e da modulação farmacológica, avaliar os graus de lesões histológicas ocorridos por conta da exposição intraluminal do intestino à toxina A

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.3.1 Determinar a curva dose-resposta utilizando toxina A em modelos de alça isolada de coelho, com as doses de 0.3; 0,5; 1.0 e 3.0 e $\mu\text{g/ml}$. Obter a curva tempo-efeito com a recuperação do fluido nos tempos de 6; 8; 10; 12 e 18 horas após a injeção da toxina A;

2.3.2 Investigar a participação de mediadores inflamatórios no evento fisiopatológico induzido pela toxina A através do pré-tratamento com drogas inibidoras de fosfolipase A₂ (dexametasona e quinacrina), inibidores de ciclooxigenase (meloxicam, celecoxibe e indometacina), inibidor do fator de necrose tumoral alfa (pentoxifilina);

2.3.3 Determinar as alterações morfológicas intestinais induzidas pela toxina A em grupos isolados e em grupos de animais pré-tratados com drogas antiinflamatórias.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Nos protocolos experimentais, foram utilizados coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*), variedade Nova Zelândia, de ambos os sexos, pesando entre 1,5 e 2,5 kg, provenientes do criatório da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará. Estes animais foram mantidos em jejum por 24 horas antes de todos os procedimentos experimentais, com livre acesso à água.

3.2 TOXINAS

A toxina A do *Clostridium difficile* foi gentilmente cedida pelo Dr. David M. Lyerly (TECLAB, VA-USA). Essa toxina foi obtida do *C. difficile* (VPI strain 10463), mantido anaerobicamente em recipiente apropriado, contendo infusão de caldo cérebro-coração, de acordo com o método preestabelecido (LYERLY e cols., 1982; SULLIVAN e cols., 1982). A purificação da toxina A foi realizada por precipitação em sulfato de amônia, através de cromatografia de troca iônica em coluna de dietilaminoetil sefarose e cromatografia de imunoafinidade. A homogeneidade da toxina foi demonstrada por imunoeletroforese cruzada e eletroforese de gel poliacrilamida (LYERLY e cols., 1982).

As alíquotas de toxina A utilizadas nos experimentos foram extraídas de uma concentração-padrão de 0.46 mg/ml, o que fez-se necessário o ajuste adequado para a obtenção de sua concentração final de 1,0µg/ml, diluída em PBS (pH 7.4).

A diluição da toxina A foi realizada em ambiente estéril de fluxo laminar onde era retirada uma alíquota de cada experimento e acrescida em

PBS estéril, sendo prontamente injetada intraluminalmente nas alças intestinais.

3.3 DROGAS E REAGENTES

Nos protocolos experimentais de modulação farmacológica, foram utilizadas as seguintes drogas:

3.3.1 Dexametasona: DECADRONAL[®], fosfato dissódico de dexametasona, do laboratório PRODOME (Campinas, SP, BRASIL) na concentração de 8mg/ml, utilizada na dose de 0,5 mg/kg.

3.3.2 Meloxicam: MOVATEC[®] em comprimidos, do laboratório BOEHRINGER DE ANGELI (Itapeverica da Serra, SP, BRASIL)

3.3.4 Indometacina: INDOMETHACIN[®], do laboratório SIGMA CHEMICAL COMPANY (St.Louis, MO, USA).

3.3.5 Celecoxibe: CELEBREX[®], em comprimidos do laboratório SEARLE PFIZER, em cápsulas de 200 mg (Chicago, IL, USA).

3.3.6 Quinacrina: QUINACRINE[®], do laboratório SIGMA CHEMICAL COMPANY (St.Louis, MO, USA).

3.3.7 Pentoxifilina: Pentoxifylline[®] do laboratório SIGMA CHEMICAL COMPANY (St.Louis, MO, USA).

3.3.8 Montelucaste sódico: SINGULAIR[®], Laboratório Merck-Sharp (Campinas, SP, BRASIL), em comprimidos.

Após a obtenção dos resultados desses grupos, foram feitos dois protocolos experimentais utilizando associação de drogas:

3.3.9 Pentoxifilina + Celecoxibe, obedecendo as mesmas concentrações e doses outrora utilizadas, e

3.3.10 Indometacina + Celecoxibe, rezando às mesmas concentrações e doses respectivas das drogas.

3.4 ALÇA INTESTINAL ISOLADA DE COELHO

Os protocolos experimentais seguiram o modelo descrito por De & Chatterje, 1953, para estudos, *in vivo*, do efeito secretório do *Vibrio cholerae*

Os animais, em jejum, foram anestesiados com a associação de cloridrato de xilazina, um miorrelaxante não-narcótico, atuando na diminuição da liberação de dopamina e noradrenalina, a nível de receptores α_2 , utilizando a dose de 5mg/kg, via intramuscular. Após um intervalo de 5 minutos, foi administrado cloridrato de quetamina (25 mg/kg), anestésico dissociativo, também por via intramuscular (BRANDER, 1991; BOOTH & MCDONALD, 1992; MASSONE, 1994).

Em seguida aos animais entrarem em plano cirúrgico, foi feita uma laparotomia mediana de 10-15 cm, incidindo-se, em primeira instância, a pele e, em seguida, o peritônio, para visualização do intestino delgado.

Após exposição do ceco e identificação do íleo, uma porção de aproximadamente 30 cm do tubo entérico terminal foi lavada com PBS, em um volume de 5 ml, para remoção de excesso de fezes oriundas do jejum. Durante este procedimento, teve-se o cuidado de não traumatizar o íleo nem tampouco rompem a vascularização entérica.

Então, segmentos de 6-8 cm de íleo foram subdivididos, em dupla ligadura, com linha de algodão, para isolamento de alças isoladas, em quantidades que variaram de 5 a 7 segmentos. Posteriormente, injetou-se nas alças isoladas, volumes iguais a 1 ml de controle, na primeira alça, e toxina A, nas demais.

O período no qual os animais foram sacrificados, após a injeção do controle e de toxina A, variou quando estabeleceu-se a curva de tempo-efeito. Durante este protocolo, os tempos variaram entre 6 a 18 horas, com posterior colheita do fluido intestinal. Quando obteve-se a curva tempo-

efeito, a recuperação do fluido intestinal foi determinada em 18 horas após as injeções.

No ato da eutanásia, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/kg; i.p.) cujas propriedades de indução do sono e de depressão do sistema nervoso central colaboraram para amenizar o sofrimento dos coelhos (RANG & DALE, 1995). Em seguida, foi injetado cloreto de potássio (dose aleatória de 2ml, via intracardíaca) para consumação da eutanásia.

A colheita do fluido intestinal foi feita pela reabertura da cavidade abdominal (pele e peritônio) dos animais. Os segmentos isolados foram descompatibilizados do plexo entérico e medidos em centímetros, e seus conteúdos acondicionado em tubos de plástico e mensurados seus volumes, em microlitros. A taxa de secreção foi calculada dividindo-se o volume do fluido recuperado pelo comprimento da alça intestinal e o quociente foi expresso em microlitros/centímetro ($\mu\text{l/ml}$).

Para o protocolo experimental de bloqueio farmacológico, foram utilizados de dois a três coelhos por experimento, com pesos médios semelhantes, e sob as mesmas condições preliminares dos experimentos anteriores.

O pré-tratamento dos grupos de animais obedeceu um curso de tempo variante entre 30 minutos a uma hora antes da injeção da toxina.

Ao final de cada procedimento de eutanásia, culminada com injeção intracardíaca de uma solução saturada de cloreto de potássio, os dados contendo os volumes recuperados, os tamanhos dos segmentos, e as respectivas taxas calculadas foram computados a uma ficha contendo, também, todos os detalhes ocorridos no término de cada experimento.

3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 CURVAS DOSE-RESPOSTA E TEMPO-EFEITO

No sentido de se traçar a curva dose-resposta, os grupos experimentais foram divididos de acordo com a administração das doses de 0,3; 0,5; 1,0 e 3,0 $\mu\text{g/ml}$, a fim de se obter a taxa de secreção intestinal, em $\mu\text{l/cm}$. Neste protocolo, o tempo de recuperação do fluido intestinal foi de 18 horas após a injeção do controle e TxA.

Traçada, então, a curva dose-resposta, outra etapa configurou-se na obtenção da cinética tempo-efeito, utilizando a dose mais adequada, 1 $\mu\text{g/ml}$, oriunda do protocolo anterior, nos tempos de 6, 8, 10; 12 e 18 horas.

3.5.2 MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA

Os dados obtidos, após a conclusão dos protocolos em epígrafe, foram essenciais para a composição da modulação farmacológica do bloqueio secretório, utilizando-se várias drogas antiinflamatórias. Para tanto, os grupos experimentais foram divididos de acordo com a via da cascata inflamatória a ser pesquisada a participação de mediadores deste processo sob influência da injeção de toxina A nas alças intestinais isoladas.

O primeiro de animais foi pré-tratado com o corticosteróide dexametasona, administrada via subcutânea, na dose de 0,5 mg/kg, 30 minutos antes do experimento no intuito de promover bloqueio do processo inflamatório (MASFERR e cols., 1990). Posteriormente, os grupos seguintes foram orientados a serem pré-tratados com drogas as quais modulariam outras vias metabólicas desencadeadas neste evento fisiopatológico. Por conseguinte, utilizou-se quinacrina, uma droga antagonista específica de fosfolipase A_2 onde uma alíquota de 100 mg foi diluída em 2 ml de PBS e administrada sob a dose de 20 mg/kg, via subcutânea, 1 hora antes do experimento.

A partir de então, os protocolos foram conduzidos no intuito de se modular as vias bioquímicas dos metabólitos do ácido araquidônico, tanto pela ciclooxigenase quanto pela lipooxigenase. A fim de se estudar o envolvimento dos derivados leucotriênicos neste processo, um grupo animal foi previamente tratado com montelucaste sódico na dose de 10mg/kg onde os animais foram pré-tratados 1 hora antes do experimento.

Devido à importância da participação da enzima ciclooxigenase na fisiopatologia desta doença diarreica, a modulação farmacológica seguiu o rumo da inibição terapêutica de COX. Em primeira instância, utilizou-se indometacina, uma droga cuja seletividade à COX-2 é, relativamente reduzida, além de induzir inflamação crônica intestinal (YAMADA e cols., 1993). Uma alíquota de 200 mg da droga foi diluída em 2 ml de PBS, na dose de 2 mg/kg, administrada via subcutânea, uma hora antes de cada experimento.

Os protocolos priorizaram, portanto, a investigação da participação mais pontual da COX-2 na promoção de secreção intestinal neste modelo experimental, onde duas drogas mais seletivas foram usadas no *screening* deste evento. O meloxicam e o celecoxibe foram colhidos para compor esta etapa do trabalho. No primeiro caso, a formulação do meloxicam tinha concentração de 7,5 mg/ml, sendo os comprimidos diluídos em 2 ml de PBS. Obteve-se uma dose final de 20 mg/kg e a droga foi administrada, via oral, uma hora antes da injeção da toxina A. No protocolo envolvendo celecoxibe, as cápsulas, formuladas na concentração de 100 mg/ml foram diluídas em PBS, tendo, portanto, a dose de 20 mg/kg, administrado via oral, onde os animais foram pré-tratados 1 hora antes da injeção de TxA.

Na pesquisa da participação do TNF- α no processo fisiopatológico induzido pela toxina A, foi utilizada pentoxifilina, na concentração de 150 mg/ml onde 300 mg da droga foram diluídos em 2 ml de PBS. A droga teve

dose de 50 mg/kg e foi administrada, via subcutânea, 1 hora antes do experimento.

A associação entre drogas foi, portanto proposta entre grupos pré-tratados concomitantemente com pentoxifilina + celecoxibe e outro grupo, associados celecoxibe e indometacina. Tal associação foi proposta a fim de se estudar o possível sinergismo farmacológico adicional com a administração concomitante das drogas, no sentido dirimente da taxa de secreção intestinal induzida pela toxina A.

3.6 HISTOPATOLOGIA

Logo após os procedimentos de eutanásia e recuperação do fluido intestinal, fragmentos de íleo terminal foram extraídos a fim da confecção das lâminas de análise histopatológica dos diversos grupos experimentais estudados neste trabalho.

Realizada a coleta do material, o íleo foi acondicionado em frascos contendo formol a 10% por 12 horas. A seguir, a peça fora disposta em álcool etílico a 70% para desidratação, por 6 horas, para em seguida, ser realizada a diafinização com água e xilol em uma hora.

O passo subsequente ocorreu a impregnação com parafina em estufa por três horas. A inclusão com parafina, antes da microtomia, ocorreu em temperatura ambiente. Após a microtomia, procedeu-se a etapa de coloração a partir da desparafinização, por três minutos, hidratação, em 12 minutos, adição de hematoxilina, entre 15 a 30 segundos, e finalmente, eosina, também em 15 a 30 segundos.

Para a montagem da lâmina, em definitivo, a peça desidratada por 6 minutos, diafinizada por uma hora e posta sob lamínula com 3 gotas de Entellan para posterior visualização ao microscópio.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística dos vários grupos de ensaios foi analisada por ANOVA, teste de Bonferroni. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Os cálculos estatísticos foram realizados, através de um microcomputador, utilizando-se o programa profissional de *software* em Estatística *SigmaStat* (Jandel Scientific, San Rafael, California, USA), através do teste estatístico de Bonferroni. O n diz respeito ao número de alças isoladas em cada grupo estudado onde, em média, foram utilizados de quatro a sete animais.

4. RESULTADOS

4.1 CURVA DOSE-RESPOSTA

Nos protocolos experimentais, foram usadas as seguintes concentrações de toxina A, já devidamente diluídas em PBS: 0,3; 0,5; 1,0 e 3,0 $\mu\text{g/ml}$, com o tempo de recuperação do fluido intestinal de 18 horas, sendo n o número de alças intestinais recuperadas. Os resultados evidenciaram que, a partir da concentração de 1,0 $\mu\text{g/ml}$, a TxA provoca secreção intestinal (TxA=1070,7 \pm 122,9 $\mu\text{l/cm}$ Vs PBS=95,9 \pm 44,9 $\mu\text{l/cm}$; $p<0,05$; $n=16$). A TxA, obteve efeito secretório, também de forma significativa, na concentração de 3,0 $\mu\text{g/ml}$ (TxA=1088,3 \pm 102,8 $\mu\text{l/cm}$ Vs PBS=95,9 $\mu\text{l/cm}$; $p<0,05$; $n=12$).

Por outro lado, as concentrações de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ (TxA=188,9 \pm 65,4 $\mu\text{l/cm}$ Vs PBS= 95,9 $\mu\text{l/cm}$; $p<0,05$; $n=10$) e de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (TxA=324,09 \pm 124,8 $\mu\text{l/cm}$ Vs PBS= 100 $\mu\text{l/cm}$; $p<0,05$; $n=12$) não foram capazes de promover secreção intestinal, de modo significativo, nos protocolos experimentais realizados. (FIGURA 1)

4.2 CURVA TEMPO-EFEITO

A partir de então, os protocolos experimentais para a determinação da curva tempo-efeito foram conduzidos utilizando a dose de 1,0 $\mu\text{g/ml}$, os resultados foram comparados entre os grupos temporais, levando-se em conta as taxas de secreção intestinal relativas a cada protocolo experimental. Observou-se, ainda, que a dose de TxA (1,0 $\mu\text{g/ml}$) provocou secreção intestinal tempo-dependente em 6 horas (TxA= 91,0 \pm 7,43 $\mu\text{g/ml}$; $n=12$; $p<0,05$); 8 horas (TxA= 88,6 \pm 29,44 $\mu\text{g/ml}$; $n=10$; $p<0,05$), 10 horas (TxA= 416,1 \pm 39,09 $\mu\text{g/ml}$; $n=10$; $p<0,05$), 12 horas (TxA= 673,6 \pm 118,11 $\mu\text{g/ml}$; $n= 10$; $p<0,05$) e 18 horas (TxA= 1070,7 \pm 122,90 $\mu\text{l/cm}$,

n=12; p<0,05). Os dados foram analisados através da comparação estatística entre as taxas das alças injetadas com TxA e as com PBS (TxA Vs PBS).

A taxa de secreção intestinal mostrou-se significativa inicialmente em 12 horas após a injeção da toxina A nas alças isoladas, culminando com seu efeito máximo ao final de 18 horas. (FIGURA 2)

4.3 MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA

Após a determinação das curvas dose-resposta e tempo-efeito, realizaram-se, a partir de então, os protocolos de modulação farmacológica do evento secretório da toxina A, através do pré-tratamento com as drogas antiinflamatórias previamente descritas. A dose de toxina A e o tempo de recuperação do fluido intestinal adotados nesta etapa foram de 1,0µg/ml e 18 horas, respectivamente.

Os resultados são mostrados na descrição com suas médias e erro padrão da média da secreção intestinal, expressas em µg/ml, comparadas com a média de secreção do grupo sem pré-tratamento, com toxina A, acompanhadas da percentagem aproximada de bloqueio da secreção intestinal com grau de significância de p< 0,05.

4.3.1 Efeito do inibidor de fosfolipase A₂ e de citocinas sobre a secreção intestinal induzida pela toxina A do *C. difficile* em íleo de coelho.

A dexametasona, dentre os diversos grupos experimentados, foi capaz de inibir a secreção intestinal de modo significativo, com maior propriedade (DEXA= 172,3 ± 37,0 Vs. TxA 1034,9 ± 93,0 µl/cm; n = 15; p<0,05). Tal afirmação é condizente com a elevada taxa de bloqueio da secreção de 83%. (FIGURA 3).

4.3.2 Efeito do inibidor específico de fosfolipase A₂ sobre a secreção intestinal induzida pela toxina A do *C. difficile* em íleo de coelho.

Observou-se que a quinacrina bloqueou de modo significativo a secreção intestinal, porém sua eficácia mostrou-se menor do que à da dexametasona, indicando um possível envolvimento de citocinas nesse evento (QUINA= $591,9 \pm 64,5$ Vs. TxA $1034,9 \pm 93,0$ $\mu\text{l}/\text{cm}$; n= 19; $p < 0,05$). O bloqueio percentual da taxa de secreção intestinal neste protocolo fora de 43%.(FIGURA 4)

4.3.3. Participação de mediadores inflamatórios derivados da lipooxigenase no evento secretório promovido pela toxina A do *Clostridium difficile* em íleo de coelho, *in vivo*.

No intuito de se constatar a participação de leucotrienos no fenômeno fisiopatológico proposto neste trabalho, um grupo de animais foi pré-tratado com um bloqueador da síntese de lipooxigenase o qual não se mostrou capaz de provocar um bloqueio significativo nas taxas de secreção intestinal (MONTE= $702,2 \pm 106,4$ Vs TxA $1034,9 \pm 93,0$ $\mu\text{l}/\text{cm}$; n= 12; $p < 0,05$). O bloqueio percentual da taxa de secreção intestinal neste protocolo fora de somente 32%, não sendo, portanto, significativo.(FIGURA 5)

4.3.4 Investigação do envolvimento de ambas as isoformas da enzima ciclooxigenase (COX 1 e 2) sobre a secreção intestinal induzida pela toxina A do *C. difficile* em alça isolada de coelho.

Não obstante o estudo acerca da participação dos derivados metabólicos do ácido araquidônico nos fenômenos secretórios da toxina A, *in vivo*, os resultados realizados com a administração de indometacina revelaram, também, uma significativa inibição das taxa de secreção intestinal (43%). Tais dados mostraram que tanto COX-1 quanto COX-2 estavam contribuindo na fisiopatologia secretória da toxina A. INDO= $587,5 \pm 49,0$ Vs. TxA $1034,9 \pm 93,0$ $\mu\text{l}/\text{cm}$; n = 15; $p < 0,05$. (FIGURA 6)

4.3.5 Ação inibitória de drogas antagonistas da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) sobre a secreção intestinal induzida pela toxina A do *C. difficile* em íleo de coelho

Quando os protocolos de modulação farmacológica, agora, investigavam a participação de COX-2, os dados obtidos demonstraram que tal enzima, induzida sua expressão durante o processo inflamatório diarreico, tem atividade marcante nos eventos secretórios causados pela toxina A, *in vivo*. Tal evidência fora denotada quando os animais foram pré-tratados com duas drogas específicas: meloxicam e celecoxibe.

Os resultados de ambas as drogas mostraram consideráveis índices de inibição das taxas de secreção intestinal, ressaltando que os fluidos recuperados apresentaram aparência límpida, em contraste àqueles oriundos da administração de indometacina. Contudo, o celecoxibe foi hábil em melhor bloquear a secreção intestinal (56%), em detrimento às taxas secretórias conseguidas com o meloxicam (39%). Meloxicam: MELOX= $627,4 \pm 77,5$ Vs. TxA $1034,9 \pm 93,0$ $\mu\text{l}/\text{cm}$; n = 18; $p < 0,05$. Celecoxibe: CELOX= $451,0 \pm 91,6$ Vs. TxA $1034,9 \pm 93,0$ $\mu\text{l}/\text{cm}$; n = 20; $p < 0,05$. (FIGURA 7)

4.3.6 Participação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no processo inflamatório intestinal induzido pela toxina A do *C. difficile* em íleo de coelho.

A fim de estudar da implicação de outro mediador inflamatório, no modelo de diarreia causada pela toxina A *in vivo*, neste protocolo procurou-se investigar se o TNF- α estaria envolvido neste evento secretório. Para tanto, os animais receberam administração prévia de pentoxifilina antes da injeção intraluminal de toxina A. Ao final dos experimentos foi constatado que o bloqueio anti-TNF- α inibiu, significativamente, a secreção intestinal, numa margem percentual de 45%, sugerindo a participação desta citocina na diarreia inflamatória induzida pela toxina A do *C. difficile*. Pentoxifilina: PENTOX= 570,0 \pm 131,7 Vs. TxA 1034,9 \pm 93,0 μ l/cm; n = 16; p<0,05. (FIGURA 8)

4.3.7 Pré-tratamento concomitante entre um inibidor de COX-2 (celecoxibe) e um antagonista de TNF- α (pentoxifilina) sobre a secreção intestinal induzida pela toxina A do *C. difficile* em íleo de coelho.

Diante dos resultados obtidos, foi estabelecida a associação entre a droga que melhor inibiu a atividade de COX-2, celecoxibe (56%), simultâneo ao inibidor de TNF- α (pentoxifilina). Tal associação, entre os grupos, também mostrou-se eficaz enquanto bloqueadora da secreção intestinal: Pentoxifilina + Celecoxibe (PENTOX + CELOX= 539,7 \pm 76,5 Vs. TxA 1034,9 \pm 93,0 μ l/cm; n = 23; 48%; p<0,05). (FIGURA 9)

4.3.8 Associação farmacológica entre um inibidor específico de COX-2 (celecoxibe) e um antagonista de ciclooxigenase (indometacina) sobre a secreção intestinal induzida pela toxina A do *C. difficile* em íleo de coelho.

Neste protocolo, agora, evidenciou-se a participação de prostaglandinas nos fenômenos inflamatórios derivados da toxina A. Os fluidos intestinais recuperados mostraram-se menos hemorrágicos, em contrapartida aos tomados durante a modulação com a indometacina isoladamente. Quanto à inibição secretória, essa associação, à semelhança da anterior, da mesma forma foi significativamente satisfatória, atingindo um percentual de 60%. Indometacina + Celecoxibe: INDO + CELOX= 421,7 ± 60,0 Vs. TxA 1034,9 ± 93,0 µl/cm; n = 13; p<0,05. (FIGURA 10).

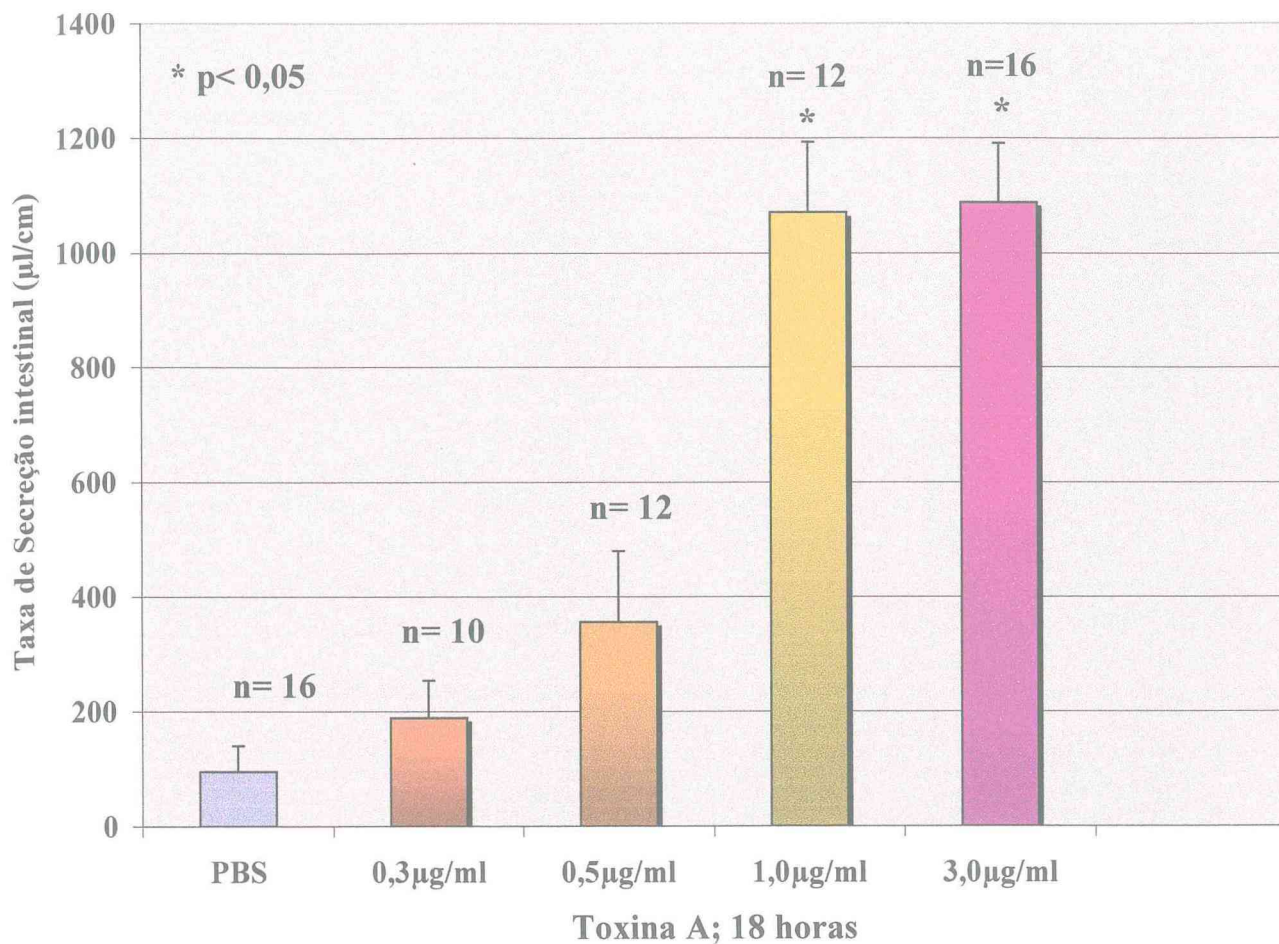


Figura 1: Cinética dose-resposta da toxina A em modelo de alça isolada em coelho. Cada grupo experimental foi conduzido com as referidas doses de toxina A, com o tempo de recuperação dos fluidos intestinais de 18 horas, tendo o PBS como grupo controle. Os dados, expressos em µg/ml, estão plotados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n diz respeito ao número de alças isoladas. As doses de 1,0; 3,0 µg/ml não tiveram diferenças estatísticas significantes.

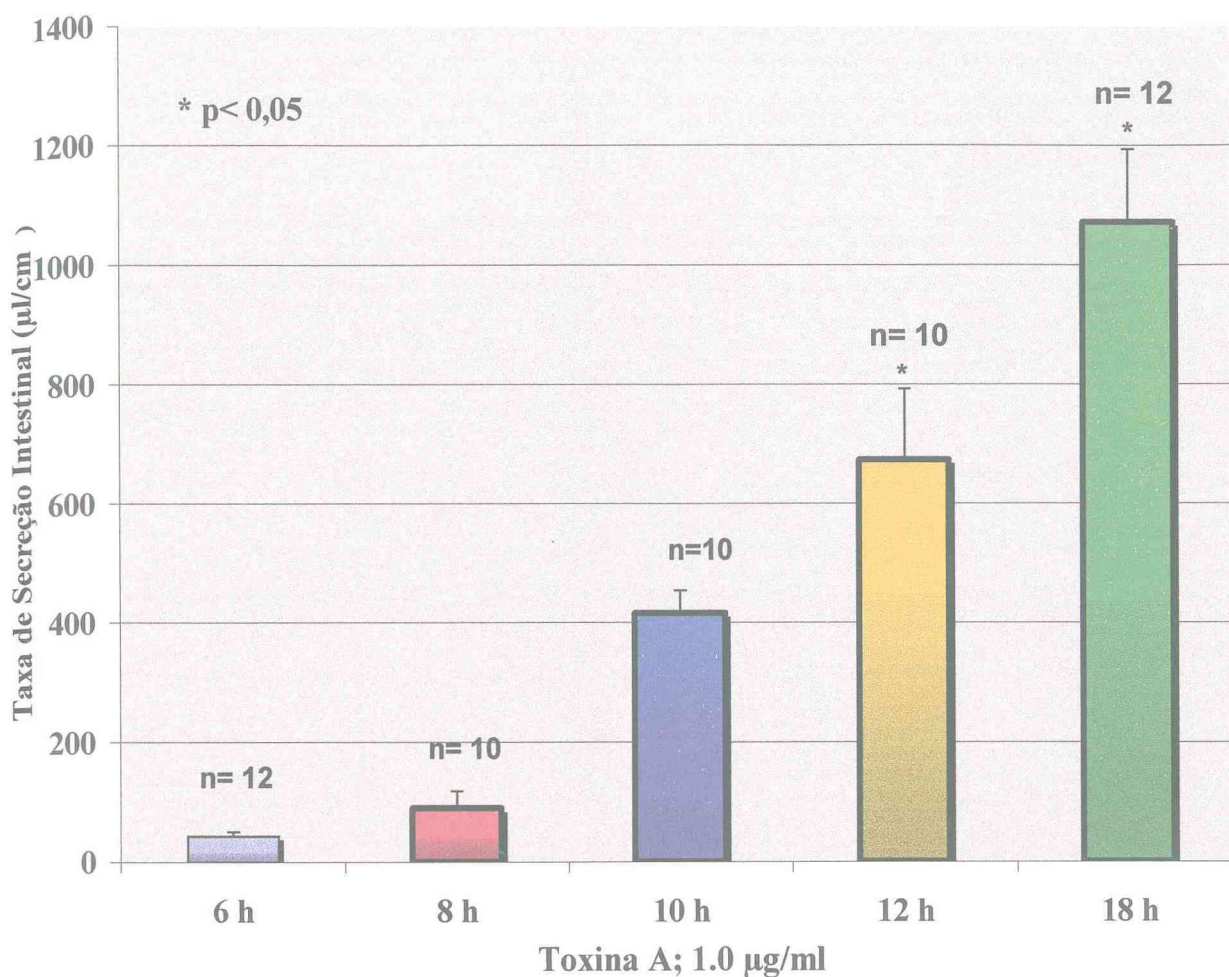


Figura 2: Cinética tempo-efeito da toxina A em modelo de alça isolada em coelho. Com a dose de 1,0 µg/ml da toxina A tirada da curva dose-resposta utilizou-se diferentes tempos de recuperação do fluido intestinal. Dentre os grupos estudados, aqueles cujos fluidos foram recuperados a partir de 12 horas tiveram significância estatística, sendo o efeito máximo obtido em 18 horas. Os grupos foram comparados entre as taxas de TxA e de PBS. Os dados, expressos em µg/ml, estão plotados como média ± erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O *n* diz respeito ao número de alças isoladas

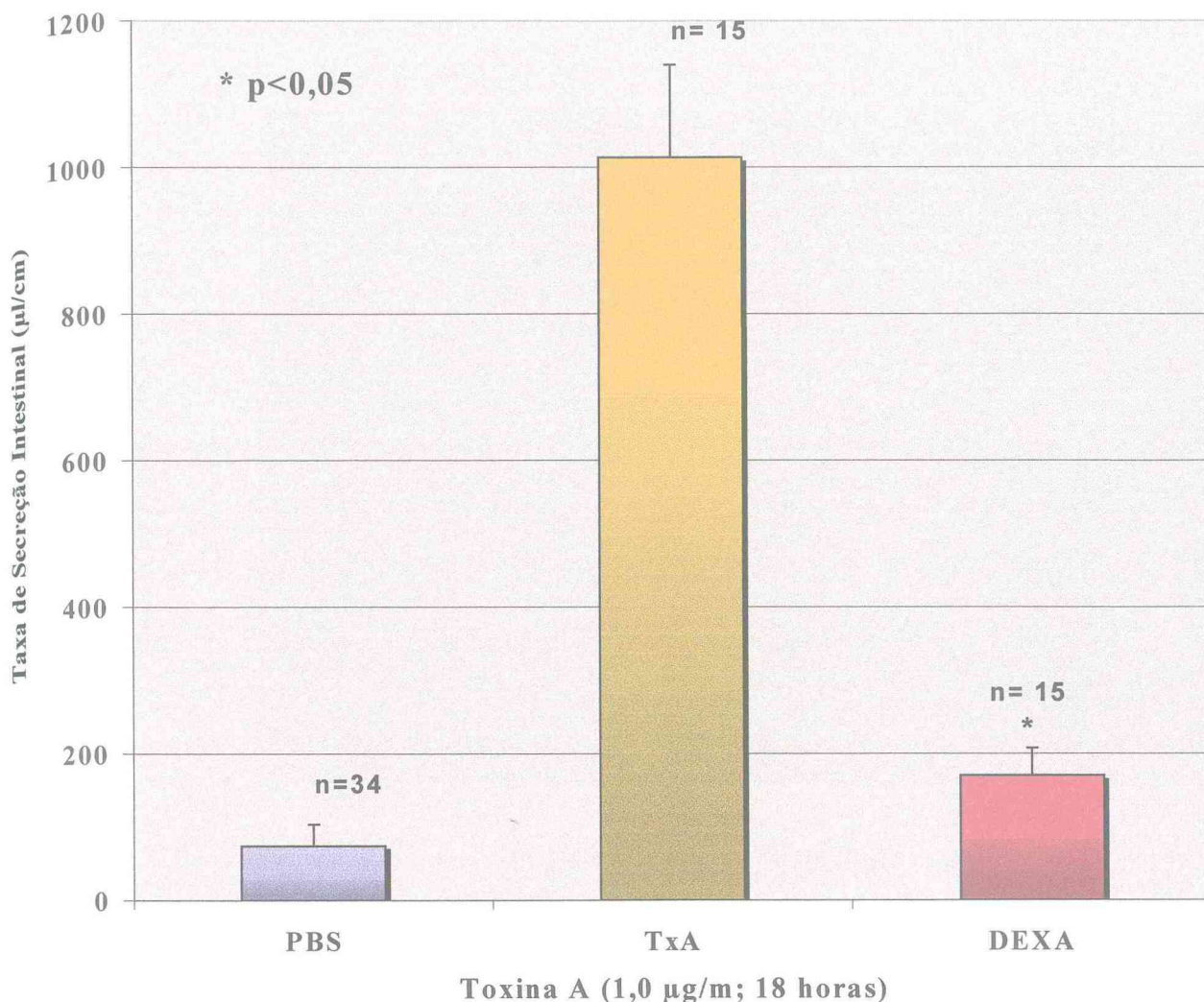


Figura 3: Efeito da dexametasona sobre a secreção intestinal induzida pela toxina A do *Clostridium difficile*. A dexametasona (0,5 mg/kg) bloqueou a secreção intestinal em íleo isolada de coelho (Dexa $170,3 \pm 37,0$ Vs TxA $1034,9 \pm 93,0 \mu\text{l}/\text{cm}$). Os dados, expressos em $\mu\text{g}/\text{ml}$, estão plotados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O *n* diz respeito ao número de alças isoladas nos grupos modulados.

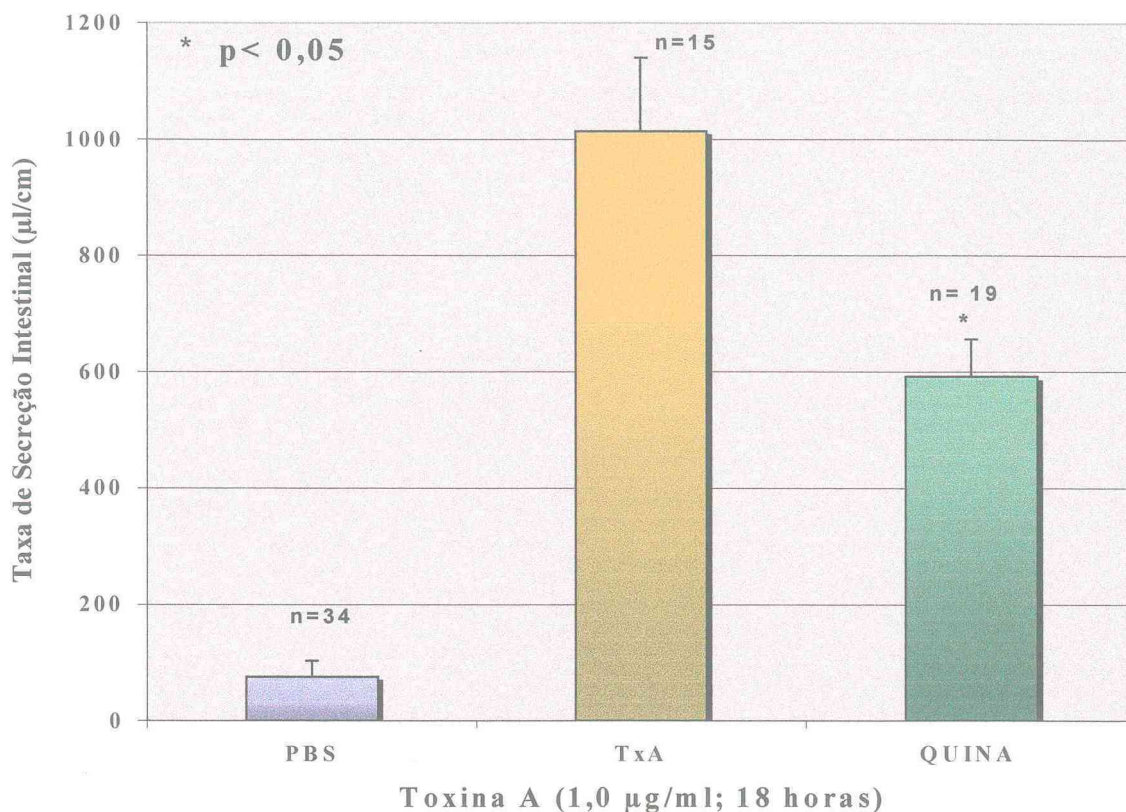


Figura 4: Pré-tratamento com bloqueador específico de fosfolipase A₂ (quinacrina) em alça isolada de coelho A secreção intestinal provocada pela toxina A do *C. difficile* foi inibida, parcialmente, por um inibidor específico de Fosfolipase A₂ (Quina $591,9 \pm 64,5$ Vs TxA $1034,9 \pm 93,0 \mu\text{l/cm}$; $p < 0,05$). Os dados, expressos em $\mu\text{g/ml}$, estão plotados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n diz respeito ao número de alças isoladas nos grupos modulados.

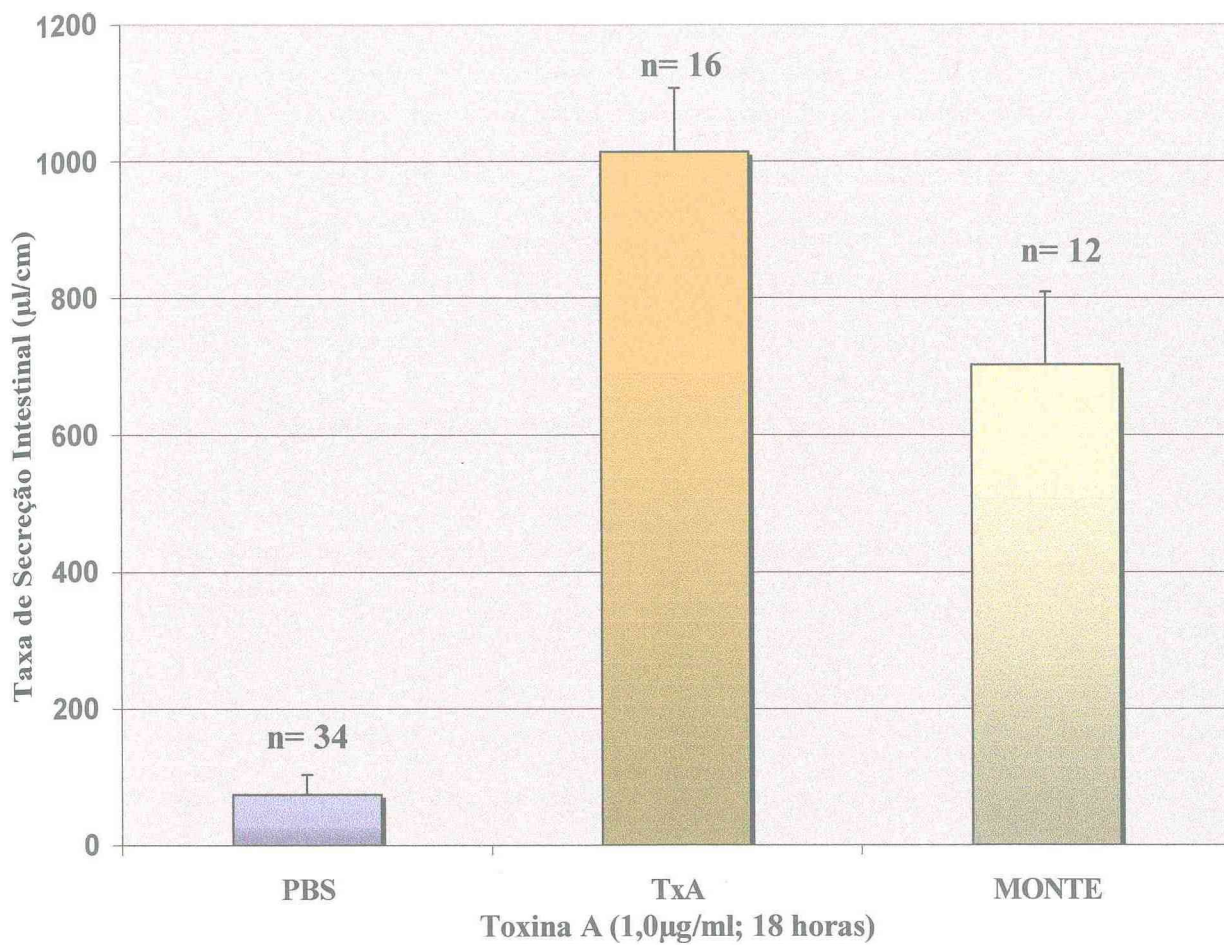


FIGURA 5. Inibidor de lipooxigenase (montelucaste sódico) não alterou as taxas de secreção intestinal provocada pela toxina A. A taxa de secreção intestinal não foi bloqueada de modo significativo, comportando-se, portanto, como uma droga ineficaz à reversão do quadro secretório promovido pela toxina A. MONTE $702,2 \pm 106,4$ Vs TxA $1034,9 \pm 93,0$ $\mu\text{l}/\text{cm}$; $n=12$; $p<0,05$. Os dados, expressos em $\mu\text{g}/\text{ml}$, estão plotados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n diz respeito ao número de alças isoladas nos grupos modulados.

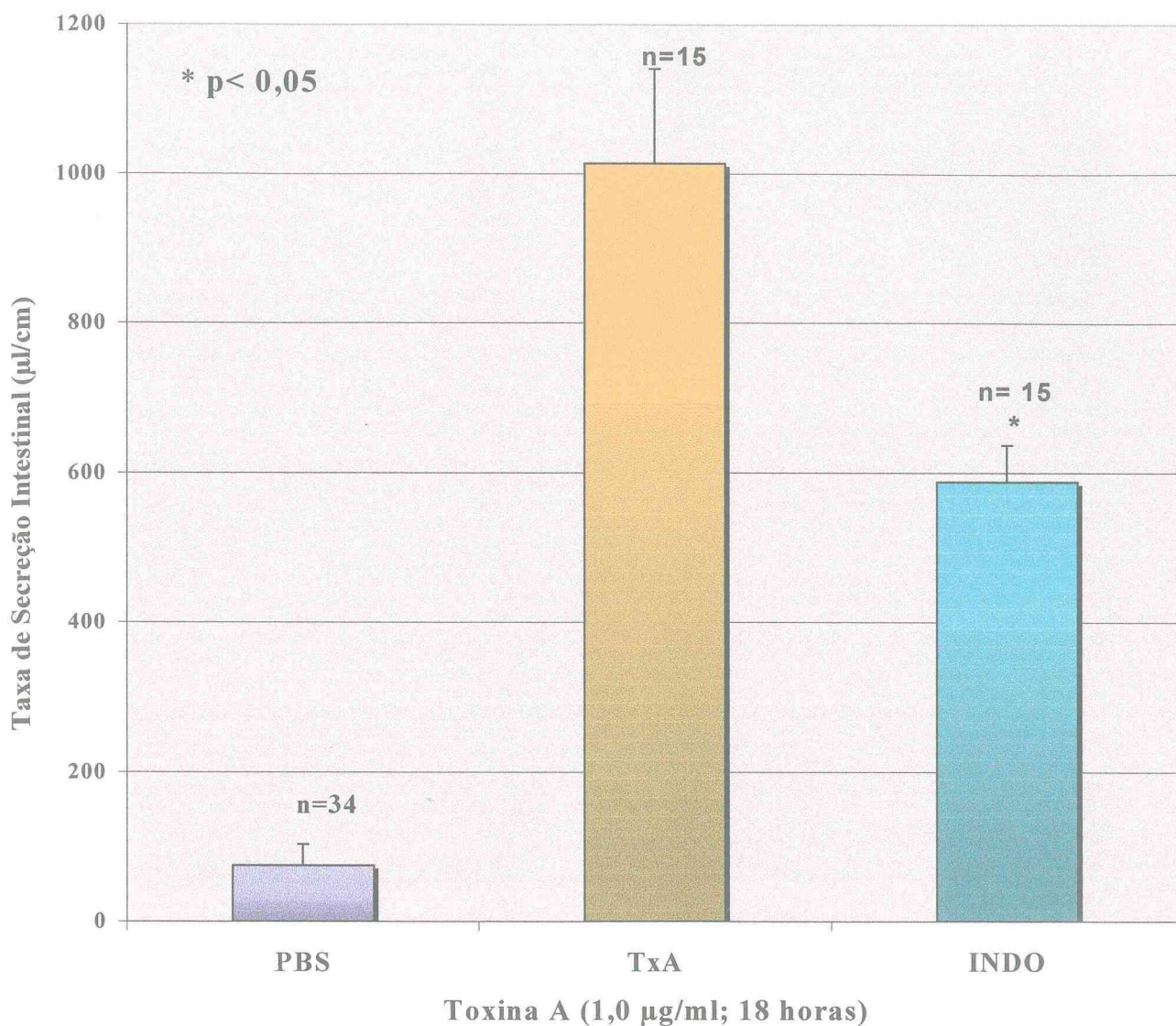


Figura 6: Indometacina bloqueia parcialmente a secreção intestinal induzida pela toxina A em íleo de coelho. A indometacina provocou uma inibição parcial nas taxas de secreção intestinal, marcadamente acompanhadas pela recuperação do fluido intestinal de veras hemorrágico (INDO $587,5 \pm 49,0$ Vs TxA $1034,9 \pm 93,0$ µl/cm). Os dados, expressos em µg/ml, estão plotados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n diz respeito ao número de alças isoladas nos grupos modulados.

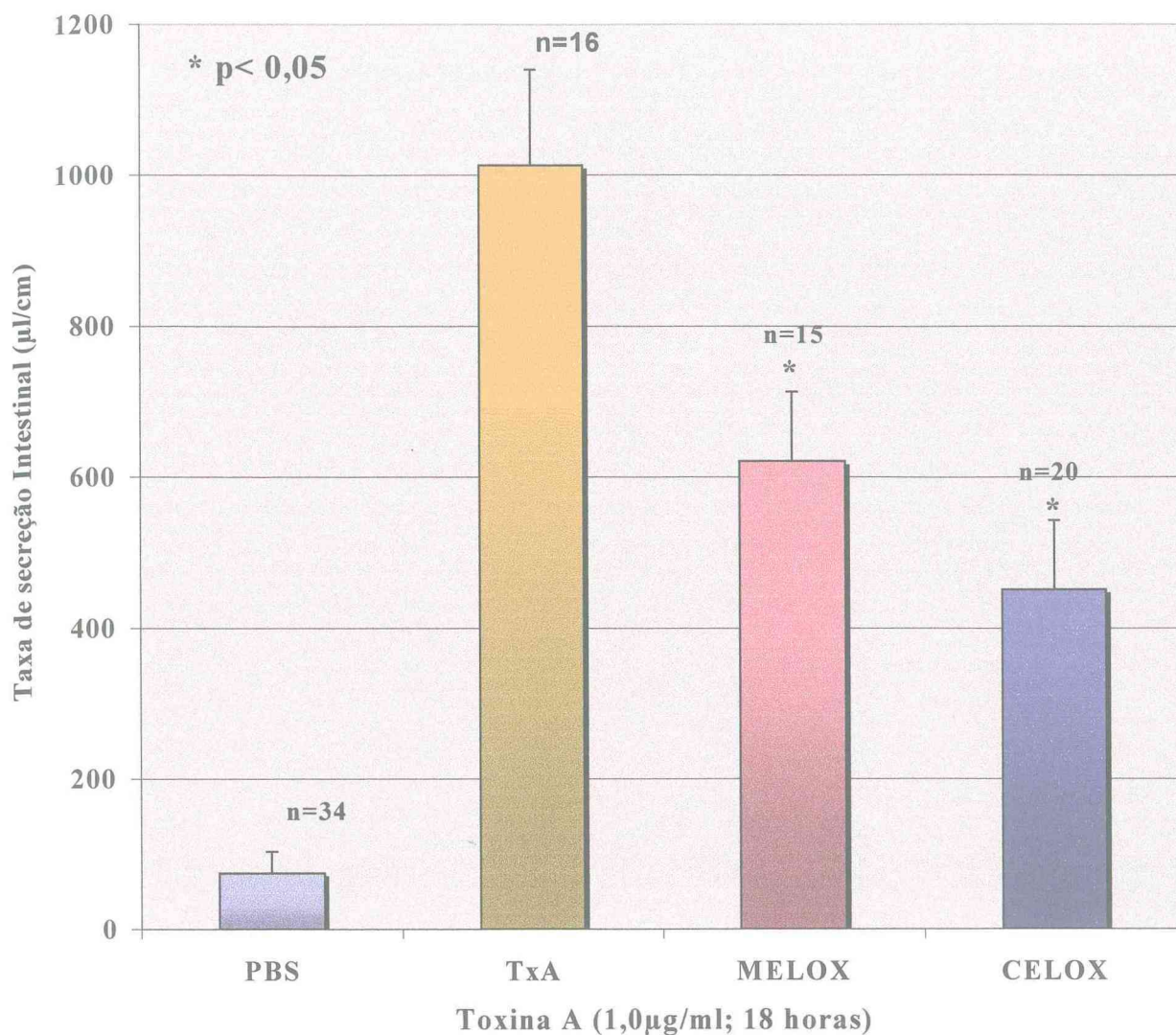


Figura 7: Efeito inibidor de antagonistas específicos da COX-2 a taxa de secreção intestinal. Tanto o meloxicam quanto o celecoxibe demonstraram bloqueio parcial da secreção intestinal perfazendo uma inibição percentual das taxas secretórias significantes (39% e 56,42%, respectivamente), enfatizando que as modulações farmacológicas utilizando drogas mais específicas para inibição de COX-2 bloqueiam, em parte, os efeitos secretórios induzidos pela toxina A do *Clostridium difficile*, apresentando fluidos recuperados sem focos hemorrágicos. Os dados, expressos em µg/ml, estão plotados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O *n* diz respeito ao número de alças isoladas nos grupos modulados.

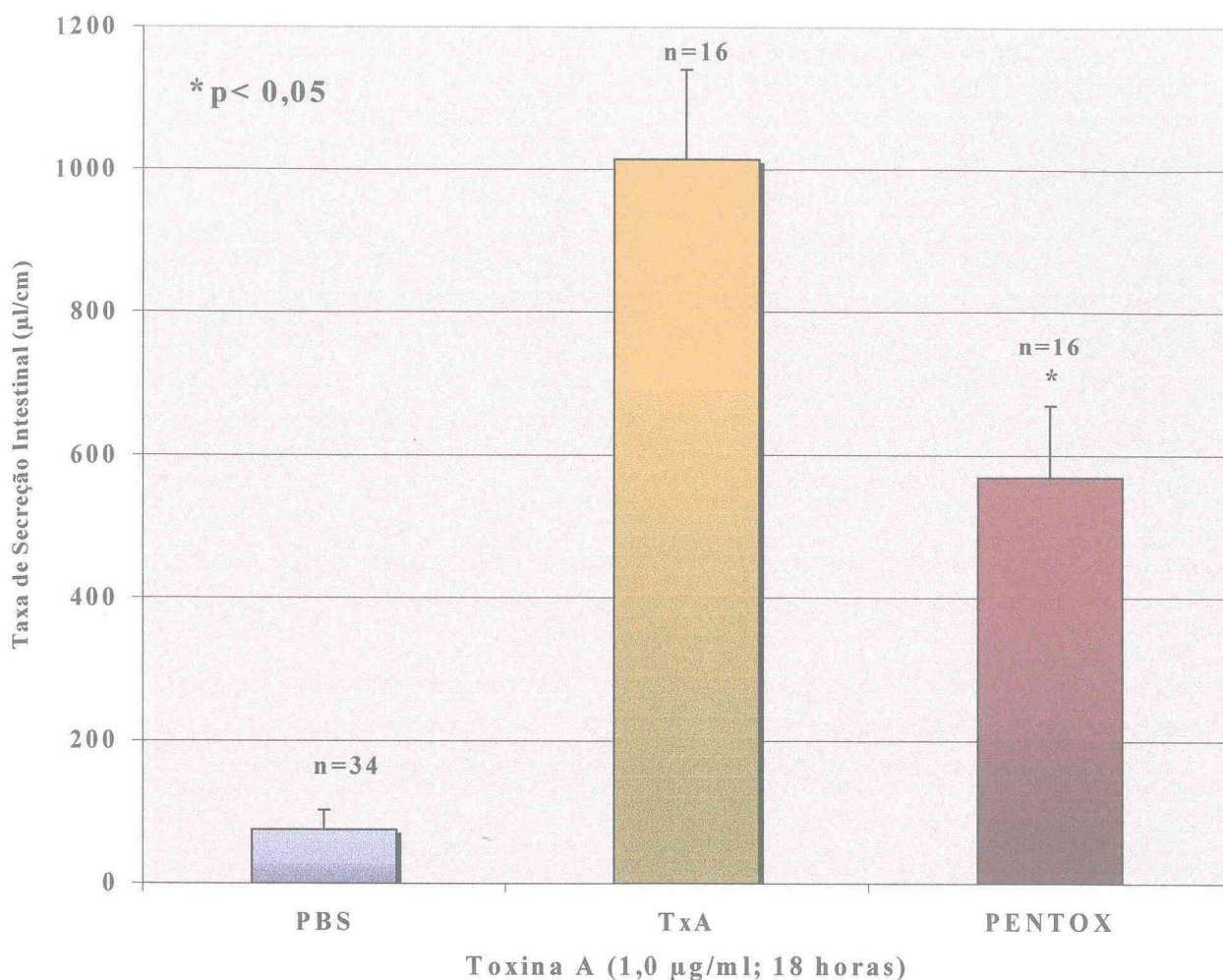


Figura 8: Pentoxifilina inibe parcialmente os fenômenos secretórios promovidos pela toxina A do *C. difficile* em alça isolada de coelho. Segundo os resultados obtidos, a pentoxifilina como inibidor da transcrição de RNAm de citocinas (IL-1, IL-6, quimiocinas) mostrou que o TNF- α participa significativamente do bloqueio secretório intestinal em analogia a outras drogas antiinflamatórias seletivas para inibição de ciclooxigenase (PENTOX $570,0 \pm 131,7$ Vs TxA $1013,9 \pm 93,0$ $\mu\text{l/cm}$). Os dados, expressos em $\mu\text{g/ml}$, estão plotados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n diz respeito ao número de alças isoladas nos grupos modulados.

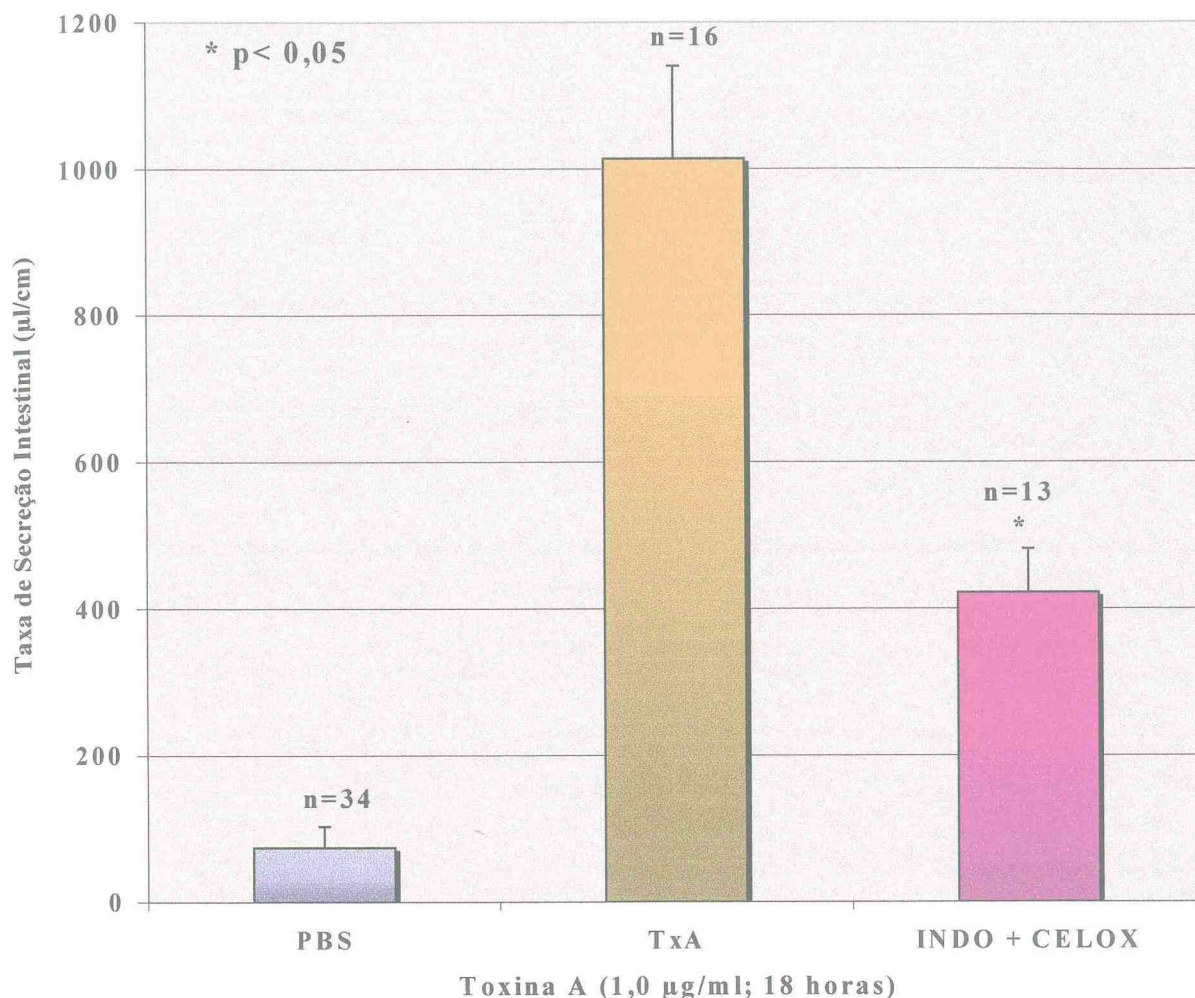


Figura 9: Associação farmacológica de indometacina e celecoxibe não bloqueou totalmente a secreção intestinal induzida pela toxina A do *C. difficile*. Celecoxibe e indometacina, associadas, não provocaram adição no bloqueio da taxa de secreção, ratificando que o pré-tratamento concomitante não levou a resultados compatíveis com aqueles obtidos com a dexametasona (INDO + CELOX $421,7 \pm 60,0$ Vs TxA $1013,9 \pm 93,0$ µl/cm). Os dados, expressos em µg/ml, estão plotados como média \pm SEM e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O *n* diz respeito ao número de alças isoladas nos grupos modulados.

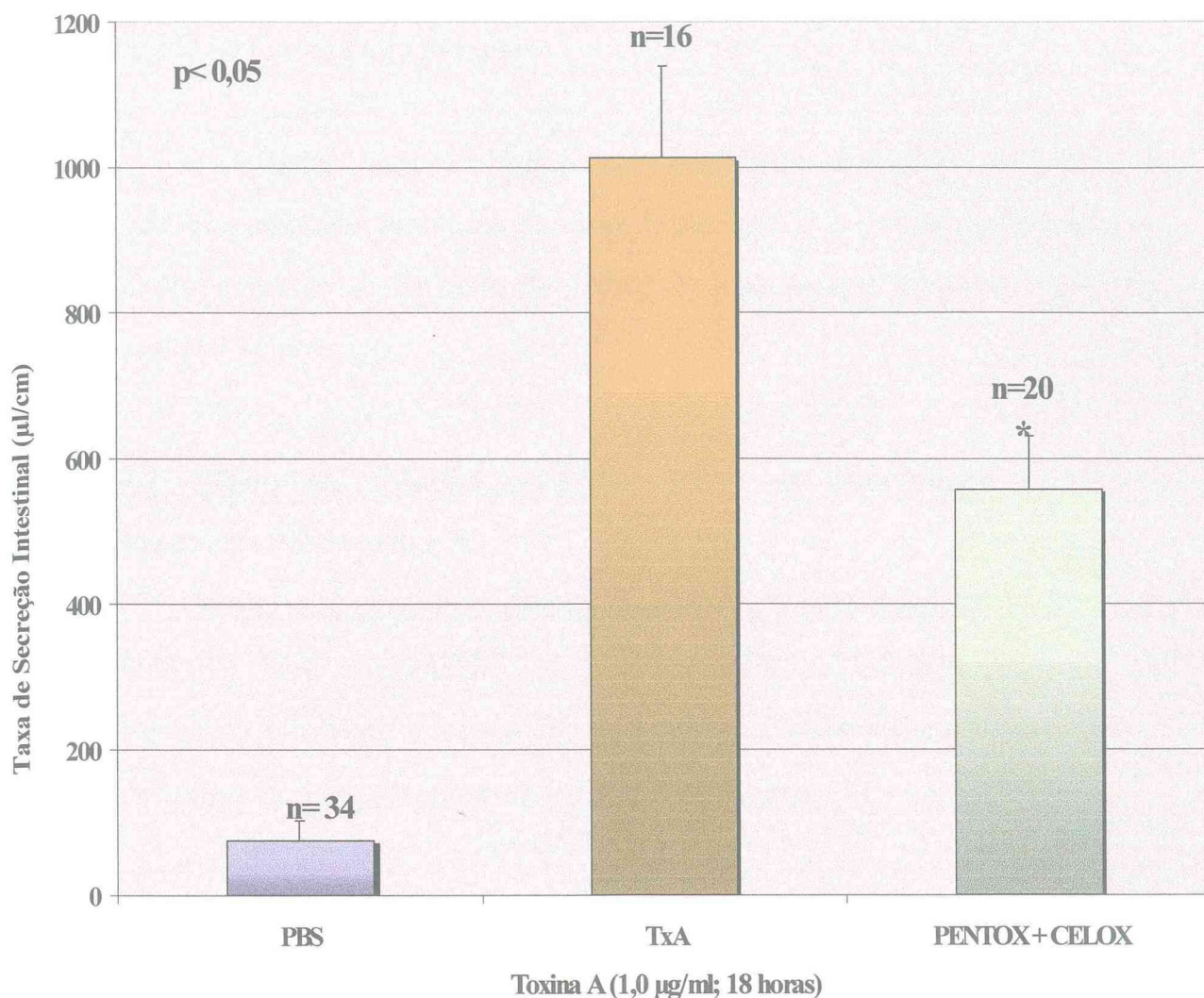


Figura 10: Efeito secretório em alça intestinal isolada de coelho através do pré-tratamento associado com celecoxibe e pentoxifilina. A associação entre celecoxibe e pentoxifilina promoveu inibição parcial das taxas de secreção intestinal, corroborando, ademais, com a ausência do sinergismo farmacológico esperado. Os resultados evidenciaram que o TNF- α participa de modo menos efetivo dos eventos secretórios, a despeito dos metabólitos oriundos da ação da COX-2 (CELOX + PENTOX $539,7 \pm 76,5$ Vs TxA $1034,9 \pm 93,0 \mu\text{l/cm}$). Os dados, expressos em $\mu\text{g/ml}$, estão plotados como média \pm SEM e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). O n diz respeito ao número de alças isoladas nos grupos modulados.

4.4 HISTOPATOLOGIA

O estudo histopatológico foi realizado a partir das lâminas confeccionadas das amostras de alças intestinais dos grupos experimentais, utilizando toxina A na dose de 1,0 μ g/ml com tempo de recuperação das alças de 18 horas.

4.4.1 Efeito da solução controle (PBS) na morfologia ileal sem tratamento com toxina A.

Os animais que receberam apenas PBS injetado mostraram suas alças intestinais bem preservadas com a espesura da camada mucosa. Foi observada, também, a ausência de exudação neutrofílica, bem como a morfologia geral apresentou-se inalterada. (Figura 11)

4.4.2 Alterações morfológicas, em íleo de coelho, induzidas pelo pré-tratamento de toxina A (1,0 μ g/ml) do *Clostridium difficile*.

Neste perfil histológico ficaram claras profundas alterações na morfologia do íleo. Na camada submucosa, foi observada a presença de exsudado de neutrófilos, predominantemente macrófagos e linfócitos, além de edema de submucosa. Nas camadas musculares, foi determinada exsudação de neutrófilos. (Figura 12)

4.4.3 Ação da dexametasona (0,5 mg/kg; s.c.) no efeito secretório induzido pela toxina A (1,0 μ g/ml) em íleo de coelho.

Foi observado discreto edema de submucosa, bem como infiltrado polimorfonuclear (neutrófilos e eosinófilos), e escassos plasmócitos e moderados linfócitos. A descamação epitelial mostrou-se discreta, aliada à preservação da mucosa bem evidente. (Figura 13)

4.4.4 Efeito de um inibidor específico de fosfolipase A₂ sobre a morfologia ileal após exposição à toxina A

Evidenciou-se intensa exsudação inflamatória de linfócitos na mucosa e a presença de poucos neutrófilos. Foram observadas alterações consideráveis, tais como: edema discreto da submucosa com exsudação de linfócitos, em maior magnitude, neutrófilos e eosinófilos, em menor escala.

Modificações vasculares puderam ser percebidas explícitas pela moderada dilatação dos vasos linfáticos e discreta congestão de vasos sanguíneos. (Figura 14)

4.4.5 Alterações histológicas no íleo de coelho sob pré-tratamento com indometacina (inibidor de COX-1 e COX-2) com exposição posterior à toxina A (1,0 µg/ml).

As lâminas revelaram vilosidades atentadamente diminuídas, embora menores do que o normal com preservação do epitélio e glândulas. Uma discreta exsudação inflamatória na mucosa, assim como apreciável exsudação de neutrófilos fora clarividente; na camada submucosa, ocorreu infiltração de neutrófilos e linfócitos. Escassos macrófagos foram distintos, aliado à presença de discreto edema. Constatou-se exsudação de neutrófilos através da camada muscular.(Figura 15)

4.4.6 Ação histopatológica da toxina A com tratamento prévio dos animais experimentais com meloxicam (droga antiinflamatória específica a COX-2)

Nas lâminas de íleo foram mostrados poucos eosinófilos. Exsudado de macrófagos, linfócitos e neutrófilos, na camada submucosa, além de discreto edema desta camada, caracterizaram este grupo estudado. Nas camadas musculares, houve moderada exsudação de neutrófilos.(Figura 16)

4.4.7 Efeito de um inibidor seletivo de cicloxigenase-2, celecoxibe, na constituição morfológica de íleo de coelho injetado com toxina A

Neste grupo estudado, foi observada hipotrofia intensa das vilosidades e da espessura da mucosa, como também, destruição na maior extensão. Moderado edema de submucosa e discreta exsudação de neutrófilos foram comumente observados. (Figura 17)

4.4.8 Alterações na morfologia normal de íleo de coelho diante de uma associação farmacológica entre celecoxibe e uma droga inibidora de transcrição para TNF-alfa (pentoxifilina)

Nota-se, nestas lâminas obtidas a partir deste protocolo experimental, o epitélio de revestimento e glândulas preservados; uma moderada reação inflamatória também foi observada neste grupo. Evidenciou-se o predomínio de linfócitos e plasmócitos sobre neutrófilos. (Figura 18)

4.4.9 Modulação farmacológica no efeito enterotóxico da toxina A (1,0 µg/ml) foi realizada pela associação de duas drogas antiinflamatórias celecoxibe e indometacina

Neste grupo, a associação entre celecoxibe e indometacina, há acentuada diminuição com quase desaparecimento de vilosidades com epitélio e glândulas relativamente preservados. Foram observados focos microscópicos de hemorragia

Moderada exsudação inflamatória, salientando a existência de linfócitos e neutrófilos na camada mucosa, como também discreto edema de submucosa caracterizaram as lâminas provenientes dos animais pré-tratados. Acúmulos linfóides (placas de Peyer), moderada exsudação predominantemente linfocitária na mucosa tornaram-se evidentes. (Figura 19)

4.4.10 Modulação farmacológica do montelucaste sódico, no efeito da toxina A (1,0 µg/ml) em íleo de coelho

Foi percebida presença de intenso exsudado intraluminal, constituído por polimorfonucleares, representados, especialmente por neutrófilos e linfócitos.

Uma discreta descamação epitelial também foi observada, além de um infiltrado submucoso. **(Figura 20)**



40 X



100 X

Figura 11. Íleo de coelho tratado com solução controle (PBS) sem a presença da toxina A

O painel A mostra as vilosidades intestinais, camadas mucosa e muscular normais em aumento de 40 vezes. Painel B mostra, no aumento de 100 vezes, a integridade das vilosidades do íleo. As lâminas das alças intestinais sem a injeção intraluminal de TxA demonstraram as vilosidades normais do intestino.

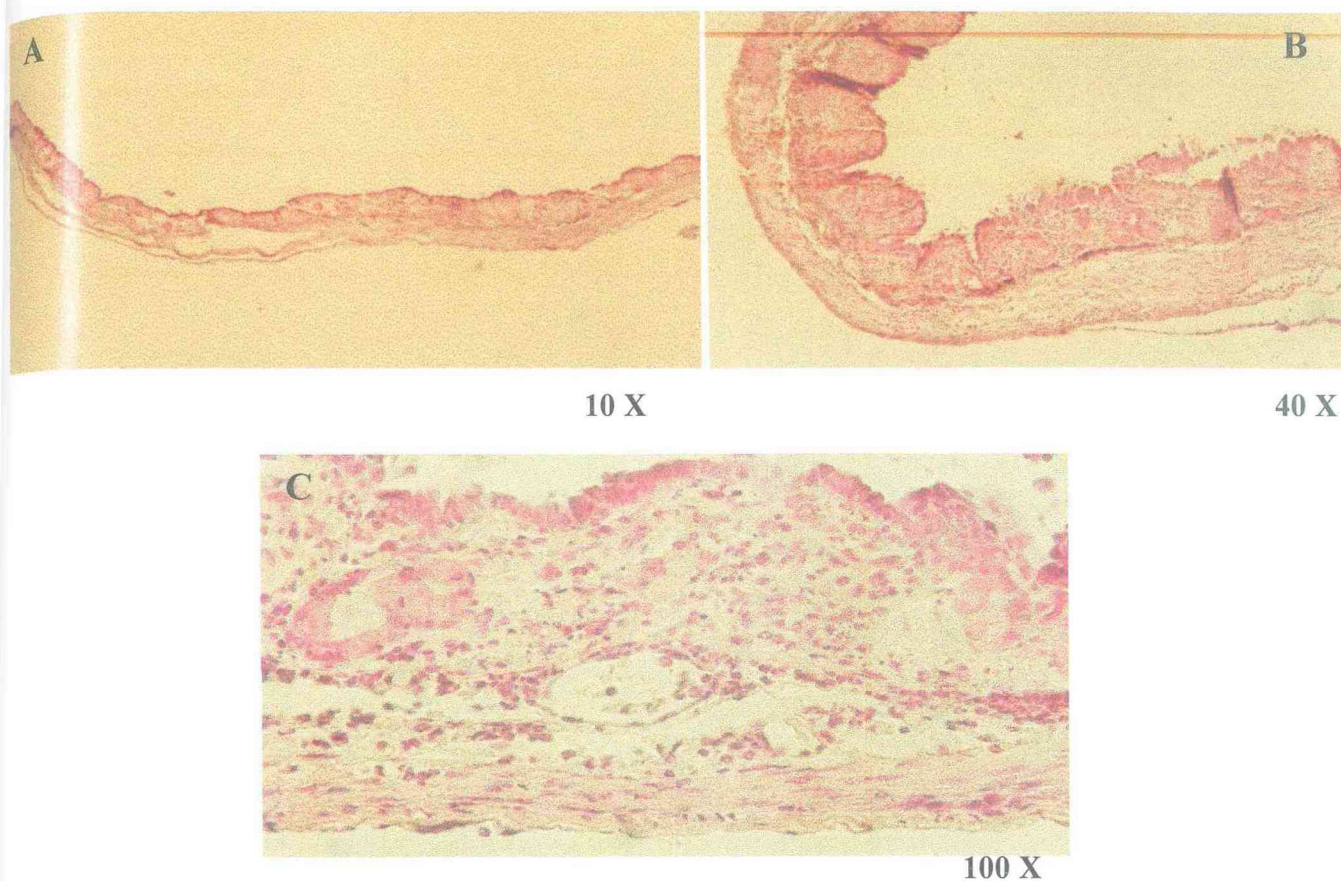


Figura 12. Íleo de coelho com injeção apenas de toxina A do *Clostridium difficile* com recuperação das alças após 18 horas.

As lâminas obtidas a partir das alças intestinais tratadas somente com injeção de TxA (1,0 $\mu\text{g/ml}$), revelaram uma acentuada diminuição das vilosidades (painel A) e da espessura da mucosa mostrado no painel B, assim há destruição do epitélio e glândulas (painel C). Observou-se, também, exsudação neutrofílica moderada de mucosa intestinal



10 X



40 X



100 X

FIGURA 13. Lâminas de íleo de coelho após pré-tratamento com antiinflamatório esteróide (dexametasona; 0,5 mg/kg; s.c.).

Os painéis A, B e C demonstram atividade farmacológica significativa na conservação da integridade das vilosidades do íleo injetado com toxina A (1,0 $\mu\text{g/ml}$; 18 horas). As lâminas de íleo, neste grupo experimental mostraram epitélio com discreta descamação, além da camada mucosa consideravelmente preservada.

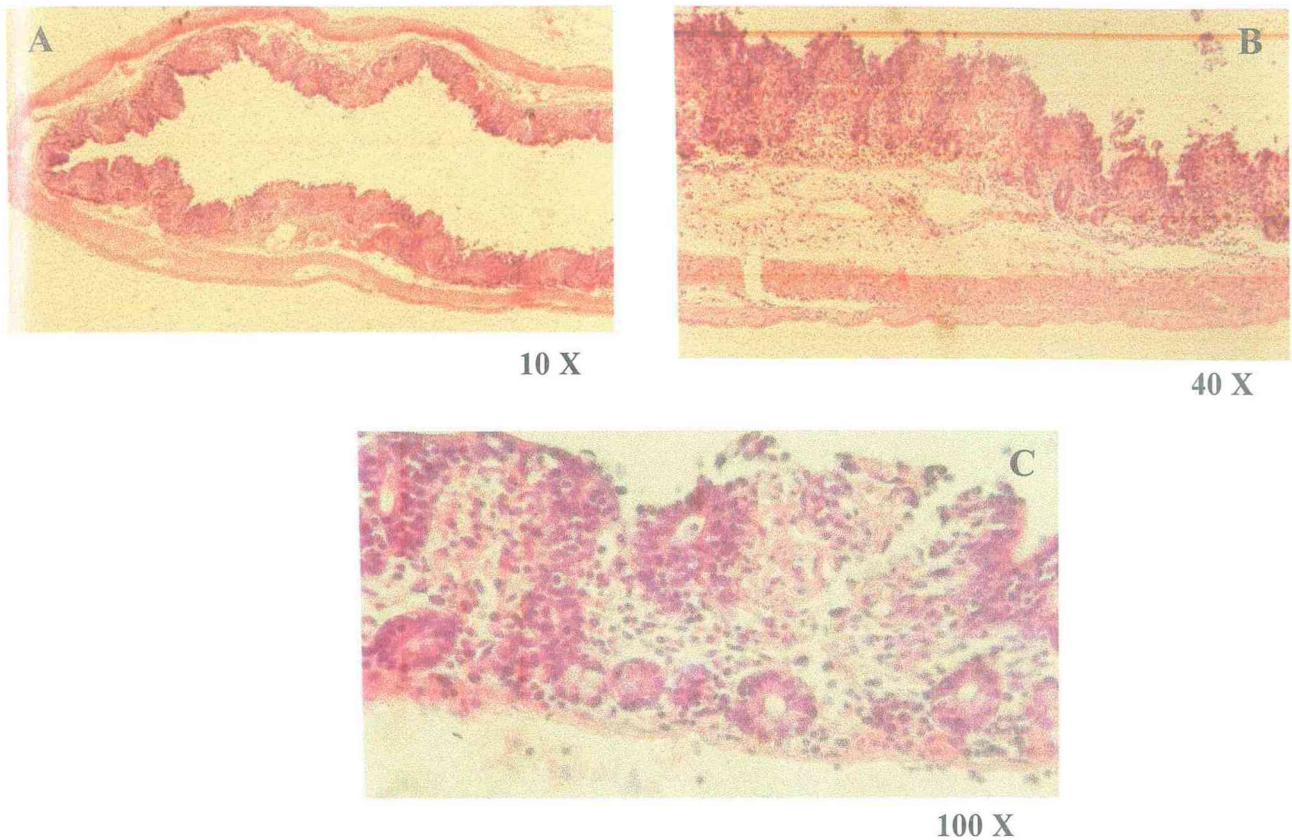


Figura 14. Corte histológico de alça de coelho onde os animais foram pré-tratados com um inibidor específico de fosfolipase A₂ (quinacrina; 20 mg/kg; s.c.)

Os grupos experimentais de modulação farmacológica com quinacrina são mostrados nos painéis A, B e C. Observou-se o desaparecimento das vilosidades, caracterizado por hipotrofia intensa, descamação epitelial apreciável, focos de erosão e hemorragias focais disseminadas na mucosa.

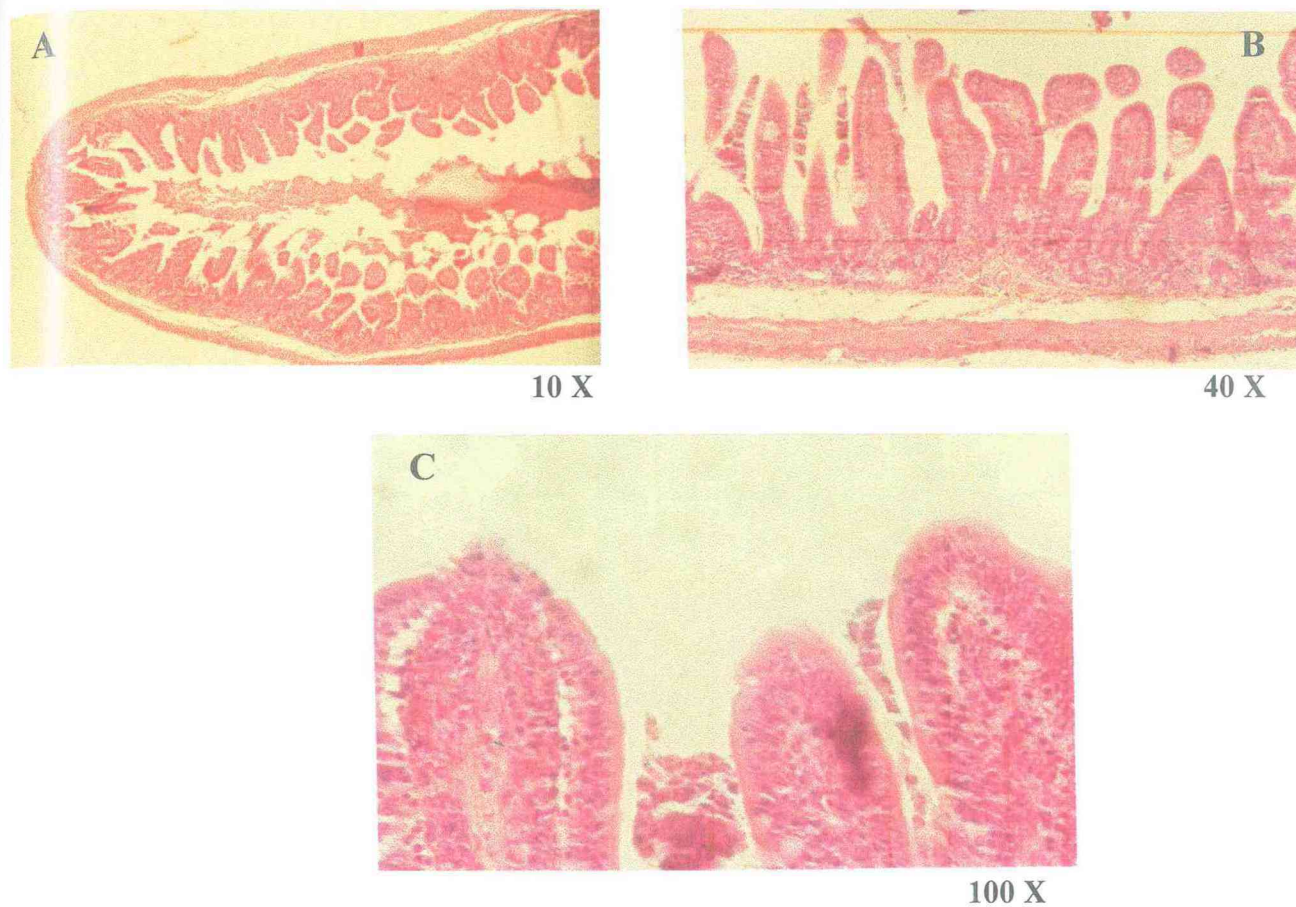


Figura 15. Íleo de coelho submetido ao pré-tratamento com inibidor inespecífico de ciclooxigenase (indometacina; 2,0 mg/kg; s.c.) e após injeção intraluminal de toxina A (1,0 μ g/ml; 18 horas)

Foi observada, nestas lâminas, uma discreta preservação das vilosidades (10X). No painel B, a diminuição das cristas é mais visível no aumento de 40 vezes. Em C, os detalhes mais apurados mostram conservação do epitélio e glândulas.

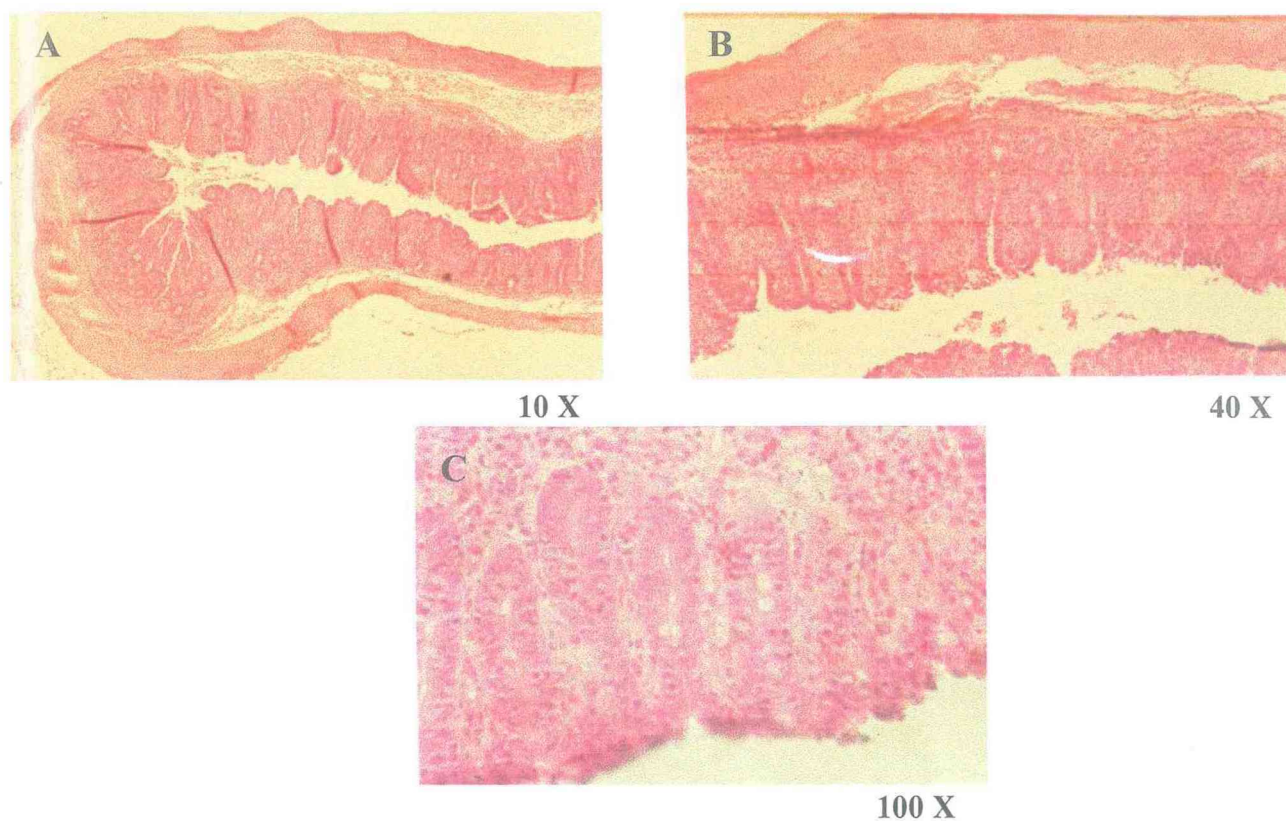


FIGURA 16. Alça intestinal de coelho pré-tratado com droga antiinflamatória inibidora seletiva de COX-2 (meloxicam; 20 mg/kg; v.o.) com posterior exposição à toxina A (1,0 μ g/ml; 18 horas).

No painel A, boa preservação das vilosidades intestinais é observada. no painel B, o aumento de 40 vezes evidencia as criptas ainda visíveis. em C, o epitélio mostra-se, apesar de nítido, inflamado, atentando ao fato de que neutrófilos encontravam-se em cariorrex.

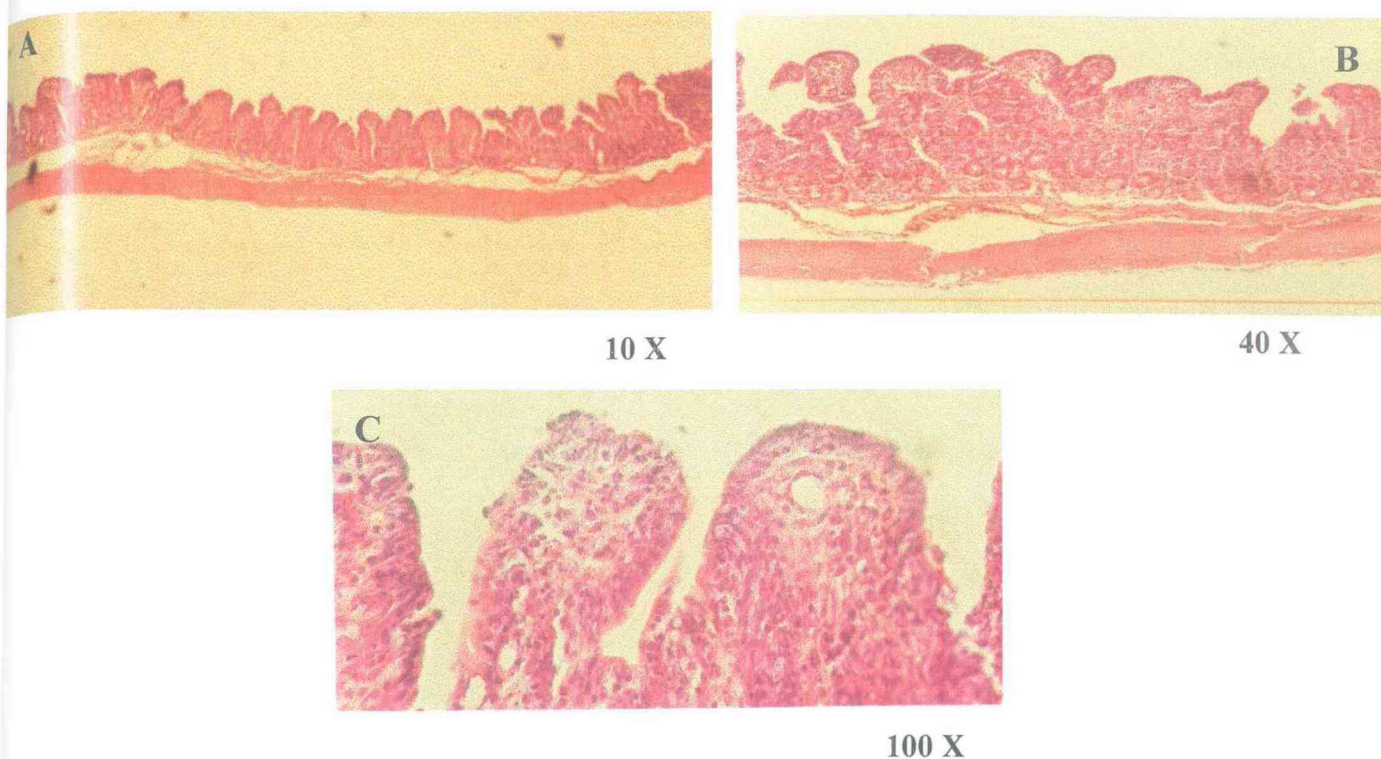


FIGURA 17. Íleo de coelho pré-tratado com inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe (20 mg/kg; v.o.) a após exposição à toxina A (1,0 $\mu\text{g/ml}$; 18 horas).

Evidenciou-se, nos painéis A (aumento de 10 vezes), B (aumento de 40X) e C aumento de 100 vezes, uma diminuição notória de mucosa, bem como menor exsudação de polimorfonucleares, devido à ação antiinflamatória da droga.

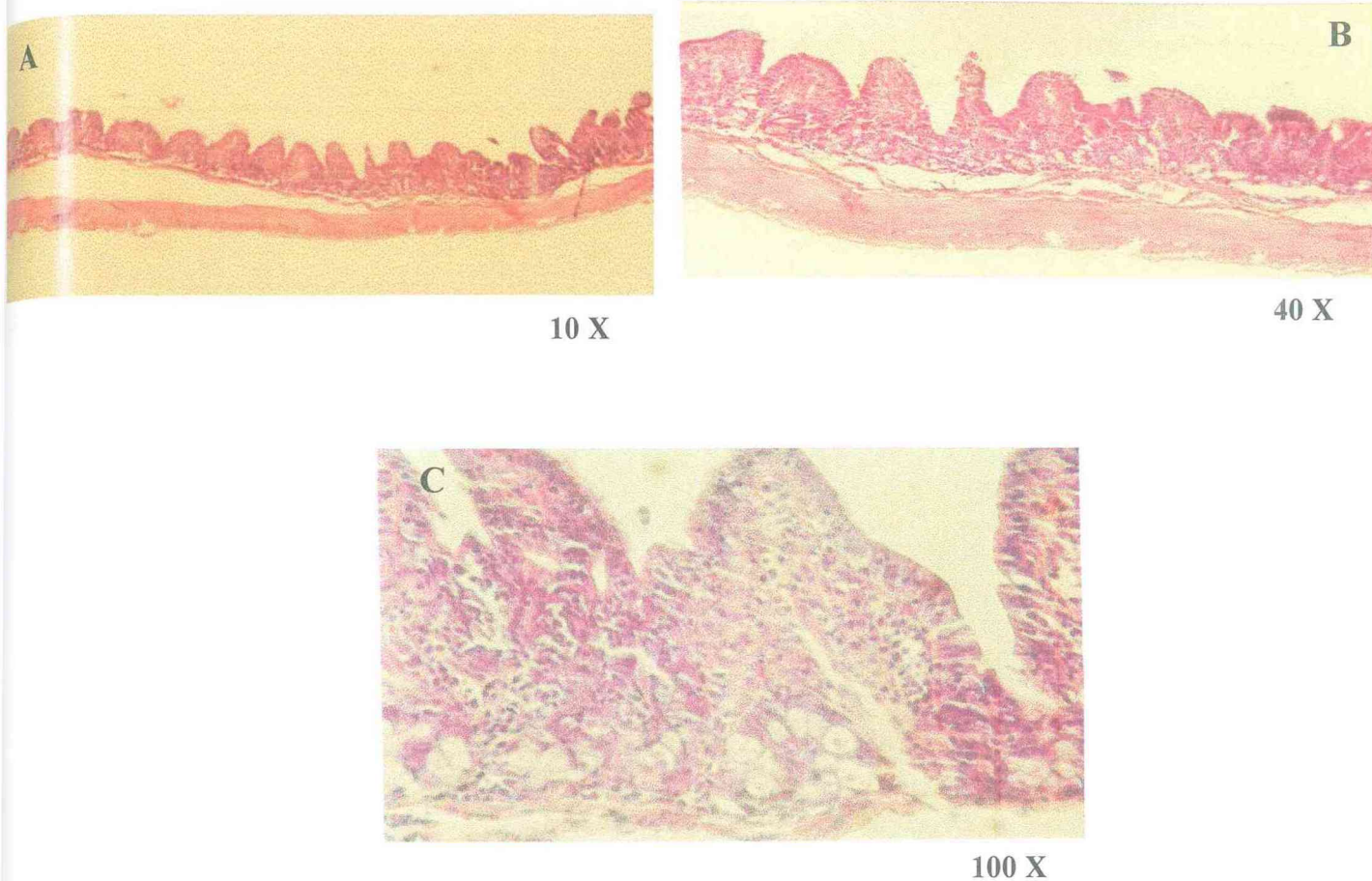


FIGURA 18. Alça intestinal mostrando corte histológico ileal com tratamento prévio antiinflamatório adotando associação entre um inibidor específico de cox-2 (celecoxibe; 20mg/kg; v.o.) e inibidor de transcrição de RNAm para TNF- α (pentoxifilina; 50mg/kg; s.c.), após exposição à toxina A (1,0 μ g/ml; 18 horas)

No painel A, assim como no painel B, a morfologia das vilosidades encontra-se alterada, fato mais detalhado presente no painel C. As lâminas oriundas da associação antiinflamatórias entre celecoxibe e pentoxifilina mostraram diminuição da altura das vilosidades intestinais.

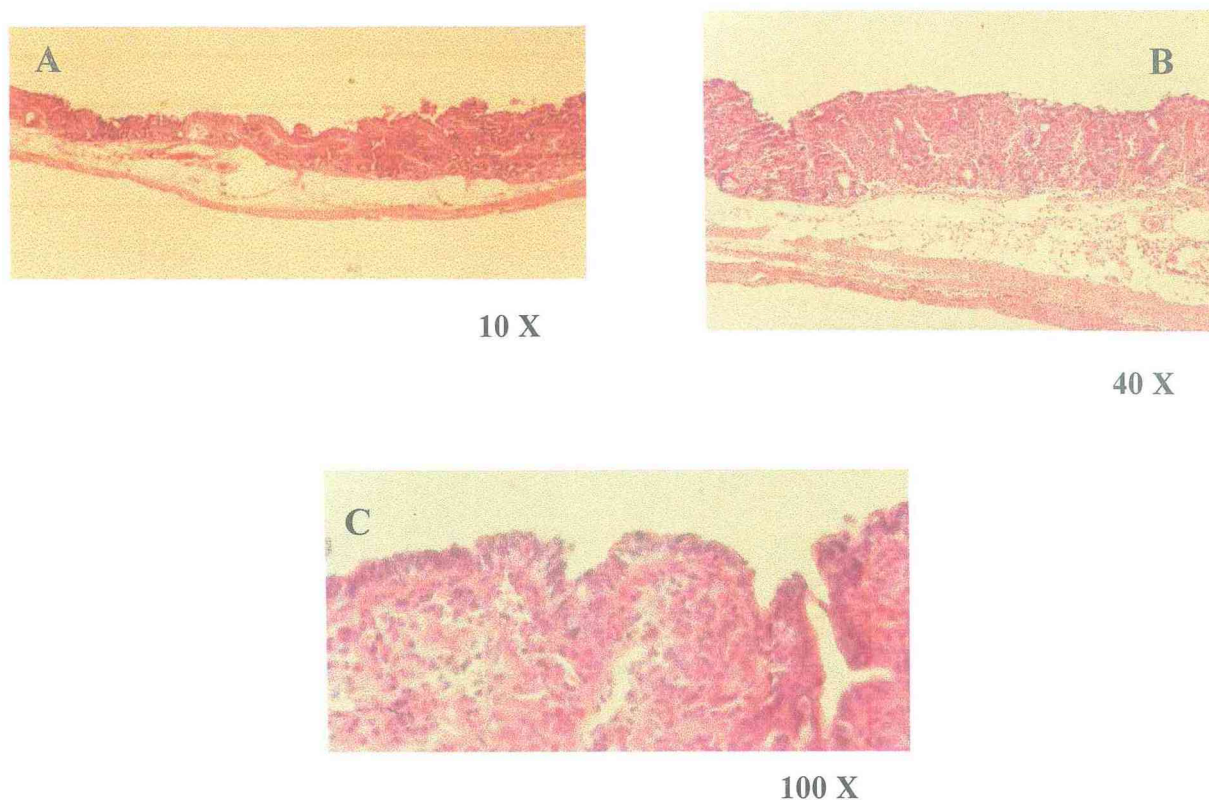


FIGURA 19. Íleo após pré-tratamento antiinflamatório com associação entre um inibidor específico de COX-2, celecoxibe e indometacina, após exposição à toxina A (1,0 $\mu\text{g/ml}$; 18 horas)

No painel A, em aumento de 10 vezes, observou-se o desaparecimento das vilosidades ileais. No painel B, é observado o mesmo fenômeno no aumento de 40 vezes. Em C, a exsudação inflamatória predominante é bem observada no aumento de 100vezes.

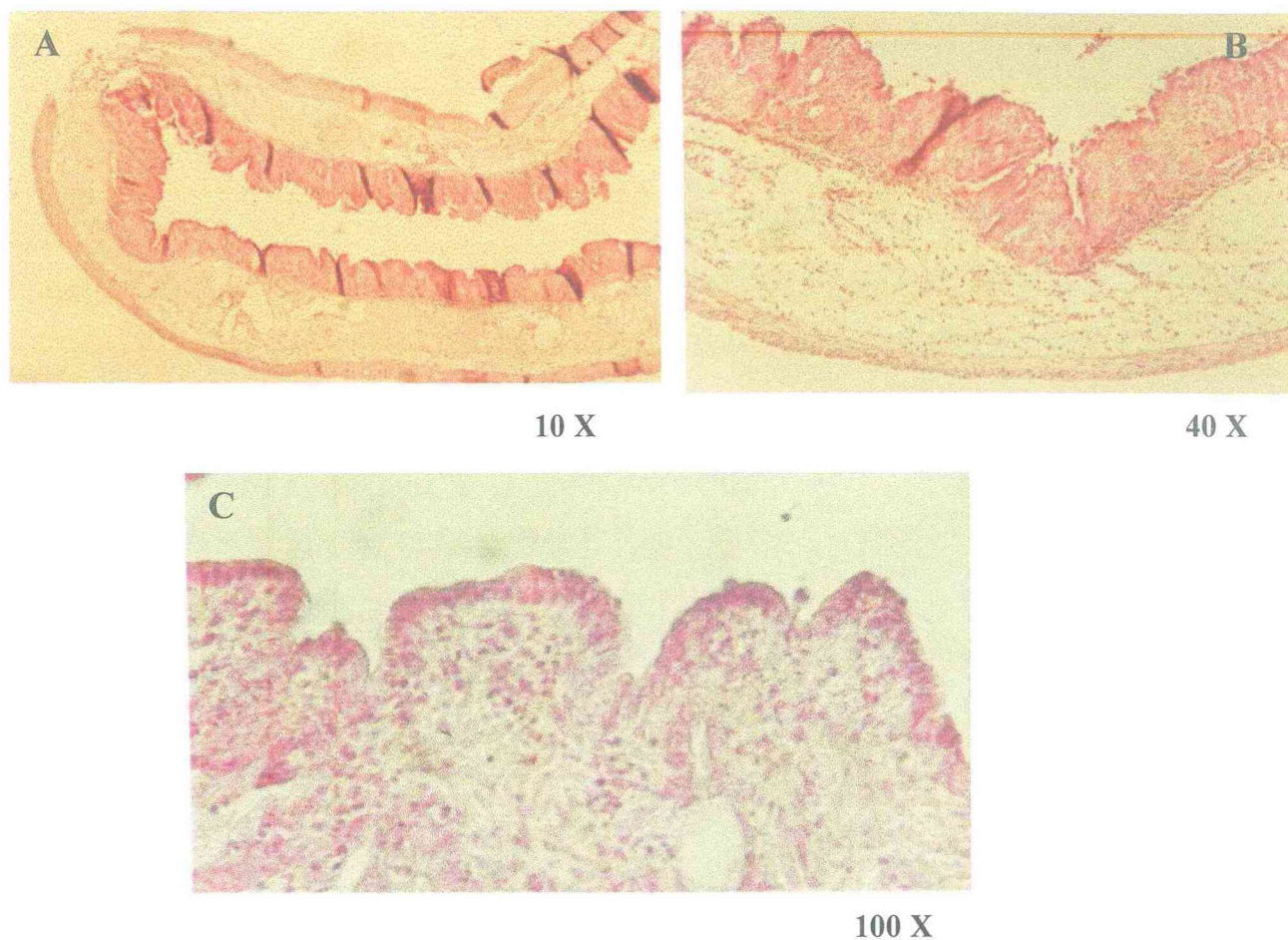


FIGURA 20. Íleo de coelho pré-tratado com inibidor de síntese de leucotrienos (montelucastesódico) a fim de se saber a participação de derivados da lipooxigenase no processo de secreção intestinal.

O epitélio intestinal apresenta discreta descamação com exsudato intraluminal, constituído principalmente por neutrófilos e linfócitos.

5. DISCUSSÃO

5.1 Atividade enterotóxica da toxina A do *Clostridium difficile*

Recentemente, a importância significativa das doenças diarreicas vem ganhando enfoque no tocante às interações destas células com a função gastrointestinal e a fisiopatologia diarreica (PERDUE e cols., 1991).

Nesse contexto, o *Clostridium difficile* toxigênico é reconhecido ser a principal causa de diarreia inflamatória associada a antibióticos e antineoplásicos (50-80%) e colite pseudomembranosa (90-100%), devido à ação biológica de suas toxinas A e B (BARTLETT, 1990; POTHOUKAKIS e cols., 1993; KNOOP e cols., 1993; JONES e cols., 1997; BLAIR e cols., 1997; SURAWICZ & MCFARLAND, 1999).

As atividades biológicas das enterotoxinas do *C. difficile* são bastante complexas e, ainda, não estão totalmente elucidadas. Em muitos estudos *in vitro* e *in vivo*, têm-se demonstrado os efeitos enterotóxicos particulares de cada toxina, envolvendo a participação de células inflamatórias na fisiopatologia e imunofarmacologia dessa doença agravante tanto ao homem quanto a animais domésticos (MITCHELL e cols., 1986; TRIADIFOLOPOULOS e cols., 1987; JONES e cols., 1989; GRYBOSKI e cols., 1991; ANGLIM & FARR, 1994; SAMORE e cols., 1996).

O fluido secretado durante o processo fisiopatológico deflagrado pelo *Clostridium difficile* é um exsudado inflamatório contendo linfócitos, neutrófilos, e proteínas séricas. A indução de secreção de fluido intestinal e inflamação, parece ser o principal mecanismo de diarreia em colites por *C. difficile* onde a toxina A induz necrose das células epiteliais e resposta inflamatória na *lamina propria* (TAYLOR e cols., 1981; WEDEL e cols., 1983).

A toxina A, portanto, assume um papel imprescindível na patogenicidade da enterocolite e suas conseqüências no processo inflamatório do epitélio intestinal. Ao contrário dos efeitos induzidos pela toxina do *Vibrio cholerae*, os processos fisiopatológicos induzidos pela toxina A levam a uma secreção profusa de exsudado rico em leucócitos e em eletrólitos, de difícil tratamento ao paciente (TRIADAFILOPOULOS e cols., 1989; TUCKER e cols., 1990; ROLFE, 1991; LIMA e cols., 1993; WILCOX, 1998).

A toxina do *Vibrio cholerae* representa um exemplo clássico de agente indutor de diarreia não-inflamatória cuja alta prevalência é preocupante, principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento na América Latina (LIMA e cols., 1994; KOO e cols., 1996; HAAN & HIRST, 2000).

5.2 Curvas dose-resposta e tempo efeitos da TxA em íleo de coelho

A investigação científica, principalmente nessa linha de pesquisa, acerca do papel de células do sistema imune no processo inflamatório, imunofisiologia e farmacologia do trato gastrointestinal resultou em importantes descobertas evidenciando aspectos fisiopatológicos antes obscuros. Nessa perspectiva, inicialmente foi demonstrado que a administração de toxina A do *Clostridium difficile*, em alça de coelho, *in vivo*, provoca potente secreção intestinal, semelhante àquela produzida pela toxina do *Vibrio cholerae* (Lima e cols., 1988; 1989).

Evidenciou-se, ainda, nesses estudos, um importante infiltrado inicial de células mononucleares na mucosa e submucosa ileal tratada com toxina A (Lima e cols., 1989). Portanto, foi sugerido o envolvimento dessas células, em especial macrófagos, na fisiopatologia da diarreia inflamatória provocada pelo *Clostridium difficile*.

Neste trabalho foi demonstrado que a toxina A do *Clostridium difficile* foi capaz de induzir secreção intestinal de maneira dose-dependente, utilizando as doses crescentes de 0.3; 0,5; 1.0 e 3.0 $\mu\text{g/ml}$, denotando que houve significância estatística nas taxas de secreção a partir de 1.0 $\mu\text{g/ml}$. Desde essas evidências, as doses seguintes também obtiveram resultados que ratificaram a idéia da dose-dependência da toxina A do *C. difficile*. A referida toxina mostrou-se, também, potente no tocante à secreção de fluidos intestinais.

Esses fatos foram, então referendados pelos resultados obtidos na construção da curva tempo-efeito, onde se observou, um incremento nas taxas de secreção intestinal, dependente do tempo de exposição da toxina A nos modelos de alça intestinal ligada em coelhos. Nos protocolos desenvolvidos, o tempo de recuperação do fluido intestinal variou de 6 a 18 horas, com a administração de toxina A intraluminalmente, recuperando as alças às 18 horas de injeção.

A partir de 12 horas, a taxa de secreção mostrou-se significativa: TxA= 673.6 $\mu\text{g/ml}$; n= 10; $p<0.05$; e, às 18 horas foi obtido o efeito máximo de secreção nos protocolos delineados (TxA= 1070.7 $\mu\text{l/cm}$, n=12; $p<0.05$). Tais médias de secreção faz-se ratificar a severidade de uma infecção induzida pelo *C. difficile* em pacientes (humanos ou animais domésticos) que estejam sob terapia antimicrobiana em longo prazo, assim como de indivíduos que desenvolvam a doença sem intervenção terapêutica imediata e/ou eficaz por parte dos órgãos de saúde, principalmente no nordeste brasileiro (COSTA RIVERA & DRASBEK, 1996; KATZ e cols., 1997).

5.3 Modulação farmacológica com drogas antiinflamatórias em alça isolada de coelho

Desde a descoberta, em 1991, de uma segunda isoforma da ciclooxigenase, houve considerável interesse na questão do porquê de duas isoformas serem necessárias e quais seus papéis durante eventos fisiológicos ou patológicos, ao mesmo tempo que drogas inibidoras específicas têm sido desenvolvidas e usadas para se investigar as funções fisiológicas de COX-1 e COX-2 (LANGENBACH e cols., 1995; MORHAN e cols., 1995; DINCUIHK e cols., 1995).

Tais estudos sugerem que há processos nos quais cada isoenzima esteja unicamente envolvida (agregação plaquetária para COX-1 e ovulação para COX-2), bem como, em outros eventos, ambas as isoformas participam concomitantemente (carcinogênese e inflamação). Estudos bioquímicos indicam que cada isoforma pode funcionar independentemente em vias distintas de biossíntese de prostanóides derivados de COX-1 e 2. Portanto, os únicos papéis fisiológicos para cada enzima podem ser atribuídos pelo conhecimento acerca das características bioquímica delas (SMITH & LANGENBACH, 2001)

Durante o processo inflamatório, aumentos drásticos na síntese de prostaglandinas na mucosa intestinal estão relacionadas com o curso de doenças diarreicas inflamatórias e colites experimentais (SHARON e cols., 1978; RACHMILEWITZ e cols., 1989). No entanto, o sistema imune intestinal desempenha um papel protetor contra a injúria intestinal e a *downregulation* da expressão de citocinas pró-inflamatórias (KNUDSEN e cols., 1986; MARCINKIEWICZ, 1991).

Durante o processo inflamatório deflagrado por ocasião de episódios de doenças diarreicas, ocorre expressão considerável de prostaglandina E₂ (PGE₂), um agente que aumenta secreção de sais e água no intestino, induzindo aumento de secreção de cloreto mediado por AMPc e inibindo absorção de água e cloreto de sódio. A PGE₂ é um metabólito do ácido araquidônico e é sintetizada pela via da ciclooxigenase (COX),

COX-1 medeia regeneração epitelial em um modelo de injúria intestinal induzida por irradiação em camundongos o que sustenta a teoria do papel citoprotetor atribuído à enzima na inflamação intestinal (COHN e cols., 1997). Contudo, camundongos deficientes em COX-1 não exibiram qualquer evidência de injúria gástrica espontânea na ausência de estímulos inflamatórios e são mais resistentes à ação de drogas antiinflamatórias na indução de danos gástricos, quando comparados com animais normais. Tais observações sugerem que COX-1 não medeia exclusivamente proteção gastrointestinal, além de atuar em consonância com outras moléculas protetoras (LANGENBACH, 1995).

Alguns pesquisadores têm atribuído a ação antiinflamatória de DAINES à inibição de COX-2, com os efeitos adversos dessas drogas sobre a mucosa gastrointestinal advindos do bloqueio da atividade de COX-1 (CHAN, 1995). Essa associação de COX-2 com eventos inflamatórios levaram ao desenvolvimento de inibidores seletivos de COX-2 os quais se esperam desempenhar propriedades antiinflamatórias sistêmicas, aliado à indução de efeitos deletérios mínimos. Inibidores seletivos de COX-2 reduzem inflamação experimental em bolsas de ar subcutânea e edema de pata, sem, contudo, causar injúria gastrointestinal, em contraste a outras drogas antiinflamatórias não-esteróides (SEIBERT, 1994; MASFERR, 1994).

Drogas antiinflamatórias não-esteróides (DAINES) desempenham um papel imprescindível na modulação da inflamação e dor causadas por estímulos tanto de cunho infeccioso quanto de outra natureza. A literatura tem citado trabalhos onde o uso de inibidores de COX-2, tais como celecoxibe, assim como o rofecoxibe e o meloxicam tem trazido benefícios advindos da baixa toxicidade, em comparação com outras DAINES tradicionais. Os efeitos colaterais entre os inibidores seletivos de COX-2 e as DAINES tradicionais não diferem significativamente, não obstante, o

tratamento com os primeiros mostrou-se efetivo na redução da dor e inflamação, além de diminuir a ocorrência de úlceras gastrointestinais (NOBLE e cols., 2000).

Partindo desse princípio, nosso trabalho demonstrou, através da modulação farmacológica do processo inflamatório induzido pela toxina A, a participação dos mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia dessa doença diarreica. Para tanto, os protocolos proferidos foram conduzidos a fim de se obter resultados os quais fossem mais fidedignos no tocante ao bloqueio da secreção intestinal pelo pré-tratamento com drogas antiinflamatórias de especificidades diferentes.

O grupo experimental pré-tratado com dexametasona revelou resultados dando conta de um bloqueio total de secreção nas alças isoladas após injeção de toxina A, visto que tal droga é um composto hábil em inibir a transcrição de RNAm de várias citocinas oriundas de macrófagos, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 β , interleucina-8, bem como inibidora da síntese de fosfolipase A₂ (BEUTLER e cols., 1986; BARNES & ADCOCK, 1993). Nossos resultados refletiram claramente sua eficácia farmacológica, atingindo um elevado índice de bloqueio da secreção intestinal, em torno de 83%, fato este podendo, também, ser atribuído à inibição de fosfolipase A₂, como evento sinérgico adicional no que concerne ao alto poder antiinflamatório da dexametasona.

Outro protocolo de inibição da resposta inflamatória focalizou, então, uma inibição mais específica da enzima fosfolipase A₂, através do pré-tratamento com quinacrina. Tal droga bloqueou de forma menos específica as taxas de secreção intestinal, em analogia com a dexametasona, indicando a participação de eicosanóides na fisiopatologia induzida pela toxina A

A fim de se investigar o grau de envolvimento de ambas as isoformas da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), os protocolos seguintes rezaram, também a administração prévia de fármacos mais ou menos

específicos a COX-2, cujo mecanismo de ação é intrínseco ao quadro patológico envolvendo o processo inflamatório provocado pela toxina A.

A indometacina, um inibidor menos específico, promoveu um bloqueio parcial nas taxas de secreção intestinal, visto que também é capaz de inibir a isoforma constitutiva da ciclooxigenase (COX-1). Quando se recuperou o fluido intestinal para posterior determinação das taxas de secreção, havia evidências de derrame hemorrágico onde os líquidos coletados em outros grupos estudados, em contraste, mostraram-se bastante opacos e, em algumas vezes, límpidos.

As drogas antiinflamatórias não-esteróides inibem a síntese de prostaglandinas e tromboxanos, em particular, o tromboxano A₂, podendo levar a hemorragias, perda de proteínas e disfunção ileal (SORENSEN, 1989). Além disso, a indometacina, além de induzir focos hemorrágicos, tem efeitos antitróficos, reduzindo a espessura do íleo, assim como colaborando com a diminuição do índice de mitose nos vários segmentos da mucosa intestinal (URIBE e cols., 1987). O bloqueio parcial se mostrou evidente pelos resultados: INDO= 587.4 Vs. TxA 1013.9 μ l/cm; $p < 0,05$, com percentual de inibição de 42%.

Outras drogas inibidoras, mais específicas de COX-2, mostraram um bloqueio mais significativo, visto que ambos os protocolos utilizando meloxicam e celecoxibe, mostraram resultados refletidos na redução das taxas de secreção intestinal, onde a expressão de ciclooxigenase-2, possivelmente, está envolvida na gênese desse fenômeno. Tal fato é comprovado quando houve o pré-tratamento com ambas as drogas e se observou, também, um bloqueio parcial na secreção intestinal, com margem estatística semelhante, porém com diferença no aspecto dos fluidos recuperados quando comparados com grupos pré-tratados com indometacina.

O celecoxibe conseguiu, por sua vez, inibir de modo mais eficiente a enzima ciclooxigenase-2 em contraste com o meloxicam: CELOX= 451.0 Vs. TxA 1013.9 $\mu\text{l}/\text{cm}$; $p < 0,05$, perfazendo um bloqueio de 56%. Por outro lado, o meloxicam mostrou um bloqueio percentual de 38.75%, obtendo os resultados de: MELOX= 621.0 Vs. TxA 1013.9 $\mu\text{l}/\text{cm}$; $p < 0,05$.

Alguns mediadores pró-inflamatórios, principalmente aqueles macrófago-derivados, incluindo o fator de necrose tumoral alfa podem causar secreção intestinal de modo significativo (KANDIL e cols., 1992). Sendo assim, um *screening* foi proposto a fim de se estudar a participação deste mediador inflamatório no processo fisiopatológico induzido pelo *Clostridium difficile*.

Foi realizado, portanto, um protocolo para avaliar a participação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), com o pré-tratamento dos animais com uma droga inibidora da síntese de TNF- α , pentoxifilina, a média de secreção intestinal revelou um bloqueio parcial, contudo significativo, confirmando sua colaboração na amplificação pró-inflamatória da doença diarreica provocada pelo *Clostridium difficile* nos modelos experimentais *in vivo*. Seus resultados sustentam essa afirmação: PENTOX= 569.3 Vs. TxA 1013.9 $\mu\text{l}/\text{cm}$; $p < 0,05$, inibindo em 44% a ação da toxina A no íleo de coelho.

Delineado, então, o envolvimento dos metabólitos do ácido araquidônico, da COX-2 e do TNF- α , assim como o bloqueio dos mesmos por drogas com especificidades diferentes, utilizou-se, a associação dessas drogas com o propósito do estudo mais agudo acerca da participação tanto de COX-2 quanto de TNF- α em modelos animais, com ambos os pré-tratamentos de um grupo com celecoxibe e pentoxifilina e outro com indometacina e celecoxibe. Os resultados mostraram que a associação de celecoxibe com indometacina mostrou-se mais significativa ($p < 0,05$),

abrangendo um percentual de bloqueio da secreção intestinal aproximadamente de 58%.

5.4 Estudo histopatológico do efeito enterotóxico da toxina A em íleo de coelho

Lima e colaboradores (1988) realizaram um estudo histológico acerca dos efeitos deletérios da toxina A (1 μ g) do *Clostridium difficile* em íleo de coelho após 2 horas de exposição. Seus resultados evidenciaram ruptura nas vilosidades com apenas algumas células basais sobreviventes.

A literatura tem citados muitos trabalhos acerca das atividades biológicas de ambas as toxinas A e B do *Clostridium difficile* em modelos *in vitro* e *in vivo* (LIMA e cols., 1988; ROCHA e cols., 1998; ALCANTARA e cols., 2001). A toxina A, portanto, induz um processo inflamatório intenso na mucosa intestinal, conseqüentemente, conduzindo a um aumento na secreção intestinal, necrose tecidual, ativação de macrófagos e mastócitos, culminando com uma acentuada migração e infiltração neutrofílica local (LYERLY e cols., 1982; LIMA e cols., 1989; BURAKOFF e cols., 1995; ROCHA e cols., 1997).

Segundo Bartlett (1986) os sinais e sintomas clínicos da colite pseudomembranosa estavam associados a lesões macroscópicas e histológicas da mucosa colônica, apresentando uma freqüência de 90-95% de diarreia aquosa, 5-10% de diarreia sanguinolenta e hipoalbuminemia.

Em um trabalho recente, Alcantara e colaboradores (2001) demonstraram, através de técnicas de imunohistoquímica, que a toxina A é capaz de induzir a expressão de COX-2 em modelos de alça isolada de coelhos. Neste trabalho também ficou evidenciado que as alças dos animais pré-tratados com drogas antiinflamatórias seletivas à COX-2 conseguiram manter um grau satisfatório de preservação estrutural. Em nosso grupos estudados tais resultados comprovaram a verdade plena destes fatos, visto

que, nos eventos secretórios, o tratamento prévio antiinflamatório conseguiu reduzir as taxas de secreção intestinal, ao mesmo tempo que a conservação da arquitetura ileal, também, foi conseguida.

A associação de um plano terapêutico baseado em DAINes junto à antibioticoterapia vem configurando-se numa alternativa viável sob o prisma da minimização dos efeitos maléficos de terapias antimicrobianas extensivas ou indiscriminadas as quais resultam em surtos de doenças diarreicas, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva. Tal atitude clínica tornar-se-ia imprescindível na recuperação satisfatória de muitos pacientes dos quais a realidade estatística é impiedosa e termina por alarmar tenebrosamente a comunidade científica.

Muitos eventos, porém, permanecem ainda pouco esclarecidos no que concerne à compreensão total da fisiopatologia inflamatória e secretória da toxina A do *Clostridium difficile*. A pesquisa, como ferramenta básica para a elucidação deste processo, deve ser seqüenciada a fim de que os profissionais de saúde tenham a seu dispor alternativas terapêuticas eficazes.

6. CONCLUSÕES

I. A toxina A do *Clostridium difficile* é capaz de promover uma potente secreção intestinal em modelos experimentais, *in vivo*, em íleo isolado de coelho a qual foi dose e tempo dependentes.

II. O estudo da modulação farmacológica do efeito da toxina A no intestino sugere a participação ativa de COX-2 na fisiopatologia do processo inflamatório induzido pela toxina, confirmada pela diminuição das taxas de secreção intestinal com drogas mais seletivas à inibição da referida enzima e redução no grau de lesão da mucosa intestinal.

III. Os leucotrienos, possivelmente, não estão envolvidos no processo secretório induzido pela toxina A, visto que o bloqueio de lipooxigenase não resultou na inibição significativa de secreção intestinal.

IV. A toxina A do *Clostridium difficile* provoca extensas e severas lesões teciduais na mucosa intestinal, variando desde destruição de vilosidades a infiltração neutrofílica evidentes, e indução de migração de células do sistema imune.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, H.R.. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**; p. 622-643; 7th Edition; Ames, Iowa; Iowa Press; 1997.

AKTORIES, K.; JUST, I. Monoglucosylation of low-molecular-mass GTP-binding Rho proteins by clostridial cytotoxins. **Trends Cell. Biol.**, v. 5, p. 441-443, 1995.

AKTORIES, K. Bacterial toxins that target Rho proteins. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 827-829, 1997.

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. **J. Infect. Dis.**, v. 184, p. 648-652, 2001.

AL-EIDAN, F. A. *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in hospitalized patients. **J. Clin. Pharm Ther.** v. 25, n.2, p. 101-109, 2000.

ALPERT, G.; BELL, L. M.; KIRKPATRICK, C. E., *et al.* Cryptosporidiosis in a day-care center. **N. Engl. J. Med.** v. 311, p. 860-861, 1984.

ANAYA-VELAZQUEZ, F.; JACKSON, G. D. F.; ERNT P. B.; UNDERDOWN, B. J.; GAULDIE, J. Cytokines in the liver and gastrointestinal tract, p. 315-23. *In*: OGRA, P. L.; LAMM, M. E.; MCGHEE, J. R.; MESTECKY, J.; STROBER, W.; BIENENSTOCK; J.

(Eds.). **Handbook of mucosal immunology**. Academic Press, San Diego: California, 1995.

ANGLIM, A. M.; FARR, B. M. Nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 7, p. 602-608, 1994.

AVERY, R. M.; SHELTON, A. P.; BEARDS, G. M.; OMOTADE, O. O.; OYEJIDE, O. C.; OLALEYE, D. O. Viral agents associated with infantile gastroenteritis in Nigeria: relative prevalence of Adenovirus Serotypes 40 and 41, Astrovirus, and Rotavirus Serotypes 1 to 4. **J. Diarrhoeal Dis. Res.** v.10, p. 105- 108, 1992.

BALDACINI, O.; GIRARDOT, R.; GREEN, R. G. A.; MONTEIL, H. comparative study of immunological properties and cytotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin B and *Clostridium sordellii* toxin L. **Toxicon**, v. 30, p. 129-40, 1992.

BANNO, Y.; KOBAYASHI, T.; KONO, H.; WATANABE, K.; UENO, K.; NOZAWA, Y. Biochemical characterization and biological actions of two toxins (D-1 and D-2) from *Clostridium difficile*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, n. 1, S11-19, 1984.

BARBUT, F. Epidemiology of *Clostridium difficile* nosocomial infections. **Presse. Med.**, v. 25, n. 8, p. 385-392, 1996.

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

BARRETT, K. E. Mechanisms of inflammatory diarrhoea. **Gastroenterology**, v. 103, p. 710-711, 1992.

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

BARTLETT, J.G. *In*: "Infection Diarrhea" (S.L. Ed.). Blackwell Scientific Publications, Boston; pp. 175-178, 1986.

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

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

BAVERUD, V.; GUSTAFSSON, A.; FRANKLIN, A. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. **Equine Vet. J.**, v. 29, p. 279-284, 1997.

BELTINGER, J. Immunological testing for occult blood in patients with acute infectious diarrhea. Can it improve the specificity of the guaiac test? **Dig. Dis. Sci.**, v. 42, n. 2, p. 366-371, 1997.

BERN, C.; MARTINES, J.; DE ZOYSA, I.; GLASS, R. I.; The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. **Bull WHO.** v. 70, p. 705- 714, 1992.

BEUTLER, B.; KROCHIN, N.; MILSARK, I. W.; LUEDKE, C.; CERAMI, A. Control of cachetin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. **Science.**, v. 232, p. 977-980, 1986.

BIANCHINI, H. M. Update on Pan-American research on anaerobes: the situation in Argentina. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, n. 2, p. 244-245, 1997.

BIGNARDI, G. E. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. **J. Hosp. Infect.**, v. 40, n. 1, p. 1-15, 1998.

BISSERET, F.; KEITH, R.; RIHN, B.; AMIRI, B.; *Clostridium difficile* toxin B: characterization and sequence of three peptides. **J. Chromat.**, v. 490, p. 91-100, 1989.

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.**, v. 147, p. 3060-3065, 1991.

BJARNASON, I.; HAYLLAR, J.; MACPHERSON, A. J.; RUSSELL, A. S. Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. **Gastroenterology.**, v. 104, p. 1832-1847, 1993.

BLAIR, B. S.; JARVIS, W. R.; SHEVCHUK, Y. M., Recurrent *Clostridium difficile* diarrhea associated with Mitoxantrone and Etoposide: A Case Report and Review. **Pharmacotherapy.**, v. 17, n. 3, p. 606-611, 1997.

BOBAK, D. A.; GUERRANT, R. L. New developments in enteric bacterial toxins. **Adv. Pharmacol.**, v. 23, p. 85-108, 1992.

BONGAERTS, G. P.; LYERLY, D. M. Role of toxins A and B in the pathogenesis of *Clostridium difficile* disease. **Microb. Pathog.**, v. 54, n. 1, p. 1-12, 1994.

BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. Anestésicos intravenosos e outros parenterais. ____ **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**; 6. Ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1992, p. 168-218.

BORRIELLO, S. P. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 41, p. 13-19, 1998.

BRANDER, G. C.; PUGH, D. M.; BYWATER, R. J.; JENKINS, W. L. **Veterinary Applied Pharmacology & Therapeutics** p. 370-71; 5th Edition, Bailliere Tindall; 1991.

BRAR, H. S.; SURAWICZ, C. M: Pseudomembranous colitis: An update. **Can. J. Gastroenterol.**, v. 14, p. 51-69, 2000.

BRINSON, R. R.; KOLTS, B. E.: Hypoalbuminemia as an indicator of diarrheal incidence in critically ill patients. **Crit. Care Med.**, v. 15, p. 506-509, 1987.

BROWN, R. B.; COLODNY, S. M.; DRAPKIN, M. S. One-day prevalence study of nosocomial infections, antibiotic usage, and selected infection control practices in adult medical/surgical intensive care units in the United States. The Fifth annual meeting of the Society for Healthcare

Epidemiology, San Diego, California, April 2-5, 1995. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, 1995.

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**, v. 109, p. 348-354, 1995.

BURKE, A.; CUNHA, M. D. Nosocomial Diarrhea **Care Clinics**, v. 14, n. 2, p. 329-338, 1998.

CALDERARO, V.; GIOVANE, A.; DE SIMONE, B.; CAMUSSI, G.; ROSSIELLO, R.; QUAGLIUOLO, L.; SERVILLO, L.; TACCONE, W.; GIORDANO, C.; BALESTRIERI, C. Arachidonic acid metabolites and chloride secretion in rabbit distal colonic mucosa. **Am. J. Physiol.**, v. 261, p. 443-450, 1991.

CALDERÓN, G. M.; TORRES-LÓPEZ, J.; LIN, T. J.; CHAVEZ, B.; HERNÁNDEZ, M.; MUÑOZ, O.; BEFUS, A. D.; ENCISO, J. A. Effects of Toxin A from *Clostridium difficile* on Mast Cell Activation and Survival. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 6, p. 2755-261, 1998.

CAINES, C.; GILL, M. V.; CUNHA, B. A.: Non- *Clostridium difficile* nosocomial diarrhea in the intensive care unit. **Heart & Lung**, v. 26, p. 83-110, 1997.

CASTAGLIUOLO, I.; . LAMONT, J. T; LETOURNEAUR, R.; KELLY, C.; O'KEANE, J. C.; JAFFER, A.; THEOHARIDES, T. C.; POTHOUKAKIS, C. Neuronal involvement in the intestinal effects of

Clostridium difficile toxin A and *Vibrio cholerae* enterotoxin in rat ileum. **Gastroenterology**, v. 107, p. 657-665, 1994.

CASTAGLIUOLO, I. LAMONT, J. T.; QIU, B. S. ; NIKULASSON, S. T.; POTHOUKAKIS, C. A receptor decoy inhibits the enterotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin A in rat ileum. **Gastroenterology**, v. 111, p. 433-438, 1996.

CASTAGLIUOLO, I.; KEATES, A. C.; QIU, B.; KELLY, C. P.; NIKULASSON, S.; 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.**, v. 94, p. 4788-4793, 1997.

CASTAGLIUOLO, I.; KELLY, C. P.; QIU, B.S.; NIKULASSON, S.T.; LAMONT, J.T.; AND POTHOUKAKIS, C. IL-11 inhibits *Clostridium difficile* toxin A toxicity in rat ileum. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. G333, 1997.

CASTAGLIUOLO, I.; KEATES, A. C.; WANG, C. C.; PASHA, A.; VALENICK, L.; KELLY, C. P.; NIKULASSON, S. T.; LAMONT, J. T.; POUTHOUKAKIS, C. *Clostridium difficile* toxin A stimulates macrophages inflammatory-2 production in rat intestinal epithelial cells. **J. Immunol.**, v. 160, n. 12, p. 6039-6045, 1998.

CASTAGLIUOLO, I.; LAMONT, J. T. Pathophysiology, diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection. **Keio J. Med.**, v. 48, n. 4, p. 169-174, 1999.

CHAN, C. C. *et al.* Pharmacology of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, L-745,337: a novel nonsteroidal anti-inflammatory agent with an ulcerogenic sparing effect in rat and nonhuman primate stomach. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 274, p. 1531-1537, 1995.

CHANG, M. M.; LEEMAN, S. E.; NIALL, H. D. Amino acid sequence of substance P. **Nature**, v. 232, p. 86-87, 1971.

CHANG, E. B.; MUSCH, M. W.; MAYER, L. Interleukins 1 and 3 stimulate anion secretion in chicken intestine. **Gastroenterology.**, v. 98, p. 1518-1524, 1990.

CHAVES-OLARTE, E.; WEIDMANN, M.; von EICHEL-STREIBER, C; THELESTAM, M. Toxins A and B from *Clostridium difficile* differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 7, p. 1734-1741, 1997.

CHIOSSIONE, D. C.; SIMON, P. L.; SMITH, P. L. Interleukin-1 effects in rabbit ileal mucosa ion transport in vitro. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 180, p. 217-228, 1990.

CHURCH, J. M. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. **Dis. Colon Rectum**, v. 41, p. 1435-1449, 1998.

CIESLA-JR., W. P.; BOBAK, D. A. *Clostridium difficile* toxins A and B are cation-dependent UDP-glucose hydrolases with differing catalytic activities. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 26, p. 16021-16026, 1998.

CLAUSEN, M. R.; BONNEN, H.; MORTENSEN, P. B.: Colonic fermentation of dietary fibre to short chain fatty acids in patients with adenomatous polyps and colonic cancer. **Gut**, v. 32, p. 923-928, 1991.

CLIMO, M. W.; ISRAEL, D. S.; WONG, E. S. Hospital-wide restriction of clindamycin: effect on the incidence of *Clostridium difficile* associated diarrhea and cost. **Ann. Intern. Med.**, v. 128, p. 989-995, 1998.

COHN, S. M.; SCHLOEMANN, S.; TESSNER, T.; SEIBERT, K.; STENSON, W. F. Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 1327-1379, 1997.

CONLY, J. M. *Clostridium difficile*-associated diarrhea – The new scourge of the health care facility. **Can. J. Infect. Dis.**, 2000.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, N. M. Diarréias Infecciosas. ___ **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos domésticos**, 2. Ed., Medsi: Rio de Janeiro, 1992 p. 525-37.

COSTA-RIVERO, H. D. A.; DRASBEK, C. J. Correct case management of childhood diarrhea: a survey of nine state capitals in Northeast Brazil. **Bol. Oficina Sanit. Panam.**, v. 120, n. 4, p. 291-303, 1996.

CROFFORD, L. J. COX-1 and COX-2 tissue expression: Implication and predictions. **J. Rheumatol.**, v. 24, suppl. 49, p. 15-19, 1997.

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.**, v. 66, p. 559-562, 1953.

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.**, v. 63, p. 1421-1426, 1995.

DINCHUK, J.E. *et al.* Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. **Nature**, v. 378, p. 406-409, 1995.

DONALDSON, M. T.; PALMER, J. E. Prevalence of *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A in feces of horses with diarrhea and colic. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 215, p. 358-361, 1999.

DOVE, C. H.; WANG, S. Z.; PRICE, S. B.; PHELPS, C. J.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D.; JOHNSON, J. L.. Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 480-488, 1990.

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.**, v. 8, p. 311-319, 1993.

DUPONT, H. L.: Guidelines on acute infectious diarrhea in adults. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 92, p. 1962, 1997.

EARNSHAW, W. C. Apoptosis: lessons from *in vitro* systems. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 217-220, 1995.

EAST, L. M.; SAVAGE, C. J.; TRAUB-DARGATZ, J. L. Enterocolitis associated with *Clostridium perfringens* infection in neonatal foals: 54 cases (1988-1997). **J. Vet. Intern. Med.**, v. 212, p. 1751-1756, 1998.

EHERER, A. J.; FORDTRAN, J. S.: Fecal osmotic gap and pH in experimental diarrhea of various causes. **Gastroenterology**, v. 103, p. 545-552, 1992.

FEKETY, R.; SHAH, A. B. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. **JAMA**, v. 269, p. 71, 1993.

FEKETY, R.; McFARLAND, L. V.; SURAWICZ, C. M. Recurrent *Clostridium difficile* diarrhea: characteristics and risk factors for patients enrolled in a prospective, randomized, double-blind trial. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 324-333, 1997.

FEKETY, R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 92, p.739-750, 1997.

FELMLEE, T.; WELCH, R. A. Alterations of amino acid repeats in the *Escherichia coli* hemolysin affect cytolytic activity and secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 85, p. 5269-5273, 1988.

FELTIS, B. A.; KIM A. S; KINNEBERG, K. M.; LYERLY, D. L.; WILKINS, T. D.; ERLANDSEN, S. L.; WELLS, C. L. *Clostridium difficile* toxins may augment bacterial penetration of intestinal epithelium: **Arch. Surg.**, v. 134, n. 11, p. 1235-1241; discussion 1241-42, 1999.

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.**, v. 95, p. 1009-1018, 1995.

FERREIRA, S. H. Are macrophages the body's alarm cells? **Agents actions**, v. 10, p. 229-230, 1980.

FIorentini, C.; FABBRI, A.; FALZANO, L.; FATTOROSI, A.; MATARRESE, P.; RIVABENE, R.; DONELLI, D. *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 6, p. 2660-2665, 1998.

FLORIN, I.; THELESTAM, M. Internalization of *Clostridium difficile* cytotoxin into cultured human lung fibroblasts. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 763, p. 383-392, 1983.

FONTELES, M. C.; FANG, G.; THIELMAN, N. M.; YOTSEFF, P. S.; GUERRANT, R. L. Role of platelet activating factor in inflammatory and secretory effects of *Clostridium difficile* toxin A. **J. Lip. Med. Cell Sign.**, v. 11, p. 133-143, 1995.

FREY, S. M.; WILKINS, T. D. Localization of two epitopes recognized by monoclonal antibody PCG-4 on *Clostridium difficile* toxin A. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2488-2492, 1992.

GEORGE, R. H.; SYMONDS, J. M.; DIMOCK, F.; BROWN, J. D.; ARABI, Y.; SHINAGAWA, N.; KEIGHLEY, M. R. B.; ALEXANDER WILLIAMS J.; BURDON, D. W. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. **Br. Med. J.**, v. 1, p. 695-705, 1978.

GERDING, D. N.; BRAZIER, J. S. Optimal methods for identifying *Clostridium difficile* infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 16, p. 439, 1993.

GLASER, P.; LADANT, D.; SEZER, O.; PICHOT, F.; ULLMAN, A.; DANCHIN, A. The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *E. coli*. **Mol. Microbiol.** v. 2, p. 19-30, 1988.

GOLDEN, B. D.; ABARMSON, S. B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.**, v. 25, p. 359-378, 1991.

GOYAL, R.; and HIRANO, I. The enteric nervous system. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, p. 1106-1115, 1996.

GROSCHER, D.H. *Clostridium difficile* infection. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**; 33: 203-45, 1996.

GROSSMANN, E. M.; LONGO, W. E.; KAMINSKI, D. L.; SMITH, G. S.; MURPHY, C. E.; DURHAM, R. L.; SHAPIRO, M. J.; NORMAN, J. G.; MAZUSKI, J. E. *Clostridium difficile* toxin: cytoskeletal changes and

lactate dehydrogenase release in hepatocytes. **J. Surg. Res.**, v. 88, n. 2, p. 165-172, 2000.

GRYBOSKI, J. D.; PELLERANO, R.; YOUNG, N.; EDBERG, S. Positive role of *Clostridium difficile* infection in diarrhea in infants and children. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 86, p. 685-689, 1991.

GUERRANT, R. L.; HUGHES, J. M.; LIMA, N. L., *et al.* Microbiology of diarrhea in developed and developing countries. **Rev. Infect. Dis.**, 154, n. 12, p. 41-50, 1990.

GUERRANT, R. L.; ARAUJO, V.; SOARES, E.: Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1238-1242, 1992.

GUERRANT, R. L. Lessons from diarrheal diseases: Demography to molecular pharmacology. **J. Infect. Dis.**, v. 169, p. 1206-1218; 1994.

HAAN, L.; HIRST, T.R. Cholera toxin and related enterotoxins: a cell biological and immunological perspective. **J. Nat. Toxins.** 9(3):281-97, 2000.

HALL, I. C.; O'TOOLE, E. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. **Am. J. Dis. Child.**, v. 49, p. 390-402, 1935.

HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**, v. 279, p. 509-514, 1998.

HANGLOW, A. C.; BIENENSTOCK, J.; PERDUE, M. H. Effects of Platelet-activating factor on ion transport in isolated rabbit jejunum. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. 845-850, 1989.

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**, v. 119, n.1, p. 139-150, 2000.

HENRIQUES, B.; FLORIN, I.; THELESTAM, M. Cellular internalisation of *Clostridium difficile* toxin A. **Microb. Pathog.**, v. 2, p. 455-463, 1987.

HILL, D. B.; HENDERSON, L. M.; McCLAIN, C. J. Osmotic diarrhea induced by sugar-free theophylline solution in critically ill patients. **J. Parenter. Enteral. Nutr.**, v. 15, p. 332-336, 1991.

HIRSCHHORN, L. R.; TRNKA, Y.; ONDERDONK, A. Epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 169, p. 127-133, 1994.

HOFMANN, F.; BUSCH, C.; PREPENS, U.; AKTORIES, I. J.; AKTORIES, K. Localization of the Glucosyltransferase Activity of *Clostridium difficile* Toxin B to the N-terminal Part of the Holotoxin **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 17, p. 11074-11078, 1997.

HUGHES, J. M.; JARVIS, W. R. Nosocomial gastrointestinal infections. In: WENZEL, R. P. (Ed). **Prevention and Control of Nosocomial Infections**. Baltimore: Williams & Wilkins; 1987.

HYAMS, J. S.: Sorbitol intolerance: An unappreciated cause of functional gastrointestinal complaints. **Gastroenterology**, v. 84, p. 30-33, 1983.

HYLAND, M. J.; OFNER-AGOSTINI, M.; PATON, S. Nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea (N-CDAD) in Canada – the results of the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP) 1997 N-CDAD Prevalence Surveillance Project. **Can. J. Infect. Control.**, v.13, abstracts 15, 1998.

JACOBS, J.; RUDENSKY, B.; DRESNER, J. Comparison of four laboratory tests for diagnosis of *Clostridium difficile* -associated diarrhea. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 15, p. 561-566, 1996.

JAMES, S. P. and ZEITZ, M. Human gastrointestinal mucosal T cells, p. 275-285. In: OGRA, P. L.; LAMM, M. E.; MCGHEE, J. R.; MESTECKY J.; STROBER, W.; BIENENSTOCK, J. (Eds.), **Handbook of mucosal immunology**. Academic Press, San Diego, California, 1994.

JOHNSON, S.; GERDING, D. N. *Clostridium difficile*-associated diarrhea **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 1027-1036, 1998.

JONES, E. M.; KIRKPATRICK, B. L.; FEENEY, R.; REEVES, D. S. *et. al.* Hospital acquired *Clostridium difficile* diarrhea (letter). **Lancet**, v. 346, p. 1176, 1997.

JONES, R. L.; Diagnosis procedures of isolation and characterization of *Clostridium difficile* associated with enterocolitis in foals. **J. Vet. Diagn. Invest.** v. 1, p. 84-86, 1989.

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.**, v. 95, p. 55, 1995.

JUST, I.; SELZER, J.; WILM, M., von Eichel-Streiber, C.; von Eichel-Streiber, M.; Aktories, K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. **Nature**, v. 375, p. 500-03, 1995.

JUST, I.; WILM, M.; SELZER, J.; REX, G.; von EICHEL-STREIBER, C.; MANN, C.M.; and AKTORIES, K. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 13932-13936, 1995.

KADER, H. A.; PICCOLI, D. A.; JAWAD, A. F.; MCGOWAN, K. L.; MALLER, E. S. Single toxin detection is inadequate to diagnose *Clostridium difficile* diarrhea in pediatric patients. **Gastroenterology**, v. 115, p. 1329-1334, 1998.

KAGNOFF, M. F.; ECKMANN, L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 6-15, 1997.

KANDIL, H.; BERSCHNEIDER, H.; ARGENZIO, A. TNF- α alters intestinal ion transport through a paracrine mechanism involving prostaglandins. **Gastroenterology**., v. 102, p. A217, 1992.

KATO, H.; NATO, N; WATANABE, K.; IWAI, N.; NAKAMURA, H.; YAMAMOTO, T.; SUZUKI, K.; KIM, S. M.; CHONG, Y.; WASITO, E.

B. Identification of a toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2178-2182, 1998.

KATZ, D. A.; BATES, D. W.; RITTENBERG, E.; ONDERDONK, A.; SANDS, K.; BAREFOOT, L.A.; SNYDMAN, D. Predicting *Clostridium difficile* stool cytotoxin results in hospitalized patients with diarrhea. **J. Gen. Intern. Med.**, v. 12, p. 57-62, 1997.

KAUFMANN, H. J.; TAUBIN, H. L.. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs activate quiescent inflammatory bowel disease. **Ann. Intern. Med.**, v. 107 p. 513-516, 1987.

KELLY, T. W.; PATRICK, M. R.; HILLMAN, K. M. Study of diarrhea in critically ill patients. **Crit Care Med.**, v. 11, p. 7-9, 1983.

KELLY, C. P. Leukocyte adhesion in gastrointestinal inflammation. **Curr. Opin. Gastroenterology**, v. 9, p. 962, 1993.

KELLY, C. P.; POUTHOUKAKIS, C.; LAMONT, T. J. *Clostridium difficile* colitis. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, p. 257-262; 1994.

KELLY, C.P.; LAMONT, T.J. *Clostridium difficile* infection. **Annu. Rev. Med.**, v. 49, p. 375-390, 1998.

KERR, R. B.; MCLAUGHLIN, D. I.; SONNENBERG, I .W. Control of *Clostridium difficile* colitis outbreak by treating asymptomatic carriers with metronidazole. **Am. J. Infect. Control.**, v. 18, p. 332-342, 1990.

KETLEY, J. M.; MITCHELL, T. J.; CANDY, D. C.; BURDON, D. W.; STEPHEN, J. The effects of *Clostridium difficile* crude toxins and toxin A on ileal and colonic loops in immune and non-immune rabbits. **J. Med. Microbiol.**, v. 24, p. 41-52, 1987.

KNOOP, F. C.; OWENS, M.; CROCKER, I. C. *Clostridium difficile*: clinical disease and diagnosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 251-65, 1993.

KNUDSEN, P. J.; DINARELLO, C. A.; STROM, T. B. Prostaglandin posttranscriptionally inhibits monocyte expression of interleukin1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. **J. Immunol.**, v. 137, p. 3189-3194, 1986.

KOO, D.; TRAVERSO, H.; LIBEL, M.; DRASBEK, C.; TAUXE, R.; BRANDLING-BENNETT, D. Epidemic cholera in Latin America, 1991-1993: implications of case definitions used for public health surveillance. **Bull. Pan Am. Health Organ.**, v. 30, n. 2, p. 134-143, 1996.

KRAMER, G.; PETIT, P.; NAOUFAL, Z.; VAYSSIÈRE, L-L.; MIGNOTTE, B. The biochemistry of programmed cell death. **FASEB J.**, v. 9, p. 1277-1287, 1995.

KUWAHARA, A.; COOKE, H. J. Tachykinin-induced anion secretion in guinea pig distal colon: role of neural and inflammatory mediators. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 252, p. 1-7, 1990.

LANGENBACH, R. *et al.* Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. **Cell**. V. 83, p. 483-492, 1995

LARSON, H. E.; PRICE, A. B.; HONOUR, P.; BORRIELLO, S. P. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. **Lancet**, v. 1, p. 1063-1066, 1978.

LASKIN, D. L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.**, v. 35, p. 655-677, 1995.

LAWRENCE, R.; SCHILLER, M. D. Advances in Gastroenterology: Diarrhea. **Med. Clin. N. Am.**, v. 84, n. 5, 2000.

LAURITSEN, K.; LAURSEN, L.; BUKHAVE, K.; and RASK-MADSEN, J. *In vivo* profiles of eicosanoids in ulcerative colitis, Crohn's colitis and *Clostridium difficile* colitis. **Gastroenterology.**, v. 95, p.11-17, 1995.

LIMA, N. L., GUERRANT, R. L; KAISER, D. L. Nosocomial diarrhea: A possible risk factor for nosocomial infections. **Clin. Res.**, v. 36, p. 580, 1988.

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 cultured cells *in vitro*. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 582-588; 1988.

LIMA, A. A. M.; 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.**, v. 56, p. 419-25, 1989.

LIMA, A. A. M.; LIMA, N. L. Epidemiology, therapy and prevention of infection with *Shigella* organisms and *Clostridium difficile*. **Curr. Op. Infect. Dis.**, v. 6, p. 63-71, 1993.

LIMA, A. A. M. Cholera: molecular epidemiology, pathogenesis, immunology, treatment and prevention. **Curr. Op. Infect. Dis.**, v. 7, p. 592-601, 1994.

LIMA, A. A. M; Molecular epidemiology of multiply antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in Fortaleza, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 5, p. 1061-1065, 1997.

LIMA, A. A. M. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 181, n. 5, p. 1643-1651, 2000.

LYERLY, D. M.; LOCKWOOD, D. E.; RICHARDSON, S. H.; WILKINS, T. D. Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. **Infect. Immun.**, v. 35, p. 1147-1150, 1982.

LYERLY, D. M.; SULIVAN, N. M.; WILKINS, T. D. Enzyme-like immunosorbent assay for *Clostridium difficile* toxin A. **J. Clin. Microbiol.**, v. 17, p. 72-78, 1983.

LYERLY, D. M.; SAUM, K. E.; MACDONALD, D.K.; WILKINS, T. D. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. **Infect. Immun.**, v. 47, p. 349-352, 1985.

LYERLY, D. M.; KRIVAN, H. C.; WILKINS, T. D. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, p. 1-18, 1988.

LYERLY, D. M.; JOHNSON, J. L.; WILKINS, T. D. Characterization of the binding portion of *Clostridium difficile* toxin A. **Microecol. Ther.**, v. 19, p. 233-237, 1989.

LYERLY, D. M.; JOHNSON, J. L.; FREY, S. M. AND WILKINS, T. D. Vaccination against lethal *Clostridium difficile* enterocolitis with a nontoxic recombinant peptide of toxin A. **Curr. Microbiol.**, v. 21, p. 29-32, 1990.

LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D. *Clostridium difficile*. In: BLASER, M. J., SMITH, P.D.; RAVDIN, J.I.; GREENBERG, H.B.; GUERRANT, R.L. (Eds.). **Infections of the Gastrointestinal Tract.**, New York, p. 867-891, 1995.

LUDOLPH, T.; SCHMIDT-WILCKE, H. A. Ultrasound diagnosis of pseudomembranous colitis. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, v. 125, n. 24, p. 750-754, 2000.

MACLAREN, R.; MORTON, T. H.; KUHL, D. A: Effective management of *Clostridium difficile* colitis. **Hosp. Pharm.**, v. 32, p. 1126, 1997.

MAHIDA, Y. R.; PATEL, S.; GIONCHETTI, P.; VAUX, D.; JEWELL, D. P. Macrophage sub-populations in lamina propria of normal and inflamed colon and terminal ileum. **Gut**, v. 30, p. 826-834, 1989.

MAHIDA, Y. R.; GALVIN, A. M.; GRAY, T.; MAKH, S.; MCALINDON, M. E.; SEWELL, H. F.; PODOLSKY, D.K. Migration of human intestinal lamina propria lymphocytes, macrophages and eosinophils following the loss of surface epithelial cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 109, p. 377-386, 1997.

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. Imm.**, v. 66, n. 11, p. 5462-569, 1998.

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**, v. 381, p. 77-79, 1996.

MANABE, Y. C.; VINETZ, J. M.; MOORE, R. D. *et al.* *Clostridium difficile* colitis: An efficient clinical approach to diagnosis **Ann. Intern. Med.**, v. 123, p. 835-840, 1995.

MANTYH, C. R.; VIGNA, S. R.; RANDAL, R.; BOLLINGER, M.; MANTYH, P. W.; MAGGIO, J. E.; PAPPAS, T. N. Differential expression of substance P receptors in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 109, p. 850-860, 1995.

MANTYH, C. R.; MAGGIO, J. E.; MANTYH, P.; VIGNA, J.; PAPPAS, T. N. Increased substance P receptor expression by blood vessels and lymphoid aggregates in *Clostridium difficile*-induced pseudomembranous colitis. **Digest. Dis. Sci.**, v. 41, p. 614-620, 1996.

MANTYH, C. R.; PAPPAS, T. N.; LAPP, J. A.; WASHINGTON, M. K.; NEVILLE, L. M.; CHILARDI, J. P.; ROGERS, S. D.; MANTYH, P. W.; VIGNA, S. R.. Substance P activation of enteric neurons in response to intraluminal *Clostridium difficile* toxin A in rat ileum. **Gastroenterology**, v. 111, p. 1272-1280, 1996.

MARCINKIEWICZ, J. *In vitro* cytokine release by activated murine peritoneal macrophages: role of prostaglandins in the differential regulation of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and interleukin 6. **Cytokine.**, v. 3, p. 327-332, 1991.

MARTINEZ, R. D.; WILKINS, T. D. Comparison of *Clostridium sordellii* toxins HT and LT with toxins A and B of *C. difficile*. **J. Med. Microbiol.**, v. 36, p. 30-36, 1992.

MARTINS, L. M.; EARNSHAW, W. Apoptosis: alive and kicking in 1997. **Trends Cell. Biol.**, v. 7, p. 111-114, 1997.

MASFERRER, J. L.; ZWEIFEL, B. S.; SEIBERT, K.; NEEDLEMAN, P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p. 1375-1379, 1990.

MASFERRER, J. L. *et al.* Selective inhibition of inducible cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 3228-3232, 1994.

MASFERRER, J. L.; ISAKSON, P. C.; SEIBERT, K. Cyclooxygenase-2 inhibitors: a new class of anti-inflammatory agents that spare the gastrointestinal tract. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 25, p. 363-372, 1996.

MASSONE, F. Mecanismo de ação dos anestésicos gerais. _____ **Anestesiologia Veterinária-Farmacologia e Técnicas.**; 2. Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994, p.107-110.

McFARLAND, L. V.; SURAWICZ, C. M.; STAMM, W. E.: Risk factors for *Clostridium difficile* carriage and *C. difficile*-associated diarrhea in a cohort of hospitalized patients. **J. Infect. Dis.**, v. 162, p. 678-684, 1990.

McFARLAND, L. V.: Diarrhea acquired in the hospital. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 22, p. 563-577, 1993.

McFARLAND, L. V.; SURAWICZ, C. M.; IUBIN, M. Recurrent *Clostridium difficile* disease: epidemiology and clinical characteristics. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 20, p. 43-50, 1999.

MILER, L. H.; HOWARD, R. J.; CARTER, R.; GOOD, M. F.; NUSSENZWEING, R. S. Research toward malaria vaccines. **Science.**, v. 234, p. 1349-1356, 1986.

MILLER, M. D.; HYLAND, M. J.; OFNER, M. Morbidity, mortality, and health-care burden of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea (N-CDAD) in Canadian hospitals. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 19, p. 691, Abstract 65, 1998.

MITCHELL, T. J.; KETLEY, J. M.; HASLAM, S. C. 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**, v. 27, p. 78-85, 1986.

MITCHELL, T. J.; KETLEY, J. M.; BURDON, D. W.; CANDY, D. C.; STEPHEN, J. The effects of *Clostridium difficile* crude toxins and purified toxin A on stripped rabbit ileal mucosa in Üssing chambers. **J. Med. Microbiol.**, v. 23, p. 199-204, 1987.

MORHAM, S.G. *et al.* Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. **Cell.**, v. 83, p. 473-482, 1995.

MORTEAU, O.; MORHAM, S.G.; LEVINUS R.S.; DIELEMAN A.; LANGENBACH, R.; SMITHIES, O.; SARTOR, R. B. Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2. **J Clin Invest**, 2000, v. 105, n. 4, p. 469-478, 2000.

MOSS, J.; VAUGHAN, M. Mechanism of action of cholera toxin. Evidence for ADP-ribosyltransferase activity with arginine as an acceptor. **J. Biol. Chem.**, v. 252, n. 7, p. 2455-2457, 1977.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Investig.**, v. 79, p. 319-326, 1987.

NEILL, M. A.; RICE, S. K.; AHMAD, N. V.; FLANIGAN, T. P. Cryptosporidiosis: An unrecognized cause of diarrhea in elderly hospitalized patients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, p. 168-170, 1996.

NOBLE S. L.; KING D. S.; OLUTADE J. I. Cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: place in therapy. **Am. Fam. Physician.**, v. 61, n. 12, p. 3669-3676, 2000.

O'BANION, M. K.; SADOWSKI, H. B.; WINN, V.; YOUNG, D. A. A serum- and glucocorticoid-regulated 4 kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 23261-23267, 1991.

PANJA, A.; SIDEN, E.; MAYER, L.. Synthesis and regulation of accessory/proinflammatory cytokines by intestinal epithelial cells. **J. Clin. Immunol.**, v. 100, p. 298-305, 1995.

PERDUE, M. H.; MASSON S.; WERSHIL, B. K.; GALLI, S. J.; Role of mast cells in ion transport abnormalities associated with intestinal anaphylaxis. Correction of diminished secretory response in genetically mast cells deficient W/W^u mice by bone marrow transplantation. **J. Clin. Invest.**, v. 87, p. 687-693; 1991.

PETERSON, L. R.; KELLY, P. J. The role of the clinical microbiology laboratory in the management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 7, p. 277, 1993.

PHELPS, C. J.; LYERLY, D. L.; JOHNSON, J. L.; WILKINS, T. D. Construction and expression of the complete *Clostridium difficile* toxin A gene in *E. coli*. **Infect. Imm.**, v. 59, p. 150-153, 1990.

POTHOULAKIS, C.; LAMONT, J. T.; EGLOW, R. E.; GAO, N. G.; RUBINS, J. B.; THEOHARIDES, T. C.; DICKEY, B. F. Characterization of rabbit ileal receptors for *Clostridium difficile* toxin A: evidence for a receptor-coupled G protein. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 119-125, 1991.

POTHOULAKIS, C.; LAMONT, J.T. *Clostridium difficile* colitis and diarrhea. **Gastr. Clin. N. Am.**, v. 22: 623-37; 1993.

POTHOULAKIS, C.; GILBERT, R.J.; CLADARAS, C.; CASTAGLIUOLO, I.; SEMENZA, G.; HITTI, Y.; MONTCRIEF, 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.**, v. 98, n. 3, p. 641-649, 1996.

POTHOULAKIS, C.; CASTAGLIUOLO, I.; LAMONT, J. T. Nerves and intestinal mast cells modulate secretory and inflammatory responses to enterotoxins. **News Physiol. Sci.**, v.13, p. 58-63, 1998.

POTTEN, C. S. Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. 253-257, 1997.

POWELL, D. W. Immunophysiology of intestinal electrolyte transport. In: SCHULZ, S.G., (Ed.) Handbook of physiology: the gastrointestinal system. Rockville, MD : **Am. Physiol. Soc.**, v. 4, p. 591-641, 1991.

PRICE, S. B., PHELPS, C. J.; WILKINS, T. D.; JOHNSON, J. L. Cloning of the carbohydrate-binding portion of the toxin A gene of *Clostridium difficile*. **Curr. Microbiol.**, v. 16, p. 82-86, 1987.

QA'DAN, M.; SPYRES, L.M.; BALLARD, J.D. pH-induced conformational changes in *Clostridium difficile* toxin B. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 5, p. 2470-2474, 2000.

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**, v. 111, p. 409-418, 1996.

RACHMILEWITZ, D. *et al.*. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. **Gastroenterology**, v. 97, p. 326-327, 1989.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Agentes anestésicos gerais. **Pharmacology**. 3. Ed. London, Churchill Livingstone; 1995, chapter 26, p. 532-547.

RANGACHARI, P. K.; PRIOR, T.; MCWADE, D. Epithelial and mucosal preparations from canine colon: responses to substance P. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 254, p. 1076-1083, 1990.

REINKE, C. M.; MESSICK, C. R. *Clostridium difficile*-induced colitis, part 1 and 2. **Am. J. Hosp. Pharm.**, v. 51, p.1771-1781; 1892-901, 1994.

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.** v. 98, p. 2076-2085, 1996.

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.**, v. 95, p. 2004-2011, 1995.

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.**, v. 73, p. 472-477, 1991.

RICHTER, C.; SCHWEIZER, M.; COSSARIZZA, A.; FRANCESCHI, C. Control of apoptosis by the cellular ATP level. **FEBS Lett.**, v. 378, p. 107-110, 1996.

RINGEL, A. F.; JAMESON, G. L.; FOSTER, E. S.: Diarrhea in the intensive care patient. **Crit. Care Clin.**, v. 11, p. 465-477, 1995.

ROCHA, M. F. G. Papel de citocinas e derivados da lipooxigenase, liberados por macrófagos, na infiltração neutrofilica induzida pelas toxinas A e B do *Clostridium difficile*. Fortaleza, 1994. Tese (Mestrado em farmacologia)-Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 1994.

ROCHA, M. F. G.; MAIA, M. E. T.; BEZERRA, L. R. P. S.; LYERLY, D. M.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. *Clostridium difficile* toxin A induces the release of neutrophil chemotatic factors from rat peritoneal macrophages: Role of interleukin-1 β , tumor necrosis factor alpha and leukotriens. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2740-2746; 1997.

ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J.J.; LIMA, A. A. M. O *Clostridium difficile* como agente indutor de diarréia inflamatória. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32 , n. 1, p. 47-52, 1999.

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**, v. 39, p. 335-340, 2001.

ROLFE, R. D. Binding kinetics of *Clostridium difficile* toxins A and B to intestinal brush border membranes from infant and adult hamsters. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 1223-1230, 1991.

RUBIN, M. S.; BODESTEIN, L. E.; KENT, K. C. Severe *Clostridium difficile* colitis. **Dis. Colon Rectum.**, v. 38, p. 350-354, 1995.

SACK, R. B.; RAHMAN, M.; YUNUS, M.; KHAN, E. H. Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, suppl. 1, p. 102-105; 1997.

SALVEMINI, D.; MASINI, E.; PISTELLI, A.; MANNAIONI, P. F. VANE, J. Nitric oxide: a regulatory mediator of mast cell reactivity. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 17, p. 258-265, 1991.

SAMORE, M. H.; VENKATARAMAN, L.; DeGIROLAMI, P. C.; ARBEIT, R. D.; KARCHMER, A. W. Clinical and molecular epidemiology of sporadic and clustered cases of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. **Am. J. Med.**, v. 100, p. 32-40, 1996.

SAMORE, M. H. Epidemiology of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. **J. Hosp. Infect.**, v. 43, p. 183-190, 1999.

SARTOR, R. B. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology**, v. 106, p. 533-541, 1994.

SAVILLE, W. J.; HINCHCLIFF, K. W.; MOORE, B. R. Necrotizing enterocolitis in horses: a retrospective study. **J. Vet Intern. Med.**, v. 10, p.265-270, 1996.

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 inflammatory cytokin and bacterial lipopolysaccharide. **Immunology**, v. 81, p. 85, 1994.

SCHWEINS, 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.**, v. 7; n. 4, p. 847-856, 1997.

SEARS, R. B.; KAPER, J. B. Enteric Bacterial Toxins: Mechanisms of Action and Linkage to Intestinal Secretion. **Microbiol. Rev.**, v. 60, p. 167-215; 1996.

SEIBERT, K. *et al.* Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 91, p. 12013-12017, 1994.

SETTLE, C. D.; WILCOX, M. H. Review article: antibiotic-induced *Clostridium difficile* infection. **Aliment. Pharmacol. Therapeut.**, v. 10, p. 835-841, 1996.

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.**, v. 158, p. 3439-3450, 1997.

SHARON, P.; LIGUMSKY, M.; RACHMILEWITZ, D.; ZOR, U. Role of prostaglandins in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine. **Gastroenterology**, v. 75, p. 638-640, 1978.

SHEK, F. W.; STACEY, B. S.; RENDELL, J.; HELLIER, M. D.; HANSON, P. J. The rise of *Clostridium difficile*: the effect of length of stay, patient age and antibiotic use. **J. Hosp. Infect.**, v. 45, n. 3, p. 235-237, 2000.

SIFFERT, J. C.; MULLER, C. D.; DUMONT, S.; MONTEIL, H.; POINDRON, P.: CD14 expression by human mononuclear phagocytes is modulated by *Clostridium difficile* toxin B. **Microbes Infect.**, v. 1, n. 14, p. 1159-1162, 1999.

SILLETTI, R. P.; LEE, G.; AILEY, E. Role of stool screening tests in diagnosis of inflammatory bacterial enteritis and in selection of specimens likely to yield invasive enteric pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1161-1168, 1996.

SILVA, J. *Clostridium difficile* Nosocomial infections-still lethal and persistent. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 15, p. 368-370, 1994.

SMITH, P. L.; MONTZKA, D. P.; McCAFFERTY, G. P.; WASSERMAN, M. A. A.; FONDACARO, J. D. Effect of sulfidopeptide leukotriens D₄ and E₄ on ileal ion transport, *in vitro*, in the rat and rabbit. **Am. J. Physiol.**, v. 255, p. 175-183, 1988.

SMITH, P. L.; CHIOSSONE, D. C.; McCAFFERTY, G.P. Characterization of LTC₄ effects on rabbit ileal mucosa *in vitro*. **Arch. Pharmacol.**, v. 341, p. 94-100, 1990.

SMITH, J. A.; COOKE, D. L.; HYDE, S.; BORRIELLO, S. P.; LONG, R. G. *Clostridium difficile* toxin A binding to human intestinal epithelial cells. **J. Med. Microbiol.** , v. 46, p. 953-958, 1997.

SMITH, W.L.; LANGEBACH, R. Why there are two cyclooxygenase isozymes? **J. Clin. Invest.**, v. 107, n. 12, p. 1491-1495, 2001.

SONGER, J. G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. **Clin. Microbiol. Ver.**, v. 9, p. 216-234, 1996.

SORENSEN, S. M. Validation of morphometric analysis procedure using indomethacin alterations in cultured hepatocytes. **Toxicol. Lett.**, v. 45, n. 1, p. 101-110, 1989.

SOUZA, M. H. L. P., MELO-FILHO, A.A, ROCHA, M.F.G., LYERLY, D.M., CUNHA, F.Q., LIMA, A.A.M., RIBEIRO, R.A. The involvement of macrophage-derived tumor necrosis factor and lipoxygenase products on the neutrophil recruitment induced by *Clostridium difficile* toxin B. **Immunology**, 91: 281-288, 1997.

SPENCER, R. C. The role of antimicrobial agents in the aetiology of *Clostridium difficile*-associated disease. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 41, p. 21-27, 1998.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell.**, v. 76, p. 301, 1994.

STANECK, J. L.; WECKBACH, L. S.; ALLEN, S. D. Multicenter evaluation of four methods for *Clostridium difficile* detection: ImmunoCard *C. difficile*, cytotoxin assay, culture, and latex agglutination. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2718-2721, 1996.

STAMM, W. E.; WEINSTEIN, R. A.; DIXON, R. E. Comparison of endemic and epidemic nosocomial infections. **Am. J. Med.**, v. 70, p. 393-397, 1981.

STARR, J. M.; ROGERS, T. R.; IMPALLOMENI, M. Hospital-acquired *Clostridium difficile* diarrhoea and herd immunity. **Lancet**, v. 349, p. 426-428, 1997.

SULIVAN, N. M.; PELLET, S.; WILKINS, T. D. Purification of toxins A and B of *Clostridium difficile*. **Infect. Immun.**, v. 35, p. 1032-1040; 1982.

SULTANA, Q., CHAUDHRY, N. A.; MUNIR, M.; ANWAR, M. S.; TAYYAB, M. Diagnosis of *Clostridium difficile* antibiotic associated diarrhoea culture versus toxin assay. **J. Pak. Med. Assoc.**, v. 50, n. 8, p. 246-249, 2000.

SURAWICZ, C. M.; and MCFARLAND, L. V. Pseudomembranous colitis: causes and cures. **Digestion**, v. 60, p. 91-100, 1999.

TABIBIAN, N. Diarrhea in critically ill patients. **Am. Fam. Physician.**, v. 40, p. 135-140, 1989.

TALLEY, N. J.; WEAVER, A. L.; ZINSMEISTER, A. R.: Self-reported diarrhea: What does it mean? **Am. J. Gastroenterol.**, v. 89, p. 1160, 1994.

TAYLOR, N.S.; THORNE, G.M.; BARTLETT, J.G. Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. **Infect. Immun.**, v. 34, 1036-1043, 1981.

TENEBERG, S. I.; LÖNNROTH, J.F.; TORRES, L. U.; GALILI, M.O. HALVARSSON, J.; ÅNGSTRÖM, AND KARLSSON, K.A. Molecular mimicry in the recognition of glycosphingolipids by Gal alpha-3Gal-beta 4GlcNAc-beta binding *Clostridium difficile* toxin A, human natural anti alpha -galactosyl IgG and the monoclonal antibody Gal-13: characterization of a binding-active human glycosphingolipid, non-identical with the animal receptor. **Glycobiology.**, v. 6, p. 599-609, 1996.

TERDIMAN, J. P. Gastrointestinal complications in the intensive care unit. In: MICHAEL, A; MATTHAY, D.E.S. (Eds): **Complications in the Intensive Care Unit**. New York, Chapman and Hall, p. 152-193; 1996.

THELESTAM, M.; FLORIN, I.; OLARTE, E. C.. 1997. Review: *Clostridium difficile* toxins, p. 141-158. In: Aktories, K. (Ed.), **Bacterial toxins: a laboratory companion**.

THOMPSON, W. G.; LONGSTRETH, G. F.; DROSSMAN, D. A. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. **Gut**, v. 45, n. 2, p. 43, 1999.

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.**, v. 38, n. 3, p. 1200-1202, 2000.

TOMA C.; NAKAMURA S.; KAMIYA S., NAKASONE N.; IWANAGA M. Detection of *Clostridium difficile* toxin A by reversed passive latex agglutination. **Microbiol. Immunol.**, v. 43, n. 8, p. 737-742, 1999.

TORRES, J. F. Purification and characterization of toxin B from a strain of *Clostridium difficile* that does not produce toxin A. **J. Med. Microbiol.**, v. 35, p. 40-44, 1991.

TREOLAR, A. J.; KALRA, L. Mortality and *Clostridium difficile* diarrhoea in the elderly. **Lancet.**, v. 2, p. 1279-1994, 1987.

TRIADIFOLOPOULOS, G.; POTHOUKAKIS, C.; O'BRIEN, M.; LaMOUNT; J. T. Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. **Gastroenterology**, v. 93, p. 273-279, 1987.

TRIADAFILOPOULOS, G., POTHOUKAKIS, C., WEISS, R., GIAMPAOLO, C., LaMONT, J. T. Comparative Study of *Clostridium difficile* toxin A and cholera toxin in rabbit ileum. **Gastroenterology**, v. 97, p. 1186-1192, 1989.

TUCKER, K. D.; CARRIG P. E.; WILKINS T. D. Toxin A of *Clostridium difficile* is a potent cytotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 869-871, 1990.

TYSK, C. Drug-induced enterocolitis. Important differential diagnosis in the investigation of diarrhea and intestinal hemorrhage. **Lakartidningen**. v. 97, n. 21, p. 2606-2610, 2000.

URIBE, A.; JOHANSSON, C.; RUBIO C.; Cell proliferation of the rat gastrointestinal mucosa after treatment with E₂ prostaglandins and indomethacin. **Digestion**, v. 36, n. 4, p. 238-245, 1987.

VINCENT, J. L.; BIHARI, D. J.; SUTER, P. M.; *et al.* The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. **JAMA**, v. 274, p. 639-644, 1995.

VISCIDI, R.; WILLEY, V.; BARTLETT, J.G. Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. **Gastroenterology**, v. 81, p. 5-9, 1981.

von EICHEL-STREIBER, C.; LAUFENBERG-FELDMANN, R., SARTINGEN, S.; SCHULZE, J.; SAUERBORN, M. Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. **Mol. Gen. Genet.**, v. 233, p. 260-268, 1992.

von EICHEL-STREIBER, C.; BOQUET, P.; SAUERBORN, M.; THELESTAM, M. Large clostridial cytotoxins- a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 375-382, 1996.

WALLACE, J. L.; KEENAN, C. M.; GALE, D.; SHOUPE, T. S. Exacerbation of experimental colitis by NSAIDs is not related to elevated leukotriene B4 synthesis. **Gastroenterology**, v. 102, p. 18-27, 1992.

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 *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 8, p. 1147-1156, 2000.

WEDEL, N.; TOSELLI, P.; POTHOUKAKIS, C. Ultrastructural effects of *Clostridium difficile* toxin B on smooth muscle cells and fibroblasts. **Exp. Cell. Res.**, v. 148, p. 413-422, 1983.

WEDLER, F. C. Biological significance of manganese in mammalian systems. **Prog. Med. Chem.**, v. 30, p. 89-133, 1993.

WEINSTEIN, R. A.: Epidemiology and control of nosocomial infections in adult intensive care units. **Am. J. Med.**, v. 91, suppl 3B, p. 179-184, 1991.

WELLIVER, R. C.; MCLAUGHLIN, S. Unique epidemiology of nosocomial infection in a children's hospital. **Am. J. Dis. Child.**, v. 138, p. 131-135, 1984.

WILCOX, M. H. Treatment of *Clostridium difficile* infection. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 41, p. 41-46, 1998.

WILKINS, T. D.; TUCKER, K. D.. *Clostridium difficile* toxin A (enterotoxin) uses Gal-alpha₁₋₃Gal-beta₁₋₄GlcNAc as a functional receptor. **Microecol. Ther.**, v. 19, p. 225-227, 1989.

WIDNER, W. R.; WHITELEY, H. R. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 965-974, 1989.

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.**, v. 86, p. 612, 1989.

WREN, B. W.; RUSSELL, R. R.; TABAQCHALI, S. Antigenic cross-reactivity and functional inhibition by antibodies to *Clostridium difficile* toxin A, *Streptococcus mutans* glucan-binding protein, and a synthetic peptide. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 3151-3155, 1991.

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**, v. 46, n. 4, p. 481-486, 2000.

YAMADA, T. *et al.* Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. **Inflammation**, v. 17, p. 641-662, 1993.

YANNELLI, B.; GUREVICH, I.; SCHOCH, P. E; *et al.* Yield of stool cultures, ova and parasite tests, and *Clostridium difficile* determinations in nosocomial diarrheas. **Am. J. Infect. Control.**, v. 16, p. 246, 1988.

YEO, C. J.; COUSE, N. F.; ZIMMER, J. M. Serotonin and substance P stimulate intestinal secretion in the isolated perfused ileum. **Surgery**, v. 105, p. 86-92, 1989.

ZALEZNIK, D. F. *Clostridium difficile*: an important nosocomial pathogen for the 1990s. **Clin. Microbiol. Newsl.**, v. 13, n. 19, p. 145-149, 1991.

ANEXOS

ANEXO - 1: Modelo de Ficha Experimental

Ficha de Experimentos	
Animal:	Sexo:
Grupo estudado:	
Droga(s):	
Observações:	
RESULTADOS ($\mu\text{l}/\text{cm}$)	
MÉDIA	
DESVIO	
S.E.M.	

N= Número de animais utilizados em cada grupo estudado

ANEXO - 2: Curva dose-resposta

Ficha de Experimentos						
Animal:	Coelhos Nova Zelândia			Sexo: Machos		
Grupo estudado:	Curva dose -resposta					
Droga(s):	Toxina A do <i>Clostridium difficile</i>					
Observações:						
RESULTADOS (µl/cm)						
PBS	0,3µg/ml	0,5µg/ml	1,0µg/ml	3,0µg/ml	5,0µg/ml	
150	200	200	258	1140	1411	
0	0	458,33	667	1032	1000	
0	0	81,81	978	887	818	
0	200	0	820	480	1235	
0	0	937,5	857	1444	1277	
0	0	545,5	1000	1538	860	
562	618	1181,81	1378	818	1133	
0	421	863,63	1545	1818	320	
0	250	0	783	1500		
255	200	0	1400	857		
100		0	1673	889		
0		0	1489	1653		
0			950	477		
0			1000	1300		
467			811,11	850		
0			950	729		
MÉDIA	95,9	188,9	355,7	1034,9	1088,3	1006,8
DESVIO	179,7	206,8	432,5	371,9	411,2	345
S.E.M.	44,9	65,4	124,8	93	102,8	122

N= 15

ANEXO - 3: Curva tempo-efeito

Ficha de Experimentos

Animal: Coelhos Nova Zelândia

Sexo: Machos

Grupo estudado: Curva Tempo-efeito

Droga(s): Toxina A do *Clostridium difficile*

Observações:

RESULTADOS ($\mu\text{l}/\text{cm}$)

	6 horas	8 horas	10 horas	12 horas	18 horas
0		224	416,67	188	258
43,75		34,11	500	1163	667
80		41,33	562,5	154	978
42,1		37	562,5	273	820
23,5		34	388,89	1118	857
46,1		37,5	454,54	636	1000
25		34	483,33	696	1378
53,3		125	181,82	711	1545
43,75		285,7	333,33	744	783
95,5		33,33	277,78	1053	1400
40,5					1673
21,1					1489
MÉDIA	42,9	88,6	416,1	673,6	1070,7
DESVIO	25,7	93,1	123,6	373,5	425,8
S.E.M.	7,43	29,44	39,09	118,11	122,9

N= 12

ANEXO - 4: Modulação Farmacológica (TxA + DEXA)

Ficha de Experimentos

Animal: Coelhos Nova Zelândia

Sexo: Machos

Grupo estudado: Efeito dexametasona sobre a secreção intestinal induzida pela toxina A do *Clostridium difficile*

Droga(s): Dexametasona

Observações: A droga foi administrada na concentração de 8,0mg/ml e dose de 2mg/kg. Os fluidos recuperados encontraram-se límpidos, viscosos e em pequenos volumes sem presença de hemorragia

RESULTADOS ($\mu\text{l}/\text{cm}$)

	TxA	DEXA
	258	50
	667	187,5
	978	100
	820	600
	857	108,3
	1000	70
	1378	66,6
	1545	58,3
	783	86,6
	1400	72,7
	1673	250
	1489	226,6
	950	200
	1000	307,7
	811,11	200
	950	
MÉDIA	1034,9	172,3
DESVIO	371,9	143,5
S.E.M.	93	37

N= 9

ANEXO -5: Modulação Farmacológica (TxA + QUINA)

Ficha de Experimentos		
Animal: Coelhos Nova Zelândia	Sexo: Machos	
Grupo estudado: Efeito anti- secretório de um inibidor específico de fosfolipase A 2 em íleo isolado de coelho		
Droga: Quinacrina (20mg/kg; s.c.; 1 hora antes do experimento)		
Observações: O fluido recuperado teve, predominantemente, aspecto sero-sanguinolento nas alças recuperadas		
RESULTADOS (µl/cm)		
TxA	QUINA	
258	1000	
667	812,5	
978	1071,43	
820	1250	
857	312,5	
1000	714,28	
1378	636,36	
1545	666,66	
783	461,54	
1400	538,46	
1673	500	
1489	666,66	
950	437,14	
1000	357,14	
811,11	133,3	
950	366,66	
	424	
	461,54	
	436,36	
MÉDIA	1034,9	591,9
DESVIO	371,9	281,1
S.E.M.	93	64,5

N= 10

ANEXO - 6: Modulação Farmacológica (TxA + MONTE)

Ficha de Experimentos

Animal: Coelhos Nova Zelândia

Sexo: Machos

Grupo estudado: Participação de mediadores inflamatórios derivados da lipooxigenase (leucotrienos) no evento secretório promovido pela toxina A do *C. difficile* em íleo de coelho, *in vivo*.

Droga: Montelucaste sódico

Observações: A droga foi administrada na dose de 10mg/kg, v.o. uma hora antes da injeção da toxina A. O fluido intestinal encontrou-se sero-mucoso em grandes volumes os quais semelhantes aos grupos sem pré-tratamento farmacológico

RESULTADOS ($\mu\text{l}/\text{cm}$)

	TxA	MONTE
	258	1250
	667	1388
	978	500
	820	333,33
	857	500
	1000	1071,42
	1378	1000
	1545	500
	783	333,33
	1400	500
	1673	550
	1489	500
	950	
	1000	
	811,11	
	950	
MÉDIA	1034,9	702,2
DESVIO	371,9	368,7
S.E.M.	93	106,4

N= 7

ANEXO -7: Modulação Farmacológica (TxA + INDO)

Ficha de Experimentos

Animal: Coelhos Nova Zelândia

Sexo: Machos

Grupo estudado: Investigação do envolvimento de ambas as isoformas da enzima ciclooxigenase (COX 1 e 2) em alça isolada de coelho.

Droga: Indometacina

Observações: A droga foi administrada na dose de 2mg/kg, s.c. uma hora antes da injeção da toxina A. O fluido intestinal encontrou-se sob intensa atividade hemorrágica sendo notória a destruição de mucosa ileal

RESULTADOS ($\mu\text{l}/\text{cm}$)

	TxA	INDO
	258	722,22
	667	666,66
	978	700
	820	625
	857	470,59
	1000	15,38
	1378	789,47
	1545	400
	783	650
	1400	750
	1673	611,11
	1489	571,42
	950	554,54
	1000	571,42
	811,11	714,28
	950	
MÉDIA	1034,9	587,5
DESVIO	371,9	189,7
S.E.M.	93	49

N= 8

ANEXO - 8: Modulação Farmacológica (TxA + CELOX)

Ficha de Experimentos

Animal: Coelhos Nova Zelândia

Sexo: Machos

Grupo estudado: Ação inibitória de drogas antagonistas da enzima COX-2 sobre a secreção intestinal induzida pela TxA em íleo de coelho

Droga: Celecoxibe

Observações: A droga foi administrada na dose de 20mg/kg, v.o. uma hora antes da injeção da toxina A. O fluido intestinal encontrou-se de límpido a opaco em pequenos volumes

RESULTADOS ($\mu\text{l}/\text{cm}$)

TxA	CELOX
258	933,33
667	23,08
978	180
820	0
857	0
1000	450
1378	416,7
1545	0
783	0
1400	575
1673	647
1489	531,25
950	631,57
1000	0
811,11	0
950	578,57
	1214,95
	1066,66
	1000
	772
MÉDIA	1034,9
DESVIO	371,9
S.E.M.	93

N= 10

ANEXO - 9: Modulação Farmacológica (TxA + MELOX)

Ficha de Experimentos		
Animal: Coelhos Nova Zelândia	Sexo: Machos	
Grupo estudado: Ação inibitória de drogas antagonistas da enzima COX-2 sobre a secreção intestinal induzida pela TxA em íleo de coelho		
Droga: Meloxicam		
Observações: A droga foi administrada na dose de 20mg/kg, v.o. uma hora antes da injeção da toxina A. O fluido intestinal encontrou-se, também, de límpido a opaco em volumes menores, contudo em maior quantidade quando comparado ao celecoxibe		
RESULTADOS (µl/cm)		
TxA	MELOX	
258	333,33	
667	375	
978	800	
820	500	
857	791,66	
1000	687,5	
1378	1269,23	
1545	1142,86	
783	1000	
1400	272,73	
1673	619,05	
1489	950	
950	761,9	
1000	650	
811,11	333,33	
950	62,5	
	300	
	444,44	
MÉDIA	1034,9	627,4
DESVIO	371,9	328,8
S.E.M.	93	77,5

N= 8

ANEXO -10: Modulação Farmacológica (TxA + PENTOX)

Ficha de Experimentos

Animal: Coelhos Nova Zelândia

Sexo: Machos

Grupo estudado: Participação do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) no processo inflamatório intestinal induzido pela toxina A do *C. difficile* em íleo de coelho, *in vivo*

Droga: Pentoxifilina

Observações: A droga foi administrada na dose de 50mg/kg, v.o. uma hora antes da injeção da toxina A. O fluido intestinal encontrou-se sero mucoso com raros pontos hemorrágicos. O volume recuperado mostrou-se em volumes compatíveis ao bloqueio arcial da secreção intestinal

RESULTADOS ($\mu\text{l}/\text{cm}$)

	TxA	PENTOX
	258	1611,11
	667	1375
	978	588,23
	820	588,23
	857	1333,33
	1000	0
	1378	0
	1545	160
	783	0
	1400	0
	1673	100
	1489	388,88
	950	777,77
	1000	711,11
	811,11	750
	950	750
MÉDIA	1034,9	570,9
DESVIO	371,9	328,8
S.E.M.	93	77,5

N= 8

ANEXO -11: Modulação Farmacológica (TxA + CELOX + INDO)

Ficha de Experimentos

Animal: Coelhos Nova Zelândia

Sexo: Machos

Grupo estudado: Associação farmacológica entre um inibidor específico de COX-2 (celecoxibe) e um antagonista de ciclooxigenase (indometacina) em alça ligada de coelho, *in vivo*

Drogas: Celecobixe e indometacina

Observações: As doses e vias de administração das drogas foram iguais mediante protocolos outrora citados. O fluido recuperado mostrou-se bem hemorrágico, porém com bloqueio parcial da secreção intestinal

RESULTADOS ($\mu\text{l}/\text{cm}$)

	TxA	CELOX + INDO
	258	500
	667	590,9
	978	650
	820	608,33
	857	200
	1000	340
	1378	420
	1545	320
	783	311,11
	1400	66,66
	1673	700
	1489	666,66
	950	109,09
	1000	
	811,11	
	950	
MÉDIA	1034,9	421,7
DESVIO	371,9	216,2
S.E.M.	93	60

N= 7

ANEXO -12: Modulação Farmacológica (TxA + CELOX + PENTOX)

Ficha de Experimentos

Animal: Coelhos Nova Zelândia

Sexo: Machos

Grupo estudado: Associação farmacológica entre um inibidor específico de COX-2 (celecoxibe) e um antagonista de TNF-alfa (pentoxifilina) em alça ligada de coelho, *in vivo*

Drogas: Celecobixe e pentoxifilina

Observações: As doses e vias de administração das drogas foram iguais mediante protocolos outrora citados. O fluido recuperado mostrou-se com menos focos hemorrágicos, além do bloqueio parcial da secreção intestinal ser um evento bem evidente nos grupos modulados

RESULTADOS ($\mu\text{l}/\text{cm}$)

TxA	CELOX + PENTOX
258	294.11
667	478.26
978	346.15
820	80.0
857	38.46
1000	457.14
1378	368.42
1545	608.69
783	347.82
1400	736.84
1673	1037.5
1489	700.0
950	600.0
1000	480.0
811,11	555.55
950	506.66
	1411.76
	400.0
	1145.85
	200.0

MÉDIA	1034,9	539,7
DESVIO	371,9	342,3
S.E.M.	93	76,5

N= 9