

COD. ACERVO: 66452

R13831134/06

R#13,80

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

**PARTICIPAÇÃO DE MASTÓCITOS E MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS
NA PATOGÊNESE DAS ENTEROTOXINAS DO *VIBRIO CHOLERA* E
*BACTEROIDES FRAGILIS***

RAIMUNDO BEZERRA DA COSTA

FORTALEZA-CE
2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

ESE
616.932
C875p
2002
ex. 2

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

PARTICIPAÇÃO DE MASTÓCITOS E MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS
NA PATOGÊNESE DAS ENTEROTOXINAS DO *VIBRIO CHOLERAE* E
BACTEROIDES FRAGILIS

RAIMUNDO BEZERRA DA COSTA

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

FORTALEZA-CE
2002

C_{875p} Costa, Raimundo Bezerra da

Participação de mastócitos e mediadores pró-inflamatórios na patogênese das enterotoxinas do *Vibrio cholerae* e *Bacteroides fragilis* / Raimundo Bezerra da Costa. – Fortaleza, 2002.

138 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Cólera – toxina. 2. *Bacteroides fragilis* – toxina. 3. Diarréia – inflamação. 4. Mediadores farmacológicos. I. Título

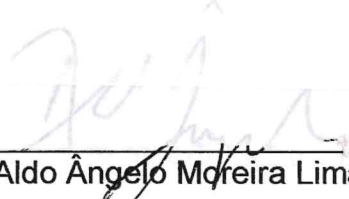
CDD 616.932

RAIMUNDO BEZERRA DA COSTA

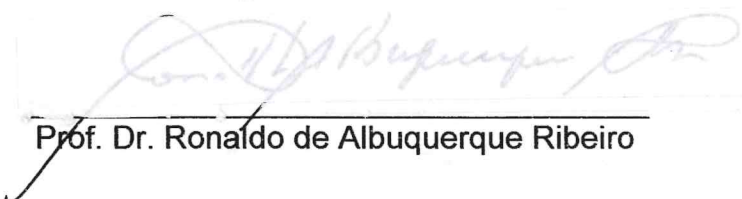
Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial desta Instituição.

Data da aprovação: 04/12/2002


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Aldo Angelo Moreira Lima (orientador)



Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro



Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha (co-orientador)



Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles



Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

UMA LIÇÃO DE VIDA

Durante o doutorado, fui tendo a oportunidade de aprender a viver e conviver com muitas pessoas, mestrandas ou doutorandas, que vinham de muitos outros lugares, de compreensões diversas e pensamentos diferentes. Porém todos tinham um objetivo em comum: concluir o curso. Alguns querendo terminar rápido, outros indiferentes, mas havia aqueles que esperavam o normal. Uns se angustiavam com as dificuldades... havia aqueles que discordavam das “injustiças” que, por ventura, ocorressem com ele ou com outrém, ao longo da estrada da vida. Também houve momentos alegres, animados e até festivos. Nos aniversários dos colegas e do chefe do departamento, no término das disciplinas e nas defesas de Teses dos concludentes. Isto alimentava e animava cada um e ia aumentando a fé do seu dia também chegar, pois todos somos filhos de Deus. Portanto, desenvolva sua aprendizagem, ampliando e fortalecendo sua razão de ser, sua crença na verdade, na prática do bem e do amor, construindo sua fé! Pois...

“A fé sincera e verdadeira é sempre calma; dá a paciência que sabe esperar, porque tendo seu ponto de apoio na inteligência e na compreensão das coisas, está certa de chegar; a fé incerta sente a sua própria fraqueza; quando está estimulada pelo interesse, torna-se colérica e crê suprir a força pela violência. A calma na luta é sempre um sinal de força e de confiança; a violência, ao contrário, é uma prova de fraqueza e de dúvida em si mesmo”. (O Evangelho Segundo o Espiritismo, cap. XIX: A Fé Transporta Montanhas).

Tenha calma e serenidade; construa sua aprendizagem na verdade e com paciência, e que cada momento seja uma lição de vida na construção do seu equilíbrio...

Faça de sua vida uma lição de humildade e de flexibilidade

Já se disse que a vida é um eterno aprendizado.

Na verdade, o aprendizado da vida é infinito, as lições se renovam incessantemente e você terá sempre ensejo para aprender.

Ninguém é absolutamente sábio. Há sempre novas lições a aprender, de modo que, à proporção que sua sabedoria aumenta e sua capacidade de vencer os desafios se engrandece, outras lições vão surgindo infinitamente.

Assuma, portanto, o seu papel de eterno estudante da vida, sendo para tanto, imprescindível que você desenvolva as virtudes da humildade e da flexibilidade.

Dizia o grande filósofo Sócrates: "Só sei que nada sei". Efetivamente, o aprendizado não acaba jamais, tal como bem expressou o profeta Kahlil Gibran: "É só quando você chega ao topo da montanha que começará a subida".

Em verdade, por mais que a gente vença em cada etapa da existência, a escalada da intérmina montanha principia.

Assim, há que se ter humildade, pautada na compreensão da limitação dos próprios méritos, ao contrário da arrogância ou da presunção.

De igual, é preciso ser flexível, porque na vida é necessário mudar com freqüência.

Adquirindo a capacidade de se adaptar às mudanças, você se assemelha à água que, sem rigidez, rompe os caminhos abrindo novas possibilidades e perspectivas.

A flexibilidade proporciona adaptabilidade, preparando-o para os altos e baixos do percurso e tornando-o capaz de suplantar obstáculos, nos rumos tortuosos da vida.

(Extraído do livro: Há um mestre adormecido dentro de você, de Edilson Santana)

Daqui levamos o saber!

Dedico este trabalho aos meus pais Izabel Bezerra de Souza e Joaquim Bezerra da Costa (*in memoriam*): Ela, uma doméstica que destinou seu apoio às empreitadas do esposo, e ele, um roceiro que sempre buscou o saber, reforçando seu anseio na luta pela formação dos filhos;

Dedico também, a todas aquelas pessoas merecedoras desse esforço: conscientes e inconscientes.

Muita saúde e paz no coração.
Que Deus abençoe a todos.
Muito obrigado!

Raimundo Bezerra da Costa

AGRADECIMENTOS

Neste momento agradeço a todas aquelas pessoas que contribuíram para minha formação e na realização deste trabalho, e em especial:

Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, pela orientação científica e efetiva participação durante todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha pela **co-orientação**, sinceridade, presteza em todos os momentos e apoio nas horas mais difíceis da elaboração do presente trabalho.

A Profa. Dra. Cynthia L. Sears (Clinical Microbiology Laboratory at The Johns Hopkins Hospital; USA), pelo fornecimento das cepas bacterianas e da toxina purificada do *Bacteroides fragilis*, utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Torres e ao Dr. José E. P. Aguiar pela contribuição dos dados parciais da cólera fornecidos, contribuindo intensamente na complementação do conteúdo final.

Ao prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles, pelo apoio inicial na orientação para o estudo da farmacologia, entrada na pós-graduação e no amadurecimento pessoal durante todo o curso.

À Profa. Dra. Diana Magalhães de Oliveira, pela amizade, apoio e participação efetiva na realização deste trabalho.

À Dra. Gerly A. C. Brito pela presteza na colaboração de realização das fotografias em seu laboratório, no Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da UFC.

Ao Prof. Dr. Geraldo de Sousa Tomé, pelo estímulo e apoio nas muitas dificuldades surgidas nesses cinco anos de trabalho.

Aos professores Dr. Vicente José de Figueiredo Freitas, vice-diretor da Faculdade de Veterinária, e Dr. José Nailton B. Evangelista, chefe do Departamento de Produção Animal e Extensão Rural, pela amizade e apoio na administração, principalmente no período de elaboração da tese.

Ao Prof. José Tarciso Sampaio Pimenta (*in memoriam*), ex-coordenador do Curso de Veterinária-UECE, pelos ensinamentos durante a formação profissional.

À técnica de laboratório Maria Rocilda de Oliveira, funcionária da Faculdade de Veterinária e amiga, pelo seu inestimado e incansável trabalho no desenvolvimento das técnicas histopatológicas.

À Profa. Dra. Dea Vidal, da Faculdade de Veterinária, pela colaboração na realização de gráficos e aos alunos do Curso de Veterinária Paulo Roberto, João José e João Luís pela preciosa contribuição na elaboração de figuras e digitalização das fotos.

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro pelo apoio recebido da Coordenação do Curso de Farmacologia.

Aos colegas de pós-graduação George, Werlames, Regina e Sandra, pelo companheirismo no laboratório e convivência durante o curso, e a estudante de medicina Cristina, pelo harmonioso desenvolvimento das técnicas aprendidas e obtenção dos dados para os trabalhos.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas: Kátia Maria L. Nogueira, Terezinha F. França, José Amadeus de Souza, Jociê A. Silva, Bento F. de Oliveira, Joana M. Tavares.

Aos funcionários da Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde Dra. Norma Linhares (diretora), Rita de Cássia, Raimundo Cezar e demais trabalhadores, pela receptividade e presteza no atendimento.

Às funcionárias Sílvia Maria A. de Lima e Aura Rhanes Yida, pelo apoio recebido da Coordenação do Curso de Farmacologia.

Agradecimentos especiais às instituições Universidade Federal do Ceará-UFC, Universidade Estadual do Ceará-UECE, Faculdade de Veterinária-FAVET, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Ceará-FUNCAP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, National Institute of Health - NIH, Grant # 1830235, e Howard Hughes Medical Institute, Grant: 55000645.

Agradeço, ainda, a todas aquelas pessoas que, tendo contribuído para minha formação ao longo do doutorado, eu não tenha sido capaz de perceber tal contribuição.

Meu muito obrigado a todas essas pessoas citadas e um agradecimento todo especial e com muita intensidade: a minha mãe, esposa, filhas, irmãos, amigos e colegas que pensaram positivamente, no sentido de tudo dar certo.

E deu certo!

**“Existem homens que lutam um dia e são bons
Existem outros que lutam um ano e são melhores
Existem os que lutam muitos anos e são muito bons
Mas existem os que lutam toda a vida
Esses são os imprescindíveis”.**

Bertold Brecht

“Não vale afirmar sem exemplo, nem sonhar sem trabalho”.

Francisco Cândido Xavier (pelo espírito Emmanuel)

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO	ix
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvii
ABREVIATURAS UTILIZADAS NO TRABALHO	xviii
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia das Doenças Diarréicas	1
1.2 Classificação das diarreias: não-inflamatórias e inflamatórias	2
1.3 Gênero <i>Vibrio</i>	4
1.3.1 Microbiologia do <i>V. cholerae</i>	4
1.3.2 Fisiopatologia do <i>V. cholerae</i>	5
1.4 Gênero <i>Bacteroides</i>	9
1.4.1 Microbiologia do <i>Bacteroides fragilis</i>	10
1.4.2 Evolução histórica	11
1.4.3 Associação do <i>B. fragilis</i> com doenças nos animais e no homem	11
1.4.4 Toxinas do <i>B. fragilis</i>	13
1.4.4.1 Endotoxina (LPS)	13
1.4.4.2 Exotoxinas	15
1.4.5 Fisiopatologia da infecção intestinal causada pelo <i>B. fragilis</i>	16
1.5 Células do sistema imune e enterotoxinas do <i>V. cholerae</i> do <i>V. cholerae</i> e <i>B. fragilis</i>	19
1.6 Mastócito: papel no processo inflamatório	22
1.6.1 Mediadores associados aos grânulos	25
1.6.1.1 Histamina	25
1.6.1.2 Heparina	25
1.6.1.3 Serotonina (5-HT; 5-Hidroxitriptamina)	26
1.6.2 Mediadores derivados de lipídios	26
1.6.3 Citocinas e quimiocinas	28

1.6.4 Ativação dos mastócitos e liberação dos mediadores	28
1.6.5 Mastócito como célula apresentadora de antígeno	29
1.6.6 Resposta diferenciada dos mastócitos a um alérgeno e a uma bactéria ...	31
1.6.7 Resposta secretória dos mastócitos à bactéria <i>in vitro</i>	32
1.6.8 Resposta secretória dos mastócitos à bactéria <i>in vivo</i>	34
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Animais experimentais	39
4.1.1 Ratos	39
4.1.2 Coelhos	39
4.2 Toxinas bacterianas	39
4.2.1 Toxina do <i>V. cholerae</i>	39
4.2.2 Toxina do <i>B. fragilis</i>	39
4.2.3 Filtrados bacterianos obtidos das cepas NTBF e ETBF	40
4.3 Drogas	40
4.4 Composição das soluções e dos meios de culturas	40
4.5 Alça intestinal ligada	43
4.6 Isolamento de células do sistema imune gastrointestinal	45
4.6.1 Células totais do sistema imune gastrointestinal	45
4.6.2 Isolamento de mastócitos do sistema imune gastrointestinal	46
4.7 Técnica histopatológica	48
4.8 Necropsia dos animais	49
4.9 Migração celular em cavidades peritoneais de ratos	50
4.9.1 Obtenção do material	51
4.9.2 Contagem celular total e diferencial	51
4.9.3 Curva dose-resposta da migração celular	51
4.9.4 Curva tempo-efeito da migração celular	52
4.10 Câmara de Üssing	52
4.10.1 Preparação da solução de Ringer	52

4.10.2	Preparação e montagem do íleo	52
4.10.3	Montagem e funcionamento das câmaras	54
4.11	Dosagem de citocinas	56
4.11.1	Ensaio para detecção de IL-1 β	56
4.11.2	Ensaio para detecção de TNF- α	58
4.12	Protocolos experimentais	59
4.12.1	Inoculação dos controles (PBS e BBL TM) e filtrados das bactérias não-toxigênica (NTBF) e toxigênica (ETBF) em alça intestinal ligada.	59
4.12.2	Estudo das curvas dose-resposta e tempo efeito da toxina da cólera em alça intestinal ligada de ratos	60
4.12.3	Inoculação das toxinas do <i>V. cholerae</i> (TC) e do <i>B. fragilis</i> (TBF) em alça intestinal ligada de ratos	60
4.12.4	Inoculação dos sobrenadantes da cultura de mastócitos estimulados com as toxinas do <i>V. cholerae</i> e do <i>B. fragilis</i> em alça intestinal ligada de ratos	60
4.12.5	Estudo histopatológico	60
4.12.6	Estudo das curvas dose-resposta e tempo-efeito da toxina pura do <i>B. fragilis</i> na migração celular em cavidade peritoneal de ratos	61
4.12.7	Bloqueadores farmacológicos utilizados na modulação da secreção intestinal induzida pela toxina da cólera (TC)	61
4.12.8	Análise estatística	63
5	RESULTADOS	64
5.1	Atividade secretória intestinal da toxina da cólera, dos filtrados das cepas não-toxigênicas e toxigênicas e da toxina pura do <i>B. fragilis</i>	64
5.1.1	Atividade secretória intestinal promovida pela toxina da cólera	64
5.1.2	Avaliação da participação dos mastócitos na produção de secreção induzida pela toxina da cólera	64
5.1.3	Participação dos antagonistas dos receptores de histamina e serotonina, na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera	64
5.1.4	Participação dos inibidores da fosfolipase A ₂ na atividade secretória da toxina da cólera	65
5.1.5	Participação dos inibidores da ciclooxygenase na atividade secretória da	

4.10.2	Preparação e montagem do íleo	52
4.10.3	Montagem e funcionamento das câmaras	54
4.11	Dosagem de citocinas	56
4.11.1	Ensaio para detecção de IL-1 β	56
4.11.2	Ensaio para detecção de TNF- α	58
4.12	Protocolos experimentais	59
4.12.1	Inoculação dos controles (PBS e BBL™) e filtrados das bactérias não-toxigênica (NTBF) e toxigênica (ETBF) em alça intestinal ligada.	59
4.12.2	Estudo das curvas dose-resposta e tempo efeito da toxina da cólera em alça intestinal ligada de ratos	60
4.12.3	Inoculação das toxinas do <i>V. cholerae</i> (TC) e do <i>B. fragilis</i> (TBF) em alça intestinal ligada de ratos	60
4.12.4	Inoculação dos sobrenadantes da cultura de mastócitos estimulados com as toxinas do <i>V. cholerae</i> e do <i>B. fragilis</i> em alça intestinal ligada de ratos	60
4.12.5	Estudo histopatológico	60
4.12.6	Estudo das curvas dose-resposta e tempo-efeito da toxina pura do <i>B. fragilis</i> na migração celular em cavidade peritoneal de ratos	61
4.12.7	Bloqueadores farmacológicos utilizados na modulação da secreção intestinal induzida pela toxina da cólera (TC)	61
4.12.8	Análise estatística	63
5	RESULTADOS	64
5.1	Atividade secretória intestinal da toxina da cólera, dos filtrados das cepas não-toxigênicas e toxigênicas e da toxina pura do <i>B. fragilis</i>	64
5.1.1	Atividade secretória intestinal promovida pela toxina da cólera	64
5.1.2	Avaliação da participação dos mastócitos na produção de secreção induzida pela toxina da cólera	64
5.1.3	Participação dos antagonistas dos receptores de histamina e serotonina, na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera	64
5.1.4	Participação dos inibidores da fosfolipase A ₂ na atividade secretória da toxina da cólera	65
5.1.5	Participação dos inibidores da ciclooxigenase na atividade secretória da	

toxina da cólera	65
5.1.6 Participação dos inibidores da lipoxigenase, na atividade secretória da toxina da cólera	65
5.1.7 Participação dos bloqueadores da síntese de TNF- α , na atividade secretória da toxina da cólera	65
5.1.8 Participação dos antagonistas de PAF, na atividade secretória da toxina da cólera	66
5.1.9 Modulação da lidocaína e atropina na atividade secretória da toxina da cólera	66
5.1.10 Determinação de IL-1 β e TNF- α na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera	66
5.1.11 Efeito da toxina da cólera sobre o transporte iônico em câmara de Üssing	66
5.1.12 Atividade secretória intestinal dos filtrados das cepas não-toxigênicas, toxigênicas e da toxina pura do <i>B. fragilis</i>	67
5.2 Estudo histopatológico	74
5.2.1 Análise histopatológica do íleo, após 8, 12 e 18 horas da inoculação dos controles (PBS e BBL™).....	74
5.2.2 Alterações histopatológicas no íleo, após dezoito horas da inoculação da toxina da cólera	74
5.2.3 Alterações histopatológicas no íleo, após dezoito horas da inoculação do sobrenadante de mastócitos estimulados pela toxina da cólera	74
5.2.4 Alterações histopatológicas no íleo, após oito horas da inoculação dos filtrados dos sobrenadantes das cepas não-toxigênica e toxigênica do <i>B. fragilis</i>	75
5.2.5 Alterações histopatológicas no íleo, após doze horas da inoculação dos filtrados dos sobrenadante das cepas não-toxigênica e toxigênica do <i>B. fragilis</i>	75
5.2.6 Alterações histopatológicas no íleo, após dezoito horas da inoculação dos filtrados dos sobrenadante das cepas não-toxigênica e toxigênica do <i>B. fragilis</i>	76
5.2.7 Alterações histopatológicas no íleo, após dezoito horas da inoculação da	

toxina purificada do <i>B. fragilis</i>	76
5.2.8 Alterações histopatológicas no íleo, após dezoito horas da inoculação do sobrenadante de mastócitos estimulados pela toxina do <i>B. fragilis</i>	77
5.2.9 Alterações macroscópicas e histopatológicas em órgãos e tecidos, após 12 horas da inoculação do filtrado do sobrenadante da cepa toxigênica do <i>B. fragilis</i>	77
5.3 Migração celular induzida pela toxina do <i>B. fragilis</i>	84
5.3.1 Indução da migração celular pela toxina do <i>B. fragilis</i> nas doses de 1, 3 e 10 µg/ml, após 4 horas da inoculação: curva dose-efeito da toxina do <i>B. fragilis</i>	84
5.3.2 Indução da migração celular pela toxina do <i>B. fragilis</i> na dose de 3 µg/ml, após 2, 4 e 8 horas da inoculação: curva tempo-efeito da toxina do <i>B. fragilis</i>	89
6 DISCUSSÃO	95
6.1 Aspectos gerais da fisiopatologia da diarreia causada por <i>V. cholerae</i> e <i>B. fragilis</i>	95
6.2 Retrospectiva de trabalhos desenvolvidos no nosso laboratório	98
6.3 Efeito secretório da toxina da cólera e do sobrenadante de cultura e da toxina purificada do <i>Bacteroides fragilis</i>	100
6.4 Modulação farmacológica realizada com a indução da toxina da cólera	101
6.5 Estudo histopatológico do efeito observado após inoculação da toxina da cólera, do sobrenadante de cultura e da toxina purificada do <i>B. fragilis</i>	108
6.6 Migração celular em cavidade peritoneal de ratos induzida pela toxina purificada do <i>B. fragilis</i>	112
7 CONCLUSÕES	115
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Ativação de mastócitos e sua participação em inflamação aguda e crônica	24
Figura 2 Alça intestinal ligada	44
Figura 3 Isolamento de mastócitos do sistema imune gastrointestinal ...	47
Figura 4 Migração celular em cavidades peritoneais de ratos	50
Figura 5 Funcionamento de Câmaras de Ussing	53
Figura 6 Ensaio para detecção de IL-1 β através de um teste de ELISA	57
Figura 7 Ensaio para detecção de TNF- α através de um teste de ELISA	58
Figura 8 Dose-resposta da secreção induzida pela toxina da cólera em alça intestinal ligada	68
Figura 9 Curso temporal da secreção provocada pela toxina da cólera em segmentos ligados do intestino delgado de ratos	69
Figura 10 Modulação do composto 48/80 e cetotifeno da secreção induzida pela toxina da cólera em segmentos ligados do intestino delgado de ratos	70
Figura 11 Modulação da lidocaína e atropina sobre a secreção induzida pela toxina da cólera em segmentos ligados do intestino delgado de ratos	72
Figura 12 Determinação da concentração de IL-1 β e TNF- α no fluido intestinal, induzida pela toxina da cólera em segmentos ligados do intestino delgado de ratos	73
Figura 13 Micrografias de íleo distal de ratos controle e tratados com toxina da cólera (1 μ g/ml), e sobrenadante de mastócitos estimulados com a toxina da cólera (1 μ g/ml), em alça intestinal ligada, após 18 horas	79
Figura 14 Micrografias de íleo distal de ratos tratados com filtrado do sobrenadante da cultura de duas cepas, uma não-toxigênica e outra toxigênica, do <i>Bacteroides fragilis</i> em alça intestinal ligada, após 8 e 12 horas	80

Figura 15	Micrografias de íleo distal de ratos tratados com filtrado do sobrenadante da cultura de duas cepas, uma não-toxigênica e outra toxigênica, do <i>Bacteroides fragilis</i> em alça intestinal ligada, após 12 e 18 horas	81
Figura 16	Micrografias de íleo distal de ratos, tratados com toxina purificada do <i>Bacteroides fragilis</i> (3 µg/ml) e do sobrenadante de mastócitos estimulados com esta toxina, em alça intestinal ligada, após 18 horas	82
Figura 17	Micrografias de órgãos de ratos tratados com filtrado do sobrenadante da cultura de uma cepa toxigênica do <i>Bacteroides fragilis</i> em alça intestinal ligada, após 12 horas da inoculação	83
Figura 18	Dose-efeito da migração de neutrófilos induzida pela toxina do <i>Bacteroides fragilis</i> (TBF) em cavidade peritoneal de ratos, após 4 horas da inoculação	85
Figura 19	Dose-efeito da migração de mononucleares induzida pela toxina do <i>Bacteroides fragilis</i> em cavidade peritoneal de ratos, após 4 horas da inoculação	86
Figura 20	Dose-efeito da migração de eosinófilos induzida pela toxina do <i>Bacteroides fragilis</i> em cavidade peritoneal de ratos, após 4 horas da inoculação.....	87
Figura 21	Dose-efeitos induzidos pela toxina do <i>Bacteroides fragilis</i> em cavidade peritoneal de ratos promovendo aumento de mastócitos, após 4 horas da inoculação	88
Figura 22	Curso temporal da migração de neutrófilos induzida pela toxina do <i>Bacteroides fragilis</i> em cavidade peritoneal de ratos, após 2, 4 e 8 horas da inoculação.....	91
Figura 23	Curso temporal da migração de mononucleares induzida pela toxina do <i>Bacteroides fragilis</i> em cavidade peritoneal de ratos, após 2, 4 e 8 horas da inoculação.....	92
Figura 24	Curso temporal da migração de eosinófilos induzida pela toxina do <i>Bacteroides fragilis</i> em cavidade peritoneal de ratos,	

	após 2, 4 e 8 horas da inoculação.....	93
Figura 25	Curso temporal no aumento do número de mastócitos induzida pela toxina do <i>Bacteroides fragilis</i> em cavidade peritoneal de ratos, após 2, 4 e 8 horas da inoculação	94

	após 2, 4 e 8 horas da inoculação.....	93
Figura 25	Curso temporal no aumento do número de mastócitos induzida pela toxina do <i>Bacteroides fragilis</i> em cavidade peritoneal de ratos, após 2, 4 e 8 horas da inoculação	94

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela-1	Composição da solução de Hanks	40
Tabela-2	Composição da solução salina tamponada com fosfato (PBS)	41
Tabela-3	Composição do líquido de Turk	41
Tabela-4	Composição do meio de cultura Dulbecco	42
Tabela-5	Composição da solução de Ringer	42
Tabela-6	Modulação dos bloqueadores farmacológicos na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera	71

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela-1	Composição da solução de Hanks	40
Tabela-2	Composição da solução salina tamponada com fosfato (PBS)	41
Tabela-3	Composição do líquido de Turk	41
Tabela-4	Composição do meio de cultura Dulbecco	42
Tabela-5	Composição da solução de Ringer	42
Tabela-6	Modulação dos bloqueadores farmacológicos na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera	71

ABREVIATURAS UTILIZADAS NO TRABALHO

Ace	Enterotoxina acessória da cólera
AMPc	AMP-cíclico
BBL™	Meio de cultura para anaeróbios Gaspak Plus
BFT	Toxina purificada do <i>Bacteroide fragilis</i>
CD	“Cluster designation”
CIT	Células intestinais totais
COX	Ciclooxygenase
C3a/C4a	Proteínas do sistema de complemento
DP	Diferença de potencial
ELISA	“Enzyme-linked immuno sorbent assay”
ETBF	Cepa enterotoxigênica do <i>B. fragilis</i>
F _{ab}	Fragmentos de ligação dos antígenos no anticorpo
F _{ce} RI	Receptor de alta afinidade para imunoglobulina E
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FimH	Fímbria de aderência de <i>Escherichia coli</i>
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino
GM-CSF	Fator estimulador de crescimento de neutrófilos e macrófagos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IL-1ra	Antagonista do receptor de interleucina-1
I _{sc}	Corrente de curto-circuito
LPS	Lipopolissacáride
LTN	Linfotaxina
LT	Leucotrieno
MCP	Peptídeo quimioatraente de macrófagos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP	Macrophage inflammatory protein
NTBF	Cepa não-enterotoxigênica do <i>B. fragilis</i>
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PG	Prostaglandinas
PTKs	Proteínas da tirosina quinase
R	Resistência
SCF	Fator estimulador de colônias
SFB	Soro fetal bovino
Syk	Um tipo de tirosina quinase
5-HT	5-Hidroxitriptamina, Serotonina
TBF	Toxina do <i>Bacteroides fragilis</i>
TC	Toxina da cólera
TCB	Toxinas e constituintes bacterinos

TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
Zot	Toxina para zônula ocludentes

RESUMO

O presente estudo aborda as toxinas do *Vibrio cholerae* e *Bacteroides fragilis* buscando estudar a farmacodinâmica das suas atividades enterotóxicas e pró-inflamatórias. A toxina da cólera (TC) promoveu uma secreção dose-dependente em alça intestinal ligada de rato. Os ratos tratados com o composto 48/80 ou cetotifeno apresentaram uma diminuição significativa da resposta secretória intestinal provocada pela TC (bloqueio: 45% e 52%, respectivamente). Sendo esta resposta reduzida ($p \leq 0,05$) por antagonistas dos receptores da histamina/serotonina (ciproheptadina: 48%), histamina (difenidramina: 45%), inibidores da fosfolipase A_2 (dexametasona: 43% e quinacrina: 35%), bloqueadores da ciclooxigenase (celocoxib: 60% e meloxicam: 71%), antagonistas de receptor de PAF (BN 52021: 32% e WEB 2086: 32%) e bloqueadores da síntese de TNF- α (pentoxifilina: 62% e talidomida: 44%). Por outro lado, o pré-tratamento com o antagonista específico de receptor de serotonina e inibidores da lipoxigenase não bloquearam esse efeito. A análise do fluido intestinal dos ratos injetados com a TC, por ELISA, revelou que essa toxina induz a liberação de IL-1 β e TNF- α no fluido intestinal. Os estudos histopatológicos do intestino, 18h após inoculação da toxina em alça, apresentaram distúrbios circulatórios com congestão e edema de mucosa e submucosa intestinal, além de intensa infiltração de mastócitos na lâmina própria intestinal. A injeção intraluminal do sobrenadante da cultura das cepas não-toxigênica e toxigênica, e da toxina purificada do *B. fragilis* (TBF), não produziu secreção intestinal significativa. Contudo, foram verificadas alterações na estrutura e forma dos vilos, criptas, submucosa e mucosa intestinal, além da ocorrência de intensa infiltração de mastócitos na mucosa e submucosa. Também foram verificadas alterações em órgãos vitais, como: *fígado, coração, rim e cérebro*. Na migração celular, induzida pela TBF, foi verificado um aumento significativo de mastócitos (TBF_{3 μ g/ml}: $0,450 \pm 0,050$ vs. PBS: $0,200 \pm 0,037$; 4 h) e eosinófilos (TBF_{3 μ g/ml}: $0,750 \pm 0,157$ vs. PBS: $0,367 \pm 0,126$; 4h; e, TBF_{3 μ g/ml}: $0,800 \pm 0,115$ vs. PBS: $0,433 \pm 0,084$; 8h). Por outro lado, essa toxina foi incapaz de induzir a migração de neutrófilos e mononucleares. Os dados sugerem que a secreção, devido a TC, envolve uma resposta inflamatória

com a participação de mastócitos, histamina, prostaglandinas, PAF, IL-1 β e TNF- α . A TBF promoveu migração de mastócitos e eosinófilos, *in vivo*. Há uma participação efetiva do componente pró-inflamatório nas atividades biológicas das toxinas do *V. cholerae* e *B. fragilis*.

ABSTRACT

This work deals with *Vibrio cholerae* and *Bacteroides fragilis* toxins, aiming to investigate the pharmacodynamics of their enterotoxic and proinflammatory activities. Cholera toxin caused dose-dependent secretory response in ligated loops of rat intestine. Rats treated with 48/80 compound or ketotifen showed a significant decrease in intestinal secretory response evoked by cholera toxin (blocking: 45% and 52%, respectively to 48/80 and ketotifen). Such secretory response was also significantly reduced by histamine/serotonin receptors antagonists (cyproheptadine: 48%), histamine (diphenhydramine: 45%), phospholipase A₂ inhibitors (dexamethasone: 43% and quinacrine: 35%), cyclooxygenase blockers (celcoxib: 60% and meloxicam: 71%), PAF receptors antagonists (BN 52021: 32% and WEB 2086: 32%) and TNF- α synthesis inhibitors (pentoxifyline: 62% and thalidomide: 44%). On the other hand, the previous treatment with serotonin receptor specific antagonist and lipooxygenase inhibitors failed to inhibit this effect. ELISA trials of intestinal fluid derived from rats submitted to cholera toxin demonstrated that this toxin induced IL-1 β and TNF- α release at intestinal fluid. Histopathology examination of intestinal tissue, 18h after toxin injection of loop, revealed hemodynamic disturbances such as congestion and edema of mucosal/submucosal layers, besides a severe infiltration of mast cells at the intestinal corion. Intraluminal injection of culture supernatants from non-toxigenic and toxigenic strains, as well as from purified toxin of *B. fragilis*, was not able to induce significant intestinal secretion. However, structural changes were seen in the shape of villi and crypts, plus submucosal and mucosal layers modifications, including the occurrence of severe mast cell infiltration. In addition, some other vital organs exhibited morphological changes, such as liver, heart, kidneys and brain. Cell migration, which was induced by *B. fragilis* purified toxin, was associated with a significant increase in number of mast cells (TBF_{3 μ g/ml}: 0,450 \pm 0,050 vs. PBS: 0,200 \pm 0,037; 4 h) and eosinophils (TBF_{3 μ g/ml}: 0,750 \pm 0,157 vs. PBS: 0,367 \pm 0,126; 4h; and TBF_{3 μ g/ml}: 0,800 \pm 0,115 vs. PBS: 0,433 \pm 0,084; 8h).

On the contrary, *B. fragilis* purified toxin was not able to induce neutrophil or mononuclear cell migration. Our results suggest that the secretory response to cholera toxin involves an inflammatory reaction orchestrated by mast cells, histamine, prostaglandins, PAF, IL-1 β and TNF- α . *B. fragilis* toxin promoted mast cells and eosinophils migration, *in vivo*. This seems to reveal an efficient pro-inflammatory participation on biological activities of *V. cholerae* and *B. fragilis* toxins.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das Doenças Diarréicas

As doenças diarréicas infecciosas são responsáveis por milhões de casos clínicos, chegando a ser a segunda maior causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (WHO, 1996). Os casos de mortes, por estas enfermidades, na Ásia, África e América Latina, estão compreendidos entre quatro e seis milhões de crianças, por ano (SNYDER; MERSON, 1982; GUERRANT *et al.*, 1990). A estimativa de atendimento clínico chega a 73 milhões de consultas, só nos Estados Unidos, com ocorrência aproximada de 211-375 milhões de episódios da doença diarréica, 1,8 milhões de hospitalizações e 3100 mortes, em cada ano (GUERRANT, 1998). No Brasil, a diarréia continua sendo uma das principais causas de mortalidade em crianças menores de cinco anos, e acumula cerca de 15% do total dos óbitos nesta faixa etária (FAGUNDES-NETO *et al.*, 1996). Estudos no Nordeste, mais especificamente no Ceará, têm mostrado que a diarréia alcança altos índices de mortes na infância (LIMA *et al.*, 1992; LIMA *et al.*, 2000). Em uma comunidade urbana, na cidade de Guaiuba-Ce, observou-se que cerca de 70% das mortes infantis foi devido a diarréia, e metade estava associada com a diarréia persistente (LIMA *et al.*, 1992). A diarréia persistente (duração ≥ 14 dias), em uma comunidade urbana de Fortaleza, além dos próprios efeitos da enfermidade em si, também mostrou-se associada com deficiências nutricionais (LIMA *et al.*, 2000).

Uma ampla variedade de agentes patogênicos está relacionada com as doenças diarréicas do trato gastrointestinal, como: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, *Giardia* e vários vírus entéricos. Esses agentes são os principais responsáveis por essas enfermidades de grande abrangência e relevância para saúde pública (BARTLETT, 1990; AVERY *et al.*, 1992; LIMA *et al.*, 2000; GUERRANT *et al.*, 2001). Contudo, outros microrganismos constituintes da flora intestinal, do homem e dos animais, vêm se apresentado como possíveis implicados em diarréias ocasionais, como os *Bacteroides fragilis* (SEARS *et al.*, 1995). Por outro lado, atenção especial deve se dar ao cólera, que havia desaparecido do hemisfério ocidental, até 1991, quando

voltou a ocorrer pela primeira vez nos últimos cem anos, constituindo-se na sétima pandemia. O *V. cholerae* El Tor espalhou-se amplamente, tornando-se endêmico em 22 dos 23 países das Américas Central e do Sul, e após cruzar os Andes disseminou-se por 19 Estados brasileiros (LIMA, 1994). Grande importância tem sido dada, também, à *diarréia dos viajantes*, que se caracteriza como devastadora em crianças nos países em desenvolvimento, e em acometer turistas durante suas visitas, principalmente, às regiões de veraneio (LIMA *et al.*, 1992; DuPONT; ERICSSON, 1993; LIMA *et al.*, 2002).

Como se constata nas observações anteriores, as doenças diarréicas constituem-se em um problema mundial permanente, e têm uma variação regional substancial quanto a prevalência dos patógenos, disponibilidade dos meios diagnósticos e tratamento, além dos níveis de prevenção alcançada. Dessa forma, as diarréias infecciosas tornam-se um problema de saúde comum. Contudo, segundo Lima *et al.*, (2000); Guerrant *et al.* (2001); Lima *et al.*, (2002), faz-se necessário que algumas recomendações sejam preconizadas aos indivíduos afetados ou no controle da enfermidade, como: rehidratação oral; avaliação clínica e epidemiológica; estudo seletivo do material fecal coletado; administração de uma terapia antimicrobiana seletiva; considerar os antidiarréicos; e, administrar vacinas seletivas disponíveis.

Considerando as diferentes etiologias das diarréias, torna-se importante agrupá-las em categorias que venha facilitar sua abordagem tanto na clínica médica como nos cuidados a serem adotados pelos serviços de saúde pública.

1.2 Classificação das diarréias: não-inflamatórias e inflamatórias

Uma consideração dos dois tipos de patogênese da diarréia microbiana, segundo Guerrant; Bobak (1991), tem implicações práticas úteis. A maioria das doenças diarréicas é *não-inflamatória*, originando-se da ação de uma enterotoxina no intestino delgado superior (como as diarréias da cólera ou da *Escherichia coli* enterotoxigênica) ou de outros processos que alteram especificamente a função absorptiva da superfície dos vilos (produzidos por *Escherichia coli* enteropatogênica, *Cryptosporidium*, *Giardia* e rotavírus). Esse tipo de diarréia é aquoso e com graus variáveis de severidade (BOBAK; GUERRANT, 1992;

SEARS; KAPER, 1996; SACK *et al.*, 1997). Por outro lado, a diarreia *inflamatória* surge, geralmente, no cólon, produzida por um processo invasivo (com ou sem citotoxinas), como acontece em shigeloses, salmoneloses, infecções por *Campilobacter*, enterite citotoxigênica promovida pelo *Clostridium difficile* ou amebíases (GUERRANT, 1994; SEARS; KAPER, 1996; SACK *et al.*, 1997; GUERRANT *et al.*, 2001). A etiologia inflamatória pode ser suspeitada com base na observação de febre, tenesmo ou sangue nas fezes, sendo confirmada pela presença de leucócitos, nos exames microscópicos (KORZENIOWSKI *et al.*, 1979), ou pela presença de lactoferrina, um marcador específico de polimorfonucleares neutrófilos, nesse material (HINES; NACHAMKIN, 1996).

Novos patógenos e novos conhecimentos de antigos agentes causadores de enfermidades infecciosas constituem aspectos esclarecedores para o entendimento da sinalização celular e dos mecanismos de produção da secreção. Dessa forma, os mecanismos de ação das toxinas, produzidas por esses agentes infecciosos, vão sendo caracterizados e encontradas semelhanças (toxina da cólera e toxina termo-lábil da *E. coli*, que atuam nas subunidades α da proteína G_s , promovendo sua ribosilação) e diferenças (toxinas A, secretória, e B, citotóxica, do *C. difficile*, atuando nas proteínas Rho, Rac e Cdc42). As subunidades da metaloprotease do *C. botulinum* (tem um átomo de zinco na sua estrutura), C2 e C3, promovem a ADP-ribosilação, inativando a actina e a proteína Rho, respectivamente (GUERRANT, 1994; GUERRANT *et al.*, 1999a). Outros mecanismos podem, ainda, estar envolvidos em uma "up-regulation" das células hospedeiras na produção de citocinas após a estimulação da *E. coli* enterotoxigênica (ZHANG; NORMARK, 1996), ou através dos produtos bacterianos secretados pela emergente *E. coli* enteroagregativa, que estimula a secreção de citocinas pró-inflamatória (STEINER *et al.*, 1998).

Na classificação da patogênese para as diarreias intestinais, considerada por Guerrant; Bobak (1991), os microrganismos *V. cholerae* e *B. fragilis* foram colocados no grupo das enfermidades não-inflamatórias. Contudo, tem se observado que estes agentes também podem promover efeitos citotóxicos (WEIKEL *et al.*, 1992; BEUBLER; HORINA, 1990; MCGEE *et al.*, 1993; PETERSON; WHIPP, 1995; OBISO *et al.*, 1995; SANFILIPPO *et al.*, 1998), e mais

recentemente vem se caracterizando como sendo capazes de promover inflamação (SILVA *et al.*, 1996; SANFILIPPO *et al.*, 2000; SAHA *et al.*, 2000; QUADRI *et al.*, 2002; VIANA *et al.*, 2002). No contexto dessa nova abordagem e no sentido de identificar novos achados que possam contribuir para o esclarecimento da fisiopatologia dos agentes infecciosos, esses dois agentes, *V. cholerae* e *B. fragilis*, são considerados como importantes alvos de estudo.

1.3 Gênero *Vibrio*

O gênero *Vibrio* é o grupo bacteriano mais extensivamente investigado e de maior importância médica dentro da família *Vibrionaceae*. Esse gênero inclui espécies que são encontradas em ambientes aquáticos, com algumas delas podendo causar doenças no homem, em vertebrados marinhos e invertebrados. No passado a importância dos vibriões estava associada quase que exclusivamente a cólera epidêmica e pandêmica, resultante de uma forma antigênica particular do *Vibrio cholerae*. Até recentemente pensava-se que o homem era o único hospedeiro natural do *V. cholerae* e que todas as infecções resultavam do contato direto ou indireto com as suas próprias fezes. Atualmente, sabe-se que o *V. cholerae*, como outros vibrios, é encontrado freqüentemente como residente natural de ambientes aquáticos em áreas livres da cólera e que sua presença não está, necessariamente, associada com contaminação fecal (KAPER *et al.*, 1995; LEWIS, 1998).

Hoje já são conhecidas mais de 20 espécies, constituindo o gênero *Vibrio*, sendo os patógenos *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* os mais significativos para o homem, por sua capacidade em promover enfermidades. Desses, o *V. cholerae* continua sendo o de maior importância por ser responsável por grandes danos em saúde pública, como a epidemia ocorrida na América Latina em 1991, que 24 meses depois do seu início, após cruzar os Andes, disseminou-se por 19 Estados brasileiros (LIMA, 1994).

1.3.1 Microbiologia do *V. cholerae*

O *V. cholerae* é uma bactéria Gram-negativa, que se apresenta na forma de bastão curto, e movimentando-se por meio de um único flagelo polar. O

antígeno somático da estrutura (O) é de importância fundamental na identificação deste organismo, que já apresenta mais de 130 diferentes sorogrupos do tipo O, descritos. Desse total, dois são os principais causadores da cólera epidêmica: os sorotipos O1 e O139. O biotipo clássico *Vibrio cholerae* O1, posteriormente classificado como Inaba ou Ogawa, é presumido como sendo o responsável pelas endemias ou epidemias da cólera desde a descoberta do microrganismo, em 1883, até por volta de 1960 (FARUQUE *et al.*, 1993). Em 1961, foi identificado o novo biotipo El Tor do *V. cholerae* O1 em uma pandemia que começou nas ilhas Celebes, na Indonésia (SIDDIQUE *et al.*, 1991). Estudos associando genes de virulência e proteínas produzidas pelo *V. cholerae* O139 mostram que esta cepa é mutante do El Tor, com determinantes da virulência típicos do biotipo O1 (LIMA, 1994). Esses tipos (O1 e O139) são os principais responsáveis pela produção da toxina da cólera (TC). As cepas de outros sorogrupos são conhecidas como *V. cholerae* não-O1, e correspondem às conhecidas, no passado, como víbrios não-aglutináveis ou não-coléricas, mas com alguns deles podendo promover diarreia moderada no homem (LEVINE *et al.*, 1988). Essas diarreias moderadas, promovidas por estas cepas não-coléricas, possibilitaram a identificação de duas toxinas adicionais, uma para zônula ocludentes (Zot) e outra para a enterotoxina acessória da cólera (Ace) (KAPER *et al.*, 1995). Os genes responsáveis pela expressão dessas toxinas encontradas na enfermidade da cólera (*ctxAB*), Zot (*zot*) e Ace (*ace*) estão localizados em uma "região core" ou "cassete de virulência" no cromossomo, medindo cerca de 4,5-kb (TRUCKSIS *et al.*, 1993). Apesar das cepas apresentarem perfis diferentes quanto à sua patogenicidade, possuem um mesmo tipo de antígeno flagelar (H), bem como, são tolerantes aos meios alcalis, pouco resistentes aos ácidos, crescem rapidamente em temperatura de até 42°C e suportam pH variando de 7,4 a 9,6.

1.3.2 Fisiopatologia do *V. cholerae*

A cólera é caracterizada por ter um início repentino de vômito, com diarreia aquosa e profusa. Essa diarreia é uma característica comum da enfermidade, levando a uma rápida desidratação e choque hipovolêmico, que pode causar morte em 12 a 24 horas. As fezes são aquosas, descoloridas e com muco

característico (fezes de água de arroz), contendo pouca proteína, o que difere das fezes mucopurulentas e sanguinolentas das disenterias bacilares. Desenvolve anúria, ocorrem câibras musculares e o paciente torna-se rapidamente débil e letárgico com perda do turgor da pele, queda da pressão sangüínea e ausência do pulso. A severidade clínica pode variar, inclusive ocorrência da falta de sintomas da infecção é comum. A seqüência de eventos, observada na cólera, é decorrente do seu efeito no intestino (KAPER *et al.*, 1995; LEWIS, 1998).

O *V. cholerae* é ingerido com a água ou alimentação e, em infecções naturais, a dose necessária pode ser bem pequena (LEVINE *et al.*, 1983). Após sua ingestão e passagem pela barreira ácida do estômago, começa a multiplicar-se no ambiente alcalino do intestino delgado, sítio primário de infecção com o *V. cholerae* O1, originando a diarréia secretória que é o principal distúrbio durante a cólera. A taxa de perda de fluidos é maior no jejuno que alcança até 11 ml/cm/h, registrados em estudos de perfusão em pacientes com cólera aguda (BANWELL *et al.*, 1970). O *V. cholerae* O1 coloniza o epitélio intestinal sem invadir as células epiteliais ou causar qualquer alteração estrutural (GANGAROSA *et al.*, 1960). Os principais efeitos promovidos pela infecção com o *V. cholerae* O1 são o aumento da atividade secretória de bicarbonato e cloreto no lúmen intestinal, pelas células das criptas e uma diminuição da absorção de cloreto de sódio nos vilos (FIELD *et al.*, 1972).

A toxina da cólera é o protótipo das toxinas com sub-unidades **A-B**, que consiste de uma subunidade **A** e cinco subunidades **B**. A subunidade **A** é constituída de dois peptídeos ligados por uma ponte dissulfeto: **A1** (21,8 kDa) que tem a atividade de ADP-ribosiltransferase, e **A2** (5,4 kDa) que se liga às subunidades **A1** e **B**. A subunidade **B** (11,6kDa) é responsável pela ligação da holotoxina a resíduos de açúcares de um receptor gangliosídico específico (GM₁) nas células dos vilos do intestino delgado. Por meio de cristalografia de raio-X foi revelada que a subunidade **B** se organiza na forma de um pentâmero, com um poro central, e ao inserir-se na membrana da célula hospedeira forma um canal hidrofílico transmembrânico que possibilita a passagem da subunidade da toxina **A** para o citoplasma (SPANGLER, 1992).

A atuação da toxina da cólera afeta um dos mais importantes fatores reguladores das células eucarióticas, a adenilato ciclase, a qual transforma o ATP em AMP-cíclico (AMPc). O AMPc é um mensageiro intracelular fundamental de várias vias metabólicas celulares. Normalmente, a adenilato ciclase é ativada ou inativada em resposta a vários estímulos. A regulação da adenilato ciclase é mediada pela proteína G, que serve para ligação em receptores de superfície celular e a proteínas efetoras na célula. A proteína G específica envolvida é a proteína G_s , cuja ativação promove um aumento na atividade da adenilato ciclase. A TC catalisa a transferência da ADP-ribose, com a participação de NAD, para um resíduo de arginina específico na sub-unidade α da proteína G_s . Esta atividade está associada especificamente com o peptídeo A1 (GILL; KING, 1975). A ribosilação da sub-unidade α , ativa a adenilato ciclase, aumentando significativamente o AMPc intracelular. O AMPc promove a fosforilação de várias proteínas quinases, causando a secreção e diminuição na absorção de eletrólitos e água.

Após a toxina da cólera ligar-se na célula normal, transcorre um período de de 15 a 60 minutos para que a adenilato ciclase seja ativada (GILL; KING, 1975), tempo necessário para que o peptídeo A1 atravesse a membrana e alcance a proteína G. As proteínas G são heterodímeros compostos de três subunidades distintas: α ($M_r = 39$ a 46 kDa), β ($M_r = 37$ kDa) e γ ($M_r = 8$ kDa) (HEPLER *et al.*, 1992). A $G_{s\alpha}$ pode dissociar-se das outras subunidades e interagir com a adenilato ciclase, e assim ativando-a. Essa é uma ativação irreversível da adenilato ciclase (ativação constitutiva) e super-produção de AMPc (KAPER *et al.*, 1995). Em íleo de coelho, *in vivo*, Field *et al.* (1972) observaram um início lento da inibição da absorção de NaCl e estimulação da secreção de Cl^- . O aumento do AMPc inibe a captação dos íons Na^+ e Cl^- , pelas células dos vilos, podendo levar a uma hipersecreção dos íons Cl^- e HCO_3^- . Este evento bloqueia a captação da água, que normalmente acompanha a absorção de Na^+ e Cl^- , e por meio de um fluxo passivo, através das células da mucosa, leva a perdas sérias de água e eletrólitos (FIELD *et al.*, 1972). Observações *in vivo* e *in vitro* colocam a patogênese da secreção intestinal causada pela TC como um evento complexo, envolvendo muitos mecanismos adicionais que, provavelmente, servem para aumentar ou

suplementar a secreção mediada pelo AMP-cíclico (KINBERG *et al.*, 1971 ;FIELD *et al.*, 1972).

Outras toxinas do *V. cholerae*, como Zot e Ace, ainda carecem de estudos que venham esclarecer seu papel de virulência, principalmente resultante da interação com a exotoxina da cólera. Com a toxina Zot bruta tem se observado uma diminuição da resistência em íleo de coelho, sem alterar a diferença de potencial, em experimentos em câmara de Üssing (FASANO *et al.*, 1991). O início da ação de Zot bruta é imediato e a atividade é reversível. Por microscopia eletrônica tem-se mostrado que ocorre a penetração de um marcador elétron-denso nas junções firmes do íleo de coelho após o tratamento com Zot, e a análise em fratura por congelamento, revelou uma diminuição marcada no número de filamentos juncionais. Por outro lado, Zot tem-se mostrado responsável pelo rearranjo da actina F em células do epitélio intestinal de rato, *in vitro*, e de íleo de coelho, *in vivo* (FASANO *et al.*, 1995). Essas observações indicam um efeito de Zot sobre as junções firmes ou "tight junctions" epiteliais, possivelmente através de um rearranjo da actina F, sugerindo, assim, que sua contribuição para a diarreia da cólera ocorre pela alteração da permeabilidade do tecido intestinal. Alguns mecanismos de transdução de sinais têm se mostrado reguladores das "tight junctions", nas células do epitélio intestinal (SCHNEEBERGER; LYNCH, 1992; VOLBERG *et al.*, 1992), e os dados correntes colocam a Zot participando da via da tirosina quinase (PKC), capaz de induzir uma resposta das células intestinais (FASANO *et al.*, 1995). Por outro lado, a toxina Ace ainda não foi purificada, mas ela bruta promove, no íleo de coelho montado em câmara de Üssing, um aumento retardado na corrente de curto-circuito e na diferença de potencial, provavelmente decorrente do estímulo da secreção eletrogênica de cloreto (KAPER *et al.*, 1995).

Resultados obtidos em diferentes trabalhos colocam as prostaglandinas, da série E (PETERSON *et al.*, 1994; PETERSON; WHIPP, 1995) e fator ativador de plaquetas (GUERRANT *et al.*, 1994) como alguns dos mediadores implicados na fisiopatologia da toxina da cólera. Em alça intestinal ligada de coelho a toxina da cólera estimula a liberação tanto de AMPc como de prostaglandinas (PETERSON; OCHOA, 1989; TRIADAFILOPOULOS *et al.*, 1989). Acredita-se, também, que o AMP cíclico promova a liberação de serotonina das células enterocromafins, com

conseqüente ativação do sistema nervoso entérico (PETERSON *et al.*, 1994; PETERSON; WHIPP, 1995). Os mecanismos pelos quais a toxina da cólera pode estimular o metabolismo do ácido araquidônico na submucosa é desconhecido. Potencialmente, a difusão de PAF, das células epiteliais, pode ativar a fosfolipase A₂ nas células da submucosa (GUERRANT *et al.*, 1994) ou a toxina da cólera pode estimular a liberação de serotonina das células enterocromafins, que estimulam a síntese de prostaglandinas na submucosa (BEUBLER; HORINA, 1990).

Uma resposta inflamatória modesta foi observada quando células do epitélio intestinal de rato, *in vitro*, ou alças intestinais ligadas de camundongos foram tratadas com a toxina da cólera, e essa resposta estimulava a produção da citocina pró-inflamatória IL-6 (McGEE *et al.*, 1993); esse estímulo também foi capaz de ativar o sistema nervoso entérico e gerar metabólitos do ácido araquidônico, como prostaglandinas e leucotrienos, que estimulam a secreção de cloreto.

Biópsia de duodeno realizada em pacientes infectados com *V. cholerae* O1 apresentou uma inflamação modesta (MATHAN *et al.*, 1995), e em fezes de voluntários humanos infectados experimentalmente com vacina da cepa El Tor $\Delta ctxA \Delta zot \Delta ace$ foram encontrados altos níveis de lactoferrina (SILVA *et al.*, 1996), um marcador para polimorfonucleares. Esses achado demonstram, assim, um possível mecanismo pró-inflamatório na fisiopatologia da cólera, como evidenciados por vários outros trabalhos (BEUBLER; HORINA, 1990; McGEE *et al.*, 1993; PETERSON; WHIPP, 1995; QUADRI *et al.*, 2002; SORIANI *et al.*, 2002).

1.4 Gênero *Bacteroides*

A composição bacteriana do cólon é numerosa e complexa. Existem pelo menos 400 espécies constituindo sua microflora. Contudo, cerca de 70% dos isolados pertencem a quatro gêneros distintos: dois anaeróbios e dois aeróbios (MacGOWAN; GORBACH, 1981); um desses gêneros é o bacteroides, com 30% do total, sendo as espécies mais numerosas (10^9 - 10^{10} microrganismos/g de peso nas fezes secas): *B. vulgatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron* e, em menor

quantidade, *B. ovatus* e *B. fragilis* (0,5% do total), são também encontradas nos animais e no homem (SMITH; CRABB, 1961).

1.4.1 Microbiologia do *Bacteroides fragilis*

O *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) é uma bactéria anaeróbia Gram-negativa presente no cólon e se caracteriza por fermentar grandes quantidades de carboidratos (lactose, sacarose, glicose, frutose, maltose, rafinose e xilose) e por sua tolerância ao oxigênio relativamente alta, capaz de crescer em concentrações de 2 a 8%, (HOLDEMAN *et al.*, 1984) e sobreviver a exposição ao ar durante 60-90 minutos (GORBACH; BARTLETT, 1974).

As diferentes espécies de bacteroides presentes no cólon são fenotipicamente semelhantes, mas o estudo resultante da homologia DNA-DNA demonstrou que são geneticamente distintas (CATO; JOHNSON, 1976). Com relação ao *B. fragilis*, são encontradas muitas cepas diferentes; umas incapazes de promover efeitos nocivos ao hospedeiro, outras com atividades toxigênicas variadas (WEIKEL *et al.*, 1992; WU *et al.*, 2002). Alguns trabalhos apresentam três cepas toxigênicas clonadas e seqüenciadas, 86-5443-2-2 (86bft), VPI 13874 (VPI-bft ou bftP) e Coréia 419 (Coréia-bft) (MONCRIEF *et al.*, 1995; FRANCO *et al.*, 1997; KLING *et al.*, 1997). FRANCO *et al.* (1997) trabalhando com reações em cadeia em polimerase (PCR), para identificar o gene bft, observaram que as seqüências de aminoácidos N-terminal de toxina purificada do *B. fragilis* (TBF), das cepas ETBF 86-5443-2-2 e VPI 13874, eram idênticas, excetuando-se na posição 7, onde apresentavam 95,4% de similaridade das proteínas e 94,6% nas seqüências de nucleotídeos eram idênticas, não se verificando semelhança com a cepa não-toxigênica 077225-2.

A clonagem e seqüenciamento do gene bft, responsável pela síntese da toxina na cepa enterotoxigênica do *B. fragilis*, consiste de 1191 nucleotídeos que codifica para uma holoenzima com 397 aminoácidos, com peso molecular em torno de 44,4 kDa (FRANCO *et al.*, 1997; KLING *et al.*, 1997).

1.4.2 Evolução histórica

Uma forma aguda de doença entérica, observada em ovinos recém-nascidos (24 a 48 horas), caracterizava-se por apresentar diarreia profusa, inapetência, letargia e alta taxa de mortalidade, mas sem que fosse estabelecido nenhum agente etiológico da infecção intestinal (MYERS *et al.*, 1984).

Essa enfermidade foi estudada extensivamente nas décadas de 1920 e 1930, chegando-se a conclusão que havia o envolvimento de vários fatores na sua determinação, como condições sanitárias precárias, alta densidade animal e o ambiente muito úmido, além do estresse. Todos esses fatores, adicionados a alguns tipos bacterianos diferentes, resultavam em uma infecção intensa do trato intestinal (MARSH; TUNNICLIFF, 1938). Foram feitos esforços com alguns dos microrganismos isolados da infecção, como por exemplo, a bactéria *Salmonella arizonae*, buscando reproduzir os efeitos da doença através da inoculação oral em ovinos, mas sem sucesso (HARP *et al.*, 1981). Em um estudo deste problema, utilizando oito ovinos e adotando o mesmo procedimento, inoculação oral da bactéria *Bacteroides fragilis*, foi desenvolvida a doença entérica aguda em três deles, clinicamente similar à ocorrência natural, que incluía diarreia, depressão e inapetência (MYERS *et al.*, 1984). Contudo, esse efeito patogênico tem se mostrado espécie-específico quanto a sua intensidade (OBISO *et al.*, 1995; SEARS *et al.*, 1995).

1.4.3 Associação do *B. fragilis* com doenças nos animais e no homem

Após a descoberta de que determinadas cepas de *B. fragilis* enterotoxigênicas (ETBF) podiam causar doenças diarreicas em ovinos, alguns estudos subseqüentes foram desenvolvidos, observando-se a ocorrência natural da doença em bovinos, aves e suínos (MYERS *et al.*, 1985; MYERS; SHOOP, 1987; MYERS *et al.*, 1987; COLLINS *et al.*, 1989), e de modo experimental em suínos (DUIMSTRA *et al.*, 1991).

Além dos efeitos enterotóxicos vem se caracterizando a ação toxigênica extra-intestinal do *B. fragilis*, com formação de abscesso em tecido conjuntivo (SIMON; GORBACH, 1984; PANTOSTI *et al.*, 1994; KATO *et al.*, 1995, 1996, 1998; MUNDY; SEARS, 1996). Parte desses estudos, demonstrando essa

atividade toxigênica extra-intestinal, foi desenvolvida na Ásia, particularmente na Coreia (WU *et al.*, 2002) e no Japão (KATO *et al.*, 1995, 1996). Nesses trabalhos observou-se que o *B. fragilis* tinha um papel importante na indução de uma bacteremia (KATO *et al.*, 1996), que incluía a formação crônica de abscesso em camundongo, além de promover necrose hepatocelular e uma hepatite severa (WOLTMANN *et al.*, 1999). No estudo realizado por Kato *et al.* (1995), ficou demonstrado que a produção de enterotoxina, em várias infecções extra-intestinais, era relativamente comum, mas a taxa de colonização do agente produzindo a toxina era desconhecida. Contudo, ele sugere que são necessários outros estudos para elucidar a importância clínica e patogênica da produção da toxina em doenças extra-intestinais.

Uma infiltração de polimorfonucleares, mas sem aderência ou invasão celular, também foi observada, o que sugere a participação de uma toxina bacteriana na patogênese da doença (DUIMSTRA *et al.*, 1991).

A patologia intestinal da infecção por ETBF em suínos foi examinada ao microscópio óptico e eletrônico de tecidos do ceco, cólon e íleo distal, revelando atrofia de vilos, hiperplasia de cripta e exfoliação de células epiteliais (COLLINS *et al.*, 1989; DUIMSTRA *et al.*, 1991).

As doenças diarréicas são causas de morbidade e mortalidade de crianças no mundo inteiro (SNYDER; MERSON, 1982; GUERRANT *et al.*, 1990; LIMA *et al.*, 1992; FAGUNDES-NETO *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 2000). São diferentes os agentes infecciosos responsáveis e uma fração substancial permanece não diagnosticada, sugerindo novos microrganismos como causadores dessa patologia no homem e nos animais. Portanto, a determinação do papel potencial de ETBF na doença diarréica no homem é de importância considerável e de interesse sanitário (SEARS *et al.*, 1995).

Após identificação de cepas de *B. fragilis* em fezes de algumas crianças e adultos com doença diarréica esporádica não diagnosticada (MYERS *et al.*, 1987), três estudos de casos-controle examinando o papel de ETBF em doença diarréica foram considerados (SACK *et al.*, 1992; SACK *et al.*, 1994; SEARS *et al.*, 1995). Cada um dos estudos incluiu crianças com idade de até cinco anos, com e sem

diarréia, em áreas geográficas diferentes. Alguns achados clínicos, nos três estudos, foram similares, como: nas ETBF isoladas de crianças com menos de um ano de idade não estavam associadas com diarréia; por outro lado, observou-se que essa associação era significativa quando a idade das crianças estava entre um e cinco anos. O ponto crítico desses estudos incluía o seguinte: os métodos usados para detectar o *B. fragilis* e as cepas ETBF variavam; as percentagens das crianças de quem o *B. fragilis* era isolado variavam (20-70%); e, não foi feita uma pesquisa extensiva para outros patógenos entéricos de maneira consistente.

À medida que os dados vão se acumulando a importância da enfermidade cresce, pois começam a ser questionados o modo de transmissão ainda pouco conhecido. Em um estudo realizado por Shoop *et al.* (1990), eles evidenciaram que a rota de infecção e o modo de transmissão da enfermidade ocorriam via água contaminada.

1.4.4 Toxinas do *B. fragilis*

Em muitas infecções bacterianas a patologia característica da doença é causada por toxinas, pois elas podem exercer seus efeitos diretamente sobre a célula-alvo ou interagindo com células do sistema imune, resultando na liberação de mediadores imunológicos (citocinas) e efeitos patológicos. Esses efeitos nem sempre levam à morte da célula-alvo mas podem impedir funções específicas seletivamente (COCKAYNE, 1997).

Quando essas toxinas têm efeitos lesivos sobre as células-alvo *in vitro* não exercem, necessariamente, o mesmo efeito *in vivo*, mas a ação de muitas delas mostra características clínicas típicas apresentadas pela doença bacteriana.

Dois principais tipos de toxinas foram descritos: *endotoxina*, componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, e *exotoxinas*, produtos excretados por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

1.4.4.1 Endotoxina (LPS)

Endotoxina, também denominada LPS (lipopolissacarídeo), é um componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, que pode ser

liberada da superfície celular por lise natural ou desintegração *in vitro*. O termo endotoxina foi utilizado originalmente para descrever o componente da bactéria Gram-negativa responsável pela patofisiologia do *choque endotóxico* (choque séptico).

A liberação de endotoxina (LPS) é considerada como a principal causa da morte, associada a bacteremia causada por organismos Gram-negativos, através do processo conhecido como choque séptico. Esse choque tem uma seqüência de alterações bem definida – como queda na pressão sanguínea, uma marcada hiperpnéia, excitação, apatia, coma e morte (WEIL; SPINK, 1957; ULEVITCH *et al.*, 1975), com eventos hematológicos múltiplos – na ativação do complemento (ULEVITCH *et al.*, 1975), diminuição no número de leucócitos e de plaquetas (WEIL; SPINK, 1957), coagulação intravascular disseminada e sangramento intestinal (BELLER *et al.*, 1969; GARNER *et al.*, 1974).

A produção da molécula sintética possibilitou a realização de muitos estudos por vários grupos de pesquisadores, tanto *in vivo* como *in vitro*. Sua atividade endotóxica *in vivo* é típica e inclui pirogenicidade, reatividade local de Shwartzman, toxicidade letal em camundongo e embrião de aves, além de tolerância cruzada da endotoxina. A eficiência da preparação *in vitro*, foi testada em sistemas celulares (linfócito B e ativação de macrófagos) e também em sistemas humorais (ativação do complemento, reatividade com antisoro) (KANEGASAKI *et al.*, 1986; RIETSCHEL *et al.*, 1987). Alguns experimentos têm demonstrado, ainda, que o LPS liga-se a receptores específicos de membrana em mastócitos, ativando-os e promovendo a liberação de serotonina (KOMISAR *et al.*, 1992) e de IL-6, mas sem degranulação precedente nem liberação de histamina (LEAL-BERUMEN *et al.*, 1994).

O *B. fragilis* contém endotoxina biologicamente ativa e é capaz de produzi-la em quantidades significativas (DELAHOOKE *et al.*, 1995; DELAHOOKE *et al.*, 1995a), mas seu potencial patogênico é, ainda, controverso. Vem crescendo as evidências de que a hiperfusão esplâncnica e a translocação intestinal de LPS, com inflamação sistêmica subsequente, colocam essa endotoxina como causa importante de complicações pós-operatórias (Bennett-Guerrero, 1998). Em estudo recente, Bennett-Guerrero *et al.* (2000) encontraram resultados sugestivos da

participação da endotoxina produzida pelo *B. fragilis*, como causa comum de translocação da mesma no intestino em cirurgias cardíacas, o que coloca este microrganismo como um agente carente de muitos estudos, no aspecto de sua patogenicidade.

1.4.4.2 Exotoxinas

Exotoxinas são proteínas secretadas pelo patógeno para o meio externo. Algumas delas podem ser desnaturadas parcialmente para gerar toxóides, inertes de atividade tóxica, mas capazes de induzirem imunidade protetora quando usada como vacina (COCKAYNE, 1997).

Nos últimos anos, a estrutura molecular de muitas exotoxinas vem sendo caracterizada, o que facilita a compreensão e conhecimento do seu mecanismo de ação. Nesse sentido, as exotoxinas podem ser classificadas em função do seu modo de ação sobre as células animais, como: toxinas do tipo I, que se ligam a receptores de superfície, estimulando os sinais transmembrânicos; tipo II, atuam diretamente sobre a membrana celular, formando poros ou destruindo a bicamada lipídica; e tipo III, responsável pela translocação de um componente enzimático ativo para dentro da célula, promovendo a alteração de uma molécula-alvo intracelular (COCKAYNE, 1997).

Quanto às exotoxinas do *B. fragilis* tem se observado um predomínio dos tipos I e II. O tipo-I, contém as toxinas mais estáveis, constituindo-se na forma mais estudada (toxina do *B. fragilis* - TBF); a segunda categoria, do tipo-II, contém somente uma toxina denominada metaloprotease-II (MPII), com 1 átomo-grama de Zn^{2+} por molécula (MONCRIEF *et al.*, 1995). Os três genes *bft* distintos foram clonados e seqüenciados de cepas ETBF 86-5443-2-2 (isolada de suíno, *bft-1*), VPI 13784 (isolada de ovino, *bft-2*) e Korea 419 (isolada do homem, *bft-3*) (MONCRIEF *et al.*, 1995; FRANCO *et al.*, 1997; KLING *et al.*, 1997; KATO *et al.*, 2000). Esses alelos são diferentes, porém muito semelhantes (92-96% na identidade de suas seqüências de aminoácidos preditas), mas os isotipos codificados pelos três alelos cortam a proteína E-caderina da zônula aderente, porém não se observou correlação entre esses alelos e a atividade biológica secretória da cepa ETBF (SEARS, 2001).

Foram identificados dois domínios potencialmente importantes para o mecanismo de ação da TBF nas seqüências dos genes *bft*. O primeiro domínio, comum a todos os alelos, tem uma molécula de zinco ligado a uma metaloprotease e foi o primeiro considerado inicialmente para o mecanismo de ação proteolítico (MONCRIEF *et al.*, 1995). Este domínio definiu a TBF como membro de uma família de enzimas bacterianas conhecidas como metaloproteases e, em particular, pertencente a família metzicín (OBISO *et al.*, 1997a). A presença desse domínio na protease identifica a atividade autoproteolítica e proteolítica da TBF, *in vitro*, para os substratos actina, gelatina, caseína e azocol (MONCRIEF *et al.*, 1995).

O segundo domínio de interesse é o constituído por 20 aminoácidos carboxi-terminal que forma uma estrutura anfipática (FRANCO *et al.*, 1997). Este domínio predito está presente somente em *bft-2*, mas sugere que a oligomerização de BFT-2 pode ocorrer seguindo-se a inserção da toxina na membrana com a criação de um canal iônico (SEARS, 2001). Conceitualmente, a presença de um possível domínio anfipático na TBF-2 assemelha esta proteína com a toxina acessória da cólera (Ace), enterotoxina termo-estável de *E. coli* (STb) e a toxina delta de *Staphylococcus aureus* (TRUCKSIS *et al.*, 1993; SEARS, 2001).

1.4.5 Fisiopatologia da infecção intestinal causada pelo *B. fragilis*

A associação do *B. fragilis* com diarreia em ovinos foi descrita por Myers *et al.* (1984), que acreditavam ser causada por uma enterotoxina liberada desse microrganismo, isolado de diarreia em bovinos e ovinos por Border *et al.* (1985), sendo denominado *B. fragilis* enterotoxigênico (ETBF). Os possíveis fatores de virulência, levantados por outros pesquisadores, incluíam cápsulas, fímbrias, proteínas da membrana externa, lipopolissacarídeos, enzimas e metabólitos (ONDERDONK *et al.*, 1977; ROTSTEIN *et al.*, 1985; ZALEZNIK *et al.*, 1986; HOFSTAT, 1992).

Em outros estudos, observou-se que a inoculação do filtrado do cultivo de cepas de ETBF em alça intestinal isolada de ovinos promovia o acúmulo de secreção. Esse efeito foi identificado como sendo produzido por uma toxina

protéica termo-lábil de aproximadamente 20 kDa (MYERS *et al.* 1984, 1985). Para Myers *et al.* (1987; 1989;1990) e Sack *et al.*, (1994) enterotoxinas produzidas por isolados de cepas de *B. fragilis* podiam ser responsáveis por doenças diarréicas tanto nos animais como no homem.

Após verificada essa associação do *B. fragilis* com diarréia, alguns trabalhos foram desenvolvidos utilizando diferentes modelos experimentais em animais. Nesses trabalhos foram observados efeitos enterotóxicos produzidos em algumas espécies, que estimulavam secreção intestinal; contudo, outras espécies não apresentavam os mesmos resultados (SEARS *et al.*, 1995), demonstrando um efeito espécie-específico; por outro lado, foram encontrados efeitos diversos ao se utilizar diferentes cepas, com algumas delas tendo a capacidade de promover efeitos patogênicos e outras não (WEIKEL *et al.*, 1992; WU *et al.*, 2002), o que realça a diversidade desse microrganismo.

Os achados em um estudo desenvolvido por Obiso *et al.* (1995), acerca da atividade da TBF purificada, em alça intestinal isolada de rato, coelho e ovino revelaram: *atividade secretora* – o estímulo da secreção é dose dependente em alças isoladas do íleo e do cólon. Contudo, sua potencialidade é espécie-específica; *alterações histopatológicas* – o exame do tecido do íleo distal e do cólon, nas três espécies citadas, apresentou vilosidades arredondadas, alongamento de criptas e infiltração de neutrófilos. Além desses efeitos, ainda foi constatada a presença de fluido moderadamente hemorrágico e hemorragia de mucosa. O efeito do filtrado de cultura contendo TBF, sobre células HT29/C1, mostrava a ocorrência de extensas áreas danificadas, com células arredondadas e circundadas por grupos de células normais, que eram neutralizadas completamente pelo soro anti-TBF (MUNDY; SEARS, 1996). Os efeitos secretório e histopatológico da toxina purificada eram inibidos parcialmente por quelantes do zinco (OBISO *et al.*, 1995).

Riegler *et al.* (1999), mostraram o efeito da TBF, quando adicionada no lado seroso da mucosa do cólon humano, causando alterações morfológicas dose-dependentes. Esse efeito iniciava-se na base das criptas avançando, posteriormente, para superfície do epitélio. Nas criptas promovia um arredondamento e descamação celular para o lúmen, enquanto na superfície

epitelial induzia a uma localização apical do núcleo picnótico, alongamento citoplasmático e protrusão luminal do enterócito. O efeito promovido pela toxina, quando colocada na luz intestinal, foi menos eficiente em danificar a superfície e criptas que do lado seroso, e incapaz de causar alteração na lâmina basal. Essas alterações morfológicas desenvolvidas nas células também foram observadas por Sanfilippo *et al.* (1998).

O efeito eletrofisiológico da TBF no cólon, investigado em recente trabalho por Riegler *et al.* (1999), ao comparar a diferença de potencial (PD), corrente de curto-circuito (I_{sc}) e resistência de membrana (R), quando a toxina foi adicionada na serosa ou mucosa mostraram um aumento da PD e I_{sc} , e uma diminuição de R, em ambos os compartimentos. Contudo, o efeito encontrado foi muito mais intenso quando a toxina foi adicionada no lado seroso, mas dose-dependente de ambos os lados. Esse efeito da TBF sobre a corrente de curto-circuito também foi observado no íleo em monocamadas de células T-84 (BERSCHNEIDER; GORALSKA, 1992; KANDIL *et al.*, 1992).

Ampliando esse dano extensivo no tecido, foram observadas necrose e hemorragia do epitélio da mucosa intestinal (OBISO *et al.*, 1995), além de uma ação proteolítica da TBF sobre as proteínas envolvidas na ligação célula-célula (Van TASSEL *et al.*, 1994; OBISO *et al.*, 1997) e sobre a interação célula-matriz tecidual (MONCRIEF *et al.*, 1995), além de sua ação sobre a proteína E-caderina da zona aderentes que unem as células do epitélio da mucosa (SHAOGUANG *et al.*, 1998).

Para Sears *et al.* (1995), a contribuição da toxina do *B. fragilis* na patogênese da doença diarréica é desconhecida, mas postula-se que ela seja um fator de virulência, em potencial, contribuindo no desencadeamento da diarréia por alterar a estrutura da mucosa, quebrando as funções de barreira protetora do epitélio intestinal, com isso gerando uma estimulação da secreção de cloreto.

O mecanismo que leva a esse dano no tecido, promovendo hemorragia e possível bacteremia é desconhecido, e de uma maneira geral podem envolver diversos mediadores e vias que levam à inflamação. O fato dessa enterotoxina produzida pelo *B. fragilis* ser uma metaloprotease, ao alcançar a circulação pode

ativar a cascata da bradicinina produzindo efeitos sistêmicos (MAEDA *et al.*, 1993).

Outras vias metabólicas vêm sendo implicadas como participantes desse processo e, em trabalho recente, Sanfillipo *et al.* (2000), buscando elucidar esses mecanismos desenvolveram estudos com células do epitélio intestinal humano, T84, *in vitro*. Desses estudos observou-se que células estimuladas com TBF liberam IL-8 e TGF- β na sua secreção, de maneira dose-dependente. Esses resultados sugerem que em exposição de células do cólon, *in vivo*, a altas concentrações de TBF, podem iniciar uma resposta inflamatória via secreção de IL-8.

Os achados histopatológicos da infecção intestinal produzido pelo *V. cholerae* e *B. fragilis* sugerem a participação significativa das células do sistema imune gastrointestinal na fisiopatologia dessas duas doenças. Nesse sentido é pertinente a revisão que inclua o papel dessas células na fisiopatologia dessas infecções.

1.5 Células do sistema imune e enterotoxinas do *V. cholerae* e *B. fragilis*

O tecido que constitui a mucosa intestinal contém uma ampla variedade de células, como: endoteliais, do estroma, neuroendócrinas e imunológicas. Durante algum tempo, uma compreensão tradicional considerava que as células epiteliais eram controladas somente pelos sistemas endócrino e nervoso, mas novos achados das pesquisas tem expandido essa visão, de modo a incluir as células imunes como tendo importante papel no controle da fisiologia intestinal. Contudo, todos esses tipos celulares, incluindo as do estroma como macrófagos e mastócitos, interagindo de maneira integrada, é que determina o funcionamento intestinal normal (McKAY; PERDUE, 1993).

Pouco tem se levado em consideração de que o intestino é o maior órgão imune do corpo, com os seus tecidos linfóides (GALT), abrangendo 40% das células imunes efetivas, isto representando cerca de 25% da massa da mucosa (McKAY; PERDUE, 1993). As células imunes intestinais são encontradas em três

compartimentos: como agregados em folículos e placas de Peyer; os linfócitos, as células reticuloendoteliais e mastócitos, distribuídos na mucosa como elementos difusos de uma teia; e, distribuídas no epitélio (VAN FURTH, 1988; LASKIN; PENDINO, 1995; MAHIDA *et al.*, 1997; METCALFE *et al.*, 1997).

Os linfócitos são células pequenas (6 a 10 μm), denominadas T e B, e têm origem nos órgãos linfóides primários produzidos a uma taxa de 10^9 células/dia, o que representa cerca de 20% das células brancas circulantes (McKAY; PERDUE, 1993). Uma nomenclatura existente (CD, "cluster designation"), classifica as células T em duas categorias: células "helper" CD4^+ (T_h), que reconhece antígeno associado com moléculas da classe II do MHC, e células citotóxicas/supressoras CD8^+ ($T_{s/c}$), que reconhecem antígenos associados com moléculas da classe I do MHC (NAOR, 1992). As células B são definidas em função de uma imunoglobulina que produz, e são encontradas circulando ou como residente nos tecidos. As células B transportam em sua superfície um único isotipo de epitopo-anticorpo específico. Quando estas células encontram um epitopo antigênico adequado, são ativadas a proliferar e se diferenciar em plasmócitos maduros efetores, que secretam uma grande quantidade de imunoglobulinas, além de se transformarem em células de memória de longa duração (McKAY; PERDUE, 1993).

Os monócitos são células mononucleares que migram para os tecidos localizados e se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos e mastócitos, diferentemente dos linfócitos, têm origem mielóide e constituem populações heterogêneas de células que se localizam em tecidos e órgãos, todos os compartimentos do intestino, sítios intraepiteliais e do plexo mioentérico. Elas se caracterizam por participar dos processos de reconhecimento dos antígenos, liberação de mediadores farmacológicos, além da participação na fagocitose (ENERBACK, 1966; VAN FURTH, 1988; LASKIN; PENDINO, 1995; METCALFE *et al.*, 1997). O papel de fagocitose dos macrófagos é realçado quando um antígeno é envolvido com IgG ou o fragmento C3 do complemento, e encontra um receptor específico na superfície da célula (VAN FURTH, 1988; McKAY; PERDUE, 1993). Os macrófagos tem uma baixa afinidade pelos receptores de IgE, denominados $\text{Fc}_\epsilon\text{RII}$ (CONRAD *et al.*, 1991), relacionadas as reações de hipersensibilidade dependente de IgE. Seu envolvimento nas reações imunes ocorre de duas

maneiras: internalização do antígeno, fragmentação e apresentação; e, síntese e liberação de citocinas. Uma vez liberadas no espaço intersticial, estas citocinas podem ligar-se a receptores de outras células, recrutando-as por uma resposta coordenada contra o patógeno antigênico agressor. Essas células são os leucócitos polimorfonucleares: basófilos, eosinófilos e neutrófilos.

Os basófilos são pouco entendidos e constituem cerca de 0,4% dos leucócitos circulantes, e seu funcionamento assemelha-se ao dos mastócitos. Os eosinófilos representam cerca de 2 a 5% dos leucócitos polimorfonucleares em indivíduos não-alérgicos (McKAY; PERDUE, 1993), que possuem Fc_εR11 e podem estar envolvidos nas reações alérgicas. Um infiltrado neutrofilico (maior que 90% dos polimorfonucleares circulantes) é uma característica comum de muitas reações inflamatórias, que podem migrar de fora do lúmen intestinal para formar um abscesso característico (NASH *et al.*, 1991). Os neutrófilos são conhecidos por sua capacidade de produzir e liberar eicosanóides e metabólitos reativos do oxigênio, que podem estimular a secreção epitelial (McKAY; PERDUE, 1993; TERR *et al.*, 1997).

Quanto ao *V. cholerae*, estudos histológicos de intestino de camundongo, após estímulo com a toxina da cólera, mostraram degenerações consideráveis dos vilos, acúmulo de exsudato e mucina celular, além de um acúmulo de células inflamatórias na lâmina própria (McCARDELL *et al.*, 1985). O tratamento de células intestinais de rato, *in vitro*, ou alça intestinal ligada de camundongo com a toxina da cólera, estimularam a produção da citocina pró-inflamatória IL-6 (McGEE *et al.*, 1993; KLIMPEL *et al.*, 1995). Foi observado, ainda, que em voluntários humanos após infecção experimental, suas fezes continham altos níveis de lactoferrina, substância normalmente encontrados em grânulos secundários de polimorfonucleares neutrófilos (SEARS; KAPER, 1996).

Em ratos observou-se uma formação significativa de edema de pata dose-dependente, com o pico ocorrendo 48h após inoculação; não ocorreu migração de neutrófilos em cavidade peritoneal, mas verificou-se níveis significativos de TNF- α quando macrófagos em cultura foram estimulados com a toxina da cólera (VIANA *et al.*, 2002).

Por outro lado, em trabalho recente, Sanfillipo *et al.* (2000) vêm desenvolvendo estudos com células do epitélio intestinal humano, T84, *in vitro* utilizando a toxina do *B. fragilis*. Desses estudos foram observados que células estimuladas com TBF liberam IL-8 e TGF- β na sua secreção, de maneira dose-dependente. Esses resultados sugerem, portanto, que exposição de células do cólon, *in vivo*, a altas concentrações de TBF, podem iniciar uma resposta inflamatória via secreção de IL-8.

No presente estudo foi observada uma participação significativa dos mastócitos nos processos inflamatórios, envolvendo as toxinas estudadas, sendo por isso considerado uma revisão científica detalhada do papel desta célula no processo inflamatório.

1.6 Mastócito: papel no processo inflamatório

Os mastócitos são células residentes distribuídas por diferentes sítios anatômicos em todo corpo, caracterizados por apresentar grânulos citoplasmáticos metacromáticos grandes (ENERBACK, 1966), e encontrados marginando os vasos sanguíneos e nervos, e também nas superfícies com interface para o ambiente externo. São células derivadas da medula óssea (KIRSHENBAUN *et al.*, 1991) que migram para os tecidos periféricos, onde completam sua diferenciação em mastócitos do tecido conjuntivo – CTMC, e das mucosas do pulmão e trato gastrintestinal – MMC (GALLI; HAMMEL, 1994). O funcionamento de cada um desses grupos de mastócitos diferentes parece responder adequadamente a citocinas distintas que influenciam seu fenótipo, viabilidade e habilidade em proliferar. Enquanto os CTMC demonstram a necessidade do fator estimulador de células tronco (*stem cell factor* – SCF) para sua proliferação, os MMC parecem depender da citocina IL-3, derivada das células T (CRAPPER *et al.*, 1984). Os mastócitos dependem de SCF para sua sobrevivência (HUANG *et al.*, 1990; ZSEBO *et al.*, 1990) e expressam diferentes características fenotípicas em cada tecido, como se determinada pelo ambiente local (FURITSU *et al.*, 1989; GALLI, 1990). A retirada desse fator estimulador, necessário ao seu crescimento, resulta em apoptose celular (COHEN *et al.*, 1992; MEKORI *et al.*, 1993). Essas células, altamente engenhosas e com múltiplas

funções biológicas críticas, podem ser ativadas por diferentes estímulos, tanto dependentes (KEEGAN; PAUL, 1992) como independentes (JASANI *et al.*, 1979; SCHULMAN *et al.*, 1988; MATTHEWS *et al.*, 1989) de receptor para IgE (Fc_εRI). A ativação desses receptores leva a vias de sinalização distintas (EISEMAN; BOLEN, 1992; JOUVIN *et al.*, 1994; YAMASHITA *et al.*, 1994) e, que após essa ativação, podem liberar imediatamente mediadores associados aos grânulos (FOX *et al.*, 1985; IRANI *et al.*, 1986; CRAIG *et al.*, 1993) e gerar substâncias derivadas dos lipídeos capazes de induzirem inflamação alérgica imediata (DEMOPOULUOS *et al.*, 1979; LEWIS; AUSTEN, 1984; LEWIS *et al.*, 1990), além da síntese de citocinas e quimiocinas. A secreção de citocinas e quimiocinas (YOUNG *et al.*, 1987; BURD *et al.*, 1989; PLAUT *et al.*, 1989; CHIOSSONE *et al.*, 1990), que ocorre horas depois e pode contribuir para inflamação crônica (**Figura 1**).

As funções biológicas dos mastócitos parecem incluir, ainda seu papel na resposta imunitária inata (MEKORI; METCALFE, 2000), envolvimento nos mecanismos de defesa contra infecções parasitárias (MAYHOFER; FISHER, 1979) e bacterianas (ECHTENACHER *et al.*, 1996), imunomodulação do sistema imune (FRANDJI *et al.*, 1993; FOX *et al.*, 1994), reparo de tecido (DAYTON *et al.*, 1989; BJERMER *et al.*, 1987) e angiogênese (RHODIN; FUJITA, 1989) (**Figura 1**).

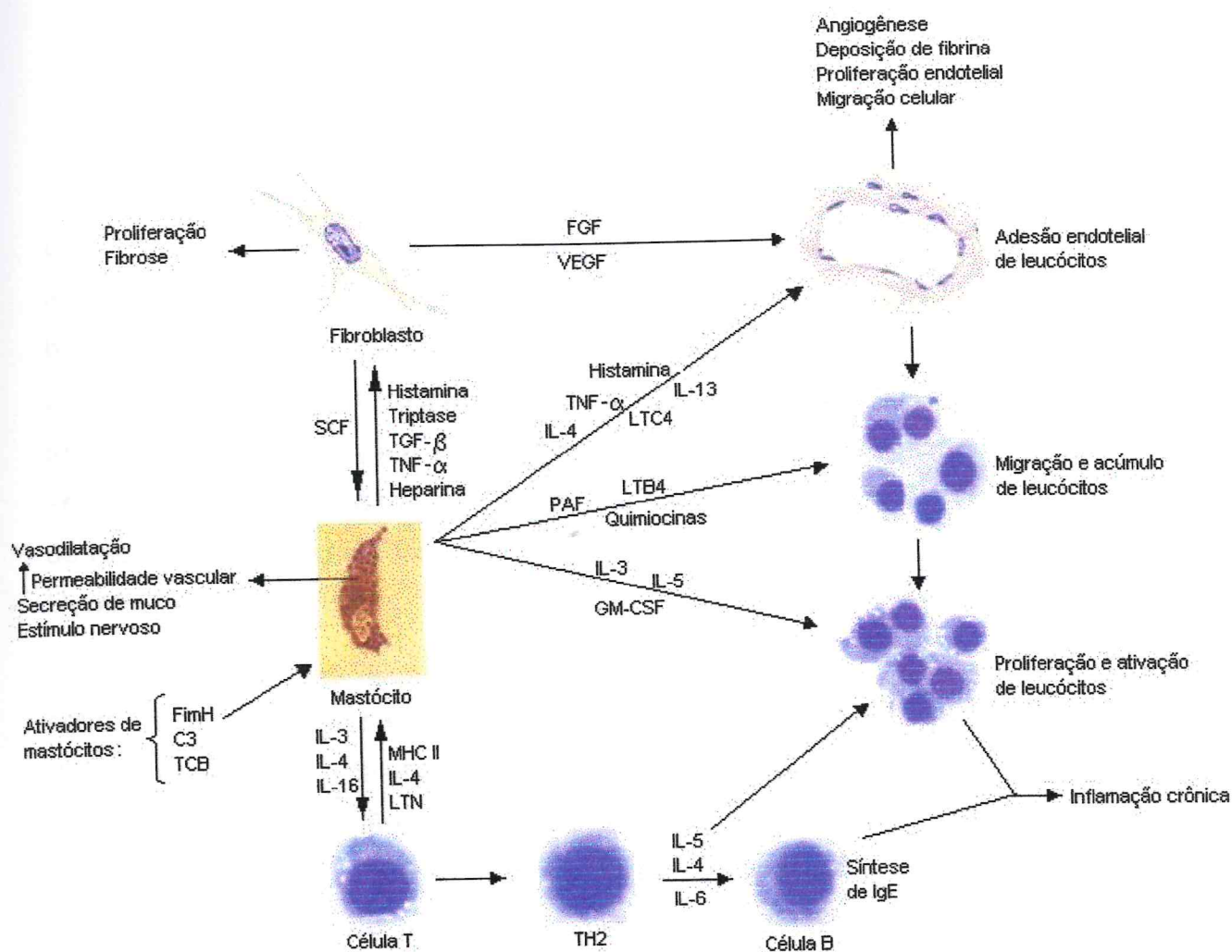


Figura 1. Ativação de mastócitos e sua participação em inflamação aguda e crônica. Os mastócitos podem ser ativados por diferentes agentes e liberar mediadores que participam das inflamações aguda e crônica. FGF, fator de crescimento de fibroblastos; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular; SCF, fator estimulador de células tronco; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; IL, interleucina; LT, leucotrieno; LTN, linfotaxina; PAF, fator ativador de plaquetas; PG, prostaglandinas; MHC, complexo principal de histocompatibilidade; GM-CSF, fator estimulador de colônias granulócitos-macrófagos; FimH, fimbria de aderência de *Escherichia coli*; C3, proteínas do sistema complemento; TCB, toxinas e constituintes bacterinos (Fonte: METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997).

1.6.1 Mediadores associados aos grânulos

1.6.1.1 Histamina

A histamina é uma molécula hidrofílica constituída por um anel imidazol e uma amina, ligados a dois grupos metilenos. Ela está distribuída em grande amplitude no reino animal, sendo componente de muitos venenos, de produtos bacterianos e de plantas (REITE, 1972). Sua síntese ocorre a partir da descarboxilação do aminoácido L-histidina numa reação catalisada nos diferentes tecidos de mamíferos, pela enzima histidina descarboxilase. Têm uma atividade ampla nos tecidos e órgãos através da ação em pelo menos três classes distintas de receptores, denominados H₁ (ASH; SCHILD, 1966), H₂ (BLACK *et al.*, 1972) e H₃ (ARRANG *et al.*, 1983).

Uma vez liberada, a histamina pode exercer efeito local ou disseminado sobre os músculos lisos e glândulas. Estudos usando linhas de células epiteliais do cólon humano, as células T84, têm evidenciado que a histamina promove um aumento da secreção iônica de Cl⁻ e induz a elevação do cálcio citosólico livre (WASSERMAN *et al.*, 1988; COHN *et al.*, 1989). Esses efeitos foram reproduzidos por outros agonistas do receptor H₁, mas não foi observado em relação a H₂, sugerindo que a histamina ativa as células do epitélio intestinal pela ligação aos receptores H₁ (WASSERMAN *et al.*, 1988). A broncoconstrição e contração do intestino são mediadas por receptores H₁ (ASH; SCHILD, 1966), enquanto o aumento na secreção gástrica resulta da ativação de receptores H₂ (BLACK *et al.*, 1972). Outras respostas resultantes de uma dilatação vascular, como hipotensão, são mediadas pelos dois receptores H₁ e H₂.

A histamina tem uma ação direta sobre diferentes órgãos e tecidos, mas no coração ela afeta tanto a contratilidade como os eventos de condução elétrica, podendo envolver ora os receptores H₁ ora os H₂.

1.6.1.2 Heparina

A heparina é um glicosaminoglican, encontrado nos grânulos de mastócitos, sintetizada a partir de precursores do açúcar-UDP como um polímero que alterna

resíduos de ácido D-glicurônico e N-acetil-glicosamina (BOURIN; LINDAHL, 1993). Quando liberada é ingerida rapidamente e destruída por macrófagos.

As moléculas de heparina são encontradas sobre a superfície das células endoteliais ou na matriz extracelular sub-endotelial interagindo com a antitrombina circulatória, promovendo o mecanismo antitrombótico natural.

1.6.1.3 Serotonina (5-HT; 5-Hidroxitriptamina)

A 5-HT tem um papel fisiológico diverso, podendo atuar como neurotransmissor do sistema nervoso central, regulador na função do músculo liso nos sistemas cardiovascular e gastrointestinal e da função plaquetária.

As concentrações mais altas da 5-HT são observadas na mucosa gastrointestinal, seguida das plaquetas e sistema nervoso central. Seu papel no trato intestinal, em trabalhos realizados por Donowitz *et al.* (1980) e Beubler *et al.* (1986), mostrou-se como tendo efeito sobre o transporte iônico epitelial, induzindo a produção de uma secreção no tecido intestinal de coelhos e ratos. Em estudos, *in vitro*, no íleo e cólon de coelho, utilizando a 5-HT exógena, foi mostrada a ocorrência de uma diminuição na absorção de eletrólitos e um aumento na I_{sc} (DONOWITZ *et al.*, 1980). Os resultados, *in vivo*, mostraram que após infusão intra-arterial de 5-HT, a absorção de eletrólito e fluido foi convertida em secreção. Essa secreção de íons, induzida pela 5-HT, foi inibida por indometacina, o que sugere a ocorrência desse mecanismo ser via produção de prostaglandina (BEUBLER *et al.*, 1986).

1.6.2 Mediadores derivados de lipídios

Os mastócitos podem, além da liberação dos mediadores pré-formados, iniciar a síntese de substâncias derivadas dos lipídios a partir de alguns ácidos graxos insaturados, principalmente do ácido araquidônico. O ácido araquidônico (5,8,11,14-ácido eicosotetraédrico) é derivado diretamente da dieta ou da modificação do ácido linoléico, como a maioria dos ácidos graxos poliinsaturados esterificados da membrana celular. Com a liberação do fosfolipídio o araquidonato torna-se disponível como um substrato para modificação enzimática (SMITH *et al.*, 1991). As três principais vias enzimáticas de metabolismo do araquidonato livre

resíduos de ácido D-glicurônico e N-acetil-glicosamina (BOURIN; LINDAHL, 1993). Quando liberada é ingerida rapidamente e destruída por macrófagos.

As moléculas de heparina são encontradas sobre a superfície das células endoteliais ou na matriz extracelular sub-endotelial interagindo com a antitrombina circulatória, promovendo o mecanismo antitrombótico natural.

1.6.1.3 Serotonina (5-HT; 5-Hidroxitriptamina)

A 5-HT tem um papel fisiológico diverso, podendo atuar como neurotransmissor do sistema nervoso central, regulador na função do músculo liso nos sistemas cardiovascular e gastrointestinal e da função plaquetária.

As concentrações mais altas da 5-HT são observadas na mucosa gastrointestinal, seguida das plaquetas e sistema nervoso central. Seu papel no trato intestinal, em trabalhos realizados por Donowitz *et al.* (1980) e Beubler *et al.* (1986), mostrou-se como tendo efeito sobre o transporte iônico epitelial, induzindo a produção de uma secreção no tecido intestinal de coelhos e ratos. Em estudos, *in vitro*, no íleo e cólon de coelho, utilizando a 5-HT exógena, foi mostrada a ocorrência de uma diminuição na absorção de eletrólitos e um aumento na I_{sc} (DONOWITZ *et al.*, 1980). Os resultados, *in vivo*, mostraram que após infusão intra-arterial de 5-HT, a absorção de eletrólito e fluido foi convertida em secreção. Essa secreção de íons, induzida pela 5-HT, foi inibida por indometacina, o que sugere a ocorrência desse mecanismo ser via produção de prostaglandina (BEUBLER *et al.*, 1986).

1.6.2 Mediadores derivados de lipídios

Os mastócitos podem, além da liberação dos mediadores pré-formados, iniciar a síntese de substâncias derivadas dos lipídios a partir de alguns ácidos graxos insaturados, principalmente do ácido araquidônico. O ácido araquidônico (5,8,11,14-ácido eicosotetraédrico) é derivado diretamente da dieta ou da modificação do ácido linoléico, como a maioria dos ácidos graxos poliinsaturados esterificados da membrana celular. Com a liberação do fosfolipídio o araquidonato torna-se disponível como um substrato para modificação enzimática (SMITH *et al.*, 1991). As três principais vias enzimáticas de metabolismo do araquidonato livre

incluem a da ciclooxigenase, da lipoxigenase e do citocromo P450. Na via da ciclooxigenase já são conhecidas pelo menos dois tipos: ciclooxigenase 1 (COX-1) (YOKOYAMA; TONABE, 1989) e ciclooxigenase 2 (COX-2) (HLA; NEILSON, 1992). Estas duas enzimas possuem atividades ciclooxigenase e peroxidase que convertem araquidionato em PGG₂, pela inserção de duas moléculas de oxigênio, convertendo esse metabólito intermediário em PGH₂ (SMITH *et al.*, 1991; SMITH; MARNETT, 1992). Na maioria das circunstâncias o gene da COX-1 expressa-se constitutivamente, com seu nível enzimático não se alterando em resposta a estímulos de citocinas ou fatores do crescimento (VANE, 1994). Por outro lado, uma isoforma desse gene, identificada mais recentemente como COX-2 pode ser induzida por vários agentes que incluem fatores do crescimento e citocinas (JONES *et al.*; 1993; DuBOIS *et al.*, 1994; KUJUBU *et al.*, 1991). Os fosfolipídeos de membrana, pela ação da fosfolipase A₂, resultam na produção do ácido araquidônico. Os metabólitos das prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, obtidos do araquidonato pelas vias da ciclooxigenase e lipoxigenase, são importantes promotores do processo inflamatório, e cuja avaliação do papel fisiológico encontra-se pouco explorado (EBERHART; DUBOIS, 1995). Os leucotrienos constituem uma família, de componentes biologicamente ativos (derivados do ácido araquidônico pela ação da enzima lipoxigenase, 5-LO) em um processo de múltiplos passos (PETERS-GOLDEN, 1998). Esses derivados promovem um aumento significativo na secreção de Cl⁻ no íleo de coelho e rato, mas é um mecanismo sensível a ação da indometacina o que sugere, pelo menos em parte, ser mediada pela prostaglandina (SMITH *et al.*, 1988).

Há várias pesquisas mostrando a importância da prostaglandina na secreção intestinal. Neste sentido foi observado que a adição de PGE₁ e PGE₂ em alça intestinal de coelho, montada em câmara de Üssing, induz um aumento significativo na corrente de curto-circuito. Por outro lado, o conhecimento da atividade do leucotrieno na fisiologia do enterócito ainda não está bem sedimentado, pois a maioria desses mediadores induz apenas um pequeno aumento na corrente de curto-circuito (SMITH *et al.*, 1988; RACUSEN, BINDER, 1980). O fator de ativação plaquetária – PAF é um outro mediador, produzido pelos mastócitos, que promove um aumento bifásico na I_{sc} do intestino delgado e

cólon de mamíferos *in vitro* (BERN *et al.*, 1989; HANGLOW *et al.*, 1989), com participação, pelo menos parcial, da prostaglandina também (BERN *et al.*, 1989).

1.6.3 Citocinas e quimiocinas

As citocinas e quimiocinas são proteínas ou glicoproteínas secretadas por algumas células especiais. As interleucinas, interferons e fatores de estimulação de colônias foram as primeiras citocinas descobertas, mas ainda continuam sendo intensamente estudadas.

Os mastócitos possuem uma capacidade múltipla de síntese que inclui a elaboração de diversas citocinas, TNF- α , GM-CSF, SCF, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-14, IL-16 e IFN- γ , e quimiocinas, MIP-1 α (macrophage inflammatory protein) e MIP-1 β (METCALFE *et al.*, 1997; MEKORI; METCALFE, 2000). A identificação desses tipos de moléculas pró-inflamatórias, produzidas pelos mastócitos, vem se ampliando.

A ação desses mediadores é diversa, mas alguns trabalhos mostram que as citocinas IL-4 e IFN- γ podem alterar o transporte iônico em monocamadas de células T-84, através da redução da secreção de Cl⁻ (HOMGREN *et al.*, 1989; ZUND *et al.*, 1996). Estudos *in vitro*, em íleo de coelho e aves, mostraram que a adição de IL-1 e IL-3 na serosa resultou num aumento transitório da I_{sc}, cujo efeito foi inibido pelos bloqueadores da ciclo-oxigenase, o que indica o envolvimento das prostaglandinas (CHANG *et al.*, 1990). Em adição, Kandil *et al.* (1992) demonstraram que o TNF- α induz secreção intestinal na mucosa ileal e em células T-84, *in vitro*, por mecanismos dependentes da síntese de prostaglandinas.

1.6.4 Ativação dos mastócito e liberação dos mediadores

Os mastócitos pertencem ao sistema imune, mas seu papel fisiológico está sujeito, ainda, a muitos debates. A ativação dos mastócitos pode se iniciar pela interação de um antígeno multivalente (alergeno) com o anticorpo específico IgE ligado à membrana da célula via um receptor de alta afinidade, Fc ϵ RI. Uma ligação cruzada de IgE pela interação do alérgeno com determinantes específicos sobre a molécula Fab coloca os receptores em justaposição, iniciando a ativação dos mastócitos com produção e liberação maciça de grande número de mediadores

inflamatórios como histamina, metabólitos derivados do ácido araquidônico e diversas citocinas imuno-reguladoras (CASALE; MAROM, 1983; GALLI, 1993; GALLI *et al.*, 1993).

Os mastócitos podem ser ativados, ainda, por mediadores que se agregam a moléculas de superfície, Fc_εR1II (ALBER *et al.*, 1992) com exposição subsequente a peptídeos pequenos, como substância P e daquele originado do gene da calcitonina (ANSEL *et al.*, 1993), endotelina (YAMAMURA *et al.*, 1994), e β-quimiocinas (MIP-1 α) e MCP-1 (ALAM *et al.*, 1992; ALAM *et al.*, 1994). Alguns fatores plasmáticos produzidos durante a resposta inflamatória, como C3a e C4a (denominadas anafilotoxinas) (EL-LATI *et al.*, 1994) e fragmentos de fibrinogênio e fibronectina (WOJECKA-LUKASIK; MASLINSKI, 1992) também recrutam e ativam os mastócitos. Outros alérgenos, como fosfolipase A₂ e proteases, associados a poeira podem induzir a degranulação de mastócitos, com síntese e liberação de IL-4, mesmo na ausência do antígeno específico IgE (MACHADO *et al.*, 1996). Recentemente, observou-se que a agregação heterotípica com células T ativadas resultava na ativação e liberação de mediadores pelos mastócitos (INAMURA *et al.*, 1998; MEKORI; METCALFE, 1999) (**Figura 1**).

Da ativação dos mastócitos podem resultar três tipos diferentes de efeitos biológicos: 1) os mastócitos têm uma secreção regulada, onde os conteúdos pré-formados, estocados nos grânulos, são rapidamente liberados por exocitose (histamina, proteoglicanas, proteases e citocinas, como TNF- α e IL-16); 2) os mastócitos sintetizam, enzimaticamente, mediadores derivados de precursores estocados na membrana celular e em corpúsculos lipídicos (PGD₂, LTC₄ e PAF); 3) os mastócitos iniciam a transcrição, tradução e secreção de diferentes citocinas (TNF- α , GM-CSF, SCF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-14 e IL-16) e quimiocinas (macrophage inflammatory protein, MIP-1 α e MIP-1 β , e peptídeo quimioatraente de monócito, MCP-1) (METCALFE *et al.*, 1997; MEKORI; METCALFE, 2000).

1.6.5 Mastócito como célula apresentadora de antígeno

Sabe-se que os mediadores pré-formados e recém-produzidos pelos mastócitos exercem um efeito imunoregulador e imunomediador, mas pouco se

conhece acerca do seu efeito sobre o curso das respostas dependentes das células T. A apresentação de antígenos é o passo inicial no processo de ativação destas células, incluindo sua interação no contexto do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), expressados pelas células apresentadoras de antígeno.

Acredita-se que as células T, após a apresentação do antígeno, dependam do estímulo de um tipo específico de células acessórias, com um conteúdo de citocinas, para seu desenvolvimento e proliferação (GAJEWSKI *et al.*, 1991). A IL-4 tem se revelado como a citocina capaz de promover essa ação, e os mastócitos como os responsáveis pela produção, liberando no ato da apresentação do antígeno, que influencia as células T CD4⁺, através da resposta apresentada pelo tipo Th2 (SEDER *et al.*, 1992).

As citocinas IL-3, IL-4 e IL-10 têm um papel chave na hiperplasia dos mastócitos, no processo inflamatório, mediado pelas células T, do tipo Th2. Alguns resultados sugerem que IL-3 seja o fator potencial necessário para indução dos mastócitos durante a inflamação (MADDEN *et al.*, 1991), mas IL-4 e IL-10 contribuem para realçar esse efeito promovido por IL-3. Por outro lado, IL-4 também se mostrou responsável pelo aumento da expressão de Fc_εRI em mastócitos peritoneais (YAMAGUCHI *et al.*, 1999). Outras citocinas podem ainda participar deste processo, contudo IL-4 e IL-5 parecem estar envolvidas diretamente dirigindo o desenvolvimento das células B e subsequente produção de IgE (imunoglobulina E), além da proliferação/maturação e possível participação de eosinófilos em reações alérgicas (McKAY; PERDUE, 1993), respectivamente. O efeito geral se apresentava como um aumento na resposta da hipersensibilidade imediata. Essa resposta de hipersensibilidade seria promovida por mastócitos na apresentação do antígeno, com produção de citocina durante o seu encontro com o antígeno na pele ou na superfície da mucosa (FOX *et al.*, 1994).

Os grânulos e o sobrenadante, liberados pelos mastócitos ativados, interferem em outras funções desenvolvidas pela célula T, nominalmente, na proliferação e sobre os componentes da matriz extracelular (FRIERI; METCALFE,

1983; HERSHKOVIZ *et al.*, 1994). Além dessas funções, experimentos, *in vivo*, têm mostrado um papel central das células T na proteção do hospedeiro durante as infecções bacterianas (REIMANN; KAUFMANN, 1997).

1.6.6 Resposta diferenciada dos mastócitos a um alérgeno e a uma bactéria

A principal atividade associada aos mastócitos refere-se a sua participação na modulação de respostas alérgicas, mas, em função da sua distribuição estratégica nos tecidos, é esperado que estejam envolvidos tanto nos eventos de sinalização, da interação com bactérias, como em resposta a um sinal iniciado por alérgeno. Como apresentado anteriormente, enquanto a secreção mediada pela interação IgE/receptor $Fc_\epsilon RI$ com o alérgeno é caracterizada por liberação espontânea do conteúdo dos grânulos e liberação intensa de diferentes mediadores. A resposta dos mastócitos a várias bactérias e seus produtos parece envolver um evento de degranulação gradativo, mais lento, que é acompanhado por uma liberação seletiva dos mediadores. Acredita-se que a consequência das respostas induzidas pelos alérgenos seja nociva, enquanto a resposta originada das bactérias parece ser, na sua maior parte, benéfica (MALAVIYA *et al.*, 1994; MEKORI, 2000).

Vários fatores podem tomar parte na distinção de respostas dos mastócitos. Algumas deles relacionando-se com a natureza do receptor que está sobre a superfície do mastócito, em função do seu número em particular e da sua acessibilidade relativa, pois acredita-se que a metade desses receptores esteja ligada a um circuito de sinalização intrínseco do mastócito. Sendo assim, os $Fc_\epsilon RI$ são abundantes, facilmente acessível e capazes de direcionar a transdução do sinal (KINET, 1989). Ligações cruzadas dos antígenos com os receptores $Fc_\epsilon RI$ desencadeiam uma cascata de eventos de transdução de sinal bioquímica, incluindo ativação de múltiplas proteínas da tirosina quinase (PKTs) (KINET, 1989; KINET *et al.*, 1991). A ativação de PTKs e subsequente fosforilação da tirosina inicia a degranulação e secreção dos mediadores dos mastócitos; em particular Syk (OLIVER *et al.*, 1994), tirosina quinase de Bruton (BTK) (KAWAKAMI *et al.*, 1999) e um membro da família Janus Kinase (JAK-3) (MALAVIYA *et al.*, 2000),

têm se mostrado como reguladores-chave do receptor $Fc_\epsilon RI$. Contudo, ainda são limitadas as informações disponíveis quanto aos receptores específicos das bactérias ou dos efeitos dos seus produtos sobre as células imunes, incluindo os mastócitos que tem glicosilfosfatidilinositol (GPI) ancorado na superfície, pois a metade delas falta a capacidade de sinalização clássica. Estes receptores são restritos a compartimentos específicos na membrana plasmática, que em algumas células compreendem cerca de 4% da superfície celular (STEFANOVA *et al.*, 1991). Após a ligação com os componentes bacterianos, estes receptores transduzem sinais para mastócito, via moléculas de sinalização, que estão presentes dentro da *caveolae* (SHIN *et al.*, 2000). *Caveolae* são estruturas membranosas pleomórficas, cavernosas, caracterizadas bioquimicamente por sua densidade variável, resistência a detergentes não-iônicos, rica em colesterol, glicolípídeos (glicofingolípídeo, GM_1) e uma proteína específica, a caveolina (ANDERSON, 1998). Esta estrutura de membrana, presente em diferentes tipos celulares, parece fazer parte dos linfócitos (FRA *et al.*, 1994) e mastócitos (FIELD *et al.*, 1995).

O CD48, uma molécula GPI-ancorada, está associada com a *caveolae* de mastócitos, localizada na sua membrana celular (SHIN *et al.*, 2000). Este é um receptor de mastócitos para bactérias que expressam a fímbria H (MALAVIYA *et al.*, 1999), e parece estar envolvido na internalização da subunidade B da toxina da cólera (MONTESANO *et al.*, 1982).

1.6.7 Resposta secretória dos mastócitos à bactéria *in vitro*

Ao se observar de maneira constante a localização estratégica dos mastócitos no pulmão, pele, tratos gastrointestinal e urogenital passou-se a acreditar na possibilidade de participação como elemento de proteção do hospedeiro, durante a invasão de substâncias estranhas. Nesse sentido, é crescente o número de trabalhos que vêm mostrando seu envolvimento na imunidade inata, através dos processos de defesa do hospedeiro contra bactérias Gram-negativas (MALAVIYA *et al.*, 1994a; MALAVIYA *et al.*, 1996; MALAVIYA *et al.*, 1996a; ECHTENACHER *et al.*, 1996; PRODEUS *et al.*, 1997).

A capacidade dos mastócitos em participar da fagocitose foi identificada, pela primeira vez, por Czarnetzki *et al.* (1982) quando observou que liberavam histamina e β -glicuronidase. Estas células ao serem estimuladas produziam e excretavam duas classes distintas de mediadores pró-inflamatórios (GALLI *et al.*, 1993) que podiam ser agrupadas: os que incluíam histamina e fator de necrose tumoral (TNF)- α , e aqueles que eram sintetizados *de novo* quando as células eram estimuladas, e incluíam os leucotrienos (LTs). Dependendo da natureza do agonista, uma ou as duas classes dos produtos eram liberados por mecanismos exocíticos diferentes. Para Dvorak *et al.* (1992) a natureza dos mecanismos exocíticos, identificada por análise ultraestrutural, revelou ser de dois tipos básicos: um gradual, com liberação lenta dos produtos das câmaras dos grânulos, antes de ocorrer sua fusão, e o outro uma degranulação anafilática, com a secreção ocorrendo de modo intenso, explosivo e rápido.

Essa participação dos mastócitos nos processos de defesa se diferencia pelo modo intenso de liberação da secreção pré-sintetizada, aparentemente desregulada, daquele da síntese *de novo* em respostas promovidas por inoculação microbiana resultante da ligação do alérgeno ao receptor $Fc_\epsilon RI$, que parece ser regulada e depender do envolvimento de agonistas microbiológicos específicos. A resposta secretória, quando estimulada pela fímbria H (FimH) de *Escherichia coli*, pode incluir a liberação de quantidades substanciais de leucotrienos, histamina e TNF- α (MALAVIYA *et al.*, 1994; AROCK *et al.*, 1998; 1999; MALAVIYA *et al.*, 2000). Um padrão diferente foi verificado com endotoxinas bacterianas, onde se observou liberação significativa de IL-6 mas sem evidência de degranulação, com liberação gradual dos mediadores pré-formados como histamina ou serotonina (MARSHALL *et al.*, 1996).

Alguns estudos *in vivo*, com mastócitos de camundongos, têm mostrado essa capacidade da resposta inflamatória nos sítios de infecção através da liberação de mediadores específicos. Em experimentos *in vitro*, os mastócitos têm se revelado capazes de realizar a exocitose e de promover a fagocitose de bactérias aderidas, transformando-as, subseqüentemente, num antígeno bacteriano para apresentação às células do sistema imune do hospedeiro. Essas várias informações têm surgido como eventos de reconhecimento molecular

emergente, e que os mastócitos são capazes de identificar as bactérias Gram-negativas de modo específico (SHIN *et al.*, 2000).

Como a resposta inflamatória dos mastócitos aos vários microrganismos e seus produtos é diferente, espera-se, também, que a natureza e a intensidade dessa resposta inflamatória às diferentes bactérias, mediada por mastócitos, sejam diferentes.

1.6.8 Resposta secretória dos mastócitos à bactéria *in vivo*

Acredita-se que os mastócitos têm a capacidade de proteger o hospedeiro contra infecções de bactérias Gram-negativas, por sua capacidade intrínseca em reconhecê-la durante a infecção, secretando mediadores inflamatórios e fazendo sua endocitose.

As primeiras evidências de que os mastócitos podiam estar envolvidos na infecção, *in vivo*, foram detectadas por Shin *et al.* (1988). Na oportunidade injetaram água destilada na cavidade peritoneal de ratos, após indução de uma peritonite bacteriana fecal. Isso possibilitava aos mastócitos liberar seus mediadores dos grânulos, proporcionando um poder protetor ao animal nesse modelo. Resultados mais convincentes foram apresentados por Malaviya *et al.* (1996), usando um modelo infeccioso de peritonite bacteriana, onde as bactérias que expressavam a fímbria H (FimH) eram empregadas como cepas estimuladoras. O efeito observado foi uma taxa de mortalidade zero para os camundongos do tipo selvagem (+/+), enquanto os deficientes para mastócitos (W/W^v) apresentavam uma mortalidade que chegou a 80%. Além desses achados foi observado que camundongos W/W^v apresentavam na cavidade peritoneal um número de neutrófilos cinco vezes menor que os selvagens. Echtenacher *et al.* (1996), usando ligação cirúrgica do ceco e um modelo pontual de peritonite séptica, mostrou que o TNF- α derivado de mastócito é crítico para a resposta inata em infecção bacteriana.

Além do TNF- α , como um importante mediador responsável pelo recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção, outros produtos derivados dos mastócitos, como o LTB₄, também contribuem nesse processo (MALAVIYA; ABRAHAM, 2000). A importância dos leucotrienos, na resposta inflamatória

protetora da infecção por bactérias Gram-negativas, foi demonstrada utilizando-se camundongos LT-knockout ao serem comparados com os do tipo selvagem. Essa comparação resultou numa taxa de mortalidade menor destes últimos quando infectados pela *Klebsiella pneumoniae* (BAILIE *et al.*, 1996).

Diferentes componentes do hospedeiro têm-se mostrado capazes em mediar uma resposta dos mastócitos nas infecções bacterianas, como o componente do complemento C3 (PRODEUS *et al.*, 1997) e SCF (fator de crescimento celular) (GALLI *et al.*, 1994; KLIMPEL *et al.*, 1996). Nesse sentido, Maurer *et al.* (1998) observaram, ainda, que o efeito protetor dos mastócitos em camundongos pode ser potencializado, aumentando-se seu número *in vivo*, pela administração de SCF.

Assim, diante do exposto, este estudo coloca os mastócitos como uma célula emergente no sistema imune, pois elas fazem parte da mucosa e podem responder a infecção bacteriana secretando diferentes componentes capazes de tomar parte na proteção do hospedeiro.

2. JUSTIFICATIVA

O nosso laboratório vem investigando o papel de células do sistema imune na imuno-fisiologia e farmacologia do trato gastrointestinal há mais de 10 anos. Nessa área de atuação foi demonstrada a ação da toxina A do *Clostridium difficile* em alça intestinal isolada, *in vivo*, que provocava uma potente secreção intestinal semelhante àquela produzida pela toxina da cólera (LIMA *et al.*, 1988). Nesses estudos, foi evidenciado, ainda, um infiltrado inicial de células mononucleares na mucosa e submucosa do íleo tratada com a toxina A, sugerindo, assim o envolvimento destas células, em especial macrófagos, na fisiopatologia da diarreia provocada pelo *C. difficile* (LIMA *et al.*, 1989). A partir do trabalho inicial que evidenciou o envolvimento de células mononucleares nos efeitos enterotóxicos da toxina A, foram desenvolvidos outros estudos em modelos clássicos de inflamação aguda, como migração de neutrófilos, que consolidavam o papel de células inflamatórias nas atividades biológicas das toxinas A (ROCHA *et al.*, 1997) e B (SOUZA *et al.*, 1997) produzidas pelo *C. difficile*. Nestes trabalhos foram demonstrados que ambas as toxinas eram potentes indutoras da migração de neutrófilos em cavidade peritoneal e bolsas de ar subcutâneas de ratos, através da liberação de fatores quimiotáticos sensíveis a inibidores de fosfolipase A₂ e lipoxigenase. Nesse mecanismo evidenciou a participação dos macrófagos nas atividades biológicas dessas toxinas, *in vivo*. Após esses achados, passou-se a estudar o potencial de macrófagos *in vitro*. Assim, dos estudos subseqüentes observou-se que o sobrenadante de macrófagos peritoneais estimulados com a toxina A (ROCHA *et al.*, 1998), mas não com a toxina B (ROCHA *et al.*, 2001), provocava uma intensa secreção intestinal no íleo de coelho, além de uma absorção reduzida de água e eletrólitos.

Nesse contexto da atividade do laboratório que inclui o estudo do processo inflamatório desenvolvido por toxinas bacterianas e a participação das células do sistema imune foi que se idealizou a execução do presente trabalho, envolvendo as toxinas do *V. cholerae* e *B. fragilis*. A literatura clássica, até recentemente, agrupava o *Vibrio cholerae* e *Bacteroides fragilis* como importantes agentes causadores de diarreia não-inflamatória. Contudo, paradoxalmente, alguns autores vêm demonstrando o envolvimento de células inflamatórias e seus mediadores na

fisiopatologia dos efeitos deletérios intestinais promovidos por estes microrganismos e/ou suas toxinas. Considerando esse conhecimento, postulamos a participação do componente pró-inflamatório nos efeitos enterotóxicos associado ao *V. cholerae* e *B. fragilis*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral foi investigar o papel de células e mediadores farmacológicos nas atividades enterotóxicas e pró-inflamatórias das toxinas produzidas pelo *V. cholerae* e *B. fragilis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade secretória intestinal da toxina da cólera, do filtrado do sobrenadante da cultura do *B. fragilis* e da toxina purificada do *B. fragilis*, *in vivo* e *in vitro*;
- Investigar o possível envolvimento de células inflamatórias e seus mediadores nas atividades biológicas dessas toxinas;
- Fazer uma análise histológica da lesão intestinal induzida pela toxina purificada do *Vibrio cholerae* (TC) e do filtrado do sobrenadante da cultura e da toxina purificada (TBF) do *B. fragilis*, *in vivo*;
- Correlacionar a dinâmica do processo inflamatório com os mecanismos de lesão e secreção intestinais, induzidos por estas toxinas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

4.1.1 Ratos

Foram utilizados ratos *Wistar* adultos, *Ratus norvegicus*, de ambos os sexos, pesando entre 170 e 220g. Os animais eram mantidos em caixas apropriadas, sendo colocados em jejum, 12 horas antes de cada experimento, com água *ad libitum*. Esses animais eram provenientes do Biotério Central da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

4.1.2 Coelhos

Coelhos albinos, da variedade Nova Zelândia, de ambos os sexos, pesando entre 1,5 e 2,5 Kg, foram provenientes do criatório da Universidade Federal do Ceará, localizado no Campus do Pici. Os animais foram mantidos em jejum, durante 12 horas, antes do experimento, com livre acesso à água.

4.2 Toxinas Bacterianas

4.2.1 Toxina do *V. cholerae*

A toxina da cólera foi obtida do *V. cholerae* Inaba 569B, Lote # 101481E, produzida pelo List Biological Laboratories, INC., Campbell, Califórnia, USA.

4.2.2 Toxina do *B. fragilis*

As cepas do *B. fragilis* foram cultivadas anaerobiamente em BBL Gaspak Plus (Becton Dickinson), em câmaras anaeróbias, por 16 horas, a 37 °C, seguida de centrifugação a 5.000 g, por 10 minutos, em 4°C. Os sobrenadantes da cultura foram passados em filtros Millex de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA) e a TBF testada em ensaio de células HT29/C1 ou por ELISA (WEIKEL *et al.*, 1992; Van TASSEL *et al.*, 1994). A toxina purificada e as cepas do *B. fragilis* foram cedidas gentilmente pela Dra. Cynthia L. Sears, Associate Professor, John Hopkins University, Baltimore, MD.

4.2.3 Filtrados bacterianos obtidos das cepas NTBF e ETBF

Os filtrados bacterianos foram produzidos de acordo com a metodologia preconizada por Mundy & Sears (1996). Dessa forma, as cepas do *B. fragilis* 77-NTBF (não-toxigênica) e 86-ETBF (toxigênica) foram cultivadas por 12 a 16 horas, em meio BBL™, que após passagem em filtros miliporos de 0,22 µm era obtido o filtrado.

4.3 Drogas

As drogas utilizadas na seleção dos bloqueadores farmacológicos efetivos da secreção intestinal induzida pela TC foram: quinacrina, indometacina, ketotifen, composto 48/80, ciproheptadina, difenidramina e metergolina, obtidas da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). MK 886 foi adquirido da Merck Sharp & Dohme (Rahway, N.J., USA). Dexametasona veio da Merck Sharp & Dohme (São Paulo, SP, Brasil). Meloxicam e celocoxibe foram adquiridos do Boehringer Ingelheim (São Paulo, SP, Brasil) e Searle & Pfizer (São Paulo, SP, Brasil), respectivamente. Thalidomida foi obtida do ICN Biomedical Inc (Aurora, OH, USA). BN 52021 e WEB 2086 foram adquiridos do Instituto Pasteur, Paris, France. A Toxina A pura do *Clostridium difficile* (TxA) (VPI strain 10464), utilizada como controle positivo, foi adquirida do TechLab. Inc, Blacksburg, VA - USA.

4.4 Composição das soluções e dos meios de culturas

As composições das soluções e meios de culturas utilizados nos experimentos encontram-se detalhadas nas tabelas apresentadas a seguir.

Tabela-1. Composição da solução de Hanks

Composição	Formulação	Companhia
Hanks	9,5 g	^a Gibco
Água destilada	^b 1,0 l	-

^aGibco: Gaithersburg, MD, USA

^bFoi completado para 1 litro

Tabela-2. Composição da solução salina tamponada com fosfato (PBS)

Composição	Formulação	Companhia
Cloreto de sódio	8,0 g	^a Reagen
Cloreto de potássio	0,2 g	Reagen
Fosfato de sódio dibásico	1,15 g	^b Fisher
Fosfato de sódio monobásico	0,2 g	Reagen
Água destilada	^b 1,0 l	-

*O pH foi corrigido para 7,4

^aReagen: Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ^bFisher: Springfield, NJ, USA

^bFoi completado para 1 litro

Tabela-3. Composição do líquido de Turk

Composição	Formulação	Companhia
Ácido acético glacial	0,020 l	^a Reagen
Violeta de genciana	0,002 l	Reagen
Água destilada	^b 1,0 l	-

^aReagen: Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^bFoi completado para 1 litro

Tabela-4. Composição do meio de cultura Dulbecco

Composição	Formulação	Companhia
Dulbecco	13,5 g	^a Gibco
Bicarbonato de sódio	2,2 g	^a Gibco
Tampão Hepes	2,381 g	^b Sigma
Água destilada	^b 1,0 l	-

*O pH foi corrigido para 7,4

^aGibco: Gaithersburg, MD, USA; ^bSigma: St. Louis, MO, USA

^bFoi completado para 1 litro

Tabela-5. Composição da solução de Ringer^a

Composição	Concentração (mEq/l)	Companhia
Na ⁺	145,0	^b Sigma
K ⁺	4,6	Sigma
Ca ⁺⁺	3,4	Sigma
Mg ⁺⁺	0,8	Sigma
Cl ⁻	119,0	Sigma
HCO ₃ ⁻	25,0	Sigma
SO ₄ ⁻	0,8	Sigma

^aO pH foi corrigido para 7,4

^bSigma: St. Louis, MO, USA

4.5 Alça intestinal ligada

Os ratos foram submetidos a um jejum alimentar de 12 horas antes da realização da cirurgia, mas com água *ad libitum*. Na anestesia utilizaram-se 5 mg/Kg de xilazina e 70 mg/Kg de cloridrato de ketamina (SILVA *et al.*, 1998). Foi feita uma laparotomia na linha mediana medindo cerca de 3 cm (FORMAL *et al.* (1961). Depois da abertura cirúrgica, o intestino delgado foi identificado, exposto e, quando necessário, lavado com PBS para retirada do excesso de resíduos digestivos. Em seguida, foram feitas as alças do íleo distal, que mediam cerca de 5 cm, separadas por ligações duplas de nylon, sendo inoculado um volume de 0,5 ml do material a ser testado ou do controle, em cada uma delas. Essas alças foram recolocadas na cavidade abdominal, sem interrupção do suporte sanguíneo (De; CHATTERJE, 1953) (**Figura 2**). Depois de completados os tempos dos tratamentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os segmentos foram medidos e o fluido intestinal coletado e mensurado. Por fim, fez-se o cálculo da taxa de secreção em $\mu\text{l}/\text{cm}$.

ALÇA INTESTINAL LIGADA

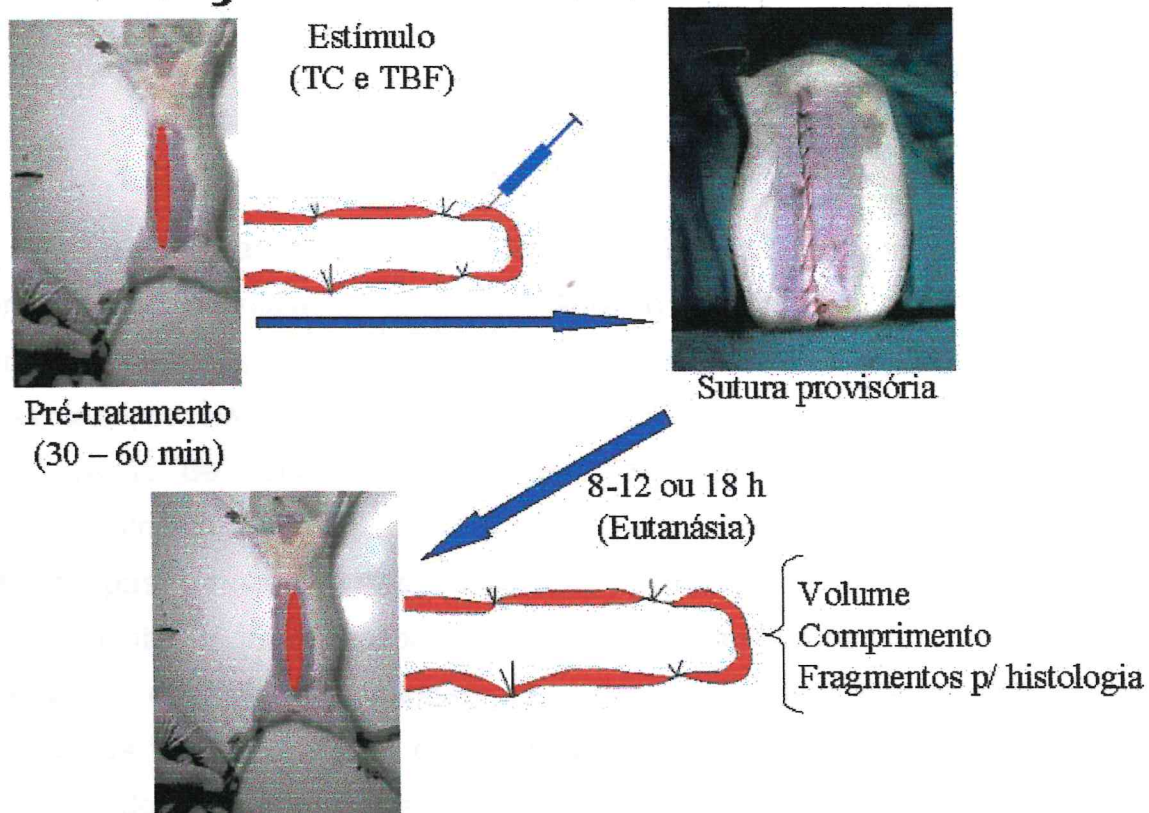


Figura 2. Alça intestinal ligada. Os sobrenadantes de culturas de cepas bacterianas do *B. fragilis*, toxigênica e não-toxigênica, e toxinas purificadas do *V. cholerae* e *B. fragilis* foram inoculadas em alça intestinal ligada para verificação do efeito secretório ou lesivo sobre a mucosa. TC, toxina da cólera; TBF, toxina do *B. fragilis*.

4.6 Isolamento de células do sistema imune gastrointestinal

As células intestinais totais foram obtidas a partir da dissecação do intestino delgado dos ratos e processadas, em seguida, para isolar-se os mastócitos. Nesse procedimento, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Befus *et al.* (1982) e Pearce *et al.* (1982) após modificação no nosso laboratório (FEITOSA *et al.*, 2001).

4.6.1 Células totais do sistema imune gastrointestinal

Os ratos foram colocados em jejum por 12 a 18 horas, em número de 6 a 7 por grupo, e sacrificados com éter. Após o sacrifício foi feita uma incisão abdominal para que o intestino delgado fosse retirado e desprendido do mesentério, seccionado na altura do piloro e porção anterior do ceco e lavado com uma injeção de 10ml de PBS estéril. Em seguida, o intestino foi aberto longitudinalmente, em toda sua extensão, e o muco contido sobre o epitélio retirado, passando-se uma gaze estéril ao longo de toda mucosa. Depois desse procedimento, o intestino foi seccionado em fragmentos de 2-3 cm, sendo removidas e descartadas todas as placas de Peyer encontradas. Esses fragmentos foram colocados em 2 tubos Falcon com 25-30 ml da solução de Hank, sendo lavados, por 2 vezes, nesta solução.

Foram preparados 100 ml de meio Dulbecco, contendo antibióticos (5.000 UI de penicilina G, 5.000 µg de estreptomicina e 12,5 µg de anfotericina B), heparina (1ml) e enzima dispase (0,3g/100ml), para isolamento das células intestinais totais. Os fragmentos do intestino foram adicionados a esse meio (50ml), contendo a dispase, e incubados por um tempo de 15 minutos, agitados em vortex a cada 5 minutos (1ª incubação); em seguida foi descartado o sobrenadante, contendo principalmente enterócitos. Novamente, foi adicionado aos fragmentos do intestino um novo meio contendo dispase, e incubados por mais 30 minutos, em estufa de CO₂, a 5%, sendo agitado em vortex a cada 5 minutos (2ª incubação).

Depois da 2ª incubação o material da estufa foi retirado e filtrado em gaze estéril, para coletar o meio com as células, e os fragmentos intestinais serem

descartados. O meio contendo as células foi centrifugado a 3000 rpm, por 7 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante (meio) foi descartado, para eliminar a dispase. Um novo meio, sem dispase, foi adicionado ao concentrado de células e centrifugado por 2 vezes para lavar as células, em 3000 rpm, durante 5 minutos; os sobrenadantes foram descartados e preservadas as células. Após a obtenção das células da lâmina própria intestinal, foi feita a contagem total, ajustando-se para 10^6 células/ml, em câmara de *Neubauer*. A contagem para ajuste do total de células é feita utilizando-se 380 μ l do corante de Turk, combinado com 20 μ l do conteúdo das células.

4.6.2 Isolamento de mastócitos do sistema imune gastrointestinal

O sobrenadante com as células totais da lâmina própria intestinal foi diluído em um volume adequado ($\pm 10^6$ células/ml). O Percoll, em temperatura ambiente, foi preparado na proporção 10 : 1, com PBS (concentrado 10X); foi utilizado 3ml por tubo Falcon (de 15ml). O meio contendo as células totais foi colocado nos tubos com Percoll + PBS, na proporção 2 : 1 (2 partes da suspensão celular e 1 de Percoll + PBS). O meio com as células foi adicionado a esta solução, deslizando suavemente pelas paredes do tubo, de modo que ficasse sobreposto ao Percoll + PBS, e centrifugado por 20 minutos a 3000 rpm. Em seguida, a camada intermediária (interface) foi coletada cuidadosamente e colocada em outro tubo estéril. O meio *Dulbecco* foi adicionado às células coletadas e centrifugado para lavagem e retirada do Percoll + PBS (repetiu-se por duas vezes esse processo de lavagem celular). Após a lavagem das células, as lâminas foram preparadas com os mastócitos para visualização e verificação da viabilidade celular (uma gota das células + uma gota de corante de Turk foi observado ao microscópio ótico, obtendo-se uma viabilidade igual ou superior a 85%). O bom estado e um número significativo das células eram necessários para que, em seguida, fossem adicionadas as substâncias controle (meio *Dulbecco*) e estimuladoras dos mastócitos, por um período de 1,0 hora. Depois de estimuladas as células da cultura foram lavadas, por duas vezes, com o meio utilizado. Após essa lavagem foi adicionado um novo meio à cultura contendo soro fetal bovino a 10% e levado à estufa por mais 2 horas. Em seguida, a cultura foi retirada da estufa,

centrifugada por 5 minutos, sendo coletado o sobrenadante, que foi colocado em recipiente adequado, para conservação no freezer a -70°C . A viabilidade celular era verificada com o objetivo de observar a morfologia das células após o desafio (Figura 3).

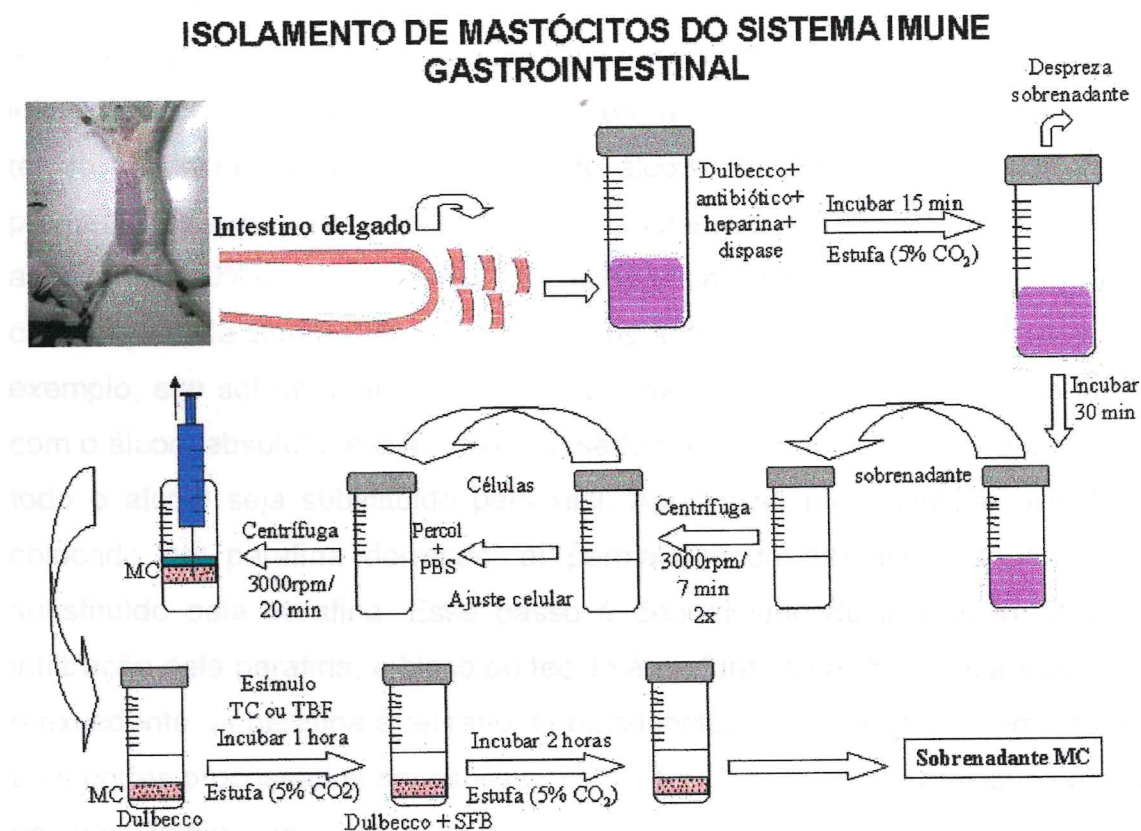


Figura 3. Isolamento de mastócitos do sistema imune gastrointestinal. Os mastócitos foram isolados da mucosa intestinal e estimulados com as toxinas da cólera e do *Bacteroides fragilis*. MC, mastócito; TC, toxina da cólera; TBF, toxina do *Bacteroides fragilis*; SFB, soro fetal bovino.

4.7 Técnica histopatológica

O tecido foi obtido após o sacrifício dos ratos, sendo coletados segmentos intestinais, do íleo distal medindo cerca de 2 a 3 cm. O material obtido foi imerso, logo após, em PBS mais formaldeído a 10%, por um período mínimo de 24 horas. Essa solução fixa a maioria dos componentes dos tecidos no lugar, a fim de que eles não se percam no decorrer do processamento posterior.

Depois da fixação dos tecidos os cortes foram preparados pela técnica da parafina. Como a água é um constituinte em grande proporção dos tecidos, a técnica consiste na sua substituição pela parafina. Essa substituição é realizada, inicialmente, através da desidratação, com a retirada da água pela imersão do tecido fixado em uma solução fraca de álcool em água, seguida por soluções progressivamente mais fortes até sua passagem em dois banhos de álcool absoluto (100%). Desta forma, o tecido fica desidratado e segue para a clarificação. Na clarificação e infiltração, os agentes clarificantes, como o xilol por exemplo, são solúveis tanto na parafina como no álcool. Esse processo inicia-se com o álcool absoluto, e o tecido é passado por sucessivas trocas de xilol até que todo o álcool seja substituído pelo xilol. Após esse procedimento o material é colocado em parafina derretida, aí permanecendo até que todo o xilol seja substituído pela parafina. Esse passo é denominado de infiltração. Depois da infiltração pela parafina, o bloco do tecido é endurecido à temperatura ambiente e o excedente da parafina é retirado. O bloco incluído é montado em um micrótomo e os cortes processados em espessuras de 4 a 6 μm . Esses cortes são colocados em uma lâmina de vidro e mergulhados, primeiro, em xilol, com o objetivo de remover a parafina e, em seguida, em álcool absoluto para remoção do xilol. Após secagem, na lâmina, o corte está pronto para coloração com corantes em solução aquosa ou alcoólica.

As colorações utilizadas no estudo foram a hematoxilina e eosina (H-E) e Giemsa. Depois da coloração, o corte passou por álcoois de concentrações crescentes até o álcool absoluto e, a seguir, por xilol. Após esse procedimento, o corte foi montado em um meio solúvel em xilol, para finalmente ser colocada uma lamínula sobre o corte, tornando-se uma preparação permanente.

Os procedimentos histopatológicos adotados nesses experimentos encontram-se descritos por Paul (1960) e Parker (1961).

4.8 Necrópsia dos animais

Os ratos foram necropsiados segundo a técnica clássica de Ghon, modificada, na qual a evisceração se dá através de monoblocos de órgãos anatomicamente relacionados. Assim, os órgãos examinados *in situ* e posteriormente retirados e isolados para análise mais detalhada (MORAES; PIRES, 2002).

O exame externo dos animais (ectoscopia) não revelou alterações dignas de nota no tocante a pelagem, orifícios naturais e extremidades dos membros.

O exame necroscópico teve início com a incisão mento-pubiana, seguindo-se da avaliação de regiões cervical e da abertura da caixa torácica pelo método de deslocamento do esterno para acesso à cavidade torácica. Houve a retirada do primeiro monobloco de órgãos (conjunto língua-esôfago, laringe, traquéia, pulmões e coração). A seguir, verificou-se a integridade do diafragma e executou-se o exame *in situ* seguido da retirada das vísceras em monoblocos: primeiro fígado e vesícula biliar; depois o conjunto estômago, pâncreas e intestinos; em sequência, baço, rins e bexiga urinária, além do sistema reprodutor, que foram também avaliados.

A análise das vísceras foi feita para constatação de cor, volume, consistência, textura e conteúdo (eventual) dos órgãos, sendo considerados normais ou alterados de acordo com o padrão considerado, para cada órgão em particular.

Também foi realizada a abertura da caixa craniana para o acesso ao cérebro e meninges, no qual observou-se a conformação encefálica e cerebelar, além da quantidade do líquido céfalo-raquidiano.

Amostras de todas as peças, aparentemente alteradas macroscopicamente e outras consideradas importantes, foram encaminhadas para exame histopatológico.

4.9 Migração celular em cavidades peritoneais de ratos

A toxina do *B. fragilis* foi inoculada na cavidade peritoneal de ratos: concentrações de 1, 3 e 10 $\mu\text{g/ml}$ no período de quatro horas e de 3 $\mu\text{g/ml}$ nos tempos de 2, 4 e oito horas (Figura 4).

MIGRAÇÃO CELULAR EM CAVIDADES PERITONEAIS DE RATOS

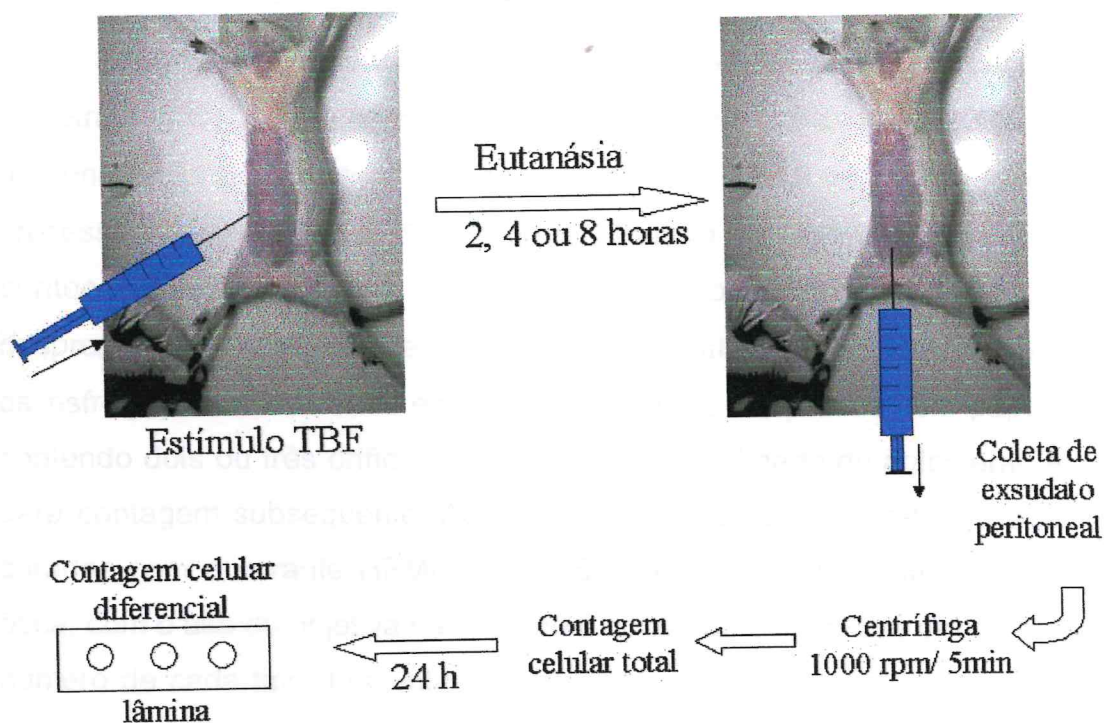


Figura 4. Migração celular em cavidades peritoneais de ratos. Após a inoculação da toxina do *Bacteroides fragilis* (TBF) na cavidade peritoneal foi realizada a coleta do material para contagem total e diferencial das células encontradas: neutrófilos, mononucleares, eosinófilos e mastócitos.

4.9.1 Obtenção do material

Depois da inoculação da toxina e do controle, e os tempos definidos alcançados, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, injetavam-se 10 ml de PBS heparinizado, contendo albumina 3%, na cavidade peritoneal, fazendo-se uma leve massagem, para colheita de cerca de 6 ml do exsudato, através de uma agulha fenestrada conectada a uma seringa de 10 ml, conforme descrito por Rocha *et al.* (1997).

4.9.2 Contagem celular total e diferencial

As contagens total e diferencial foram feitas baseadas no método de Souza; Ferreira (1985). A contagem *total* foi processada retirando-se 20 μ l do lavado peritoneal, acrescido de 380 μ l do corante de Turk. A seguir, as leituras foram processadas em câmaras de *Neubauer*. Para a contagem *diferencial*, o lavado peritoneal foi centrifugado a 1.000 r.p.m., por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenso em 200 μ l de albumina a 3%. Em seguida, os esfregaços foram feitos em lâminas comuns, adaptadas com papel de filtro, contendo dois ou três orifícios centrais, com a finalidade de aglomerar as células para contagem subsequente. Após a secagem, o papel foi retirado e as células coradas com o corante HEMA III. As lâminas foram analisadas em microscopia ótica, com o uso da objetiva de imersão e contadas 100 células em cada lâmina. O número de cada tipo de célula foi calculado a partir da percentagem encontrada em relação ao número total por ml. Diferenciavam-se quatro tipos celulares a saber: neutrófilos, mononucleares, eosinófilos e mastócitos.

4.9.3 Curva dose-resposta da migração celular

As doses de TBF utilizadas foram de 1, 3 e 10 μ g/ml no tempo de quatro horas. A migração celular foi verificada após inoculação de 1,0 ml do estímulo (TBF) e do controle (PBS) por via intraperitoneal.

4.9.4 Curva tempo-efeito da migração celular

Em função dos resultados obtidos na curva dose-resposta, foi utilizada a dose de 3 µg/ml de TBF, no tempo de 2, 4 e 8 horas para verificação do seu efeito em função do tempo.

4.10 Câmara de Üssing

4.10.1 Preparação da solução de Ringer

A solução de Ringer utilizada nos experimentos com câmaras de Üssing, foi elaborada de acordo com a fórmula preconizada por Field *et al.* (1971). Após a adição dos componentes da solução, o Ringer era saturado durante 15 minutos com uma mistura carbogênica, contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂, sendo em seguida o seu pH corrigido para 7,4. Por fim, adicionava-se D(+) glicose (100 mg/dl; Sigma; St. Louis, MO) na solução perfusora do lado seroso e D(+) manitol (100 mg/dl; Sigma; St. Louis, MO) na solução do lado mucoso (Soares *et al.*, 1991).

4.10.2 Preparação e montagem do íleo

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

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

Por fim, o íleo foi dividido em fragmentos de ± 3 cm e colocado entre duas hemi-câmaras de acrílico, com 1 cm² de área circular interna. Todos esses procedimentos foram executados em uma placa de petrí, sobre uma superfície com gelo, de acordo com a metodologia descrita anteriormente (ÜSSING; ZERAHN, 1951; SCHULTZ; ZALUSKY, 1964) (**Figura 5**).

CÂMARA DE ÜSSING

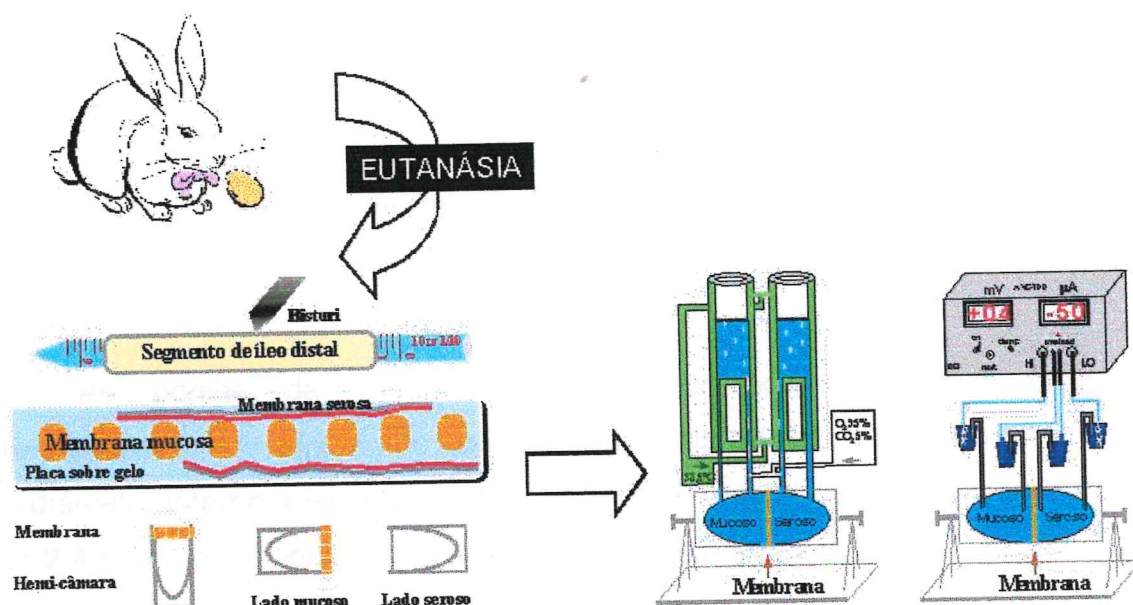


Figura 5. Funcionamento de Câmaras de Üssing. O íleo de coelho foi coletado e montado em Câmaras de Üssing para realização das mediadas elétricas de corrente de curto-circuito, diferença de potencial e resistência transmembrana (Adaptado de ROCHA *et al.*, 1998).

4.10.3 Montagem e funcionamento das câmaras

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

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

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

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

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

Após todo esse aparato técnico, os clampeadores foram ligados e o amperímetro zerado a fim de ser medido e registrado o potencial elétrico

espontâneo, gerado pelo sistema. Caso o potencial espontâneo ultrapassasse os limites, +1,0 a -1,0 mV, o sistema elétrico era desmontado e imediatamente refeito.

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

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

- Período inicial: as medidas elétricas monitoradas durante esse período foram usadas como critério de triagem das condições do tecido. Caso essas medidas ultrapassassem de forma acentuada a média das outras câmaras, a membrana era substituída.
- Período de estabilização (30 min.): nesse período foi dada uma atenção especial às variações da corrente de curto-circuito; se houvesse variações maiores que 20%, entre o final deste período e as leituras anteriores, a câmara era automaticamente eliminada do experimento.
- Período de adição (60 min.): após o período de estabilização, as câmaras foram divididas de acordo com cada protocolo experimental. A seguir, foi retirado 1,0 ml do perfusado. A toxina da cólera (1 µl/ml) e controles, eram adicionados no volume de 1,0 ml, de tal maneira que o volume total retornasse aos 10 ml.
- Período de teste funcional (20 min.): independentemente do protocolo experimental, no início deste período, foram retirados 200 µl do perfusado e adicionado o mesmo volume de teofilina, 10^{-3} M, no lado seroso, com o objetivo de testar o estado elétrico final da membrana. Caso o clampeador de voltagem apresentasse uma sobrecarga de corrente, *over-load*, os dados obtidos nesta câmara eram eliminados dos resultados experimentais.

4.11 Dosagem de citocinas

4.11.1 Ensaio para detecção de IL-1 β

As amostras do fluido intestinal foram obtidas conforme a técnica descrita no item 4.5. A concentração de IL-1 β foi determinada através de um ELISA específico (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; Rat IL- 1 β ; Biosource International, Camarillo, Califórnia, USA).

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

Na etapa seguinte, 100 μ l de anti- IL-1 β foram adicionados a cada poço e aí permaneceram por 1 hora à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, as soluções foram desprezadas e os poços novamente lavados, por mais 4 vezes, com o líquido-tampão. Após este procedimento, 100 μ l de streptavidina-HRP foram distribuídos em cada poço. A placa foi coberta e deixada por mais um período de 30 minutos à temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, essa placa foi esvaziada e lavada de acordo com o método descrito anteriormente.

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

As curvas do padrão foram construídas para cada experimento de forma análoga à descrita anteriormente. Contudo, inicialmente foram adicionados aos poços 100 μ l dos padrões de IL-1 β nas respectivas diluições (46,9, 93,7, 187, 375, 750, 1500 e 3000 pg/ml), em substituição aos sobrenadantes de macrófagos (Figura 6).

ENSAIO PARA DETECÇÃO DE IL- β

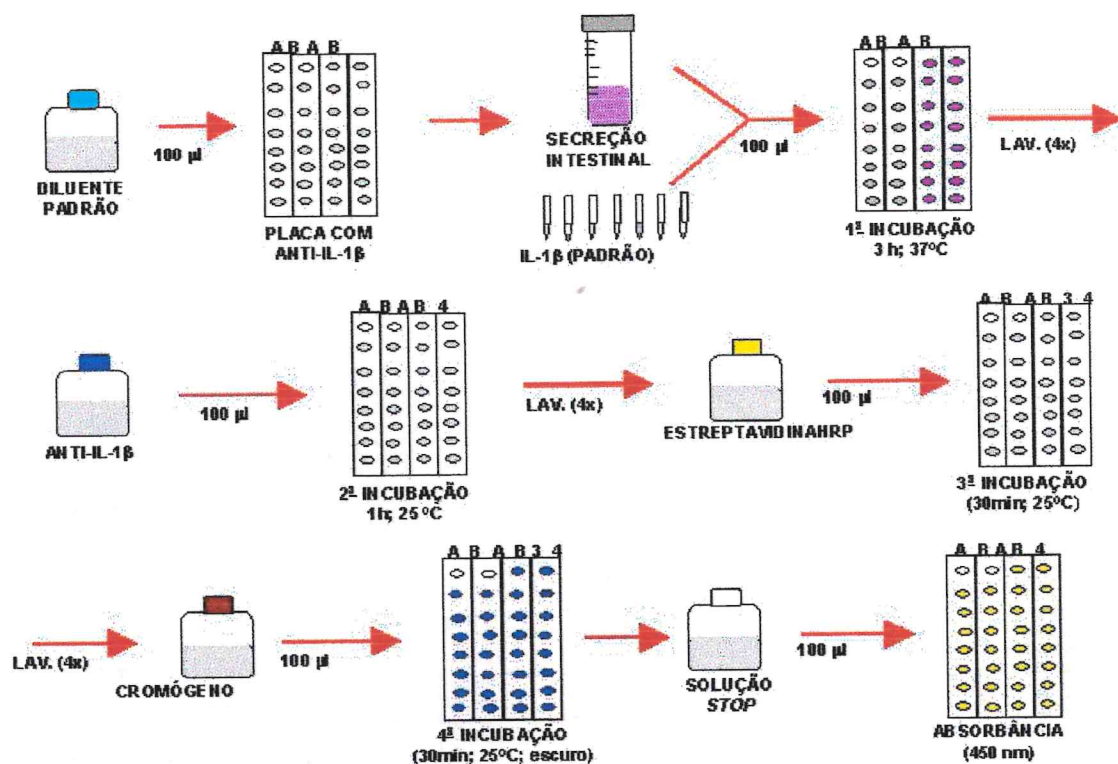


Figura 6. Ensaio para detecção de IL-1 β através de um teste de ELISA. As amostras do fluido intestinal foram distribuídas nas placas de acordo com a técnica preconizada (Fonte: ROCHA *et al.*, 1998; ROCHA *et al.*, 2000).

4.11.2 Ensaio para detecção de TNF- α

Os níveis de TNF- α no fluido intestinal induzido pela toxina da cólera foram analisados por meio de um *kit* de ELISA, específico para essa citocina (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; Rat TNF- α ; Biosource International, Camarillo, Califórnia, USA).

ENSAIO PARA DETECÇÃO DE TNF- α

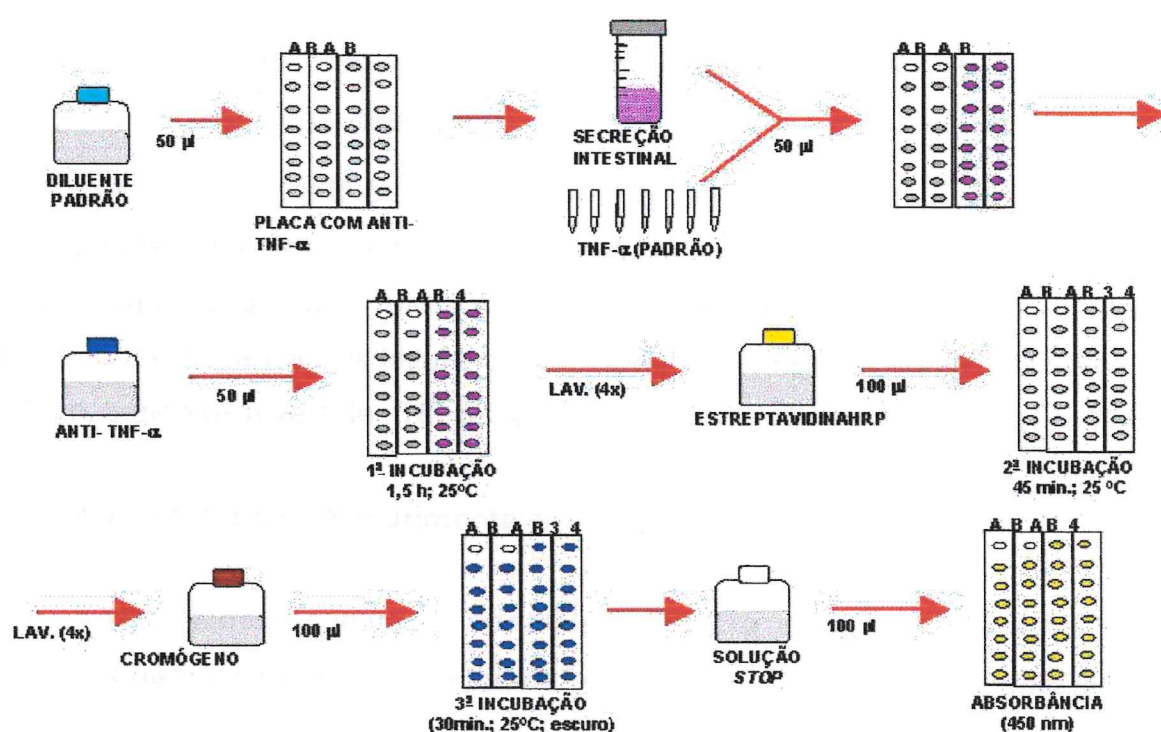


Figura 7. Ensaio para detecção de TNF- α através de um teste de ELISA. As amostras do fluido intestinal foram distribuídas em placas padronizadas, de acordo com kit do fabricante (Fonte: ROCHA *et al.*, 1998; ROCHA *et al.*, 2000).

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

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

Por último, foram adicionados 100 µl de cromógeno a cada poço e, subsequente, a placa foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Logo após essa etapa, colocaram-se 100 µl/poço da solução bloqueadora de reação. A leitura da absorbância foi realizada imediatamente, a 450 nm, sendo os níveis de TNF-α expressos em picogramas por ml (**Figura 7**).

4.12 Protocolos Experimentais

4.12.1 Inoculação dos controles (PBS e BBL™) e filtrados das bactérias não-toxigênica (NTBF) e toxigênica (ETBF) em alça intestinal ligada

Foram feitas inoculações em 2 segmentos intestinais isolados de ratos, do mesmo tratamento, contendo 0,5 ml dos controles (BBL™ e PBS) e dos filtrados dos sobrenadantes das cepas NTBF e ETBF, em 3 grupos, constituídos de 4 animais cada um, nos tempos de 8, 12 e 18 horas. Grupo I – tratamento com PBS/BBL™; grupo II – tratamento com o filtrado de NTBF; e, Grupo III – tratamento com o filtrado de ETBF. Com esse protocolo objetiva-se verificar o efeito dos sobrenadantes produzidos pelas cepas bacterianas não-toxigênica (NTBF) e toxigênica (ETBF) na mucosa intestinal, quanto a ação lesiva e secretória (**Figura 2**).

4.12.2 Estudo das curvas dose-resposta e tempo-efeito da cólera em alça intestinal ligada de ratos

O PBS e a toxina da cólera (1,0 µg/ml), diluída em PBS, foram inoculados em alças intestinais ligadas de ratos, em um volume de 0,5 ml. No estudo da dose-resposta foram consideradas as doses de 0,1, 0,3 e 1,0 µg/ml. Quanto ao tempo-efeito foi utilizada a dose de 1,0 µg/ml, nos tempos de 6, 10, 14 e 18 horas (Figura 2).

4.12.3 Inoculação das toxinas do *V. cholerae* (TC) e do *B. fragilis* (TBF) em alça intestinal ligada de ratos

PBS sozinho, TBF (3 µg/ml) e a TC (1,0 µg/ml), diluídas em PBS, em um volume de 0,5 ml, foram inoculados em alças intestinais ligadas de ratos. O tempo do experimento foi de 18 horas. Esse protocolo objetivou a verificar a ocorrência de lesão da mucosa, secreção intestinal e destacar a presença de alguma célula específica (Figura 2).

4.12.4 Inoculação dos sobrenadantes da cultura de mastócitos estimulados com as toxinas do *V. cholerae* e do *B. fragilis* em alça intestinal ligada de ratos

Foram utilizados três grupo de 4 animais para os inóculos dos sobrenadantes do cultivo de mastócitos estimulados com o meio Dulbecco, com TBF (3 µg/ml) e TC (1 µg/ml), respectivamente. O tempo de exposição do estímulo foi de 18 horas. Esse protocolo objetivou a verificar a ocorrência de lesão da mucosa, secreção intestinal e destacar a presença de alguma célula específica (Figura 2).

4.12.5 Estudo histopatológico

Nesse estudo foram coletados materiais das alças intestinais com inóculos controles e filtrados, dos itens 4.12.1 (controles PBS e BBL™, filtrado das bactérias não-toxigênicas, NTBF e filtrado das bactérias toxigênicas, ETBF), 4.12.2 (inoculo das toxinas puras do *V. cholerae*, 1 µg/ml, e do *B. fragilis*, 3 µg/ml)

e 4.12.3 (sobrenadantes do cultivo de mastócitos estimulados com as toxinas do *V. cholerae*, 1 $\mu\text{g/ml}$, e do *B. fragilis*, 3 $\mu\text{g/ml}$) e processado histopatologicamente.

4.12.6 Estudo das curvas dose-resposta e tempo-efeito da toxina pura do *B. fragilis* na migração celular em cavidade peritoneal de ratos

Um primeiro estudo foi realizado utilizando as doses de 1, 3 e 10 $\mu\text{g/ml}$ no tempo de quatro horas. Num outro considerou-se a dose de 3 $\mu\text{g/ml}$ nos tempos de 2, 4 e 8 horas. A migração celular foi verificada após inoculação na cavidade peritoneal de 1,0 ml do controle (PBS) e do estímulo (TBF, diluída em PBS).

Após os tempos definidos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e inoculados na cavidade peritoneal 10 ml de PBS com 3% de albumina. Esse material foi coletado, cerca de 60 a 70%, para contagem celular total e diferencial.

Neste protocolo objetivou-se verificar se havia uma predominância na migração de um tipo celular, promovida pela toxina purificada injetada na cavidade peritoneal de ratos; caso ocorresse a migração, verificavam-se as curvas de dose e tempo dependentes em relação a esse efeito (Figura 4).

4.12.7 Bloqueadores farmacológicos utilizados na modulação da secreção intestinal induzida pela toxina da cólera (TC)

PBS e a TC (1,0 $\mu\text{g/ml}$), diluída em PBS, foram inoculados em alça do intestino delgado (um volume de 0,5 ml por segmento), de aproximadamente 5 cm de comprimento, com ligações duplas de nylon entre os segmentos. Os segmentos intestinais pré-tratados foram novamente introduzidos na cavidade abdominal. Os ratos foram sacrificados após 18 horas, por deslocamento cervical, e a proporção do volume (ml) pelo comprimento (cm) foi determinada. O "screening" farmacológico foi usado, 30-60 minutos antes da inoculação da TC no lúmen intestinal, com o fluido intestinal sendo recuperado 18 horas depois.

Os fármacos utilizados neste trabalho com suas respectivas diluição, dose e via de aplicação (subcutânea [sc]; intraperitoneal [ip]; oral [pó]; intraluminal [il]; endovenosa [ev]), foram baseados nos seguintes autores: Triadafilopoulos *et al.*

(1989); Grant *et al.* (1990); Barnes; Adcock, (1993); Moreira *et al.* (1993); Rocha *et al.* (1997); Feitosa *et al.* (2002). Dentre estes fármacos, destacam-se:

1. Quinacrina (20 mg/kg, diluída em PBS; sc) – inibidor seletivo de fosfolipase A₂.
2. Indometacina (2 mg/kg, diluída em solução de NaHCO₃, a 5%; sc) – inibidor de ciclooxigenase.
3. Cetotifeno (10 mg/kg, diluída em PBS; sc) – estabilizador de membrana em mastócitos.
4. Composto 48/80 (0,6 mg/kg, diluída em PBS, duas vezes ao dia por 3 dias e 1,2 mg/kg, duas vezes no quarto dia; ip) – degranulador de vesículas em mastócitos.
5. Ciproheptadina (2 mg/kg, diluída em PBS; sc) – antagonista dos receptores de histamina (H₁) e serotonina (5-HT_{2A}).
6. Difenidramina (9 mg/kg, diluída em PBS; sc) – antagonista específico de receptor de histamina (H₁).
7. Metergolina (5 mg/kg, diluída em PBS; sc) - antagonista específico de receptor de serotonina.
8. MK 886 (5 mg/kg, diluído em metilcelulose; po) e ácido nordihidroguaiarético (NDGA; 50mg/kg, diluído em etanol; sc) – inibidor de lipoxigenase.
9. Dexametasona (0,5 mg/kg, diluída em PBS; sc) – inibidor de fosfolipase A₂ e da transcrição de RNAm para síntese de citocinas.
10. Meloxicam e celecoxibe (20 mg/kg, diluídos em água destilada; po) – inibidores seletivos de ciclooxigenase-2.
11. Talidomida (50 mg/kg, diluída em PBS; sc) e pentoxifilina (50 mg/kg, diluída em PBS; sc) – inibidores de TNF- α .
12. BN 52021 (20 mg/kg, diluída em PBS; sc) e WEB 2086 (20 mg/kg, diluída em PBS; sc) – antagonista de receptor de PAF.

13. Lidocaína (1,0 mg/kg, diluída em água destilada; il) - bloqueador dos canais de sódio sensíveis à voltagem.

14. Atropina (0,5 mg/kg, diluída em água destilada; ev) – antagonista muscarínico.

4.12.8 Análise estatística

A significância estatística dos experimentos realizados, migração celular na cavidade peritoneal e efeitos secretórios intestinais, foi realizada por análise de variância (ANOVA; complementado pelo teste de Bonferroni). O transporte iônico no modelo de câmara de Üssing foi avaliado pelo Teste t não pareado. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 *Atividade secretória intestinal da toxina da cólera, dos filtrados das cepas não-toxigênicas e toxigênicas e da toxina pura do B. fragilis*

5.1.1 *Atividade secretória intestinal promovida pela toxina da cólera*

A utilização da toxina da cólera (TC), em diferentes doses, promoveu um potente efeito secretor dose-dependente, em alça intestinal ligada de ratos, 18 horas após inoculação (TC_{0,1µg/ml}: 90,1 ± 26,0, n = 14; TC_{0,3µg/ml}: 127,6 ± 18,9, n = 13 e TC_{1,0µg/ml}: 160,6 ± 14,1 µl/cm, n = 14, respectivamente, vs. PBS: 17,2 ± 8,6 µl/cm, n = 14; p < 0,05) (**Figura 8**).

O curso temporal do efeito dessa toxina em promover a secreção foi estudado na dose de 1,0 µg/ml, no período de 6 a 18 horas pós-inoculação. O efeito começou a partir de 10 horas (139,4 ± 29,0 µl/cm, n = 4; p ≤ 0,05) com aumento gradual em 14 e 18 horas (151,2 ± 20,0 e 187 ± 25,0 µl/cm, n = 5, respectivamente, vs. 6 horas: 1,0 ± 0,5 µl/cm, n = 5; p ≤ 0,05) (**Figura 9**).

5.1.2 *Avaliação da participação dos mastócitos na produção de secreção induzida pela toxina da cólera*

A participação dos mastócitos na secreção induzida pela toxina da cólera (TC) foi averiguada com dois grupos de animais: um deles tratado com o composto 48/80 e o outro com cetotifeno. Os ratos tratados com o composto 48/80 apresentaram como resultado: 118,1 ± 26,5 µl/cm, n = 21, vs. TC: 213,4 ± 19,1 µl/cm, n = 18; redução de 45% (p ≤ 0,05); os tratados com cetotifeno apresentaram: 102,3 ± 37,3 µl/cm, n = 9, vs. TC: 213,4 ± 19,1 µl/cm, n = 18; redução de 52%, p ≤ 0,05). A redução na resposta secretória foi significativa para os dois tratamentos (p ≤ 0,05), como se observa na **Figura 10**, sugerindo, assim o envolvimento de mastócitos neste evento.

5.1.3 *Participação dos antagonistas dos receptores de histamina e serotonina, na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera*

Como mostra a **Tabela - 6**, a secreção da toxina da cólera em ratos, foi reduzida parcialmente pelo antagonista inespecífico dos receptores da

histamina/serotonina (ciproheptadina: $102,2 \pm 34,3$, $n = 9$ vs. TC: $194,8 \pm 11,3$ $\mu\text{l}/\text{cm}$, $n = 26$; redução de 48%; $p \leq 0,05$) e antagonista dos receptores de histamina (difenidramina: $108,0 \pm 24,3$, $n = 9$ vs. TC: $194,8 \pm 11,3$ $\mu\text{l}/\text{cm}$, $n = 26$; redução de 45%; $p \leq 0,05$). Por outro lado, o antagonista dos receptores da serotonina falhou em inibir este efeito (metergolina: $197,5 \pm 27,1$, $n = 9$ vs. TC: $194,8 \pm 11,3$ $\mu\text{l}/\text{cm}$, $n = 26$).

5.1.4 Participação dos inibidores da fosfolipase A_2 na atividade secretória da toxina da cólera

A dexametasona e a quinacrina, inibidores da fosfolipase A_2 , bloquearam significativamente a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera em ratos (dexametasona: $111,8 \pm 18,0$, $n = 24$, e quinacrina: $127,0 \pm 24,0$ $\mu\text{l}/\text{cm}$, $n = 21$, vs. TC: $194,8 \pm 11,3$ $\mu\text{l}/\text{cm}$, $n = 26$; redução: 43 e 35%, respectivamente; $p \leq 0,05$) (Tabela – 6).

5.1.5 Participação dos inibidores da ciclooxigenase na atividade secretória da toxina da cólera

A indometacina, o meloxicam e o celecoxibe também reduziram a secreção da toxina da cólera em ratos ($34,7 \pm 12,3$, $n = 18$, $57,2 \pm 19,7$, $n = 12$, e $78,0 \pm 26,3$ $\mu\text{l}/\text{cm}$, $n = 9$ vs. TC: $194,8 \pm 11,3$ $\mu\text{l}/\text{cm}$, $n = 26$; redução: 82, 71 e 60%, respectivamente; $p \leq 0,05$) (Tabela – 6).

5.1.6 Participação dos inibidores da lipoxigenase, na atividade secretória da toxina da cólera

O pré-tratamento dos animais com MK 886 e NDGA não bloqueou significativamente a produção da secreção intestinal em ratos (MK 886: $163,0 \pm 34,9$, $n = 15$ e NDGA: $189,1 \pm 28,1$, $n = 15$ $\mu\text{l}/\text{cm}$, vs. TC: $194,8 \pm 11,3$ $\mu\text{l}/\text{cm}$, $n = 26$) (Tabela-6).

5.1.7 Participação dos bloqueadores da síntese de $\text{TNF-}\alpha$, na atividade secretória da toxina da cólera

Os bloqueadores da síntese de $\text{TNF-}\alpha$ reduziram a secreção induzida pela toxina da cólera nos segmentos de alça do intestino delgado ligado de ratos

(pentoxifilina: $74,0 \pm 17,4$, $n = 15$, e talidomida: $109,5 \pm 19,1 \mu\text{l}/\text{cm}$, $n = 15$, vs. TC: $194,8 \pm 11,3 \mu\text{l}/\text{cm}$, $n = 26$; redução: 62 e 44%, respectivamente; $p \leq 0,05$) (Tabela-6).

5.1.8 Participação dos antagonistas de PAF, na atividade secretória da toxina da cólera

Os antagonistas dos receptores de PAF também reduziram a secreção induzida pela toxina da cólera nos segmentos de alça do intestino delgado ligado de ratos (BN 52021: $133,0 \pm 19,9$, $n = 21$ e WEB 2086: $133,4 \pm 23,6 \mu\text{l}/\text{cm}$, $n = 14$, vs. TC: $194,8 \pm 11,3 \mu\text{l}/\text{cm}$, $n = 26$; redução de 32% para ambos; $p \leq 0,05$) (Tabela-6).

5.1.9 Modulação da lidocaína e atropina na atividade secretória da toxina da cólera

O efeito da toxina da cólera ($1,0 \mu\text{g}/\text{ml}$) sobre a secreção intestinal foi reduzido após a inoculação de lidocaína (Lidocaína: $99,5 \pm 38,33$, $n = 12$ vs. TC: $194,8 \pm 11,34$, $n = 26$, bloqueio de 45%, $p \leq 0,05$), em ratos. Por outro lado, a atropina não apresentou efeito sobre a taxa de secreção promovida pela TC (Atropina: $193 \pm 28,39$, $n = 9$ vs. TC: $194,8 \pm 11,34$, $n = 26$) (Figura 11).

5.1.10 Determinação de IL-1 β e de TNF- α na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera

A análise do fluido intestinal dos ratos, injetados com a toxina da cólera ($1,0 \mu\text{g}/\text{ml}$), por ELISA para IL-1 β e TNF- α mostrou que a TC induz a liberação destas citocinas no fluido (IL-1 β : $299,0 \pm 20,0$ vs. PBS: $22,0 \pm 2,0 \text{ pg}/\text{ml}$, $n = 4$; $p \leq 0,05$) e TNF- α : $118,0 \pm 23,0$, $n = 7$, vs. PBS: $22,0 \pm 2,0 \text{ pg}/\text{ml}$, $n = 4$; $p \leq 0,05$) (Figura 12).

5.1.11 Efeito da toxina da cólera sobre o transporte iônico em câmaras de Üssing

Uma vez não sendo encontrado efeito significativo em câmaras de Üssing quando se adicionou os sobrenadantes do cultivo de macrófagos, estimulados pela TC ou TBF, passou-se a utilizar fragmentos de íleo distal de coelho, incubado

por duas horas em toxina da cólera (1 $\mu\text{g/ml}$) + PBS. Nesses experimentos foram observadas alterações significativas no transporte iônico (TC: $111,2 \pm 9,1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; $n = 6$ vs. Ringer controle: $47,8 \pm 5,0 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; $n = 5$, $p \leq 0,05$).

5.1.12 Atividade secretória intestinal dos filtrados das cepas não-toxigênicas, toxigênicas e da toxina pura do *B. fragilis*

No interior das alças intestinais ligadas, injetadas com os filtrados (0,5 ml/alça) das cepas não-toxigênicas (NTBF) e toxigênicas (ETBF), nos tempos utilizados de 8, 12 e 18 h, e com a toxina pura (3 $\mu\text{g/ml}$), no tempo de 18 h, foi encontrado apenas um discreto muco pegajoso e de aspecto sanguinolento. Esse achado sugere o pequeno efeito desse filtrado em promover secreção intestinal em ratos.

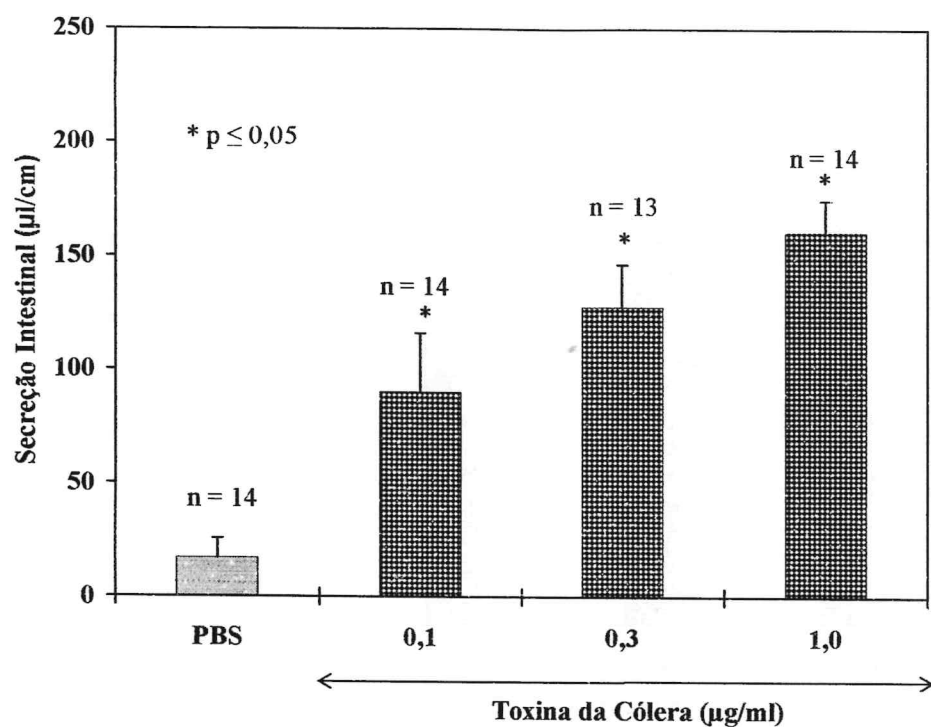


Figura-8. Dose-resposta da secreção induzida pela toxina da cólera em alça intestinal ligada. A toxina da cólera (TC) promoveu uma secreção dose dependente em segmentos ligados do intestino delgado, 18 horas após inoculação. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (complementado pelo teste de Bonferroni). "n" indica o número de segmentos intestinais. * $p \leq 0,05$ para TC (0,1, 0,3 e 1,0 $\mu\text{g/ml}$) vs. PBS (controle).

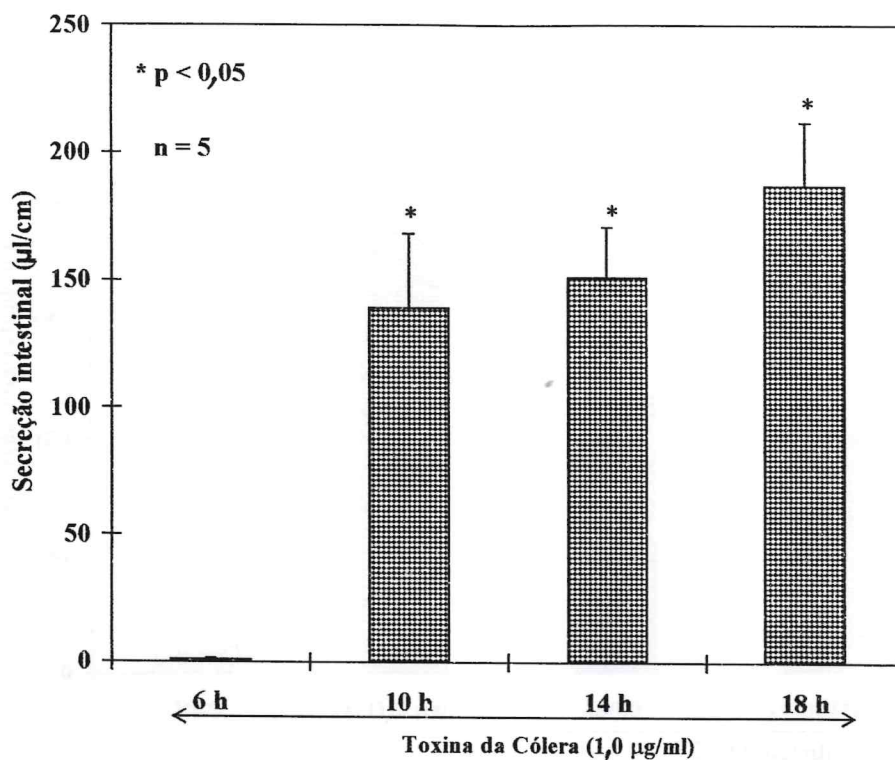


Figura-9. Curso temporal da secreção provocada pela toxina da cólera em segmentos ligados do intestino delgado de ratos. A secreção intestinal induzida pela toxina da cólera (1,0 µg/ml) foi investigada no período compreendido entre 6 e 18 horas pós-inoculação. A secreção começou a partir de 10 h, aumentando em 14 e 18 h. os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (complementado pelo teste de Bonferroni). "n" indica o número de segmentos intestinais. * $p \leq 0,05$ para os tempos de 10, 14 e 18 h vs. 6h.

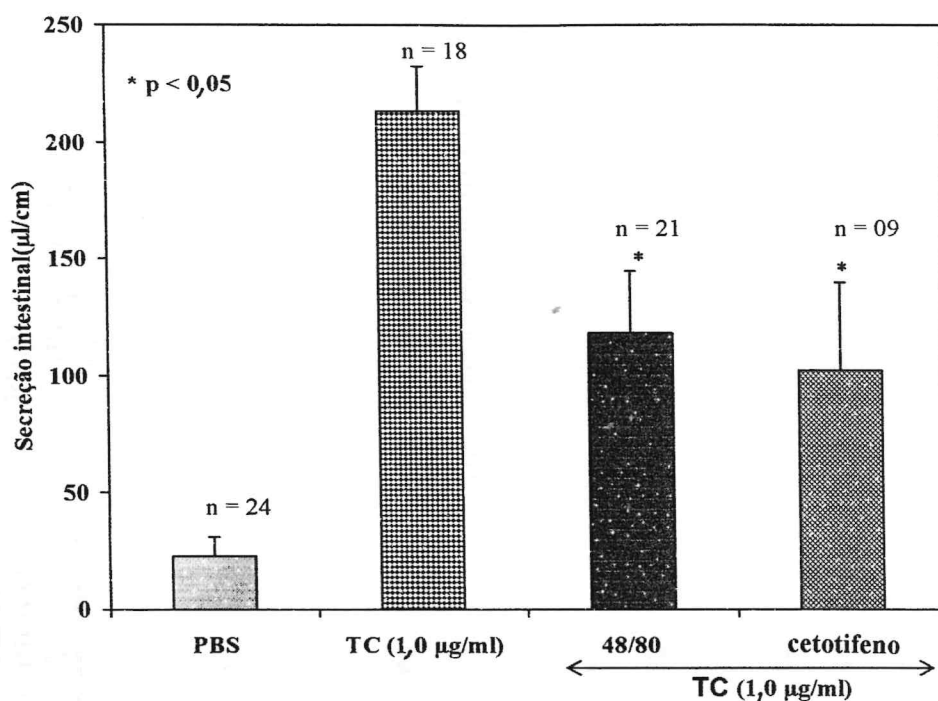


Figura-10. Modulação do composto 48/80 e cetotifeno da secreção induzida pela toxina da cólera em segmentos ligados do intestino delgado de ratos. Ratos pré-tratados com o composto 48/80 (0,6 mg/kg, ip) ou cetotifeno (10 mg/kg, SC) tiveram uma redução significativa na resposta secretória intestinal. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (complementado pelo teste de Bonferroni). “n” indica o número de segmentos intestinais. * $p \leq 0,05$ para pré-tratados com 48/80 ou cetotifeno vs. ratos injetados somente com a toxina da cólera (TC).

Tabela 6: Efeitos dos bloqueadores inflamatórios na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera

Tratamento	*n	Taxa de Secreção (µl/cm) (Média ± **EPM)	Inibição (%)	p	Efeito Farmacológico
PBS (0,5 ml, i.l.)	24	22,9 ± 8,1	-	-	Controle : solução salina tamponada (pH 7,4)
TC (1,0 µg/ml, i.l.)	26	194,8 ± 11,3	-	-	Toxina do <i>Vibrio cholerae</i>
TC + dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.)	24	111,8 ± 18,0	43	≤0,05	Inibidor da fosfolipase A ₂ e síntese de citocinas
TC + quinacrina (20 mg/kg, s.c.)	21	127,0 ± 24,0	35	≤0,05	Inibidor da fosfolipase A ₂
TC + indometacina (2,0 mg/kg, s.c.)	18	34,7 ± 12,3	82	≤0,05	Inibidor mais específico para ciclooxigenase-1
TC + celocoxib (20 mg/kg, v.o.)	09	78,0 ± 26,3	60	≤0,05	Inibidor mais seletivo para ciclooxigenase - 2
TC + meloxicam (20 mg/kg, v.o.)	12	57,2 ± 19,7	71	≤0,05	Inibidor específico da ciclooxigenase - 2
TC + NDGA (50 mg/kg, s.c.)	15	189,1 ± 28,1	#NS	NS	Inibidor duplo para ciclooxigenase e lipoxigenase
TC + MK 886 (5 mg/kg, v.o.)	15	163,0 ± 34,9	NS	NS	Inibidor da lipoxigenase
TC + BN 52021 (20 mg/kg, s.c.)	21	133,0 ± 19,9	32	≤0,05	Antagonista do PAF
TC + WEB 2086(20 mg/kg, s.c.)	14	133,4 ± 23,6	32	≤0,05	Antagonista do PAF
TC + pentoxifilina (50 mg/kg, s.c.)	15	74,0 ± 17,4	62	≤0,05	Inibidor da síntese de TNF-alfa
TC + talidomida (50 mg/kg, s.c.)	15	109,5 ± 19,1	44	≤0,05	Inibidor da síntese de TNF-alfa
TC + ciproheptadina (2 mg/kg, s.c.)	09	102,2 ± 34,3	48	≤0,05	Antagonista dos receptores de histamina e serotonina
TC + difenidramina (9 mg/kg, s.c.)	09	108,0 ± 24,3	45	≤0,05	Antagonista de receptor de histamina
TC + metergolina (5 mg/kg, s.c.)	09	197,0 ± 27,1	-	NS	Antagonista de receptor de serotonina

*n: número de segmentos intestinais

**EPM: erro padrão da média

#NS: não significativo

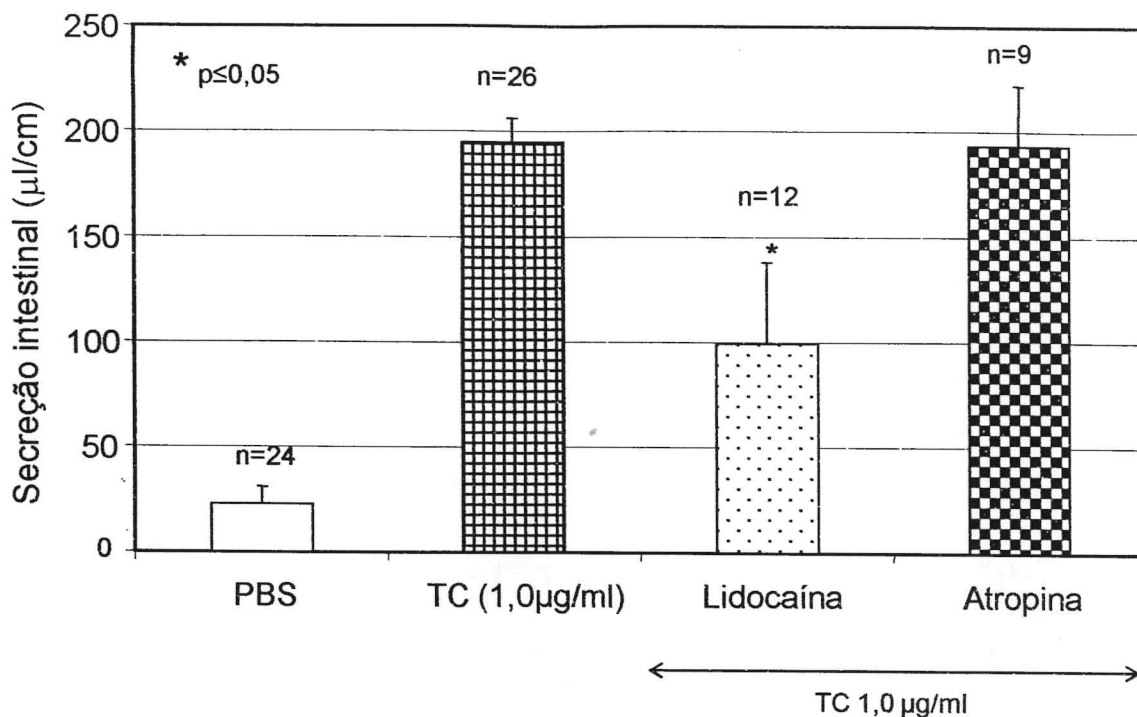


Figura-11. Modulação da lidocaína e atropina sobre a secreção induzida pela toxina da cólera em segmentos ligados do intestino delgado de ratos. Ratos pré-tratados com lidocaína (1,0 mg/kg, il) tiveram uma redução significativa, enquanto a atropina (0,5 mg/kg, ev) não apresentou efeito sobre a secreção intestinal. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (complementado pelo teste de Bonferroni). “n” indica o número de segmentos intestinais. * $p \leq 0,05$ para os ratos pré-tratados com lidocaína vs. os injetados somente com a toxina da cólera (TC).

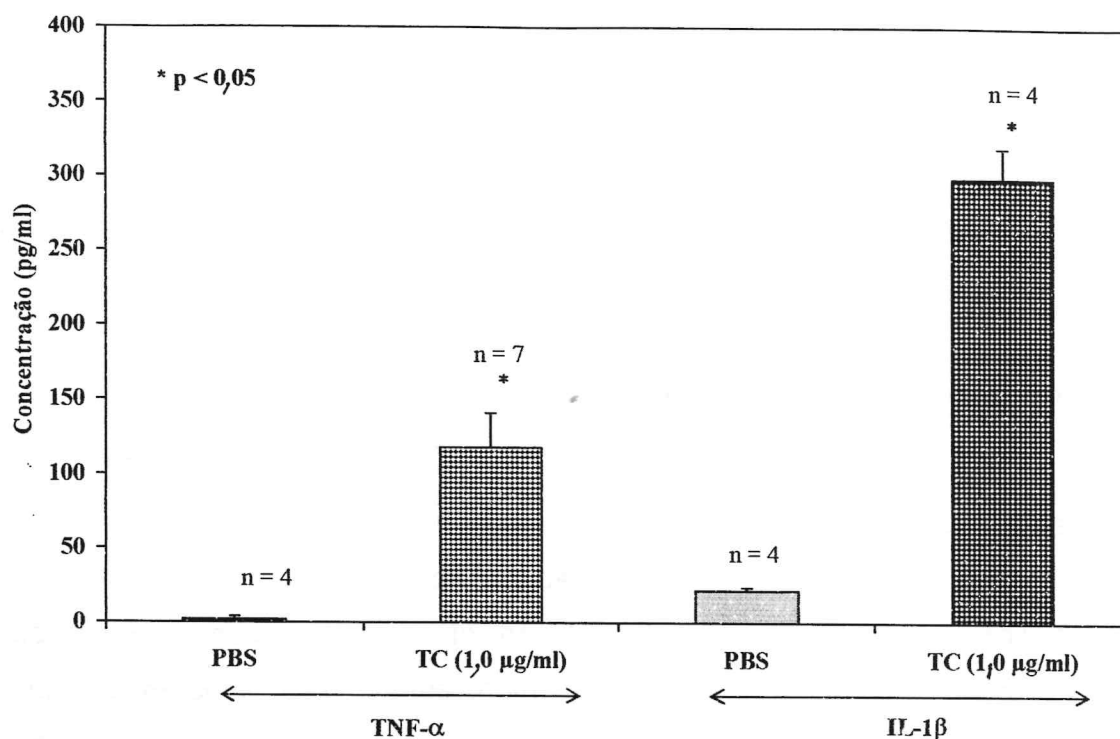


Figura-12. Determinação da concentração de IL-1 β e TNF- α no fluido intestinal, induzida pela toxina da cólera em segmentos ligados do intestino delgado de ratos. A toxina da cólera (TC; 1,0 μ g/ml) induziu a liberação de TNF- α e IL-1 β . Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (complementado pelo teste de Bonferroni). "n" indica o número de dosagens em duplicata. * $p \leq 0,05$ para os níveis de TNF- α e IL-1 β em segmentos intestinais ligados e estimulados com a toxina da cólera (1,0 μ g/ml) vs. seu respectivo PBS (controle).

5.2 Estudo histopatológico

5.2.1 Análise histopatológica do íleo, após 8 12 e 18 horas da inoculação dos controles (PBS e BBL™)

No estudo com os controles (PBS e BBL™) não foram observadas alterações histopatológicas, quanto à integridade estrutural e forma de vilos, criptas, células de Paneth, submucosa e muscular (**Figuras 13A e B**).

5.2.2 Alterações histopatológicas no íleo, após dezoito horas da inoculação da toxina da cólera

As alterações mais marcantes observadas 18 horas após inoculação da toxina da cólera (TC) foram: distúrbios circulatórios de congestão e edema de mucosa e submucosa, além de hemorragia na submucosa. Outros achados incluíram reações das criptas com hipertrofia e inflamação (com infiltrado mononuclear); leves alterações no epitélio superficial dos vilos e, no seu interior, foi notada a presença de um grande número de mastócitos (**Figura 13C e D**).

5.2.3 Alterações histopatológicas no íleo, após dezoito horas da inoculação do sobrenadante de mastócitos estimulados pela toxina da cólera

Utilizou-se o sobrenadante de cultivo de mastócitos, os quais foram estimulados com a toxina da cólera (TC, 1µg/ml). A inoculação deste sobrenadante na alça intestinal, promoveu uma atrofia e achatamento dos vilos, com leve descamação epitelial; proliferação de mastócitos dispersos por toda parede, sendo que um maior número se encontrava na mucosa e submucosa, e em menor quantidade na muscular. Notou-se também, dilatação dos vasos lactíferos com edema no córion (**Figura 13E**).

5.2.4 Alterações histopatológicas no íleo, após oito horas da inoculação dos filtrados dos sobrenadantes das cepas não-toxigênica e toxigência do *B. fragilis*

Não foram observadas alterações histopatológicas com o inóculo do filtrado de sobrenadante das cepas não-toxigênicas (NTBF), quanto à integridade estrutural e forma de vilos, criptas, células de Paneth, submucosa e muscular (**Figura 14A**). Observou-se, contudo, uma ligeira basofilia, principalmente das criptas e células de Paneth, com o início de necrose no tratamento com NTBF, sugerindo um efeito moderado desse tratamento. Contudo, quando o inóculo utilizado foi o filtrado do sobrenadante das cepas toxigênicas (ETBF) observou-se perda da integridade das vilosidades (**Figura 14B**), com degenerações hidrópicas-balonosas dos enterócitos; descamação-esfoliação epitelial; moderada necrose de liquefação nas extremidades e ao longo dos vilos (**Figura 14C**); infiltração mono e polimorfonuclear na submucosa e no interior das vilosidades e um grande número de mastócitos em diferentes estágios de degranulação (**Figura 14D**); e, congestão de vasos.

5.2.5 Alterações histopatológicas no íleo, após doze horas da inoculação dos filtrados dos sobrenadantes das cepas não-toxigênica e toxigência do *B. fragilis*

No tratamento com o inóculo do filtrado do sobrenadante das cepas não-toxigênicas (NTBF), observou-se uma leve congestão na submucosa e do interior dos vilos; indícios de renovação epitelial aumentada (pela maior descamação apical na extremidade vilosa); reatividade segmentar com exarcebação de placas de Peyer e/ou GALT (gut-associated lymphoid tissue), algumas áreas de necrose superficial e ao longo dos vilos; infiltrado mono e polimorfonuclear e hiperplasia de células caliciformes (**Figura 15A**); com o inóculo do filtrado das cepas toxigênicas (ETBF) foi observada uma enterite fibrino-necrótica. Os segmentos intestinais apresentavam-se deteriorados, com extenso conteúdo de muco e células descamadas no lúmen; áreas de descamação freqüentes e necrose superficial; distorção segmentar e perda da arquitetura das vilosidades, com áreas de total

destruição dos vilos e necrose de criptas; infiltrado de mono e polimorfonucleares disperso pela parede intestinal (mucosa, submucosa e muscular); na camada interna da muscular, os núcleos dos miócitos apresentavam-se hipocrômicos (**Figura 15B**). Constatou-se a presença de células longas no interior das vilosidades, com citoplasma fortemente acidófilo e localizadas estrategicamente na superfície vilosa, sugestivas de mastócitos. Em função desses achados, foi feita coloração pelo método de Giemsa para confirmar a presença dessas células. Após a coloração, observou-se um grande número de mastócitos, com granulações características e em diferentes estágios de degranulação. O tempo de 12 horas foi o que apresentou uma melhor definição dos efeitos histopatológicos.

5.2.6 Alterações histopatológicas no íleo, após dezoito horas da inoculação dos filtrados dos sobrenadantes das cepas não-toxigênica e toxigência do *B. fragilis*

Dezoito horas após inoculação do filtrado das cepas toxigências (ETBF), observou-se uma mucosa intensamente afetada, com perda das vilosidades por degeneração e necrose, infiltrado inflamatório de mononucleares, intensa congestão e áreas de hemorragias; distorção da arquitetura de vilosidades e criptas; destruição do estroma dos vilos, das células de Paneth e das glândulas de Lüberkie; edema submucoso e intramural; além de distensão da parede intestinal (**Figura 15D**). No tratamento com NTBF, também foram observadas alterações nos segmentos intestinais, as quais se assemelhavam às encontradas em ETBF, porém com menor intensidade (**Figura 15C**).

5.2.7 Alterações histopatológicas no íleo, após dezoito horas da inoculação da toxina purificada do *B. fragilis*

As alterações observadas 18 horas após inoculação da toxina purificada do *B. fragilis* ocorreram no epitélio de revestimento, com esfoliação e necrose superficial no ápice, parcialmente íntegro, e com intensa proliferação de células caliciformes. Os vilos apresentavam alterações variadas em sua forma e estrutura, como: digitiformes, filiformes, ovalados, em dedo polegar e apontador, em folha. A relação vilo/cripta estava alterada, pois os vilos encontravam-se atrofiados. No

córon detectou-se a presença de mastócitos e proliferação linfocítica no seu interior. Havia dilatação e edema dos vilos, com dilatação marcante de vasos lactíferos. As *criptas* e células de Paneth encontravam-se normais (**Figura 16A e B**).

5.2.8 Alterações histopatológicas no íleo, após dezoito horas da inoculação do sobrenadante de mastócitos estimulados pela toxina do *B. fragilis*

A utilização do sobrenadante de mastócitos, estimulados com a toxina do *B. fragilis* (TBF), na alça intestinal não desenvolveu alteração na arquitetura dos vilos, mas promoveu uma intensa proliferação das células calciformes, alongamentos dos vilos, descamação do epitélio superficial, edema de corion, e presença de mastócitos na mucosa e submucosa (**Figura 16C e D**).

5.2.9 Alterações macroscópicas e histopatológicas em órgãos e tecidos, após 12 horas da inoculação do filtrado do sobrenadante da cepa toxigênica do *B. fragilis*

Após o tratamento com o filtrado do sobrenadante da cepa toxigênica do *B. fragilis* (ETBF), os ratos foram sacrificados e posteriormente necropsiados. Ao exame post mortem, as seguintes alterações foram evidenciadas:

- **macroscópicas** – *coração*: dilatação e hipertrofia unilateral direita; *fígado*: muitas manchas esbranquiçadas e amareladas na superfície que se aprofundavam ao corte. Nos demais órgãos examinados (pulmão, pâncreas, rins, estômago, cérebro, cerebelo, bulbo, pâncreas e intestino) não foram observadas alterações macroscópicas.
- **histopatológicas** – *Fígado*: congestão passiva e dilatação de sinusoides, em padrão de noz-moscada a partir da veia centro-lobular; degeneração em vários graus (tumeção turva) e necrose mista (coagulação e liquefação) (**Figura 17A e B**); *Coração*: necrose liquefativa do miocárdio, atrofia de fibras com acentuada diferença de tamanho, além de edema intersticial (**Figura 17C**); *Rim*: focos de atrofia e destruição glomerular acompanhados de necrose e destruição intensa

dos túbulos proximais; os túbulos distais apresentaram-se intensamente dilatados (aumento do lúmen tubular) e congestão peri-tubular (**Figura 17D e E**); *Cérebro*: alterações citoplasmáticas de ordem degenerativa e necrótica, proliferação de oligodendrócitos e moderada vacuolização de neurófilos (**Figura 17F**).

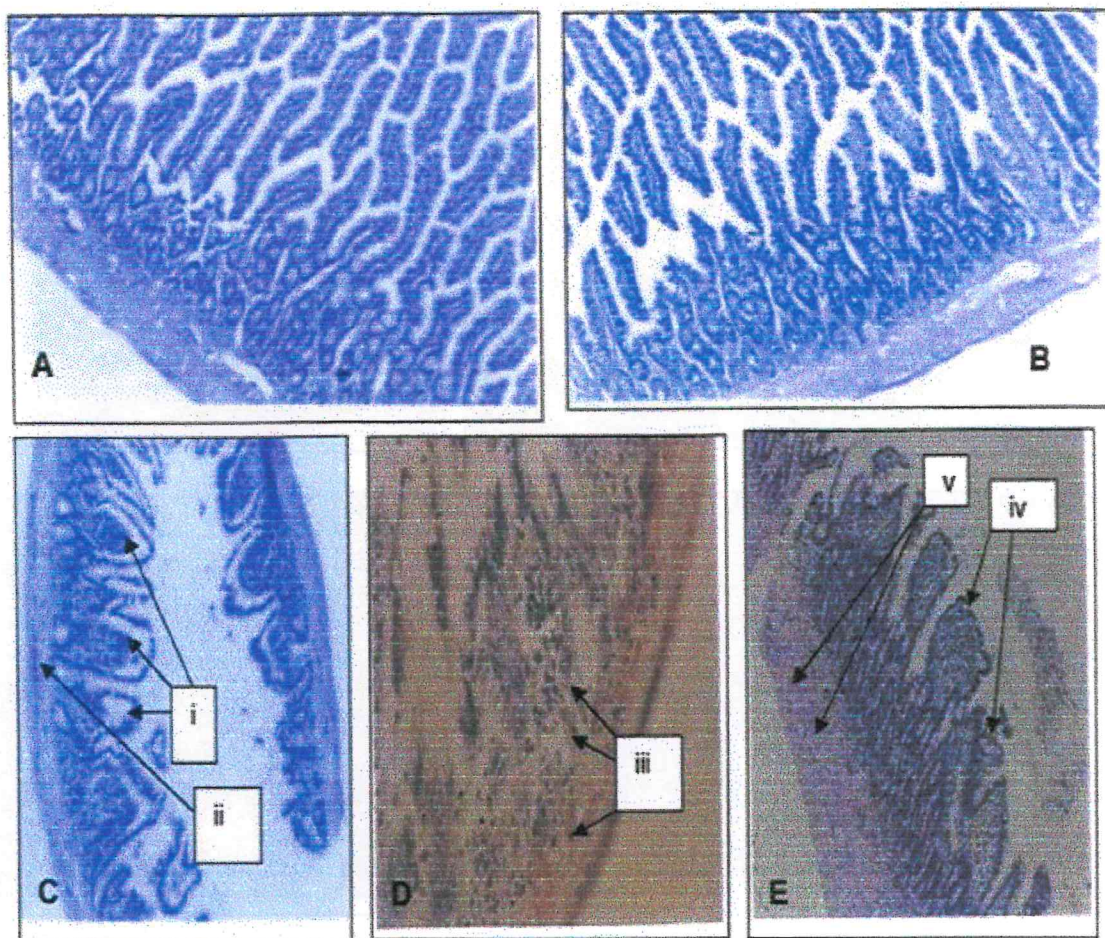


Figura 13. Micrografias de íleo distal de ratos controle e tratados com toxina da cólera (1 $\mu\text{g/ml}$) e sobrenadante de mastócitos estimulados com a toxina da cólera (1 $\mu\text{g/ml}$), em cada alça intestinal ligada, após 18h. A. Tratamento realizado com PBS (coloração H-E; aumento de 100X) e B. Tratamento realizado com BBL™ (coloração H-E; aumento de 100X), onde se observam todas as estruturas histológicas preservadas em secção oblíqua; C. Tratamento realizado com a toxina da cólera (coloração H-E; aumento de 100X), observando-se em secções transversais do íleo, distúrbios circulatórios com congestão e edema de mucosa (i), além de hemorragia de submucosa (ii); D. Tratamento realizado com a toxina da cólera (coloração Giemsa; aumento de 400X) em que se observa um grande número de mastócitos (iii); E. Tratamento realizado com o sobrenadante de mastócitos (coloração Giemsa; aumento de 100X), onde se observa atrofia e achatamento de vilos (iv), além de inúmeros mastócitos (v).

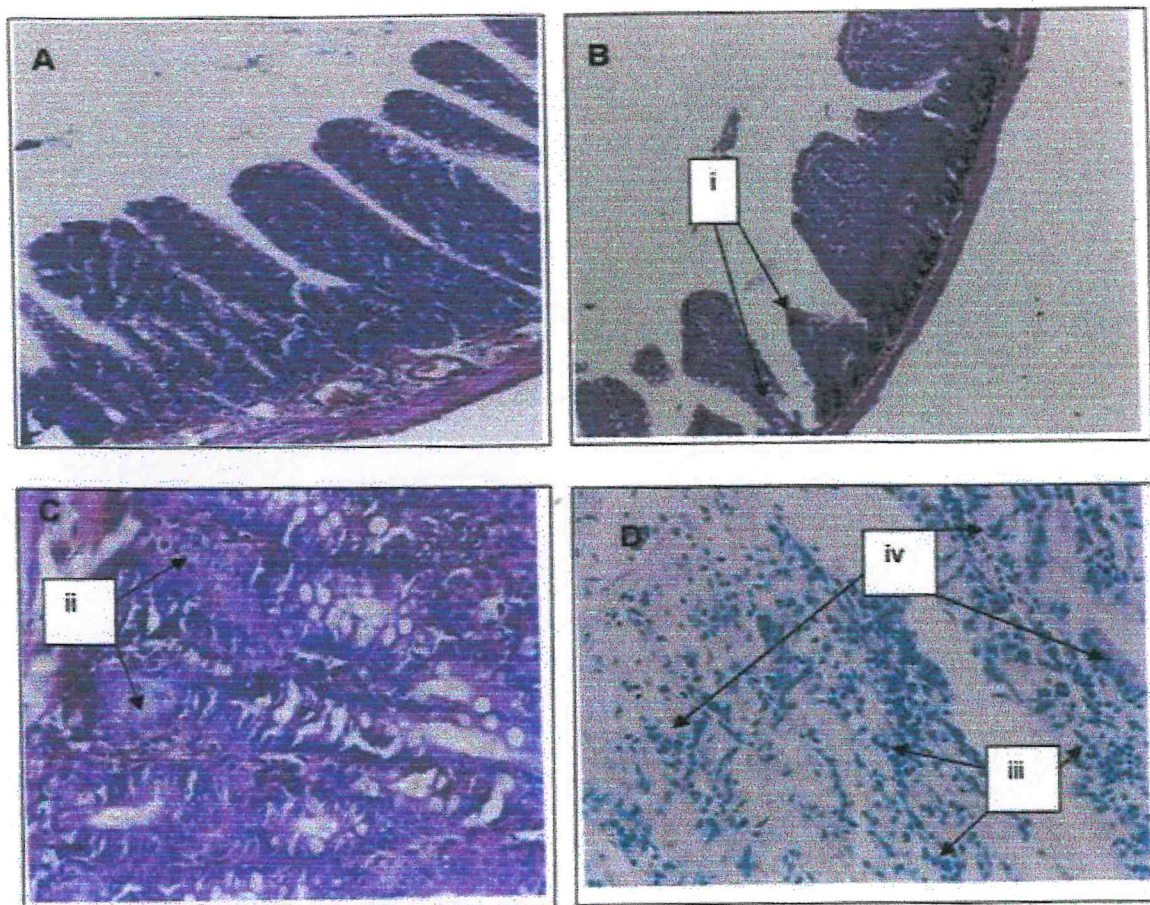


Figura 14. Micrografias de ileo distal de ratos tratado com filtrado do sobrenadante da cultura de duas cepas, uma não-toxigênica e outra toxigênica, do *Bacteroides fragilis* em alça intestinal ligada, após 8 e 12 horas. A. Os indivíduos tratados com o filtrado da cepa não-toxigênica (NTBF), no tempo de 8h (coloração H-E; aumento de 100X), apresentaram-se sem alterações nas estruturas e formas dos vilos, células de Paneth, submucosa e muscular; **B.** O tratamento com filtrado da cepa toxigênica (ETBF), no tempo de 8h (coloração H-E; aumento de 100X), promoveu perda da integridade dos vilos, com achatamento (i), e **C. Necrose moderada** (ii) (coloração H-E; aumento de 400X); e **D. No tratamento com** o filtrado da ETBF, 12h (coloração Giemsa; aumento de 400X), observa-se um infiltrado de mono e polimorfonucleares (iii), além de mastócitos em grande número e em diferentes estágios de degranulação (iv).

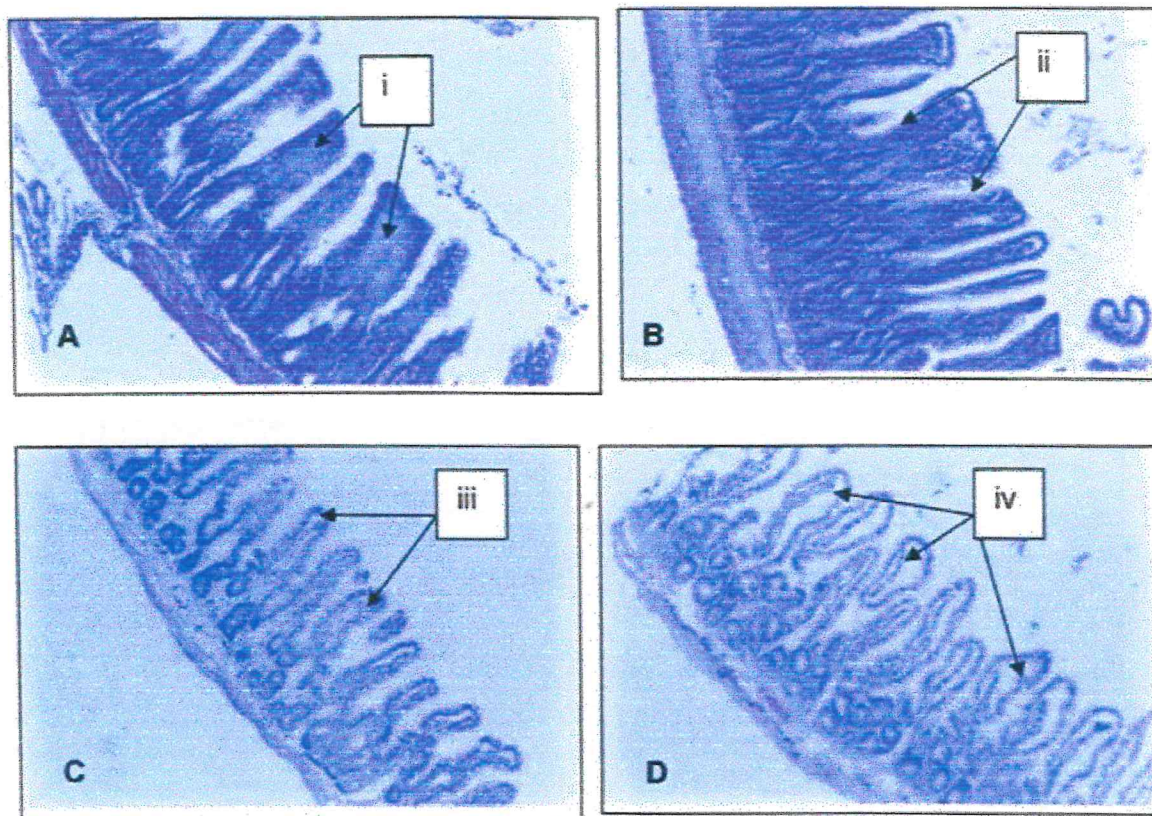


Figura 15. Micrografias de íleo distal de ratos tratados com filtrado do sobrenadante da cultura de duas cepas, uma não-toxigênica e outra toxigênica, do *Bacteroides fragilis* em cada alça intestinal ligada, após 12 e 18 horas. A. Os indivíduos tratados com o filtrado da cepa não-toxigênica (NTBF), no tempo de 12h (coloração H-E; aumento de 100X), apresentaram necrose superficial e no interior das vilosidades (i), com infiltrado de mono e polimorfonucleares; **B.** O tratamento com filtrado da cepa toxigênica (ETBF), no tempo de 12h (coloração H-E; aumento de 100X), promoveu enterite fobrina-necrótica, com descamação de células e início de perda da arquitetura das vilosidades (ii); **C.** O filtrado de NTBF, 18h (coloração H-E; aumento de 100X) e **D.** o da ETBF, 18h (coloração H-E; aumento de 100X), promoveram um efeito lesivo mais pronunciado, com degeneração e necrose epitelial, intensa congestão com áreas de hemorragias e destruição do estroma dos vilos (córion). A destruição do córion foi menos (iii) ou mais intensa (iv) em relação direta com a natureza do estímulo (NTBF e ETBF).

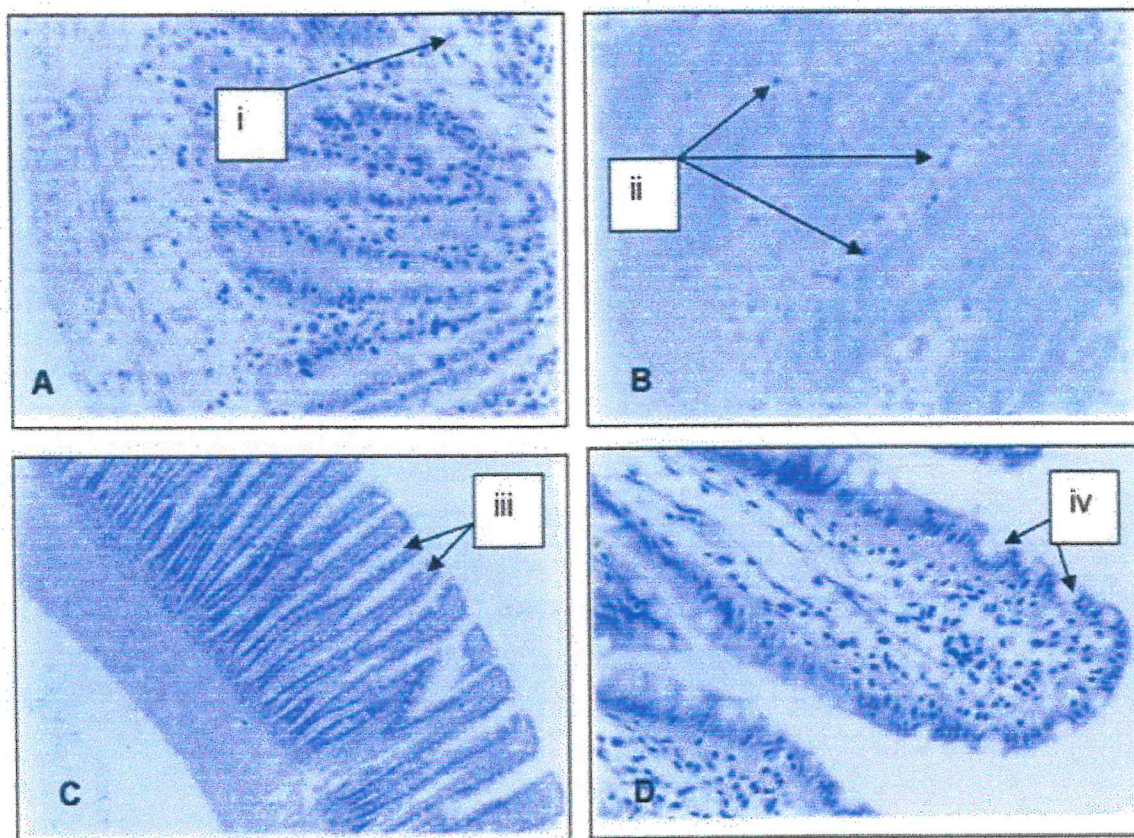


Figura 16. Micrografias de íleo distal de ratos, tratados com toxina purificada do *Bacteroides fragilis* (3 μ g/ml) e do sobrenadante de mastócitos estimulados com esta toxina, em alça intestinal ligada, após 18 horas. A. A toxina purificada do *B. fragilis* (TBF) promoveu uma esfoliação do epitélio de revestimento e necrose apical (coloração H-E; aumento de 400X), vistos em (i); B. O tratamento com TBF promoveu uma intensa migração de mastócitos, vistos em (ii) (coloração Giemsa; aumento de 400X). O sobrenadante da cultura de mastócitos promoveu um alongamento dos vilos (iii) com relativa integralidade do epitélio superficial, observados em C (coloração H-E; aumento de 100X), e uma intensa proliferação das células caliciformes (iv), uma intensa proliferação das células caliciformes (iv) (D: coloração H-E; aumento de 400X).

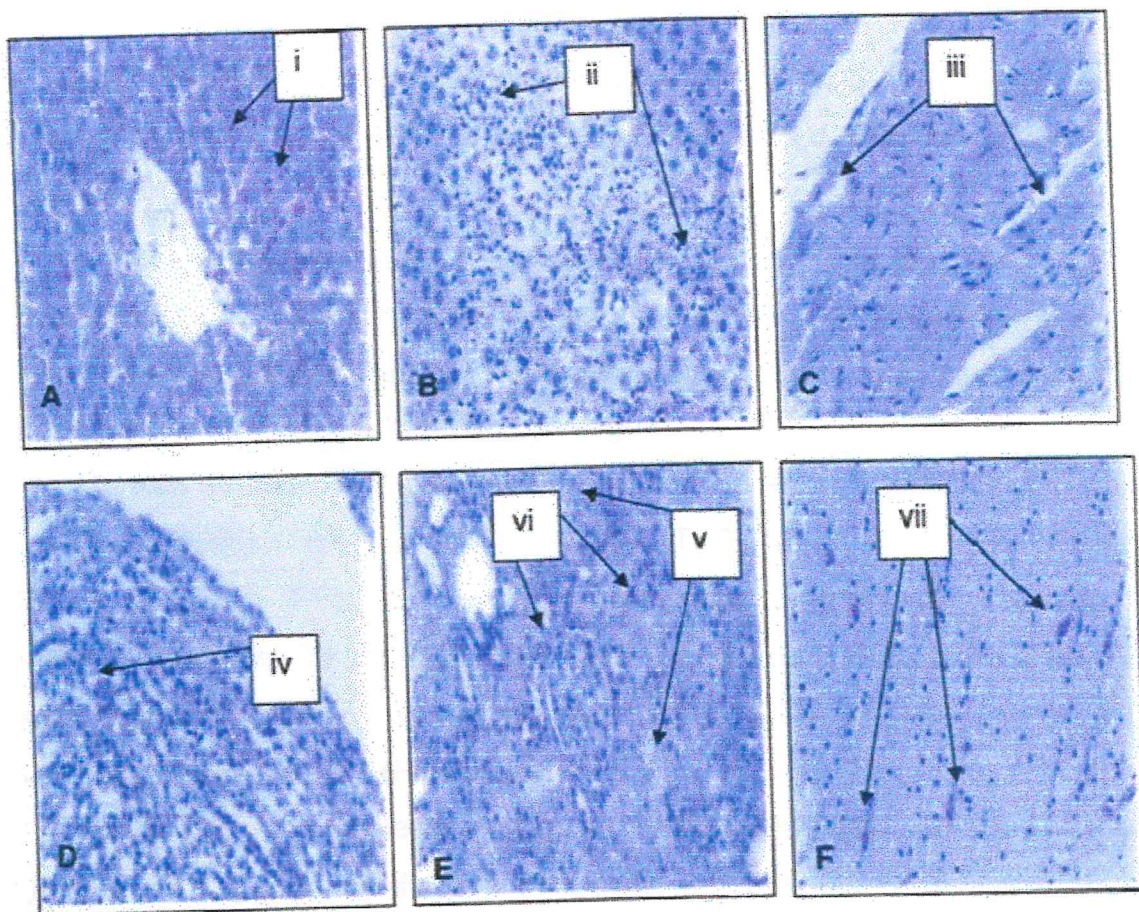


Figura 17. Micrografias de órgãos de ratos tratados com filtrado do sobrenadante da cultura de uma cepa toxigênica do *Bacteroides fragilis* em alça intestinal ligada, após 12 horas da inoculação. No fígado foram encontradas uma congestão passiva e dilatação de sinusoides (i), com degeneração em vários graus, necrose mista e infiltrado inflamatório (ii) como se observa em A. e B. (coloração H-E; aumento de 100X); C. Miocárdio com necrose liquefativa, atrofia de fibras e edema intersticial (iii) (coloração H-E; aumento de 100X). No rim houve predomínio de lesão cortical, sendo encontrados focos de atrofia e destruição glomerular ou mesmo ausência de glomérulos (iv), acompanhados de necrose (v) e destruição intensa dos túbulos contorcidos proximais e distais (vi), como se observa em D e E (coloração H-E; aumento de 100X); F. Cérebro: alterações citoplasmáticas de ordem degenerativa e necrótica, além de proliferação de oligodendrócitos (vii) (coloração H-E; aumento de 100X).

5.3 Migração celular induzida pela toxina do *B. fragilis*

5.3.1 Indução da migração celular pela toxina do *B. fragilis* nas doses de 1, 3 e 10 µg/ml, após 4 horas da inoculação: curva dose-efeito da toxina do *B. fragilis*

A inoculação da toxina do *B. fragilis* (1, 3 e 10 µg/ml) na cavidade peritoneal de ratos induziu a migração celular de maneira significativa, dependendo do tipo celular envolvido a saber: de neutrófilos, mononucleares, eosinófilos e mastócitos, conforme pode ser observado no que se segue:

Com os neutrófilos não houve migração de maneira significativa em relação ao controle (PBS) (TBF_{1µg/ml}: 1,483 ± 0,259; TBF_{3µg/ml}: 1,0 ± 0,068; TBF_{10µg/ml}: 1,483 ± 0,259 vs. PBS: 1,1 ± 0,169 neutrófilos x 10⁶/ml, n = 6), mas foi significativa, ao nível de p < 0,01, quando se considerou a toxina A do *Clostridium difficile* (controle positivo, 0,1 µg/ml, TxA: 3,3 ± 0,596 vs. PBS: 1,1 ± 0,169 neutrófilos x 10⁶/ml, n = 6) (**Figura 18**).

As células mononucleares ao serem estimuladas pela TBF, também não migraram de maneira significativa (TBF_{1µg/ml}: 3,033 ± 0,436; TBF_{3µg/ml}: 2,75 ± 0,303; TBF_{10µg/ml}: 2,5 ± 0,353 e TxA: 2,067 ± 0,199 vs. PBS: 2,383 ± 0,383 mononucleares x 10⁶/ml, n = 6), como se observa na **Figura 19**.

Por outro lado, com os eosinófilos observa-se uma tendência no seu crescimento quando se aumenta a concentração da dose de TBF (TBF_{1µg/ml}: 0,567 ± 0,156; TBF_{3µg/ml}: 0,75 ± 0,085; TBF_{10µg/ml}: 1,15 ± 0,118 e TxA: 0,400 ± 0,058 vs. PBS: 0,367 ± 0,061 eosinófilos x 10⁶/ml, n = 6), mas a migração foi significativa somente na dose 10 µg/ml (p < 0,001) (**Figura 20**).

Os resultados obtidos com os mastócitos (TBF_{1µg/ml}: 0,267 ± 0,033; TBF_{3µg/ml}: 0,450 ± 0,050; TBF_{10µg/ml}: 0,450 ± 0,056 e TxA: 0,283 ± 0,031 vs. PBS: 0,200 ± 0,037 mastócitos x 10⁶/ml, n = 6) observou aumento significativa quando o estímulo (TBF) era de 3 e 10 µg/ml (p < 0,01) (**Figura 21**).

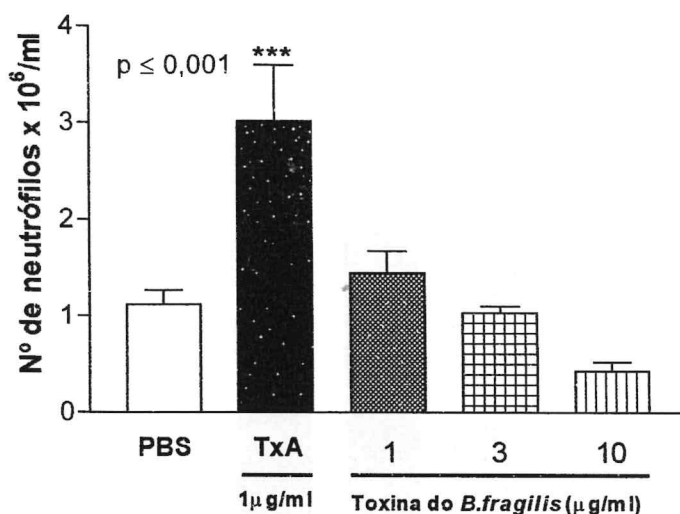


Figura-18. Dose-efeito da migração de neutrófilos induzida pela toxina do *Bacteroides fragilis* (TBF) em cavidade peritoneal de ratos, após 4 horas da inoculação. A TBF não foi capaz de promover a migração celular significativa em nenhuma das doses utilizadas (1,0, 3,0 e 10,0 µg/ml). A toxina A do *Clostridium difficile* (controle positivo; TxA = 1,0 µg/ml) promoveu uma migração intensa de neutrófilos. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (complementado pelo teste de Bonferroni). Em cada um dos experimentos foram utilizados 6 animais. *** $p \leq 0,001$ para TxA (controle positivo) vs. PBS (controle).

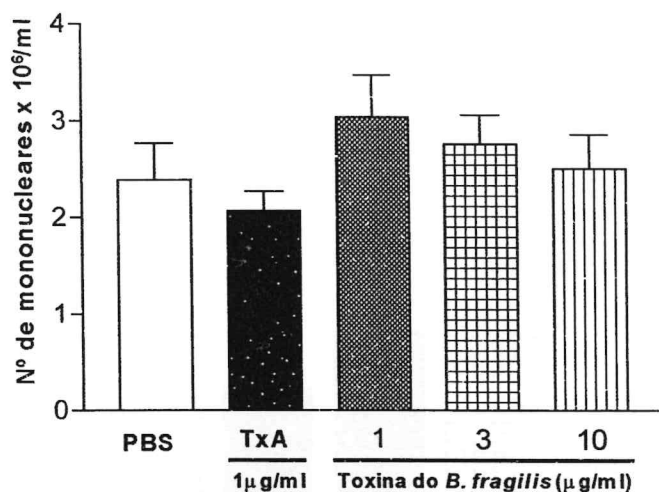


Figura-19. Dose-efeito da migração de mononucleares induzida pela toxina do *Bacteroides fragilis* em cavidade peritoneal de ratos, após 4 horas da inoculação. A toxina do *Bacteroides fragilis* (TBF), a exemplo da toxina A (TxA) (1 µg/ml), não foi capaz de promover a migração celular significativa em nenhuma das doses utilizadas (1,0, 3,0 e 10,0 µg/ml). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (complementado pelo teste de Bonferroni). Em cada um dos experimentos foram utilizados 6 animais. A TxA foi utilizada como controle positivo.

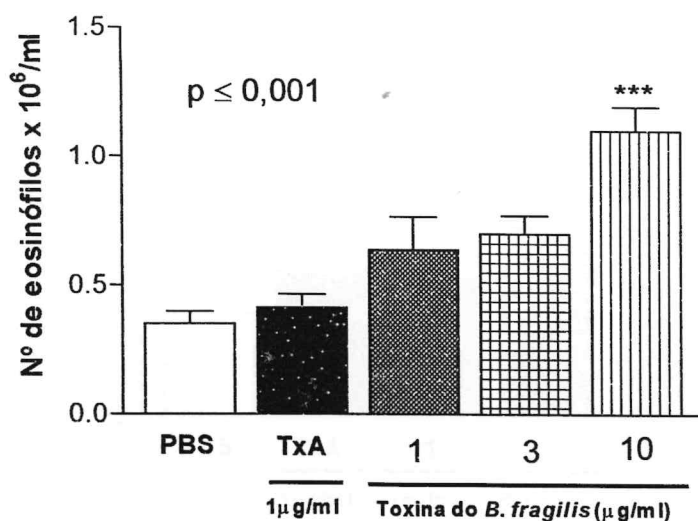


Figura-20. Dose-efeito da migração de eosinófilos induzida pela toxina do *Bacteroides fragilis* em cavidade peritoneal de ratos, após 4 horas da inoculação. A toxina do *Bacteroides fragilis* (TBF) foi capaz de promover um aumento gradual da migração celular dependente da dose utilizada (1,0, 3,0 e 10,0 µg/ml), sendo altamente significativa em 10,0 µg/ml. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (complementado pelo teste de Bonferroni). Em cada um dos experimentos foram utilizados 6 animais. *** $p \leq 0,001$ para BFT10 vs. PBS (controle).

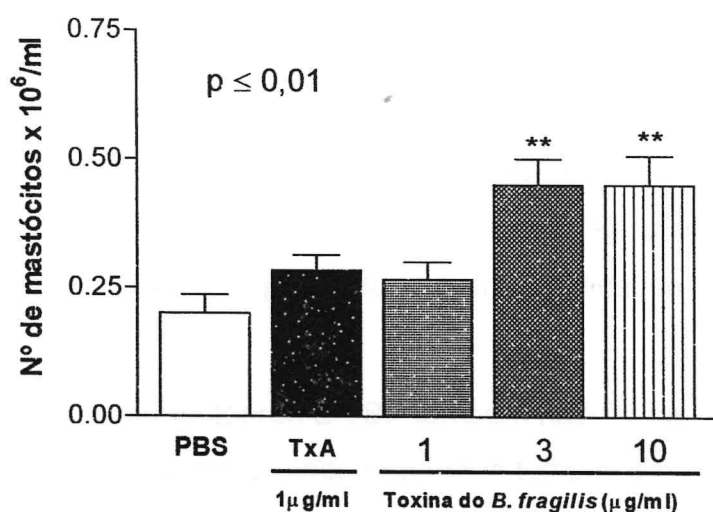


Figura-21. Dose-efeitos induzidos pela toxina do *Bacteroides fragilis* em cavidade peritoneal de ratos promovendo aumento de mastócitos, após 4 horas da inoculação. A toxina do *Bacteroides fragilis* (TBF) promoveu um aumento celular significativo somente nas doses de 3,0 e 10,0 µg/ml. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (teste de Bonferroni). Em cada um dos experimentos foram utilizados 6 animais. **p ≤ 0,01 para BFT3 e BFT10 vs. PBS (controle).

5.3.2 Indução da migração celular pela toxina do *B. fragilis* na dose de 3 µg/ml, após 2, 4 e 8 horas da inoculação: curva tempo-efeito da toxina do *B. fragilis*

A inoculação da toxina do *B. fragilis* (3 µg/ml) nos tempos de 2, 4 e 8 horas, na cavidade peritoneal de ratos, induziu migração de maneira significativa, dependendo do tipo celular e do tempo, conforme pode ser observado abaixo:

Os resultados da migração de neutrófilos induzida pela TBF nos tempos de 2 horas (TBF_{3µg/ml}: 1,617 ± 0,250 vs. PBS: 1,333 ± 0,251 neutrófilos x 10⁶/ml, n = 6), 4 horas (TBF_{3µg/ml}: 1,000 ± 0,169 vs. PBS: 1,100 ± 0,169 neutrófilos x 10⁶/ml, n = 6) e 8 horas (TBF_{3µg/ml}: 1,717 ± 0,114 vs. PBS: 1,283 ± 0,164 10⁶/ml, n = 6) não apresentaram diferenças significativas em relação ao PBS. A TxA (TxA: 3,300 ± 0,596 vs. PBS: 1,100 ± 0,169 neutrófilos x 10⁶/ml, n = 6), utilizada no tempo de 4 horas como controle positivo, apresentou efeito significativo (p < 0,001) (**Figura 22**).

Com células mononucleares a TBF também não foi capaz de estimular sua migração de maneira significativa, nos diferentes tempos considerados de 2 horas (TBF_{3µg/ml}: 1,383 ± 0,095 vs. PBS: 1,483 ± 0,240 mononucleares x 10⁶/ml, n = 6), 4 horas (TBF_{3µg/ml}: 2,750 ± 0,303; vs. PBS: 2,383 ± 0,383 mononucleares x 10⁶/ml, n = 6) e 8 horas (TBF_{3µg/ml}: 3,250 ± 0,345 vs. PBS: 2,083 ± 0,271 10⁶/ml, n = 6). A TxA (TxA: 2,067 ± 0,199 vs. PBS: 2,383 ± 0,383 mononucleares x 10⁶/ml, n = 6), utilizada no tempo de 4 horas como controle positivo, não apresentou efeito significativo, como se observa na **Figura 23**.

Por outro lado, com os eosinófilos observa-se uma tendência no crescimento de seu número, com o passar do tempo, em 2 horas (TBF_{3µg/ml}: 0,367 ± 0,061 vs. PBS: 0,317 ± 0,065 eosinófilos x 10⁶/ml, n = 6), e sendo significativa em 4 horas (TBF_{3µg/ml}: 0,750 ± 0,157 vs. PBS: 0,367 ± 0,126 eosinófilos x 10⁶/ml, n = 6, p < 0,01) e em 8 horas (TBF_{3µg/ml}: 0,800 ± 0,115 vs. PBS: 0,433 ± 0,084 10⁶/ml, n = 6, p < 0,05). A TxA (TxA: 0,400 ± 0,058 vs. PBS: 0,367 ± 0,126 eosinófilos x 10⁶/ml, n = 6), utilizada no tempo de 4 horas como controle positivo, não apresentou efeito significativo (**Figura 24**).

No tocante aos mastócitos, os dados deste trabalho demonstram que no tempo de 4 horas, após a injeção do estímulo, houve um aumento significativo destas células no foco inflamatório (TBF_{3μg/ml}: $0,450 \pm 0,050$ vs. PBS: $0,200 \pm 0,037$ mastócitos x $10^6/ml$, n = 6, p < 0,05).

Por outro lado, quando foram avaliados os tempos de 2 horas (TBF_{3μg/ml}: $0,400 \pm 0,026$ vs. PBS: $0,200 \pm 0,026$ mastócitos x $10^6/ml$, n = 6) e 8 horas (TBF_{3μg/ml}: $0,467 \pm 0,105$ vs. PBS: $0,233 \pm 0,056$ $10^6/ml$, n = 6), apesar de um pequeno aumento no número de células, não foi significativa. A TxA (TxA: $0,283 \pm 0,031$ vs. PBS: $0,200 \pm 0,037$ mastócitos x $10^6/ml$, n = 6), utilizada no tempo de 4 horas como controle positivo, não apresentou efeito significativo (**Figura 25**).

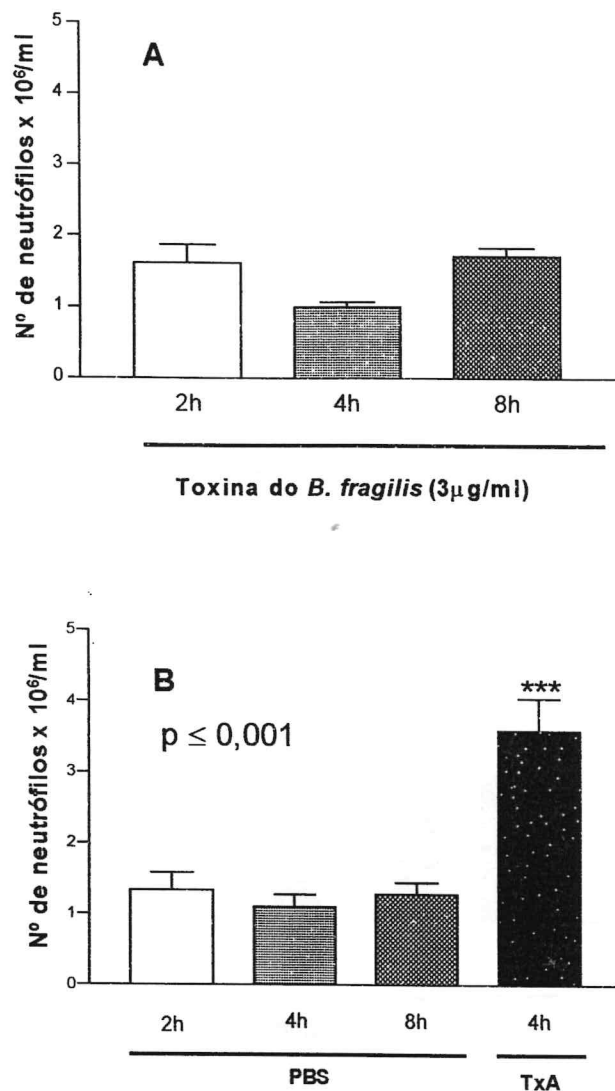


Figura-22. Curso temporal da migração de neutrófilos induzida pela toxina do *Bacteroides fragilis* em cavidade peritoneal de ratos, após 2, 4 e 8 horas da inoculação. A. Observa-se a migração celular de neutrófilos, estimulados pela toxina do *Bacteroides fragilis* (TBF) (3,0 µg/ml), que não foi significativa em nenhum dos tempos utilizados. **B.** Nesta figura observam-se os controles PBS (2, 4 e 8h) e TxA. A toxina A do *Clostridium difficile* (TxA; 1,0 µg/ml) promoveu uma migração intensa de neutrófilos. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (complementado pelo teste de Bonferroni). Em cada um dos experimentos foram utilizados 6 animais. *** $p \leq 0,001$ para TxA (controlé positivo, em 4 h) vs. PBS (controle, 4h).

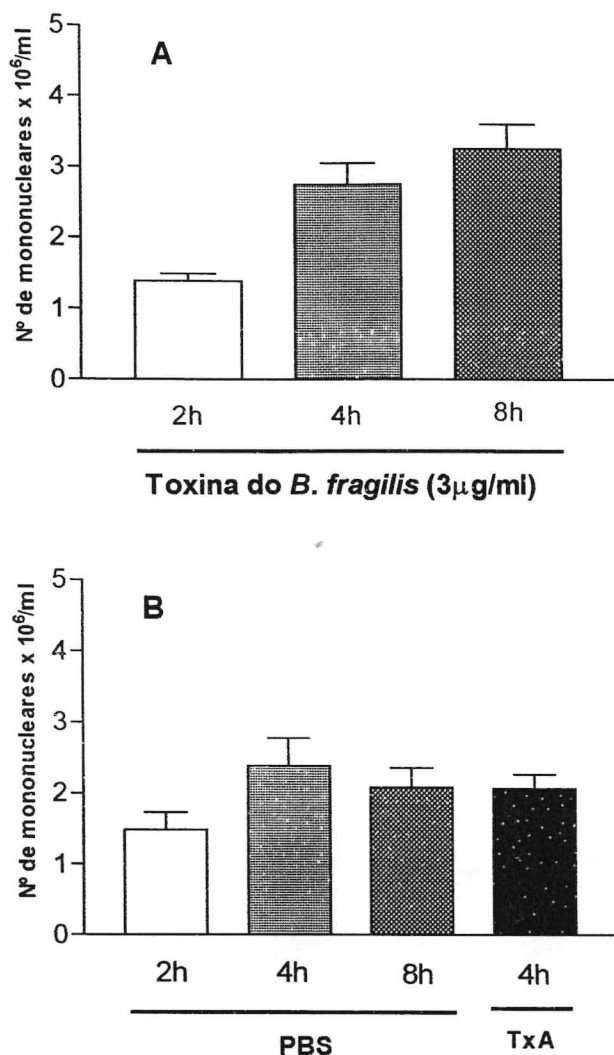


Figura-23. Curso temporal da migração de mononucleares induzida pela toxina do *Bacteroides fragilis* em cavidade peritoneal de ratos, após 2, 4 e 8 horas da inoculação. A. Observa-se a migração celular de mononucleares, após estímulo pela toxina do *Bacteroides fragilis* (TBF) (3,0 µg/ml), que não foi significativa em nenhum dos tempos utilizados. B. Nesta figura observam-se os controles de PBS (2, 4 e 8h) e a toxina A do *Clostridium difficile* (TxA). A TxA (1,0 µg/ml) também não promoveu migração significativa. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (complementado pelo teste de Bonferropi). Em cada um dos experimentos foram utilizados 6 animais. A TxA foi utilizada como controle positivo, somente em 4 horas.

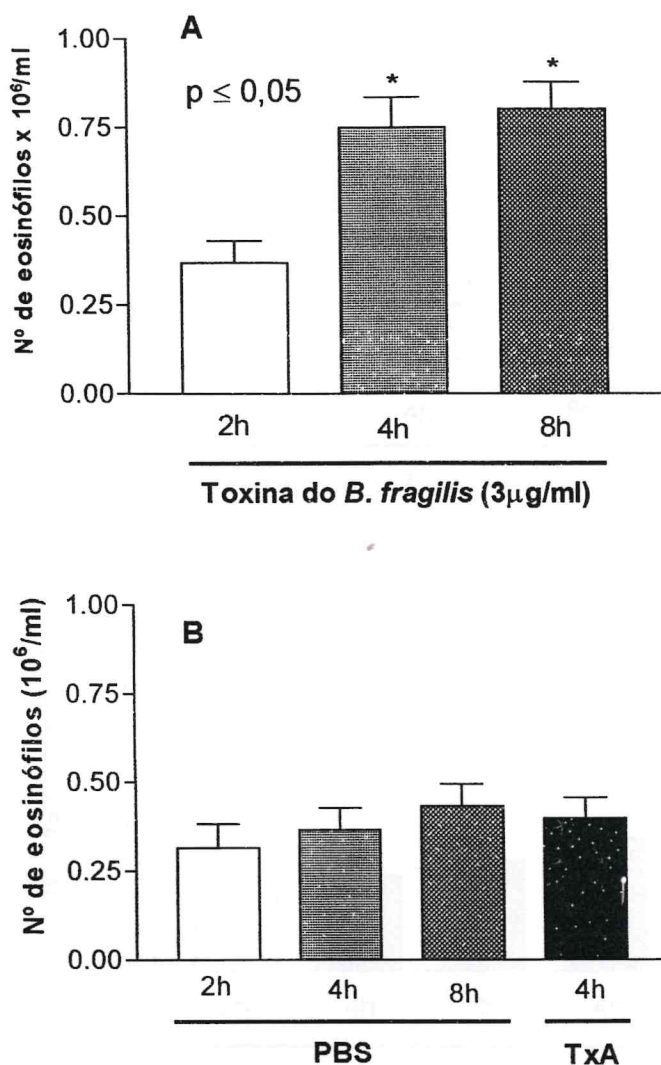


Figura-24. Curso temporal da migração de eosinófilos induzida pela toxina do *Bacteroides fragilis* em cavidade peritoneal de ratos, após 2, 4 e 8 horas da inoculação. **A.** Observa-se a migração celular de eosinófilos, estimulados pela toxina do *Bacteroides fragilis* (TBF) (3,0 µg/ml), que foi significativa nos tempos de 4 e 8 horas. **B.** Nesta figura observam-se os controles de PBS (2, 4 e 8h) e toxina A do *Clostridium difficile* (TxA). A TxA (1,0 µg/ml) não promoveu migração significativa. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (complementado pelo teste de Bonferroni). Em cada um dos experimentos foram utilizados 6 animais. * $p \leq 0,05$ para TBF vs. PBS, em 4h e 8 h. A TxA foi utilizada como controle positivo, somente em 4 horas.

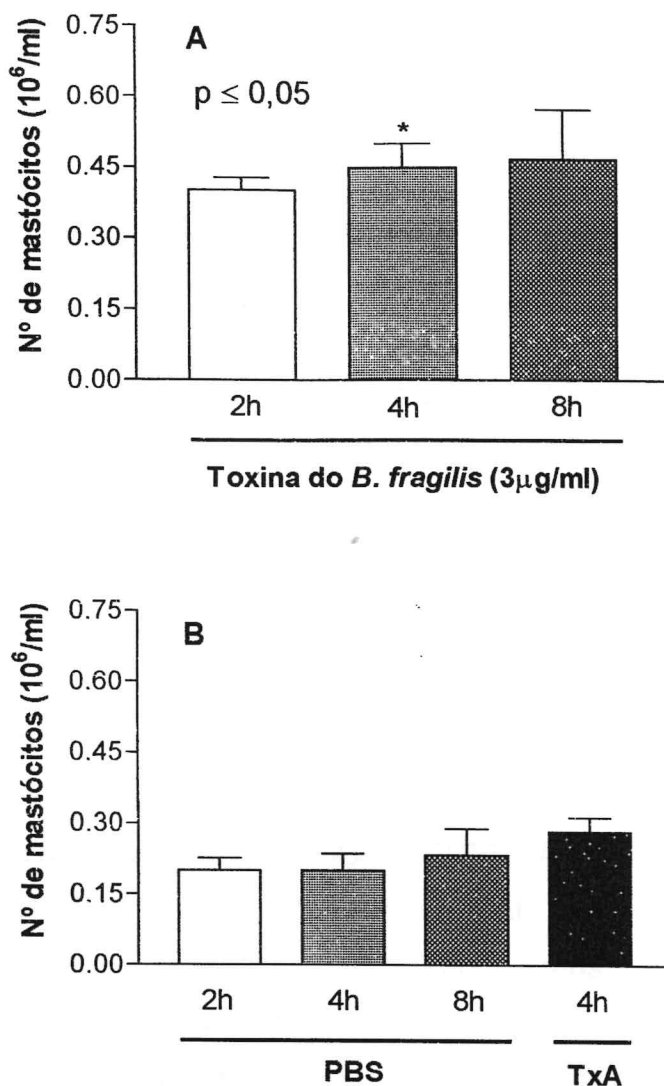


Figura-25. Curso temporal no aumento do número de mastócitos induzida pela toxina do *Bacteroides fragilis* em cavidade peritoneal de ratos, após 2, 4 e 8 horas da inoculação. **A.** Observa-se um aumento no número de mastócitos, provocado pela toxina do *Bacteroides fragilis* (TBF) ($3,0 \mu\text{g/ml}$), que foi significativa no tempo de 4h. Em 8 horas, apesar do aumento destas células, não foi significativo. **B.** Nesta figura observam-se os controles de PBS (2, 4 e 8h) e toxina A do *Clostridium difficile* (TxA). A TxA ($1,0 \mu\text{g/ml}$) não promoveram uma resposta significativa. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média e foram analisados por ANOVA (complementado pelo teste de Bonferroni). Em cada um dos experimentos foram utilizados 6 animais. * $p \leq 0,05$ para TBF vs. PBS, em 4h. A TxA foi utilizada como controle positivo, somente em 4 horas.

6. DISCUSSÃO

6.1 Aspectos gerais da fisiopatologia da diarreia causada por *V. cholerae* e *B. fragilis*

Vários estudos têm sido conduzidos no sentido de esclarecer a fisiopatologia da diarreia causada pelo *V. cholerae* e *B. fragilis*. Contudo, muitos aspectos dos efeitos enterotóxicos das toxinas produzidas por esses microrganismos ainda não foram esclarecidos (MYERS *et al.*, 1984; BORDER *et al.*, 1985; MYERS *et al.*, 1985; MYERS; SHOP, 1987; MYERS *et al.*, 1987; COLLINS *et al.*, 1989; BOBAK; GUERRANT, 1992; SACK *et al.*, 1994; OBISO *et al.*, 1995; SEARS; KAPER, 1996; SANFÍLIPO *et al.*, 2000).

A literatura relata que o *V. cholerae*, através de suas toxinas, produz uma diarreia secretória. Essa diarreia, não-inflamatória, acomete usualmente o intestino delgado e em geral é provocada por vírus, protozoários ou bactérias produtoras de enterotoxinas, como o *V. cholerae*, por exemplo. Essa diarreia tende a ser aquosa, com graus variáveis de severidade (BOBAK; GUERRANT, 1992; SEARS; KAPER, 1996). Como principais agentes causadores deste tipo de diarreia, estão *V. cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* enterotoxigênica. Tais microrganismos aderem ao epitélio do intestino, mas não o rompem nem o lesam significativamente. Assim, não promovem uma destruição comprometedora da mucosa intestinal, nem induzem a presença de leucócitos nas fezes (AVERY *et al.*, 1992; BOBAK; GUERRANT, 1992). Contudo, paradoxalmente, alguns trabalhos demonstram que a TC é capaz de estimular a síntese de prostaglandinas (BEUBLER; HORINA, 1990; PETERSON *et al.*, 1994; PETERSON; WHIPP, 1995), ativar plaquetas (GUERRANT *et al.*, 1994), induzir células enterocromafins a liberar serotonina (PETERSON *et al.*, 1994; PETERSON; WHIPP, 1995) e estimular a síntese de citocinas pró-inflamatória (McGEE *et al.*, 1993). Ademais, têm-se observado altos níveis de lactoferrina nas fezes de indivíduos infectados com a vacina do *V. cholerae* (SILVA *et al.*, 1996). A lactoferrina é considerada um importante marcador para polimorfonucleares neutrófilos.

Por outro lado, o *B. fragilis* tem sido implicado como um agente causador de diarreia secretória em algumas espécies (MYERS, *et al.*, 1984; 1985; OBISO *et al.*, 1995; SEARS *et al.*, 1995) e diarreia inflamatória em outras (OBISO *et al.*, 1995; SANFILLIPO *et al.*, 2000). Esse tipo de diarreia acomete, mais frequentemente, a parte distal do intestino delgado e cólon, e pode ser causada por microrganismos invasivos como a *Salmonella sp*, *Shigella sp* e *Campylobacter sp*, ou por agentes que elaboram toxinas lesivas para o tecido, tais como: *Clostridium difficile* e *Escherichia coli* enterohemorrágica. Estes microrganismos, geralmente, promovem uma destruição do revestimento mucoso do intestino com o consequente aparecimento de sangue, serosidade e leucócitos nas fezes (BARRET, 1992; GUERRANT, 1994; SEARS; KAPER, 1996). Com relação ao *B. fragilis*, segundo Weikel *et al.* (1992), a patogenicidade é variável para vários tipos de diferentes cepas encontradas. Alguns fatores, como cápsula, fímbrias, proteínas da membrana externa, lipopolissacarídeos, enzimas e metabólitos, podem ser as causas da virulência (ONDERDONK *et al.*, 1977; ROTSTEIN *et al.*, 1985; ZALEZNIK *et al.*, 1986; HOFSTAT, 1992). Trabalhos recentes destacam três cepas toxigênicas de *B. fragilis* (MONCRIEF *et al.*, 1995; FRANCO *et al.*, 1997; KLING *et al.*, 1997). A ação toxigênica intestinal desse microrganismo, por infecção natural, inclui diferentes espécies animais (MYERS, *et al.*, 1985; MYERS; SHOOP, 1987; MYERS, *et al.*, 1987; COLLINS *et al.*, 1989); também se observa a infecção do tecido conjuntivo, com formação de abscessos, e bacteremia (SIMON; GORBACH, 1984; PANTOSI *et al.*, 1994; KATO *et al.*, 1995; 1996; 1998; MUNDY; SEARS, 1996). Após infecção pela toxina foi observada, ainda, a indução na síntese de mediadores pró-inflamatórios (WOLTMANN *et al.*, 1999; JYONOUCHI *et al.*, 2000), além de endotoxemia (BENNETT-GUERRERO *et al.*, 2000).

A ação das toxinas entéricas chega a ser problemática, uma vez que pode induzir a secreção de cloreto, via um segundo mensageiro intracelular, estimular o sistema nervoso entérico, formando PAF e/ou prostaglandinas; e, atuando na actina F, pode modificar a organização da estrutura celular. Considerando esses aspectos, Sears; Kaper (1996) agruparam as toxinas em quatro classes: a) *enterotoxinas*, que promovem a secreção em alça intestinal ligada sem evidência

de dano histológico da mucosa; b) *toxinas que alteram o citoesqueleto*, induzindo modificações na forma da célula através de alteração no rearranjo da actina F; c) *citotoxinas*, responsáveis por produzirem dano na célula ou no tecido, muitas vezes, culminando na morte celular, com com esses efeitos danosos podendo estar ou não associados com a secreção; d) *toxinas com atividades neurais*, envolvidas na liberação de um ou mais neurotransmissores do sistema nervoso entérico, e capaz de alterar a atividade do músculo liso intestinal.

No tocante ao *V. cholerae*, apesar da literatura clássica considerá-lo como agente causador de diarreia secretória (BOBAK; GUERRANT, 1992; SEARS; KAPER, 1996), mais recentemente vários trabalhos clínicos e experimentais têm demonstrado que sua etiopatogenia envolve células e mediadores pró-inflamatórios (BEUBLER; HORINA, 1990; McGEE *et al.*, 1993; PETERSON; WHIPP, 1995; QUADRI *et al.*, 2002). Nesta perspectiva, Silva *et al.* (1996), Saha *et al.* (2000), Qadri *et al.* (2002) evidenciaram, em pacientes com cólera, o envolvimento de um possível componente pró-inflamatório. Contudo, são unânimes quanto a necessidade de mais estudos na busca da elucidação do mecanismo inflamatório que participa do processo considerado.

Ratificando esses resultados, em humanos, vários trabalhos experimentais têm demonstrado a importância do componente pró-inflamatório na fisiopatologia dos efeitos enterotóxicos das toxinas do *V. cholerae* envolvendo a participação de prostaglandinas, PAF, citocinas e óxido nítrico (TRIADAFILOPOULOS *et al.*, 1982; PETERSON; OCHOA, 1989; GUERRANT *et al.*, 1994; SEARS; KAPER, 1996; THIELMAN *et al.*, 1997).

Viana *et al.* (2002) observaram recentemente que a toxina da cólera não induz migração de neutrófilos em cavidade peritoneal de ratos. Por conseguinte, os experimentos deste trabalho foram realizados apenas no modelo experimental de secreção intestinal.

Diversos estudos clínicos e experimentais têm sido realizados com o intuito de demonstrar os mais diversos efeitos das toxinas do *B. fragilis* sobre o trato gastrointestinal. Nesse sentido Myers *et al.* (1984), Obiso *et al.* (1995), Mundy; Sears (1996) através do modelo de alça intestinal ligada ou em cultura de células (WEIKEL *et al.*, 1992), demonstraram que a inoculação do sobrenadante e/ou da

toxina pura do *B. fragilis* promovia danos morfológicos, caracterizados por arredondamento das células epiteliais em áreas focais, separando-se umas das outras, chegando a destacar-se até da membrana basal. Em alça intestinal ligada essas alterações envolviam, inclusive, as células epiteliais das criptas. Muitas dessas células destacadas apresentavam, ainda, características de apoptose (SANFILIPPO *et al.*, 1998). Além dos efeitos morfológicos, também foi observada uma infiltração de leucócitos, principalmente de polimorfonucleares neutrófilos (OBISO *et al.*, 1995; DUIMSTRA *et al.*, 1991), e a migração para luz intestinal de linfócitos, macrófagos e eosinófilos após a perda das células epiteliais de superfície (MAHIDA *et al.*, 1997).

Com o intuito de contribuir para um melhor entendimento da fisiopatologia das doenças diarréicas induzidas pelo *V. cholerae* e *B. fragilis*, este estudo fez um paralelo das atividades enterotóxicas e pró-inflamatórias das toxinas produzidas por estes microrganismos, utilizando os seguintes procedimentos: alça intestinal ligada, modulação farmacológica, câmaras de Üssing, ELISA, análise histológica e modelos experimentais de migração celular.

6.2 Retrospectiva de trabalhos desenvolvidos no nosso laboratório

Há 14 anos o nosso laboratório vêm investigando o papel de células do sistema imune na inflamação, imunofisiologia e farmacologia do trato gastrointestinal. Nessa perspectiva, inicialmente, foi demonstrado que a administração de toxina A do *Clostridium difficile*, em alça intestinal de coelho, *in vivo*, provocava uma potente secreção intestinal, semelhante àquela produzida pela toxina do *Vibrio cholerae* (LIMA *et al.*, 1988; LIMA *et al.*, 1989). Evidenciou-se ainda, nestes estudos, um importante infiltrado inicial de células mononucleares na mucosa e submucosa do íleo tratada com toxina A, sugerindo, assim, o envolvimento destas células, em especial macrófagos, na fisiopatologia da diarréia inflamatória provocada pelo *C. difficile*.

Seguindo esta linha de raciocínio, outros pesquisadores, deste mesmo grupo, observaram que a atividade secretória intestinal provocada pela toxina A, vem acompanhada por uma reação inflamatória excessiva, sensível a inibidores de fosfolipase A₂ e ciclooxigenase, bem como, a antagonistas do fator de

agregação plaquetária (FANG *et al.*, 1994; FONTELES *et al.*, 1995). Ratificando, assim, a participação de células inflamatórias nos efeitos deletérios intestinais desta toxina.

A partir dos dados de Lima *et al.* (1988), evidenciando o envolvimento de células mononucleares nos efeitos enterotóxicos da toxina A, foram delineados outros estudos em modelos clássicos de inflamação aguda, como migração de neutrófilos, por exemplo, no sentido de consolidar o papel de células inflamatórias nas atividades biológicas das toxinas A e B do *C. difficile*. Por conseguinte, evidenciou-se que ambas toxinas são indutoras potentes da migração de neutrófilos em cavidade peritoneal e bolsa de ar subcutâneo de rato, através da liberação de fatores quimiotáticos, em especial leucotrieno B₄, IL-1 e TNF- α , por macrófagos residentes (ROCHA *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 1997).

Com a confirmação da relevância dos macrófagos nas atividades biológicas destas toxinas, *in vivo*, resolvemos investigar o potencial destas células *in vitro*. Dessa forma, foi observado que o sobrenadante de macrófagos peritoneis estimulados com toxina A (ROCHA *et al.*, 1998), mas não com toxina B (ROCHA *et al.*, 2001), provocava uma intensa secreção intestinal do íleo de coelho, em câmaras de Üssing; bem como, reduz a absorção de água e eletrólitos, *in vivo*, no modelo de perfusão intestinal em ratos (SANTOS-NETO *et al.*, 1996).

Rocha *et al.* (1998) demonstraram, pelo método de ELISA, que macrófagos estimulados com a toxina A, mas não com a toxina B (ROCHA *et al.*, 2001), liberam interleucina-1 β no sobrenadante da cultura que, por sua vez, é capaz de induzir secreção intestinal em mucosa ileal de coelho, *in vitro*. Evidenciaram, ainda, que a regulação desta citocina é dependente da ativação de uma proteína G, sensível à toxina pertussis. Ademais, prostaglandinas, PAF e TNF- α estão envolvidos nos mecanismos de síntese e liberação de IL-1 β . A atividade secretória desta citocina ocorre de maneira indireta, via síntese de prostaglandinas, por células da lâmina própria intestinal, e ativação do sistema nervoso entérico (ROCHA *et al.*, 1998).

Ademais, em outros estudos avaliamos o efeito do sobrenadante de macrófagos peritoneais estimulados com LPS, toxina do *V. cholerae* e

microcistina (*Microcystis aeruginosa*) no íleo de coelho, em câmara de Üssing. Entretanto, dentre essas toxinas, somente a microcistina foi capaz de estimular a síntese de fatores com propriedade secretória intestinal (ROCHA *et al.*, 2001). Dessa forma, esses resultados forneceram mais um subsídio científico, apontando a importância de macrófagos no efeito secretório intestinal de algumas toxinas.

Os resultados do presente trabalho envolvendo as toxinas do *Vibrio cholerae* e *B. fragilis* ampliam os conhecimentos apresentados anteriormente, quanto as alterações produzidas na mucosa intestinal, secreção e migração de células que fazem parte do processo infeccioso intestinal promovido pelo *Vibrio cholerae* e *B. fragilis*. O estudo focaliza o papel de mastócitos e seus mediadores, em especial: histamina, IL-1 β , TNF- α , prostaglandinas e PAF.

6.3 Efeito secretório da toxina da cólera e do sobrenadante de cultura e da toxina purificada do *Bacteroides fragilis*

Inicialmente foram conduzidos os experimentos de secreção intestinal, *in vivo*, no modelo de alça intestinal ligada em ratos. A toxina da cólera causou uma potente secreção intestinal no modelo de alça intestinal, sendo este efeito dose e tempo-dependentes, com maior atividade no tempo de 18 horas após a inoculação. Quando se considerou três doses diferentes (0,1, 0,3 e 1,0 $\mu\text{g/ml}$), no tempo de 18 horas, observou-se um potente efeito secretor dose-dependente. O curso desse efeito, na produção da secreção, foi obtido com a dose de 1,0 $\mu\text{g/ml}$, no período de 6 a 18 horas após inoculação. A ação da toxina foi significativa a partir de 10 horas do início do experimento, ocorrendo aumentos ainda maiores em 14 e 18 horas, respectivamente. Essas observações caracterizam a TC como uma toxina clássica capaz de promover a produção de secreção no modelo de alça intestinal ligada de rato.

O efeito da toxina da cólera aumentando o transporte iônico no íleo de coelho, em câmara de Üssing, ratifica os resultados, *in vivo*, observados no modelo de alça intestinal isolado, onde demonstrou-se a participação de mastócitos, histamina, prostaglandinas, PAF, IL-1, TNF- α e sistema nervoso entérico. Baseado nestas evidências, sugere-se que essa atividade secretória da

toxina da cólera, *in vitro*, provavelmente ocorre de forma indireta, via participação de células residentes da lâmina própria e sistema nervoso entérico.

Por outro lado, com relação ao *B. fragilis*, Myers *et al.* (1984; 1985; 1987; 1989) e Obiso *et al.* (1995), ao utilizar o filtrado e a TBF, observaram sua capacidade em produzir a secreção intestinal em algumas espécies diferentes de animais. Contudo, Obiso *et al.* (1995) verificaram que em ratos, ocorria menos secreção e mais dano da mucosa. Ademais, Riegler *et al.* (1999) encontraram efeito eletrofisiológico no cólon humano quando adicionou a TBF, tanto no lado seroso quanto no mucoso, sendo um efeito de maior significância no lado seroso. Os resultados mostraram um aumento da PD (diferença de potencial) e I_{sc} (corrente de curto-circuito), enquanto a R (resistência) diminuía, sendo sugestivos de produção de secreção.

Diferentemente do observado por Myers *et al.* (1984; 1985; 1987; 1989) e Riegler *et al.* (1999), *in vitro*, no presente trabalho, *in vivo*, não foi observada secreção de forma significativa, tendo sido evidenciada apenas uma discreta presença de fluido com aspecto muco-sanguinolento e viscoso, também encontrado por Obiso *et al.* (1995). Contudo, clinicamente os animais apresentavam-se letárgicos, progressivamente debilitados, com deficiências de locomoção e alguns chegando até a morte. Alguns trabalhos são concordantes com os dados da presente investigação, quanto a ausência da secreção intestinal, sua natureza muco-sanguinolenta e morte de animais após o referido estímulo (MYERS *et al.*, 1985; 1987; 1989; 1990). Esses efeitos parecendo ser de natureza sistêmica, conforme sugerido por Maeda *et al.* (1993), uma vez que os animais além de apresentarem um estado de prostração, alguns chegavam até morrer. Portanto, estes efeitos não parecem condizentes apenas com uma inflamação local promovida na alça intestinal, e sim com uma abrangência de maior espectro.

6.4 Modulação farmacológica realizada com a indução da toxina da cólera

Os mastócitos, semelhantemente aos macrófagos, são células imunocompetentes encontradas em grande número na submucosa intestinal, que ao serem estimuladas são capazes de produzir diferentes mediadores, como os metabólitos do ácido araquidônico, oxidantes e citocinas. Esses mediadores

podem afetar o epitélio direta ou indiretamente (McKAY; PERDUE, 1993; HERSHKOVITZ *et al.*, 1994; METCALFE *et al.*, 1997; PETERS-GOLDEN, 1998; ROCHA *et al.*, 1998; MEKORI; METCALFE, 2000; ROCHA *et al.*, 2000).

No tratamento de ratos com o composto 48/80, que causa degranulação e diminuição na população de mastócitos (Di ROSA *et al.*, 1971; ROCHA *et al.*, 1997), assim como com o ketotifen, estabilizador da membrana dos mastócitos (GRANT *et al.*, 1990), foram observadas reduções significativas das secreções induzidas pela toxina da cólera, em alça intestinal ligada de rato. Estes experimentos evidenciaram que os mastócitos parecem estar envolvidos na atividade secretória da toxina da cólera. Acredita-se, ainda, que a via dependente dos mastócitos envolve a liberação de mediadores pró-inflamatórios, e assim é capaz de induzir a secreção de fluido das células do epitélio intestinal.

Durante muito tempo os mastócitos foram considerados como células responsáveis, simplesmente, por iniciar reações alérgicas através de liberação rápida de mediadores metabolizados, como histamina e produtos de oxidação do ácido araquidônico (GALLI, 1993). Além dos mastócitos, outras células do sistema imune, podem também ser estimuladas a sintetizar citocinas, tais como IL-1 β e TNF- α , por exemplo. Contudo, somente os mastócitos estocam TNF- α em seus grânulos, que podem liberar imediatamente esses estoques pré-formados, além de sintetizá-los outros mediadores, novamente, logo a seguir (GALLI, 1993). Alguns mediadores derivados dos mastócitos, como as prostaglandinas (CALDERARO *et al.*, 1991), leucotrienos (SMITH *et al.*, 1988), PAF (HANGLOW *et al.*, 1989), histamina (HARDCASTLE; HARDCASTLE, 1987), serotonina (BEUBLER *et al.*, 1986), IL-1 β (CHIOSSONE *et al.*, 1990) e TNF- α (KANDIL *et al.*, 1992) podem induzir a secreção intestinal. Considerando essa abrangência potencial dos possíveis mediadores liberados por mastócitos foi feito um “*screening*” investigativo, buscando determinar se um ou mais desses mediadores pró-inflamatórios, participava do processo de secreção intestinal induzida pela toxina da cólera, *in vivo*.

Quando foram considerados os mastócitos, observou-se uma redução significativa na secreção em alça intestinal isolada de ratos, se os animais eram tratados com o composto 48/80 (promove a degranulação e diminuição da

população de mastócitos) (Di ROSA *et al.*, 1971; ROCHA *et al.*, 1997) ou com ketotifen (estabilizador de mastócitos) (GRANT *et al.*, 1990). Assim, estes experimentos evidenciam que os mastócitos, pelo menos em parte, parecem estar envolvidos na atividade secretora da toxina da cólera. Corroborando com essa idéia, os dados obtidos nos experimentos com toxina da cólera, em câmara de Üssing, tiveram fundamental importância; ou seja, a ausência de efeitos sobre o transporte iônico pode estar relacionada ao número reduzido de células, dentre estas mastócitos, contidas no pequeno fragmento de íleo utilizado nos experimentos.

A quinacrina, inibidor da fosfolipase A_2 , por sua vez, reduziu a secreção induzida pela toxina da cólera parcialmente o que sugere uma provável participação dos metabólitos do ácido araquidônico neste efeito. Esta evidência foi confirmada com a inibição produzida pela dexametasona, que promove bloqueio na transcrição do RNAm de várias citocinas (TNF- α , IL-1, IL-8, etc.) e inibe a atividade da fosfolipase A_2 (BARNES; ADCOCK, 1993). Ademais, inibidores da ciclooxigenase (indometacina, meloxicam e celocoxibe) e antagonistas de receptor de PAF (BN 52021 e WEB 2086) também reduziram a secreção induzida pela toxina da cólera, *in vivo*. Por outro lado, os inibidores preferencial e específico da lipoxigenase, NDGA e MK 886, respectivamente, não apresentaram efeitos significativos sobre a atividade secretória. Assim, esses resultados sugerem que as prostaglandinas e PAF, mais não os leucotrienos, participam da fisiopatologia da secreção intestinal induzida pela toxina da cólera.

Ratificando estes resultados, tem sido descrito que a indução, pela toxina da cólera, de prostaglandinas, fator ativador de plaquetas (PAF) e formação de AMPc estão interrelacionadas (PETERSON; OCHOA, 1989; GUERRANT *et al.*, 1994; SEARS; KAPER, 1996; THIELMAN *et al.*, 1997). Também, ficou evidenciado que a injeção da toxina da cólera purificada, em alça ileal de coelho, causa um aumento significativo na secreção de fluido e na permeabilidade intestinal de manitol, assim como uma liberação de PGE_2 no lúmen; contudo, sem promover efeito sobre a liberação de LTB_4 (TRIADAFILOPOULUS *et al.*, 1989). Em adição, foi demonstrado que a secreção de fluido intestinal em coelho, mediada por *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* e *Vibrio cholerae*, é inibida

pelo tratamento com indometacina, o que sugere o envolvimento dos eicosanóides na resposta secretória (GOTS *et al.*, 1974).

Os metabólitos do ácido araquidônico desempenham um papel significativo na fisiopatologia das diarreias inflamatórias. São encontrados em vários relatos descrições de níveis elevados de eicosanóides, tanto nas diarreias de ocorrência natural, como naquelas produzidas em animais experimentais. Alguns trabalhos demonstram que esses mediadores inflamatórios estimulam a secreção de cloro e água no intestino (McKAY; PERDUE, 1993; EBERHART; DuBOIS, 1995).

Desses eicosanóides, observa-se que as prostaglandinas, em especial, participam do processo da fisiopatologia das doenças inflamatórias intestinais, pois além de induzirem a secreção diretamente, podem intermediar as ações de outros agentes sobre a fisiologia dos enterócitos (BERN *et al.*, 1989; McKAY; PERDUE, 1993; EBERHART; DuBOIS, 1995). Nesse sentido, evidencia-se a importância das prostaglandinas na secreção intestinal quando se adiciona PGE₁ e PGE₂ em alça intestinal de coelho, *in vitro*, resultando num aumento significativo da corrente de curto-circuito, decorrente da secreção de cloreto (RACUSEN *et al.*, 1980), e essa ação sendo bloqueada pela indometacina, um inibidor da ciclooxigenase (SMITH *et al.*, 1991).

Esses efeitos dos eicosanóides também foram demonstrados em preparações de camadas de células T-84, da mucosa intestinal, em câmaras de Üssing (McKAY; PERDUE, 1993), mas que somente a PGE₂ era capaz de promover a secreção. O bloqueio com a indometacina eliminava tanto a síntese de prostaglandinas como a secreção intestinal (CALDERARO *et al.*, 1991). Estas evidências ressaltam e ratificam a importância da participação da enzima ciclooxigenase nesse processo de secreção intestinal.

Outros relatos demonstram, ainda, um aumento na síntese de leucotrienos tanto em animais com inflamação intestinal induzida experimentalmente, como em indivíduos com colite ulcerativa. Smith *et al.* (1988); McKay; Perdue (1993) evidenciaram a participação desses agentes na patogênese das doenças inflamatórias intestinais, com os peptidoleucotrienos, LTC₄, LTD₄ e LTE₄, no lado

seroso da câmara de Üssing induzindo um aumento transiente na corrente de curto-circuito em íleo de coelho ou rato.

Quanto ao LTB₄, tem sido apresentado que esse leucotrieno não participa diretamente do transporte iônico no intestino. No entanto, age como um potente quimioatraente celular, estimulando a migração de neutrófilos para o intestino, provocando, conseqüentemente, a lesão da mucosa (ELTON *et al.*, 1989; McKAY; PERDUE, 1993).

Na tentativa de investigar o possível papel da interleucina-1 β e/ou fator de necrose tumoral α na secreção induzida pela toxina da cólera, foi usado uma modulação farmacológica com a pentoxifilina e a talidomida, que exercem suas ações inibitórias sobre o TNF- α pela degradação de RNAm (MOREIRA *et al.*, 1993). O pré-tratamento dos ratos com pentoxifilina e talidomida resultou em inibição parcial do efeito intestinal da toxina da cólera. Além desses efeitos, altos níveis de IL-1 β e TNF- α foram detectados, por ELISA, no fluido intestinal de ratos injetados com a toxina da cólera. Conseqüentemente, estes dados sugerem que IL-1 β e TNF- α estão provavelmente envolvidos na produção de secreção, em alça ligada do intestino delgado, induzida pela toxina da cólera. De acordo com esses dados, tem sido descrito que a toxina da cólera estimula as células epiteliais a secretar um número variado de citocinas que podem contribuir com sua ação imunoreguladora para o processo inflamatório (SORIANI *et al.*, 2002). Especificamente, foi evidenciado que o TNF- α (RODRIGUEZ *et al.*, 1998; YAN *et al.*, 1999) e IL-1 β (CONG *et al.*, 2001) podem estar envolvidos em alguma atividade biológica da toxina da cólera.

No tocante aos efeitos biológicos do TNF- α no intestino, alguns trabalhos mostram que essa citocina induz um aumento na corrente de curto-circuito em mucosa ileal, *in vitro*, e em monocamadas de células T-84 postas em cultura com fibroblastos (BERSCHNEIDER; GORALSKA, 1992; KANDIL *et al.*, 1992). Entretanto, há dados em nosso laboratório evidenciando que a adição de TNF- α , no lado seroso do íleo de coelho, montado em câmara de Üssing, produz uma discreta variação na corrente de curto-circuito, não diferente daquela induzida pelo controle (Ringer).

A interleucina-1, por sua vez, possui uma influência marcante na fisiopatologia da lesão e secreção intestinal (COMINELLI *et al.*, 1989; CHANG *et al.*, 1990; THEODOROU *et al.*, 1994). Uma boa evidência que demonstra a contribuição da IL-1 na patogênese da inflamação intestinal pode ser observada em animais com colite aguda, induzida por imunocomplexo, na qual o bloqueio da atividade desta citocina, com o IL-1ra, reduz drasticamente a lesão e a síntese de eicosanóides (COMINELLI *et al.*, 1992; FERRETI *et al.*, 1994). Nesse sentido, existem dois trabalhos clássicos demonstrando que a IL-1 produz uma intensa secreção intestinal, em mucosa ileal de coelho ou galinha montada em câmaras de Üssing, por um mecanismo sensível à ação da indometacina, sugerindo, portanto, que as prostaglandinas, provavelmente de fontes subepiteliais, são os mediadores finais da atividade secretória dessa citocina (CHANG *et al.*, 1990; CHIOSSONE *et al.*, 1990). Por último, Rocha *et al.* (1998) demonstraram que a IL-1 β é um importante fator de secreção presente no sobrenadante de macrófagos, quando estimulados com a toxina A do *C. difficile*.

A participação da histamina e serotonina na produção da secreção intestinal, induzida pela toxina da cólera, também foi investigada utilizando-se ratos tratados com antagonista de receptor inespecífico de histamina/serotonina (ciproheptadina), antagonista de receptor de histamina (difenidramina) e antagonista de receptor de serotonina (metergoline). Os dados deste protocolo experimental mostraram que a ciproheptadina e difenidramina diminuem a atividade da toxina da cólera, enquanto a metergoline não apresentou efeito. Essas evidências sugerem que a histamina, mas não a serotonina, está envolvida na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera.

Corroborando com esses dados, tem sido descrito que a histamina contribui para a diarreia associada com anafilaxia sistêmica, alergia alimentar, mastocitose sistêmica e rejeição de parasitas helmínticos (CIANCIO; CHANG, 1992). Foi também observado que a adição de histamina no lado seroso de monocamadas de células colônicas humana, células da linha T₈₄, promove a secreção de cloreto. Neste protocolo, a histamina ligava-se diretamente ao enterócito, via receptor do tipo H₁, que podia ser inibido por seu antagonista, como difenidramina (BARRET, 1992). Adicionalmente, a histamina vem sendo descrita como capaz de estimular,

indiretamente, a secreção de cloreto em segmento intestinal de cobaio e rato via estimulação do metabolismo do ácido araquidônico e do sistema nervoso entérico (COOKE, 1994; HARDCASTLE; HARDCASTLE, 1987).

O sistema nervoso entérico é constituído por um conjunto de neurônios altamente organizados, e capaz de funcionar independentemente do sistema nervoso central. Este sistema nervoso controla a motilidade, secreções exócrina e endócrina, microcirculação, além de estar envolvido com os processos imune e inflamatório de todo o trato gastrointestinal, (LUNDGREN *et al.*, 1989; COOKE, 1994; SURPRENANT, 1994). Contudo, sua conexão com o sistema nervoso central se dá através de uma rede que envolve as vias sensorial e motora do sistema nervoso simpático e parassimpático (GOYAL; HIRANO, 1996).

Na década passada houve um aumento no interesse em se conhecer o mecanismo controlador da fisiologia epitelial e, em particular, o papel das células do sistema imunológico neste processo inflamatório intestinal, e sua relação com o sistema nervoso entérico. Esse despertar advem do conhecimento da constituição da mucosa intestinal que contém um grande número de células imunocompetentes, onde, muitas vezes, se localizam nas proximidades do epitélio, além de associar-se com fibras nervosas. Essa associação anatômica sugeria uma relação funcional (McKAY; PERDUE, 1993; PERDUE; McKAY, 1994). Das diferentes células, os macrófagos e mastócitos são tipos imunocompetentes capazes de sintetizar e secretar uma ampla variedade de mediadores, tais como metabólitos do ácido araquidônico, oxidantes e citocinas, que podem afetar o epitélio direta ou indiretamente (McKAY; PERDUE, 1993; PERDUE; McKAY, 1994; ROCHA *et al.*, 1998; ROCHA *et al.*, 2000).

A estimulação do sistema nervoso entérico ocorre por diferentes estímulos, como: substâncias químicas, toxinas não-invasivas, toxina termo-estável da *Escherichia coli* e toxina da cólera que ativam o reflexo secretomotor intestinal, estimulando os receptores da mucosa, quando são expostas ao conteúdo luminal. *In vivo*, a resposta secretória de fluido, induzida pela aplicação da toxina da cólera na superfície da mucosa de íleo de rato, pode ser reduzida por bloqueadores neuronais, como lidocaína ou tetrodotoxina (LUNDGREN *et al.*, 1989).

Buscando ampliar o conhecimento sobre o envolvimento do sistema nervoso entérico, quando estimulados pela toxina da cólera, os animais foram pré-tratados com lidocaína (bloqueador dos canais de sódio) e atropina (inibidor da ação da acetilcolina). O resultado observado com os animais pré-tratados com lidocaína foi uma redução significativa da secreção intestinal, enquanto aqueles pré-tratados com a atropina não apresentaram nenhum efeito. Os resultados obtidos neste trabalho, portanto, são concordantes com Lundgren *et al.* (1989), quanto ao bloqueio secretório promovido pela lidocaína.

A resposta secretória pode, também, ser reduzida por uma combinação dos antagonistas dos receptores 5-HT₂ e 5-HT₃, mas não por uma denervação extrínseca ou pelo tratamento com capsaicina, que destrói seletivamente os nervos esplâncnicos primários aferentes, acumuladores da substância P (BEUBLER; HORINA, 1990; BUCK; BURKS, 1986). Os mastócitos, também, podem estar envolvidos nesse estímulo, levando a uma degranulação e liberação de prostaglandinas, histamina e 5-HT e induzindo uma vasodilatação na submucosa (VANNER *et al.*, 1993). A degranulação dos mastócitos e efeitos inflamatórios envolvendo a ativação dos nervos, por causa dos efeitos da toxina, são suprimidos por bloqueadores neuronais (CASTAGLIUOLO *et al.*, 1994).

6.5 Estudo histopatológico do efeito observado após inoculação da toxina da cólera, do sobrenadante de cultura e da toxina purificada do *B. fragilis*

No estudo histopatológico, em modelo de alça isolada de ratos, foram utilizadas as toxinas puras do *V. cholerae* e do *B. fragilis*, 18 horas após inoculação, e os sobrenadantes do cultivo de *B. fragilis*, nos tempos de 8, 12 e 18 horas.

Quando se utilizou a toxina pura do *V. cholerae*, 18 horas após inoculação, observou-se uma indução de distúrbios circulatórios com congestão e edema da mucosa e submucosa marcantes, e hemorragia de submucosa. Além destes achados, foram observadas ainda hipertrofia e infiltração de mononucleares, leves alterações no epitélio superficial dos vilos e no seu interior e, também, a presença de inúmeros mastócitos. Já os sobrenadantes da cultura de mastócitos, estimulados pela toxina pura (1 µg/ml), na alça intestinal isolada de ratos, teve

efeito sobre os vilos, deixando-os achatados e atrofiados, com leve descamação epitelial; intensa proliferação de mastócitos dispersos por toda parede do intestino, sendo encontrado um maior número na mucosa e submucosa, e em menor proporção na muscular; observou-se ainda uma dilatação dos vasos lactíferos, além de edema no córion. Esse edema produzido pelo sobrenadante sugere a participação dos mastócitos na atividade secretória desenvolvida pela TC, durante a diarreia. Neste trabalho foi observado, ainda, que o efeito secretório foi reduzido por antagonistas da histamina que, por sua vez, é produzida principalmente por mastócito o que fortalece a participação destas células.

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram, também, a ocorrência de uma ação significativa dos sobrenadantes das cepas de *B. fragilis*, inoculados em alça intestinal de ratos, que se acentuavam com o passar do tempo. O filtrado do cultivo da cepa ETBF apresentou efeitos danosos sobre a mucosa intestinal 8 horas após sua inoculação que se intensificaram em 12 horas. Esses efeitos observados foram: enterite fibrino-necrótica; segmentos intestinais deteriorados, com extenso conteúdo de muco e células descamadas no lúmen; áreas de descamação freqüentes e necrose superficial; distorção segmentar e perda da arquitetura das vilosidades, com áreas onde os vilos foram destruídos totalmente, além de necrose de criptas; infiltrados mono e polimorfonuclear disperso pela parede intestinal; reatividade de regiões com placas de Peyer e/ou GALT; na camada interna da muscular, os núcleos dos miócitos apresentavam-se hipocrômicos; destacando-se a presença de grande número de mastócitos na mucosa intestinal. Às 18 horas, as alterações da mucosa estavam ainda mais intensamente afetadas, com perda das vilosidades por degeneração e necrose, infiltração de mononucleares, intensa congestão e áreas hemorrágicas. As alterações promovidas pelo sobrenadante de NTBF eram significativas, mas sempre de menor intensidade. Esses efeitos de virulência e infiltração celular observados, foram também descritos por outros autores (MYERS *et al.*, 1984; BORDER *et al.* 1985; MYERS *et al.*, 1985; MYERS; SHOP, 1987; MYERS *et al.*, 1987; COLLINS *et al.*, 1989; DUIMSTRA *et al.*, 1991; MAHIDA *et al.*, 1997; SANFILIPPO *et al.*, 2000). Contudo, a presença de grande número de mastócitos deve ser ressaltada como um achado novo. Uma vez que os mastócitos, assim

como os macrófagos, são também células residentes responsáveis por inúmeros produtos excretados, tendo, portanto, uma participação em diferentes processos fisiológicos ou patológicos. As funções biológicas dos mastócitos parecem incluir um papel na resposta imunitária inata (METCALFE et al., 1997; MEKORI; METCALFE, 2000), envolvimento nos mecanismos de defesa contra infecções parasitárias (MAYHOFER; FISHER, 1979) e bacterianas (FRA et al., 1994; ECHTENACHER et al., 1996; AROCK et al., 1998; SHIM et al., 2000), imunomodulação do sistema imune (FRANDJI et al., 1993; FOX et al., 1994), reparo de tecido (DAYTON et al., 1989; BJERMER et al., 1987) e angiogênese (RHODIN; FUJITA, 1989).

A toxina pura do *B. fragilis* (3 µg/ml), na alça intestinal isolada de ratos, foi utilizada somente no tempo de 18 horas, que promoveu um efeito sobre a forma e estrutura dos vilos; proliferação de células caliciformes; dilatação marcante dos vasos lactíferos, com edema, proliferação de linfócitos e presença de mastócitos no interior dos vilos; a relação vilo/cripta apresentava-se alterada, demonstrando uma atrofia dos vilos. Essas alterações devem se intensificar com o aumento da dose, conforme apresenta Obiso et al. (1995).

Corroborando com os resultados desta pesquisa, foi observado que a inoculação do sobrenadante do cultivo e da toxina purificada de ETBF, em alça intestinal isolada de ovino, coelho e rato, era capaz de induzir alterações morfológicas na mucosa, além de estimular a infiltração de polimorfonucleares neutrófilos (OBISO et al., 1995). Os mecanismos responsáveis por esses efeitos, danos na mucosa e sua inflamação, não são ainda bem conhecidos. Inicialmente, Myers et al. (1984) descreveram uma diarreia epidêmica em ovinos, associada com *B. fragilis*, que também promovia uma resposta secretória em alça intestinal ligada de ovinos e bovinos. Trabalhos subseqüentes foram demonstrando a associação desse microrganismo com diarreia em bovinos, aves, suínos e, mais recentemente, no homem (BORDER et al. 1985; MYERS et al., 1985; MYERS; SHOP, 1987; MYERS et al., 1987; COLLINS et al., 1989). Dano extensivo intestinal com expoliação do epitélio da superfície, sem afetar a submucosa, mas com áreas hemorrágicas e necrose da mucosa foram observados por Obiso et al., 1995. A TBF parece medear uma ação proteolítica sobre as proteínas envolvidas

na ligação célula-célula (Van TASSEL *et al.*, 1994; OBISO *et al.*, 1997) e na interação célula-matriz (MONCRIEF *et al.*, 1995). Shaoguang *et al.* (1998) demonstrou, ainda, que a TBF pode cortar uma proteína da zona aderentes, a E-caderina. Outros estudos, *in vitro*, têm mostrado que a TBF tem competência para quebrar a barreira paracelular das células epiteliais (OBISO *et al.*, 1997), e isto facilita a exarcebação de uma inflamação da mucosa; *in vivo*, após descamação do epitélio observou-se uma migração de macrófagos, linfócitos e eosinófilos para luz intestinal (MAHIDA *et al.*, 1997). A estimulação dose-dependente de citocinas, *in vitro*, sugere que grandes concentrações de TBF possam induzir respostas inflamatórias, via secreção de IL-8, e uma exposição constante a esta toxina venha promover uma diarreia secundária em função da mucosa inflamada (SANFILIPPO *et al.*, 2000).

A utilização dos sobrenadantes da cultura de mastócitos, estimulados pela toxina pura do *B. fragilis* (3 µg/ml), na alça intestinal isolada de ratos, foi utilizado somente no tempo de 18 horas. Esse sobrenadante promoveu efeitos bem menos acentuados que o da toxina pura. Os efeitos incluíram alteração da arquitetura dos vilos, intensa proliferação das células caliciformes, alongamento dos vilos, descamação do epitélio superficial, edema do córion e presença de mastócitos na mucosa e submucosa. Estas alterações estruturais sugerem uma participação de produtos secretados pelos mastócitos presentes no seu sobrenadante.

A presença de um grande número de mastócitos induzido pelos sobrenadantes dos mastócitos, estimulados pelas duas toxinas, sugere um efeito autócrino dessas células, através da produção de IL-3 e IL-4 (MADDEN *et al.*, 1991), sugerindo a presença dessas citocinas neste sobrenadante. A grande amplitude de ação dos mastócitos, apresentada anteriormente, demonstra sua importância na participação do processo inflamatório, o que deixa claro uma necessidade de outros estudos mais específicos que possam identificar quais os mediadores envolvidos.

O efeito do filtrado de culturas de ETBF em diferentes órgãos e tecidos, 12 horas após a inoculação na alça intestinal isolada de ratos, foi ainda estudado tanto a nível macroscópico como microscópico. Os dados deste trabalho mostraram efeitos macroscópicos importantes, principalmente sobre o coração,

com dilatação e hipertrofia unilateral direita, e no fígado manchas esbranquiçadas e amareladas que se aprofundavam ao corte. Esses efeitos de grande abrangência, sobre os tecidos destes órgãos vitais, podem justificar o estado fisiológico apresentado pelos animais durante a evolução do processo, inclusive com o registro de mortes. A nível microscópico, o estudo histopatológico apresentou um efeito do filtrado sobre um maior número de órgão: coração com necrose liquefativa do miocárdio e atrofia de fibras; fígado com congestão passiva, dilatação de sinusóides, degeneração e necrose; rim, com degeneração e necrose de glomérulos; e, o cérebro também apresentou-se afetado com alterações degenerativas e necróticas de células. A inoculação do microrganismo na obtenção de infecção localizada (JYONOUCHI *et al.*, 2000), assim como uma exposição do indivíduo a endotoxina do *B. fragilis* (BENNETT-GUERRERO *et al.*, 2000), promoveram uma ação sistêmica. Esses efeitos generalizados sobre os diferentes órgãos, colocam esse agente como um candidato em potencial merecedor de outros estudos, como os apresentados por Jyonouchi *et al.* (2000) e Bennett-Guerrero *et al.* (2000), que não esclarecem por completo a causa responsável.

6.6 Migração celular em cavidade peritoneal de ratos induzida pela toxina purificada do *B. fragilis*

Como não foi observado efeito secretório significativo relacionado com o *B. fragilis*, em alça intestinal isolada de ratos, optou-se por outro modelo experimental capaz de avaliar o possível processo inflamatório produzido pela TBF. Dessa forma, foram utilizados alguns protocolos de migração celular para neutrófilos, mononucleares, eosinófilos e mastócitos.

Inicialmente foram inoculadas três doses diferentes de TBF (1, 3 e 10 µg/ml) na cavidade peritoneal de ratos, com o objetivo de identificar a melhor concentração capaz de promover a migração celular. Com as células neutrófilos e mononucleares não foi observada migração. Contudo, os eosinófilos migraram na dose de 10 µg/ml e foi observado um aumento no número de mastócitos nas doses de 3 e 10 µg/ml.

A dose de 3 $\mu\text{g/ml}$ apresentou resultados consistentes quanto ao estado celular, pois estavam íntegras e bem conservadas morfológicamente, diferentemente de 10 $\mu\text{g/ml}$ que já demonstravam alterações na sua estrutura. Os mastócitos, muitas vezes, tinham seu citoplasma destruído, e o núcleo encontrava-se disperso entre as outras células. Após a escolha da dose (3 $\mu\text{g/ml}$), a inoculação na cavidade peritoneal de ratos foi processada objetivando a verificação do seu efeito 2, 4 e 8 horas depois. Do resultado desse estudo não foi observada migração celular significativa, com os neutrófilos e mononucleares. Com relação aos eosinófilos, observou-se um crescimento gradativo no número celular, sendo significativo em 4 e 8 horas. Os mastócitos mostraram-se em maior número ($p \leq 0,05$) 4 horas após estímulo peritoneal, e as células estavam em bom estado estrutural. No tempo de 8 horas, apesar de ocorrer um aumento no número destas células, também foi verificada uma maior variação nas contagens, o que provavelmente pode ter influenciado na análise estatística, e a diferença não ser significativa; essas diferenças surgiram, provavelmente, em função do estado em que as células se encontravam, onde muitas delas estavam com citoplasmas destruídos e os núcleos muitas vezes dispersos entre as outras células do esfregaço.

Especialmente em relação aos mastócitos, evitou-se utilizar o termo "migração", por haver discordância desta terminologia por parte de alguns autores. Muito embora, a origem destas células tenha permanecido obscura por muito tempo, foram sugeridos os linfócitos T, macrófagos ou fibroblastos como possível fonte (BURNET, 1977; CZARNETZKI *et al.*, 1982). Contudo, atualmente aceita-se que os mastócitos tenham origem em células hematopoiéticas pluripotenciais da medula óssea (KITAMURA; GO, 1978; KITAMURA *et al.*, 1981; SONODA *et al.*, 1983). Sendo observado em camundongos que as células precursoras dos mastócitos estão presentes no sangue circulante normal (90 de 10^6 células mononucleares do sangue periférico) (ROTTEM *et al.*, 1994). Além do mais, produtos obtidos de sobrenadantes de linfócitos e células similares eram capazes de manter e proliferar populações de mastócitos (JARBOE *et al.*, 1989; HULTNER *et al.*, 1990; ROTTEM *et al.*, 1994).

Após análise dos dados tanto no modelo de secreção intestinal como na migração celular, observou-se um papel importante de células pró-inflamatórias, particularmente mastócitos e eosinófilos nas atividades biológicas das toxinas de *B. fragilis* e *V. cholerae*. No que se refere a importância dos mastócitos, como discutido anteriormente, são células residentes, do tecido conjuntivo e das mucosas, com múltiplas funções biológicas críticas, podendo ser ativadas por diferentes estímulos, tanto dependentes (KEEGAN; PAUL, 1992) como independentes (JASANI *et al.*, 1979; SCHULMAN *et al.*, 1988; MATTHEWS *et al.*, 1989) de Fc_εRI (receptor para IgE). A ativação desses receptores leva a vias de sinalização distintas (EISEMAN; BOLEN, 1992; JOUVIN *et al.*, 1994; YAMASHITA *et al.*, 1994) e, que após essa ativação, podem liberar imediatamente mediadores associados aos grânulos (FOX *et al.*, 1985; IRANI *et al.*, 1986; CRAIG *et al.*, 1993) e gerar substâncias derivadas dos lipídeos capazes de induzirem inflamação alérgica imediata (DEMOPOULUOS *et al.*, 1979; LEWIS; AUSTEN, 1984; LEWIS *et al.*, 1990), além da síntese de citocinas e quimiocinas. A secreção de citocinas e quimiocinas (YOUNG *et al.*, 1987; BURD *et al.*, 1989; PLAUT *et al.*, 1989) ocorre horas depois e pode contribuir para inflamação crônica. Quanto aos eosinófilos, chegam a representar um percentual de 2 a 5 % dos leucócitos polimorfonucleares circulantes, em indivíduos não-alérgicos. Seu número se torna elevado em indivíduos infestados com helmintos intestinais. Porém, os eosinófilos por possuírem Fc_εR2, significa dizer que podem, também, estar envolvidos em reações alérgicas (McKAY; PERDUE, 1993).

Finalizando, a partir da análise histológica do íleo tratado com o filtrado do cultivo de NTBF e de ETBF, da TBF e da TC, observou-se um aumento significativo de mastócitos. Os dados desta pesquisa sugerem que a secreção induzida pela toxina da cólera envolve uma resposta pró-inflamatória, com a participação dos mediadores como histamina, prostaglandinas, PAF, IL-1 β e TNF- α , produzidos por esta célula. Ademais, a TBF promoveu um aumento significativo deste tipo celular no modelo de migração celular e no estudo histopatológico, gerando lesão tecidual na mucosa intestinal, mas sem produzir secreção. Por conseguinte, esses resultados evidenciam um papel relevante dos mastócitos na etiopatologia dos efeitos enterotóxicos produzidos por *B. fragilis* e *V. cholerae*.

7. CONCLUSÕES

- A toxina da cólera induz uma potente secreção intestinal, *in vivo*, de forma dose e tempo-dependentes;
- Os mastócitos desempenham um papel relevante nos efeitos enterotóxicos provocados pela toxina da cólera;
- A secreção intestinal induzida pela toxina da cólera decorre, em parte, via síntese de histamina, prostaglandinas, PAF, IL-1 β e TNF- α ;
- Os leucotrienos não participam do efeito da produção da secreção intestinal, induzida pela toxina da cólera;
- A serotonina não participa do efeito da produção da secreção intestinal, induzida pela toxina da cólera;
- O sistema nervoso entérico desempenha um papel relevante nos efeitos enterotóxicos provocados pela toxina da cólera;
- O sobrenadante da cultura de *B. fragilis* e sua toxina purificada são incapazes de induzir em ratos secreção intestinal;
- O sobrenadante da cultura de *B. fragilis* é um potente indutor de lesão intestinal, caracterizado por descamação celular, necrose, distorção segmentar e perda da arquitetura das vilosidades;
- A toxina purificada foi capaz de induzir alterações no epitélio de revestimento, com esfoliação e necrose superficial no ápice do vilo;
- A toxina purificada do *B. fragilis* é capaz de promover migração celular, especialmente mastócitos e eosinófilos;

Há uma participação efetiva do componente pró-inflamatório nas atividades biológicas das toxinas do *V. cholerae* e *B. fragilis*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, R., FORSYTHE, P. A.; STAFFORD, S.; LETT-BROWN, M. A.; GRANT, J. A. Macrophage inflammatory protein-1 α activates basophils and mast cells. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 781-786, 1992.
- ALAM, R.; KUMAR, D.; ANDERSON-WALTERS, D.; FORSYTHE, P. A. Macrophage inflammatory protein-1 α and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells *in vivo*. **J. Immunol.**, v. 152, p. 1298-1303, 1994.
- ALBER, G.; KENT, U. M.; METZGER, H. Functional comparison of Fc ϵ Δ RI, Fc γ RII and Fc γ RIII in mast cells. **J. Immunol.**, v. 149, p. 2428-2436, 1992.
- ANDERSON, R. G. The caveolae membrane system. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 199-225, 1998.
- ANSEL, J. C.; BROWN, J. R.; PAYAN, D. G.; BROWN, M. A. Substance P selectively activates TNF- α gene expression in murine mast cells. **J. Immunol.**, v. 150, p. 4478-4485, 1993.
- AROCK, M.; ROSS, E.; Lai-KUEN, R.; AVERLANT, G.; GAO, Z.; ABRAHAM, S. N. Phagocytic and tumor necrosis factor alpha response of human mast cells following exposure to gram-negative and gram-positive bacteria. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 6030-6034, 1998.
- ARRANG, J.-M.; SCHWARTZ, J.-C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by novel class (H $_3$) of histamine receptor. **Nature**, v. 302, p. 832-837, 1983.
- ASH, A. S. F.; SCHILD, H. O. Receptors mediating some actions of histamine. **Br. J. Pharmacol.**, v. 27, p. 427-439, 1966.
- 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.
- BAILIE, M. B.; STANDIFORD, T. J.; LAICHALK, L. L.; COFFEY, M. J.; STRIETER, R.; PETERS-GOLDEN, M. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. **J. Immunol.**, v. 157, p. 5221-5224, 1996.
- BANWELL, J. G.; PIERCE, N. F.; MITRA, R. C.; BRIGHAM, K. L.; CARANASOS, G. J.; KEIMOWITZ, R. J.; FEDSON, D. S.; THOMAS, J.; GORBACH, S. L.; SACK, R. B.; MONDAL, A. Intestinal fluid and electrolyte transport in human cholera. **J. Clin. Invest.**, v. 49, p. 183-195, 1970.
- BARNES, P.J.; ADCOCK, I. Antiinflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol.**, v. 259, p. G947-G954, 1993.
- BARRETT, K. E. Mechanisms of inflammatory diarrhoea. **Gastroenterology**, v. 103, p. 710-711, 1992.

- BARTLETT, J.G. *Clostridium difficile*: clinical considerations. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, p. suppl. 2, p. S243-S251, 1990.
- BEFUS, A. D.; PEARCE, F. L.; GAULDIE, P. J.; HORSEWOOD, P.; BIENENSTOCK, J. Mucosal mast cells. I. Isolation and functional characteristics of rat intestinal mast cells. **J. Immunol.**, v. 128, p. 2475-2480, 1982.
- BELLER, F. K.; GRAEFF, H.; GORSTEIN, F. Disseminated intravascular coagulation during the continuous infusion of endotoxin in rabbits: morphologic and physiologic studies. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 103, p. 544-554, 1969.
- BENNETT-GUERRERO, E.; KAPLAN, J. A.; REICH, D.L.; KONSTADT, S. N apud BENNETT-GUERRERO, E.; BARCLAY, R.; YOUSSEF, M. E.; HOSSAIN, S.; VELA-CANTOS, F.; ANDRES, L. A.; POXTON, I. R. Exposure to *Bacteroides fragilis* endotoxin during cardiac surgery. **Anesth. Analg.**, v. 90, p. 819-823, 2000.
- BENNETT-GUERRERO, E.; BARCLAY, G. R.; YOUSSEF, M. E.; HOSSAIN, S.; VELA-CANTOS, F.; ANDRES, L. A.; POXTON, I. R. Exposure to *Bacteroides fragilis* endotoxin during cardiac surgery. **Anesth. Analg.**, v. 90, p. 819-823, 2000.
- BERN, M. J.; STURBAUN, C. W.; KARAYALCIN, S. S.; BERSCHNEIDER, H. M.; WACHSMAN, J. T.; POWELL, D. W. Immune system control of rat and rabbit electrolyte transport. Role of prostaglandins and enteric nervous system. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 1810-1820, 1989.
- BERSCHNEIDER, H. M.; GORALSKA, M. Interleukin-1 α (IL-1) and tumor necrosis factor- α (TNF) enhance the paracrine modulation of intestinal epithelial Cl⁻ secretion by fibroblasts. **Gastroenterology**, v. 102, p. A201, 1992.
- BEUBLER, E.; BUKHAVE, K.; RASK-MADSEN, J. Significance of calcium for the prostaglandin E₂-mediated secretory response to 5-hydroxytryptamine in the small intestine of the rat *in vivo*. **Gastroenterology**, v. 90, p. 1972-1977, 1986.
- BEUBLER, E.; HORINA, G. 5-HT₂ and 5-HT₃ receptor subtypes mediate cholera toxin-induced intestinal fluid secretion in the rat. **Gastroenterology**, v. 99, p. 83-89, 1990.
- BJERMER, L.; ENGSTROM-LAURENT, A.; THUNELL, M.; HALLGREN, R. The mast cell and signs of pulmonary fibroblast activation in sarcoidosis. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 82, p. 298-301, 1987.
- BLACK, J. W.; DUNCAN, W. A. M.; DURANT, C. J.; GANELLIN, C. R.; PARSONS, E. M. Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. **Nature**, v. 236, p. 385-390, 1972.
- BOBAK, D. A.; GUERRANT, R. L. New developments in enteric bacterial toxins. **Adv. Pharmacol.**, v. 23, p. 85-108, 1992.
- BORDER, M.; FIREHHEMMER, B. D.; SHOOP, D. S.; MYERS, L. L. Isolation of *Bacteroides fragilis* from the feces of diarrheic calves and lambs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 21, p. 472-473, 1985.
- BOURIN, M. C.; LINDAHL, U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. **Biochem. J.**, v. 289, p. 313-330, 1993.

- BUCK, S. H.; BURKS, T. F. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. **Pharmacol. Rev.**, v. 38, p. 179-226, 1986.
- BURD, P. R.; ROGERS, H. W.; GORDON, J. R. Interleukin 3-dependent and – independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 245-257, 1989.
- BURNET, F. M. The probable relationship of some or all mast cells to the T-cell system. **Cell Immunol.**, v. 170: p. 358-360, 1977.
- CALDERARO, V.; GIOVANI, A.; DE SIMONE, B.; CAMUSSI, G.; ROSSIELLO, R.; QUAGLIUOLO, L.; SERVILLO, L.; TACCONE, W.; GIORDANO, C.; BALESTRIERI, C. Arachidonic acid metabolites and chloride secretion in rabbit distal colonic mucosa. **Am. J. Physiol.**, v. 261, p. G443-G450, 1991.
- CASALE, T. B.; MAROM, Z. Mast cells and asthma. The role of mast cell mediators in the pathogenesis of allergic asthma. **Ann. Allergy**, v. 51, p. 2-6, 1983.
- CASTAGLIULO, I.; LaMONT, J. T.; LETOURNEAU, R.; KELLY, C.; O'KEANE, J.C.; JAFFER, A.; THEOHARIDES, T. C. Neuronal involvement in the intestinal effects of *Clostridium difficile* toxin A and *Vibrio cholerae* enterotoxin in rat ileum. **Gastroenterology**, v. 107, p. 657-665, 1994.
- CATO, E. P.; JOHNSON, J. L. Reinstatement of species rank for *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron* and *B. vulgatus*: Designation of neotype strains for *Bacteroides fragilis* (veillon and Zuber) Castellani and Chalmer and *B. thetaiotaomicron* (Ditaso) Castellani and Chalmer. **Inter. J. System. Bacteriol.**, v. 26, p. 230-237, 1976.
- CHANG, E. B.; MUSCH, M. W.; MAYER, L. Interleukin 1 and 3 stimulate anion secretion in chicken intestine. **Gastroenterology**, v. 98, p. 1518-1524, 1990.
- CHIOSSONE, D. C.; SIMON, P. L.; SMITH, P. L. Interleukin 1: effects on rabbit ileal mucosal ion transport in vitro. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 180, p. 217-228, 1990.
- CIANCIO, M. J.; CHANG, E. B. Epithelial secretory response to inflammation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 664, p. 210-221, 1992.
- COCKAYNE, A. Bacterial pathogenicity. In: GREENWOOD, D.; SLACK, R. C. B.; PENTHERS, J. F. (Ed.) **Medical microbiology**. 15th. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1997. chapt. 8, p. 86-87.
- COHEN, J. J.; DUKE, R. C.; FADOK, V. A. Apoptosis and programmed cell death in immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 267-293, 1992.
- COHN, J. A.; DOUGHERTY, N. C.; KING, W. F. Histamine stimulates calcium-mediated protein phosphorylation in a colonic epithelial cell line. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 165, p. 810-816, 1989.
- COLLINS, J. E.; BERGELAND, M. E.; MYERS, L. L.; SHOOP, D. S. Exfoliating colitis associated with enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in a piglet. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 1, p. 349-351, 1989.
- COMINELLI, F.; NAST, C. C.; DINARELLO, C. A.; GENTILINI, P.; ZIPSER, R. D. Regulation of eicosanoid production in rabbit colon by interleukin-1. **Gastroenterology**, v. 97, p. 1400-1405, 1989.

- COMINELLI, F.; NAST, C. C.; DUCHINI, L.M. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin1 in rabbit immune colitis. **Gastroenterology**, v. 103, p. 365-371, 1992.
- CONG, Y.; OLIVER, A. O.; ELSON, C. O. Effects of cholera toxin on macrophage production of co-stimulatory cytokines. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 64-71, 2001.
- CONRAD, D. H.; SQUIRE, C. M.; BARTLETT, W. C.; DIERKS, S. E. Fc_ε receptors. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 3, p. 859-864, 1991.
- COOKE, H. J. Neuroimmune signaling in regulation of intestinal ion transport. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. G167-G178, 1994.
- CRAIG, S.; IRANI, A. A.; METCALFE, D. D.; SCHWARTZ, L. B. Ultrastructural localization of heparin to human mast cells of the MC_{TC} and MC_T types by labeling with antithrombin III-gold. **Lab. Invest.**, v. 69, p. 552-561, 1993.
- CRAPPER, R. M.; CLARK-LEWIS, I.; SCHRADER, J. W. The *in vivo* functions and properties of persisting cell-stimulating factor. **Immunology**, v. 53, p. 33-42, 1984.
- CZARNETZKI, B. M.; STERRY, W.; BRAZIN, H.; KAPVERAM, K. J. Evidence that tissue mast cells are derived from monuclear phagocytes. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 67, p. 44-48, 1982.
- DAYTON, E. T.; CAULFIELD, J. P.; HEIN, A.; AUSTEN, K. F.; STEVENS, R. L. Regulation of the growth rate of mouse fibroblasts by IL-3-activated mouse bone marrow-derived mast cells. **J. Immunol.**, v. 142, p. 4307-4313, 1989.
- De, S. N.; CHATTERJE, D. N. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 66, p. 559-562, 1953.
- DELAHOOK, D. M.; BARCLAY, G. R.; POXTON, I. R. A re-appraisal of the biological activity of *Bacteroides* lipopolysaccharide. **J. Med. Microbiol.**, v. 42, p. 102-112, 1995.
- _____. Tumor necrosis factor induction by an aqueous phenol-extracted lipopolysaccharide complex from *Bacteroides* species. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 840-846, 1995a.
- DEMOPOULUOS, C. A.; PINCKARD, R. N.; HANAHAN, D. J. Platelet-activating factor (PAF): evidence for 1-o-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 9355-9358, 1979.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediator of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, v. 104, p. 15-29, 1971.
- DONOWITZ, M.; TAI, Y. H.; ASARKOF, N. Effect of serotonin on active electrolyte transport in rabbit ileum, gall bladder, and colon. **Am. J. Physiol.**, v. 239, p. G463-G472, 1980.
- DRIKS, M. R.; CRAVEN, D.E.; CELLI, B. R.; MANNING, M.; BURKE, R. A.; GARVIN, G. M.; KUNCHES, L. M.; FARBER, H. W.; WEDEL, S. A.; McCABE, W. R. Nosocomial pneumonia in intubated patients given sucralfate as compared

with antacids or histamine type 2 blockers: the role of gastric colonization. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, p. 1376-1382, 1987.

DuBOIS, R. N.; AWAD, J.; MORROW, J.; ROBERTS, L. J.; BISHOP, P. R. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor- α and phorbol ester. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 493-498, 1994.

DUIMSTRA, J. R.; MYERS, L. L.; COLLINS, J. E.; BENFIELD, D. A.; SHOOP, D. S.; BRADBURY, W. C. Enterovirulence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in gnotobiotic pigs. **Vet. Patol.**, v. 28, p. 514-518, 1991.

DuPONT, H. L.; ERICSSON, C. D. Prevention and treatment of travel's diarrhea. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, p. 1881-1887, 1993.

DVORAK, A. M.; McLEOD, R. S.; ONDERDONK, A. B.; MONAHAN-EARLY, R. A.; CULLEN, J. B.; ANTONIOLI, D. A.; MORGAN, E.; BLAIR, J. E.; ESTRELLA, P.; CIRNEROS, R. L. Human gut mucosal mast cells: ultrastructural observations and anatomic variation in mast cell-nerve associations in vivo. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 98, p. 158-168, 1992.

EBERHART, C. E.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, v. 109, p.285-301, 1995.

ECHTENACHER, B.; MANNEL, D. N.; HULTNER, L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. **Nature**, v. 381, p. 75-77, 1996.

EISEMAN, E.; BOLEN, J. B. Engagement of the high affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. **Nature**, v. 355, p. 78-81, 1992.

EL-LATI, S. G.; DAHINDEN, C. A.; CHURCH, M. K. Complement peptides C3a and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 102, p. 803-816, 1994.

ELTON, E.; CHIOSSONE, D. C.; McCAFFERTY, G. P.; RYAN, F. M.; SMITH, P. L. SK & F 104353: selective antagonism of peptidoleukotriene-induced changes in electrolyte transport by rat ilealmucosa *in vitro*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 251, p. 484-489, 1989.

ENERBACK, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 66, p. 289-302, 1966.

FAGUNDES-NETO, U.; SCHMITZ, L. G.; SCALETSKY, I. C. A. Acute diarrhea due to enteropathogenic *Escherichia coli* epidemiological and clinical features in Brasília, Brazil. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 1, p. 65, 1996.

FANG, G., LIMA, A.A.M., THIELMAN, N., FONTELES, M.C., YOTSEFF, P., LYERLY, D., GUERRANT, R.L. Role of phospholipase A₂ in the histologic, epithelial and secretory responses to *Clostridium difficile*. **Biomed. J.**, v. 1, p. 1-15, 1994.

FARUQUE, S. M.; ALIM, A. R. M.; RAHMAN, N. M.; SIDDIQUE, A. K.; SACK, R. B.; ALBERT, J. Clonal Relationships Among Classical Cholerae O1 Strains Isolated between 1961 and 1992 in Bangladesh. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 2513-2516, 1993.

- FASANO, A.; BAUDRY, B.; PUMPLIN, D. W.; WASSERMAN, S. S.; TALL, B. D.; KETLEY, J. M.; KAPER, J. B. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 5242-5246, 1991.
- FASANO, A.; FIORENTINI, C.; DONELLI, G.; UZZAU, S.; KAPER, J. B.; MARGARETTEN, K.; DING, X.; GUANDALINI, S.; COMSTOCK, L.; GOLDBLUM, S. E. Zonula occludens toxin (Zot) modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization in vitro. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 710-720, 1995.
- FEITOSA, R. F. G.; ROCHA, M. F. G.; LIMA, A. A. M. Isolamento de macrófagos, linfócitos e mastócitos da lâmina própria intestinal de ratos. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 16., Caxambu, MG, **Resumos...** Minas Gerais, 2001. p. 248. 30.030,
- FEITOSA, R. F. G.; MELCÍADES, G. B.; ASSREUY, A. M. S.; ROCHA, M. F. G.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. The pharmacological profile of ovalbumin-induced paw oedema in rats. **Mediators Inflamm.**, v. 11, p. 155-163, 2002.
- FERRETI, M.; CASINIRAGGI, V.; PIZARRO, T. T.; EISENBERG, S. P.; NAST, C. C.; COMINELLI, F. Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 449-453, 1994.
- FIELD, K. A.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B. Fc epsilon RI-mediated recruitment of p53/56lyn to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 9201-9205, 1995.
- FIELD, M.; FROMM, D.; MCCOLL, I. Ion transport in rabbit ileal mucosa. I. Na⁺ and Cl⁻ fluxes and short-circuit current. **Am. J. Physiol.**, v. 220, p. 1388-1396, 1971.
- FIELD, M.; FROMM, D.; AL-AWQATI, Q.; GREENOUGH III, W. B. Effect of cholera enterotoxin on ion transport across isolated ileal mucosa. **J. Clin. Invest.**, v. 51, p. 796-804, 1972.
- FIELD, M.; RAO, M. C.; CHANG, E. B. Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 321, p. 879-883, 1989.
- 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. Mediat. Cell Signal.**, v. 11, p. 133-143, 1995.
- FORMAL, S. B.; KUNDEL, D.; SCHNEIDER, H.; KUNEV, N.; SPRINZ, H. Studies with *Vibrio cholerae* in the ligated loop of the rabbit intestine. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 42, p. 504-510, 1961.
- FORMAL, S. B.; ABRAMS, G. D.; SCHNEIDER, H.; SPRINZ, H. Experimental *Shigella* infections. VI. Role of the small intestine in an experimental infection in guinea pigs. **J. Bacteriol.**, v. 85, p. 119-125, 1963.
- FOX, C. C.; DVORAK, A. M.; PETERS, S. P.; KAGEY-SOBOTKA, A.; LICHTENSTEIN, L. M. Isolation and characterization of human intestinal mucosal mast cells. **J. Immunol.**, v. 135, p. 483-491, 1985.
- FOX, C. C.; JEWELL, S. D.; WHITACRE, C. C. Rat peritoneal mast cells present antigen to a PPD specific T cell line. **Cell. Immunol.**, v. 158, p. 253-264, 1994.

- FRA, A. M.; WILLIAMSON, E.; SIMONS, K.; PARTON, R. G. Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. **J. Biol. Chem.**, 269: 30745-30748, 1994.
- FRANCO, A. A.; MUNDY, L. M.; TRUCKSIS, M.; WU, S.; KAPER, J. B.; SEARS, C. L. Cloning and characterization of the *Bacteroides fragilis* metalloprotease toxin gene. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1007-1013, 1997.
- FRANDJI, P.; OSKERITZIAN, C.; CACARACI, F.; LAPYERE, J.; PERONET, R.; DAVID, B.; GUIELLET, J. G.; MECHELI, S. Antigen-dependent stimulation by bone marrow-derived mast cells of MHC class II restricted T cell hybridoma. **J. Immunol.**, v. 151, p. 6318-6328, 1993.
- FRIERI, M.; METCALFE, D. D. Analysis of the effect of mast cell granules on lymphocyte blastogenesis in the absence and presence of mitogen. **J. Immunol.**, v. 131, p. 1942-1948, 1983.
- FURITSU, T.; SAITO, H.; DVORAK, A. M.; SCHWATZ, L. B.; IRANI, A. A.; BURDICK, J. F.; ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T. Development of human mast cells in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 86, p. 10030-10043, 1989.
- GAJEWSKI, T. F.; PINNAS, M.; WONG, T.; FITCH, F. W. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct APC populations. **J. Immunol.**, v. 146, p. 1750-1758, 1991.
- GALLI, S. J. New insights into "the riddle of the mast cell." Microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. **Lab. Invest.**, v. 62, p. 5-33, 1990.
- _____. New concepts about the mast cell. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, p. 257-265, 1993.
- GALLI, S. J.; GORDON, J. R.; WERSHIL, B. K. Mast cell cytokines in allergy and inflammation. **Agents Actions**, v. 43, p. 209-220, 1993.
- GALLI, S. J.; HAMMEL, I. Mast cell and basophil development. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 1, p. 33-39, 1994.
- GALLI, S. J.; ZSEBO, K. M.; GEISLER, E. N. The kit ligand, stem cell factor. **Adv. Immunol.**, v. 55, p. 1-96, 1994.
- GANGAROSA, E. J.; BEISEL, W. R.; BENYAJATI, C.; SPRINZ, H.; PIYARATN, P. The nature of the gastrointestinal lesion in Asiatic cholera and its relation to pathogenesis. A biopsy study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 9, p. 125-135, 1960.
- GARNER, R.; CHATER, B. V.; BROWN, D. L. The role of complement in endotoxinshock and disseminated intravascular coagulation: experimental observation in the dog. **Br. J. Haematol.**, v. 28, p. 393-401, 1974.
- GIANNELLA, R. A.; BROITMAN, S. A.; ZAMCHECK, N. Influence of gastric acidity on bacterial and parasitic enteric infection: a prospective. **Ann. Inter. Med.**, v. 78, p. 271-276, 1973.
- GILL, D. M.; KING, C. A. The mechanism of action of cholera toxin in pigeon erythrocyte lysates. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 6424-6432, 1975.

- GITELSON, 1971. Apud: GUERRANT, R. L.; BOBAK, D. A. Bacterial and protozoal gastroenteritis. **N. Engl. J. Méd.**, v. 325, p. 327-340, 1991.
- GORBACH, S. L.; BARTLETT, J. G. Anaerobic Infections III. **N. Engl. J. Med.**, v. 290, p. 1189-1194, 1974.
- GOTS, R. E.; FORMAL, S. B.; GIANNELLA, R. A. Indomethacin inhibition of *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and cholera-mediated rabbit ileal secretion. **J. Infect. Dis.**, v. 130, p. 280-284, 1974.
- GOYAL, R. K.; HIRANO, I. The enteric nervous system. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, p. 1106-1115, 1996.
- GRANT, S. M.; GOAT, K. L.; FITTON, A.; SORKIN, E. M. Ketotifen: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in asthma and allergic disorders. **Drugs**, v. 100, p. 412-448, 1990.
- GUERRANT, R. L.; FANG, G. D.; THIELMAN, N. M.; FONTELES, M. C. Role of platelet activating factor (PAF) in the intestinal epithelial secretory and Chinese hamster ovary (CHO) cell cytoskeletal responses to cholera toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 9655-9658, 1994.
- GUERRANT, R. L.; HUGHES, J. M.; LIMA, N. L.; CRANE, J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, S41-S50, 1990.
- GUERRANT, R. L.; BOBAK, D. A. Bacterial and protozoal gastroenteritis. **N. Engl. J. Méd.**, v. 325, p. 327-340, 1991.
- GUERRANT, R. L. Lessons from diarrheal diseases: Demography to molecular pharmacology. **J. Infect. Dis.**, v. 169, p. 1206-1218, 1994.
- GUERRANT, R. L. Why America must care about tropical medicine: threats to global health and security from tropical infectious diseases. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 3-16, 1998.
- GUERRANT, D. I.; MOORE, S. R.; LIMA, A. A. M.; PATRICK, P.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function 4-7 years later in a poor urban community in Northeast Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 707-713, 1999.
- GUERRANT, R. L.; STEINER, T. S.; LIMA, A. A. M.; BOBAK, D. A. How intestinal bacteria cause disease. **J. Infec. Dis.**, v. 179, suppl. 2, p. S331-S337, 1999a.
- GUERRANT, R. L.; Van GILDER, T.; STEINER, T. S.; THIELMAN N. M.; SLUTSKER, L.; TAUXE, R. V.; HENNESSY, T.; GRIFFIN, P. M.; DuPONT, H.; SACK, R. B.; TARR, P.; NEILL, M.; NACHAMKIN, I.; RELLER, L. B.; OSTERHOLM, M. T.; BENNISH, M. L.; PICKERING, L. K. Practice Guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin. Infec. Dis.**, v. 32, p. 331-350, 2001.
- HANGLOW, A. C.; BIENENSTOCCK, J.; PERDUE, M. H. Effects of platelet-activating factor on ion transport in isolated rat jejunum. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. G845-G850, 1989.

- HARDCASTLE, J.; HARDCASTLE, P. T. The secretory actions of histamine in rat small intestine. **J. Physiol.**, v. 388, p. 521-532, 1987.
- HARP, J. A.; MYERS, L. L.; RICH, J. E.; GATES, N. L. Role of *Salmonella arizonae* and other infective agents in enteric disease of lambs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 42, p. 596-599, 1981.
- HEPLER, J. R.; GILMAN, A. G. G proteins. **Trends Biochem. Sci.**, v. 17, p. 383-387, 1992.
- HERSHKOVIZ, R.; LIDER, O.; BARAM, D.; RESHEF, T.; MIRON, S.; MEKORI, Y. A. Inhibition of T cell adhesion of extracellular matrix glycoproteins by histamine: a role for mast cell degranulation products. **J. Leukocyte Biol.**, v. 56, p. 495-501, 1994.
- HIGGENS, J. A.; CODE, C. F.; ORVIS, A. L. The influence of motility on the rate of absorption of sodium and water from the small intestine of healthy persons. **Gastroenterology**, v. 31, p. 708-715, 1956.
- HINES, J.; NACHAMKIN, I. Effective use of the clinical microbiology laboratory for diagnosing diarrheal diseases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 23, p. 1292-1301, 1996.
- HIRSCHHORN, N.; KINZIE, J. L.; SACHAR, D. B.; NORTHRUP, R. S.; TAYLOR, J. O.; AHMAD, S. Z.; PHILLIPS, R. A. Decrease in net stool output in cholera during intestinal perfusion with glucose-containing solutions. **N. Engl. J. Med.**, v. 279, p. 176-181, 1968.
- HLA, T.; NEILSON, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 7384-7388, 1992.
- HOLDEMAN, L. V.; KELLEY, R. W.; MORE, W. E. C. Family bacteroidaceae. Sect. 6 Anaerobic gram-negative straight, Curve and Helical Rods. *Bergey's Manual. Systematic bacteriology.* London: William y Wilkins, 1984. v. 1, p. 602-630.
- HOFSTAT, T. Virulence factors in anaerobic bacteria. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 11, p. 1044-1048, 1992.
- HOMGREN, J.; FRYKLUND, J.; LARSSON, H. gamma-interferon-mediated down-regulation of electrolyte secretion by intestinal epithelial cells: a local immune mechanism? **Scand. J. Immunol.**, v. 30, p. 499-503, 1989.
- HUANG, E.; NOCKA, K.; BEIER, D. R.; CHU, T. Y.; BUCH, J.; LAHM, H. W.; WELLNER, D.; BESMER, P. The hematopoietic growth factor KL is encoded at the St locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. **Cell**, v. 63, p. 225-233, 1990.
- HULTNER, L.; DRUEZ, C.; MOELLER, J. Mast cell growth enhancement activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P₄₀/TCGFIII. **Eur. J. Immunol.**, v. 20, p. 1413-1416, 1990.
- INAMURA, N.; MEKORI, Y. A.; BHATTACHARYYA, S. P.; BIANCHINE, P. J.; METCALFE, D. D. Induction and enhancement of Fc_εRI-dependent mast cell degranulation following co-culture with activated T cell. **J. Immunol.**, v. 160, p. 4026-4033, 1998.

- IRANI, A. A.; SCHECHTER, N. M.; CRAIG, S. S.; DEBLOIS, G.; SCHWARTZ, L. B. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease composition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 4464-4468, 1986.
- JACSON, M.P., Structure-function analysis of Shiga toxin and the Shuga-like toxins. **Microb. Pathog.**, v. 8, p. 235-242, 1990.
- JARBOE, D. L.; MARSHALL, J. S.; RANDOLPH, T. R.; KUKOLJA, A.; HUFF, T. F. The mast cell-committed progenitor. I. Description of a cell capable of IL-3-independent proliferation and differentiation without contact with fibroblasts. **J. Immunol.**, v. 142, p. 2405-2417, 1989.
- JASANI, B.; KREIL, G.; MACKLER, B. F.; STANWORTH, D. R. Further studies on structural requirements for polypeptide-mediated histamine release from rat mast cells. **Biochem. J.**, v. 181, p. 623-632, 1979.
- JONES, D. A.; CARLTON, D. P.; McINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 9049-9054, 1993.
- JOUVIN, M. H.; ADAMCZEWSKI, M.; NUMEROF, R.; LETOURNEUR, O.; VALLE, A.; KINET, J. P. Differential control of tyrosine kinase lyn and syk by two signalling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 5918-5925, 1994.
- JYONOUCHI, H.; SUN, S.; KENNEDY, C. A.; RIMELL, F. L. Interferon gamma levels in the sinus, ear, and airway in a rabbit sinusitis model induced by *Bacteroides* inoculation. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 126, p. 529-532, 2000.
- KANDIL, H.; BERSCHNEIDER, H.; ARGENZIO, A. TNF- α alters intestinal ion transport through a paracrine mechanism involving prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 102, p. A217, 1992.
- KANEGASAKI, S.; TANAMOTO, K.; YASUDA, K.; HOMMA, J. Y.; MATSUURA, M.; NAKATSUKA, M.; KUMAZAWA, Y.; YAMAMOTO, A.; SHIBA, T.; KUSUMOTO, S.; IMOTO, M.; YOSHIMURA, H.; SHIMAMOTO, T. Structure-activity relationship of lipid A: comparison of biological activities of natural and synthetic lipid A's with different fatty acid compositions. **J. Biochem.**, v. 99, p. 1203-1210, 1986.
- KAPER, J. B.; MORRIS, J. G.; LEVINE, M. M. Cholera. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 48-86, 1995.
- KAPRAL, F.A. Staphylococcus aureus delta toxin as an enterotoxin. **Ciba Found Symp.**, v. 112, p. 215-229, 1985.
- KARCHMER, A. W.; CURLIN, G.T.; HUQ, M. I.; HIRSCHHORN, N. apud WACHSMUTH, I. K.; BLAKE, P. A.; OLSVIK, Ø. **Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives**. Washington: ASM Press, 1994. cap. 15.
- KATO, N.; KARUNIAWATI, A.; JOTWANI, R.; KATO, H.; WATANABE, K.; UENO, K. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from extraintestinal sites by cell culture assay. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, suppl., p. S141, 1995.

- KATO, N.; KATO, H.; WATANABE, K.; UENO, K. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with bacteremia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 23, p. S83-S86, 1996.
- KATO, N.; LIU, C. X.; KATO, H.; WATANABE, K.; TANAKA, Y.; YAMAMOTO, T.; SUZUKI, K.; UENO, K. A new subtype of the metalloprotease toxin gene and the incidence of the three bft subtypes among *Bacteroides fragilis* isolates in Japan. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 182, p. 171-176, 2000.
- KAWAKAMI, Y.; KITAURA, J.; HATA, D.; YAO, L.; KAWAKAMI, T. Functions of Bruton's tyrosine kinase in mast and B cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 65, p. 286-290, 1999.
- KEEGAN, A. D.; PAUL, W. E. Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signaling pathways. **Immunol. Today**, v. 13, p. 63-68, 1992.
- KENNEDY, D. J.; GREENBERG, R. N.; DUNN, J. A.; ABERNATHY, R.; RYERSE, J. S.; GUERRANT, R. L. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on intestinal of mice, rats, rabbits, and piglets. **Infect. Immun.**, v. 46, p. 639-643, 1984.
- KINBERG, D. V.; FIELD, M.; JOHNSON, J.; HENDERSON, A.; GERSHON, E. Stimulation of intestinal mucosal adenyl cyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins. **J. Clin. Invest.**, v. 50, p. 1218-1230, 1971.
- KINET, J. P. The high-affinity receptor for IgE. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 2, p. 499-505, 1989.
- KINET, J. P., BLANK, U.; BRIM, A.; JOUVIN, M. H.; KUSTEN, H.; MEJAN, O., RA, C. The high-affinity receptor for immunoglobulin E: a target for therapy of allergic diseases. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 94, p. 51-55, 1991.
- KIRSHENBAUN, A. S.; KESSLER, S. W.; GOFF, J. P.; METCALFE, D. D.; Demonstration of the origin of human mast cells from cd34+ bone marrow progenitor cells. **J. Immunol.**, v. 146, p. 1410-1415, 1991.
- KITAMURA, Y.; GO, S.; HATANAKA, S. Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. **Blood**, v. 52, p. 447-452, 1978.
- KITAMURA, Y.; YOKOHAMA, M.; MATSUDA, H.; OHNO, T.; MORI, J. J. Spleen colony-forming cell as common precursor for tissue mast cells and granulocytes. **Nature**, v. 291, p. 159-160, 1981.
- KLING, J. J.; WRIGHT, R. L.; MONCRIEF, J. S.; WILKENS, T. D. Cloning and characterization of gene for the metalloprotease enterotoxin of *Bacteroides fragilis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 146, p. 279-284, 1997.
- KLIMPEL, G. R.; ASUNCION, J.; HAITHCOAT, J.; NIESEL, D. W. Cholera toxin and *Salmonella typhimurium* induce different cytokine profiles in the gastrointestinal tract. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1134-1137, 1995.
- KLIMPEL, G. R.; LANGLEY, K. E.; WYPYCH, J.; ABRAMS, J. S.; CHOPRA, A. K.; NIESEL, D. W. A role for stem cell factor (SCF): c-kit interaction(s) in the intestinal tract response to *Salmonella typhimurium* infection. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 271-276, 1996.

- KOMISAR, J.; RIVERA, J.; VEGA, A.; TSENG, J. Effects of staphylococcal enterotoxin B on rodent mast cells. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2969-2975, 1992.
- KORZENIOWSKI, O. M.; BARADA, F. ; ROUSE, J. D.; GUERRANT, R. L. Value of examination for fecal leukocytes in the early diagnosis of shigellosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 28, p. 1031-1035, 1979.
- KUJUBU, D. A.; FLETCHER, B. S.; VARNUM, B. C.; LIM, R. W.; HERSCHMAN, H. R. TS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 12866-12872, 1991.
- LASKIN, D. L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 35, p. 655-677, 1995.
- LEAL-BERUMEN, I.; CONLON, P.; MARSHALL, J. S. IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, v. 152, p. 5468-5476, 1994.
- LEVINE, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E.; CLEMENTS, M. L. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. **Microbiol. Rev.**, v. 47, p. 510-550, 1983.
- LEVINE, M. M.; KAPER, J. B.; HERRINGTON, D.; LOSONSKY, G.; MORRIS, J. G.; CLEMENTS, M. L.; BLACK, R. E.; TALL, B.; HALL, R. Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 161-167, 1988.
- LEWIS, M. J. *Vibrio*, *mobiluncus*, *gardnerella* and *spirillum*: cholera; vaginosis; rat bite fever. In: GREENWOOD, D.; SLACK, R. C. B.; PEUTHERER, J. F. (Ed.). **Medical microbiology: a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control.** 15th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1998. chapt. 31, p. 298-306.
- LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F. The biologically active leukotrienes: biosynthesis, metabolism, receptors, functions and pharmacology. **J. Clin. Invest.**, v. 73, p. 889-897, 1984.
- LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F.; SOBERMAN, R. J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway-biochemistry and relation to pathobiology in human disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 645-655, 1990.
- LIMA, A. A. M.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D.; INNES, D. J.; GUERRANT, R. L.; Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine *in vivo* and on cultured cells *in vitro*. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 582-588, 1988.
- LIMA, A. A. M.; INNES, D. J.; CHADEE, K.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D.; GUERRANT, R. L. *Clostridium difficile* toxin A interactions with mucus and early sequential histopathologic effects in rabbit small intestine. **Lab. Invest.**, v. 61, p. 419-425, 1989.
- LIMA, A. A. M.; FANG, G.; SCHORLING, J. B.; ALBUQUERQUE, L.; McAULIFFE, J. F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta. Paediatr.**, v. 47, p. 28-35, 1992.

- LIMA, A. A. M. Cholera: molecular epidemiology, pathogenesis, immunology, treatment, and prevention. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 7, p. 592-601, 1994.
- LIMA, A. A. M.; MOORE, S. R.; BARBOZA Jr., M. S.; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; NATARO, J. P.; FEDORKO, D. P.; WUHHIB, T.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea signals a critical periodo of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in Northeastern Brazil. **J. Inf. Dis.**, v. 181, p. 1643-1651, 2000.
- LIMA, A. A. M.; CARVALHO, G. H. P.; FIGUEIREDO, A. A.; GIFONI, A. R.; SOARES, A. M.; SILVA, E. A. T.; GUERRANT, R. L. Effects of na alanyl-glutamine-based oral rehydration and nutrition therapy solution on Eletrolyte and water absorption in a rat model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. **Nutrition**, v. 18, p. 458-462, 2002.
- LUNDGREN, O.; SVANVIK, J.; JIVEGARD, L. Enteric nervous system. I. Physiology and pathophysiology of the intestinal tract. **Dig. Dis. Sci.**, v. 34, p. 264-283, 1989.
- LYERLY, D. M.; KRIVAN, H. C.; WILKINS, T. D. Clostridium difficile: its disease and toxins. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, p. 1-18, 1988.
- MacGOWAN, K.; GORBACH, S. L. Anaerobes in Mixed Infections. **J. Infect. Dis.**, v. 144, p. 181-186, 1981.
- MACHADO, D. C.; HORTON, D.; HARROP, R.; PEACHELL, P. T.; HELM, B. A. Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigen specific IgE. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 2972-2980, 1996.
- MADDEN, K. B.; URBAN, J. F.; ZILTENER, H. J.; SCHRADER, J. W.; FINKELMAN, F. D.; KATONA, I. M. Antibodies to IL-3 and IL-4 suppres helminth-induced intestinal mastocytosis. **J. Immunol.**, v. 47, p. 1387-1391, 1991.
- MAEDA, H.; AKAIKE, T.; MARUA, K. apud KATO, N., KATO, H., WATANABE, K., UENO, K. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with bacteremia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 23, p. S83-S86, 1993.
- MAHIDA, Y. R.; GALVIN, A.; GRAY, T.; 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.
- MALAVIYA, R.; TWESTEN, N. J.; ROSS, E.; ABRAHAM, S. N. Mast cell degranulation induced by type 1 fimbriated *Escherichia coli* in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 1645-1653, 1994.
- MALAVIYA, R.; ROSS, E. A.; MacGREGOR, J. I.; IKEDA, T.; LETTLE, J. R.; JAKSCHIK, B. A.; ABRAHAM, S. N. Mast cell fagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. **J. Immunol.**, v. 152, p. 1907-1914, 1994a.
- MALAVIYA, R.; IKEDA, T.; ROSS, E.; ABRAHAM, S. N. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . **Nature**, v. 381, p. 77-80, 1996.

- MALAVIYA, R.; TWESTEN, N. J.; ROSS, E. A.; ABRAHAM, S. N.; PFEIFER, J. D. Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells. **J. Immunol.**, v. 156, p. 1490-1496, 1996a.
- MALAVIYA, R.; GAO, Z.; THANKAVEL, K.; van der MERWE, P. A.; ABRAHAM, S. N. The mast cell tumor necrosis factor alpha response to Fimh-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 8110-8115, 1999.
- MALAVIYA, R.; ABRAHAM, S. N. Role of leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, p. 841-846, 2000.
- MALAVIYA, R.; CHEN, C. L.; NAVARA, C.; LIU, X. P.; KEENAN, M.; WAURZYNIAK, B.; UCKUN, F. M. Treatment of allergic asthma by targeting Janus kinase 3-dependent leukotriene synthesis in mast cells with 4-(3',5'-dibromo-4'-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazoline (WHI-P97). **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 295, p. 912-926, 2000.
- MARNETT, L. J. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. **Cancer Res**, v. 52, p. 5575-5589, 1992.
- MARSH, H.; TUNNICLIFF, E. A. *apud* MYERS, L. L.; FIREHAMMER, B. D.; SHOOP, D. S.; BORDER, M. M. *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. **Infect. Immun.**, v. 44, p. 241-244, 1984.
- MARSHALL, J. S.; LEAL-BERUMEN, I.; NIELSEN, L.; GLIBETIC, M.; JORDANA, M. Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. **J. Clin. Invest.**, v. 97, p. 1122-1128, 1996.
- MATHAN, M. M.; CHANDY, G.; MATHAN, V. I. Ultrastructural changes in the upper small intestinal mucosa in patients with cholera. **Gastroenterology**, v. 109, p. 422-430, 1995.
- MATTHEWS, G.; NEHER, E.; PENNER, R. Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells. **J. Physiol.**, v. 418, p. 105-130, 1989.
- MAURER, M.; ECHTENACHER, B.; HULTNER, L.; KOLLIAS, G.; MANNEL, D. N.; LANGLEY, K. E.; GALLI, S. J. The c-kit ligand, stem cell factor, can enhance innate immunity through effects on mast cells. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 2343-2348, 1998.
- MAYRHOFER, G.; FISHER, R. Mast cells in severely T cell depleted rats and the response to infestation with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Immunology**, v. 37, p. 145-155, 1979.
- McCARDELL, B., MADDEN, J.M., SHAH, D.B. Isolation and characterization of a cytotoxin produced by *Vibrio cholerae* serogroup non-01. **can. J. Microbiol.**, v. 31, p. 711-720, 1985.
- McGEE, D. W.; ELSON, C.O.; McGHEE, J. R. Enhancing effect of cholera toxin on interleukin-6 secretion by IEC-6 intestinal epithelial cells: mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 4637-4644, 1993.

- MCKAY, D. M.; PERDUE, M. H. Intestinal epithelial function: the case for immunophysiological regulation. Cells and mediators. **Dig. Dis. Sci.**, v. 38, p. 1377-1387, 1993.
- MEKORI, Y. A.; OH, C. K.; METCALFE, D. D. IL-3 dependent mast cells undergo apoptosis on removal of IL-3. Prevention of apoptosis by *c-kit* ligand. **J. Immunol.**, v. 151, p. 3775-3784, 1993.
- MEKORI, Y. A.; METCALFE, D. D. Mast cell-T cell interactions. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 104, p. 517-523, 1999.
- MEKORI, Y.A.; METCALFE, D.D. Mast cells in innate immunity. **Immunol. Rev.**, v. 173, p. 131-140, 2000.
- METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 1033-1079, 1997.
- MOBASSALEH, M.; DONOHUE-ROLFE, A.; JACEWICZ, M., GRAND, R.J., KEUSCH, G.T. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea: evidence for a developmentally regulated glycolipid receptor for shigella toxin involved in the fluid secretory response of rabbit small intestine. **J. Infect. Dis.**, v. 157, p. 1023-1031, 1988.
- MONCRIEF, J. S.; OBISO, R.; BARROSO, L. A.; KLING, J. J.; WRIGHT, R. L.; Van TASSEL, R. L.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D. The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 175-181, 1995.
- MONTESANO, R.; ROTH, J.; ROBER, A.; ORCI, L. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. **Nature**, v. 296, p. 651, 1982.
- MORAES, H. P.; PIRES, A. R. C. **Manual de necrópsia**. Departamento de Patologia, Universidade Federal Fluminense, 2002. Disponível em: <<http://www.uff.br/mpt/manual.htm>>. Acesso em: 12 jul. 2002.
- MOREIRA, A. L.; SAMPAIO, E.P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K.A.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor α by enhancing mRNA degradation. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 1675-1680, 1993.
- MUNDY, L.M.; SEARS, C.L. Detection of toxin production by *Bacteroides fragilis*: assay development and screening of extraintestinal clinical isolates. **Clin. Infect. Dis.**, v. 23, p. 269-276, 1996.
- MYERS, L. L.; FIREHAMMER, B. D.; SHOOP, D. S.; BORDER, M. M. *Bacteroides fragilis*: a possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. **Infect. Immun.**, v. 44, p. 241-244, 1984.
- MYERS, L. L.; SHOOP, D. S.; FIREHAMMER, B. D.; BORDER, M. M. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with diarrheal disease in calves. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 1344-1347, 1985.
- MYERS, L. L.; SHOOP, D. S. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with diarrheal disease in young pigs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 48, p. 774-775, 1987.
- MYERS, L. L.; SHOOP, D. S.; STACKHOUSE, L. L.; NEWMAN, F. S.; FLAHERTY, R. J.; LETSON, G. W.; SACK, R. B. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrheal. **J. Clin Microbiol.**, v. 25, p. 2330-2333, 1987.

- MYERS, L. L.; SHOOP, D. S.; COLLINS, J. E.; BRADBURY, W. C. Diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in infant rabbits. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 2025-2030, 1989.
- MYERS, L. L.; SHOOP, D. S.; COLLINS, J. E. Rabbit model to evaluate enterovirulence of *Bacteroides fragilis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 1658-1660, 1990.
- NAOR, D. A different outlook at the phenotype-function relationships of T cell subpopulations: fundamental and clinical implications. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 62, p. 127-132, 1992.
- NASH, S.; PARKOS, C.; NUSRAT, A.; DELP, C.; MADARA, J. L. *In vitro* model of intestinal crypt abscess. A novel neutrophil-derived secretagogue activity. **J. Clin. Invest.**, v. 87, p. 1474-1477, 1991.
- OBISO, R. J., Jr.; LYERLY, D. M.; Van TASSEL, R. L.; WILKINS, T. D. Proteolytic activity of the *Bacteroides fragilis* enterotoxin causes fluid secretion and intestinal damage *in vivo*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3820-3826, 1995.
- OBISO, R. J.; AZGHANI, A. O.; WILKINS, T. D. the *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1431-1439, 1997.
- OBISO-Jr., R. J.; BEVAN, D.; WILKINS, T. D. Molecular modeling and analysis of fragilysin, the *Bacteroides fragilis* toxin. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. S153-S155, 1997a.
- OLIVER, J. M.; BURG, D. L.; WILSON, B. S.; McLAUGHLIN, J. L.; GEAAHLEN, R. L. Inhibition of mast cell Fc_εR1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 29697-29703, 1994.
- ONDERDONK, A. A.; KASPER, D. L.; CISNEROS, R. L.; BARTLETT, J. G. The capsular polysaccharide of *Bacteroides fragilis* as virulence factor: comparison of the pathogenic potential of encapsulated and unencapsulated strains. **J. Infect. Dis.**, v. 136, p. 82-89, 1977.
- PANTOSTI, A.; CERQUETTI, M.; COLANGELI, R.; D'AMBROSIO, E. Detection of intestinal and extra-intestinal strains of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* by the HT-29 cytotoxicity assay. **J. Med. Microbiol.**, v. 41, p. 191-196, 1994.
- PARKER, R. C. apud HAM, A. W.; CORMACK, D. H. **Histologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. cap. 1.
- PAUL, J. apud HAM, A. W.; CORMACK, D. H. **Histologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. cap. 1.
- PEARCE, F. L.; BEFUS, A. D.; GAULDIE, J.; BIENENSTOCK, J. Mucosal mast cells. II. Effects of anti-allergic compounds histamine secretion by isolated intestinal mast cells. **J. Immunol.**, v. 128, p. 2481-2486, 1982.
- PERDUE, M.H.; MCKAY, M.M. Integrative immunophysiology in the intestinal mucosa. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. G151-G165, 1994.
- PETERS-GOLDEN, M. Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 157, p. S227-S232, 1998.

- PETERSON, J. W.; HEJTMANCIK, K. E.; MARKEL, D. E.; CRAIG, J. P.; KUROSKY, A. Antigenic specificity of neutralizing antibody to cholera toxin. **Infect. Immun.**, v. 24, p. 774-779, 1979.
- PETERSON, J. W.; OCHOA, L. G. Role of prostaglandins and cAMP in the secretory effects of cholera toxin. **Science**, v. 245, p. 857-859, 1989.
- PETERSON, J. W.; LU, Y.; DUNCAN, S.; CANTU, J.; CHOPRA, A. K. Interactions of intestinal mediators in the mode of action of cholera toxin. **J. Med. Microbiol.**, v. 41, p. 3-9, 1994.
- PETERSON, J. W.; WHIPP, S. C. Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1452-1461, 1995.
- PIERCE, N. F. Differential inhibitory effects of cholera toxoids and ganglioside on the enterotoxin of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. **J. Exp. Med.**, v. 137, p. 1009-10023, 1973.
- PLAUT, M.; PIERCE, J. H.; WATSON, C. J.; HANLEY-HYDE, J.; NORDAN, R. P.; PAUL, W. E. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linking of Fc ϵ R1 or to calcium ionophores. **Nature**, v. 339, p. 64-67, 1989.
- PRODEUS, A. P.; ZHOU, X.; MAURER, M.; GALLI, S. J.; CARROL, M. Impaired mast cell-dependent natural immunity in C3-deficient mice. **Nature**, v. 390, p. 172-175, 1997.
- QUADRI, F.; RAQIB, R.; AHMED, F.; RAHMAN, T.; WANNERAS, C.; KUMAR, D. S.; ALAM, N. H.; MATHAN, M. M.; SVENNERHOLM, A. M. Increased Levels of Inflammatory Medators in Children and Adults Infected with *Vibrio cholerae* O1 and O139. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, p. 221-229, 2002.
- RABBANI, G.H.; GREENOUGH III, W. B. Pathophysiology and clinical aspects of cholera. In: BARUA, D.; GREENOUGH III, W. B. (Ed.), **Cholera**. New York: Plenum. p. 209-228.
- RACUSEN, L. C.; BINDER, H. J. E. Effect of prostaglandins on ion transport across isolated colonic epithelium. **Dig. Dis. Sci.**, v. 25, p. 900-904, 1980.
- REIMANN, J.; KAUFMANN, S. H. Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 9, p. 462-469, 1997.
- REITE, O. B. Comparative physiology of histamine. **Physiol. Rev.**, v. 52, p. 778-819, 1972.
- RHODIN, J. A. G.; FUJITA, H. Capillary growth in the mesentery of normal young rats. Intravital vudeo and electron microscope analyses. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 21, p. 1-34, 1989.
- RIEGLER, M.; LOTZ, M.; SEARS, C.; POTHOUKAKIS, C.; CASTAGLIUOLO, I.; WANG, C. C.; SEDIVY, R.; SOGUKOGLU, T.; COSENTINI, E.; BISCHOF, G.; FEIL, W.; TELEKY, B.; HAMILTON, G.; LaMONT, J. T.; WENZL, E. *Bacteroides fragilis* toxin 2 damages human colonic mucosa *in vitro*. **Gut**, v. 44, p. 504-510, 1999.

RIETSCHEL, E. T.; BRADE, L.; BRANDENBURG, K.; FLAD, H-D.; de JONG-LEUVENINCK, J.; KAWAHARA, K.; LINDNER, B.; LOPPNOW, H.; LÜDERITZ, T.; SCHADE, U.; SEYDEL, U.; SIDORCZYK, Z.; TACKEN, A.; ZÄHRINGER, U.; BRADE, H. Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A. **Rev. Infect. Dis.**, v. 9, p. S527-S536, 1987.

ROCHA, M. F. G.; MAIA, M. E. T.; BEZERRA, L. R. P. S.; LYERLY, GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. *Clostridium difficile* toxin A Induce the Release of Neutrophil Chemotactic Factors From Rat Peritoneal Macrophages: Role of Interleukin-1 β , Tumor Necrosis Factor Alpha, and Leukotrienes. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2740-2746, 1997.

ROCHA, M. F. G.; SOARES, A. M.; FLORES, C. A.; STEINER, T. S.; LYERLY, D. M.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Intestinal secretory factor released by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin-1 β . **Infect. Immun.**, v. 66, p. 4910-4919, 1998.

ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J.J.C.; SOARES, A. M.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Supernatants from macrophages stimulated with microcystin-LR induce an electrogenic intestinal response in rabbit ileum. **Pharmacol. Toxicol.**; v. 87, p. 46-51, 2000.

ROCHA, M. F. G.; SOARES, A. M.; LYERLY, D. M.; GUERRANT, R. L.; 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.

ROCHA, M. F.G.; AGUIAR, J. E. P.; SIDRIM, J. J. C.; COSTA, R. B.; FEITOSA, R. F. G.; LIMA, A. A. M. Role of mast cells and pro-inflammatory mediators on the intestinal secretion induced by Cholera toxin. **Infect. Immun.**, 2002. In Press.

RODRIGUEZ, B. L.; ROJAS, A.; BENITEZ, J. A. cholera toxin differentially regulates nitric oxide synthesis, tumor necrosis factor-alpha production and respiratory burst in murine macrophages. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 22, p. 193-198, 1998.

ROTSTEIN, O. D.; PRUETT, T. L.; FIEGEL, V. D.; NELSON, R. D.; SIMMONS, R. L. Succinic acid, a metabolic by-product of *Bacteroides* species, inhibits polymorphonuclear leucocyte function. **Infect. Immun.**, v. 48, p. 402-408, 1985.

ROTTEM, M.; HULL, G.; METCALFE, D.D. Demonstration of differential effects of cytokines on mast cells derived from murine bone marrow and peripheral blood mononuclear cells. **Exp. Hematol.**, v. 22, p. 1147-1155, 1994.

SACK, R. B.; MYERS, L. L.; ALMEIDO-HILL, J.; SHOOP, D. S.; BRADBURY, W. C.; REID, R.; SANTOSHAM, M. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: epidemiologic studies of its role as a human diarrhoeal pathogen. **J. Diarrhoeal Dis.**, v. 10, p. 4-9, 1992.

SACK, R. B.; ALBERT, M. J.; ALAM, K.; NEOGI, P. K.; AKBAR, M. S. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from Bangladeshi children with diarrhea: a controlled study. **J. Clin Microbiol.**, v. 32, p. 960-963, 1994.

- 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. S102-S105, 1997.
- SAHA, D. R.; NIYOGI, S. K.; NAIR, G. B.; MANNA, B.; BHATTACHARYA, S. K. Detection of faecal leucocytes & erythrocytes from stools of cholera patients suggesting an evidence of an inflammatory response in cholera. **Indian. J. Med. Res.**, v. 112, p. 5-8, 2000.
- SANFILIPPO, L.; BALWIN, T. J.; MENOZZI, M. G.; BORRIELLO, S. P.; MAHIDA, Y. R. Heterogeneity in responses by primary adult human colonic epithelial cells to purified enterotoxin of *Bacteroides fragilis*. **Gut**, v. 43, p. 651-655, 1998.
- SANFILIPPO, L.; LI, C. K. F.; SETH, R.; BALWIN, T. J.; MENOZZI, M. G.; MAHIDA, Y. R. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces the expression of IL-8 and transforming growth factor beta (TGF-beta) by human colonic epithelial cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 119, p. 456-463, 2000.
- SANTOS-NETO, M. S.; SILVA, A. C.; ROCHA, M. F. G.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. O sobrenadante de macrófagos estimulados com a toxina A do *Clostridium difficile* reduz a absorção de água e eletrólitos no modelo *in vivo* de perfusão intestinal de rato. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 11., 1996, Caxambu, MG. Resumos... p.203, A12.079.
- SCHEIFELE, D W. Role of bacterial toxins in neonatal necrotizing enterocolitis. **J. Pediatr.**, v. 117, suppl. 112, p. 215-229, 1990.
- SCHNEEBERGER, E. E.; LYNCH, R. D. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. L647-L661, 1992.
- SCHULMAN, E. S.; POST, T. J.; HENSON, P. M.; GICLAS, P. C. Differential effects of the complement peptides C5a and C5a-de-sArg on human basophil and lung mast cell histamine release. **J. Clin. Invest.**, v. 81, p. 919-923, 1988.
- SCHULTZ, S. G.; ZALUSKY, R. Ion transpor in isolated rabbit ileum. I. Short-circuit current fluxes. **J. Gen. Physiol.**, v. 47, p. 567-583, 1964.
- SEARS, C. L.; MYERS, L. L.; LAZENBY, A.; Van TASSEL, R. L. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, suppl. 2, p. 5142-5148, 1995.
- SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.**, v. 60, p. 167-215, 1996.
- SEARS, C. L. The toxins of *Bacteroides fragilis*. **Toxicon**, v. 39, p. 1737-1746, 2001.
- SEDER, R. A.; PAUL, W. E.; DAVIS, M. M.; DE ST. GROTH, B. F. The presence of IL-4 during *in vitro* priming determines the lymphokine producing potential of CD4 T cells from T cell receptor transgenic mice. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1091-1098, 1992.
- SHAOGUANG, W.; LIM, K.; HUANG, J.; SAIDI, R. F.; SEARS, C. L. *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. **Proc. Natl. Acad. USA**, v. 95, p. 14979-14984, 1998.

- SHIN, R.; ILIESCU, H.; DUMONT, A. E. Resistance to peritonitis following disruption of peritoneal mast cells. **J. Surg. Res.**, v. 45, p. 565-567, 1988.
- SHIN, J. S.; GAO, Z.; ABRAHAM, S. N. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. **Science**, v. 289, p. 785-788, 2000.
- SHOOP, D. S.; MYERS, L. L.; LeFEVER, J. B. Enumeration of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in municipal sewage. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2243-2244, 1990.
- SIDDIQUE, A. K.; BAQUI, A. H.; EUSOF, A.; HAIDER, K.; HOSSAIN, M. A.; BASIR, I.; ZAMAN, K. Survival of classic cholera in Bangladesh. **Lancet**, v. 337, p. 1125-1127, 1991.
- SILVA, T. M.; SCHLEUPNER, M. A.; TACKET, C. O.; STEINER, T. S.; KAPER, J. B.; EDELMAN, R.; GUERRANT, R. New evidence for an inflammatory component in diarrhea caused by selected new, live attenuated cholera vaccines and by El Tor and Q139 *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2362-2364, 1996.
- SILVA, A. C.; SANTOS-NETO, M. S.; SOARES, A. M.; FONTELES, M. C.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. M. Efficacy of a glutamine-based oral rehydration solution on the electrolyte and water absorption in a rabbit model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nut.**, v. 26, p. 513-519, 1998.
- SIMON, G. L.; GORBACH, S. L. Intestinal health and disease. **Gastroenterology**, v. 86, p. 174-193, 1984.
- SMITH, H. W.; CRABB, W. E. The faecal bacterial flora of animal and man: its development in the young. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 82, p. 53-66, 1961.
- SMITH, H. W.; LINGGOOD, M. A. Observations of the pathogenic properties of the K88, Hly, and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 4, p. 467-485, 1971.
- SMITH, S. A.; MONTZKA, D. P.; McCAFFERTY, G. P.; WASSERMAN, M. A.; FONDACARO, J. D. Effect of sulfidopeptide leukotrienes D₄ and E₄ on ileal ion transport in the rat and rabbit. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. G175-G183, 1988.
- SMITH, W. L.; MARNETT, L. J. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1083, p. 1-17, 1991.
- SMITH, W. L.; MARNETT, L. J.; DeWITT, D. L. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. **Pharmacol. Ther.**, v. 49, p. 153-179, 1991.
- SNYDER, J. D.; MERSON, M. H. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. **Bull. World Health Organ.**, v. 60, p. 605-613, 1982.
- SOARES, A. M.; FREIRE, J. E., Jr.; LIMA, A. A. M. Transport of glutamine, alanine and glucose by rabbit intestinal membrane. **Br. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 111-113, 1991.
- SONODA, T.; KITAMURA, Y.; HAKU, Y.; HARA, H.; MORI, K. J. Mast cell precursors in various hematopoietic colonies of mice produced in vivo and in vitro. **Br. J. Haematol.**, v. 53, p. 611-620, 1983.

- SORIANI, M.; BAILEY, L.; HIRST, T. R Contribution of the ADP-ribosylating and receptor-binding properties of cholera-like enterotoxins in modulating cytokine secretion by human intestinal epithelial cells. **Microbiology**, v. 148, p. 667-676, 2002.
- SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by anti-macrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.
- 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**, v. 91, p. 281-288, 1997.
- SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 622-647, 1992.
- STEFANOVA, I.; HOREJSI, V.; ANTSOTEGUI, I. J.; KNAPP, W.; STOCKINGER, H. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. **Science**, v. 254, p. 1016-1019, 1991.
- STEINER, T. S.; LIMA, A. A. M.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 88-96, 1998.
- TERR, A. I. Inflammation. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. (Ed.) **Medical immunology**. 9th ed. Stanford: Appleton & Lange, 1997. cap. 12, p. 182-195.
- SURPRENANT, A. Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 56, p. 117-140, 1994.
- THEODOROU, V.; EUTAMENE, H.; FIORAMONTI, J.; JUNIEN, J.L.; BUENO, L. Interleukin 1 induces a neurally mediated colonic secretion in rats: Involvement of mast cells and prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 196, p. 1493-1500, 1994.
- THIELMANN, M.; MARCINKIEWICZ, M.; SAROSIEK, J.; FANG, G. D.; GUERRANT, R. L. The role of platelet activating factor in Chinese hamster ovary cell responses to cholera toxin. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 1999-2004, 1997.
- 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.
- TRUCKSIS, M.; GALEN, J. E.; MICHALSKI, J.; FASANO, A.; KAPER, J. B. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 5267-5271, 1993.
- ULEVITCH, R. J.; COCHRANE, C. G.; HENSON, P. M.; MORRISON, D. C.; DOE, W. F. Mediation systems in bacterial lipopolysaccharide-induced hypotension and disseminated intravascular coagulation. I. The role of complement. **J. Exp Med**, v. 142, p. 1570-1590, 1975.

- ÜSSING, H. H.; ZERAHN, K. Active transport of sodium as the source of electrical current in the short circuited frog skin. **Acta Physiol. Scan.**, v. 23, p. 110-117, 1951.
- VAN FURTH, R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. **Curr. Top. Pathol.**, v. 79, p. 125, 1988.
- VANE, J. Towards a better aspirin. **Nature**, v. 367, p. 215-216, 1994.
- VANNER, S.; JIANG, M. M.; SURPRENANT, A. Mucosal stimulation evokes vasodilation in submucosal arterioles by neuronal and nonneuronal mechanisms. **Am J. Physiol.**, v. 264, p. G202-G212, 1993.
- Van TASSEL, R. L.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D. Production of antisera against the enterotoxin of *Bacteroides fragilis* and their use in a cytotoxicity neutralization assay of HT-29 cells. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 1, p. 473-476, 1994.
- VIANA, C. F. G.; MELO, D. H.; CARNEIRO-FILHO, B. A.; MICHELIN, M. A.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, F. Q.; LIMA, A. A. M.; RIBEIRO, R. A. Pro-inflammatory effects of cholera toxin: role of tumor necrosis factor alpha. **Toxicon**, v. 40, p. 1487-1494, 2002.
- VOLBERG, T.; ZICK, Y.; DROR, R.; SABANAY, I.; GILON, C.; LEVITZKI, A.; GEIGER, B. The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens-type junctions. **EMBO J.**, v. 11, p. 1733-1742, 1992.
- WASSERMAN, S. I.; BARRETT, K. E.; HUOTT, P. A.; BEUERLEIN, G.; KAGNOFF, M. F.; DHARMSATHAPHORN, K. Immune-related intestinal Cl⁻ secretion. I. Effect of histamine on the T84 cell line. **Am. J. Physiol.**, v. 254, p. C53-C62, 1988.
- WEIKEL, C. S.; GRIECO, F. D.; REUBEN, J.; MYERS, L. L.; SACK, R. B. Human colonic epithelial cells, HT29/C₁, treated with crude *Bacteroides fragilis* enterotoxin dramatically alter their morphology. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 321-327, 1992.
- WEIL, M. H.; SPINK, W. W. A comparison of shock due to endotoxin with anaphylactic shock. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 50, p. 501-515, 1957.
- WELSH, J.K.; MAY, J.T. Anti-infective properties of breast milk. **J. Pediatr.**, v. 94, p. 1-9, 1979.
- WOJECKA-LUKASIK, E.; MASLINSKI, S. Fibronectin and fibrinogen degradation products stimulate PMN leukocyte and mast cell degranulation. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 43, p. 173-181, 1992.
- WOLTMANN, A.; GANGLOFF, S. C.; BRUCH, H. P.; RIETSCHEL, E. T.; SOLBACH, W.; SILVER, J.; GOYERT, S. M. Reduced bacterial dissemination and liver injury in CD14-deficient mice following a chronic abscess-forming peritonitis induced by *Bacteroides fragilis*. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 187, p. 149-156, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World Health report 1996: fighting disease, fostering development.** Report of the Director-General. Geneva, 1996.

WU, S.; DREYFUS, L. A.; TZIANABOS, A. O.; FRANCO, A. A.; HAYASHI, C.; SEARS, C. L. Diversity of the metalloprotease toxin produce by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 2463-2471, 2002.

YAMAGUCHI, M.; SAYAMA, K.; YANO, K.; LANTZ, C. S.; NOBEN-TRAUTH, N.; RA, C.; COSTA, J. J.; GALLI, S. J. IgE enhances Fc ϵ receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fc ϵ receptor I expression and mediator release. **J. Immunol.**, v. 162, p. 5455-5465, 1999.

YAMAMURA, H.; NABE, T.; KOHNO, S.; OHATA, K. Endothelin 1, one of the most potent histamine releasers in mouse peritoneal mast cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 265, p. 9-15, 1994.

_____. Mechanism of histamine release by endothelin-1 distinct from that by antigen in mouse bone marrow-derived mast cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 288, p. 269-275, 1995.

YAMASHITA, T.; MAO, S. Y.; METZGER, H. Aggregation of the high affinity IgE receptor and enhanced activity of p53/56lyn protein-tyrosine kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 91, p. 11251-11255, 1994.

YAN, Z.; YANG, D. C.; JETT, M. Cholera toxin induces tumor necrosis factor alpha production in human monocytes. **Mol. Cell Biol. Res. Commun.**, v. 2, p. 124-130, 1999.

YOKOYAMA, C.; TANABE, T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 165, p. 888-894, 1989.

YOUNG, J.D.-E.; LIU, C.-C.; BUTLER, G.; COHN, Z. A.; GALLI, S. J. Identification, purification, and characterization of a mast cell-associated cytolytic factor related to tumor necrosis factor. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 84, p. 9175-9179, 1987.

ZALEZNIK, D. F.; ZHANG, Z.; ONDERDONK, A. B.; KASPER, D. L. Effect of subinhibitory doses of clindamycin on the virulence of *Bacteroides fragilis*: role of lipopolysaccharide. **J. Infect. Dis.**, v. 154, p. 40-46, 1986.

ZHANG, J. P.; NORMARK, S. Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. **Science**, v. 273, p. 1234-1236, 1996.

ZSEBO, L. M.; WYPYCH, J.; McNIECE, I. K. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. **Cell**, v. 63, p. 195-201, 1990.

ZUND, G.; MADARA, J. L.; DZUS, A. L.; AWTREY, C. S.; COLGAN, S. P. Interleukin-4 and interleukin-13 differentially regulate epithelial chloride secretion. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 7460-7464, 1996.