

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**Departamento de Fisiologia e Farmacologia**

**Estudo Comparativo de Parâmetros Elétricos na Absor-  
ção de Substratos Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Dependentes em Epitélio  
Jejunal e Ileal de Coelho em Câmaras de Ussing**

**Eduardo Augusto Torres da Silva**

**Fortaleza-Ceará**

**2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**Departamento de Fisiologia e Farmacologia**

**Estudo Comparativo de Parâmetros Elétricos na Absorção de Substratos  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Dependentes em Epitélio Jejunal e Ileal de Coelho em Câmaras de Ussing**

Eduardo Augusto Torres da Silva

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Doutor

Orientador:

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles

**Fortaleza-Ceará**

**2002**

S579e Silva, Eduardo Augusto Torres da

**Estudo Comparativo de Parâmetros Elétricos na Absorção de Substratos Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Dependentes em Epitélio Jejunal e Ileal de Coelho em Câmaras de Ussing** / Eduardo Augusto Torres da Silva. – Fortaleza, 2002.

182 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles.  
Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará.  
Faculdade de Medicina.

1. Câmara de perfusão. 2. Sistemas de transporte de aminoácidos. 3. Dipeptídeos / Fisiologia. 4. Diarréia. 5. Toxina da cólera. I. Título.

CDD 612.01575

# **Estudo Comparativo de Parâmetros Elétricos na Absorção de Substratos $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Dependentes em Epitélio Jejunal e Ileal de Coelho em Câmaras de Ussing**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Data da Aprovação: **29 de Maio de 2002**

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima  
(co-Orientador)

---

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

---

Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

---

Prof. Dr. David Neil Criddle

*Aos meus pais*

*Honor Torres da Silva*

*e*

*Angélica Ellery Torres da Silva*

*Por tudo que fizeram por mim*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Aldo Ângelo Moreira Lima** que, além de me orientar os primeiros passos neste mundo fantástico das membranas epiteliais, colocou à minha disposição, de forma gentil e desinteressada, todo seu equipamento, materiais e instalações, sem os quais não poderia realizar este trabalho.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Estadual do Ceará Prof. Dr. **Manassés Claudino Fonteles**, meu orientador, cuja tenaz insistência me levou a concluir esta tese.

Ao Prof. Dr. **Alberto de Melo Soares**, meu amigo e colega, que, com suas críticas e observações sempre pertinentes, além do inestimável auxílio na apresentação final deste trabalho, considero co-partícipe do mesmo.

A todos os meus colegas, **técnicos administrativos** e **docentes** do Depto. de Fisiologia e Farmacologia da UFC, cujo carinho, compreensão, paciência e incentivo me permitiram concluir esta tarefa. A todos eles, minha perene gratidão.

Ao Prof. Dr. **Carlos Maurício de Castro Costa** por ter me permitido “invadir” seu laboratório e usufruir de seu funcionário e equipamentos (computador e impressora).

À Sra. **Terezinha Freire França** pelo seu fundamental auxílio técnico, ao Sr. **José Amadeus Souza** que não permitiu a falta de material, e ao Sr. **Jociê Andrade da Silva** que garantiu o suprimento de animais nas melhores condições possíveis.

Ao Sr. **Sílvio Alves Costa** pela dedicação e atenção ao trabalho de digitação desta tese.

## SUMÁRIO

|   |       |
|---|-------|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....                                 | viii  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....                                 | xiii  |
| <b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....                             | xv    |
| <b>RESUMO</b> .....   | xviii |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | xix   |
| <br>  |       |
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....                                       | 1     |
| 1. Transporte de Íons e Água.....                             | 1     |
| 2. Canais Apicais de Cloreto.....                             | 6     |
| 3. Transporte de Nutriente Na <sup>+</sup> -Dependentes.....  | 9     |
| 4. Diarréias Infecciosas.....                                 | 14    |
| 5. Cólera.....  | 16    |
| 6. Terapia com Solução de Reidratação Oral.....               | 20    |
| 7. Importância da Glutamina no Metabolismo do Enterócito..... | 22    |
| 8. Desenvolvimento de Novas Soluções de Reidratação Oral..... | 23    |
| 9. Relevância e Justificativa.....                            | 24    |
| 10. Objetivos.....  | 26    |
| <br>  |       |
| <b>MATERIAL &amp; MÉTODOS</b> .....                           | 27    |
| 1. Animais Utilizados.....                                    | 27    |
| 2. Procedimento Cirúrgico.....                                | 27    |
| 3. Preparo dos Fragmentos de Membrana.....                    | 29    |
| 4. Montagem dos Fragmentos de Tecido.....                     | 29    |
| 5. Princípio de Funcionamento das Câmaras de Ussing.....      | 31    |
| 6. Sistema de Perfusão/Aeração das Câmaras de Ussing.....     | 37    |
| 7. Ajuste da Resistência Intrínseca do Sistema.....           | 37    |
| 8. Soluções Perfusoras.....                                   | 40    |

|  |           |
|--|-----------|
| 9. Substratos Utilizados nos Experimentos.....   | 40        |
| 10. Fase Experimental.....   | 41        |
| 11. Tratamento Estatístico.....  | 42        |
| <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>43</b> |
| 1. Ação da Glicose sobre Jejuno.....   | 43        |
| 2. Ação da Glicose sobre Íleo.....   | 48        |
| 3. Comparação entre os Resultados da Ação da Glicose sobre Jejuno e sobre Íleo nos Grupos Controle e Toxina.....                                     | 53        |
| 4. Ação da Glutamina sobre Jejuno.....   | 54        |
| 5. Ação da Glutamina sobre Íleo.....   | 59        |
| 6. Comparação entre os Resultados da Ação da Glutamina sobre Jejuno e sobre Íleo nos Grupos Controle e Toxina.....                                   | 64        |
| 7. Ação da Alanina sobre Jejuno.....   | 65        |
| 8. Ação da Alanina sobre Íleo.....   | 70        |
| 9. Comparação entre os Resultados da Ação da Alanina sobre Jejuno e sobre Íleo nos Grupos Controle e Toxina.....                                     | 75        |
| 10. Ação da Glicina sobre Jejuno.....  | 76        |
| 11. Ação da Glicina sobre Íleo.....  | 81        |
| 12. Comparação entre os Resultados da Ação da Glicina sobre Jejuno e sobre Íleo nos Grupos Controle e Toxina.....                                    | 86        |
| 13. Ação da Alanil-Glutamina sobre Jejuno.....   | 87        |
| 14. Ação da Alanil-Glutamina sobre Íleo.....   | 92        |
| 15. Comparação entre os Resultados da Ação da Alanil-Glutamina sobre Jejuno e sobre Íleo nos Grupos Controle e Toxina.....                           | 97        |
| 16. Resultados Gerais das Correntes de Curto-Circuito Basais nos Segmentos Intestinais Jejuno e Íleo com e sem a Influência da Toxina de Cólera..... | 98        |

|  |     |
|--|-----|
| 17. Resultados Gerais das Diferenças de Potencial Transepitelial Basal nos Segmentos Intestinais Jejuno e Íleo com e sem a Influência da Toxina de Cólera.....   | 100 |
| 18. Resultados Gerais das Resistências Transepteliais Basais nos Segmentos Intestinais Jejuno e Íleo com e sem a Influência da Toxina de Cólera.....   | 102 |
| 19. Resultados Comparativos Globais da Adição Cumulativa dos Substratos Glicose, Glutamina, Alanina, Glicina e Alanil-Glutamina Sobre os Segmentos Intestinais Jejuno e Íleo com e sem a Influência da Toxina de Cólera..... | 105 |
| <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 109 |
| 1. Adição de Glicose no Jejuno e no Íleo.....  | 116 |
| 2. Adição de Glutamina no Jejuno e no Íleo.....  | 118 |
| 3. Adição de Alanina no Jejuno e no Íleo.....  | 120 |
| 4. Adição de Glicina no Jejuno e no Íleo.....  | 121 |
| 5. Adição de Alanil-Glutamina no Jejuno e no Íleo.....   | 122 |
| 6. Curvas de Significância.....  | 124 |
| <b>CONCLUSÕES</b> .....  | 129 |
| <b>BIBLIOGRAFIA CONSULTADA</b> .....   | 131 |
| <b>ANEXOS</b> .....  | 152 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Representação Esquemática dos Transportes de Íons e Água no Enterócito.....  | 5  |
| <b>Figura 2</b> - Ação da Teofilina e da Toxina Termo-Lábil do <i>E. coli</i> .....  | 8  |
| <b>Figura 3</b> - Localização das Proteínas de Membrana Transportadoras do Enterócito.....   | 13 |
| <b>Figura 4</b> - Modo de Ação da Toxina do Cólera.....  | 19 |
| <b>Figura 5</b> - Alças Intestinais Isoladas.....  | 28 |
| <b>Figura 6</b> - Montagem dos Fragmentos de Tecido.....   | 30 |
| <b>Figura 7</b> - Representação Esquemática das Câmaras de Ussing.....   | 32 |
| <b>Figura 8</b> - Sistema Simplificado de um Fixador de Voltagem.....  | 34 |
| <b>Figura 9</b> - Câmaras de Perfusão e suas Conexões ao Fixador de Voltagem..   | 36 |
| <b>Figura 10</b> - Aparelho Fixador de Voltagem.....   | 38 |
| <b>Figura 11</b> - Circuito Esquemático do Fixador de Voltagem com Compensação de $R_{sis}$ .....  | 39 |
| <b>Figura 12</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$ versus Log [M]) da Glicose Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal..... | 45 |
| <b>Figura 13</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$ versus Log [M]) da Glicose Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal..... | 46 |
| <b>Figura 14</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$ versus Log [M]) da Glicose Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal..... | 47 |
| <b>Figura 15</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$ versus Log [M]) da Glicose Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....      | 50 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 16</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$ <i>versus</i> Log [M]) da Glicose Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....        | 51 |
| <b>Figura 17</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$ <i>versus</i> Log [M]) da Glicose Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....        | 52 |
| <b>Figura 18</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$ <i>versus</i> Log [M]) da Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal..... | 56 |
| <b>Figura 19</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$ <i>versus</i> Log [M]) da Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal..... | 57 |
| <b>Figura 20</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$ <i>versus</i> Log [M]) da Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal..... | 58 |
| <b>Figura 21</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$ <i>versus</i> Log [M]) da Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....      | 61 |
| <b>Figura 22</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$ <i>versus</i> Log [M]) da Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....      | 62 |
| <b>Figura 23</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$ <i>versus</i> Log [M]) da Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....      | 63 |
| <b>Figura 24</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$ <i>versus</i> Log [M]) da Alanina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal.....   | 67 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 25</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$ versus Log [M]) da Alanina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal..... | 68 |
| <b>Figura 26</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$ versus Log [M]) da Alanina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal..... | 69 |
| <b>Figura 27</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$ versus Log [M]) da Alanina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....      | 72 |
| <b>Figura 28</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$ versus Log [M]) da Alanina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....      | 73 |
| <b>Figura 29</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$ versus Log [M]) da Alanina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....      | 74 |
| <b>Figura 30</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$ versus Log [M]) da Glicina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal..... | 78 |
| <b>Figura 31</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$ versus Log [M]) da Glicina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal..... | 79 |
| <b>Figura 32</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$ versus Log [M]) da Glicina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal..... | 80 |
| <b>Figura 33</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$ versus Log [M]) da Glicina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....      | 83 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 34</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$ versus Log [M]) da Glicina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....              | 84  |
| <b>Figura 35</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$ versus Log [M]) da Glicina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....              | 85  |
| <b>Figura 36</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$ versus Log [M]) da Alanil-Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunó Proximal..... | 89  |
| <b>Figura 37</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$ versus Log [M]) da Alanil-Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunó Proximal..... | 90  |
| <b>Figura 38</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$ versus Log [M]) da Alanil-Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunó Proximal..... | 91  |
| <b>Figura 39</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$ versus Log [M]) da Alanil-Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....     | 94  |
| <b>Figura 40</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$ versus Log [M]) da Alanil-Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....     | 95  |
| <b>Figura 41</b> - Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$ versus Log [M]) da Alanil-Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.....     | 96  |
| <b>Figura 42</b> - Valores Médios Basais das Correntes de Curto-Circuito no Jejunó e no Íleo.....  | 99  |
| <b>Figura 43</b> - Valores Médios Basais das Diferenças de Potencial Trans-epitelial no Jejunó e no Íleo.....  | 101 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 44</b> - Valores Médios Basais das Resistências Transepiteliais no Jeuno e no Íleo.....                   | 104 |
| <b>Figura 45</b> - Incremento das Correntes de Curto-Circuito com a Adição Cumulativa de Substratos.....            | 106 |
| <b>Figura 46</b> - Incremento das Diferenças de Potencial Transepitelial com a Adição Cumulativa de Substratos..... | 107 |
| <b>Figura 47</b> - Incremento das Resistências Transepiteliais com a Adição Cumulativa de Substratos.....           | 108 |
| <b>Figura 48</b> - Modelo Elétrico do Enterócito.....   | 112 |
| <b>Figura 49</b> - Modelo de Regulação da Resistência Paracelular.....  | 128 |

**LISTA DE TABELAS**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> - Classificação dos Sistemas de Transporte de Aminoácidos.....   | 13 |
| <b>Tabela 2</b> - Concentração em mM dos Principais Íons em Fezes Diarréicas..   | 15 |
| <b>Tabela 3</b> - Composição Básica da Solução de Reidratação Oral.....  | 21 |
| <b>Tabela 4</b> - Resultados da Ação da Glicose sobre Jejuno no Grupo Controle (n = 6) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 7). Sumário dos valores dos Anexos 2 e 3.....    | 44 |
| <b>Tabela 5</b> - Resultados da Ação da Glicose sobre Íleo no Grupo Controle (n = 6) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 6). Sumário dos valores dos Anexos 4 e 5.....      | 49 |
| <b>Tabela 6</b> - Resultados da Ação da Glutamina sobre Jejuno no Grupo Controle (n = 4) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 6). Sumário dos valores dos Anexos 6 e 7.....  | 55 |
| <b>Tabela 7</b> - Resultados da Ação da Glutamina sobre Íleo no Grupo Controle (n = 8) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 5). Sumário dos valores dos Anexos 8 e 9.....    | 60 |
| <b>Tabela 8</b> - Resultados da Ação da Alanina sobre Jejuno no Grupo Controle (n = 3) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 3). Sumário dos valores dos Anexos 10 e 11.....  | 66 |
| <b>Tabela 9</b> - Resultados da Ação da Alanina sobre Íleo no Grupo Controle (n = 3) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 3). Sumário dos valores dos Anexos 12 e 13.....    | 71 |
| <b>Tabela 10</b> - Resultados da Ação da Glicina sobre Jejuno no Grupo Controle (n = 4) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 6). Sumário dos valores dos Anexos 14 e 15..... | 77 |
| <b>Tabela 11</b> - Resultados da Ação da Glicina sobre Íleo no Grupo Controle (n = 5) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 5). Sumário dos valores dos Anexos 16 e 17.....   | 82 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 12</b> - Resultados da Ação da Alanil-Glutamina sobre Jejuno no Grupo Controle (n = 5) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 5). Sumário dos valores dos Anexos 18 e 19..... | 88  |
| <b>Tabela 13</b> - Resultados da Ação da Alanil-Glutamina sobre Íleo no Grupo Controle (n = 5) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 5). Sumário dos valores dos Anexos 20 e 21.....   | 93  |
| <b>Tabela 14</b> - Equações de Tendência.....   | 126 |

## LISTA DE ABREVIACÕES

|                         |   |
|-------------------------|---|
| AMPC                    | - Monofosfato de adenosina cíclico  |
| AC                      | - Adenililciclase   |
| PDE                     | - Fosfodiesterase   |
| TL                      | - Toxina termo-lábil da <i>E. coli</i>  |
| AA                      | - Aminoácido  |
| SGLT1                   | - Co-transportador Na <sup>+</sup> -glicose tipo 1  |
| GLUT2                   | - Transportador de glicose tipo 2   |
| Sistema A               | - Transportador Na <sup>+</sup> -dependente de aminoácidos neutros pequenos                             |
| Sistema ASC             | - Transportador Na <sup>+</sup> -dependente de aminoácidos neutros (Thr)                                |
| Sistema B               | - Transportador Na <sup>+</sup> -dependente de aminoácidos neutros                                      |
| Sistema B <sup>0+</sup> | - Transportador Na <sup>+</sup> -dependente de aminoácidos com preferência por prolina                  |
| Sistema b <sup>0+</sup> | - Transportador não Na <sup>+</sup> -dependente   |
| Sistema IMINO           | - Transportador Na <sup>+</sup> -dependente de aminoácidos com preferência por prolina e hidroxiprolina |
| Sistema L               | - Transportador Na <sup>+</sup> -dependente de L-isómeros   |
| Sistema Xag             | - Transportador Na <sup>+</sup> -dependente com preferência por ácido aspártico e glutâmico             |
| Sistema y <sup>+</sup>  | - Transportador não Na <sup>+</sup> -dependente com preferência por lisina e arginina                   |
| PEPT1                   | - Transportador de peptídeos H <sup>+</sup> -dependentes  |
| mRNA                    | - Ácido ribonucleico mensageiro   |
| cDNA                    | - Ácido deoxiribunucleico complementar  |
| GM1                     | - Monosialosilgnaglisídeo   |

|                            |  |
|----------------------------|--|
| ADP                        | - Adenosina difosfato                        |
| NAD                        | - Nicotinamida                               |
| GTP                        | - Guanosina trifosfato                       |
| ATP                        | - Adenosina trifosfato                       |
| Gal                        | - Galactose                                  |
| Glc                        | - Glicose                                    |
| GalNAc                     | - Ácido N-acetilgalactosamina                |
| NANA                       | - Ácido N-acetilneuramínico                  |
| GI                         | - Gastrintestinal                            |
| $i_{cc}$                   | - Corrente de curto-circuito                 |
| $V_{TE}$                   | - diferença de potencial transepitelial      |
| $R_{TE}$                   | - Resistência transepitelial                 |
| PBS                        | - Solução salina tamponada com fosfato       |
| HC                         | - Hemicâmara                                 |
| $E_1, E_2, E_3 \dots$ Eliq | - Potenciais de junção líquida               |
| $V_{sis}$                  | - Diferença de potencial gerada pelo sistema |
| $R_{sis}$                  | - Resistência intrínseca do sistema          |
| POT                        | - Potenciômetro                              |
| ddp                        | - diferença de potencial                     |
| epm                        | - Erro padrão da média                       |
| R                          | - Resistor, resistência                      |
| $i$                        | - Corrente elétrica                          |
| V                          | - Voltagem, tensão                           |
| NHE3                       | - Trocador $Na^+ - H^+$ isoforma 3           |
| Ocl                        | - Ocludina (proteína transmembrana)          |
| Cad                        | - Caderina (proteína transmembrana)          |
| Ac                         | - Actina                                     |
| M II                       | - Miosina tipo II                            |

|     |                   |
|-----|-------------------|
| Tyr | - Tirosina        |
| Phe | - Fenilalanina    |
| Trp | - Triptofano      |
| Asp | - Ácido aspártico |
| Ile | - Isoleucina      |
| Cys | - Cisteína        |
| Ser | - Serina          |
| Leu | - Leucina         |
| Val | - Valina          |
| Glu | - Glutamato       |
| Ala | - Alanina         |
| Gly | - Glicina         |
| Thr | - Treonina        |

## RESUMO

### **Estudo Comparativo de Parâmetros Elétricos na Absorção de Substratos $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Dependentes em Epitélio Jejunal e Ileal de Coelho em Câmaras de Ussing**

Eduardo Augusto Torres da Silveira. Orientador: Manassés Claudino Fonteles. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará

A cólera é uma doença que se tornou endêmica no Nordeste do Brasil após a pandemia iniciada no Peru em 1991. A toxina do *Vibrio cholerae* (TC) causa potente ação secretória no intestino delgado, podendo levar a desequilíbrio hidro-eletrolítico e choque hipovolêmico nos pacientes com cólera. Postulamos que a administração de substratos, tais como aminoácidos e di-peptídeos à base de glutamina, possa aumentar a absorção de sódio e água no intestino, reduzindo parcialmente as perdas hidro-eletrolíticas na doença. Este trabalho tem como objetivo estudar a farmacodinâmica da absorção de substratos  $\text{Na}^+$  e/ou  $\text{H}^+$ -dependentes no intestino delgado de coelho normal e naquele pré-tratado com a TC. A administração de substratos com mecanismos de absorção  $\text{Na}^+$ -dependentes pode contrabalançar parcialmente as perdas hídricas e eletrolíticas. Outros substratos, tais como os di- e tri-peptídeos, que apresentam mecanismos de absorção próton-dependentes, também possuem propriedades semelhantes. Estas reflexões nos levaram a estudar os efeitos da toxina de cólera sobre os parâmetros elétricos de dois segmentos intestinais (jejuno e íleo). Alças de jejuno proximal e de íleo distal foram isoladas *in vivo* e injetadas com 5 ml de toxina de cólera (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) em solução fisiológica (grupo experimental) ou igual volume de solução fisiológica (grupo controle). Após 1 hora de incubação com a toxina, as alças foram retiradas, dissecadas da membrana serosa e abertas. Os fragmentos planos foram montados em câmaras de perfusão com temperatura e oxigenação controladas. O lado mucoso foi perfundido por solução sem glicose (substituída por manitol), enquanto que o lado seroso por solução glicosada. Após estabilização, foram adicionados cumulativamente substratos em concentrações que variam de  $1 \times 10^{-5}$  a  $1,7 \times 10^{-3}$  M. Os parâmetros elétricos corrente de curto-circuito ( $i_{\text{cc}}$ ), diferença de potencial transepitelial ( $V_{\text{TE}}$ ) e resistência transepitelial ( $R_{\text{TE}}$ ) foram medidos em câmaras de Ussing, antes e durante o período de adição de substratos. Foi observado que: 1) a toxina de cólera aumentou significativamente estes parâmetros, com exceção da  $R_{\text{TE}}$ , nos fragmentos de íleo; 2) a adição de substratos de absorção  $\text{Na}^+$ -dependentes nos fragmentos pré-incubados com toxina de cólera sempre provocou um aumento da  $R_{\text{TE}}$  significativamente maior do que aquele observado nos fragmentos controle, o mesmo ocorrendo com relação à  $V_{\text{TE}}$ , mas com redução da  $i_{\text{cc}}$ ; e 3) o di-peptídeo alanil-glutamina não causou alteração na  $R_{\text{TE}}$ , mas aumentou significativamente a  $i_{\text{cc}}$  tanto nas preparações normais como nas pré-incubadas. Esses resultados indicam uma possível ligação entre os mecanismos de transporte de substratos  $\text{Na}^+$ -dependentes e os mecanismos reguladores da resistência paracelular, fenômeno não observado na absorção do substrato  $\text{H}^+$ -dependente.

## ABSTRACT

Cholera is a disease that became endemic in Brazil Northeastern after the pandemic initiated in Peru in 1991. Cholera toxin causes a potent intestinal secretion effect, resulting in significant loss of hydro-electrolyte balance and hypovolemic shock in patients with cholera. We postulate that the administration of substrates, such as amino acids and di-peptide-based glutamine, may increase intestinal sodium and water absorption, resulting in partial decrease of hydro-electrolyte loss in this disease. The aim of this work is to study the pharmacodynamic of  $\text{Na}^+$  and/or  $\text{H}^+$ -dependent substrates in the rabbit normal small bowel and in the pre-treated with cholera toxin. The administration of substrates with sodium-dependent absorption could, partially, counterbalance the water and electrolyte losses. Other substrates such as di- and tri-peptides presenting mechanisms of proton-dependent absorption also reveal similar properties. The above facts encouraged the development of this comparative study about the effect of cholera toxin on jejunum and ileum absorptive functions. The proximal jejunum and distal ileum loops were isolated *in vivo* and injected with 5 ml of cholera toxin (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in saline (experimental group) or equal volume of saline alone (control group). After 1 hour of toxin incubation, the jejunum and ileum loops were excised, freed of their serosa membrane and opened. The fragments were mounted in perfusion chambers with temperature and oxygen control. The mucosal side was perfused with glucose-free physiological solution (substituted by mannitol) and the serosal side by physiological solution with glucose. After stabilization, substrates from  $1 \times 10^{-5}$  to  $1.7 \times 10^{-3}$  M were cumulatively added. The electric parameters of short circuit current ( $i_{\text{cc}}$ ), transepithelial potential difference ( $V_{\text{TE}}$ ) and transepithelial resistance ( $R_{\text{TE}}$ ) were measured in Ussing chambers before and during the period of substrate addition. It was observed that: 1) the presence of cholera toxin increased significantly those parameters, except for  $R_{\text{TE}}$ , in ileum fragments; 2) the addition of substrates presenting sodium-dependent absorption onto cholera toxin pre-incubated fragments always provoked an increase of  $R_{\text{TE}}$  larger than that observed with control fragments. The same occurred with  $V_{\text{TE}}$ , except for reduction of  $i_{\text{cc}}$ ; and 3) the di-peptide alanyl-glutamine did not alter the  $R_{\text{TE}}$  but increased significantly the  $i_{\text{cc}}$  both in normal and pre-incubated preparations. These results indicate a probable link between the transport mechanisms of  $\text{Na}^+$ -dependent substrates and the regulatory mechanisms of the paracellular resistance, phenomena not observed in  $\text{H}^+$ -dependent substrate absorption.

## INTRODUÇÃO

No homem, o aporte de “água” no intestino delgado no período de 24 horas é de cerca de 9 litros, provenientes da dieta alimentar, secreções salivares, gástricas e pancreáticas, e bile. O duodeno, jejuno e íleo absorvem, em condições normais, cerca de 8,5 litros deste total, restando para o cólon 0,5 litros, dos quais 0,1 litro é excretado com as fezes. O intestino grosso tem a capacidade de absorver até 5 litros de água por dia, de forma que, caso não ocorra a esperada absorção de água no intestino delgado e o volume do mesmo que entra no cólon seja maior que sua capacidade máxima de absorção, o excesso será excretado como fezes líquidas ou diarreias (JOHNSON, 1997).

O conteúdo estomacal que entra no intestino (duodeno) pode ser hipo ou hiperosmolar com relação ao plasma, em ambos os casos, inicia-se o transporte de água na direção lúmen-plasma e no sentido adequado para a obtenção da osmolaridade do conteúdo luminal, contudo, este transporte de água está sempre associado ao movimento dos solutos que compõem as soluções (líquidos extravasculares ou líquidos intraluminais). Estes solutos podem ser divididos em dois grupos: um constituído por íons, tais como sódio, potássio, cloreto, bicarbonato e hidrogênio, e outro constituído por produtos do processo gastrodigestivo, tais como açúcares, aminoácidos (AA), peptídeos, lipídeos e outros.

### 1. Transporte de Íons e Água

Na ausência de alimentos, são os íons os principais responsáveis pela pressão osmótica no lúmen intestinal. A composição iônica do líquido intraluminal pode variar ao longo do intestino, mas, em situação normal, permanece isotônica em relação ao plasma graças à alta permeabilidade do epitélio intestinal à água e íons. O conteúdo gástrico que entra no duodeno, se hipotônico, inicia o transporte de água no sentido lúmen-sangue, de forma que, ao atingir o li-

gamento de Treitz, o líquido intraluminal é isotônico com relação ao plasma, se o conteúdo gástrico for hipertônico, ocorrerá uma excreção inicial de água e eletrólitos, mas ao atingir o jejuno proximal, a tonicidade intraluminal assemelha-se àquela do plasma, e à medida que se afasta no sentido aboral, a capacidade de transporte de sódio e água aumenta até a válvula íleo-secal (JOHNSON, 1997).

Considerando-se que o epitélio intestinal é classificado em termos de permeabilidade como do “tipo frouxo” (TRAVIS & MENZIES, 1992), os íons podem mover-se do lúmen para o sangue e vice-versa por vias paracelulares ou transcelulares. O movimento passivo de sódio entre estes dois compartimentos é feito pela via paracelular, que tem na *zonulae ocludens*, aquela estrutura característica de todos os epitélios, um elemento regulador, e nos gradientes eletroquímicos e osmóticos, a energia determinadora do sentido de deslocamento. Em condições normais, as pressões osmóticas atuam temporariamente e com participação reduzida no transporte global de íons, ou em outras palavras, atingido o equilíbrio osmótico do conteúdo intraluminal, os subseqüentes movimentos de fluidos absorptivos ou secretórios ocorrem isosmoticamente em relação ao plasma. As funções secretórias e absorptivas do trato intestinal são espacialmente separadas: a secreção ocorre predominantemente nas células da cripta, enquanto que a absorção nas células mais afastadas e já bem diferenciadas que formam os vilos.

A absorção de sódio ocorre por meio de mecanismos situados na membrana apical das células de borda em escova, todos eles impulsionados pelo potencial eletroquímico do sódio. Considerando uma situação de isosmolaridade entre conteúdo luminal e plasma e as células do epitélio intestinal, as concentrações extracelulares dos íons sódio, cloreto e potássio, na altura do duodeno-jejuno, serão, respectivamente, 140, 120 e 5 mM aproximadamente, enquanto que as concentrações intracelulares são 20, 40 e 125 mM (FIELD *et al.*, 1989),

valores típicos e ainda com uma diferença de potencial (ddp) de membrana de cerca de -40 mV.

Os valores acima citados denotam o potencial eletroquímico favorável ao influxo de sódio nos mecanismos anteriormente citados: o primeiro mecanismo trata de uma difusão via canal seletivo de sódio, uma proteína de membrana comum a vários outros epitélios e que é bloqueada por amiloride, um conhecido diurético bloqueador do trocador  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  (GARTY & BENOS, 1988), cuja contribuição quantitativa na absorção de sódio no intestino delgado é pequena, tornando-se mais acentuada na região reto-sigmóide (FRIZZEL *et al.*, 1976). O segundo mecanismo é aquele constituído pelas várias proteínas de membrana que medeiam os co-transportes de substratos, tais como AA, peptídeos e açúcares. O terceiro mecanismo é constituído do co-transporte eletro-neutro sódio-cloreto, em que o potencial eletroquímico do  $\text{Na}^+$  é aproveitado para transportar o  $\text{Cl}^-$ , este transporte vai aumentando de importância à medida que se desloca para o íleo terminal (KNICKELBEIN *et al.*, 1983). E finalmente, um quarto mecanismo, que é o co-transporte  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  também eletro-neutro e presente na membrana apical das células dos vilos e nas membranas basolaterais das células dos vilos e da cripta (KNICKELBEIN *et al.*, 1988).

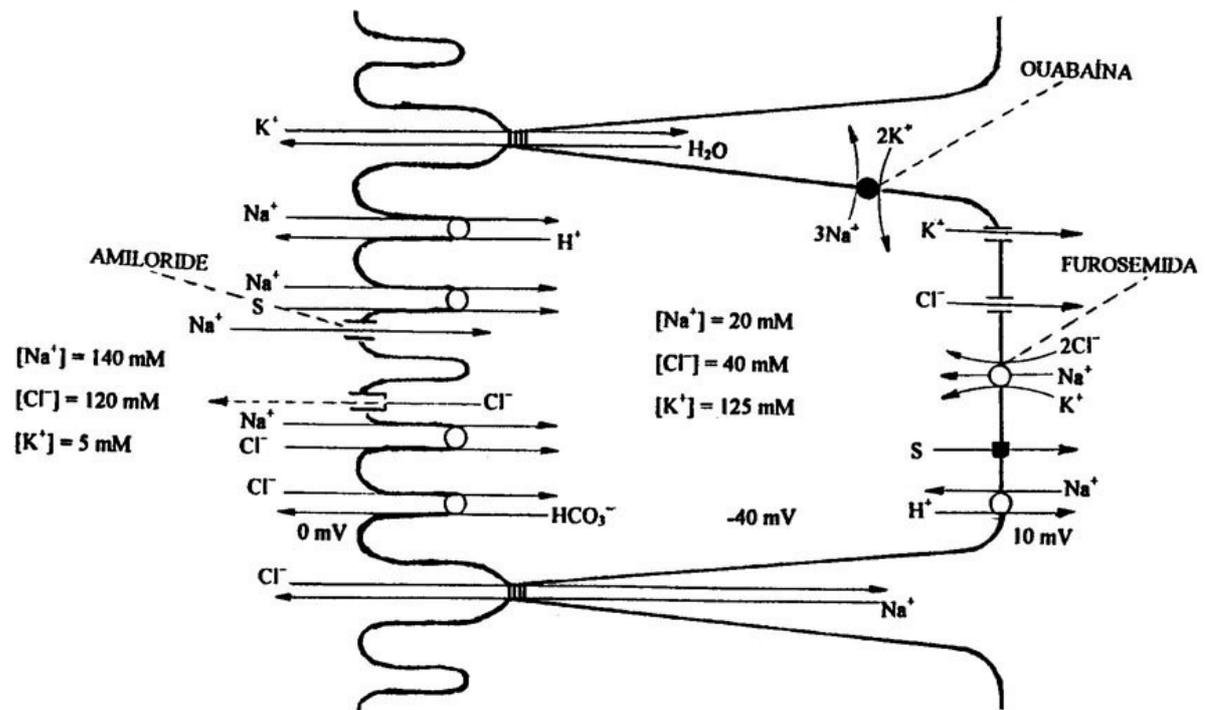
Com relação ao cloreto, além do co-transporte  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  já citado, ele é também absorvido por um antiporte  $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ , que ocorre tanto nas células da cripta como nas dos vilos, e ao longo de todo o intestino delgado; o cloreto, por sua vez, é também absorvido pela via paracelular, impulsionado por uma ddp transepitelial.

O íon sódio que atravessa a membrana apical por qualquer de seus mecanismos é transportado para o meio extracelular-basolateral pela bomba de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase, enquanto que o cloreto passivamente se difunde via canais clo-ro-seletivos.

O íon potássio tem um potencial químico altamente desfavorável a um transporte transcelular. Somente mecanismos de co-transporte ou de antiporte, como ocorre na região reto-sigmóide com uma  $H^+-K^+$  ATPase, poderiam promover a absorção de  $K^+$  (GUSTIN & GOODMAN, 1981; CROWSON & SHULL, 1992); estes mecanismos são desconhecidos no intestino delgado, de forma que apenas a via paracelular possibilita a absorção passiva deste íon.

Os trabalhos pioneiros realizados na década de 1950 por Koefed-Johnsen & Ussing e por Ussing & Zerahn usando epitélio de pele de anfíbios, o qual possui um mecanismo de transporte de sódio capaz de absorver este íon contra um gradiente químico de 1 para 115 mM, constataram que a adição de ouabaína à solução basolateral mas não a apical, era capaz de abolir o transporte de sódio (USSING & ZERAHN, 1951). Posteriormente, Schultz & Zalusky, na década de 1960, mostraram que a adição de glicose à solução apical do intestino delgado aumentava a absorção de sódio, e ainda que a adição basolateral de ouabaína também abolia esta absorção. Como este glicosídeo é inibidor da bomba de  $Na^+-K^+$  ATPase, por conseguinte, a absorção do íon sódio por qualquer de seus mecanismos é um processo dependente de transporte ativo eletrogênico (SCHULTZ & ZALUSKY, 1964).

A Figura 1 mostra os diversos mecanismos de co-transporte, antiporte, difusão passiva, transportes ativos primário e secundário, bem como bloqueadores e concentrações iônicas típicas.



**Figura 1 – Representação Esquemática dos Transportes de Íons e Água no Enterócito**

Os círculos vazios (O) representam os transportes ativos secundários; o círculo cheio (●) representa o transporte ativo ATP-dependente; as barras paralelas horizontais (=) representam os canais de difusão passiva; o quadrado cheio (■) representa o transporte facilitado; e as letras S representam os substratos (açúcares ou aminoácidos de absorção sódio-dependente). O canal de cloreto é do tipo com portão.

## 2. Canais Apicais de Cloreto

Em 1971, Michael Field adicionou AMP cíclico (cAMP) e/ou teofilina ao lado seroso de uma preparação de íleo isolado e obteve um rápido e grande aumento na corrente de curto-circuito da preparação, que não ultrapassava seu valor máximo, mesmo com a adição simultânea das duas substâncias, e constatou que o aumento de corrente era devido a um efluxo mucosal de  $\text{Cl}^-$  (FIELD, 1971a; CHAPPE *et al.*, 1998).

A teofilina é um conhecido inibidor de fosfodiesterase que promove a elevação intracelular dos níveis tanto de cAMP como cGMP, apesar de dados na literatura terem demonstrado aumento de secreção de  $\text{Cl}^-$  independente da elevação dos níveis de cAMP (CERMAK, 1998), outros autores, tais como Forte e cols., demonstraram que em monocamadas de cultura de células T84 a adição das enterotoxinas de *Escherichia coli*, tanto a termo-estável como a termo-lábil, as quais estimulam respectivamente a guanilato-ciclase e a adenil-ciclase, promovem um intenso efluxo apical de  $\text{Cl}^-$  como resultante da abertura de canais de cloreto apical (FORTE *et al.*, 1992). O intenso efluxo de  $\text{Cl}^-$  é possibilitado pela força impulsionadora gerada pela diferença entre o potencial de membrana existente e o potencial de equilíbrio do cloro.

$$\Delta V_{\text{Cl}^-} = V_m - \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{Cl}^-]_i}{[\text{Cl}^-]_e}$$

Onde:

$\Delta V_{\text{Cl}^-}$  é a força eletro-motriz para o efluxo de cloreto;

$V_m$  é o potencial de membrana;

$R$  é a constante do gases;

$T$  é a temperatura em graus Kelvin; e

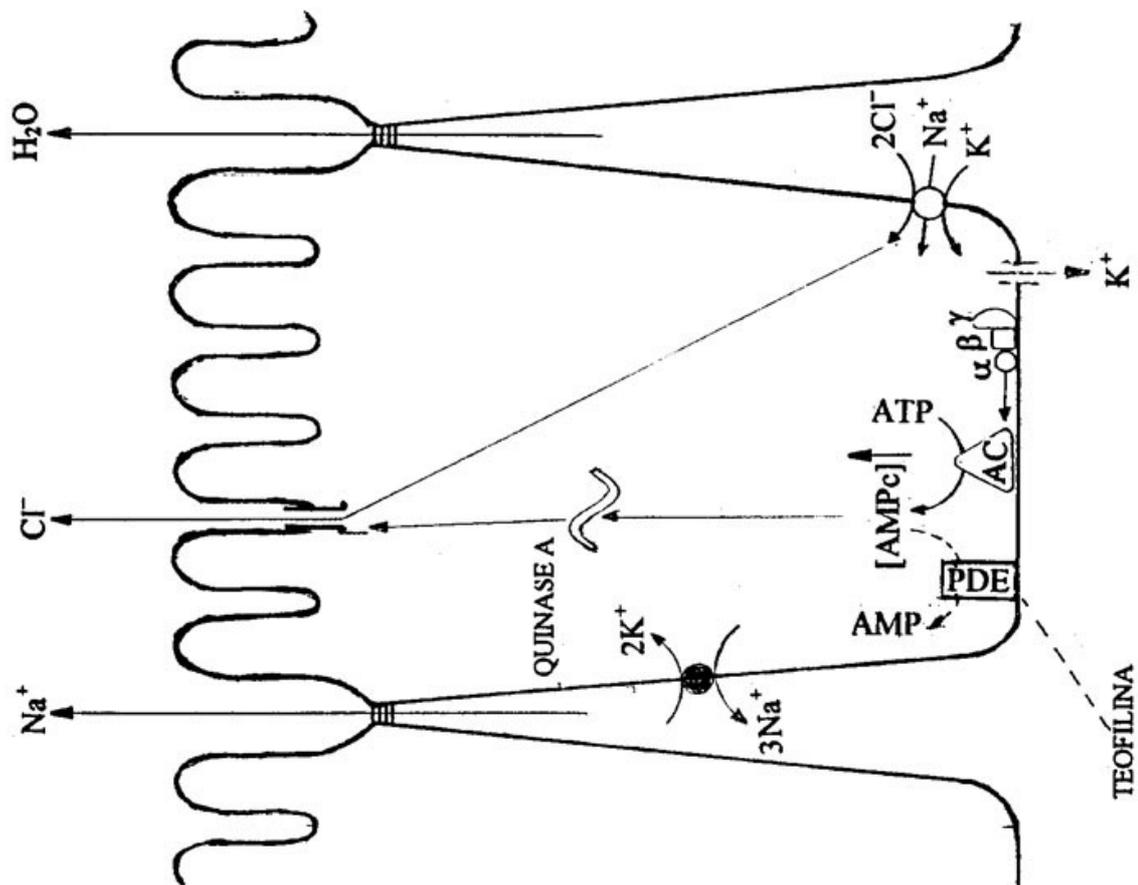
$[\text{Cl}^-]_i$  e  $[\text{Cl}^-]_e$  são as concentrações intracelular e luminal, respectivamente.

Este efluxo de  $\text{Cl}^-$  apical é compensado por um influxo de  $\text{Cl}^-$  na região basolateral promovido por um co-transporte eletro-neutro, o  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ , que por conta desta eletroneutralidade esta desacoplado do potencial elétrico da célula, porém, função das razões de concentração dos íons envolvidos:

$$\frac{[\text{Na}^+]_e}{[\text{Na}^+]_i} = \frac{[\text{K}^+]_i}{[\text{K}^+]_e} \times \left( \frac{[\text{Cl}^-]_i}{[\text{Cl}^-]_e} \right)^2$$

Este co-transportador basolateral usa a energia eletroquímica do sódio, supre-se de  $\text{Cl}^-$  abundante no espaço extracelular basolateral, e é bloqueado pelo diurético de alça furosemida (DHARMSATHAPHORN *et al.*, 1985; FIELD *et al.*, 1989; O'GRADY *et al.*, 1987). O abundante aporte de  $\text{Cl}^-$  ao ambiente luminal da cripta perturba a eletroneutralidade deste espaço, cuja correção é a difusão de cátions ( $\text{Na}^+$ ) pela via paracelular, com conseqüente secreção de água para o ajuste de osmolaridade.

A Figura 2 mostra os locais de ação das substâncias elevadoras da concentração intracelular de AMPc.



**Figura 2 – Ação da Teofilina e da Toxina Termo-Lábil do *E. coli***

A teofilina inibe a fosfodiesterase (PDE) enquanto que a toxina termo-lábil (TL) do *E. coli*, atuando sobre uma proteína trimérica ( $\alpha\beta\gamma$ ), ativa a adenililciclase (AC); ambas ações promovem a elevação da concentração intracelular de AMPc, ativando uma proteína quinase A com conseqüente abertura de canais apicais de  $Cl^-$ . O círculo cheio (●) representa o transporte ativo e o círculo vazio (○) o transporte ativo secundário.

### **3. Transporte de Nutriente Na<sup>+</sup>-Dependentes**

#### **3.1. Absorção de Glicose**

A absorção de glicose pelo enterócito é um processo ativo secundário mediado por uma proteína de membrana, um co-transportador que utiliza o potencial eletroquímico do sódio como fonte de energia impulsionadora. Esta proteína é conhecida como SGLT1, tendo já sua seqüência de aminoácidos (AA) definida e seu gene localizado no cromossomo 22 (HEDIGER *et al.*, 1987). Incubando-se fragmentos de intestino com Phlorizin-H<sup>3</sup>, um conhecido bloqueador da absorção de glicose galactose (STIRLING, 1967; STIRLING & KINTER, 1967), ou com anticorpos específicos para a proteína, demonstrou-se que o co-transporte localiza-se na membrana apical das células dos vilos mas não nas da cripta (HWANG *et al.*, 1991; TAKATA *et al.*, 1992; FERRARIS *et al.*, 1992a, 1992b), assim sendo, fica evidenciado a diferença funcional entre as duas micro-regiões do epitélio, a cripta como eminentemente excretora e os vilos absorptivos. O efluxo de glicose pela membrana basolateral ocorre por meio de outra proteína transportadora denominada GLUT2 e pertencente a uma família de proteínas correlacionadas e presentes numa grande variedade de tecidos. No intestino, ela localiza-se somente nas células já diferenciadas dos vilos e não naquelas ainda imaturas da cripta, reforçando mais ainda a diferença funcional das duas regiões (THORENS *et al.*, 1990).

#### **3.2. Absorção de Aminoácidos**

A superfície mucosa do epitélio intestinal é a grande fronteira por onde ocorre a entrada de nitrogênio-amino no corpo humano. A maior parte deste nitrogênio passa do lúmen para o sangue, bem como do sangue para as células do enterócito via proteínas intrínsecas (carreadores) localizadas nas membranas apicais e basolaterais das células da mucosa intestinal. As enzimas digestivas

reduzem a ingesta protéica a 40% de AA livres e a 60% de peptídeos que variam de dois a seis resíduos de AA (JOHNSON., 1997).

Os AA livres são transportados nas membranas apical e basolateral por mecanismos de transporte facilitado não-dependente de sódio ou por mecanismos de transporte ativos secundários (sódio-dependente). De uma forma não muito rigorosa, procura-se classificar os vários sistemas de transporte por letras e sinais que mostrem a preferência destes sistemas para determinados AA. Desta forma, letras maiúsculas representariam sistemas  $\text{Na}^+$ -dependentes, enquanto que letras minúsculas referem-se a sistemas  $\text{Na}^+$ -independentes, ainda, expoentes tais como 0, + e - referem-se respectivamente à carga neutra, catiônica ou aniônica dos AA (MAILLIARD *et al.*, 1995).

De acordo com Mailliard, pelo menos nove diferentes proteínas de membrana localizadas nos domínios apical e basolateral das células da mucosa do intestino delgado participam dos sistemas de transporte de AA.

O sistema A, inicialmente associado ao transporte de alanina, é também responsável pelo transporte  $\text{Na}^+$ -dependente de AA neutros de baixo peso molecular. Os sistemas B e  $\text{B}^{0+}$  estão respectivamente associados ao transporte de AA neutros e de AA neutros e catiônicos, sendo dois sistemas  $\text{Na}^+$ -dependentes, enquanto que o sistema  $\text{b}^{0+}$  transporta estes mesmos AA, mas é  $\text{Na}^+$ -independente. O sistema L está associado ao transporte de AA neutros com cadeias laterais hidrofóbicas e é  $\text{Na}^+$ -independente. Pesquisas mais recentes usando sondas de cDNA mostraram que este sistema é constituído de pelo menos dois tipos de proteínas com características funcionais bem definidas (SEGAWA *et al.*, 1999). O sistema LAT1 (*L-type aminoacid transporter-1*) (KANAI *et al.*, 1998) transporta preferencialmente AA neutros grandes com cadeias laterais ramificadas ou aromáticas, enquanto que a isoforma LAT2 demonstra uma acentuada seletividade pelo substrato, ela transporta todos os L-isômeros de  $\alpha$ -AA neutros com um pequeno  $K_m$  para Tyr, Phe, Trp, Asp, Ile, Cys, Ser, Leu, Val e

Glu (SEGAWA *et al.*, 1999). O sistema ASC está associado com o co-transporte  $\text{Na}^+$ -dependente de AA neutros de cadeia curta (3-4 átomos de carbono) (STEVENS, 1992). O co-transporte  $\text{Na}^+$ -dependente IMINO transporta preferencialmente o AA prolina (hidroxi-prolina) (MUNCK & MUNCK, 1992) assim como o sistema Xag co-transporta preferencialmente os ácidos aspártico e glutâmico (KANAI & HEDIGER, 1992). E finalmente, o sistema  $\gamma^+$ , é um transportador  $\text{Na}^+$ -independente com preferência pelos AA arginina e lisina (CLOSS *et al.*, 1993). Observa-se que os sistemas transportadores mostram uma considerável sobreposição funcional, significando assim que se um sistema com preferência por determinados AA está saturado, outros sistemas transportadores podem funcionar, embora que com menos eficiência (CASTAGNA *et al.*, 1997).

### 3.3. Transporte de Di- e Tri-Peptídeos

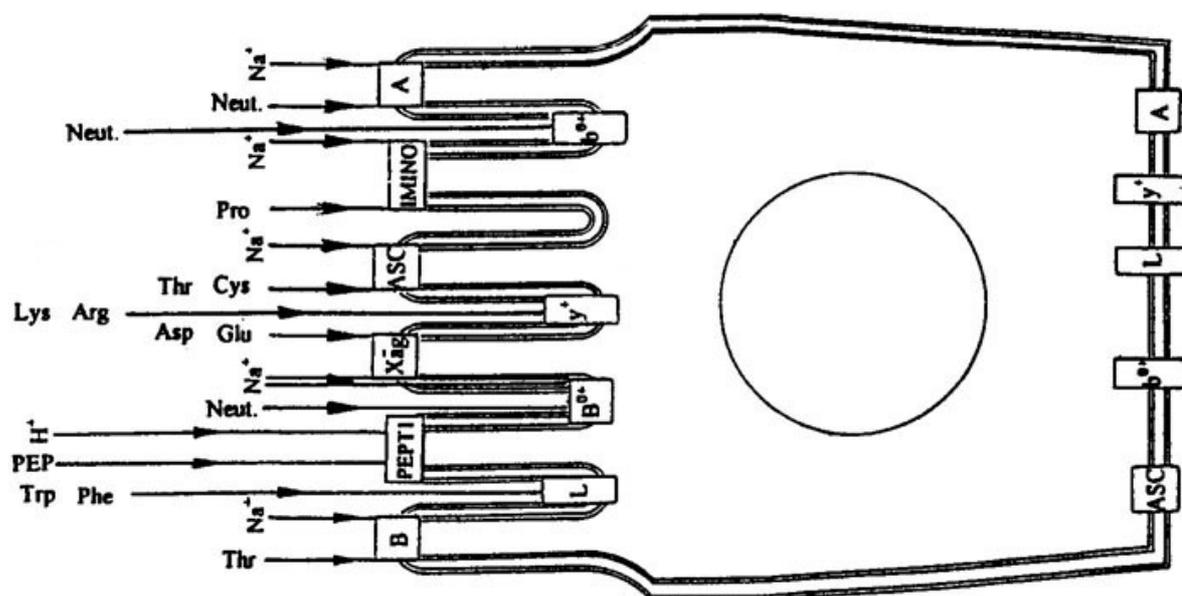
Os fragmentos resultantes da digestão das proteínas encontram na membrana apical do enterócito enzimas (peptidases) que os reduzem a AA livres, di-peptídeos e tri-peptídeos, os quais são absorvidos por transportadores específicos. Os peptídeos vão encontrar no compartimento intracelular peptidases citoplasmáticas, contudo, uma significativa fração de peptídeos pode ser como tal transportada pela membrana basolateral para o sangue (JOHNSON, 1997).

O principal íon que através de seu gradiente eletroquímico impulsiona os transportadores de açúcar, AA e peptídeos no mundo microbiológico é o  $\text{H}^+$ , enquanto que para o restante do reino animal é o  $\text{Na}^+$ , o grande provedor da energia impulsionadora destes mecanismos de transporte, com especial exceção para os transportadores de peptídeos, os quais permanecem usando como fonte de energia o gradiente eletroquímico do  $\text{H}^+$  (LEIBACH & GANAPATHY, 1996). Esta não alteração ao longo do processo evolutivo já mostra por si só a eficácia do mecanismo, tanto que portadores de defeitos genéticos na absorção de AA,

tais como as doenças de Hartnup e cistinúria, não apresentam sinais clínicos de desnutrição protéica, desde que estejam presentes no lúmen intestinal AA na forma de pequenos peptídeos, além do mais, ao contrário do que sempre se afirmou sobre a pequena concentração de aminopeptídeos no plasma, estudos mais precisos e recentes (SEAL & PARKER, 1991) demonstram que estas concentrações são da ordem de 50% do conjunto de AA plasmáticos. Adibi, em seu trabalho com *anima nobili* (ADIBI, 1971), demonstrou que a absorção intestinal de leucina na forma de di-peptídeo é cerca do dobro daquela de leucina livre, e que no tocante à glicina, a absorção do di-peptídeo é mais que o triplo quando comparada à absorção de AA livres. Várias outras observações levaram a considerar-se atualmente o co-transportador intestinal de peptídeos como a principal via de absorção de nitrogênio da dieta (MEREDITH & BOYD, 2000).

### 3.3.1. Localização do co-Transportador PEPT1

Estudos realizados com mRNA isolados do rim e trato gastrointestinal (GI) e transcritos por transcriptase reversa para cDNA mostram que a célula renal expressa dois tipos de co-transportadores, o PEPT2 e o PEPT1, cujas seqüências de AA mostram respectivamente 50% de identidade e 70% de similaridade (LIU *et al.*, 1995), enquanto que a célula intestinal expressa exclusivamente o PEPT1. Quanto à ocorrência do co-transportador PEPT1 ao longo do trato GI, observa-se que o mRNA para a síntese desta proteína é extremamente abundante em células mucosas do duodeno e jejuno, menos abundante nas células do íleo, muito reduzido no cólon e indetectável no estômago e ceco (FREEMAN *et al.*, 1995). Quanto ao eixo cripta-vilos, constata-se que as células da cripta não transcrevem de forma detectável o mRNA para PEPT1 e que à medida que as células migram para o ápice dos vilos (região de absorção) estas passam a sintetizar a proteína transportadora de forma significativa (LEIBACH & GANAPATHY, 1996). A Figura 3 mostra a localização destas proteínas transportadoras nas membranas apicais e basolaterais das células dos vilos intestinais, enquanto que a Tabela 1 ordena-as em função de serem ou não dependentes de Na<sup>+</sup> para o co-transporte, bem como de sua preferência por aminoácidos.



**Figura 3 – Localização das Proteínas de Membrana Transportadoras do Enterócito**  
Localização apical e basolateral dos transportadores, co-transportadores Na<sup>+</sup>-dependentes, bem como do transportador de peptídeos (PEPT1) H<sup>+</sup>-dependentes.  
PEP = peptídeos Neut. = AA neutros

**Tabela 1 – Classificação dos Sistemas de Transporte de Aminoácidos**

| Sistema         | Na <sup>+</sup> -dependência | Aminoácido preferencial         |
|-----------------|------------------------------|---------------------------------|
| A               | +                            | Neutros pequenos                |
| B               | +                            | Neutros (Thr)                   |
| IMINO           | +                            | Pro                             |
| ASC             | +                            | Neutros – Dipolares (Cys, Thr)  |
| Xag             | +                            | Asp, Glu                        |
| B <sup>0+</sup> | +                            | Neutros – Catiônicos (Lys)      |
| L               | –                            | Grandes – Ramificados – Neutros |
| b <sup>0+</sup> | –                            | Neutros, Catiônicos (Lys)       |
| y <sup>+</sup>  | –                            | Arg, Lys                        |

O sinal (+) significa a dependência de Na<sup>+</sup> para o co-transporte e o sinal (–) a não dependência de Na<sup>+</sup> para o co-transporte

### 3.3.2. Transporte de Substâncias Peptidomiméticas

Várias pesquisas têm demonstrado que o co-transportador H<sup>+</sup>-PEPT1 no intestino, bem como o H<sup>+</sup>-PEPT2 no rim, possuem a propriedade de transportar substâncias peptidomiméticas (DORING *et al.*, 1998) tais como as cefalosporinas (cefaloxina, cefaradina, cefadroxil) ou as penicilinas (ciclacilina, ampicilina) (GANAPATHY *et al.*, 1995), e até mesmo o inibidor da enzima conversora de angiotensina, o captopril (BOLL *et al.*, 1994; FEI *et al.*, 1994; LIANG *et al.*, 1995). Caso não fosse esta capacidade dos transportadores, tanto a nível renal, quanto intestinal, a meia-vida biológica das substâncias supracitadas seria bem menor, por conseguinte, o conhecimento desta propriedade deve influenciar no “desenho” de futuros antibióticos, de tal maneira que suas estruturas moleculares favoreçam a afinidade com os transportadores (MEREDITH & BOYD, 2000).

## 4. Diarréias Infeciosas

Segundo Gorbach, “diarréia é um grande equalizador, aflige todas as classes, jovens e velhos, sadios e enfermos, com sintomas que variam de um leve desconforto à ameaça à vida por desidratação” (GORBACH, 1997).

Guerrant define diarréia como “uma alteração no funcionamento normal do intestino, caracterizado por um aumento do conteúdo de água, volume e frequência de evacuações” ou “uma redução na consistência (liquefação) das fezes e aumento da frequência para mais de três evacuações por dia” (GUERRANT *et al.*, 2001).

Pesquisadores que trabalham no campo das doenças diarreicas estimam que a cada ano morrem entre quatro e seis milhões de crianças na Ásia, África e América Latina (SNYDER & MERSON, 1982; GUERRANT *et al.*, 1990). Nos Estados Unidos, a mortalidade por diarréia e desidratação é estimada em 500 casos (dados de 1988) (HO *et al.*, 1988; GUERRANT & BOBAK,

1991). Aqui no Nordeste Brasileiro, em uma pequena comunidade rural do Estado do Ceará, Lima e cols. comprovaram que 70% das mortes na primeira infância eram devidas à diarreia e ainda que metade dos óbitos estavam associados à diarreia persistente (14 ou mais dias de duração) (LIMA *et al.*, 1992, 2000). Vírus, bactérias e parasitas são os patógenos que podem causar diarreia em adultos e crianças, além dos casos de intolerância alimentar como o da lactose (LIFSHITZ *et al.*, 1971), contudo, mais de 50% dos casos de diarreia têm um agente patógeno específico não identificado (LANEY & COHEN, 1993).

A Tabela 2 a seguir fornece as concentrações de eletrólitos em mM das fezes diarreicas para diferentes agentes patógenos (POWELL & SZAUTER, 1993).

**Tabela 2 – Concentração em mM dos Principais Íons em Fezes Diarreicas**

| <b>Doenças</b> | <b>Na<sup>+</sup></b> | <b>K<sup>+</sup></b> | <b>Cl<sup>-</sup></b> | <b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> |
|----------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------------------|
| Cólera         | 80                    | 30                   | 86                    | 32                                 |
| <i>E. coli</i> | 53                    | 37                   | 24                    | 18                                 |
| Rotavírus      | 37                    | 38                   | 22                    | 6                                  |
| Fezes normais  | 20-30                 | 50-75                | 15-20                 | 25-30                              |

A perda de fluido para as doenças acima citadas pode variar de 10 a 200 ml/kg de peso corporal de tal forma que uma criança pode perder quatro litros e um adulto até mais de 14 litros de água corporal, o que equivale a cerca de 20% de seu peso total (POWELL & SZAUTER, 1993). Diarreias leves, cuja perda de fluido varia de 3-5% da perda de peso corporal, normalmente não provoca um déficit de eletrólitos e volemia muito significativos, mas as diarreias secretórias de alto volume (acima de 10% de perda de peso corporal) resultam em um perigoso desequilíbrio ácido-básico e em uma provável hipopotassemia, cujas conseqüências podem ser insuficiência renal e distúrbios cardíacos e respiratórios, que fatalmente levam ao choque e coma. Quadros desta gravidade re-

querem uma rápida reposição de água e eletrólitos por via intravenosa, mas se o paciente suporta ingestão de fluidos, deve-se iniciar a administração da solução de reidratação oral.

## 5. Cólera

A cólera é uma das doenças que afligem a humanidade com remoto registro histórico e que causa surtos epidêmicos de grandes proporções e índices significantes de mortalidade. Seu agente foi considerado por Robert Koch, em 1884, como sendo um veneno especial, e seus sintomas como um envenenamento do epitélio intestinal. Em 1953, De & Chatterje, usando extratos estéreis de cultura, e Dutta e cols., usando lisados estéreis de *V. cholerae*, conseguiram independentemente provocar diarreia em coelhos (DE & CHATTERJE, 1953). Finalmente, em 1969, Finkelstein e cols. conseguiram isolar e purificar a toxina do *V. cholerae* (FINKELSTEIN & LOSPALLUTO, 1969).

A toxina do *V. cholerae* tem uma estrutura que é característica daquelas toxinas com duas subunidades A e B, e é extremamente semelhante à enterotoxina termo-lábil da *E. coli* (SIXMA *et al.*, 1991). Cada subunidade separadamente não possui atividade secretória significativa, sendo a subunidade B considerada o elemento que promove a interação entre a toxina e o receptor celular, visto que a adição prévia da subunidade B purificada em alça isolada de coelho inibe drasticamente o efeito da adição posterior da toxina (PIERCE, 1973). Outra evidência para o papel da subunidade B é que o emprego de anticorpos específicos para esta subunidade é muito mais eficaz no bloqueio da atividade da toxina do que o emprego de anticorpos específicos para a subunidade A (PETERSON *et al.*, 1979). O receptor para a toxina da cólera foi identificado como sendo o monosialosilgângliosídeo, ou GM<sub>1</sub> (KING & VAN HEYNINGEN, 1973; WOLF *et al.*, 1998), que é um glicolípídeo complexo contendo oligosacarídeos e um resíduo de ácido siálico (Figura 4). Os gângliosídeos existem

em maior ou menor quantidade em todas as membrana plasmáticas das células animais. Nos epitélios, eles estão confinados à membrana apical aonde poderiam auxiliar na proteção a situações de baixo pH ou de enzimas degradadoras (WEIGANDT, 1982). Admite-se que pelo menos duas das cinco subunidades do pentâmero B devem ligar-se a moléculas de GM<sub>1</sub> (DE WOLF *et al.*, 1981; SIXMA *et al.*, 1991). Várias evidências sugerem que as subunidades do pentâmero B se ancorem à membrana citoplasmática e formem como que um largo poro por onde a subunidade A possa ser introduzida na célula epitelial (SIXMA *et al.*, 1992; LONDON, 1992). Considerando-se o fato de que a redução da temperatura é um fator da gênese e deslocamento de vesículas intracelulares, Lancer e cols., trabalhando com monocamadas de células T84 montadas em câmaras de Ussing e variando convenientemente a temperatura da preparação, observaram que só ocorria resposta significativa à adição da toxina nas temperaturas propícias à formação vesicular, e sugeriram que este fenômeno envolve o transporte vesicular da toxina (LENCER *et al.*, 1992). Em trabalho posterior Lancer e cols. usaram Brefeldin-A, um conhecido inibidor do transporte vesicular, e conseguiram bloquear quase totalmente a ação da toxina (LANCER *et al.*, 1993).

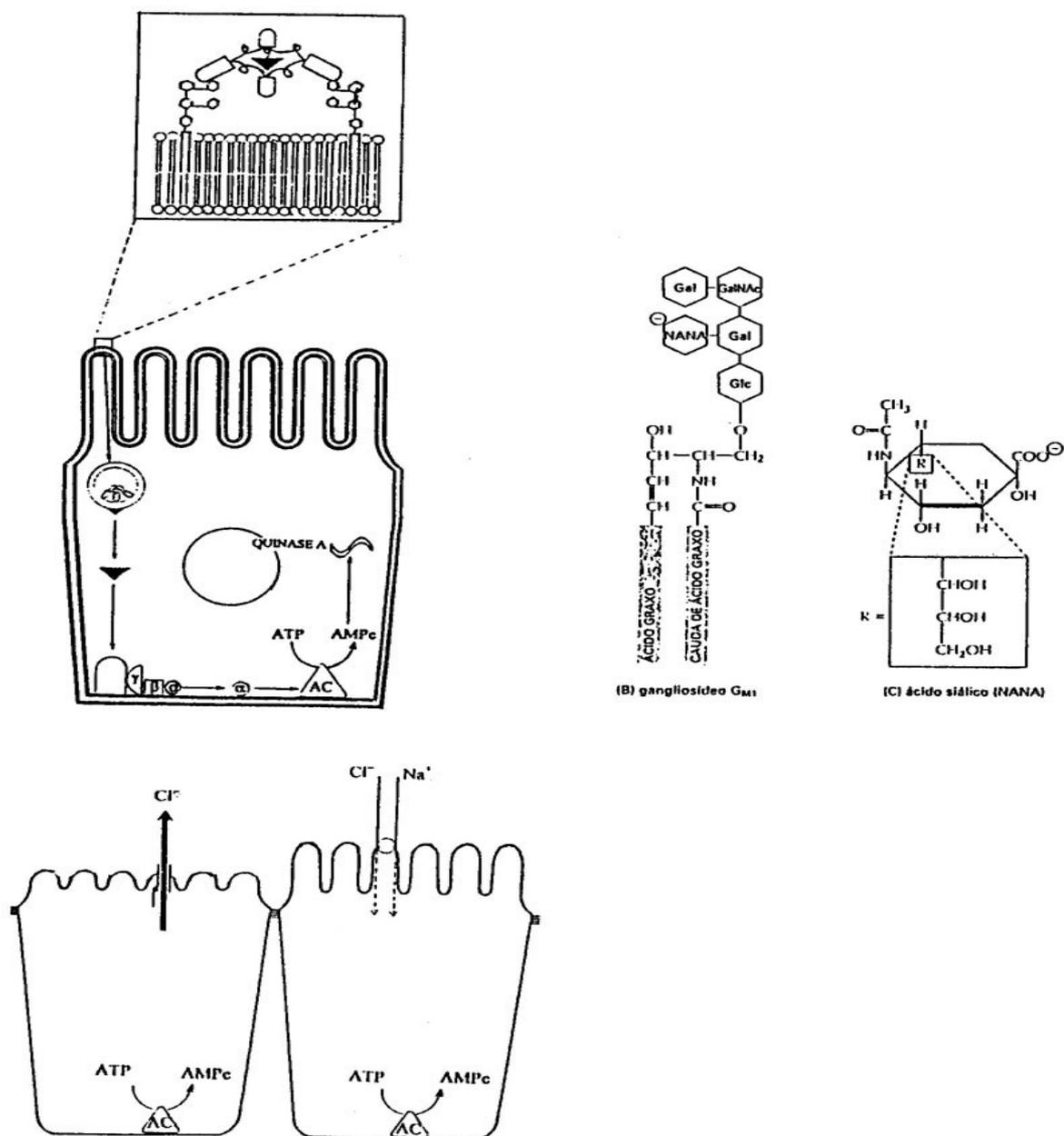
Em 1977, Moss & Vaughan demonstraram que a subunidade A convertia o NAD citoplasmático em ADP-ribose + nicotinamida (MOSS & VAUGHAN, 1977). A ADP-ribose interage com a unidade  $\alpha$  de uma proteína trimérica G<sub>s</sub> que, liberando seu GDP e substituindo-o por uma molécula de GTP, torna-se o complexo ADP-ribosil-G $\alpha$ -GTP, perdendo assim sua atividade GTPásica e ganhando uma permanente afinidade ativadora de adenilatociclase, que provavelmente dura todo o ciclo de vida da célula (CASSEL & SELINGER, 1977; KAHN & GILMAN, 1984).

Como consequência da ativação da adenilatociclase pela toxina da cólera, a concentração intracelular de cAMP é grandemente aumentada, e a resposta celular final é o exacerbado aumento da secreção de Cl<sup>-</sup> nas células da

cripta e uma concomitante redução da absorção em co-transporte do  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  nas células dos vilos (FIELD, 1971b; SHARP & HYNIE, 1971; KIMBERG, 1971).

A ação primeira da cAMP é a ativação da proteíno-quinase cAMP-dependente (quinase A). Esta enzima catalisa a transferência de um fosfato terminal do ATP para serinas ou treoninas específicas de determinadas proteínas, neste caso, os canais de  $\text{Cl}^-$  na membrana apical das células da cripta ou os co-transportadores de  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  nas células dos vilos.

Além da ação ativadora da adenililciclase, a toxina do *V. cholerae* também gera no tecido intestinal o fator ativador de plaquetas (PAF), como demonstraram Guerrant e cols. (1994). No tecido renal, a toxina da cólera promove uma significativa redução na taxa de filtração glomerular, contudo, quando o rim é perfundido com toxina da cólera + WEB 2086 (um bloqueador do receptor do PAF), bloqueia completamente o efeito induzido pelo cólera, sugerindo assim que o efeito da toxina é mediado pelo PAF (MONTEIRO *et al.*, 1999).



**Figura 4 – Modo de Ação da Toxina do Cólera**

A toxina ancora-se no gangliosídeo GM<sub>1</sub> e internaliza-se em forma de vesícula. No citoplasma, o componente A vai ribolisar uma proteína G<sub>s</sub>α e ativar a adeni-liclase (AC), o AMPC aumentado ativa a quinase A, nas células da cripta, serão abertos canais apicais de Cl<sup>-</sup>, e nos vilos, será bloqueado o co-transporte de Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>. No gangliosídeo, Gal = galactose, Glc = glicose, GalNAc = N-acetilgalactosamina, e NANA = ácido N-acetilneuramínico

## 6. Terapia com Solução de Reidratação Oral

O uso de soluções de eletrólitos para reidratação de pacientes diarreicos, por via oral, começou a ser sugerido em meados da década de 1940, mas a adição de glicose às soluções salinas só começaram a ser seriamente consideradas a partir de meados da década de 1960 quando então pesquisadores demonstraram a existência de um mecanismo de co-transporte  $\text{Na}^+$ -glicose na membrana apical do enterócito (SCHULTZ & ZALUSKY, 1964) de forma que a presença de glicose ou outros açúcares semelhantes, tais como a galactose, por exemplo, no lúmen, aumentavam a absorção de  $\text{Na}^+$ , e com isto, também a de água. Pesquisas posteriores mostraram que também os AA eram co-transportados com  $\text{Na}^+$ .

Estudos sobre a fisiopatologia de diarreias severas, tais como a cólera, mostrando a intensa secreção luminal de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$  pelas células da cripta, ao mesmo tempo que uma redução na absorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nas células dos vilos (WELSH *et al.*, 1982; FIELD *et al.*, 1989), contribuíram para esclarecer os mecanismos da perda de eletrólitos nos estados diarreicos e impulsionaram o desenvolvimento de soluções de reidratação oral (SRO). A importância do conhecimento deste mecanismo foi demonstrada com os estudos realizados em pacientes com cólera nas Filipinas, Bangladesh e Índia entre os anos de 1964 e 1968 (PHILLIPS, 1964; PIERCE *et al.*, 1968; HIRSCHHORN *et al.*, 1968). Subseqüentes relatos mostrando a eficácia do emprego de SRO na correção da acidose e desidratação (CASH *et al.*, 1970; MAHALANABIS *et al.*, 1973) levaram a Organização Mundial da Saúde a deflagrar uma campanha em âmbito mundial pelo emprego da SRO, propondo uma composição básica para a mesma (Tabela 3).

**Tabela 3 – Composição Básica da Solução de Reidratação Oral**

| Componentes | mM  | Substância           | g/l H <sub>2</sub> O |
|-------------|-----|----------------------|----------------------|
| Sódio       | 89  | Cloreto de sódio     | 3,5                  |
| Potássio    | 20  | Cloreto de potássio  | 1,5                  |
| Cloreto     | 80  | Bicarbonato de sódio | 2,5                  |
| Bicarbonato | 30  | Glicose              | 20,0                 |
| Glicose     | 111 | –                    | –                    |

O uso de SRO tem pelo menos três vantagens: reduz o uso de infusão intravenosa, que é de maior custo que a oral (LANEY & COHEN, 1993); reduz o risco de septicemia pelo emprego de soluções e equipamentos contaminados; e reduz a presença de pessoal médico treinado.

Apesar da comprovada eficácia da terapia de reidratação oral (TRO), algumas situações particulares recomendam cautela, e até mesmo contra-indicação, no emprego desta terapia. É possível o desenvolvimento de hipernatremia quando se oferta um grande volume de SRO em curto intervalo de tempo, ou se esta solução contém uma excessiva taxa de glicose, ou ainda na co-administração de alimentos tais como leite desnatado (CLEARY *et al.*, 1981), principalmente se o paciente está com sua função renal reduzida. A reidratação parenteral é indicada para pacientes com desidratação severa (acima de 10% de perda de peso corporal) e com risco de complicações hemodinâmicas ou com um volume de perda fecal maior que 10 ml/kg/h (LANEY & COHEN, 1993).

Nos países do terceiro mundo, e como consequência da deficiência nos serviços de saúde pública, bem como de outros fatores sócio-econômicos, tem-se divulgado uma forma alternativa para a TRO que é uma solução de cloreto de sódio e sacarose (soro caseiro). Esta terapia tem sido de grande importância na redução da morbidez e mortalidade infantil nestes países, contudo, tem uma desvantagem que é a ausência de potássio e bicarbonato (ELLERBROCK, 1981; BARROS *et al.*, 1991).

## 7. Importância da Glutamina no Metabolismo do Enterócito

A glutamina é um AA não essencial que pode ser sintetizado por praticamente todos os tecidos do corpo humano. Sua molécula possui cinco átomos de carbono e dois radicais amino, característica esta que mostra sua importância como transportador de nitrogênio para os tecidos periféricos (MARLISS *et al.*, 1971; WINDMUELLER, 1982)

A glutamina é captada por uma grande variedade de membranas celulares de transporte de AA neutros, como os sistemas A e ASC sódio-dependentes, ou pelo sistema L sódio-independente (CHRISTENSEN, 1973; MIRCHEFF *et al.*, 1980). Com a exclusão do aminosulfoácido taurina, 61% do conjunto de AA livres restantes no tecido muscular esquelético é composto por glutamina (BERGSTROM *et al.*, 1974), e uma vez que este conjunto corresponde a 70-80% do total de AA livres do corpo como um todo, pode-se concluir que sua metade é constituída por glutamina. O metabolismo da glutamina é regulado por duas enzimas ATP-dependentes: a glutaminase, que converte glutamina em glutamato e amônia, e a glutamina sintetase, que catalisa a reação em sentido contrário. O glutamato tem três possíveis rotas para converter-se em  $\alpha$ -cetoglutarato, diretamente pela glutamato desidrogenase reagindo com piruvato e catalisado pela glutamina-piruvato aminotransferase gerando assim alanina, ou com oxaloacetato e catalisado pela glutamina-aspartato transaminase produzindo assim aspartato (SOUBA *et al.*, 1985). O  $\alpha$ -cetoglutarato resultante da ação destas vias entra no ciclo de Krebs, gerando 30 moles de ATP para cada mol de glutamina. Os enterócitos do jejuno e do íleo, principalmente do jejuno, possuem as mais altas concentrações de glutaminase em todo o corpo ao mesmo tempo em que as concentrações citosólicas de glutamina são significativamente baixas (SOUBA, 1993). Windmueller mostrou que a glutamina é o principal substrato da cadeia respiratória da célula do enterócito (WINDMUELLER & SPAETH, 1980; WINDMUELLER, 1982) e que o intestino está bem capacitado a usar este

processo, pois a amônia resultante da hidrólise da glutamina pela glutaminase mitocondrial difunde-se pelo Sistema Porta, passando logo pelo fígado (convertendo-se em uréia) antes de difundir-se sistemicamente. A avidéz do trato GI por glutamina (particularmente o intestino delgado) é tal que cerca de 13% da glutamina circulante é retirada da circulação mesentérica a uma taxa de 1200 nmol/kg de peso corporal/minuto (SOUBA *et al.*, 1990; AUSTGEN *et al.*, 1991).

Pacientes tratados com drogas antineoplásicas, como o metotrexate, ou submetidos a uma nutrição parenteral total por longo período de tempo, frequentemente apresentam um quadro de enterocolite e de atrofia vilosa (CUNNINGHAM *et al.*, 1985; O'DWYER *et al.*, 1989), bem como uma maior probabilidade de translocação bacteriana (BURKE *et al.*, 1989). Vários autores, considerando o já conhecido fato de que a glutamina é o substrato preferido pelos enterócitos em seus processos oxidativos, verificaram que a adição suplementar de glutamina demonstra, no tocante às lesões causadas por drogas citotóxicas, uma ação reparadora altamente significativa (FOX *et al.*, 1987, 1988; MCANENA *et al.*, 1987), de tal forma que a adição de glutamina às soluções de nutrição parenteral total preveniram tanto o processo de atrofia da mucosa intestinal quanto o aumento da permeabilidade do epitélio (TAMADA *et al.*, 1992; LI *et al.*, 1994).

## **8. Desenvolvimento de Novas Soluções de Reidratação Oral**

Basicamente, o tratamento por via oral da desidratação tem como objetivos compensar os três principais distúrbios do estado fisiológico imposto ao portador de diarréia secretória: (1) corrigir o desequilíbrio ácido-básico mediante a administração de bicarbonato; (2) restaurar a volemia pela absorção de água, que só pode ocorrer com a concomitante absorção de sais tais como o NaCl; e (3) refazer a composição plasmática de eletrólitos críticos como o  $K^+$ , pois

inicialmente o uso de soluções de reidratação oral tinha como principal objetivo a reposição das perdas fecais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$ , como já comentado anteriormente. Em 1964, o reconhecimento do mecanismo de co-transporte  $\text{Na}^+$ -glicose introduziu mais um componente amplificador do processo de absorção de fluidos e eletrólitos (SCHULTZ & ZALUSKY, 1964).

As evidências de que vários agentes patógenos diarreicogênicos, tais como *C. difficile*, *C. perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*, dentre outros, estão intimamente relacionados a enterocolites necrotizantes (SCHEIFELE, 1990; KASIMIR *et al.*, 1990), ou ainda, que patógenos tais como *C. jejuni*, *H. pylori* e *V. cholerae*, são produtores de citotoxinas desestabilizadoras da barreira epitelial entérica (GUERRANT *et al.*, 1987; FASANO *et al.*, 1991), induziu uma nova linha de pesquisa no sentido de procurar novas soluções para o paciente diarreico que não fossem apenas de reposição de água e sais, mas também reparadoras das lesões causadas ao tecido pelos diversos agentes patógenos.

O reconhecimento de que a glutamina é o metabólito preferido pelo enterócito levou vários pesquisadores a demonstrarem que este AA era um poderoso agente auxiliador na reparação de lesões da mucosa intestinal (FOX *et al.*, 1988; KLIMBERG *et al.*, 1990; ILLIG *et al.*, 1992), e ainda, que o mesmo agia também como amplificador no transporte de sódio, função esta conferida inicialmente apenas à glicose (SOARES *et al.*, 1991, 1992; LIMA *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 1998; ABELY *et al.*, 2000), por conseguinte, em decorrência destas pesquisas, a adição de glutamina confere uma significativa melhora na qualidade terapêutica das soluções de reidratação oral.

## 9. Relevância e Justificativa

Diarréias em geral, e em particular diarréias infecciosas, são consequências de uma complexa disfunção nos mecanismos fisiológicos de transporte de eletrólitos em um epitélio normal. Nas diarréias infecciosas severas, o pro-

blema dominante não é a infecção em si, mas sim o bloqueio da absorção de água e eletrólitos e a estimulação da secreção dos mesmos, o que leva à desidratação, desequilíbrio eletrolítico e até à morte.

A desidratação, acidose e hipoperfusão de órgãos vitais (podendo chegar até a um completo colapso circulatório) são os grandes responsáveis pela morbidez e mortalidade associadas às doenças diarréicas infecciosas. Doenças estas que nos países ricos (também conhecidos como “do 1º mundo”) são casos episódicos acidentais. Já nos países mais pobres (também conhecidos como “em desenvolvimento”), em função de fatores tais como urbanização desordenada associada à ausência de saneamento básico, baixo nível educacional, precários serviços de saúde pública, e reduzido poder aquisitivo, estas doenças são ainda um flagelo que castiga mais ainda àqueles que, pelos fatores acima descritos, já são subnutridos, e portanto, deficientes em seus sistemas fisiológicos de defesa.

Há, portanto, três opções terapêuticas para o tratamento das diarréias infecciosas:

1. Reposição e manutenção de fluidos e eletrólitos perdidos;
2. Reparo farmacológico dos distúrbios provocados nos mecanismos de transporte de água e eletrólitos mediante o emprego de drogas anti-inflamatórias, bloqueadoras de motilidade, bloqueadoras de canais de  $\text{Cl}^-$ ; e
3. Antibioticoterapia.

Das três opções acima, a que mais se adequa ao contexto de países como o nosso, onde doenças diarréicas são mais aflitivas, é a primeira, pois é nela que se enquadra a Terapia de Reidratação Oral.

Esta terapia será tanto mais eficaz quanto os componentes que compõem as soluções promoverem uma absorção de água, e conseqüentemente de eletrólitos, da forma mais eficiente possível. Além do mais, esta terapia é a de mais baixo custo, não é do tipo invasiva, e dispensa pessoal médico permanente.

## 10. Objetivos

### 10.1. Geral

Comparar dois segmentos distintos do trato gastrointestinal absorptivo (jejuno e íleo) sob a ação de agente estimulador da secreção intestinal e o efeito que a adição de substâncias normalmente absorvíveis possam provocar no sentido de compensar ou minimizar esta ação secretora.

### 10.2. Específicos

1. Avaliar a eficiência *in vitro* do transporte sódio-dependente dos substratos glicose, glutamina, alanina e glicina, e o transporte próton-dependente do di-peptídeo alanil-glutamina, entre duas regiões anátomo-topograficamente distantes (jejuno proximal e íleo distal), em situação normal e pré-incubados com toxina da cólera, usando como modelo, epitélio intestinal de coelho, e para obtenção dos dados, a técnica de fixação de voltagem em câmaras de Ussing.

2. Investigar as relações entre corrente de curto-circuito ( $i_{cc}$ ), diferença de potencial transepitelial ( $V_{TE}$ ) e resistência transepitelial ( $R_{TE}$ ) como função da absorção de substratos.

3. Sugerir um modelo de absorção intestinal, e um possível substrato dentre os estudados, como componente de uma solução de reidratação oral.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Animais Utilizados

Foram usados coelhos albinos da raça California, de ambos os sexos, com peso variando entre 1.100 e 2.000 g. Os animais eram mantidos em jejum com água *ad libitum* nas 24 horas precedentes ao experimento.

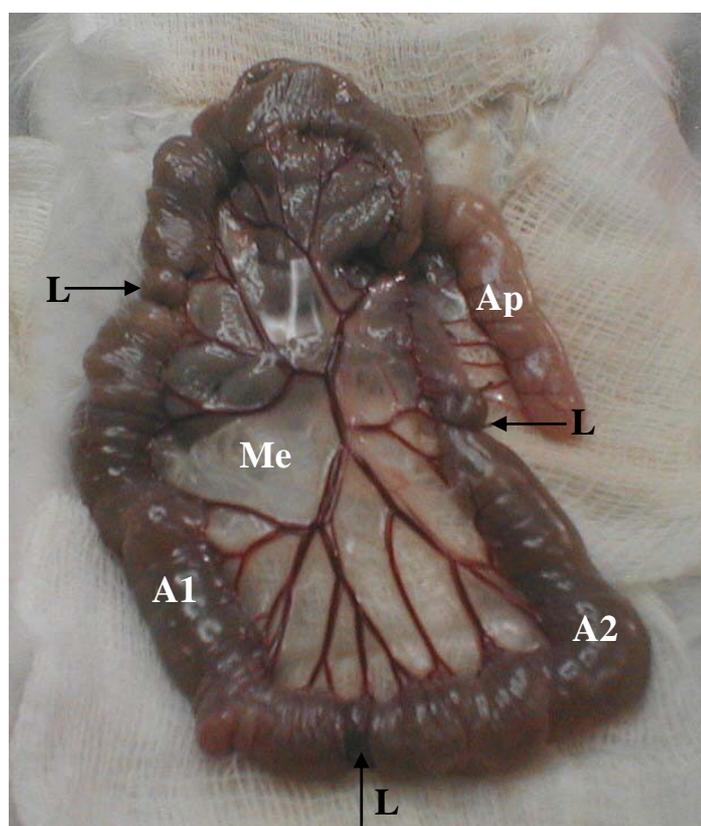
### 2. Procedimento Cirúrgico

Com o animal convenientemente imobilizado, era aplicada, na região glútea, uma injeção intramuscular do sedativo-analgésico-relaxante muscular Rompum (cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4-H-1,3-tiazina, Bayer S.A., Brasil) na dose de 10 mg/kg de peso. Quando o animal mostrava os primeiros sinais de sedação, era aplicada uma injeção intramuscular do anestésico Franco-tar (quetamina base, Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda.) na dose de 60 mg/kg de peso. Observamos que a quetamina, em muitos casos, apesar de provocar uma sedação profunda, não era eficiente em promover analgesia e relaxamento muscular adequados, tanto que alguns de nossos experimentos foram abortados por total impossibilidade de obtenção do efeito anestésico adequado.

Estando o animal convenientemente anestesiado, foi feita uma incisão com cerca de 6 cm na porção média do abdômen, sobre a linha Alba. O intestino delgado é exposto, e na região do íleo correspondente ao fim do apêndice (cerca de 18 cm da válvula íleo-secal), foi feita uma dupla ligadura, e a partir deste ponto, no sentido oral, medimos cerca de 15 cm, quando fazemos uma segunda dupla ligadura, e novamente mais 15 cm é medido e ligado, de forma a obter-se duas alças isoladas de íleo distal (Figura 5). O intestino delgado continua a ser exposto até o ligamento de Treitz (30 a 40 cm do piloro), neste ponto, e agora no sentido aboral, isola-se duas alças de 15 cm de jejuno proximal, conforme acima descrito.

Em cada par de alças, uma é escolhida para injetar-se 5 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, nas duas restantes (uma de jejuno e outra de íleo), foi injetado 5 ml de solução contendo toxina de Cólera (*Sigma Chemical Co.*, USA) diluída em PBS na concentração de 1,0  $\mu\text{g/ml}$ .

Após o preparo das alças, as vísceras eram cuidadosamente reintroduzidas na cavidade abdominal, e a incisão devidamente suturada, o animal era mantido em decúbito dorsal e permanentemente observado, visto que frequentemente torna-se necessário um reforço de anestésico. A figura abaixo mostra duas alças isoladas no íleo distal prontas para a reintrodução no abdômen.



**Figura 5 – Alças Intestinais Isoladas**

A foto acima mostra duas alças intestinais isoladas por duplas ligaduras (L) com cerca de 15 cm cada. Em uma delas (A1), foram injetados 5 ml de PBS estéril, na outra (A2) injetou-se 5 ml de PBS + 5  $\mu\text{g}$  de toxina do cólera. Observa-se ainda o apêndice (Ap) e o mesentério e sua circulação (Me).

### **3. Preparo dos Fragmentos de Membrana**

Após 1 hora de incubação, o animal era sacrificado, a incisão reaberta, e as alças retiradas, colocadas em um Becker contendo PBS a cerca de 5°C, e devidamente identificadas quanto ao conteúdo e posição anatômica de cada uma delas.

Cada alça foi suficientemente lavada pela passagem de PBS resfriado em seu interior para a eliminação de eventuais restos alimentares. Todas as alças eram seqüencialmente varetadas com uma pipeta de vidro de 5 ml, e com o auxílio de um bisturi, fez-se duas suaves incisões ao longo da inserção mesentérica apenas o suficiente para cortar a membrana serosa, que era gentilmente, e em sua totalidade, dissecada de forma que a camada de músculo longitudinal ficasse exposta. Ainda com o bisturi, o corte ao largo da inserção mesentérica é aprofundado, fazendo com que a alça intestinal tome a forma de uma fita sobre a superfície de uma placa de Petri, devidamente umedecida com PBS e apoiada sobre uma placa de gelo, ficando a mucosa voltada para cima. O tecido assim preparado foi fragmentado em pedaços com cerca de 3 cm de comprimento descartando-se aquelas regiões que apresentam placas de Peyers.

Cada fragmento de tecido foi convenientemente colocado entre duas hemicâmaras de acrílico com uma área escavada interna de 1,0 cm<sup>2</sup> e um volume total de 0,8 cm<sup>3</sup>, cada hemicâmara possui quatro orifícios para as pontes de agar e líquido perfusante, este conjunto é então montado em um suporte adequado e o compartimento seroso é preenchido com Ringer-Glicosado, enquanto que o mucoso o é com Ringer-Manitol.

### **4. Montagem dos Fragmentos de Tecido**

Uma das duas hemicâmaras possui cinco pinos pontiagudos de aço inox fixados ao longo da borda do escavado interno, enquanto que na outra he-

micâmara cinco orifícios correspondentes permitem o perfeito encaixe dos pinos.

Com o auxílio de pinças, os fragmentos retangulares de tecido são cuidadosamente apoiados e transfixados nos pinos de forma que a “membrana epitelial” se mantenha em posição até a justaposição da outra hemicâmara, o conjunto é então montado em um suporte adequado (Figura 6). Do lado mucoso é colocado 0,8 ml de solução livre de glicose (Ringer-Manitol), enquanto que no lado seroso é acrescentado também 0,8 ml de solução com glicose (Ringer-Glicose).

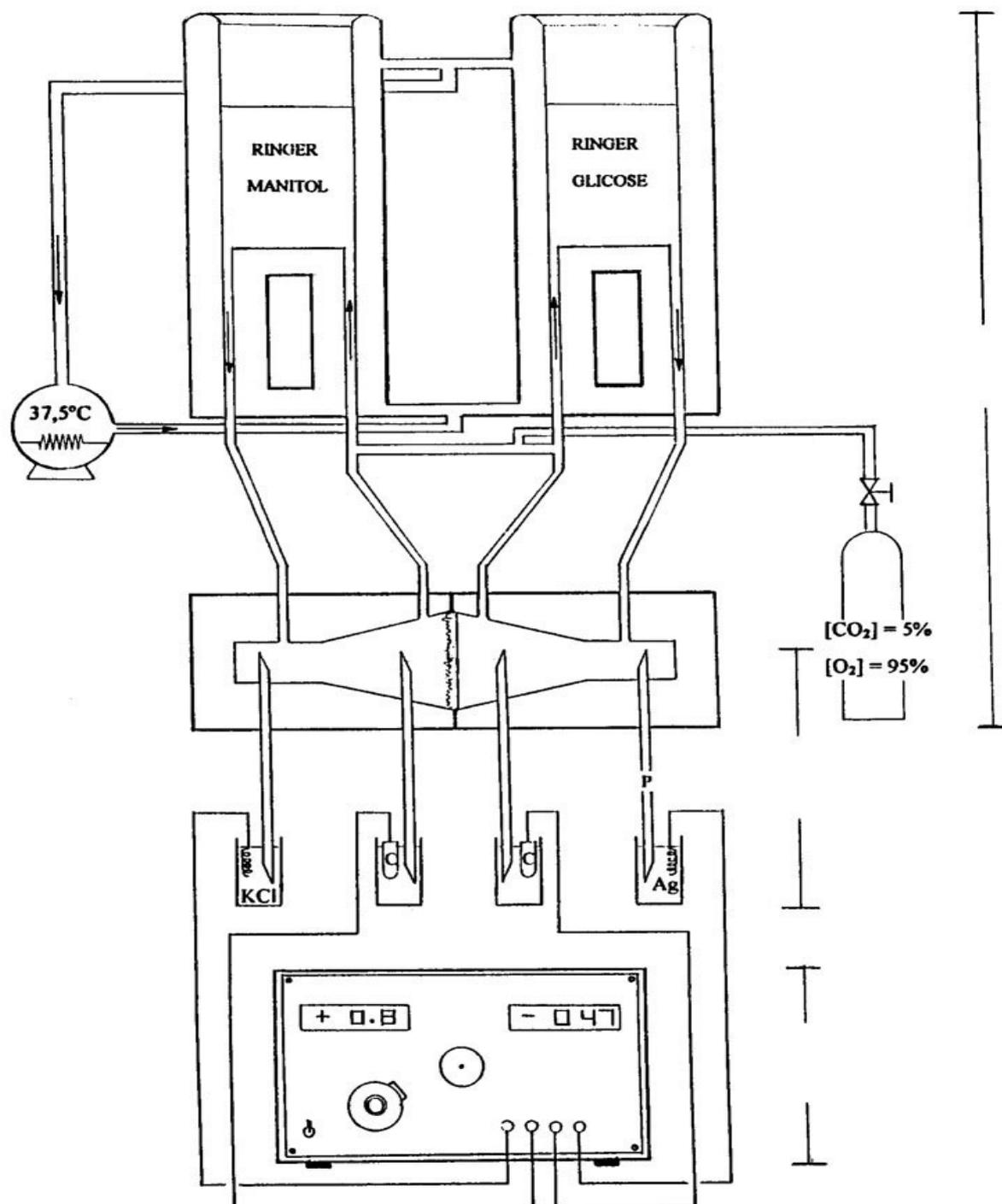


**Figura 6 – Montagem dos Fragmentos de Tecido**

A foto acima mostra um fragmento de tecido (FT) fixado sobre uma hemicâmara (Hc) na qual já estão colocadas as pontes salinas de agar (P). Observa-se ainda que a placa de Petri esta apoiada sobre uma barra de gelo. No canto superior direito, vêem-se as hemicâmaras que serão justapostas àquela do centro da placa de Petri.

## 5. Princípio de Funcionamento das Câmaras de Ussing

Antes da montagem definitiva das hemicâmaras com os fragmentos de alça, as câmaras de Ussing devem ser ajustadas. O sistema completo de câmaras de Ussing pode ser separado em três partes: a primeira parte é constituída pelas hemicâmaras que mantêm a membrana e pelos recipientes de soluções perfusantes permanentemente aeradas e com temperatura constante; a segunda parte é constituída pelas conexões elétricas das hemicâmaras formadas pelas pontes salinas, eletrodos de prata e de calomelano (*Beckman Instruments Inc.*, Irvine, CA, USA); e a terceira parte é constituída pelo fixador automático de voltagem BIC (modelo AVC-300) (*Buck & Co. Inc.*, Franklin, MA, USA). Cada par de hemicâmaras está conectada ao fixador de voltagem por dois pares de pontes salinas (agar-Ringer). O primeiro par é constituído por tubos de polietileno com cerca de 15 cm de comprimento e 1,57 mm de diâmetro interno, preenchido com gel agar-Ringer. Uma das extremidades destes tubos é inserida no orifício de cada hemicâmara mais próximo das faces do fragmento de tecido, enquanto que as outras extremidades são mergulhadas em recipientes contendo solução saturada de KCl. Nestes recipientes, são também mergulhados eletrodos de calomelano, que são ligados às entradas do fixador de voltagem. O segundo par de pontes é também constituído por tubos de polietileno, mas com 2,15 mm de diâmetro interno. Uma de suas extremidade é inserida no orifício distal da hemicâmara, enquanto que a outra é mergulhada em recipiente também contendo KCl saturado. Os eletrodos de prata aí colocados farão a conexão com as saídas do fixador de voltagem (Figura 7).



**Figura 7 – Representação Esquemática das Câmaras de Ussing**

O sistema completo é constituído pelas partes: I- Hemicâmaras conectadas aos banhos perfusantes aerados e aquecidos; II- Conexões elétricas via pontes salinas, eletrodos de calomelano (c) e de prata (Ag); III- Fixador automático de voltagem.

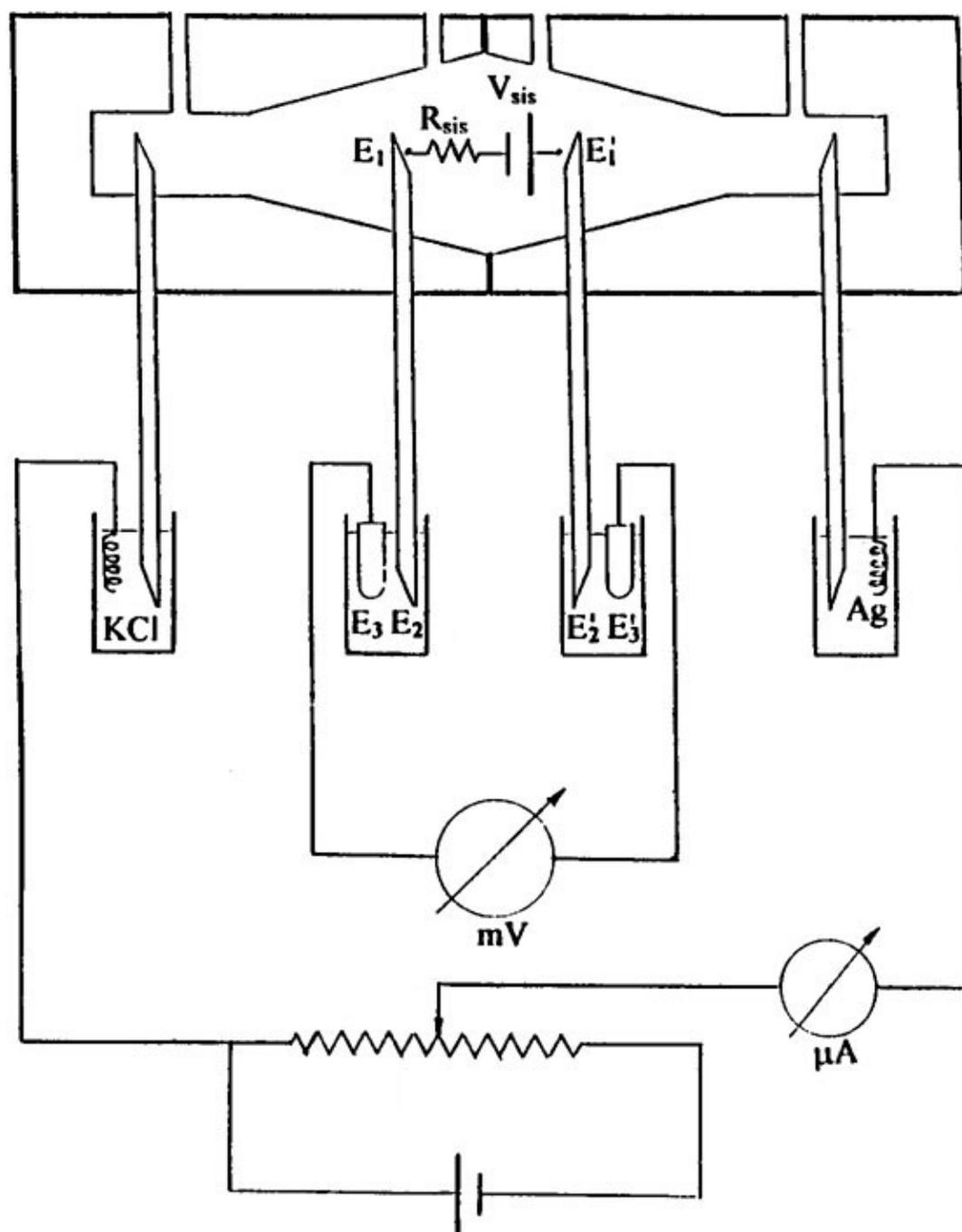
As junções entre as pontes de agar, bem como os eletrodos de calomelano e as soluções de KCl e fisiológicas (PBS) que preenchem as câmaras (Figura 8), possibilitam processos de difusão de íons nas interfaces de contato, originando potenciais de junção líquida ( $E_1$ ), portanto, mesmo sem os fragmentos de tecido montados nas câmaras, pode ser gerado uma ddp por conta destas junções, e que pode ser expresso como a seguir:

$$E_1 + E_2 + E_3 - E_1' - E_2' - E_3' = \Delta E_{\text{liq}}$$

Dependendo do valor de cada potencial de junção, esta diferença pode ser:

$$\Delta E_{\text{liq}} = 0 \quad \Delta E_{\text{liq}} < 0 \quad \Delta E_{\text{liq}} > 0$$

Isto é equivalente ao próprio sistema gerar uma bateria ( $\Delta E_{\text{liq}} = V_{\text{sis}}$ ) e possuir uma resistência intrínseca ( $R_{\text{sis}}$ ), como representado na Figura 8.



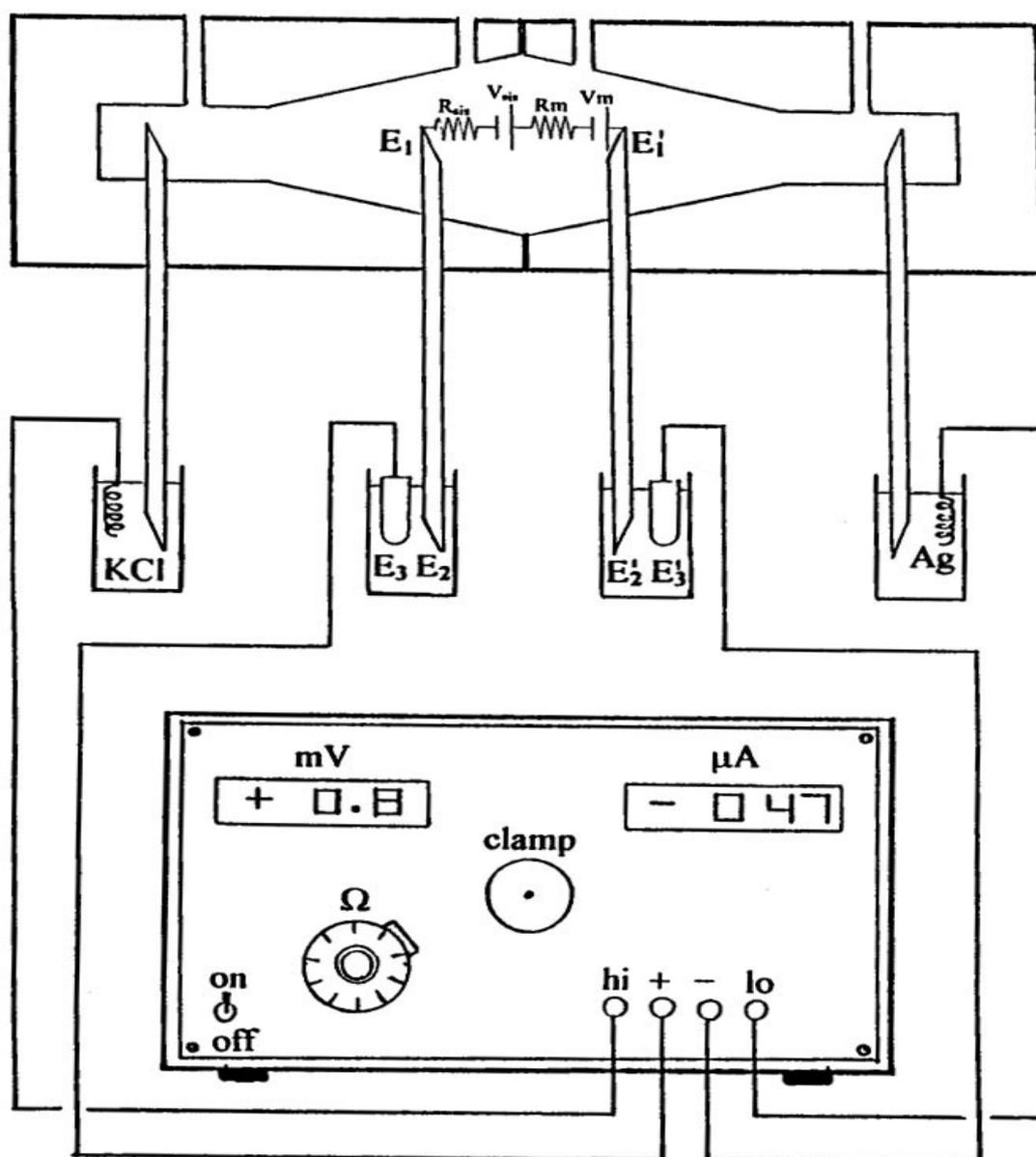
**Figura 8 – Sistema Simplificado de um Fixador de Voltagem**

Com o circuito aberto, o milivoltímetro ( $mV$ ) expressa a ddp resultante dos potenciais de junção líquida, simbolizado por  $V_{sis}$ . Ajustando-se o potenciômetro ( $POT$ ), gera-se uma corrente medida no microamperímetro ( $\mu A$ ) e que origina uma ddp antagônica a do sistema

Procuramos sempre trabalhar com a menor  $V_{\text{sis}}$  possível. Arbitrariamente, estipulamos  $\pm 0,8$  mV como valor máximo admissível, portanto, quando da montagem preliminar para a determinação de  $R_{\text{sis}}$ , obtinha-se valores de  $V_{\text{sis}}$  maiores que  $\pm 0,8$  mV, todo o sistema (hemicâmaras e pontes salinas) era desmontado, as pontes eram trocadas e revistas as diversas conexões.

O princípio de desenvolvimento das técnicas aqui empregadas é baseado na possibilidade das medidas de diferença de potencial (ddp) e correntes (i) geradas por um tecido vivo como função de potenciais eletroquímicos, e das propriedades peculiares dos tecidos em gerarem fluxos iônicos, por conseguinte, é fundamental que diferenças de potencial e correntes sejam mediadas de forma seletiva.

O equipamento mostrado nas figuras 9 e 10 é um fixador de voltagem. Este equipamento nos permite gerar uma tensão antagônica à preparação, cuja resultante seja uma desejada ddp, e que ao mesmo tempo seja possível medir-se a corrente produzida, e com estes dados possa-se determinar valores de resistência inerentes ao circuito em estudo. Para melhor entendimento das medidas realizadas neste trabalho, apresentamos a seguir o esquema simplificado do equipamento em questão (Figura 9).



**Figura 9 – Câmaras de Perfusão e suas Conexões ao Fixador de Voltagem**

As entradas + e - do aparelho estão permanentemente conectadas ao milivoltímetro e lêem as ddp geradas pelos fragmentos de tecido ( $V_m$ ), bem como aquelas geradas pelo próprio sistema ( $V_{sis}$ ) através das conexões feitas pelas pontes salinas e eletrodos de calomelano. Os eletrodos de prata ( $Ag$ ) estão ligados em série com o microamperímetro ( $\mu A$ ). O potenciômetro ( $\Omega$ ) compensa a resistência do sistema ( $R_{sis}$ ) e o comando (clamp) é o potenciômetro para o ajuste de fixação de voltagem

## 6. Sistema de Perfusão/Aeração das Câmaras de Ussing

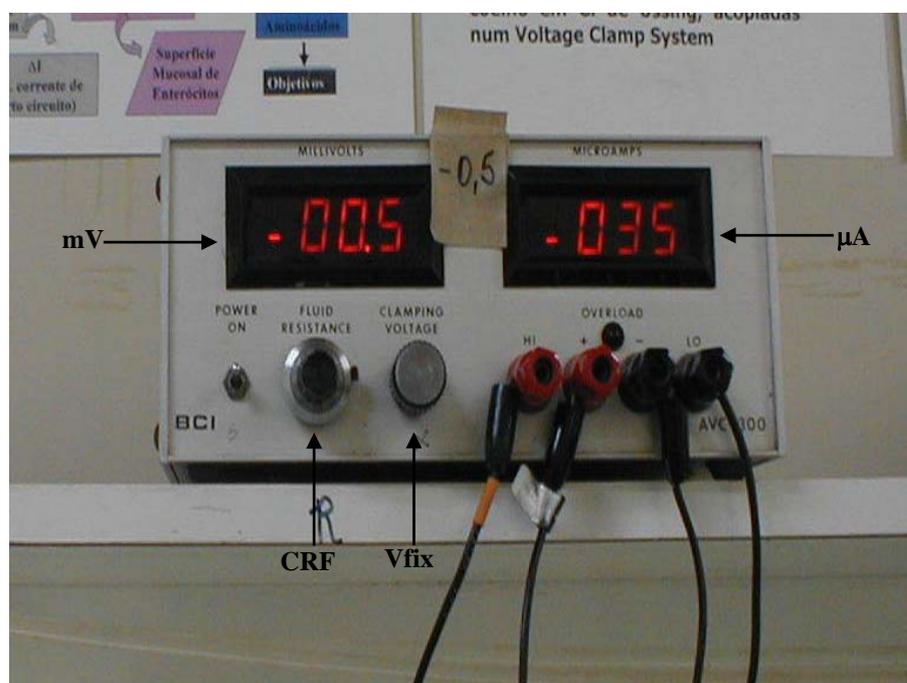
Cada hemicâmara possui, além dos orifícios das pontes de agar, mais dois orifícios para acoplamento do banho de perfusão individual para cada hemicâmara. A circulação da solução é feita por arraste por borbulhamento de mistura carbogênica. O recipiente que contém a solução perfusante é envolvida por uma “camisa” na qual circula água aquecida a 37,8°C (FIELD *et al.*, 1971), mantida por uma bomba de circulação termo-estável (Haake Fe2, Berlin-W-Germany). O banho que irá perfundir o lado mucoso é preenchido com 9,2 ml de Ringer-Manitol, enquanto que o do lado seroso o é com 9,2 ml de Ringer-Glicose (Figura 7).

## 7. Ajuste da Resistência Intrínseca do Sistema

Como já comentado anteriormente, é possível que ocorra o aparecimento de uma ddp espontânea (conseqüente do desequilíbrio dos potenciais de junção líquida), diferente de zero, além disto, devemos considerar que as correntes geradas irão atravessar percursos constituídos por soluções, que apesar de conterem eletrólitos, possuem uma resistência própria. A determinação da resistência é feita com as duas hemicâmaras devidamente montadas e preenchidas com solução fisiológica. Com todas as pontes salinas e eletrodos devidamente posicionados, ajusta-se o comando de fixação de voltagem de forma a ler-se 0,0  $\mu\text{A}$ , anota-se a ddp registrada no mostrador do milivoltímetro ( $V_0$  = voltagem espontânea do sistema), ajusta-se novamente o fixador de voltagem até que o microamperímetro acuse uma corrente de 100  $\mu\text{A}$  e anota-se o novo valor de ddp ( $V_{100}$ ) expresso no milivoltímetro. A resistência do sistema é calculada pela aplicação da lei de Ohm:

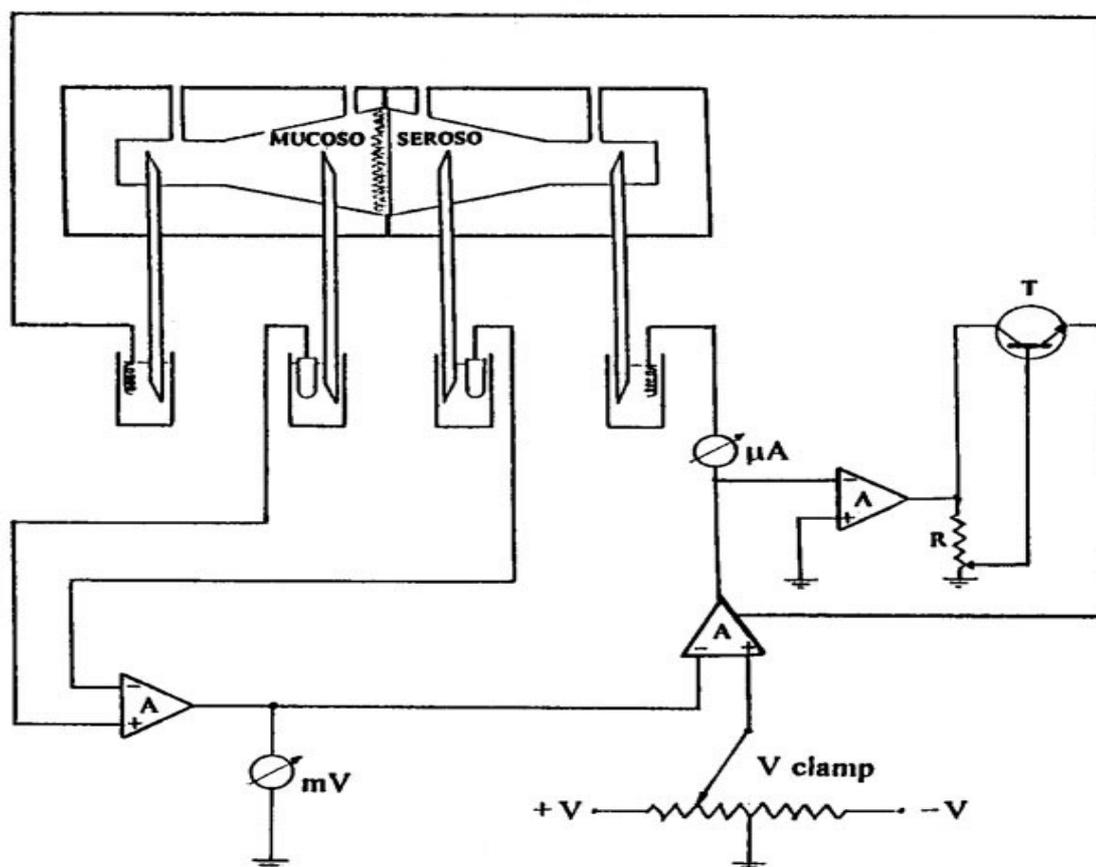
$$R_{\text{sis}} = \frac{(V_{100} - V_0)\text{mV}}{100 \mu\text{A}} = (V_{100} - V_0) \times 10 \Omega$$

O valor de  $R_{\text{sis}}$  é ajustado no potenciômetro de 10 voltas (*Control Resistance Fluid*) do aparelho (Figura 10) de forma que (segundo o esquema eletrônico da Figura 11) se acrescente, automática e permanentemente, ao sistema, uma queda de tensão antagônica para compensar a queda de tensão causada pela resistência intrínseca do sistema, de forma que as leituras de corrente feitas a partir deste ajuste sejam as da corrente que realmente precisa ser fornecida para fixar a voltagem do fragmento de tecido na ddp desejada.



**Figura 10 – Aparelho Fixador de Voltagem**

A foto acima mostra o potenciômetro de 10 voltas (CRF), o qual faz a compensação da  $R_{\text{sis}}$ , que corresponde, na Figura 11, à letra R. Observa-se ainda os visores do milivoltímetro (mV) e do microamperímetro ( $\mu\text{A}$ ), cujos valores apresentados evidenciam que o sistema está gerando uma ddp de  $-0,5$  mV e que a corrente necessária para anular a ddp gerada pelo tecido é de  $-35$   $\mu\text{A}$ , sendo estes valores ajustados em Vfix.



**Figura 11 – Circuito Esquemático do Fixador de Voltagem com Compensação de  $R_{sis}$**   
 Os triângulos com a letra A em seu interior representam os amplificadores operacionais que têm a propriedade de comparar os potenciais das suas entradas (+ e -) sem consumir as correntes da preparação. A ddp gerada entre os lados MUCOSO e SEROSO, e transmitida para o amplificador via eletrodos de calomelano, é observada em mV e é também a entrada negativa (-) do segundo amplificador; a entrada positiva (+) deste último está ligada a um divisor de tensão (Vfix), o qual nos permite ajustar uma ddp antagônica àquela gerada pela preparação e pelo sistema, promovendo assim uma corrente ( $i_{cc}$ ) observada no  $\mu A$ . O terceiro amplificador alimenta um transistor (T), cujo funcionamento é função de R, que por sua vez é proporcional à resistência do sistema ( $R_{sis}$ ); o transistor gera uma ddp igual e antagônica àquela do potencial de  $i_{cc} \cdot R_{sis}$ , eliminando-a de futuras leituras.

## 8. Soluções Perfusoras

A composição da solução de Ringer usada em todos os experimentos seguiu a recomendação dada por Field (1971a), tendo as seguintes concentrações em mM:  $\text{Na}^+ = 145$ ,  $\text{K}^+ = 4,6$ ,  $\text{Ca}^{++} = 3,4$ ,  $\text{Mg}^{++} = 0,8$ ,  $\text{Cl}^- = 119$ ,  $\text{SO}_4^{--} = 0,8$  e  $\text{HCO}_3^- = 25$ . Todos os componentes da solução foram fornecidas pela *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MA, USA.

Para cada experimento, era feito um litro de Ringer com a composição mM acima citada. Após a mistura dos componentes, a solução era borbulhada durante 15 min. com mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$ ), fornecida pela White Martins Gases Industriais do Nordeste S. A., Fortaleza, CE. Em seguida, ajustou-se o pH para 7,4 com peagâmetro Beckman-32 da *Beckman Instruments Inc.*, Fullerton, CA, USA, e adicionava-se solução de HCl 1N o quanto necessário.

Para a confecção das pontes de agar, tomou-se 50 ml de Ringer, ao qual adiciona-se 2,4 g de agar (*Sigma Chemical Co.*) e coloca-se em banho-maria por 30 min.

Da solução salina acima descrita, tomou-se duas porções de 200 ml: à uma porção adiciona-se 180 mg de D-(+)-Glicose (*Sigma Chemical Co.*), que será empregada para perfundir o lado seroso do fragmento de intestino, e à outra porção, adiciona-se 182,2 mg de D-Manitol (*Sigma Chemical Co.*), sendo esta empregada na perfusão do lado mucoso.

## 9. Substratos Utilizados nos Experimentos

- D-Glicose            *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO, USA;
- L-Glutamina        *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO, USA;
- L-Alanina            *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO, USA;
- Glicina              *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO, USA;
- Alanil-glutamina   *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO, USA;

## **10. Fase Experimental**

### **10.1. Período de Estabilidade**

Estando os fragmentos de tecido devidamente montados, pontes e eletrodos corretamente ligados ao fixador de voltagem/registrator, as preparações (total de 8 câmaras) são então perfundidas com suas respectivas soluções (Ringer-Manitol do lado mucoso e Ringer-Glicose do lado seroso), por um período de 30 min., anotando-se, a intervalos de 10 min., as leituras de ddp e corrente, com o objetivo de observar-se a tendência de estabilização da preparação ou se o fragmento de tecido foi lesado, caso em que será imediatamente substituído.

Vale salientar que o fixador de voltagem é ajustado para apresentar uma leitura no milivoltímetro igual àquela do ddp do sistema. Vale ressaltar também que câmaras montadas com fragmentos de tecido anatomicamente contíguos podem apresentar uma razoável variação nas leituras de corrente e ddp, discrepância esta explicada pela não homogeneidade na montagem das câmaras (erro do operador) quando um fragmento pode ser mais ou menos distendido do que outro (SCHULTZ & ZALUSKY, 1964).

### **10.2. Período de Adição de Substratos**

Foram realizados seis conjuntos de experimentos (ou seja, seis substratos diferentes). Cada conjunto constituiu-se de quatro grupos de experimentos, com quatro animais diferentes para cada substrato. Cada grupo compunha-se de oito câmaras, sendo quatro para alças de jejuno e quatro para as do íleo. Em cada um destes subgrupos, duas câmaras eram destinadas para controle. Após os 30 min. do período de estabilidade, procedeu-se a adição de 100 µl de substrato na seqüência do menos concentrado para o mais concentrado e de forma cumulativa, tanto nas câmaras controle como nas pré-incubadas com toxina. Após a última coleta de dados, foi adicionada a solução perfusora (200 µl de Teofilina a  $10 \times 10^{-3}$  M) do lado seroso com a finalidade de testar a estabilidade

elétrica dos fragmentos de tecido, durante 30 min., observa-se se não ocorre uma sobrecarga de corrente, e no caso disso ocorrer, os resultados desta câmara serão descartados.

### **11. Tratamento Estatístico**

Os valores tabelados nas planilhas que constituem os anexos 2 a 11 tiveram suas médias e respectivos erro padrão da média (epm) calculados pelo programa Microsoft® Excel 97. A comparação entre médias do mesmo grupo de experimentos teve sua significância avaliada pelo emprego do teste t de *Student* para amostras pareadas. Entre grupos diferentes, e com n diferente, foi usado o teste t de *Student* não-pareado. Consideramos como estatisticamente significativo valores com  $p < 0,05$ , mas expressamos o valor real obtido no cálculo de significância.

## RESULTADOS

### 1. Ação da Glicose sobre Jejuno

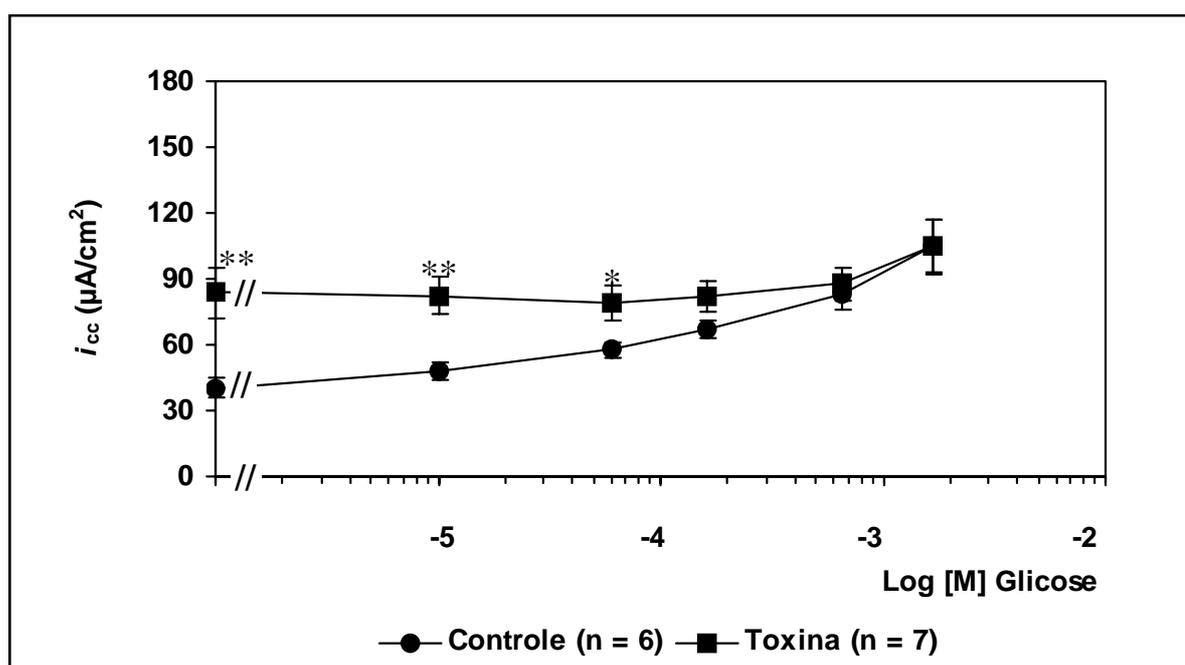
Os valores fornecidos pela Tabela 4 mostram que a adição cumulativa de glicose na preparação controle (não pré-incubada com toxina) gerou um aumento significativo da corrente de curto-circuito ( $i_{cc}$ ), com um  $\Delta i_{cc} = 64,2 \pm 12,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $p < 0,01$  – teste t pareado). A partir deste momento,  $\Delta i_{cc}$  é definido como a diferença entre o valor de  $i_{cc}$  correspondente à concentração final acumulada de substrato e o valor da corrente basal (concentração de substrato). Nas preparações pré-incubadas com toxina, o valor basal (Dose M = 0) da  $i_{cc}$  é significativamente maior que o valor basal do grupo controle (cerca de 2,1 vezes,  $p < 0,01$  – teste t não-pareado). A adição cumulativa de glicose só provocou aumento na  $i_{cc}$  na última dose. Na Figura 12 estão representadas as curvas dose-resposta para os dois grupos (controle e toxina). O teste para dados não-pareados mostra que no início as duas curvas são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ), mas tendem a convergir para um ponto comum à medida que a dose aumenta.

A diferença de potencial transepitelial ( $V_{TE}$ ) aumenta no grupo controle progressiva e significativamente com a adição de glicose ( $\Delta V_{TE} = 1,5 \pm 0,3$  mV,  $p < 0,01$  – teste t pareado). A partir deste momento,  $\Delta V_{TE}$  é definido de forma semelhante a  $\Delta i_{cc}$ . No grupo toxina, a  $V_{TE}$  basal é mais que o dobro do controle (2,3 vezes,  $p < 0,05$  – teste t não-pareado) e também cresce significativamente com a adição cumulativa de glicose ( $\Delta V_{TE} = 1,7 \pm 0,2$  mV,  $p < 0,01$  – teste t pareado), conforme pode ser visto na Figura 13.

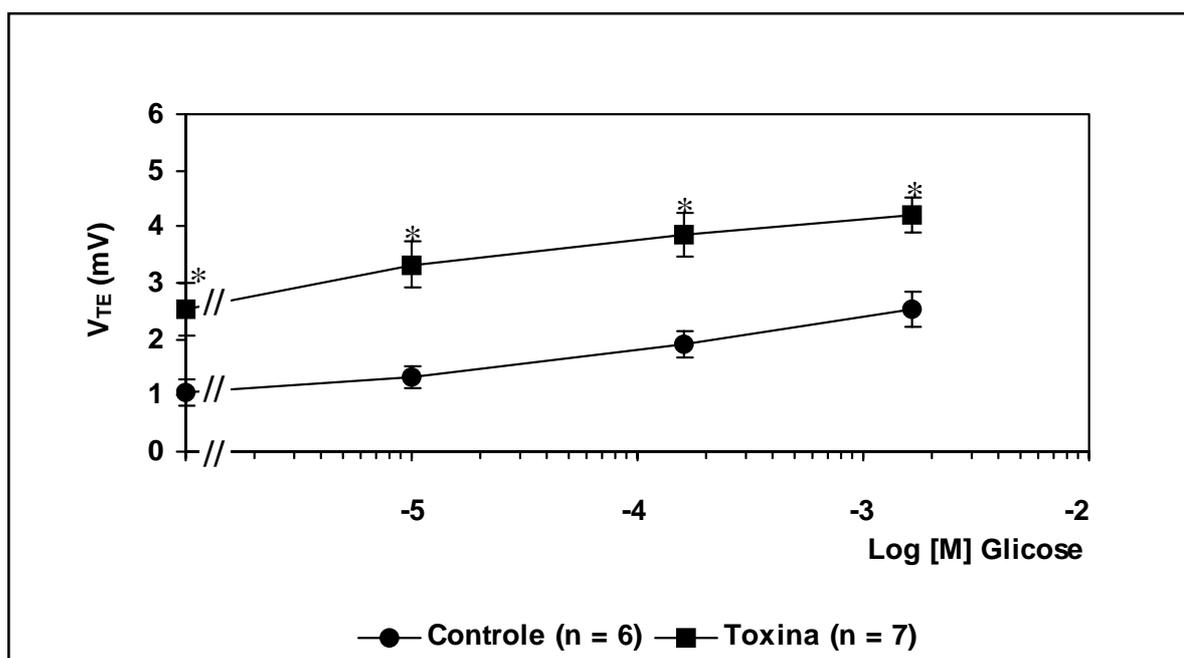
As resistências transepiteliais ( $R_{TE}$ ) dos grupos controle e toxina entre si (Figura 14) não mostram inicialmente uma  $\Delta R_{TE}$  significativa, mas a adição subsequente de glicose aumenta esta diferença, tanto que na dose final ela é significativa ( $p < 0,02$  – teste t pareado). A partir deste momento, definimos  $\Delta R_{TE}$  de forma análoga àquela de  $\Delta V_{TE}$  e  $\Delta i_{cc}$ . O grupo controle mostra um comportamento constante.

**Tabela 4 – Resultados da Ação da Glicose sobre Jejuno no Grupo Controle (n = 6) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 7). Sumário dos valores dos Anexos 2 e 3.**

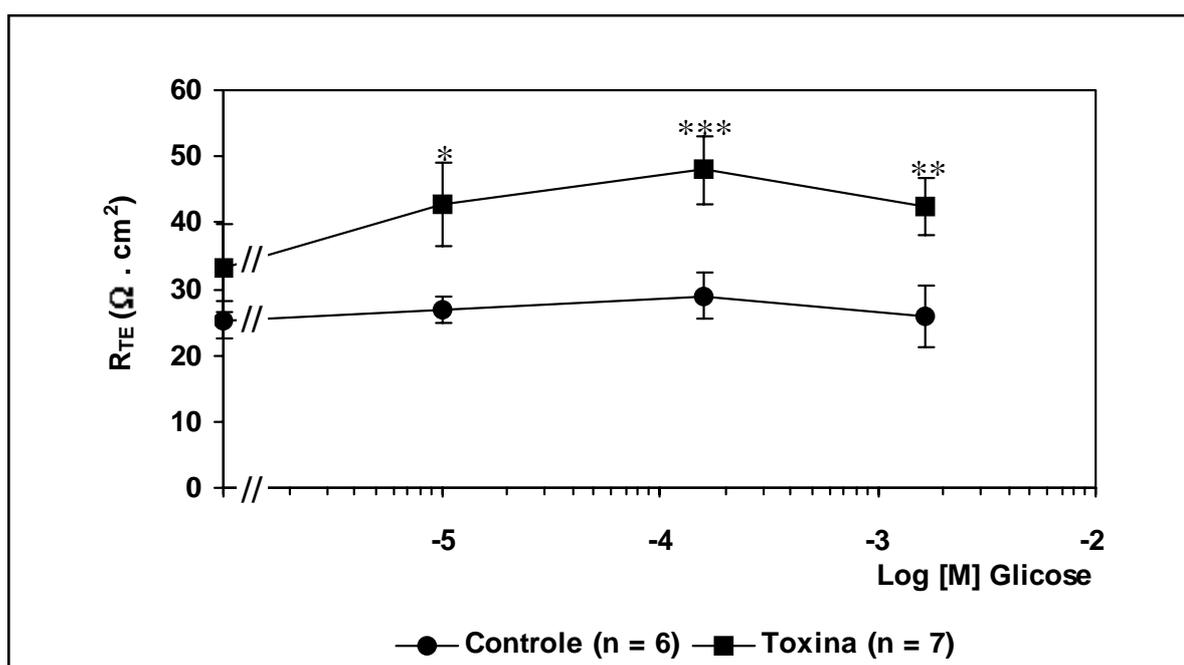
| <b>G L I C O S E s o b r e J E J U N O</b> |  |               |  |               |   |               |
|--|--|---------------|--|---------------|---|---------------|
| <b>Dose (M)</b>                            | <b><math>i_{cc} \pm \text{epm}</math> (<math>\mu\text{A}/\text{cm}^2</math>)</b> |               | <b><math>V_{TE} \pm \text{epm}</math> (mV)</b> |               | <b><math>R_{TE} \pm \text{epm}</math> (<math>\Omega \cdot \text{cm}^2</math>)</b> |               |
|  | <b>Controle</b>  | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>                                | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>   | <b>Toxina</b> |
| 0  | 40,5 ± 4,9   | 83,7 ± 11,5   | 1,1 ± 0,2                                      | 2,5 ± 0,5     | 25,3 ± 2,8  | 33,1 ± 6,5    |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                       | 48,2 ± 3,9   | 82,4 ± 8,9    | 1,3 ± 0,2                                      | 3,3 ± 0,4     | 26,8 ± 1,9  | 42,7 ± 6,2    |
| 6 x 10 <sup>-5</sup>                       | 57,7 ± 3,6   | 79,0 ± 7,6    | –  | –             | –   | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-4</sup>                     | 67,0 ± 4,4   | 82,1 ± 7,2    | 1,9 ± 0,2                                      | 3,9 ± 0,4     | 29,0 ± 3,6  | 48,0 ± 5,1    |
| 6,6 x 10 <sup>-4</sup>                     | 83,5 ± 7,5   | 87,9 ± 7,4    | –  | –             | –   | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-3</sup>                     | 104,7 ± 12,3   | 104,6 ± 12,0  | 2,5 ± 0,3                                      | 4,2 ± 0,3     | 25,8 ± 4,6  | 42,6 ± 4,3    |



**Figura 12 – Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$  versus Log [M]) da Glicose Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunó Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 13 – Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$  versus Log [M]) da Glicose Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunó Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,01$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 14 – Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$  versus Log [M]) da Glicose Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunó Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,02$ ; \*\*\*  $p < 0,01$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.

## 2. Ação da Glicose sobre Íleo

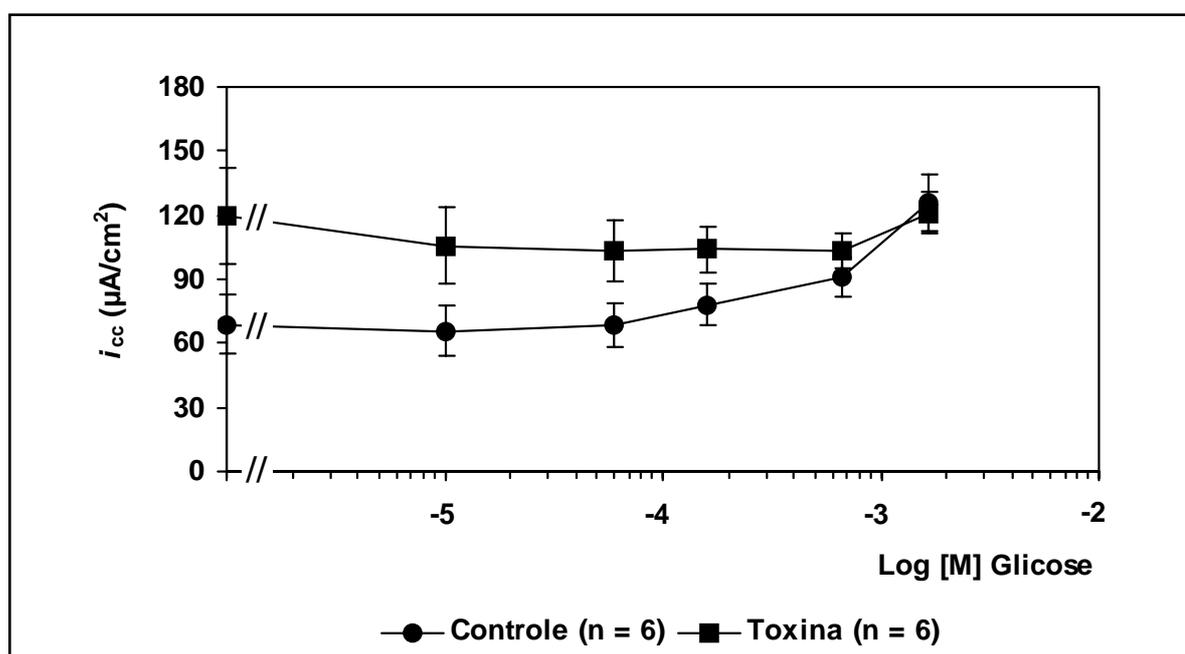
Os valores fornecidos pela Tabela 5 mostram que a adição cumulativa de glicose ao lado mucoso de fragmentos de íleo gerou um aumento da  $i_{cc}$  no grupo controle altamente significativo ( $\Delta i_{cc} = 56,7 \pm 6,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0,01$  – teste t pareado), enquanto que no grupo toxina observa-se que a corrente basal (Dose M = 0) é significativamente maior (cerca do dobro) que a da corrente correspondente ao grupo controle ( $\Delta i_{cc} = 62,8 \pm 18,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0,05$  – teste t não-pareado), mas, estatisticamente, não ocorreu uma variação significativa da  $i_{cc}$  com a adição cumulativa de glicose. Contudo, a Figura 15 sugere um comportamento (curva média central) decrescente.

As  $V_{TE}$ , tanto do grupo controle quanto do grupo toxina, aumentaram significativamente ( $p < 0,01$  – teste t pareado) em função da adição cumulativa de glicose, além do fato de que a curva  $V_{TE}$  do grupo toxina ser significativamente maior (cerca de 1,5 vezes) que aquela do grupo controle ( $p < 0,05$  – teste t não-pareado), conforme pode ser visto na Figura 16.

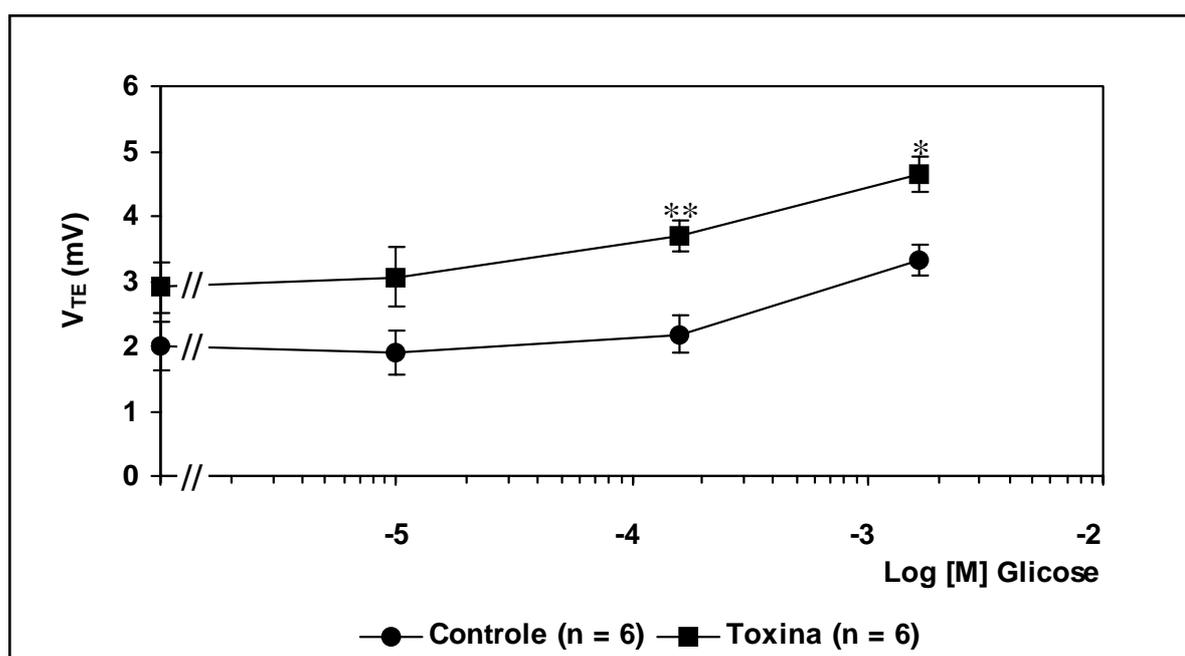
A Figura 17 mostra as curvas das  $R_{TE}$  dos dois grupos (controle e toxina). Segundo a análise estatística, a curva do grupo controle sofreu uma redução significativa ( $\Delta R_{TE} = -2,3 \pm 0,9 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $p < 0,05$  – teste t pareado) em função da adição de glicose, enquanto que a curva do grupo toxina sofreu um acréscimo altamente significativo ( $\Delta R_{TE} = 12,4 \pm 3,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $p < 0,01$  – teste t pareado). A diferença entre os pontos das duas curvas correspondentes à dose máxima cumulativa é também muito significativa ( $\Delta R_{TE} = 13,6 \pm 4,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $p < 0,05$ ), evidenciando a nítida diferença de comportamento entre o tecido pré-incubado com toxina daquele sadio.

**Tabela 5 – Resultados da Ação da Glicose sobre Íleo no Grupo Controle (n = 6) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 6). Sumário dos valores dos Anexos 4 e 5.**

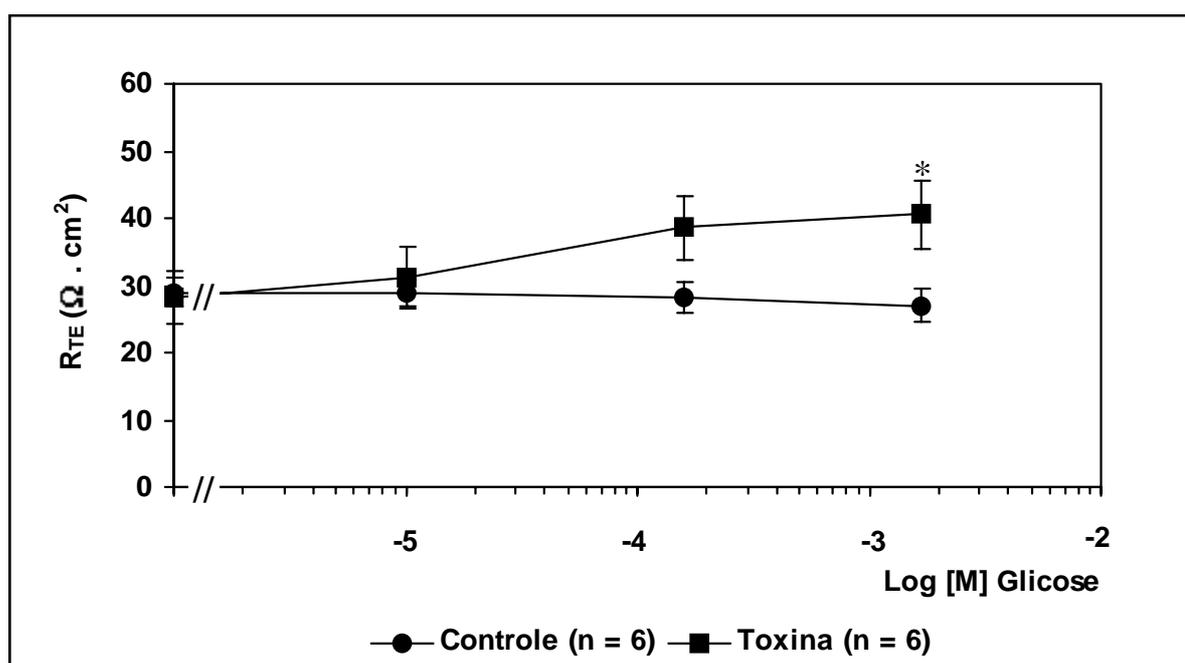
| <b>G L I C O S E   s o b r e   Í L E O</b> |  |               |  |               |   |               |
|--|--|---------------|--|---------------|---|---------------|
| <b>Dose (M)</b>                            | <b><math>i_{cc} \pm \text{epm}</math> (<math>\mu\text{A}/\text{cm}^2</math>)</b> |               | <b><math>V_{TE} \pm \text{epm}</math> (mV)</b> |               | <b><math>R_{TE} \pm \text{epm}</math> (<math>\Omega \cdot \text{cm}^2</math>)</b> |               |
|  | <b>Controle</b>  | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>                                | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>   | <b>Toxina</b> |
| 0  | 69,0 ± 13,7  | 119,3 ± 22,5  | 2,0 ± 0,4                                      | 2,9 ± 0,4     | 29,0 ± 2,3  | 28,1 ± 4,0    |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                       | 65,5 ± 11,8  | 105,4 ± 17,9  | 1,9 ± 0,3                                      | 3,1 ± 0,5     | 28,8 ± 2,1  | 31,3 ± 4,6    |
| 6 x 10 <sup>-5</sup>                       | 69,0 ± 10,2  | 103,4 ± 14,5  | –  | –             | –   | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-4</sup>                     | 78,2 ± 10,1  | 104,1 ± 10,9  | 2,2 ± 0,3                                      | 3,7 ± 0,2     | 28,2 ± 2,3  | 38,6 ± 4,7    |
| 6,6 x 10 <sup>-4</sup>                     | 91,0 ± 9,5   | 103,3 ± 7,8   | –  | –             | –   | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-3</sup>                     | 125,7 ± 13,1   | 121,0 ± 9,9   | 3,3 ± 0,2                                      | 4,6 ± 0,3     | 27,0 ± 2,5  | 40,6 ± 5,0    |



**Figura 15 – Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$  versus Log [M]) da Glicose Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Óleo Distal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 16 – Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$  versus Log [M]) da Glicose Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 17 – Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$  versus Log [M]) da Glicose Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,05$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.

### 3. Comparação entre os Resultados da Ação da Glicose sobre Jejuno e sobre Íleo nos Grupos Controle e Toxina

- 1) As correntes basais do grupo controle do jejuno são significativamente diferentes ( $p < 0,05$  – teste t não-pareado) das correntes basais do grupo controle do íleo (íleo  $>$  jejuno) ;
- 2) O aumento de corrente ( $\Delta i_{cc}$ ) provocado pela adição de glicose no grupo controle do jejuno ( $64,2 \pm 13,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) não é significativamente diferente do correspondente acréscimo provocado no íleo ( $56,7 \pm 15,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ );
- 3) As correntes basais do grupo pré-incubado com toxina não são estatisticamente diferentes quando comparamos o jejuno com o íleo, mas, há uma forte tendência de que a ação da toxina no íleo seja maior que no jejuno;
- 4) A adição cumulativa de glicose no jejuno do grupo pré-incubado com toxina provocou um aumento não significativo de corrente ( $\Delta i_{cc} = 20,9 \pm 10,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), no entanto, houve aumento significativo (174%,  $p < 0,01$  – teste t pareado) dessa corrente no grupo controle, sugerindo que a presença da toxina reduz a absorção de glicose. No íleo, a variação de corrente como função da adição de glicose é estatisticamente nula, e neste caso, a ação da toxina bloqueou ou mascarou a absorção da glicose mais intensamente que no jejuno;
- 5) A  $R_{TE}$  no íleo pré-incubado com toxina foi, dentre os quatro grupos, a única que aumentou significativamente ( $\Delta R_{TE} = 12,4 \pm 3,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $p < 0,01$  – teste t pareado) em função da adição de glicose.

#### 4. Ação da Glutamina sobre Jejuno

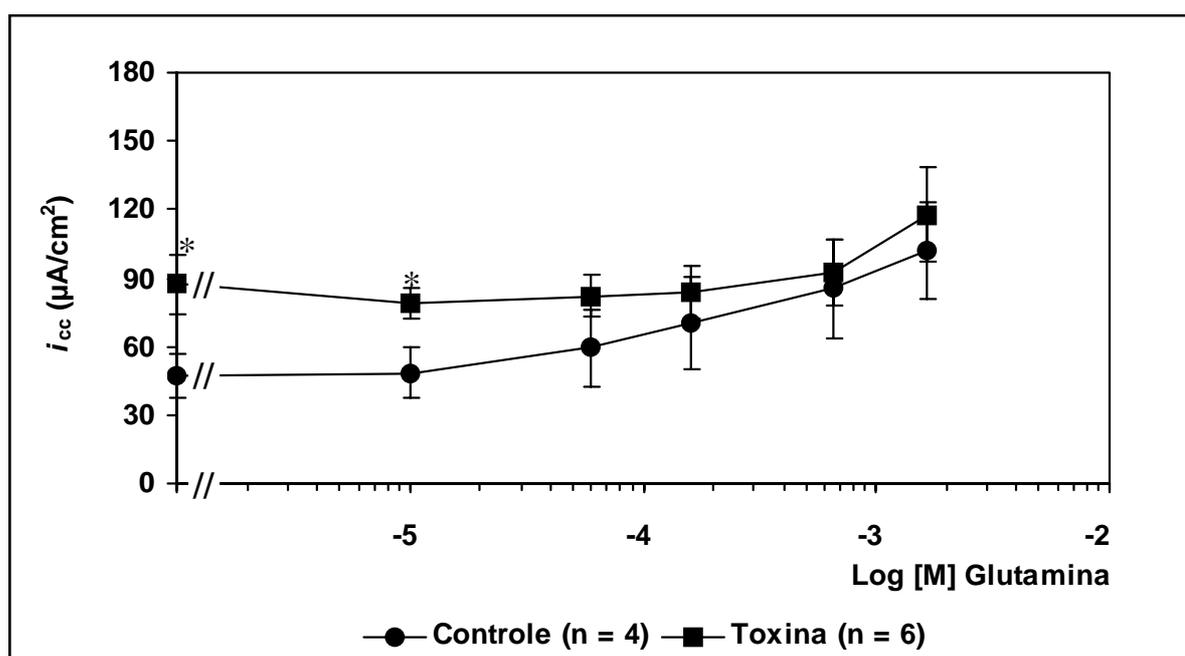
Os valores fornecidos pela Tabela 6 mostram que a adição cumulativa de glutamina ao lado mucoso dos fragmentos de jejuno no grupo controle provocou um aumento gradual e significativo da  $i_{cc}$  ( $\Delta i_{cc} = 54,8 \pm 19,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0,05$  – teste t pareado). No grupo toxina, o valor médio basal é significativamente maior (cerca de 85%) que o seu correspondente no grupo controle, mas, a variação de corrente ( $\Delta i_{cc} = 30,3 \pm 18,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) não é considerada um acréscimo estatisticamente significativo. Contudo, a curva deste grupo em seus valores médios centrais tende a uma ascensão a partir da penúltima dose, como pode ser visto na Figura 18.

Quanto às  $V_{TE}$  (Figura 19), o grupo controle mostra uma significativa elevação em função da dose ( $\Delta V_{TE} = 1,7 \pm 0,5 \text{ mV}$ ,  $p < 0,05$  – teste t pareado), sendo mais significativo ainda o incremento no grupo toxina ( $\Delta V_{TE} = 2,2 \pm 0,1 \text{ mV}$ ,  $p < 0,001$  – teste t pareado).

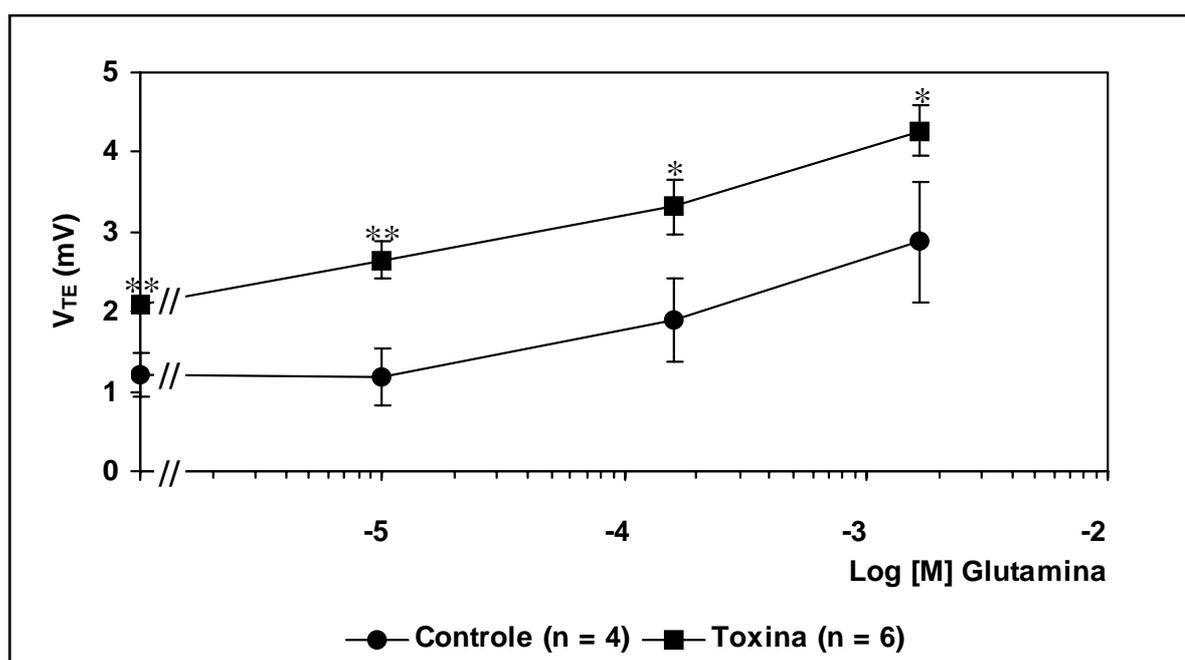
Estatisticamente, a  $R_{TE}$  do grupo controle é constante, ou seja, seu  $\Delta R_{TE} = 6,8 \pm 7,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Já para o grupo toxina, a diferença entre o valor correspondente à última dose e o basal é  $\Delta R_{TE} = 17,0 \pm 4,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  ( $p < 0,01$  – teste t pareado) (Figura 20). Portanto, a adição de glutamina não alterou a resistência do tecido sadio, mas aumentou a mesma no tecido pré-incubado com toxina de cólera.

**Tabela 6 – Resultados da Ação da Glutamina sobre Jejuno no Grupo Controle (n = 4) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 6). Sumário dos valores dos Anexos 6 e 7**

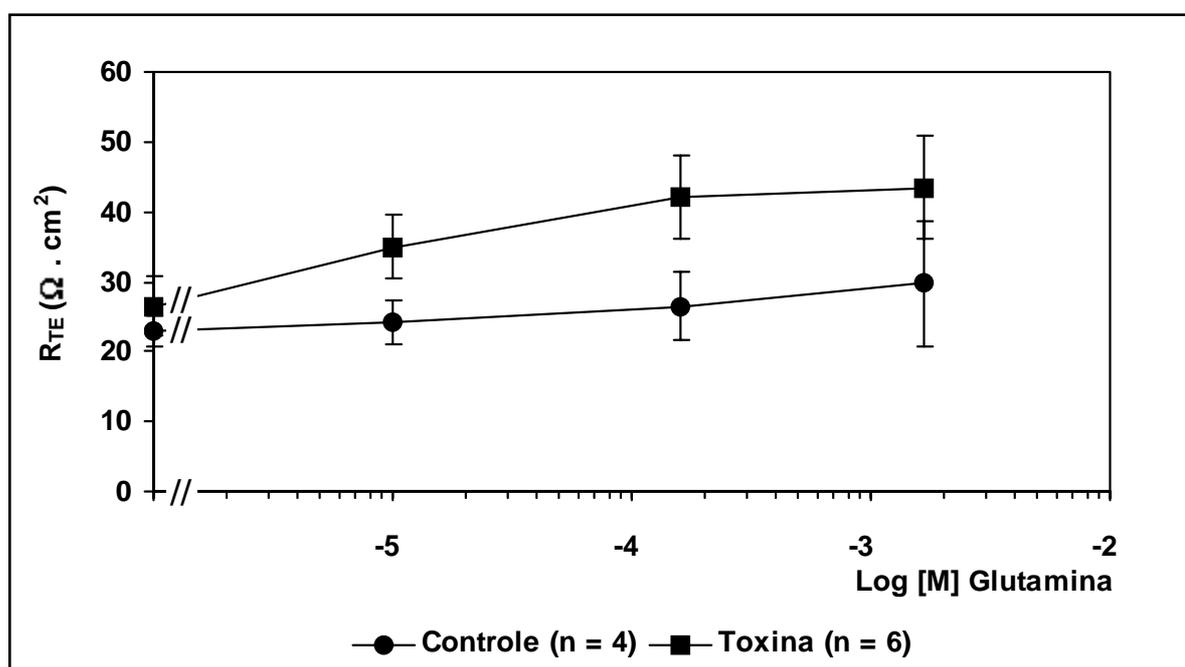
| <b>GLUTAMINA sobre JEJUNO</b> |  |               |  |               |   |               |
|-------------------------------|--|---------------|--|---------------|---|---------------|
| <b>Dose (M)</b>               | <b><math>i_{cc} \pm \text{epm}</math> (<math>\mu\text{A}/\text{cm}^2</math>)</b> |               | <b><math>V_{TE} \pm \text{epm}</math> (mV)</b> |               | <b><math>R_{TE} \pm \text{epm}</math> (<math>\Omega \cdot \text{cm}^2</math>)</b> |               |
|                               | <b>Controle</b>  | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>                                | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>   | <b>Toxina</b> |
| 0                             | 47,5 ± 9,7   | 87,5 ± 12,9   | 1,2 ± 0,3                                      | 2,1 ± 0,1     | 23,0 ± 2,2  | 26,5 ± 4,1    |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>          | 48,5 ± 10,8  | 79,2 ± 6,6    | 1,2 ± 0,4                                      | 2,7 ± 0,2     | 24,3 ± 3,2  | 35,0 ± 4,7    |
| 6 x 10 <sup>-5</sup>          | 59,5 ± 17,0  | 82,2 ± 8,9    | –  | –             | –   | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-4</sup>        | 70,5 ± 20,2  | 83,8 ± 11,7   | 1,9 ± 0,5                                      | 3,3 ± 0,3     | 26,5 ± 4,9  | 42,2 ± 6,0    |
| 6,6 x 10 <sup>-4</sup>        | 85,3 ± 22,0  | 92,5 ± 14,2   | –  | –             | –   | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-3</sup>        | 102,3 ± 20,9   | 117,8 ± 20,8  | 2,9 ± 0,7                                      | 4,3 ± 0,3     | 29,8 ± 8,9  | 43,5 ± 7,2    |



**Figura 18 – Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$  versus Log [M]) da Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejuno Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,05$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 19 – Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$  versus Log [M]) da Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunum Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 20 – Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$  versus  $\text{Log [M]}$ ) da Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunó Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. Resultados médios  $\pm$  epm.

## 5. Ação da Glutamina sobre Íleo

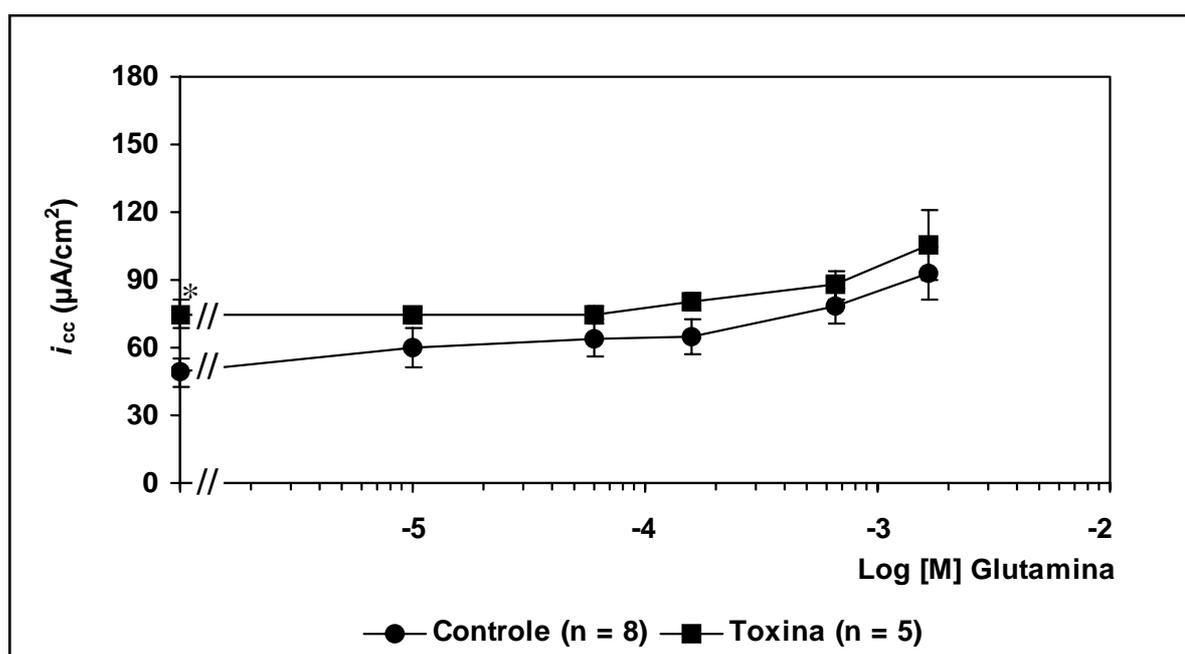
Os valores fornecidos pela Tabela 7 mostram que a adição cumulativa de glutamina ao lado mucoso de fragmentos de íleo distal provocou um incremento altamente significativo da  $i_{cc}$  no grupo controle ( $\Delta i_{cc} = 44,0 \pm 9,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0,01$  – teste t pareado). No grupo toxina, a adição cumulativa de glutamina gerou um  $\Delta i_{cc}$  significativo ( $30,8 \pm 10,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0,05$  – teste t pareado). Estes valores foram obtidos analisando-se individualmente cada curva da Figura 21, pois apenas o ponto inicial de cada curva (correspondente à dose 0) é significativamente diferente ( $p < 0,05$  – teste t não-pareado), ou seja, os demais pontos são estatisticamente semelhantes, apesar de ambas as curvas mostrarem tendência de ascensão.

As curvas mostradas na Figura 22 retratam a variação das  $V_{TE}$ . Tanto o grupo controle quanto o grupo toxina obtiveram um crescimento significativo ( $p < 0,01$  – teste t pareado) em função da adição de glutamina. Contudo, quando as duas curvas são analisadas em conjunto, elas não são estatisticamente diferentes.

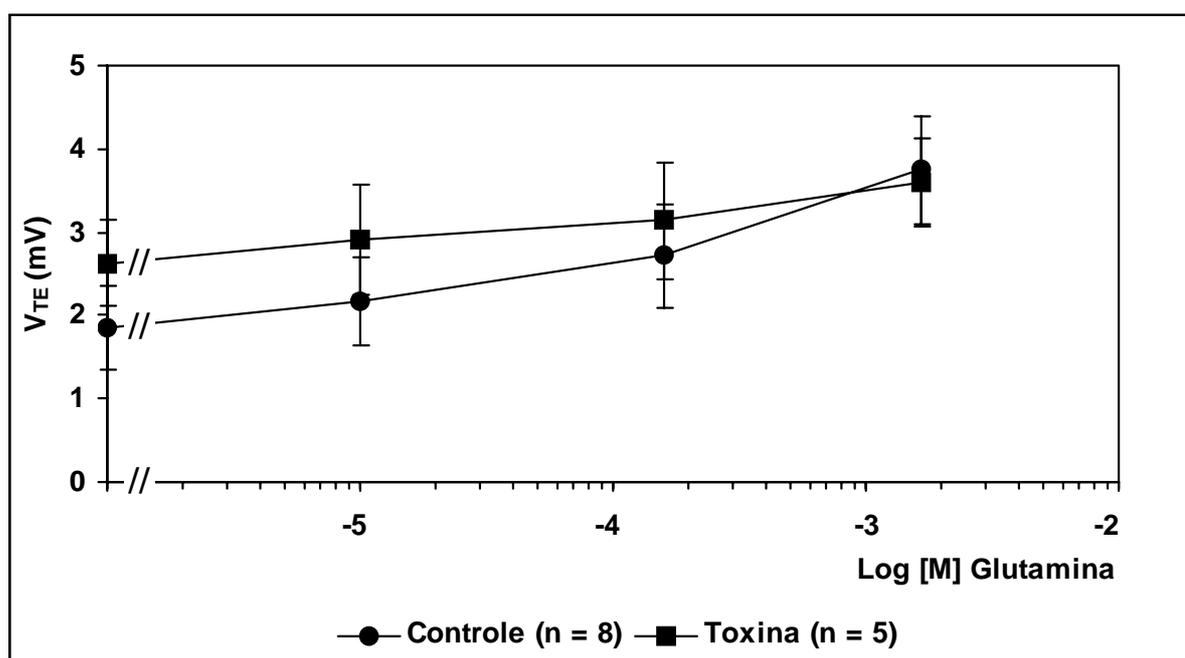
As  $R_{TE}$  de ambos os grupos não variaram significativamente em função da adição de glutamina, se analisadas individualmente; e em conjunto, elas são consideradas estatisticamente semelhantes, como pode ser visto na Figura 23.

**Tabela 7 – Resultados da Ação da Glutamina sobre Íleo no Grupo Controle (n = 8) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 5). Sumário dos valores dos Anexos 8 e 9.**

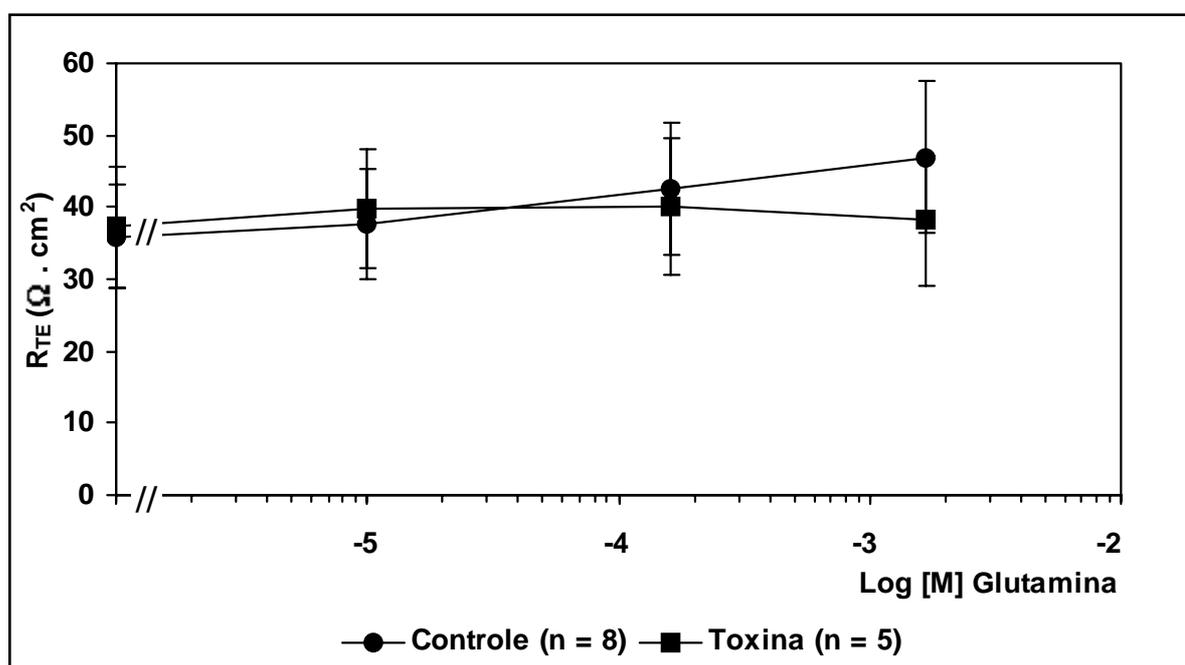
| <b>G L U T A M I N A s o b r e Í L E O</b> |  |               |  |               |   |               |
|--|--|---------------|--|---------------|---|---------------|
| <b>Dose (M)</b>                            | <b><math>i_{cc} \pm \text{epm}</math> (<math>\mu\text{A}/\text{cm}^2</math>)</b> |               | <b><math>V_{TE} \pm \text{epm}</math> (mV)</b> |               | <b><math>R_{TE} \pm \text{epm}</math> (<math>\Omega \cdot \text{cm}^2</math>)</b> |               |
|  | <b>Controle</b>  | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>                                | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>   | <b>Toxina</b> |
| 0  | 49,0 ± 6,1   | 74,8 ± 6,1    | 1,9 ± 0,5                                      | 2,6 ± 0,5     | 35,9 ± 7,2  | 37,2 ± 8,5    |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                       | 60,0 ± 9,0   | 74,2 ± 3,4    | 2,2 ± 0,5                                      | 2,9 ± 0,7     | 37,6 ± 7,7  | 39,8 ± 8,2    |
| 6 x 10 <sup>-5</sup>                       | 64,1 ± 8,4   | 74,6 ± 3,5    | –  | –             | –   | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-4</sup>                     | 64,9 ± 7,5   | 80,6 ± 4,0    | 2,7 ± 0,6                                      | 3,1 ± 0,7     | 42,6 ± 9,2  | 40,2 ± 9,5    |
| 6,6 x 10 <sup>-4</sup>                     | 78,3 ± 7,8   | 87,6 ± 6,7    | –  | –             | –   | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-3</sup>                     | 93,0 ± 11,4  | 105,6 ± 15,7  | 3,8 ± 0,7                                      | 3,9 ± 0,5     | 46,9 ± 10,6   | 38,2 ± 9,1    |



**Figura 21 – Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$  versus Log [M]) da Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Óleo Distal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,05$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 22 – Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$  versus Log [M]) da Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal. O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. Resultados médios  $\pm$  epm.**



**Figura 23 – Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$  versus Log [M]) da Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. Resultados médios  $\pm$  epm.

## **6. Comparação entre os Resultados da Ação da Glutamina sobre Jejuno e sobre Íleo nos Grupos Controle e Toxina**

- 1) As correntes basais e finais dos grupos controles no jejuno e no íleo não são significativamente diferentes;
- 2) As correntes basais e finais dos grupos toxina no jejuno e no íleo não são significativamente diferentes;
- 3) A adição de glutamina nos grupos controles tanto do jejuno quanto do íleo provocou acréscimos significativos da  $i_{cc}$ ;
- 4) A adição de glutamina nos grupos pré-incubados com toxina provocou no jejuno uma variação de corrente estatisticamente não significativa, mas no íleo, o aumento de corrente em função da dose cumulativa foi bastante significativo;
- 5) As diferenças de potenciais basais e finais para os grupos controles no jejuno e no íleo não são significativamente diferentes;
- 6) As diferenças de potenciais basais e finais para os grupos toxina no jejuno e no íleo não são significativamente diferentes;
- 7) As  $R_{TE}$  dos grupos controles no jejuno e no íleo não são significativamente diferentes;
- 8) As  $R_{TE}$  dos grupos toxina no jejuno e no íleo não são significativamente diferentes.

## 7. Ação da Alanina sobre Jejuno

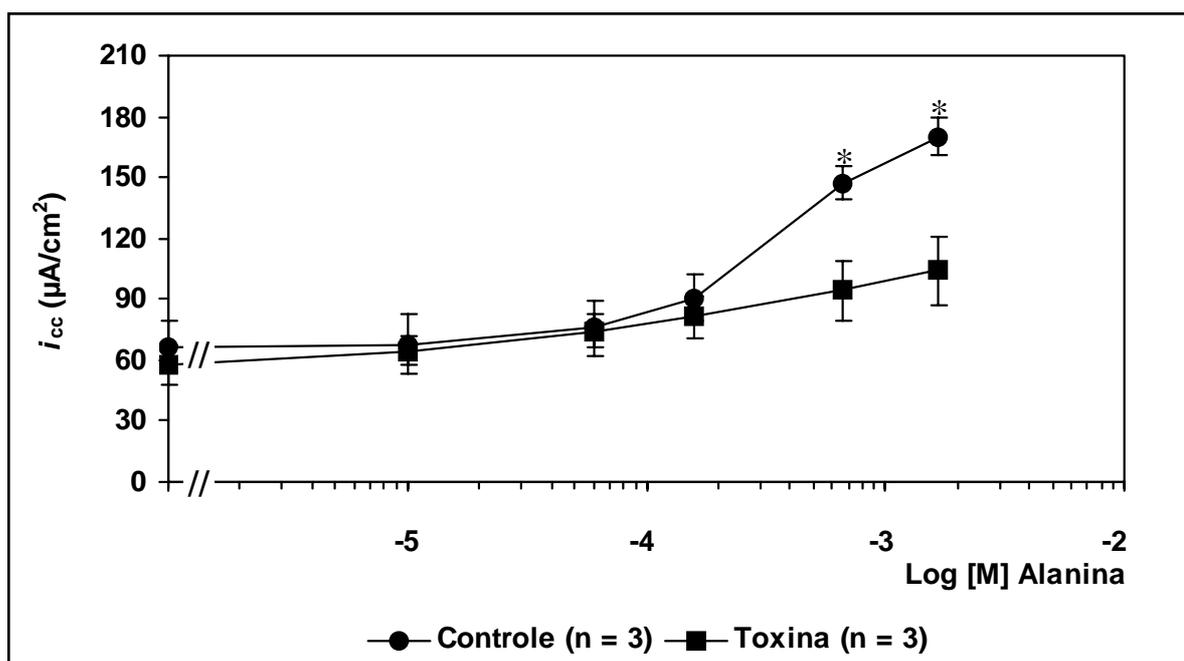
Os valores fornecidos pela Tabela 8 mostram que a adição cumulativa de alanina ao lado mucoso de fragmentos de jejuno proximal no grupo controle gerou uma curva cujos três primeiros pontos, inclusive o basal (sem substrato), não são significativamente diferentes, mas os três seguintes diferenciavam-se de forma significativa ( $p < 0,01$  – teste t não-pareado); estes pontos geraram uma curva sigmoidal que quase atingiu o  $V_{max}$ . O grupo toxina mostrou uma discreta tendência de aumento somente a partir da 3ª dose; o número excessivamente pequeno de amostras prejudicou sobremaneira os resultados finais (Figura 24).

As curvas que mostram o estabelecimento da  $V_{TE}$  são significativamente diferentes ( $p < 0,05$  – teste t pareado) entre si, tendo o grupo controle apresentado um incremento global de 130%, com uma significância de  $p < 0,001$  (teste t pareado), enquanto que a  $V_{TE}$  do grupo toxina também cresceu significativamente ( $p < 0,05$  – teste t pareado), para um valor final da ordem de cerca de 150% acima do valor basal, em função da adição de substrato (Figura 25).

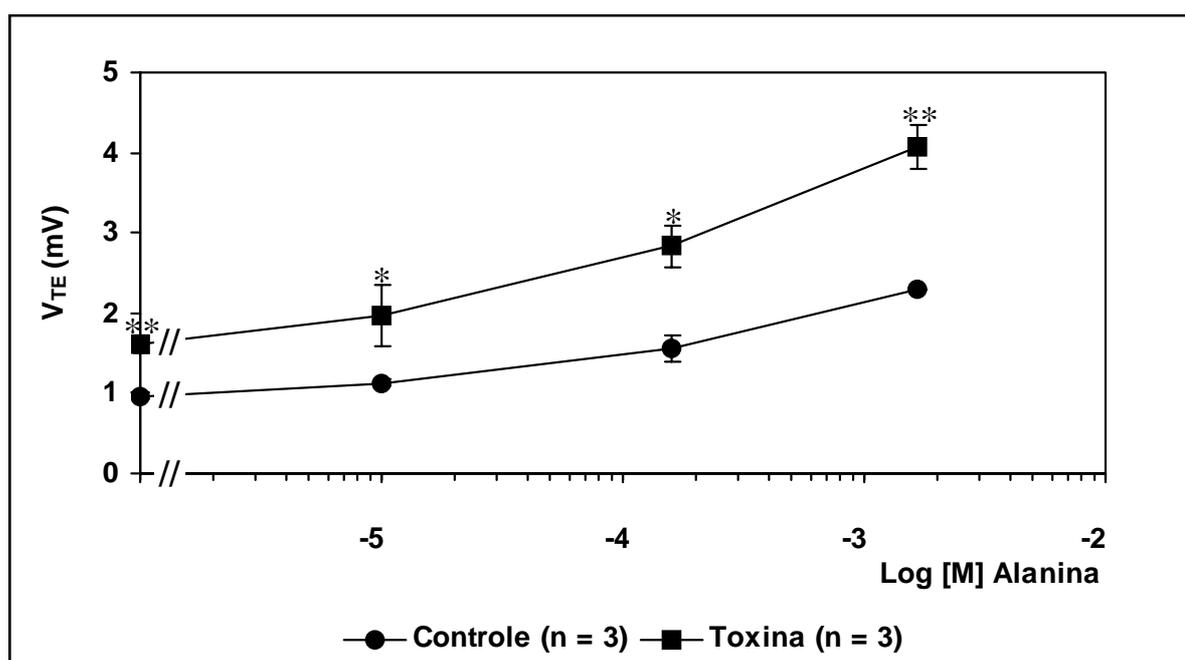
As  $R_{TE}$  mostraram, no grupo controle, um súbito incremento, mas estatisticamente não significativo; que interpretamos como um erro de leitura ou flutuação do aparelho e a diferença entre as respostas para o basal e a dose máxima pode ser considerada nula ( $\Delta R_{TE} = -0,6 \pm 2,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). No grupo toxina, ocorreu um significativo aumento de resistência (36,5% acima do valor basal, com um  $\Delta R_{TE} = 10,7 \pm 1,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,  $p < 0,01$  – teste t pareado) quando adicionamos a alanina (Figura 26).

**Tabela 8 – Resultados da Ação da Alanina sobre Jejuno no Grupo Controle (n = 3) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 3). Sumário dos valores dos Anexos 10 e 11.**

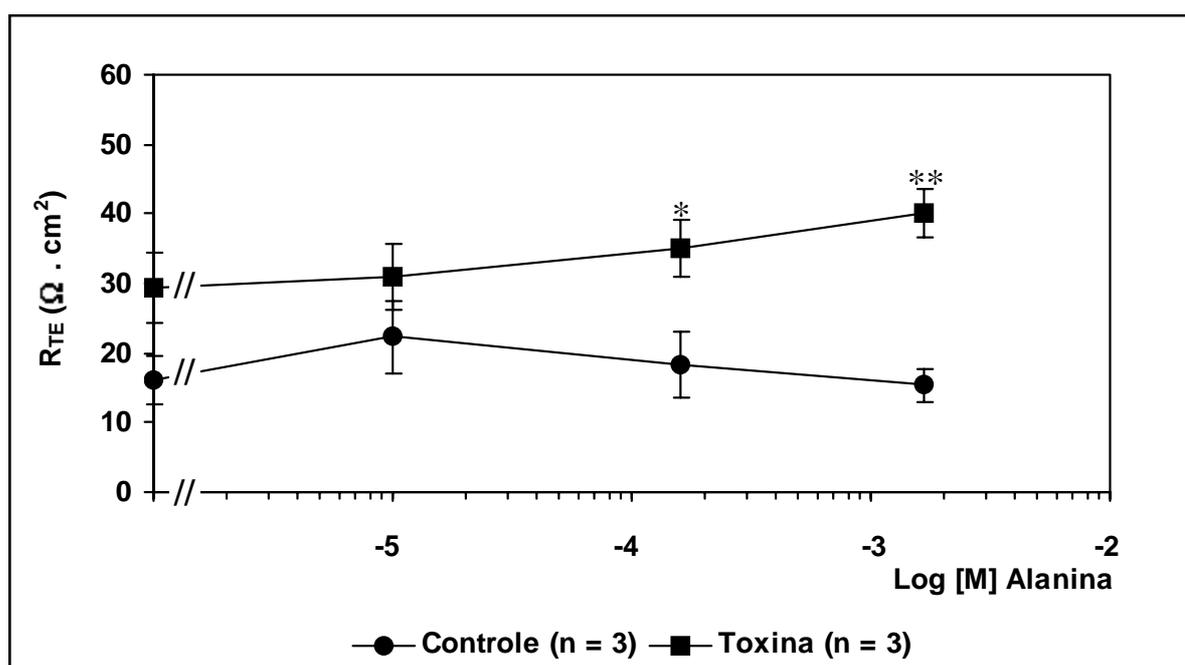
| <b>A L A N I N A   s o b r e   J E J U N O</b> |  |               |  |               |   |               |
|--|--|---------------|--|---------------|---|---------------|
| <b>Dose (M)</b>                                | <b><math>i_{cc} \pm \text{epm}</math> (<math>\mu\text{A}/\text{cm}^2</math>)</b> |               | <b><math>V_{TE} \pm \text{epm}</math> (mV)</b> |               | <b><math>R_{TE} \pm \text{epm}</math> (<math>\Omega \cdot \text{cm}^2</math>)</b> |               |
|  | <b>Controle</b>  | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>                                | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>   | <b>Toxina</b> |
| 0  | 66,7 ± 12,4  | 57,7 ± 10,3   | 1,0 ± 0,0                                      | 1,6 ± 0,1     | 16,0 ± 3,5  | 29,3 ± 5,2    |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                           | 68,0 ± 14,8  | 64,3 ± 7,2    | 1,1 ± 0,0                                      | 2,0 ± 0,4     | 22,3 ± 5,2  | 31,0 ± 4,7    |
| 6 x 10 <sup>-5</sup>                           | 75,7 ± 13,5  | 74,3 ± 7,9    | –  | –             | –   | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-4</sup>                         | 90,7 ± 11,4  | 81,3 ± 10,2   | 1,6 ± 0,2                                      | 2,8 ± 0,3     | 18,3 ± 4,8  | 35,0 ± 4,0    |
| 6,6 x 10 <sup>-4</sup>                         | 147,3 ± 7,8  | 94,3 ± 14,5   | –  | –             | –   | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-3</sup>                         | 170,0 ± 7,3  | 104,0 ± 17,1  | 2,3 ± 0,0                                      | 4,1 ± 0,3     | 15,3 ± 2,4  | 40,0 ± 3,5    |



**Figura 24 – Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$  versus Log [M]) da Alanina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejuno Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com três animais diferentes. \*  $p < 0,01$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 25 – Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$  versus Log [M]) da Alanina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejun Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com três animais diferentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 26 – Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$  versus Log [M]) da Alanina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunó Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com três animais diferentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.

## 8. Ação da Alanina sobre Íleo

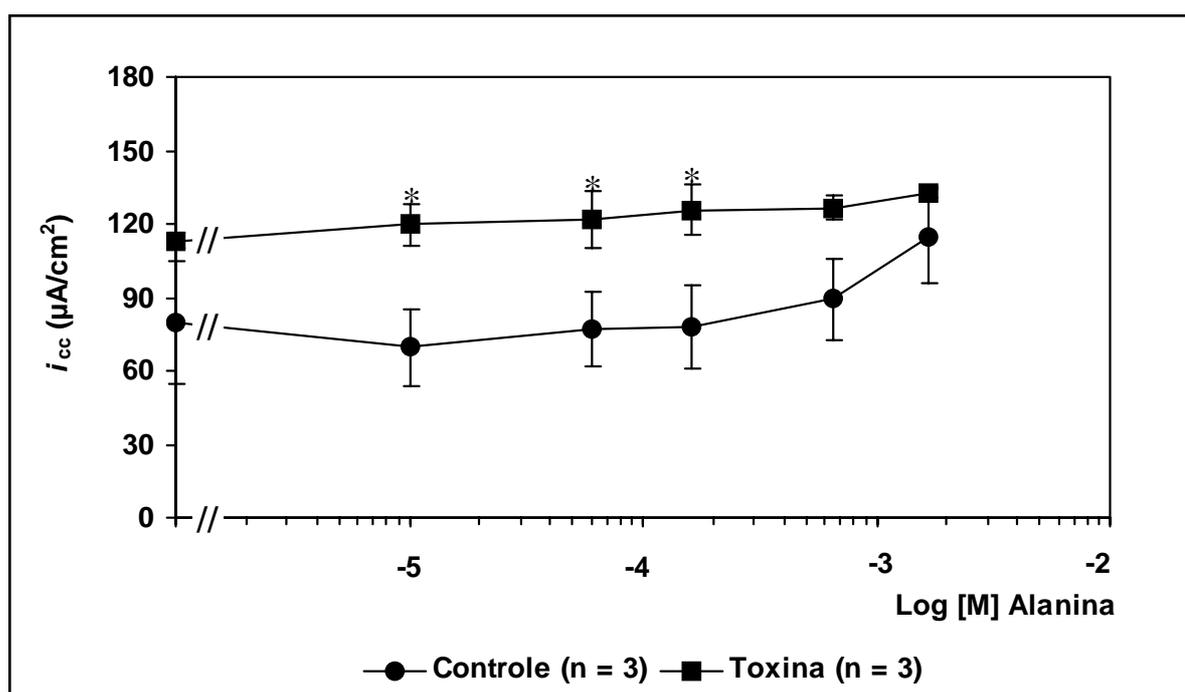
A curva dose-resposta da Figura 27 para o grupo controle mostra um crescimento significativo já a partir da 1ª dose de alanina, com um  $\Delta i_{cc} = 35,3 \pm 9,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $p < 0,05$  – teste t pareado). Já no grupo toxina, a tendência da sua curva é de um crescimento muito mais lento, com uma menor diferença da  $i_{cc}$  entre seus pontos extremos em função da adição de alanina ( $\Delta i_{cc} = 19,7 \pm 5,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Contudo, do ponto de vista estatístico, esta duas médias não podem ser consideradas significativamente diferentes.

A variação de  $V_{TE}$  no grupo controle é significativa ( $\Delta V_{TE} = 0,9 \pm 0,2 \text{ mV}$ ,  $p < 0,05$  – teste t pareado). Já no grupo toxina, a diferença entre os pontos extremos não pode ser considerada significativa (teste t pareado). Quanto à diferença entre as duas curvas individualmente, seus valores basais são foram significativamente diferentes, mas seus pontos extremos têm uma significativa diferença ( $p < 0,05$  – teste t pareado) (Figura 28)

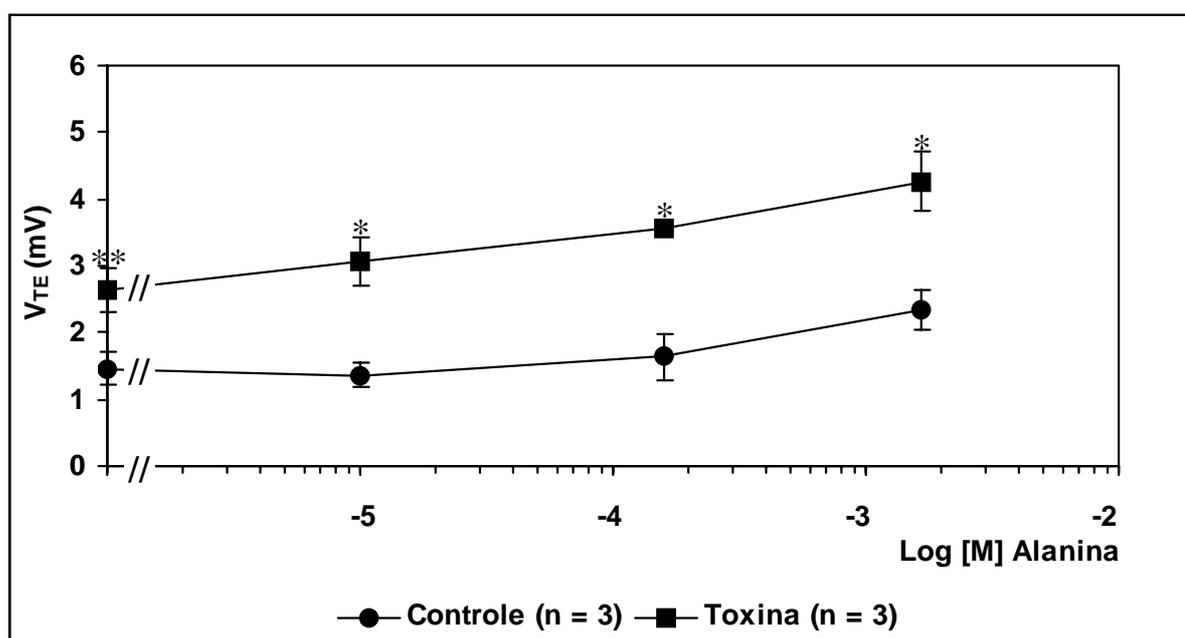
A análise dos dados das  $R_{TE}$  evidenciadas na Figura 29, e sumarizadas na Tabela 9, mostraram que no grupo controle não ocorreu variação significativa com a adição de alanina e seu gráfico tende a uma reta paralela ao eixo das abcissas  $\Delta R_{TE} \cong 0$ . Também para o grupo toxina, não ocorreu variação significativa, podendo-se observar, no entanto, uma tendência a aumento da  $R_{TE}$  com o aumento das doses. O teste t pareado mostrou que as duas curvas de  $R_{TE}$  não são significativamente diferentes.

**Tabela 9 – Resultados da Ação da Alanina sobre Óleo no Grupo Controle (n = 3) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 3). Sumário dos valores dos Anexos 12 e 13.**

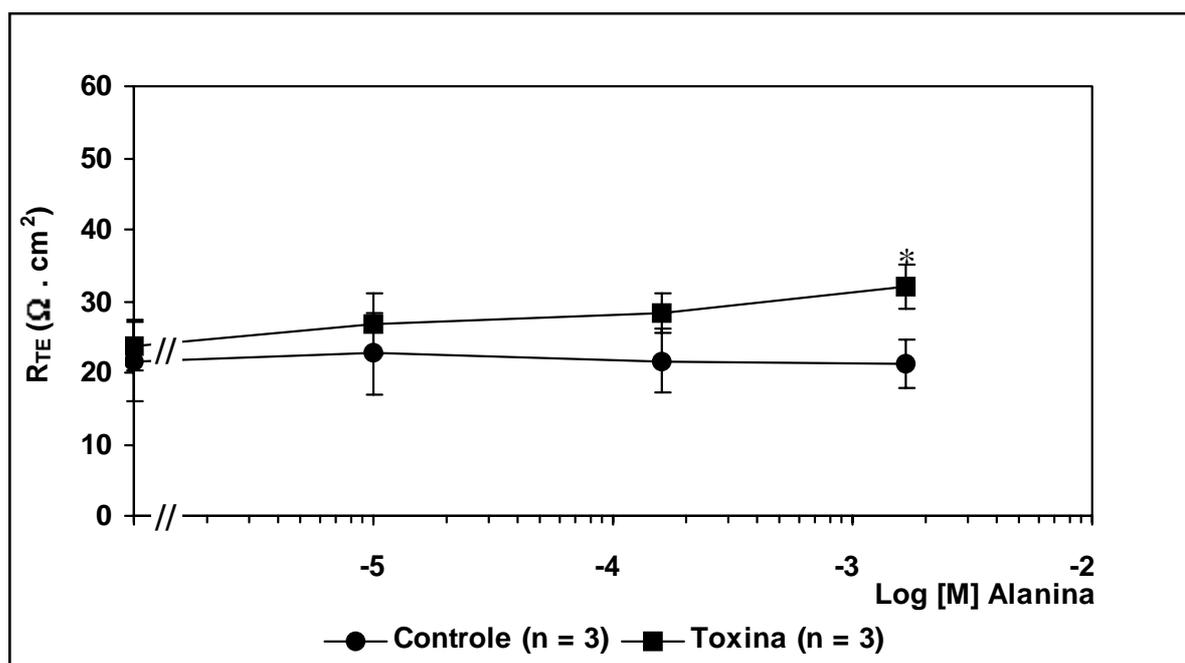
| <b>A L A N I N A   s o b r e   Ó I L E O</b> |   |               |   |               |  |               |
|--|---|---------------|---|---------------|--|---------------|
| <b>Dose (M)</b>                              | <b><math>i_{cc} \pm \text{epm} (\mu\text{A}/\text{cm}^2)</math></b> |               | <b><math>V_{TE} \pm \text{epm} (\text{mV})</math></b> |               | <b><math>R_{TE} \pm \text{epm} (\Omega \cdot \text{cm}^2)</math></b> |               |
|  | <b>Controle</b>   | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>                                       | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>  | <b>Toxina</b> |
| 0  | 79,7 ± 25,4   | 113,0 ± 3,2   | 1,5 ± 0,3   | 2,6 ± 0,3     | 21,7 ± 5,7   | 23,7 ± 3,4    |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                         | 69,7 ± 15,8   | 119,7 ± 8,2   | 1,4 ± 0,2   | 3,1 ± 0,3     | 22,7 ± 5,8   | 26,7 ± 4,3    |
| 6 x 10 <sup>-5</sup>                         | 76,7 ± 15,3   | 122,0 ± 11,5  | –   | –             | –  | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-4</sup>                       | 77,7 ± 16,8   | 125,7 ± 10,3  | 1,6 ± 0,3   | 3,6 ± 0,0     | 21,7 ± 4,4   | 28,3 ± 2,7    |
| 6,6 x 10 <sup>-4</sup>                       | 89,3 ± 16,6   | 126,7 ± 4,7   | –   | –             | –  | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-3</sup>                       | 115,0 ± 19,1  | 132,7 ± 2,3   | 2,3 ± 0,3   | 4,3 ± 0,4     | 21,3 ± 3,4   | 32,0 ± 3,2    |



**Figura 27 – Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$  versus Log [M]) da Alanina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.** O n corresponde ao número de experimentos com três animais diferentes. \*  $p < 0,05$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 28 – Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$  versus Log [M]) da Alanina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Óleo Distal.** O n corresponde ao número de experimentos com três animais diferentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 29 – Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$  versus  $Log [M]$ ) da Alanina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Óleo Distal.** O n corresponde ao número de experimentos com três animais diferentes. \*  $p < 0,05$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.

## 9. Comparação entre os Resultados da Ação da Alanina sobre Jejuo e sobre Íleo nos Grupos Controle e Toxina

- 1) As correntes basais dos grupos controles (sem toxina) são semelhantes tanto no jejuno como no íleo;
- 2) As correntes correspondentes às doses máximas são significativamente maiores no jejuno do que no íleo;
- 3) As correntes basais (dose 0) nos grupos toxina são significativamente maiores no íleo do que no jejuno;
- 4) A adição de alanina nos grupos toxina não tornou significativamente diferente a resposta máxima no íleo daquela no jejuno, mas a razão entre as correntes correspondentes à dose máxima e à dose 0 são muito diferentes;

$$\text{Jejuno} \rightarrow \frac{104,0}{52,7} = 1,82 \pm 0,1 \quad \text{Íleo} \rightarrow \frac{132,7}{113,0} = 1,18 \pm 0,05$$

- 5) A  $V_{TE}$  sem a presença de substrato (situação basal, dose 0) no jejuno e no íleo dos grupos controles não é significativamente diferente, e a adição de substrato (alanina) não modifica esta situação;
- 6) A  $V_{TE}$  sem a presença de substrato (situação basal, dose 0) no íleo dos grupos toxina é significativamente maior do que no jejuno ( $p < 0,05$  – teste t não-pareado);
- 7) A adição de substrato (alanina) nos grupos toxina não manteve a diferença dos valores basais, pois os  $V_{TE}$  correspondentes à dose máxima não são significativamente diferentes;
- 8) As  $R_{TE}$  dos grupos controles, tanto no jejuno como no íleo, não possuem diferença significativa, quer entre os valores basais (sem substrato) quer entre os valores correspondentes à dose máxima, e ainda entre os basais e os máximos de cada segmento intestinal.

## 10. Ação da Glicina sobre Jejuno

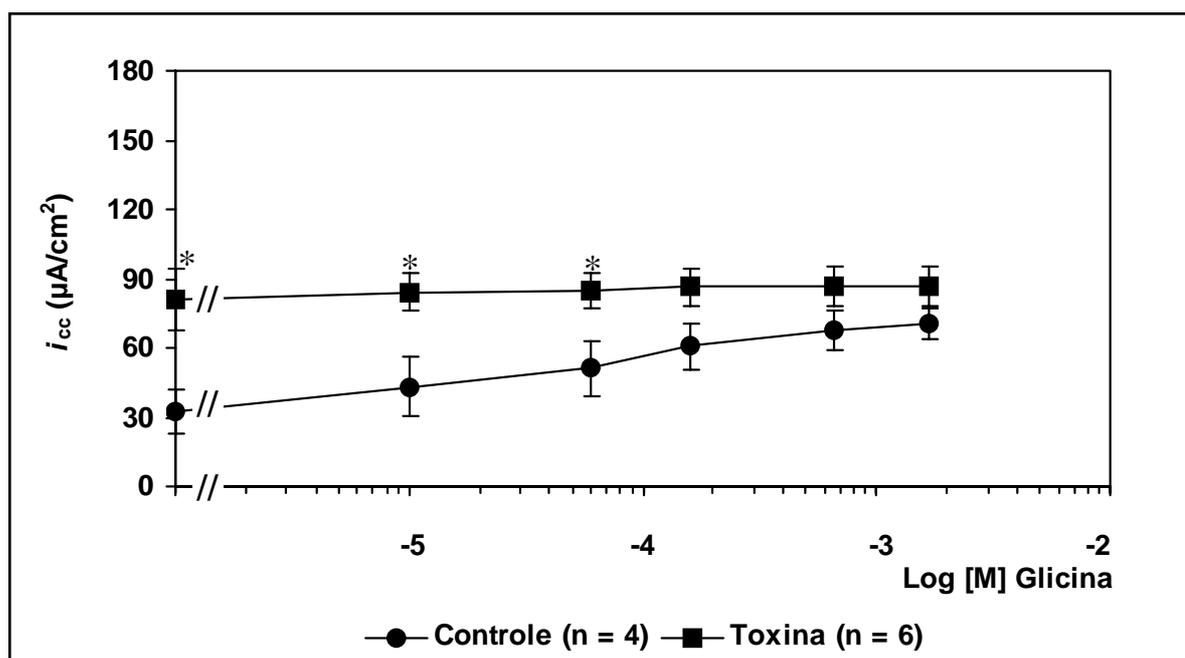
Os valores fornecidos pela Tabela 10 mostram que a adição cumulativa de glicina ao lado mucoso de fragmentos de jejuno proximal no grupo controle (não pré-incubado com toxina) provocou um aumento significativo ( $\Delta i_{cc} = 38,5 \pm 6,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0,01$  – teste t pareado) da  $i_{cc}$ . A diferença entre o valor basal da  $i_{cc}$  do grupo toxina e o seu correspondente no grupo controle é de cerca de 150% maior ( $p < 0,05$ ). Contudo, o grupo toxina não demonstrou nenhum crescimento estatisticamente significativo como resposta à adição cumulativa do substrato ( $\Delta i_{cc} = 5,7 \pm 10,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), mas apresentou forte tendência à constância, como pode ser visto na Figura 30.

A  $V_{TE}$  do grupo controle mostrou um crescimento altamente significativo ( $\Delta V_{TE} = 1,7 \pm 0,1 \text{ mV}$ ,  $p < 0,001$  – teste t pareado) em função da adição de substrato, semelhante ao que ocorreu com o grupo toxina, com um  $\Delta V_{TE} = 1,4 \pm 0,4 \text{ mV}$  ( $p < 0,05$  – teste t pareado). Vale salientar que enquanto no grupo controle o percentual de aumento foi de 212%, no grupo toxina este percentual foi de apenas 56% (Figura 31).

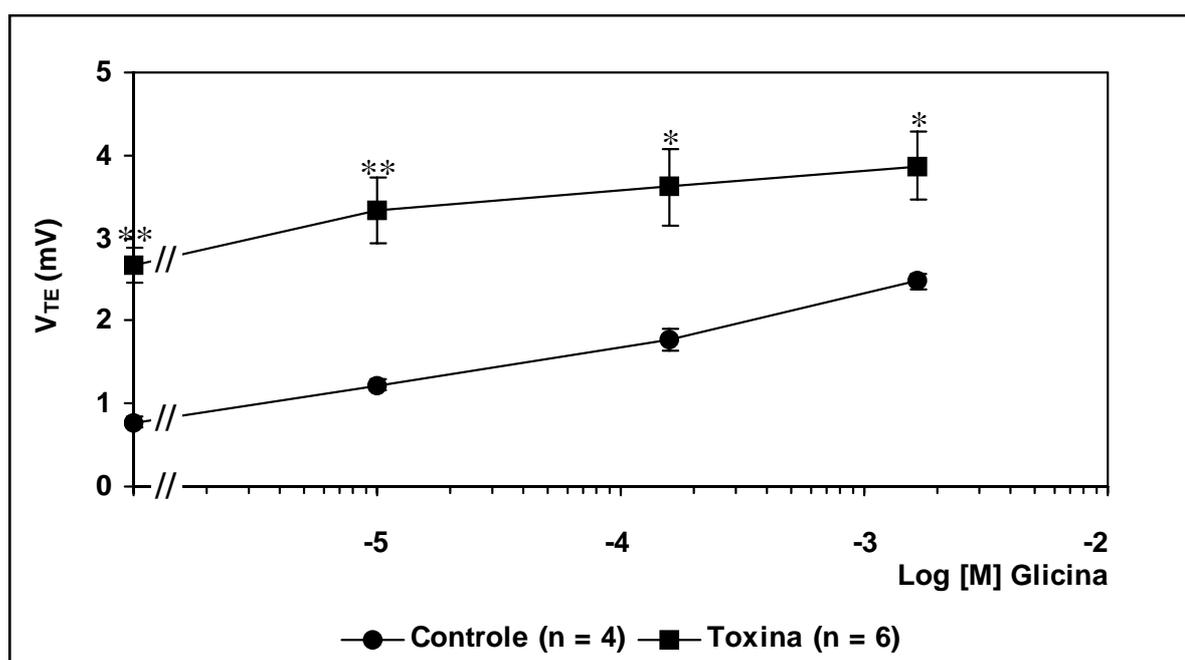
Os dados relativos à  $R_{TE}$  mostraram que as curvas da Figura 32 não são estatisticamente diferentes. Contudo, seus valores centrais mostram que o grupo toxina tende a valores maiores que o controle.

**Tabela 10 – Resultados da Ação da Glicina sobre Jejuno no Grupo Controle (n = 4) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 6). Sumário dos valores dos Anexos 14 e 15.**

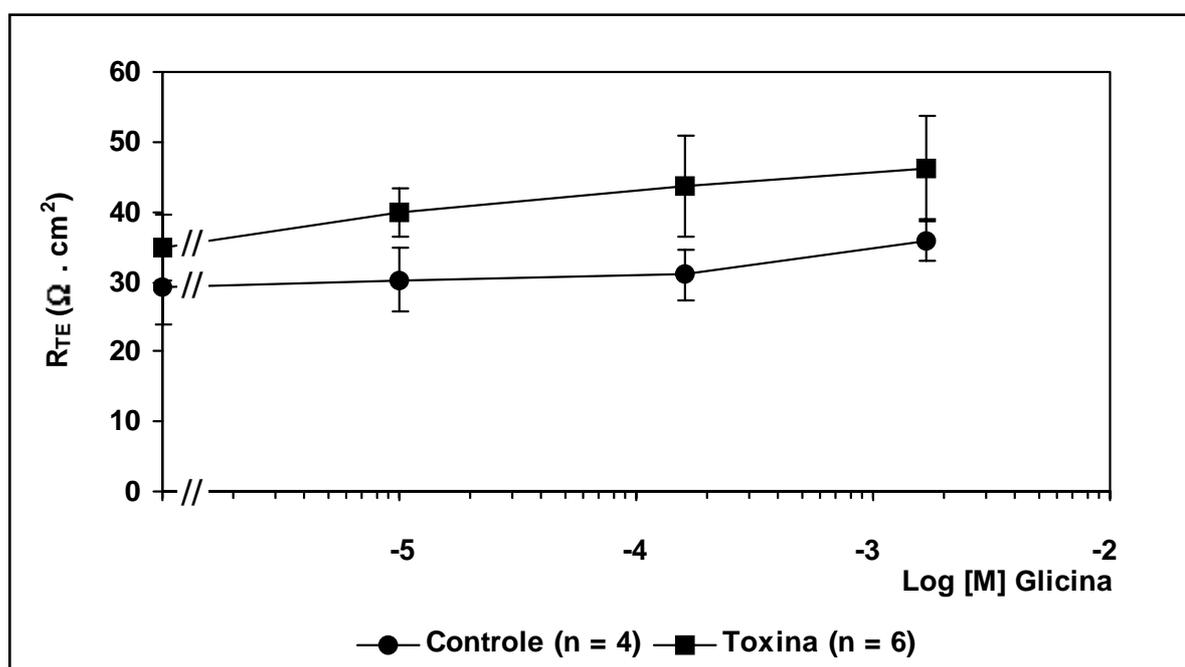
| <b>G L I C I N A   s o b r e   J E J U N O</b> |  |               |  |               |   |               |
|--|--|---------------|--|---------------|---|---------------|
| <b>Dose (M)</b>                                | <b><math>i_{cc} \pm \text{epm}</math> (<math>\mu\text{A}/\text{cm}^2</math>)</b> |               | <b><math>V_{TE} \pm \text{epm}</math> (mV)</b> |               | <b><math>R_{TE} \pm \text{epm}</math> (<math>\Omega \cdot \text{cm}^2</math>)</b> |               |
|  | <b>Controle</b>  | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>                                | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>   | <b>Toxina</b> |
| 0  | 32,0 ± 9,6   | 80,8 ± 13,3   | 0,8 ± 0,1                                      | 2,7 ± 0,2     | 29,3 ± 5,3  | 34,8 ± 4,7    |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                           | 43,3 ± 12,6  | 84,2 ± 8,4    | 1,2 ± 0,1                                      | 3,3 ± 0,4     | 30,3 ± 4,5  | 39,8 ± 3,4    |
| 6 x 10 <sup>-5</sup>                           | 51,0 ± 12,2  | 84,7 ± 7,7    | –  | –             | –   | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-4</sup>                         | 60,8 ± 9,9   | 86,7 ± 7,9    | 1,8 ± 0,1                                      | 3,6 ± 0,5     | 31,0 ± 3,5  | 43,7 ± 7,1    |
| 6,6 x 10 <sup>-4</sup>                         | 67,5 ± 8,9   | 86,7 ± 8,4    | –  | –             | –   | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-3</sup>                         | 70,5 ± 7,1   | 86,5 ± 8,6    | 2,5 ± 0,1                                      | 3,9 ± 0,4     | 35,8 ± 2,8  | 46,3 ± 7,2    |



**Figura 30 – Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$  versus Log [M]) da Glicina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejun Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,05$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 31 – Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$  versus Log [M]) da Glicina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 32 – Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$  versus Log [M]) da Glicina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunó Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. Resultados médios  $\pm$  epm.

## 11. Ação da Glicina sobre Íleo

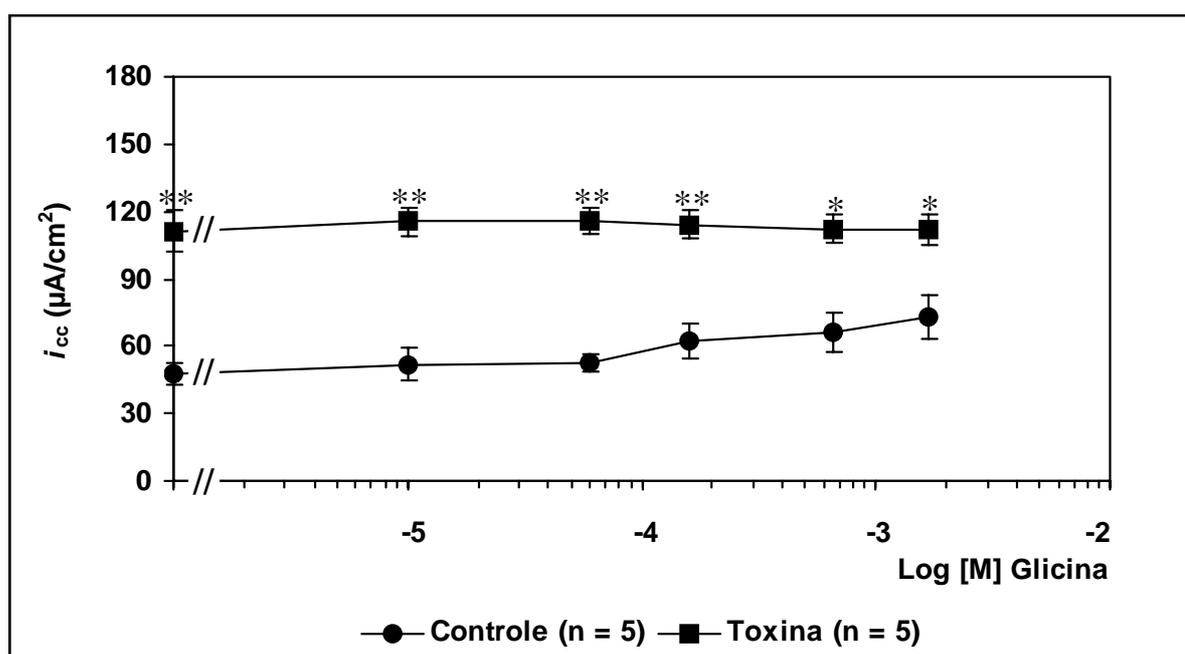
Os valores fornecidos pela Tabela 11 mostram que a adição cumulativa de glicina ao lado mucoso de fragmentos de íleo distal no grupo controle provoca um crescimento significativo ( $\Delta i_{cc} = 25,2 \pm 6,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0,01$  – teste t pareado) da  $i_{cc}$  (52% acima da basal). Já no grupo toxina, o valor basal da  $i_{cc}$  (que é cerca de 130% maior que o seu correspondente no grupo controle) tem seu crescimento com a adição de substrato estatisticamente nulo ( $\Delta i_{cc} = 0,4 \pm 9,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), sendo na prática uma reta paralela ao eixo das abscissas (Figura 33).

A adição cumulativa de glicina ao íleo do grupo controle causou um aumento significativo ( $\Delta V_{TE} = 0,8 \pm 0,3$  mV,  $p < 0,05$  – teste t pareado) da  $V_{TE}$  (67% acima da basal). Já no grupo toxina, além da ocorrência de um incremento significativo ( $\Delta V_{TE} = 1,1 \pm 0,3$  mV,  $p < 0,01$  – teste t pareado) correspondendo a 33% acima do valor basal (o que pode ser visto na Figura 34), o teste t não-pareado indicou que as duas curvas são significativamente diferentes entre si.

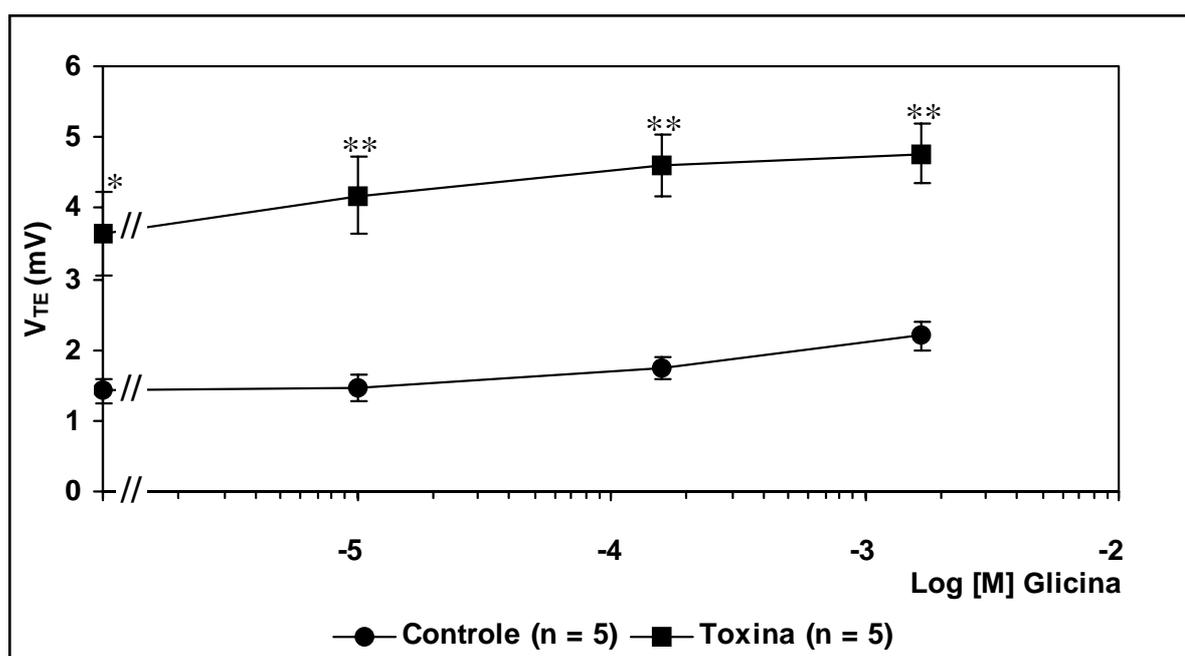
A  $R_{TE}$  no grupo controle não variou estatisticamente falando. Já no grupo toxina, ocorreu um aumento significativo ( $p < 0,05$  – teste t pareado), mostrando uma diferença entre valores correspondentes à dose máxima adicionada e à dose basal de um  $\Delta R_{TE} = 9,8 \pm 2,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , o que equivale a 30% de elevação (Figura 35). O teste t de *Student* não-pareado indica não haver diferença estatística entre as duas curvas.

**Tabela 11 – Resultados da Ação da Glicina sobre Íleo no Grupo Controle (n = 5) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 5). Sumário dos valores dos Anexos 16 e 17.**

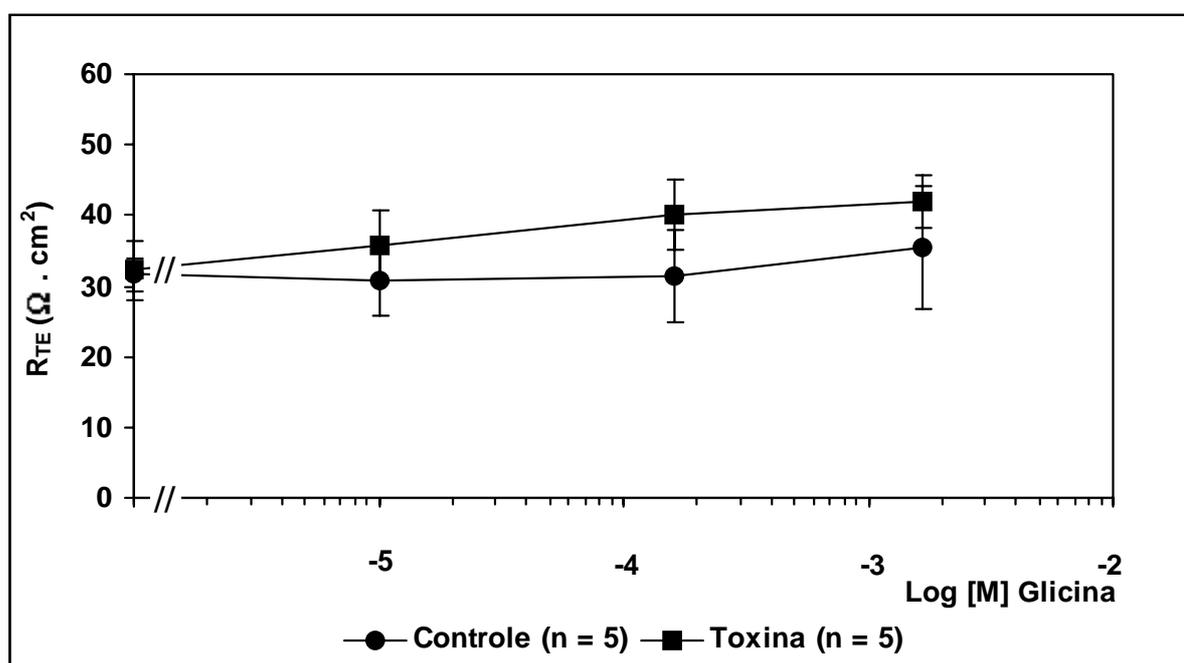
| <b>G L I C I N A   s o b r e   Í L E O</b> |   |               |   |               |  |               |
|--|---|---------------|---|---------------|--|---------------|
| <b>Dose (M)</b>                            | <b><math>i_{cc} \pm \text{epm} (\mu\text{A}/\text{cm}^2)</math></b> |               | <b><math>V_{TE} \pm \text{epm} (\text{mV})</math></b> |               | <b><math>R_{TE} \pm \text{epm} (\Omega \cdot \text{cm}^2)</math></b> |               |
|  | <b>Controle</b>   | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>                                       | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>  | <b>Toxina</b> |
| 0  | 47,8 ± 5,0  | 111,2 ± 9,1   | 1,4 ± 0,2   | 3,6 ± 0,6     | 34,4 ± 2,1   | 32,2 ± 4,2    |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                       | 52,0 ± 7,4  | 115,4 ± 6,1   | 1,5 ± 0,1   | 4,2 ± 0,5     | 30,2 ± 4,8   | 35,6 ± 5,2    |
| 6 x 10 <sup>-5</sup>                       | 52,6 ± 4,3  | 115,6 ± 5,6   | –   | –             | –  | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-4</sup>                     | 62,2 ± 8,1  | 114,2 ± 6,1   | 1,7 ± 0,2   | 4,6 ± 0,4     | 31,2 ± 6,6   | 40,2 ± 5,0    |
| 6,6 x 10 <sup>-4</sup>                     | 66,2 ± 8,6  | 112,2 ± 6,1   | –   | –             | –  | –             |
| 1,6 x 10 <sup>-3</sup>                     | 73,0 ± 9,6  | 111,6 ± 6,7   | 2,2 ± 0,2   | 4,8 ± 0,4     | 35,4 ± 8,7   | 42,0 ± 3,8    |



**Figura 33 – Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$  versus Log [M]) da Glicina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,005$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 34 – Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$  versus Log [M]) da Glicina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,005$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 35 – Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$  versus Log [M]) da Glicina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. Resultados médios  $\pm$  epm.

## **12. Comparação entre os Resultados da Ação da Glicina sobre Jejuno e sobre Íleo nos Grupos Controle e Toxina**

- 1) As correntes de curto-circuito basais (dose 0) no jejuno e no íleo são estatisticamente iguais, mas há uma discreta tendência de elevação no íleo;
- 2) A adição cumulativa de glicina nos grupos controles provocou uma elevação significativa da corrente tanto no jejuno como no íleo, mas estatisticamente iguais, embora o jejuno mostre uma tendência para mais;
- 3) Nos grupos toxina, os valores basais de  $i_{cc}$  são significativamente superiores ( $p < 0,05$  – teste t pareado) no íleo se comparados ao jejuno, o que nos leva a crer que a ação da toxina no íleo seja mais eficaz que no jejuno;
- 4) A adição cumulativa de glicina nos grupos toxina, tanto no jejuno como no íleo, não provocou nenhuma alteração na  $i_{cc}$ , o que equivale a uma absorção nula.

### 13. Ação da Alanil-Glutamina sobre Jejunio

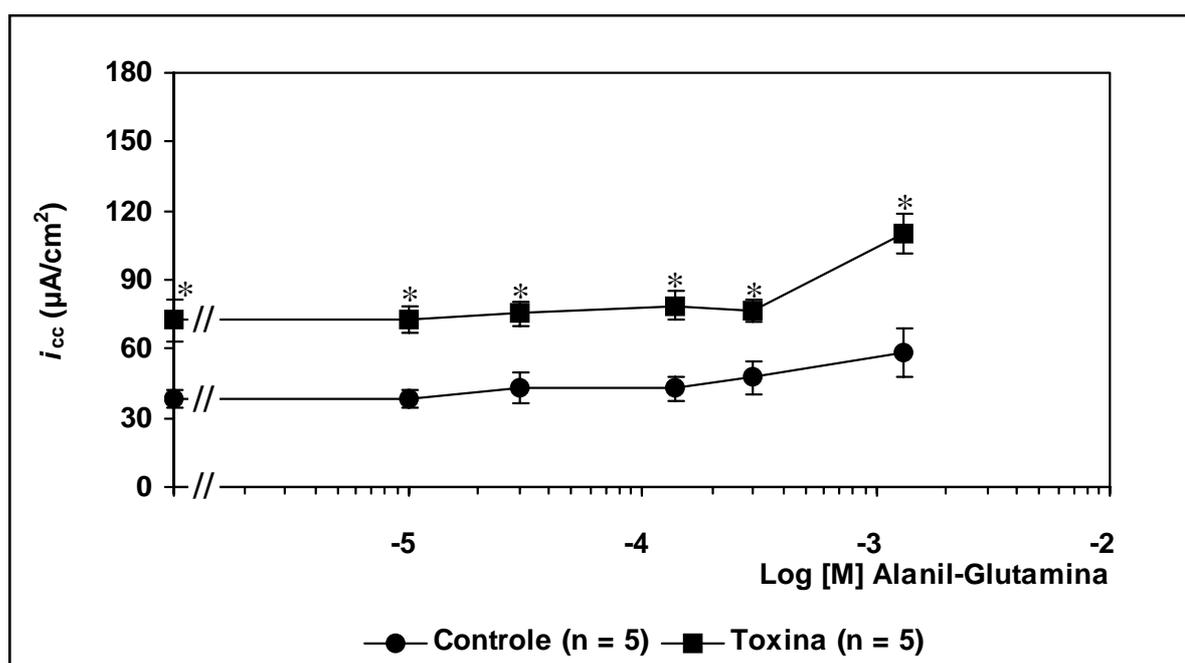
Os valores fornecidos pela Tabela 12 mostram que a adição cumulativa de alanil-glutamina ao lado mucoso de fragmentos de jejunio proximal no grupo controle causou uma elevação na  $i_{cc}$  bastante significativa ( $\Delta i_{cc} = 20,6 \pm 6,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0,05$  – teste t pareado), o mesmo ocorrendo no grupo toxina, onde a adição das doses correspondentes ao grupo controle também provocou um acréscimo altamente significativo da  $i_{cc}$  ( $\Delta i_{cc} = 37,8 \pm 7,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0,01$  – teste t pareado). Contudo, a análise estatística destes dois valores evidencia o fato de que o aumento de corrente, e por conseguinte o influxo de alanil-glutamina, no grupo toxina, foi significativamente maior ( $p < 0,05$  – teste t não-pareado) que no grupo controle, conforme pode ser visto na Figura 36.

Os valores obtidos para a variação da  $V_{TE}$  nos grupos controle e toxina ( $\Delta V_{TE} = 1,0 \pm 0,2 \text{ mV}$ ,  $p < 0,01$ , e  $\Delta V_{TE} = 1,2 \pm 0,4 \text{ mV}$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente – teste t pareado) não são estatisticamente diferentes (Figura 37).

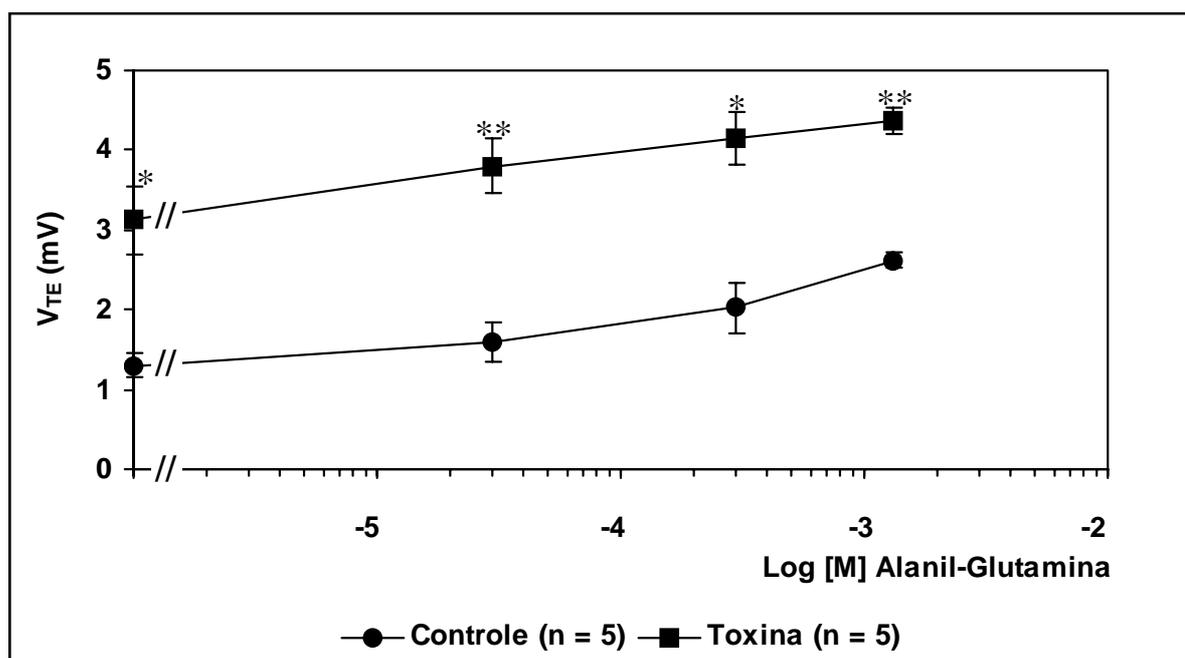
Quanto às  $R_{TE}$ , não ocorreu variação significativa no grupo controle ( $\Delta R_{TE} = 5,4 \pm 5,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ), mas ocorreu uma tendência de redução no grupo toxina ( $\Delta R_{TE} = 2,4 \pm 5,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) (Figura 38).

**Tabela 12 – Resultados da Ação da Alanil-Glutamina sobre Jejuno no Grupo Controle (n = 5) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 5). Sumário dos valores dos Anexos 18 e 19.**

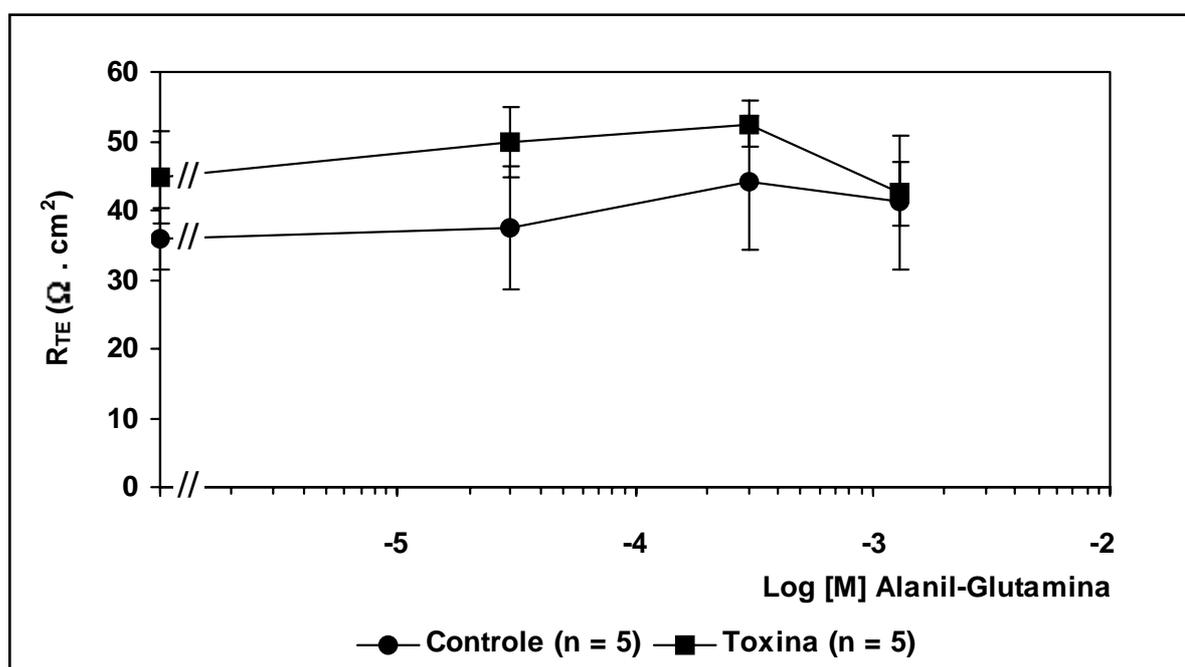
| <b>A L A N I L - G L U T A M I N A s o b r e J E J U N O</b> |   |               |   |               |  |               |
|--|---|---------------|---|---------------|--|---------------|
| <b>Dose (M)</b>  | <b><math>i_{cc} \pm \text{epm} (\mu\text{A}/\text{cm}^2)</math></b> |               | <b><math>V_{TE} \pm \text{epm} (\text{mV})</math></b> |               | <b><math>R_{TE} \pm \text{epm} (\Omega \cdot \text{cm}^2)</math></b> |               |
|  | <b>Controle</b>   | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>                                       | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>  | <b>Toxina</b> |
| 0  | 38,2 ± 4,0  | 72,4 ± 8,8    | 1,3 ± 0,2   | 3,1 ± 0,4     | 35,8 ± 4,4   | 44,8 ± 6,7    |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>   | 38,4 ± 3,9  | 72,4 ± 5,7    | –   | –             | –  | –             |
| 3 x 10 <sup>-5</sup>   | 43,4 ± 6,7  | 75,2 ± 5,5    | 1,6 ± 0,2   | 3,8 ± 0,4     | 37,4 ± 8,9   | 49,8 ± 5,1    |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>   | 42,8 ± 5,5  | 78,8 ± 6,5    | –   | –             | –  | –             |
| 3 x 10 <sup>-4</sup>   | 47,4 ± 7,1  | 76,5 ± 4,6    | 2,0 ± 0,3   | 4,2 ± 0,3     | 44,0 ± 9,7   | 52,5 ± 3,2    |
| 1 x 10 <sup>-3</sup>   | 58,8 ± 10,5   | 105,8 ± 13,1  | 2,6 ± 0,1   | 4,4 ± 0,2     | 41,2 ± 9,7   | 42,4 ± 4,7    |



**Figura 36 – Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$  versus Log [M]) da Alanil-Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejun Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,01$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 37 – Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$  versus Log [M]) da Alanil-Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejuno Proximal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,005$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 38 – Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$  versus Log [M]) da Alanil-Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Jejunio Proximal. O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. Resultados médios  $\pm$  epm.**

#### 14. Ação da Alanil-Glutamina sobre Íleo

Os valores fornecidos pela Tabela 13 mostram que a adição cumulativa de alanil-glutamina ao lado mucoso de fragmentos de íleo distal no grupo controle provocou uma variação significativa ( $\Delta i_{cc} = 56,8 \pm 11,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) da  $i_{cc}$ , enquanto que no grupo toxina ( $\Delta i_{cc} = 31,4 \pm 9,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0,05$  – teste t pareado). A Figura 39 evidencia o fato de que não há diferença estatística significativa entre as duas curvas ponto a ponto, sugerindo assim que a toxina não interferiu na taxa de absorção do substrato.

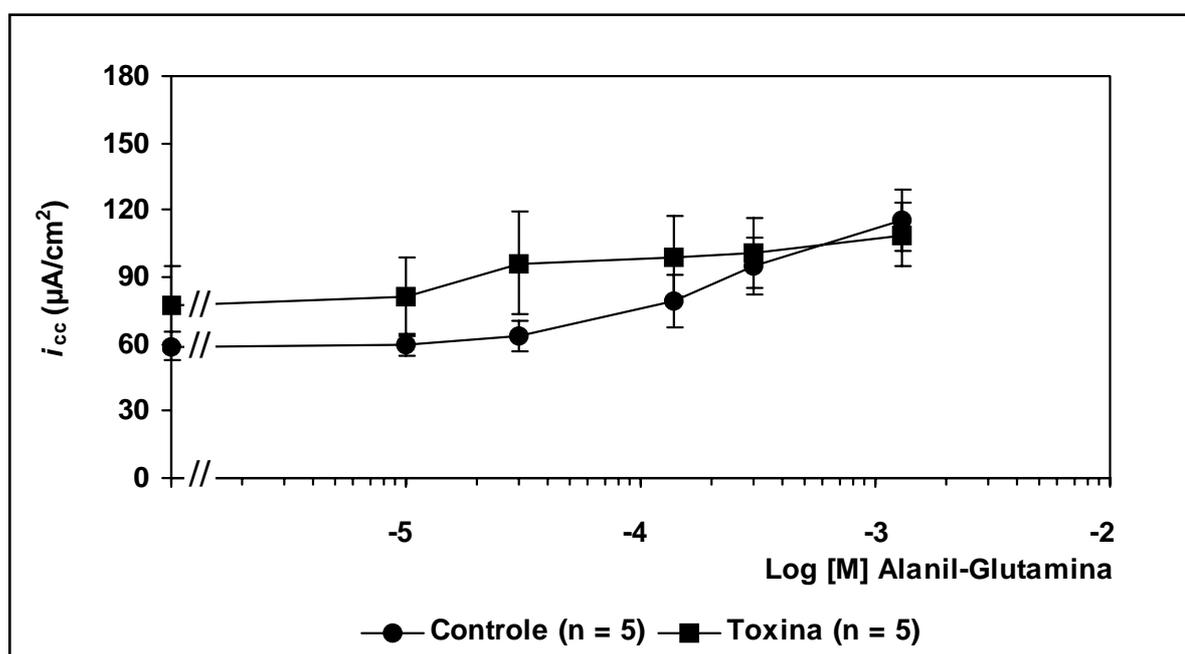
A adição de alanil-glutamina nos grupos controle e toxina produziu incrementos significativos ( $\Delta V_{TE} = 1,5 \pm 0,4 \text{ mV}$ ,  $p < 0,05$ , e  $\Delta V_{TE} = 1,6 \pm 0,6 \text{ mV}$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente – teste t pareado) nas  $V_{TE}$  (Figura 40).

A diferença de potencial basal do grupo toxina é maior que a sua correspondente no grupo controle de forma muito significativa ( $p < 0,01$  – teste t não-pareado). Este fato também é observado entre os valores basais das  $R_{TE}$ , onde a resistência basal do grupo controle ( $23,8 \pm 1,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) é quase a metade de sua correspondente no grupo toxina ( $45,2 \pm 4,9 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ), cuja diferença é muito significativa ( $p < 0,01$  – teste t não-pareado). Como não há diferença significativa entre os valores basais das correntes de curto-circuito de ambos os grupos (controle e toxina), fica claro que a significativa diferença entre os valores basais da  $V_{TE}$  entre os dois grupos ocorreu em decorrência do aumento de resistência provocado pela toxina.

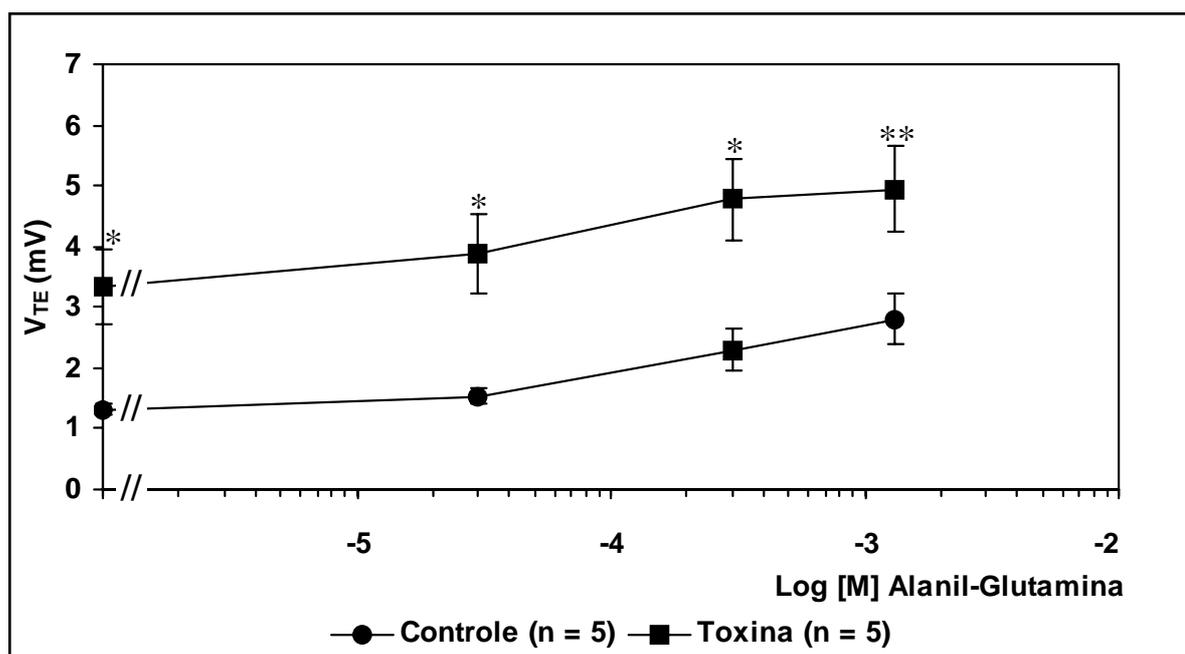
Quanto às  $R_{TE}$ , não correram variações estatisticamente significativas em função da adição cumulativa de alanil-glutamina (Figura 41).

**Tabela 13 – Resultados da Ação da Alanil-Glutamina sobre Íleo no Grupo Controle (n = 5) e no Grupo com Toxina de Cólera (n = 5). Sumário dos valores dos Anexos 20 e 21.**

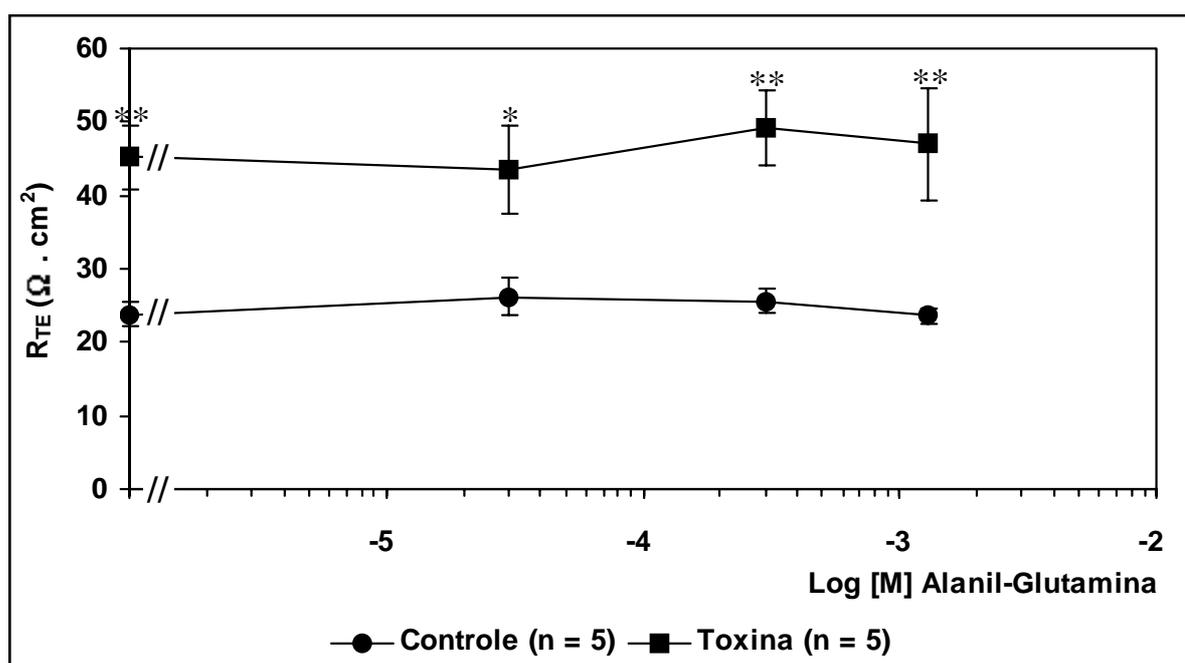
| <b>A L A N I L - G L U T A M I N A s o b r e Í L E O</b> |  |               |  |               |   |               |
|--|--|---------------|--|---------------|---|---------------|
| <b>Dose (M)</b>  | <b><math>i_{cc} \pm \text{epm}</math> (<math>\mu\text{A}/\text{cm}^2</math>)</b> |               | <b><math>V_{TE} \pm \text{epm}</math> (mV)</b> |               | <b><math>R_{TE} \pm \text{epm}</math> (<math>\Omega \cdot \text{cm}^2</math>)</b> |               |
|  | <b>Controle</b>  | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>                                | <b>Toxina</b> | <b>Controle</b>   | <b>Toxina</b> |
| 0  | 58,8 ± 6,5   | 77,6 ± 17,5   | 1,3 ± 0,1                                      | 3,3 ± 0,6     | 23,8 ± 1,7  | 45,2 ± 4,9    |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                                     | 59,4 ± 4,8   | 81,2 ± 18,1   | –  | –             | –   | –             |
| 3 x 10 <sup>-5</sup>                                     | 64,0 ± 6,9   | 96,0 ± 22,9   | 1,5 ± 0,1                                      | 3,9 ± 0,6     | 26,2 ± 2,6  | 43,6 ± 5,9    |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>                                     | 79,2 ± 11,7  | 99,2 ± 18,5   | –  | –             | –   | –             |
| 3 x 10 <sup>-4</sup>                                     | 94,8 ± 12,5  | 100,6 ± 13,9  | 2,3 ± 0,3                                      | 4,8 ± 0,7     | 25,6 ± 1,6  | 49,2 ± 5,2    |
| 1 x 10 <sup>-3</sup>                                     | 115,6 ± 11,5   | 109,0 ± 13,9  | 2,8 ± 0,4                                      | 4,9 ± 0,7     | 23,6 ± 1,0  | 47,0 ± 7,7    |



**Figura 39 – Curvas Concentração-Efeito ( $i_{cc}$  versus Log [M]) da Alanil-Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal. O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. Resultados médios  $\pm$  epm.**



**Figura 40 – Curvas Concentração-Efeito ( $V_{TE}$  versus  $\text{Log [M]}$ ) da Alanil-Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.



**Figura 41 – Curvas Concentração-Efeito ( $R_{TE}$  versus Log [M]) da Alanil-Glutamina Adicionada Cumulativamente ao Lado Mucoso de Fragmentos de Íleo Distal.** O n corresponde ao número de experimentos com quatro animais diferentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados médios  $\pm$  epm.

### **15. Comparação entre os Resultados da Ação da Alanil-Glutamina sobre Jejunos e sobre Íleo nos Grupos Controle e Toxina**

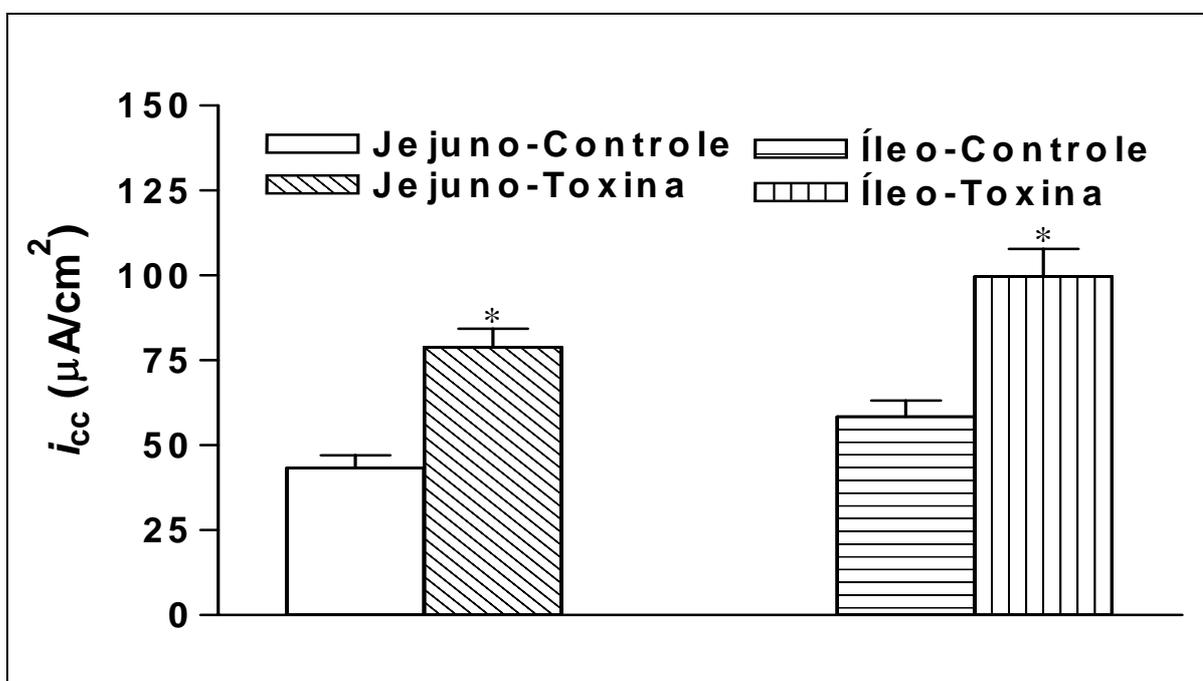
A diferença entre os acréscimos da  $i_{cc}$  ( $\Delta i_{cc}$ ) obtidos no jejuno e no íleo dos grupos controles foi significativa ( $36,2 \pm 9,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0,01$  – teste t não-pareado), sendo o acréscimo no íleo  $2,2 \pm 0,1$  vezes maior que o  $\Delta i_{cc}$  do jejuno, como se o influxo de alanil-glutamina fosse mais favorável no segmento final do intestino delgado. Nos grupos pré-incubados com toxina, os  $\Delta i_{cc}$  tanto do jejuno como do íleo não são estatisticamente diferentes. As diferenças de potencial e de resistência transepiteliais ( $\Delta V_{TE}$  e  $\Delta R_{TE}$ , respectivamente) para ambos os segmentos do intestino delgado não são estatisticamente diferentes.

## 16. Resultados Gerais das Correntes de Curto-Circuito Basais nos Segmentos Intestinais Jejuno e Íleo com e sem a Influência da Toxina de Cólera

A Figura 42 exibe os valores médios basais das correntes de curto-circuito ( $i_{cc}$ ) do total de experimentos realizados nos dois segmentos do intestino delgado (jejuno e íleo), tanto nos grupos controles como nos pré-incubados com toxina de cólera. A média dos valores basais dos grupos controles do jejuno (num total de 22 medidas) foi  $43,3 \pm 3,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Nos grupos pré-incubados (total de 27 medidas), o valor médio basal foi de  $78,9 \pm 5,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . A comparação entre estas duas médias mostra que a corrente média dos grupos pré-incubados é significativamente maior (cerca de 1,8 vezes,  $p < 0,001$  – teste t não-pareado) que a sua correspondente no grupo controle.

A média dos valores basais (dose 0) dos cinco grupos controles no íleo distal (num total de 27 medidas) foi de  $58,4 \pm 4,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Já nos grupos pré-incubados (total de 25 medidas), a média das  $i_{cc}$  basais foi de  $99,7 \pm 8,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . A razão entre os valores médios dos grupos pré-incubados e seus respectivos nos grupos controles é cerca de 1,7 (muito semelhante a do jejuno que é 1,8) e estatisticamente muito significativa ( $p < 0,001$  – teste t não-pareado).

Comparando-se os dois segmentos intestinais, constatamos que a média das  $i_{cc}$  basais dos grupos controles do íleo é maior que a sua equivalente no jejuno, com uma diferença de cerca de  $15,1 \pm 6,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $p < 0,01$  – teste t não-pareado). Com relação aos valores dos grupos pré-incubados, aqueles do íleo foram significativamente ( $p < 0,025$  – teste t não-pareado) superiores aos do jejuno.



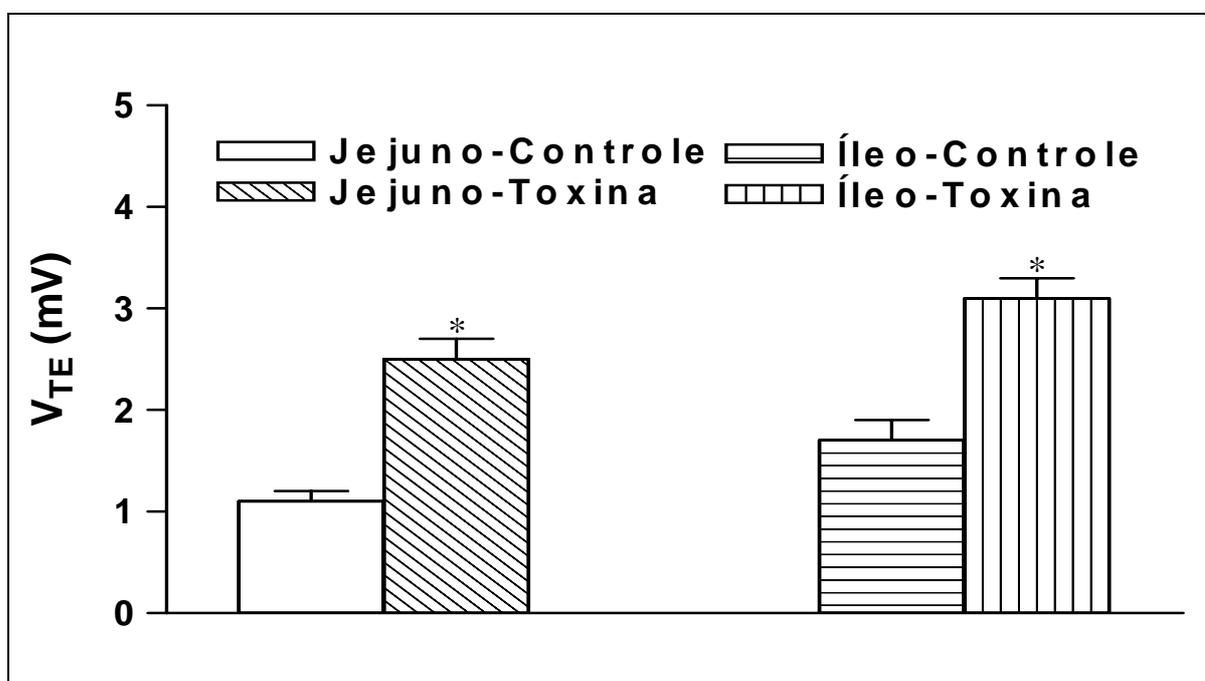
**Figura 42 – Valores Médios Basais das Correntes de Curto-Circuito.** O topo das barras indica os valores médios basais de todos os grupos de experimentos feitos ao longo deste trabalho. No Jejunum, a média dos valores basais dos grupos controles ( $43,3 \pm 3,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) é significativamente diferente da média dos grupos pré-incubados ( $78,9 \pm 5,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). No Íleo, a média dos valores basais dos grupos controles ( $58,4 \pm 4,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) também é significativamente diferente da média dos grupos pré-incubados ( $99,7 \pm 8,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). O n corresponde ao número de experimentos com 20 animais diferentes. \*  $p < 0,001$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados experimentais  $\pm$  epm.

### **17. Resultados Gerais das Diferenças de Potencial Transepitelial Basal nos Segmentos Intestinais Jejuno e Íleo com e sem a Influência da Toxina de Cólera**

A Figura 43 exibe os valores médios basais das  $V_{TE}$  do total de experimentos realizados nos dois segmentos do intestino delgado (jejuno e íleo), tanto nos grupos controles como nos pré-incubados com toxina de cólera. A média dos valores basais dos grupos controles do jejuno (num total de 22 medidas) foi de  $1,1 \pm 0,1$  mV. Nos grupos pré-incubados (total de 27 medidas), o valor médio basal foi de  $2,5 \pm 0,2$  mV. A comparação entre estas duas médias mostra que o tecido pré-incubado mais que dobrou seu valor basal de forma estatisticamente significativa ( $p < 0,001$  – teste t não-pareado) em relação à sua correspondente no grupo controle.

Os grupos controles do íleo (num total de 27 medidas) tiveram uma média igual a  $1,7 \pm 0,2$  mV. Já nos grupos pré-incubados (total de 25 medidas), o valor médio basal subiu para  $3,1 \pm 0,2$  mV, sendo este valor (3,1 mV) quase o dobro do seu equivalente nos grupos controles (1,7 mV). Todos estes valores são significativamente diferentes ( $p < 0,001$  – teste t não-pareado)

O valor médio basal dos grupos controles no íleo ( $1,7 \pm 0,2$  mV) é estatisticamente maior ( $p < 0,05$  – teste t não-pareado) que seu equivalente no jejuno ( $1,1 \pm 0,1$  mV). Da mesma forma, os valores médios basais dos grupos pré-incubados no íleo são significativamente maiores ( $p < 0,05$  – teste t não-pareado) que seus equivalentes no jejuno.



**Figura 43 – Valores Médios Basais das Diferenças de Potencial Transepithelial.** O topo das barras indica os valores médios basais de todos os grupos de experimentos feitos ao longo deste trabalho. No Jejunum, a média dos valores basais dos grupos controles ( $1,1 \pm 0,1$  mV) é significativamente diferente da média dos grupos pré-incubados ( $2,5 \pm 0,2$  mV). No Íleo, a média dos valores basais dos grupos controles ( $58,4 \pm 4,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) também é significativamente diferente da média dos grupos pré-incubados ( $3,2 \pm 0,2$  mV). O n corresponde ao número de experimentos com 20 animais diferentes. \*  $p < 0,001$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados experimentais  $\pm$  epm.

## 18. Resultados Gerais das Resistências Transepiteliais Basais nos Segmentos Intestinais Jejuno e Íleo com e sem a Influência da Toxina de Cólera

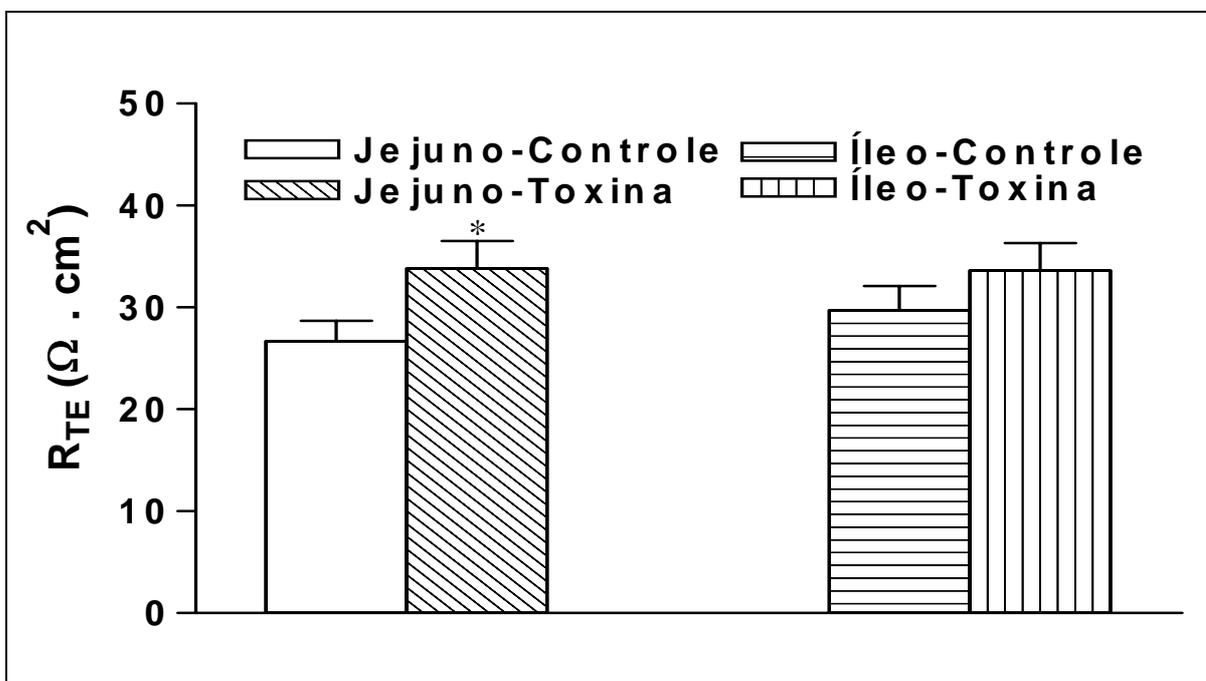
A determinação das  $R_{TE}$  é feita pela passagem de uma corrente de 100,0  $\mu\text{A}$  através do fragmento do tecido, provocando assim uma queda de potencial tal, que a razão entre o valor desta queda e o valor do próprio pulso de corrente (100,0  $\mu\text{A}$ ) fornece, de acordo com a lei de ohm, o valor da resistência a ser medido. Caso haja um potencial de fixação diferente de zero ( $V_{\text{sis}} \neq 0$ ), a resistência será obtida pela razão entre a diferença da queda de potencial provocada pelo pulso de corrente e o potencial  $V_{\text{sis}} \neq 0$ , e o valor do pulso de corrente (neste caso 100,0  $\mu\text{A}$ ). A passagem deste pulso não causa alterações no comportamento posterior do fragmento de tecido em estudo (SOARES *et al.*, 1991).

A Figura 44 exhibe os valores médios basais das  $R_{TE}$  do total de experimentos realizados nos dois segmentos do intestino delgado (jejuno e íleo), tanto nos grupos controles como nos pré-incubados com toxina de cólera. A média dos valores basais dos grupos controles do jejuno (num total de 22 medidas) foi de  $26,7 \pm 2,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Nos grupos pré-incubados (total de 27 medidas), o valor médio basal foi de  $33,8 \pm 2,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . A comparação entre estas duas médias mostra que o tecido pré-incubado tem sua  $R_{TE}$  significativamente aumentada ( $p < 0,05$  – teste t não-pareado) em relação à sua correspondente no grupo controle.

Os valores basais médios dos fragmentos de tecido do íleo para os grupos controles (total de 27 medidas) e pré-incubados (total de 22 medidas) são, respetivamente,  $29,7 \pm 2,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  e  $33,6 \pm 2,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . No entanto, estes valores não são significativamente diferentes entre si, nem tão pouco estatisticamente diferentes de seus equivalentes no jejuno.

O cálculo da  $R_{TE}$  a partir da razão ponto a ponto da  $V_{TE}$  e da sua correspondente  $i_{cc}$ , forneceu, para os fragmentos do jejuno relativos aos grupos

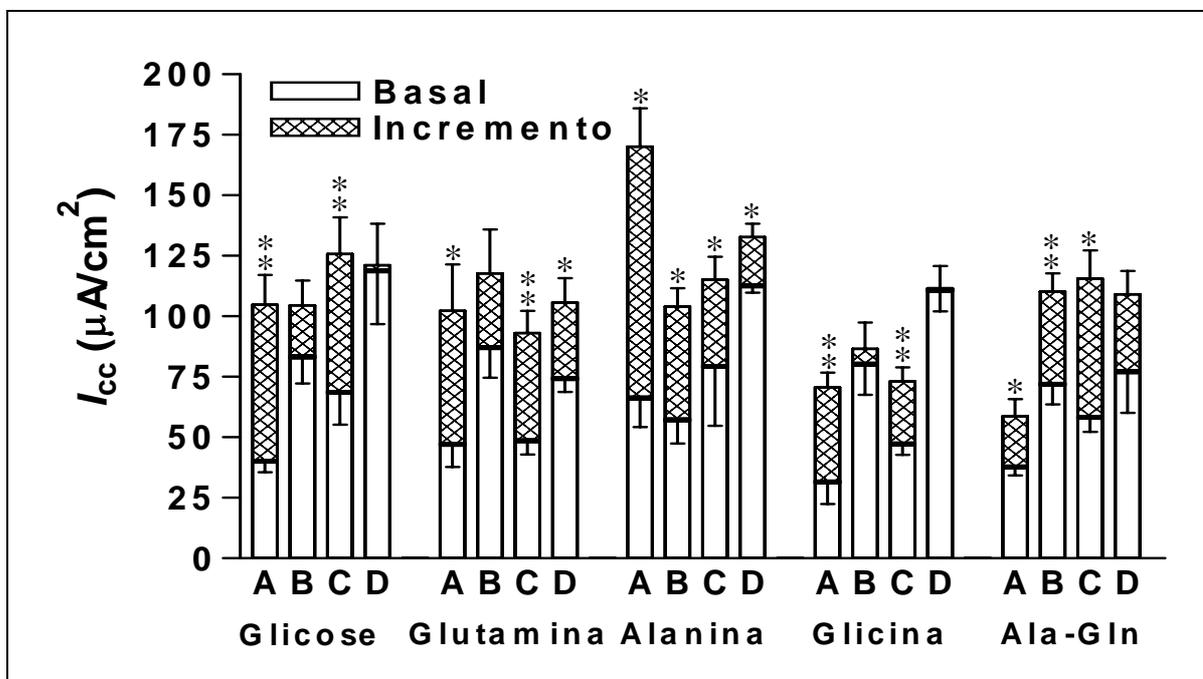
controles e pré-incubados com toxina de cólera, os seguintes e respectivos valores médios basais:  $26,7 \pm 2,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$  e  $34,1 \pm 2,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Valores estes a serem respectivamente comparados com aqueles obtidos pela passagem do pulso de corrente acima citado:  $26,7 \pm 2,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$  e  $33,8 \pm 2,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . No íleo, a concordância também é total. Valores calculados pela razão  $V_{TE}/i_{cc}$ , cujos resultados para os grupos controles e pré-incubados são respectivamente  $29,4 \pm 2,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$  e  $33,1 \pm 2,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , não têm nenhuma diferença significativa daqueles obtidos com pulso de corrente de  $100,0 \mu\text{A}$ , cujos valores respectivos são  $29,7 \pm 2,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  e  $33,6 \pm 2,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .



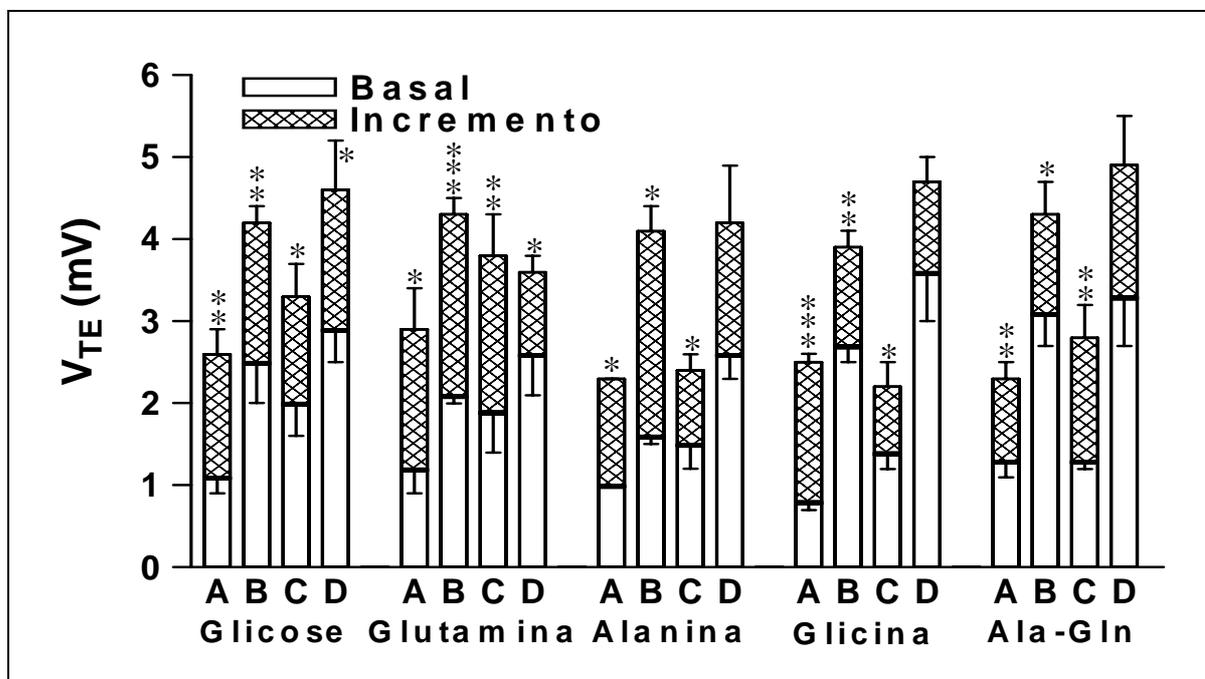
**Figura 44 – Valores Médios Basais das Resistências Transepiteliais.** O topo das barras indica os valores médios basais de todos os grupos de experimentos feitos ao longo deste trabalho. No JEJUNO, a média dos valores basais dos grupos controles foi de  $26,7 \pm 2,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , enquanto que a média dos grupos pré-incubados foi de  $33,8 \pm 2,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . No ÍLEO, a média dos valores basais dos grupos controles e pré-incubados foi, respectivamente,  $29,7 \pm 2,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  e  $33,6 \pm 2,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . O n corresponde ao número de experimentos com 20 animais diferentes. \*  $p < 0,05$  (teste t não-pareado) em relação ao grupo controle. Resultados experimentais  $\pm$  epm.

### **19. Resultados Comparativos Globais da Adição Cumulativa dos Substratos Glicose, Glutamina, Alanina, Glicina e Alanil-Glutamina Sobre os Segmentos Intestinais Jejuno e Íleo com e sem a Influência da Toxina de Cólera**

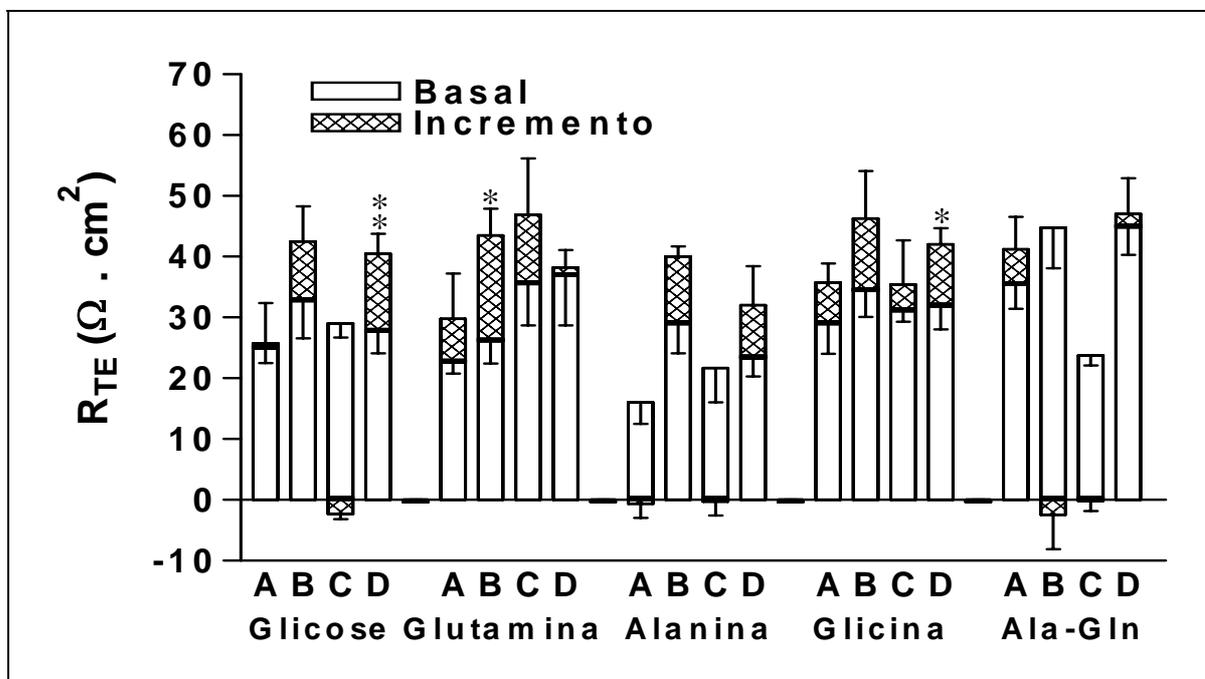
A Figura 45 exhibe os cinco conjuntos de experimentos realizados neste trabalho, dispostos de maneira comparativa. Nele podemos observar o incremento da  $i_{cc}$  com relação a seus valores basais e em função da adição de substratos. Da mesma forma, a Figura 46 mostra as alterações causadas na  $V_{TE}$  relativo a seus valores basais em função da adição de substratos. Por último, na Figura 47, observamos as variações das  $R_{TE}$  relativas a seus valores basais em função da adição de substratos.



**Figura 45 – Incremento das Correntes de Curto-Circuito com a Adição Cumulativa de Substratos.** Cada barra do gráfico acima representa o valor basal (porção inferior vazia) e o incremento da  $i_{cc}$  (porção superior preenchida) decorrente da adição de um substrato específico, identificado na última linha do gráfico. Cada barra nomeada A e B representa a resposta à adição do correspondente substrato nos grupos controle e toxina no jejuno. Cada barra nomeada C e D representa a equivalente resposta no íleo. Os números entre parênteses (n) correspondem ao número total de experimentos para aquele grupo. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (teste t pareado) em relação aos valores basais. Linha vertical representa epm.



**Figura 46 – Incremento das Diferenças de Potencial Transepitelial com a Adição Cumulativa de Substratos.** Cada barra do gráfico acima representa o valor basal (porção inferior vazia) e o incremento da  $V_{TE}$  (porção superior preenchida) decorrente da adição de um substrato específico, identificado na última linha do gráfico. Cada barra nomeada A e B representa a resposta à adição do correspondente substrato nos grupos controle e toxina no jejuno. Cada barra nomeada C e D representa a equivalente resposta no íleo. Os números entre parênteses (n) correspondem ao número total de experimentos para aquele grupo. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (teste t pareado) em relação aos valores basais. Linha vertical representa epm.



**Figura 47 – Incremento das Resistências Transepiteliais com a Adição Cumulativa de Substratos.** Cada barra do gráfico acima representa o valor basal (porção inferior vazia) e o incremento da  $R_{TE}$  (porção superior preenchida) decorrente da adição de um substrato específico, identificado na última linha do gráfico. Cada barra nomeada A e B representa a resposta à adição do correspondente substrato nos grupos controle e toxina no jejuno. Cada barra nomeada C e D representa a equivalente resposta no íleo. Os números entre parênteses (n) correspondem ao número total de experimentos para aquele grupo. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (teste t pareado) em relação aos valores basais. Linha vertical representa epm.

## DISCUSSÃO

A análise matemática, particularmente a estatística, pode nos ajudar a decidir que variáveis são ou não relacionadas, bem como que espécie de equação matemática melhor traduziria as relações observadas. O problema crucial na análise de um determinado sistema que não é quantitativamente matemático é aquele da certeza de que uma ou mais variáveis são totalmente independentes, totalmente dependentes, ou ainda, parcialmente dependentes ou parcialmente independentes. Uma variável é totalmente independente caso ela não seja influenciada por alguma alteração nas outras variáveis do sistema, e será totalmente dependente caso não possa influenciar qualquer outra variável do sistema, e ainda, dentro de um mesmo sistema, uma variável pode ser parcialmente independente ou parcialmente dependente caso ela possa influenciar pelo menos uma variável deste sistema ou ser influenciada por pelo menos uma variável deste sistema, respectivamente.

Em um sistema físico “rígido”, constituído por uma fonte de tensão constante ( $V$ ) em um resistor ( $R$ ), um fluxo de corrente ( $i$ ) flui através desta resistência em uma relação que é governada pela lei de Ohm, de forma que  $i = V/R$ , e neste caso, pode-se alterar o valor de  $i$  manipulando-se as variáveis independentes  $V$  ou  $R$ , mas não se pode variar  $V$  ou  $R$  pela manipulação de  $i$ , visto que a corrente é originada pela pré-existência de uma diferença de potencial (ddp), e nunca vice-versa. Portanto,  $i$  é uma variável totalmente dependente neste sistema em que a fonte de ddp é um parâmetro fixo ou constante, e  $V$  e  $R$  são variáveis totalmente independentes.

No modelo biológico utilizado neste trabalho, foram medidas, em duas fases distintas, os três parâmetros elétricos acima citados. O estudo interpretativo das relações de interdependência destes parâmetros deve fornecer subsídios para a justificativa dos objetivos aqui propostos. É válido, portanto, que se

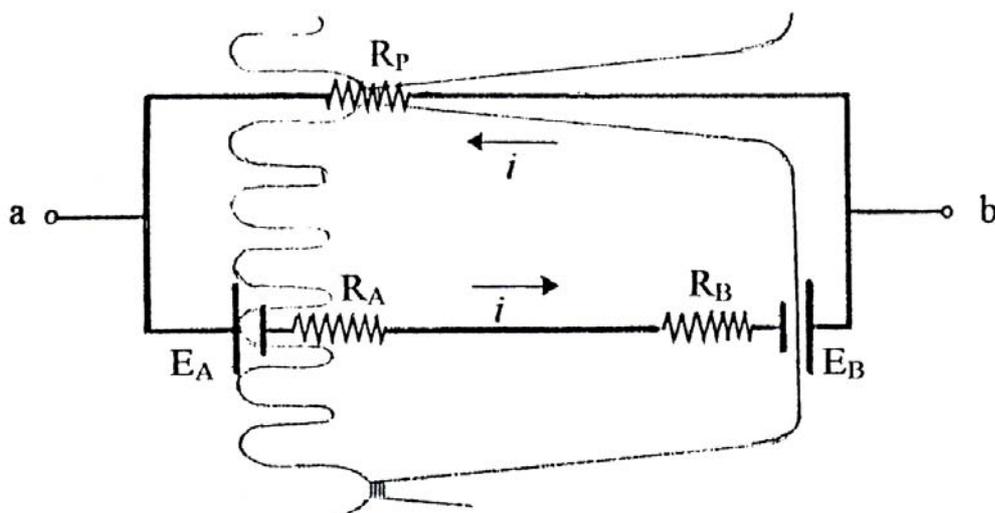
mostre, ao nível do tecido, suas origens, bem como os mecanismos e estruturas peculiares que governam estas relações de interdependência dos mesmos.

Convém lembrar que as soluções que banham as faces luminal e serosa dos fragmentos epiteliais, os quais constituem o nosso modelo biológico e que são montados nas câmaras de Ussing, são iguais em termos de composição iônica e osmolaridade. Portanto, não existem gradientes de concentração (potencial químico) que promovam fluxo de matéria através de vias comunicantes entre os dois lados da membrana epitelial que possa justificar o aparecimento de um potencial de difusão, como ocorre nas membranas seletivamente permeáveis que separam soluções iônicas de composição química diferentes. No entanto, se detectamos uma ddp entre as faces do fragmento epitelial, outros mecanismos característicos das células que constituem este tecido são necessários para justificar a criação desta diferença.

Sabidamente, nas células que revestem a superfície mucosa do intestino delgado (enterócitos), os canais de potássio seletivamente permeáveis, estão predominantemente situados na membrana basolateral (HALM & FRIZZEL, 1986), enquanto que o sódio (função principalmente dos mecanismos de co-transporte e antiporte) é muito mais permeável à membrana luminal que à basolateral, ainda, a bomba de sódio ( $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase), que é indetectável na membrana luminal, é extremamente eficiente na basolateral (SCHULTZ & ZALUSKY, 1964). Estas particularidades já conferem ao enterócito características de células polarizadas. Outra característica fundamental do tecido epitelial é o espaço inter ou paracelular, o qual funciona como uma via, ou barreira, de permeabilidade seletiva, possuindo, portanto, uma resistividade inerente, visto que as células da mucosa intestinal devem transportar nutrientes de forma seletiva do espaço luminal para o extracelular basolateral num fluxo unidirecional. Esta unidirecionalidade de transporte é garantida por famílias específicas de proteínas localizadas nas membranas apicais, ou basolaterais, dos enterócitos. A restrição

ao natural processo de difusão de proteínas na fluída bicamada fosfolipídica, permitindo assim a mistura entre proteínas com localização funcional restrita à membrana apical com aquelas restritas à basolateral, é garantida por uma estrutura de células conhecida como JUNÇÃO COMPACTA (*zonulae ocludens* ou *tight junction*) (FARQUHAR & PALADE, 1963; GUMBINER, 1987, 1993). Esta estrutura é formada por proteínas intrínsecas e periféricas, com domínios intra e extracelulares, dispostas lado a lado, em linhas que formam uma trama circundando interna e externamente como uma faixa, a região mais próxima do ápice da células. Pelo menos três proteínas desta estrutura já foram identificadas: a ocludina hiperfosforilada (65-79 kDa) e as proteínas periféricas ZO-1 e ZO-2 (citoplasmáticas, ~ 210 kDa) (JESAITIS & GOODENOUGH, 1994; NUSRAT *et al.*, 2000). As ocludinas têm um domínio citosólico que, segundo todas as evidências, interage com as proteínas ZO-1 e ZO-2, estas últimas possuem uma estrutura molecular que sugere fortemente uma função de ligação interproteínas (STEVENSON *et al.*, 1986), o domínio extracelular das ocludinas interage com suas homólogas das células vizinhas. Imediatamente adjacentes (e abaixo) à junção compacta, uma outra faixa constituída por proteínas transmembrana (CADERINAS), e também circundando toda a célula, forma os chamados CINTOS DE ADESÃO. O domínio extracelular das caderinas realiza ligações homofílicas com as correspondentes proteínas das células vizinhas. Ao domínio citoplasmático, esta intimamente, e ao longo de todo o perímetro, associado um feixe de fibras de ACTINA-MIOSINA II, o qual também interage com o cito-esqueleto (MADARA *et al.*, 1987; MADARA *et al.*, 1992; MADARA, 1998).

Fundamentado na estrutura física e no comportamento funcional do modelo biológico em estudo, e no fato de que as variáveis medidas eram parâmetros de um circuito elétrico, propomos um modelo (esquema) que indubitavelmente contenha estas variáveis e que de forma mais racional, se possa visualizar suas relações de interdependência, conforme exposto na Figura 48.



**Figura 48 – Modelo Elétrico do Enterócito**

$E_A$  e  $E_B$  são as forças motrizes (baterias) geradas nas membranas apicais e basolaterais;  $R_A$  e  $R_B$  representam as resistências transmembrana;  $R_P$  é a resistência oferecida pela junção compacta (*tight junction*).

No circuito acima exposto,  $E_A$  representa a força eletromotriz (potencial de membrana), cujo valor é predominantemente influenciado pela permeabilidade do  $\text{Na}^+$  na membrana apical, e cujo sentido é sempre o de despolarizar esta membrana;  $R_A$  é a resistência que representa e é proporcional a esta permeabilidade, ou a do  $\text{Cl}^-$  quando for o caso de abertura de canais de cloro;  $E_B$  é a bateria predominantemente influenciada pela permeabilidade basolateral do  $\text{K}^+$ , o qual tende sempre a hiperpolarizar esta região da membrana;  $R_B$  é a resistência que corporifica esta permeabilidade;  $R_P$  representa a resistência oferecida à passagem de partículas pelo espaço paracelular.

A aplicação elementar das leis de Kirchof ao circuito representado na Figura 48 resulta na seguinte expressão para a diferença de potencial transepitelial ( $V_{TE}$ ):

$$V_{ab} = \frac{R_P (E_A - E_B)}{R_A + R_B + R_P}$$

O entendimento da expressão acima ficará mais clara com as seguintes considerações: os íons  $\text{Na}^+$  que estão permanentemente atravessando a membrana apical, quer sozinhos, quer em co-transporte com substâncias eletro-neutras, estarão realizando a polarização (despolarizando) da própria membrana apical. Estes íons estarão na membrana basolateral também permanente e eletrogenicamente sendo transportados para fora das células por transporte ativo que, associado à difusão passiva de  $\text{K}^+$ , tende a tornar esta membrana mais polarizada (hiperpolarizada) do que a apical. Por isso, teremos sempre  $E_A - E_B > 0$ . Por outro lado, cada cátion que atravessa a membrana apical e é transportado para o espaço extracelular basolateral, deixa no espaço luminal um ânion, criando assim uma distribuição espacial de cargas que dão origem à  $V_{TE}$ , sendo a tendência natural a redistribuição destas cargas e como o  $\text{Cl}^-$  tem um extremamente desfavorável potencial eletroquímico para acompanhar o  $\text{Na}^+$  pela via transcelular, só lhe resta o caminho paracelular, se esta via não oferecer nenhuma resistência à passagem do  $\text{Cl}^-$ , estará ocorrendo um movimento simultâneo de cargas entre as faces luminal e basolateral da célula epitelial, portanto, não ocorrerá partição de cargas e conseqüentemente a ddp entre os dois espaços será nula, que é o mesmo o que obtivemos na igualdade acima quando tornamos  $R_P = 0$ . Por outro lado, se  $R_P$  tende para infinito, poderemos obter desta mesma igualdade  $V_{ab} = E_A - E_B$ . De fato, a simples substituição do ânion  $\text{Cl}^-$  pelo  $\text{SO}_4^{=}$  em epitélio de anfíbio, cujas propriedades são semelhantes às da mucosa intestinal, mas para ambos epitélios, o sulfato é um ânion impermeável (o que equivale ao aumento da resistência paracelular ao  $\text{Cl}^-$ ), elevou a  $V_{TE}$  em mais de 150% (LACAZ-VIEIRA & SANIOTO, 1981).

Assim sendo, a variável  $V_{TE}$ , que representa a força eletromotriz geradora da corrente de curto-circuito ( $i_{cc}$ ), é função do grau de despolarização de uma membrana apical (aumento ou diminuição do influxo eletrogênico de  $\text{Na}^+$ ), da hiperpolarização de outra membrana celular (transporte ativo eletrogê-

nico do  $\text{Na}^+$  basolateral). Portanto, de acordo com as observações iniciais deste capítulo, a  $V_{\text{TE}}$  é uma variável independente, a  $i_{\text{cc}}$  será uma variável totalmente dependente, e a  $R_{\text{TE}}$  é a outra variável totalmente independente.

Os resultados experimentais mostraram que os valores basais da  $i_{\text{cc}}$  e  $V_{\text{TE}}$  dos fragmentos pré-incubados com toxina de cólera (Figura 42), tanto no jejuno como no íleo, eram significativamente maiores ( $p < 0,001$  – teste t não-pareado) que os seus correspondentes valores nos fragmentos controles. A explicação óbvia para isso se dá no efeito da toxina sobre os canais de  $\text{Cl}^-$  nas células da cripta, promovendo assim um efluxo de ânions (equivalente a um influxo de cátions) tendente a despolarizar a membrana apical destas células, e com isso, aumentando em módulo a diferença  $E_A - E_B$ . Reforçando este efeito, Shorofsky e cols. mostraram que o aumento da secreção de  $\text{Cl}^-$  induz um aumento de permeabilidade de  $\text{K}^+$  na membrana basolateral, que tende a levar o potencial de membrana para o potencial de equilíbrio do  $\text{K}^+$ , o qual é superior a  $-80$  mV (SHOROFSKY *et al.*, 1983), isto aumenta mais ainda a força eletromotriz de efluxo de cloreto, mas, como postulado nas considerações preliminares desta discussão, apesar de um aumento da força eletromotriz aumentar a variável dependente  $i_{\text{cc}}$ , esta pode também sofrer influência do terceiro parâmetro medido, a  $R_{\text{TE}}$ .

Os resultados experimentais mostraram também que os valores obtidos para os fragmentos pré-incubados com toxina, principalmente no jejuno, região predominantemente absorvedora de substratos em co-transporte com  $\text{Na}^+$  e trocadora de  $\text{H}^+$  em antiporte com o  $\text{Na}^+$  (JOHNSON, 1997), relativos à  $R_{\text{TE}}$ , eram significativamente maiores ( $p < 0,05$  – teste t não-pareado) que seus correspondentes controle (Figura 44). No íleo, região predominantemente absorvedora de  $\text{Na}^+$  em co-transporte com  $\text{Cl}^-$  (JOHNSON, 1997), a diferença entre os valores basais dos grupos controle e pré-incubados com toxina não foi estatísti-

camente significativa. Mesmo assim, observamos uma tendência à elevação de  $R_{TE}$  nos fragmentos pré-incubados.

Procuramos justificar esta observação com aquela feita em 1995 por Turner & Madara. Os autores constataram que a absorção de glicose promovia a fosforilação da cadeia leve de miosina (MIOSINA II) intracelular (TURNER & MADARA, 1995) com conseqüente redução da resistência transepitelial ( $R_{TE}$ ). Esta alteração de resistência já havia sido observada quando da adição de glicose ao lado mucoso de epitélio intestinal (MADARA & PAPPENHEIMER, 1987; ATISOOK *et al.*, 1990). Em 1997, Turner e cols. demonstraram que a inibição farmacológica da quinase fosforilante da MIOSINA II evitava o aumento da permeabilidade transepitelial (não reduzia a resistência) mesmo com a adição de glicose (TURNER *et al.*, 1997). Uma vez que MacLeod & Hamilton haviam demonstrado que a deflagração do processo de co-transporte  $Na^+$ -glicose provocava um aumento de volume do enterócitos, mas um mecanismo restaurador era concomitantemente disparado, e este mecanismo era a ativação de um trocador  $Na^+$ - $H^+$  (MACLEOD & HAMILTON, 1991, 1996), isto induziu novamente Turner e cols. a associarem regulação de volume e junção compacta com o trocador sódio-próton. Os autores observaram que a inibição deste trocador reduzia acentuadamente a fosforilação da MIOSINA II com um conseqüente e significativo aumento da  $R_{TE}$ , ou seja, a ativação do trocador sódio-próton tenderia a aumentar o pH intracelular (alcalinizar) e isto seria o sinal para a fosforilação da cadeia leve de miosina, a qual, uma vez fosforilada, promoveria a contração do feixe de actina-miosina II do cinto de adesão perijuncional, provocando mecanicamente a redução da  $R_{TE}$ .

Considerando-se que a toxina do cólera promove um exacerbado aporte de cloreto no lúmen, e que tanto as células da cripta como as dos vilos possuem em suas membranas apicais um trocador cloro-bicarbonato (KNICKELBEIN *et al.*, 1988), a troca  $Cl^-$ - $HCO_3^-$  será bastante favorecida, causando a

grande perda fecal de bicarbonato, e como conseqüência, levando ao mais importante transtorno eletrolítico do paciente com cólera, que é a acidose metabólica.

Baseado nas considerações feitas acima, sugerimos como justificativa para a elevação da  $R_{TE}$  observada nos valores basais dos grupos pré-incubados com toxina, a conseqüente redução do pH citoplasmático, que diminuindo a fosforilação da miosina II e com isto promovendo o relaxamento do mecanismo tipo esfínter do cinto de adesão, e aumentando assim a  $R_{TE}$ .

### **1. Ação da Glicose sobre Jejuno e Íleo**

A adição de glicose ao lado mucoso dos fragmentos epiteliais do grupo controle provocou aumento significativo ( $p < 0,01$  – teste t pareado) da  $i_{cc}$  no jejuno (174%) e no íleo (110%). Este aumento de corrente já havia sido mostrado primeiramente por Schultz & Zalusky (1964) e comprovado pelos trabalhos de Windmueller & Spaeth (1974, 1978, 1980) e Stevens e cols. (1990). A  $V_{TE}$  também sofreu um significativo aumento ( $p < 0,0051$  – teste t pareado), mas a  $R_{TE}$  não sofreu nenhuma alteração ( $\Delta R_{TE} = 0,5 \pm 6,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ), podendo ser considerada constante ou tendendo à redução, como no caso do grupo controle do íleo, o que já havia sido demonstrado por Atisook e cols. (1990). Estes comportamentos podem ser observados nos Figuras 45, 46 e 47 dos Resultados, nas barras A e C do substrato GLICOSE.

Nos fragmentos de jejuno pré-incubados com toxina, a adição de glicose provocou uma alteração na  $i_{cc}$  muito menor do que aquela observada no controle (apenas 25% acima do valor basal), mas mesmo assim de maneira significativa ( $p < 0,051$  – teste t pareado), enquanto que a  $V_{TE}$  (com um acréscimo de 68% do valor basal) ficou muito aquém da sua correspondente no controle (com um acréscimo da ordem de 130%), já no caso da  $R_{TE}$ , seu valor médio corresponde a um aumento da ordem de 29%. A comparação destes valores com os

seus correspondentes no grupo controle demonstra que a toxina do cólera provocou uma redução na absorção da glicose, tanto que a variação da  $V_{TE}$  foi metade daquela do grupo controle. Além disso, houve uma nítida tendência de aumento da  $R_{TE}$ .

Nos fragmentos de íleo pré-incubados com toxina, a variação da  $i_{cc}$  pode ser considerada nula ( $\Delta i_{cc} = 1,7 \pm 17,3 \mu A/cm^2$ ), enquanto que a variação da  $V_{TE}$  foi na casa dos 50%, de forma compatível com o aumento da  $R_{TE}$ . Isto significa que no íleo, no limite das doses adicionadas, a toxina não permitiu a absorção da glicose (pelo menos não de forma detectável) pela variação da  $i_{cc}$ , mas como verificamos uma variação na  $V_{TE}$  e  $R_{TE}$ , isto significa que ocorreu uma absorção maior do que zero, o que promoveu um aumento da resistência paracelular, que por sua vez aumentou a ddp. Estas constatações podem ser visualizadas nos Figuras 45, 46 e 47 dos Resultados, nas barras B e D do substrato GLICOSE.

Torna-se intrigante a constatação de que a adição de glicose aos fragmentos do grupo pré-incubado com toxina provocou uma forte tendência de aumento da  $R_{TE}$  num comportamento antagônico àquele observado no grupo controle.

Como já havia demonstrado Madara & Pappenheimer (1987), a ativação do co-transporte  $Na^+$ -GLICOSE, o SGLT1, provocava, em epitélios normais (não inoculados), uma redução na  $R_{TE}$  de até 30%, mas como já citado anteriormente, esta redução se dá em função da fosforilação de uma MIOSINA II, que por outro lado, depende do pH citoplasmático. Em 1995, Brant e cols. clonaram e estudaram a distribuição e análise funcional de uma terceira iso-forma de trocador sódio-próton, o NHE3, cuja localização nos enterócitos é restrita à membrana apical (BRANT *et al.*, 1995). Posteriormente, Turner e cols. (2000) demonstraram, em monocamadas de clones de carcinoma de colo (Caco-2) transfectados para expressar o transportador SGLT1, que a inibição específica do trocador

NHE3 provocava um aumento da  $R_{TE}$  da ordem de  $15 \pm 3\%$ , com uma significância de  $p < 0,05$ , mas este aumento só ocorria se, e somente se, o co-transportador SGLT1 fosse ativado (TURNER *et al.*, 2000).

Apoiado nestes achados experimentais, sugerimos como justificativa para o acréscimo de resistência ocorrido quando da adição da glicose aos grupos pré-tratados com toxina, tendo em vista que as diferenças entre os valores máximos dos grupos controle e toxina são significativas ( $p < 0,02$  e  $p < 0,001$ , jejuno e íleo, respectivamente, dados das tabelas 4 e 5 dos Resultados), que a toxina de cólera venha, de forma semelhante ao acima exposto, criar as condições para que, quando o transportador SGLT1 for ativado, ocorra a aumentada alteração da  $R_{TE}$ .

## 2. Ação da Glutamina sobre Jejuno e Íleo

Os resultados da ação da glutamina sobre o jejuno do grupo controle mostraram que a variação da  $R_{TE}$  pode ser considerada nula ou decrescente, o que em termos percentuais seria  $\Delta R_{TE} = 24,2 \pm 27,6\%$ , mas os acréscimos relativos às variações da  $i_{cc}$  e  $V_{TE}$  ( $\Delta i_{cc} = 131,5 \pm 39,2\%$  e  $\Delta V_{TE} = 133,6 \pm 8,9\%$ , respectivamente) são absolutamente coerentes com a propriedade das porcentagens de um produto de dois fatores em que a variação percentual resultante é igual à soma dos acréscimos percentuais de cada fator mais o produto destes acréscimos dividido por 100, como pode ser melhor demonstrado na fórmula abaixo:

$$y = x \cdot \beta \longrightarrow \Delta y\% = \Delta x\% + \Delta \beta\% + (\Delta x\% \cdot \Delta \beta\%) / 100$$

Como numericamente  $V_{TE} = i_{cc} \cdot R_{TE}$ , e considerando-se que a  $R_{TE}$  é estatisticamente não significativa, teríamos:

$$\Delta V_{TE} = 131,5\% + 0,0\% + (131,5 \cdot 0) / 100 = 131,5\%$$

Valor este extremamente próximo ao valor de  $\Delta V_{TE}$  (133,6%) obtido a partir dos dados experimentais, de forma que podemos afirmar que a adição de glutamina aos fragmentos de jejuno no grupo controle promoveu um aumento real da  $i_{cc}$  às custas de um aumento da  $V_{TE}$ , mas sem alteração da  $R_{TE}$ , e que estas variações são consequência do influxo de  $Na^+$  na membrana apical em co-transporte com a glutamina.

A adição de glutamina aos fragmentos pré-incubados com toxina produziu um incremento não significativo ( $\Delta i_{cc} = 39,8 \pm 22,0\%$ ), mas a variação da  $R_{TE}$  foi significativa ( $\Delta R_{TE} = 68,7 \pm 20,0\%$ ,  $p < 0,05$ ). Usando o mesmo raciocínio empregado nos fragmentos do grupo controle, encontraríamos uma variação percentual de  $135,8 \pm 21,0\%$ . Os valores experimentais nos mostram que a variação de  $V_{TE}$  é igual a  $103,0 \pm 7,0\%$ , o qual, considerando-se as dispersões dos dois fatores, é um valor bastante coerente. Isto significa que a toxina teve uma dupla influência, reduziu o transporte de sódio em co-transporte e aumentou significativamente a  $R_{TE}$ .

A adição de glutamina sobre o íleo do grupo controle, que promoveu uma variação da  $i_{cc}$ , cujo acréscimo percentual foi de  $101,0 \pm 21,0\%$ , não é significativamente diferente da sua equivalente no jejuno, que foi de  $131,5 \pm 39,2\%$ . De forma análoga, ela variou a ddp, e assim como no jejuno, a variação da  $R_{TE}$  não é estatisticamente significativa. Estas comparações sugerem que a capacidade absorptiva de ambos os segmentos intestinais é muito semelhante no tocante a este aminoácido (AA).

Do ponto de vista prático e estatístico, a adição de glutamina ao íleo do grupo pré-incubado com toxina não provocou alterações na  $R_{TE}$  ( $1,5 \pm 6,8\%$ ) tanto que a  $\Delta R_{TE} = 1,0 \pm 2,9 \Omega \cdot cm^2$  não é significativo, enquanto que a variação da  $i_{cc}$  e da  $V_{TE}$  ( $38,7 \pm 10,1\%$  e  $44,7 \pm 12,1\%$ , respectivamente) são valores estatisticamente semelhantes, justificando assim o raciocínio empregado na dis-

cussão do substrato GLICOSE. Constata-se portanto que a presença da toxina no íleo reduziu substancialmente a absorção de glutamina, mesmo sem alterar a  $R_{TE}$ . Sumarizando, podemos afirmar que a presença de toxina, mais no íleo do que no jejuno, reduz a capacidade absorptiva, bem como tende a aumentar a  $R_{TE}$ , cujo reflexo é uma maior tendência de aumento da  $V_{TE}$ .

### 3. Ação da Alanina sobre Jejuno e Íleo

A alanina adicionada ao jejuno do grupo controle mostrou ser extremamente absorvível, visto que provocou um aumento na  $i_{cc}$  de  $154,9 \pm 16,9\%$ , ao mesmo tempo que elevou a  $V_{TE}$  em  $138,3 \pm 8,3\%$ , mas sem alterar a  $R_{TE}$  ( $\Delta R_{TE} = -0,6 \pm 2,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). Enquanto que no grupo pré-incubado com toxina, o aumento da  $R_{TE}$ , mesmos que pouco significativo, correspondeu a  $42,0 \pm 15,9\%$ , o qual, associado ao aumento de corrente de  $81,6 \pm 9,5\%$ , forneceu o percentual teórico de  $157,9\%$ , o qual é precisamente o acréscimo medido experimentalmente e cujo valor é  $157,4 \pm 29,2\%$ , que mais uma vez justifica que a presença de toxina aumenta a  $R_{TE}$  e reduz a  $i_{cc}$ .

No íleo do grupo controle, a adição de alanina é absorvida com uma taxa menor que no jejuno. O acréscimo na  $i_{cc}$  de  $73,9\%$ , com uma significância de  $p < 0,05$ , está razoavelmente afastada dos valores obtidos no jejuno, que são respectivamente de  $154,9\%$  e  $p < 0,01$ . Esta diferença de comportamento entre os dois segmentos do intestino já foi observada na discussão dos substratos GLICOSE e GLUTAMINA.

No íleo pré-incubado com toxina, a variação percentual da  $i_{cc}$  como consequência da adição de alanina foi de apenas  $17,4 \pm 4,9\%$ , além disso, as variações de  $V_{TE}$  e  $R_{TE}$  não foram estatisticamente significativas visto que seus desvios são muito grandes. Mesmo assim, se aplicarmos a propriedade da variação percentual de um produto, ela será inteiramente satisfeita, como se segue: a variação percentual encontrada para  $\Delta R_{TE}$  é de  $45,8 \pm 37,2\%$ , que associado aos

17,4% de  $\Delta i_{cc}$  nos fornece um  $\Delta V_{TE} = 71,2\%$ , enquanto que o valor encontrado com os dados experimentais da  $V_{TE}$  foi de  $71,3 \pm 38,0\%$ . Esta semelhança justifica o fato de que, mesmo com a grande dispersão e o pequeno número de amostras, os valores centrais (médios) demonstraram que a toxina agiu efetivamente no íleo, aumentando assim a  $R_{TE}$ , mas, sobretudo, não aumentando a  $i_{cc}$ , mostrando nitidamente o efeito bloqueador do co-transporte de substrato, que é mais acentuado no íleo do que no jejuno, como consequência da ação da toxina da cólera.

#### 4. Ação da Glicina sobre Jejuno e Íleo

A adição de glicina no jejuno do grupo controle fez com que a  $i_{cc}$  aumentasse continua e gradualmente, alcançando assim um acréscimo de 162% em relação ao valor basal concomitante à  $V_{TE}$ , a qual também aumentou de forma quase linear (224,3%) ao mesmo tempo que a resistência mostrou um discreto aumento (não significativo) somente na última dose, e que em termos percentuais, com relação ao valor basal, correspondeu a  $35,0 \pm 26,2\%$ ; estes valores mostram claramente que ocorre co-transporte glicina- $Na^+$  no jejuno normal. No entanto, quando observamos a curva de variação da  $i_{cc}$  para o grupo pré-incubado com toxina, constatou-se que não ocorreu variação significativa ( $7,1 \pm 13,5\%$ ) da  $i_{cc}$ , mas sim um muito significativo aumento ( $44,4 \pm 7,4\%$ ) da  $R_{TE}$ , que mesmo sendo significativo, seu valor médio foi de  $33,0 \pm 22,4\%$ . Estes valores demonstram que a diminuta absorção de  $Na^+$  em co-transporte com a glicina nos fragmentos pré-incubados com toxina serviu para alterar a  $R_{TE}$ , e conseqüentemente, a ddp ( $7,1 + 33,0 + 0,71 \cdot 3,3 = 42,4\%$ ), valor este extremamente semelhante ao obtido com os dados experimentais (44,4%) para a  $V_{TE}$ .

A adição de glicina no íleo do grupo controle produziu um aumento da  $i_{cc}$  de  $52,3 \pm 10,4\%$  acima do valor basal para este segmento intestinal. Valor este bastante inferior àquele observado no jejuno ( $162,0 \pm 46,8\%$ ). Estes valores corroboram os dados achados nos grupos anteriormente comentados. Em todos

eles, o acréscimo na  $i_{cc}$  é sempre menor no íleo que no jejuno. Apesar da  $R_{TE}$  ser completamente não significativa, seu valor médio central corresponde a um acréscimo de 8,9%, que associado aos 52,3% de variação da  $i_{cc}$ , corrobora o aumento de  $62,0 \pm 27,7\%$  na ddp (65,9%, valor teórico).

No grupo pré-incubado com toxina, a adição de glicina provocou uma variação desprezível da  $i_{cc}$  ( $3,1 \pm 10,1\%$ ) relativo ao valor basal, enquanto que a  $R_{TE}$  aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ), com um valor médio percentual de  $35,4 \pm 14,2\%$ . Estes valores são validados pelo cálculo teórico (39,6%) com o valor experimental medido (40,6%) para a  $V_{TE}$ . Os dados obtidos justificam o fato de que a presença da toxina de cólera reduz de forma mais acentuada a absorção de substrato no segmento intestinal distal (ÍLEO).

### **5. Ação da Alanil-Glutamina sobre Jejuno e Íleo**

A adição de alanil-glutamina ao jejuno do grupo controle produziu um incremento de 53,9% do valor basal deste segmento, e concomitantemente, um acréscimo não significativo da  $R_{TE}$ , porém, seu valor médio foi de 15,1% acima do basal. Estes dois valores justificam o acréscimo na ddp de 76,9%, mas surpreendentemente, a adição do di-peptídeo ao fragmento pré-incubado com toxina produziu um incremento na  $i_{cc}$  83,5% maior que a sua equivalente no grupo controle, enquanto que a  $R_{TE}$ , embora não estatisticamente significativa, sofreu uma pequena redução (-2,4%) em relação ao valor basal. Estes resultados divergem daqueles obtidos em todos os substratos anteriormente analisados. Glicose, glutamina, alanina e glicina sempre provocaram uma  $i_{cc}$  significativamente maior nos fragmentos de jejuno do grupo controle do que naqueles pré-incubados com toxina. Do mesmo modo, a  $R_{TE}$  sempre foi aumentada nas preparações pré-incubadas com toxina quando da adição de substratos.

Quando comparamos o incremento percentual causado pela adição de alanil-glutamina nas preparações pré-incubadas com toxina (que foi da ordem

de 60,2%) com aquele causado pela adição de glutamina na preparação homóloga (que foi de 34,6%) evidenciamos maior rendimento na absorção deste AA quando na forma de di-peptídeo. Considerando-se que o transporte de di-peptídeos nas células intestinais é promovido por transportadores  $H^+$ -dependentes, situados tanto nas membranas apicais quanto nas basolaterais (BRANDSCH *et al.*, 1994; THWAITES *et al.*, 1993a, 1993b), além desta dependência de um gradiente eletroquímico de  $H^+$ , o co-transportador PEPT1, já clonado e seqüenciado (LEIBACH & GANAPATHY, 1996), mostrou a existência de um sítio de fosforilação para uma quinase-A e outro para uma quinase-C. Como nas preparações pré-incubadas com toxina os níveis de AMPc estão muito elevados, e conseqüentemente as quinases-A foram ativadas, sugerimos que estes fatos possam ter influenciado no significativo aumento da  $i_{cc}$  em relação ao controle.

Os resultados experimentais nos mostraram que no íleo normal (grupo controle) a adição de substrato sempre provocou um acréscimo da  $i_{cc}$  menor do que aquele encontrado no jejuno: a glicose promoveu um aumento da  $i_{cc}$  no íleo 11,7% menor que a do jejuno, a glutamina foi 19,7% menor, a alanina 65,8%, e finalmente a glicina, que promoveu no íleo um acréscimo da  $i_{cc}$  35,5% menor que o aquele produzido com as mesmas doses no jejuno do grupo controle. Quando analisamos os dados obtidos após a adição de alanil-glutamina no íleo do grupo controle, constatou-se que a adição do di-peptídeo provocou um aumento na  $i_{cc}$  175% acima do acréscimo provocado no jejuno; fato este totalmente contrário ao observado para os demais substratos, que, como dito anteriormente, sempre tiveram valores menores que os obtidos no jejuno do grupo controle. A  $R_{TE}$  não variou ( $\Delta R_{TE} = -0,2 \pm 1,6$ ), e embora não sendo significativa, pode-se dizer que há uma tendência de redução, enquanto que a  $V_{TE}$  sofreu um acréscimo compatível com aquele da  $i_{cc}$ .

No segmento distal (íleo) pré-incubado com toxina, o incremento causado na  $i_{cc}$  pela adição do di-peptídeo ( $31,4 \pm 9,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), embora menor do que aquele observado no grupo controle do íleo, foi semelhante ao incremento causado no jejuno do grupo pré-incubado com toxina ( $37,8 \pm 7,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), e ainda semelhante àquele observado quando da adição de GLUTAMINA neste mesmo grupo ( $30,8 \pm 10,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Na ddp, o acréscimo foi significativo e coerente com aquele visto na  $i_{cc}$ , ao mesmo tempo que a  $R_{TE}$  não variou.

## 6. Curvas de Significância

Tendo em vista que as doses cumulativas foram pequenas, de maneira que não houve o desenvolvimento completo das curvas dose-resposta, as quais se limitaram apenas ao segmento inicial das mesmas, optamos pela obtenção de uma equação que melhor representasse este trecho do conjunto de dados. A observação das formas das curvas obtidas nos levou a crer que neste intervalo ocorria um crescimento tipo exponencial, ou seja: a taxa de variação da variável dependente (no caso  $i_{cc}$ ) em função da variação da variável independente (no caso DOSE) é proporcional a um valor inicial da  $i_{cc}$ , expressando-se de forma simbólica como:

$$\frac{dy}{dx} \propto y_0 \quad (\text{I}) \longrightarrow \frac{dy}{dx} = ky_0 \quad (\text{II}) \longrightarrow k = \frac{dy}{dx} / y_0 \quad (\text{III})$$

Onde:

$dy/dx$  representa a razão entre o incremento infinitesimal da variável dependente  $y$  e a correspondente variação infinitesimal da variável independente  $x$ .

$y_0$  representa o valor inicial da variável dependente ( $y$ ), no nosso caso  $i_{cc0}$ .

$x$  representa a variável independente, que no nosso caso é o valor da dose aplicada.

$k$  representa a constante de proporcionalidade, cuja dimensão é a recíproca da unidade de  $y$ .

Rearranjando-se a equação (II) e integrando-se entre os limites que serão  $y_0$  correspondendo a uma dose 0 (zero) até valores genéricos  $y_x$  e dose ( $x$ ), teríamos:

$$\int_{y_0}^{y_x} \frac{dy}{y} = \int_{x=0}^x k dx \longrightarrow \ln \frac{y_x}{y_0} = kx \longrightarrow y_x = y_0 e^{kx} \quad (\text{IV})$$

Utilizando-se programas estatísticos que realizem, sobre um conjunto de dados, uma regressão não-linear que melhor se adeque à equação (IV), obteremos os melhores valores de  $y$  e  $k$ .

Se tomarmos como exemplo o substrato GLICOSE e o grupo pré-incubado com toxina, teremos, de acordo com o exposto acima, a seguinte equação:

$$y = 81e^{149,2x} \quad (\text{V}), \text{ onde: } y \equiv i_{cc} \text{ e } x \equiv \text{dose adicionada cumulativamente}$$

O conjunto de dados fornecido pela Tabela 4 dos Resultados mostra que para a dose  $x = 0$ , a  $i_{cc0} = 83,7 \pm 11,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , enquanto que para a dose  $x = 1,66 \times 10^{-3} \text{ M}$  o valor da  $i_{cc}$  foi de  $104,6 \pm 12,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . A substituição destes valores de  $x$  na equação (V) fornece para  $y$  ( $i_{cc}$ ) os valores da  $i_{cc0} = 81,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  e  $103,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Estes resultados mostram que a equação (V) de fato representa o comportamento da variável dependente nesta faixa de variação da variável independente DOSE.

Com a finalidade de comparar a potencialidade de absorção de cada um dos substratos testados neste trabalho de uma forma mais precisa e elegante que aquela de apenas comparar o nível de significância estatística entre os  $\Delta i_{cc}$  obtidos com a adição dos respectivos substratos, determinamos para os grupos pré-incubados com toxina, tanto no jejuno como no íleo, as equações de crescimento exponencial, de forma que, pela comparação de suas constantes de proporcionalidade (k), possamos avaliar, dentre os substratos empregados, quais oferecem melhor taxa de absorção ( $\Delta i_{cc}$ ), o que pode ser visto na tabela abaixo:

**Tabela 14 – Equações de Tendência**

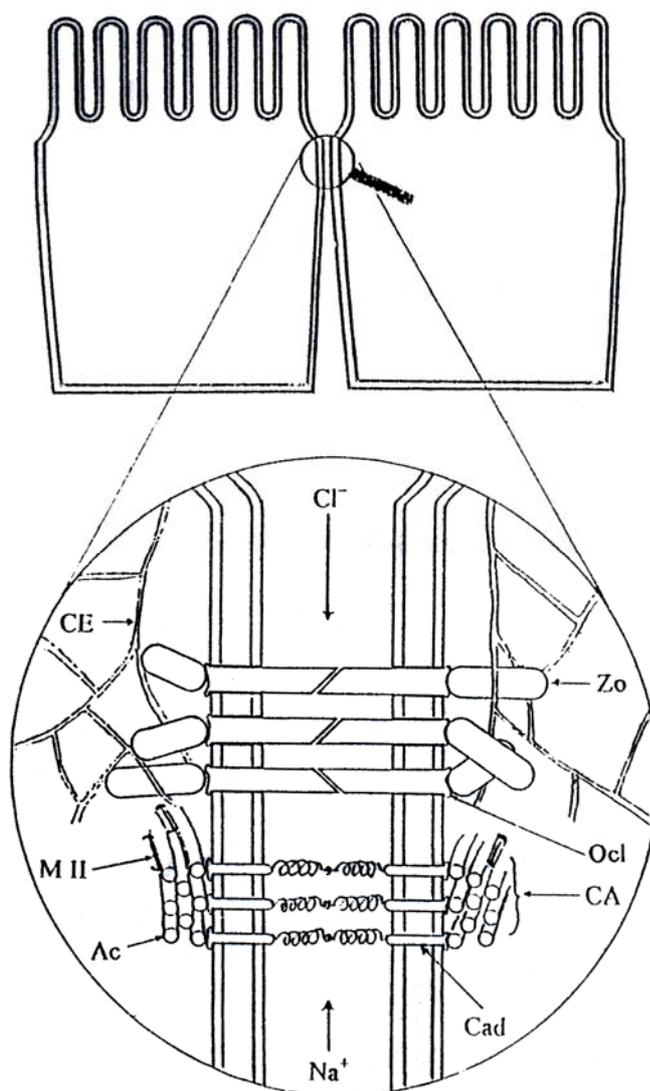
| <b>Substrato</b> | <b>JEJUNO + Toxina (Função)</b> | <b>ÍLEO + Toxina (Função)</b> |
|------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Glicose          | $y = 81,0e^{149,2x}$            | $y = 106,5e^{57,7x}$          |
| Glutamina        | $y = 82,0e^{213,7x}$            | $y = 75,2e^{209,5x}$          |
| Alanina          | $y = 68,8e^{287,7x}$            | $y = 119,6e^{67,9x}$          |
| Glicina          | $y = 84,0e^{22,9x}$             | $y = 114,0e^{-14,09x}$        |
| Alanil-glutamina | $y = 73,0e^{313,1x}$            | $y = 88,3e^{183,5x}$          |

Observando-se as equações acima, constatamos que dentre os substratos de absorção  $\text{Na}^+$ -dependentes, o AA ALANINA possui o maior k, ou seja, a melhor taxa de absorção como função da dose ( $k = 287,7 \text{ M}^{-1}$ ) para o segmento intestinal jejuno, seguido de perto pela GLUTAMINA, com um  $k = 213,7 \text{ M}^{-1}$ . No entanto, o di-peptídeo ALANIL-GLUTAMINA sobrepuja estes dois AA com um  $k = 313,1 \text{ M}^{-1}$ , cerca de 10% acima do valor da ALANINA. No segmento ileal pré-incubado com toxina, os substratos  $\text{Na}^+$ -dependentes são de longe sobrepujados pela GLUTAMINA ( $k = 209,5 \text{ M}^{-1}$ ), enquanto que o di-peptídeo apresentou um  $k = 183,5 \text{ M}^{-1}$ , que é apenas 14% menor que o da GLUTAMINA.

Sumarizando o exposto na Tabela 14 acima, concluímos que, dentre os substratos de absorção  $\text{Na}^+$ -dependentes, a GLUTAMINA oferece a maior tendência à absorção, mas o di-peptídeo com um valor de k 47% maior no jejuno e

apenas 14% menor no íleo do que a GLUTAMINA, justifica a conservação dentro do processo evolucionário deste mecanismo ancestral de co-transporte próton-dependente, garantindo que, mesmo na eventual não-expressão gênica de co-transportadores  $\text{Na}^+$ -dependentes, AA podem ainda de forma satisfatória serem absorvidos a partir de uma dieta contendo proteínas integrais.

Considerando-se que, quando da adição de substratos de absorção sódio-dependentes, particularmente nas preparações pré-incubados com toxina, ocorreu um significativo aumento da  $R_{\text{TE}}$ . Sugerimos que este aumento seja decorrente de alterações ocorridas na região da *zonulae ocludens*, em consonância com as observações citadas por Turner e cols. (2000), e cujo modelo por nós proposto esta esquematizado na Figura 49 a seguir.



**Figura 49 – Modelo de Regulação da Resistência Paracelular**

A figura acima mostra a região do *zonulae ocludens* e cinto de adesão. A primeira é constituída pelas proteínas transmembrana OCLUDINAS (Ocl) e pelas proteínas periféricas ZO-1 e ZO-2 (Zo). O cinto de adesão (CA) é constituído por FILAMENTOS DE ACTINA (Ac) aos quais estão aderidos pares de moléculas de MIOSINA tipo II (MII). O feixe de filamentos de actina interage com as proteínas transmembrana ancoradas às CADERINAS (Cad). A fosforilação da miosina II promove a contração dos filamentos de actina que, funcionando como um esfíncter, tende a abrir o espaço paracelular, facilitando a passagem de íons do espaço basolateral para o lúmen, ou vice-versa, o que é equivalente a reduzir a resistência paracelular. CE significa cito-esqueleto.

## CONCLUSÕES

- 1) A diferença de potencial transepitelial ( $V_{TE}$ ) no íleo distal normal é maior que no jejuno proximal;
- 2) A inoculação com toxina de cólera aumentou exageradamente esta diferença de potencial, ultrapassando a 100% no jejuno e a 80% no íleo;
- 3) A corrente de curto-circuito ( $i_{cc}$ ) no íleo distal é maior que no jejuno proximal;
- 4) A inoculação com toxina de cólera aumentou esta corrente em mais de 80% no jejuno assim como no íleo;
- 5) A inoculação com toxina de cólera aumentou significativamente a resistência transepitelial ( $R_{TE}$ ) no jejuno mas não no íleo;
- 6) A adição de substratos de absorção sódio-dependente ou próton-dependente ao lado mucoso das preparações, tanto do jejuno como do íleo, sempre promove aumento da  $V_{TE}$ ;
- 7) A adição de substratos de absorção sódio-dependentes ao lado mucoso das preparações, tanto do jejuno como do íleo, promoveu uma aumento significativo, ou pelo menos uma nítida tendência de aumento, da  $R_{TE}$ ;
- 8) A adição do di-peptídeo de absorção próton-dependente alanil-glutamina ao lado mucoso das preparações, tanto do jejuno como do íleo, tanto nos grupos controles como nos pré-tratados com toxina, promoveu incrementos desprezíveis (absolutamente não-significativos) ou forte tendência de redução da  $R_{TE}$ ;
- 9) Sempre que a  $R_{TE}$  tende a aumentar em função da absorção de um substrato, a  $V_{TE}$  tende a aumentar simultaneamente, e a  $i_{cc}$  a reduzir, mas de forma que a relação percentual de acréscimos e decréscimos obedeça a lei de Ohm;
- 10) Como explicação para o aumento da  $R_{TE}$  observado no lado mucoso das preparações pré-tratadas com toxina de cólera, sugerimos que esta toxina

possivelmente influencia o estado da JUNÇÃO DENSA e CINTO DE ADESÃO no sentido de reduzir a mobilidade do  $\text{Na}^+$ , dificultando assim o contra-fluxo SEROSO-MUCOSO deste íon; e

- 11) O di-peptídeo alanil-glutamina, por sua alta tendência de absorção ao longo do intestino delgado, aliado à sua maior estabilidade e importância nutricional, é um componente que deve ser avaliado *in vivo* na composição de soluções para terapias de reidratação oral.

**BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

ABELY, M.; DALLET, P.; BOISSET, M.; DESJEUX, J. F. Effect of cholera toxin on glutamine metabolism and transport in rabbit ileum. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 278, n. 5, p. G789-G796, 2000.

ADIBI, S. A. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. **J. Clin. Invest.**, v. 50, n. 11, p. 2266-2275, 1971.

ATISOOK, K.; CARLSON, S.; MADARA, J. L. Effects of phlorizin and sodium on glucose-elicited alterations of cell junctions in intestinal epithelia. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. C77-C85, 1990.

AUSTGEN, T. R.; CHEN, M. K.; FLYNN, T. C.; SOUBA, W. W. The effects of endotoxin on the splanchnic metabolism of glutamine and related substrates. **J. Trauma**, v. 31, n. 6, p. 742-751, 1991.

BARROS, F. C.; VICTORIA, C. G.; FORSBERG, B.; MARANHÃO, A. G.; STEGEMAN, M.; GONZALEZ-RICHMOND, A.; MARTINS, R. M.; NEUMAN, Z. A.; MCAULIFFE, J.; BRANCO, J. A. Jr. Management of childhood diarrhoea at the household level: a population-based survey in north-east Brazil. **Bull. World Health Organ.**, v. 69, n. 1, p. 59-65, 1991.

BERGSTROM, J.; FURST, P.; NOREE, L. O.; VINNARS, E. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. **J. Appl. Physiol.**, v. 36, n. 6, p. 693-697, 1974.

BOLL, M.; MARKOVICH, D.; WEBER, W. M.; KORTE, H.; DANIEL, H.; MURER, H. Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides, beta-lactam antibiotics and ACE-inhibitors. **Pflugers Arch.**, v. 429, n. 1, p. 146-149, 1994.

BRANDSCH, M.; MIYAMOTO, Y.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F. H. Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/H<sup>+</sup> co-transport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line. **Biochem. J.**, v. 299, p. 253-260, 1994.

BRANT, S. R.; YUN, C. H.; DONOWITZ, M.; TSE, C. M. Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na<sup>+</sup>/N<sup>+</sup> exchanger isoform, NHE3. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. C198-C206, 1995.

BURKE, D. J.; ALVERDY, J. C.; AOYS, E.; MOSS, G. S. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves gut immune function. **Arch. Surg.**, v. 124, n. 12, p. 1396-1399, 1989.

CASH, R. A.; FORREST, J. N.; NALIN, D. R.; ABRUTYN, E. Rapid correction of acidosis and dehydration of cholera with oral electrolyte and glucose solution. **Lancet**, v. 2, p. 549-550, 1970.

CASSEL, D.; SELINGER, Z. Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, n. 8, p. 3307-3311, 1977.

CASTAGNA, M.; SHAYAKUL, C.; TROTTI, D.; SACCHI, V. F.; HARVEY, W. R.; HEDIGER, M. A. Molecular characteristics of mammalian and insect

amino acid transporters: implications for amino acid homeostasis. **J. Exp. Biol.**, v. 200, p. 269-286, 1997.

CERMAK, R.; FOLLMER, U.; WOLFFRAM, S. Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. G1166-G1172, 1998.

CHAPPE, V.; METTEY, Y.; VIERFOND, J. M.; HANRAHAN, J. W.; GOLLA, M.; VERRIER, B.; BECQ, F. Structural basis for specificity and potency of xanthine derivatives as activators of the CFTR chloride channel. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, n. 4, p. 683-693, 1998.

CHRISTENSEN, H. N. On the development of amino acid transport systems. **Fed. Proc.**, v. 32, n. 1, p. 19-28, 1973.

CLEARY, T. G.; CLEARY, K. R.; DUPONT, H. L.; EL-MALIH, G. S.; KORDY, M. I.; MOHIELDIN, M. S.; SHOUKRY, I.; SHUKRY, S.; WYATT, R. G.; WOODWARD, W. E. The relationship of oral rehydration solution to hypernatremia in infantile diarrhea. **J. Pediatr.**, v. 99, n. 5, p. 739-741, 1981.

CLOSS, E. I.; ALBRITTON, L. M.; KIM, J. W.; CUNNINGHAM, J. M. Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 10, p. 7538-7544, 1993.

CROWSON, M. S.; SHULL, G. E. Isolation and characterization of a cDNA encoding the putative distal colon H<sup>+</sup>, K(+)-ATPase. Similarity of deduced amino acid sequence to gastric H<sup>+</sup>, K(+)-ATPase and Na<sup>+</sup>, K(+)-ATPase and

mRNA expression in distal colon, kidney, and uterus. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 19, p. 13740-13748, 1992.

CUNNINGHAM, D.; MORGAN, R. J.; MILLS, P. R.; NELSON, L. M.; TONER, P. G.; SOUKOP, M.; MCARDLE, C. S.; RUSSELL, R. I. Functional and structural changes of the human proximal small intestine after cytotoxic therapy. **J. Clin. Pathol.**, v. 38, n. 3, p. 265-270, 1985.

DE WOLF, M. J.; FRIDKIN, M.; KOHN, L. D. Tryptophan residues of cholera toxin and its A and B protomers. Intrinsic fluorescence and solute quenching upon interacting with the ganglioside GM1, oligo-GM1, or dansylated oligo-GM1. **J. Biol. Chem.**, v. 256, n. 11, p. 5489-5496, 1981.

DE, S. N.; CHATTERJE, D. N. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. **J. Path. Bact.**, v. 66, p. 559-562, 1953.

DHARMSATHAPHORN, K.; MANDEL, K. G.; MASUI, H.; McROBERTS, J. A. Vasoactive intestinal polypeptide-induced chloride secretion by a colonic epithelial cell line. Direct participation of a basolaterally localized  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  cotransport system. **J. Clin. Invest.**, v. 75, n. 2, p. 462-471, 1985.

DORING, F.; WILL, J.; AMASHEH, S.; CLAUSS, W.; AHLBRECHT, H.; DANIEL, H. Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 36, p. 23211-23218, 1998.

ELLERBROCK, T. V. Oral replacement therapy in rural Bangladesh with home ingredients. **Trop. Doct.**, v. 11, n. 4, p. 179-183, 1981.

FARQUHAR, M. G.; PALADE, G. E. Junctional complexes in various epithelia. **J. Cell Biol.**, v. 17, p. 375-412, 1963.

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, n. 12, p. 5242-5246, 1991.

FEI, Y. J.; KANAI, Y.; NUSSBERGER, S.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F. H.; ROMERO, M. F.; SINGH, S. K.; BORON, W. F.; HEDIGER, M. A. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. **Nature**, v. 368, p. 563-566, 1994.

FERRARIS, R. P.; VILLENAS, S. A.; DIAMOND, J. Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. G1047-G1059, 1992a.

FERRARIS, R. P.; VILLENAS, S. A.; HIRAYAMA, B. A.; DIAMOND, J. Effect of diet on glucose transporter site density along the intestinal crypt-villus axis. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. G1060-G1068, 1992b.

FIELD, M. Intestinal secretion: effect of cyclic AMP and its role in cholera. **N. Engl. J. Med.**, v. 284, p. 1137-1144, 1971a.

\_\_\_\_\_. Ion transport in rabbit ileal mucosa. II. Effects of cyclic 3', 5'-AMP. **Am. J. Physiol.**, v. 221, n. 4, p. 992-997, 1971b.

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, n. 5, p. 1388-1396, 1971.

FIELD, M.; RAO, M. C.; CHANG, E. B. Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease (1). **N. Engl. J. Med.**, v. 321, n. 12, p. 800-806, 1989.

FINKELSTEIN, R. A.; LoSPALLUTO, J. J. Pathogenesis of experimental cholera. Preparation and isolation of cholera toxin and cholera toxinogen. **J. Exp. Med.**, v. 130, n. 1, p. 185-202, 1969.

FORTE, L. R.; THORNE, P. K.; EBER, S. L.; KRAUSE, W. J.; FREEMAN, R. H.; FRANCIS, S. H.; CORBIN, J. D. Stimulation of intestinal Cl<sup>-</sup> transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. C607-C615, 1992.

FOX, A. D.; KRIPKE, S. A.; BERMAN, J. M. *et al.* Reduction of the severity of enterocolitis by glutamine-supplemented enteral diets. **Sur. Forum**, v. 38, p. 43-44, 1987.

FOX, A. D.; KRIPKE, S. A.; DE PAULA, J.; BERMAN, J. M.; SETTLE, R. G.; ROMBEAU, J. L. Effect of a glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolitis. **JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.**, v. 12, n. 4, p. 325-331, 1988.

FREEMAN, T. C.; BENTSEN, B. S.; THWAITES, D. T.; SIMMONS, N. L. H<sup>+</sup>/di-tripeptide transporter (PepT1) expression in the rabbit intestine. **Pflugers Arch.**, v. 430, n. 3, p. 394-400, 1995.

FRIZZELL, R. A.; KOCH, M. J.; SCHULTZ, S. G. Ion transport by rabbit colon. I. Active and passive components. **J. Membr. Biol.**, v. 27, n. 3, p. 297-316, 1976.

GANAPATHY, M. E.; BRANDSCH, M.; PRASAD, P. D.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F. H. Differential recognition of beta-lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT1 and PEPT2. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 43, p. 25672-25677, 1995.

GARTY, H.; BENOS, D. J. Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na<sup>+</sup> channel. **Physiol. Rev.**, v. 68, n. 2, p. 309-373, 1988.

GORBACH, S. L. Treating diarrhoea. **BMJ**, v. 314, p. 1776-1777, 1997.

GUERRANT, R. L.; BOBAK, D. A. Bacterial and protozoal gastroenteritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, n. 5, p. 327-340, 1991.

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 cell cytoskeletal responses to cholera toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, n. 20, 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.; 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. Infect. Dis.**, v. 32, n. 3, p. 331-351, 2001.

GUERRANT, R. L.; WANKE, C. A.; PENNIE, R. A.; BARRETT, L. J.; LIMA, A. A.; O'BRIEN, A. D. Production of a unique cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. **Infect. Immun.**, v. 55, n. 10, p. 2526-2530, 1987.

GUMBINER, B. M. Breaking through the tight junction barrier. **J. Cell Biol.**, v. 123, p. 1631-1633, 1993.

\_\_\_\_\_. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. **Am. J. Physiol.**, v. 253, p. C749-C758, 1987.

GUSTIN, M. C.; GOODMAN, D. B. Isolation of brush-border membrane from the rabbit descending colon epithelium. Partial characterization of a unique K<sup>+</sup>-activated ATPase. **J. Biol. Chem.**, v. 256, n. 20, p. 10651-10656, 1981.

HALM, D. R.; FRIZZELL, R. A. Active K transport across rabbit distal colon: relation to Na absorption and Cl secretion. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. C252-C267, 1986.

HEDIGER, M. A.; COADY, M. J.; IKEDA, T. S.; WRIGHT, E. M. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter. **Nature**, v. 330, p. 379-381, 1987.

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, n. 4, p. 176-181, 1968.

HO, M.S.; GLASS, R. I.; PINSKY, P. F.; ANDERSON, L. J. Rotavirus as a cause of diarrheal morbidity and mortality in the United States. **J. Infect. Dis.**, v. 158, n. 5, p. 1112-1116, 1988.

HWANG, E. S.; HIRAYAMA, B. A.; WRIGHT, E. M. Distribution of the SGLT1 Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter and mRNA along the crypt-villus axis of rabbit small intestine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 181, n. 3, p. 1208-1217, 1991.

ILLIG, K. A.; RYAN, C. K.; HARDY, D. J.; RHODES, J.; LOCKE, W.; SAX, H. C. Total parenteral nutrition-induced changes in gut mucosal function: atrophy alone is not the issue. **Surgery**, v. 112, n. 4, p. 631-637, 1992.

JESAITIS, L. A.; GOODENOUGH, D. A. Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. **J. Cell Biol.**, v. 124, n. 6, p. 949-961, 1994.

JOHNSON, L. R. **Gastrointestinal Physiology**. 5.ed., St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc., 1997. Fluid and electrolyte absorption, p. 135-145.

KAHN, R. A.; GILMAN, A. G. ADP-ribosylation of Gs promotes the dissociation of its alpha and beta subunits. **J. Biol. Chem.**, v. 259, n. 10, p. 6235-6240, 1984.

KANAI, Y.; HEDIGER, M. A. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. **Nature**, v. 360, p. 467-471, 1992.

KANAI, Y.; SEGAWA, H.; MIYAMOTO, K.; UCHINO, H.; TAKEDA, E.; ENDOU, H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 37, p. 23629-23632, 1998.

KASIMIR, S.; SCHONFELD, W.; ALOUF, J. E.; KONIG, W. Effect of *Staphylococcus aureus* delta-toxin on human granulocyte functions and platelet-activating-factor metabolism. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 6, p. 1653-1659, 1990.

KIMBERG, 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, n. 6, p. 1218-1230, 1971.

KING, C. A.; VAN HEYNINGEN, W. E. Deactivation of cholera toxin by a sialidase-resistant monosialosylganglioside. **J. Infect. Dis.**, v. 127, n. 6, p. 639-647, 1973.

KLIMBERG, V. S.; SALLOUM, R. M.; KASPER, M.; PLUMLEY, D. A.; DOLSON, D. J.; HAUTAMAKI, R. D.; MENDENHALL, W. R.; BOVA, F. C.; BLAND, K. I.; COPELAND, E. M. 3rd *et al.* Oral glutamine accelerates healing of the small intestine and improves outcome after whole abdominal radiation. **Arch. Surg.**, v. 125, n. 8, p. 1040-1045, 1990.

KNICKELBEIN, R. G.; ARONSON, P. S.; DOBBINS, J. W. Membrane distribution of sodium-hydrogen and chloride-bicarbonate exchangers in crypt and villus cell membranes from rabbit ileum. **J. Clin. Invest.**, v. 82, n. 6, p. 2158-2163, 1988.

KNICKELBEIN, R.; ARONSON, P. S.; ATHERTON, W.; DOBBINS, J. W. Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. I. Evidence for Na-H exchange. **Am. J. Physiol.**, v. 245, n. 4, p. G504-G510, 1983.

LACAZ-VIEIRA, F.; SANIOTO, S. M. L. Transporte em pele de anfíbio. In: LACAZ-VIEIRA, F.; MALNIC, F. (eds.). **Biofísica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1981. p. 129-179

LANEY, D. W. Jr.; COHEN, M. B. Approach to the pediatric patient with diarrhea. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 22, n. 3, p. 499-516, 1993.

LEIBACH, F. H.; GANAPATHY, V. Peptide transporters in the intestine and the kidney. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 16, p. 99-119, 1996.

LENCER, W. I.; DE ALMEIDA, J. B.; MOE, S.; STOW, J. L.; AUSIELLO, D. A.; MADARA, J. L. Entry of cholera toxin into polarized human intestinal

epithelial cells. Identification of an early brefeldin A sensitive event required for A1-peptide generation. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. 6, p. 2941-2951, 1993.

LENCER, W. I.; DELP, C.; NEUTRA, M. R.; MADARA, J. L. Mechanism of cholera toxin action on a polarized human intestinal epithelial cell line: role of vesicular traffic. **J. Cell Biol.**, v. 117, n. 6, p. 1197-1209, 1992.

LI, J.; LANGKAMP-HENKEN, B.; SUZUKI, K.; STAHLGREN, L. H. Glutamine prevents parenteral nutrition-induced increases in intestinal permeability. **JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.**, v. 18, n. 4, p. 303-307, 1994.

LIANG, R.; FEI, Y. J.; PRASAD, P. D.; RAMAMOORTHY, S.; HAN, H.; YANG-FENG, T. L.; HEDIGER, M. A.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F. H. Human intestinal H<sup>+</sup>/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 12, p. 6456-6463, 1995.

LIFSHITZ, F.; COELLO-RAMIREZ, P.; GUTIERREZ-TOPETE, G.; CORNADO-CORNET, M. C. Carbohydrate intolerance in infants with diarrhea. **J. Pediatr.**, v. 79, n. 5, p. 760-767, 1971.

LIMA, A. A.; MOORE, S. R.; BARBOZA, M. S. Jr.; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; NATARO, J. P.; FEDORKO, D. P.; WUHIB, T.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 181, n. 5, p. 1643-1651, 2000.

LIMA, A. A.; SOARES, A. M.; FREIRE JUNIOR, J. E., GUERRANT, R. L. Cotransport of sodium with glutamine, alanine and glucose in the isolated rabbit ileal mucosa. **Braz. J. Med .Biol. Res.**, v. 25, n. 6, p. 637-640, 1992.

LIU, W.; LIANG, R.; RAMAMOORTHY, S.; FEI, Y. J.; GANAPATHY, M. E.; HEDIGER, M. A.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F. H. Molecular cloning of PEPT2, a new member of the H<sup>+</sup>/peptide cotransporter family, from human kidney. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1235, n. 2, p. 461-466, 1995.

LONDON, E. How bacterial protein toxins enter cells; the role of partial unfolding in membrane translocation. **Mol. Microbiol.**, v. 6, n. 22, p. 3277-3282, 1992.

MacLEOD, R. J.; HAMILTON, J. R. Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange is required for regulatory volume decrease after modest “physiological” volume increases in jejunal villus epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 38, p. 23138-23145, 1996.

\_\_\_\_\_. Volume regulation initiated by Na(+)-nutrient cotransport in isolated mammalian villus enterocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. G26-G33, 1991.

MADARA, J. L. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 60, p. 143-159, 1998.

MADARA, J. L.; MOORE, R.; CARLSON, S. Alteration of intestinal tight junction structure and permeability by cytoskeletal contraction. **Am. J. Physiol.**, v. 253, p. C854-C861, 1987.

MADARA, J. L.; PAPPENHEIMER, J. R. Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. **J. Membr. Biol.**, v. 100, n. 2, p. 149-164, 1987.

MADARA, J. L.; PARKOS, C.; COLGAN, S.; NUSRAT, A.; ATISOOK, K.; KAOUTZANI, P. The movement of solutes and cells across tight junctions. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 664, p. 47-60, 1992.

MAHALANABIS, D.; CHOUDHURI, A. B.; BAGCHI, N. G.; BHATTACHARYA, A. K.; SIMPSON, T. W. Oral fluid therapy of cholera among Bangladesh refugees. **Johns Hopkins Med. J.**, v. 132, n. 4, p. 197-205, 1973.

MAILLIARD, M. E.; STEVENS, B. R.; MANN, G. E. Amino acid transport by small intestinal, hepatic, and pancreatic epithelia. **Gastroenterology**, v. 108, n. 3, p. 888-910, 1995.

MARLISS, E. B.; AOKI, T. T.; POZEFSKY, T.; MOST, A. S.; CAHILL, G. F. Jr. Muscle and splanchnic glutamine and glutamate metabolism in post absorptive and starved man. **J. Clin. Invest.**, v. 50, n. 4, p. 814-817, 1971.

McANENA, O. J.; HARVEY, L. P.; BONAUI, R. A.; DALY, J. M. Alteration of methotrexate toxicity in rats by manipulation of dietary components. **Gastroenterology**, v. 92, n. 2, p. 354-360, 1987.

MEREDITH, D.; BOYD, C. A. Structure and function of eukaryotic peptide transporters. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 57, n. 5, p. 754-778, 2000.

MIRCHEFF, A. K.; VAN OS, C. H.; WRIGHT, E. M. Pathways for alanine transport in intestinal basal lateral membrane vesicles. **J. Membr. Biol.**, v. 52, n. 1, p. 83-92, 1980.

MONTEIRO, H. S. A.; LIMA, A. A. M.; FONTELES M. C. Glomerular effects of cholera toxin in isolated perfused rat kidney: a potential role for platelet activating factor. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 85, n. 3, p. 105-110, 1999.

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

MUNCK, L. K.; MUNCK, B. G. The rabbit jejunal "imino carrier" and the ileal "imino acid carrier" describe the same epithelial function. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1116, n. 2, p. 91-96, 1992.

NUSRAT, A.; PARKOS, C. A.; VERKADE, P.; FOLEY, C. S.; LIANG, T. W.; INNIS-WHITEHOUSE, W.; EASTBURN, K. K.; MADARA, J. L. Tight junctions are membrane microdomains. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 1771-1781, 2000.

O'DWYER, S. T.; SMITH, R. J.; HWANG, T. L.; WILMORE, D. W. Maintenance of small bowel mucosa with glutamine-enriched parenteral nutrition. **JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.**, v. 13, n. 6, p. 579-585, 1989.

O'GRADY, S. M.; PALFREY, H. C.; FIELD, M. Characteristics and functions of Na-K-Cl cotransport in epithelial tissues. **Am. J. Physiol.**, v. 253, p. C177-C192, 1987.

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, n. 3, p. 774-779, 1979.

PHILLIPS, R. A. Water and electrolyte losses in cholera. **Fed. Proc.**, v. 23, p. 705-718, 1964.

PIERCE, N. F. Differential inhibitory effects of cholera toxoids and ganglioside on the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. **J. Exp. Med.**, v. 137, n. 4, p. 1009-1023, 1973.

PIERCE, N. F.; BANWELL, J. G.; RUPAK, D. M.; MITRA, R. C.; CARANASOS, G. J.; KEIMOWITZ, R. I.; MONDAL, A.; MANJI, P. M. Effect of intragastric glucose-electrolyte infusion upon water and electrolyte balance in Asiatic cholera. **Gastroenterology**, v. 55, n. 3, p. 333-143, 1968.

POWELL, D. W.; SZAUTER, K. E. Nonantibiotic therapy and pharmacotherapy of acute infectious diarrhea. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 22, n. 3, p. 683-707, 1993.

SCHEIFELE, D. W. Role of bacterial toxins in neonatal necrotizing enterocolitis. **J. Pediatr.**, v. 117, p. S44-S46, 1990.

SCHULTZ, S. G.; ZALUSKY, R. The interaction between active sodium and active sugar transports. **J. Gen. Physiol.**, v. 47, p. 1043-1059, 1964.

SEAL, C. J.; PARKER, D. S. Isolation and characterization of circulating low molecular weight peptides in steer, sheep and rat portal and peripheral blood. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 99, n. 3, p. 679-685, 1991.

SEGAWA, H.; FUKASAWA, Y.; MIYAMOTO, K.; TAKEDA, E.; ENDOU, H.; KANAI, Y. Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 28, p. 19745-19751, 1999.

SHARP, G. W.; HYNIE, S. Stimulation of intestinal adenyl cyclase by cholera toxin. **Nature**, v. 229, p. 266-269, 1971.

SHOROFSKY, S. R.; FIELD, M.; FOZZARD, H. A. Electrophysiology of Cl secretion in canine trachea. **J. Membr. Biol.**, v. 72, n. 1-2, p. 105-115, 1983.

SILVA, A. C.; SANTOS-NETO, M. S.; SOARES, A. M.; FONTELES, M. C.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. 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. Nutr.**, v. 26, n. 5, p. 513-519, 1998.

SIXMA, T. K.; PRONK, S. E.; KALK, K. H.; VAN ZANTEN, B. A.; BERGHUIS, A. M.; HOL, W. G. Lactose binding to heat-labile enterotoxin revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 355, p. 561-564, 1992.

SIXMA, T. K.; PRONK, S. E.; KALK, K. H.; WARTNA, E. S.; VAN ZANTEN, B. A.; WITHOLT, B.; HOL, W. G. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. **Nature**, v. 351, p. 371-377, 1991.

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

SOARES, A. M.; FREIRE JUNIOR, J. E.; LIMA, A. A. Mathematical dose-response model for sodium cotransport with glucose and glutamine in the rabbit ileal mucosa. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 25, n. 11, p. 1141-1144, 1992.

\_\_\_\_\_. Transport of glutamine, alanine and glucose by rabbit intestinal membrane. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, n. 1, p. 111-113, 1991.

SOUBA, W. W. Intestinal glutamine metabolism and nutrition. **J. Nutr. Biochem.**, v. 4, p. 2-9, 1993.

SOUBA, W. W.; HERSKOWITZ, K.; KLIMBERG, V. S.; SALLOUM, R. M.; PLUMLEY, D. A.; FLYNN, T. C.; COPELAND, E. M. 3rd. The effects of sepsis and endotoxemia on gut glutamine metabolism. **Ann. Surg.**, v. 211, n. 5, p. 543-549, 1990;

SOUBA, W. W.; SMITH, R. J.; WILMORE, D. W. Glutamine metabolism by the intestinal tract. **JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.**, v. 9, n. 5, p. 608-617, 1985.

STEVENS, B. R. Vertebrate intestine apical membrane mechanisms of organic nutrient transport. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. R458-R463, 1992.

STEVENS, B. R.; FERNANDEZ, A.; HIRAYAMA, B.; WRIGHT, E. M.; KEMPNER, E. S. Intestinal brush border membrane Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter

functions in situ as a homotetramer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, n. 4, p. 1456-1460, 1990.

STEVENSON, B. R.; SILICIANO, J. D.; MOOSEKER, M. S.; GOODE-NOUGH, D. A. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (*zonula occludens*) in a variety of epithelia. **J. Cell Biol.**, v. 103, n. 3, p. 755-766, 1986.

STIRLING, C. E. High-resolution radioautography of phlorizin-3H in rings of hamster intestine. **J. Cell Biol.**, v. 35, n. 3, p. 605-618, 1967.

STIRLING, C. E.; KINTER, W. B. High-resolution radioautography of galactose-3H accumulation in rings of hamster intestine. **J. Cell Biol.**, v. 35, n. 3, p. 585-604, 1967.

TAKATA, K.; KASAHARA, T.; KASAHARA, M.; EZAKI, O.; HIRANO, H. Immunohistochemical localization of Na(+)-dependent glucose transporter in rat jejunum. **Cell Tissue Res.**, v. 267, n. 1, p. 3-9, 1992.

TAMADA, H.; NEZU, R.; IMAMURA, I.; MATSUO, Y.; TAKAGI, Y.; KAMATA, S.; OKADA, A. The dipeptide alanyl-glutamine prevents intestinal mucosal atrophy in parenterally fed rats. **JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.**, v. 16, n. 2, p. 110-116, 1992.

THORENS, B.; CHENG, Z. Q.; BROWN, D.; LODISH, H. F. Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. C279-C285, 1990.

THWAITES, D. T.; BROWN, C. D.; HIRST, B. H.; SIMMONS, N. L. H(+)-coupled dipeptide (glycylsarcosine) transport across apical and basal borders of human intestinal Caco-2 cell monolayers display distinctive characteristics. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1151, n. 2, p. 237-245, 1993a.

\_\_\_\_\_. Transepithelial glycylsarcosine transport in intestinal Caco-2 cells mediated by expression of H(+)-coupled carriers at both apical and basal membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 7640-7642, 1993b.

TRAVIS, S.; MENZIES, I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. **Clin. Sci. (London)**, v. 82, n. 5, p. 471-488, 1992.

TURNER, J. R.; BLACK, E. D.; WARD, J.; TSE, C. M.; UCHWAT, F. A.; ALLI, H. A.; DONOWITZ, M.; MADARA, J. L.; ANGLE, J. M. Transepithelial resistance can be regulated by the intestinal brush-border Na(+)/H(+) exchanger NHE3. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 279, n. 6, p. C1918-C1924, 2000.

TURNER, J. R.; MADARA, J. L. Physiological regulation of intestinal epithelial tight junctions as a consequence of Na(+)-coupled nutrient transport. **Gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 1391-1396, 1995.

TURNER, J. R.; RILL, B. K.; CARLSON, S. L.; CARNES, D.; KERNER, R.; MRSNY, R. J.; MADARA, J. L. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. C1378-C1385, 1997.

USSING, H. H.; ZERAHN, K. Active transport of sodium as the source of electrical current in the short-circuited frog skin. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 23, p. 110-117, 1951.

WEIGANDT, H. The gangliosides. **Adv. Neurochem.**, v. 4, p. 149-223, 1982.

WELSH, M. J.; SMITH, P. L.; FROMM, M.; FRIZZELL, R. A. Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. **Science**, v. 218, p. 1219-1221, 1982.

WINDMUELLER, H. G. Glutamine utilization by the small intestine. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 53, p. 201-237, 1982.

WINDMUELLER, H. G.; SPAETH, A. E. Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels *in vivo* for postabsorptive rat small intestine. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 1, p. 69-76, 1978.

\_\_\_\_\_. Respiratory fuels and nitrogen metabolism *in vivo* in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. **J. Biol. Chem.**, v. 255, n. 1, p. 107-112, 1980.

\_\_\_\_\_. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. **J. Biol. Chem.**, v. 249, n. 16, p. 5070-5079, 1974.

WOLF, A. A.; JOBLING, M. G.; WIMER-MACKIN, S.; FERGUSON-MALTZMAN, M.; MADARA, J. L.; HOLMES, R. K.; LENCER, W. I. Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia. **J. Cell Biol.**, v. 141, n. 4, p. 917-927, 1998.



### Anexo 2 – Glicose sobre Jejuo no Grupo Controle

|          | Corrente |     | Glicose |    | Jejuo |    | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|-----|---------|----|-------|----|----------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2   | 3       | 4  | 5     | 6  | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 34       | 56  | 43      | 29 | 28    | 53 |          |   | 40,5  | 4,9   |
| 0,00001  | 42       | 65  | 47      | 45 | 38    | 52 |          |   | 48,2  | 3,9   |
| 0,00006  | 51       | 75  | 53      | 54 | 55    | 58 |          |   | 57,7  | 3,6   |
| 0,00016  | 61       | 85  | 66      | 56 | 74    | 60 |          |   | 67,0  | 4,4   |
| 0,00066  | 81       | 103 | 84      | 63 | 106   | 64 |          |   | 83,5  | 7,5   |
| 0,00166  | 111      | 153 | 105     | 79 | 113   | 67 |          |   | 104,7 | 12,3  |

|          | DDP |      | Glicose |      | Jejuo |      | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-----|------|---------|------|-------|------|----------|---|-------|-------|
|          | 1   | 2    | 3       | 4    | 5     | 6    | 7        | 8 |       |       |
| V. Clamp | 0,1 | -0,6 | 0,0     | -0,5 | 0,3   | -0,5 |          |   |       |       |
| 0,000001 | 1,1 | 2,0  | 1,1     | 0,6  | 0,5   | 1,0  |          |   | 1,1   | 0,2   |
| 0,00001  | 1,3 | 2,2  | 1,2     | 1,2  | 0,8   | 1,3  |          |   | 1,3   | 0,2   |
| 0,00016  | 1,3 | 2,7  | 1,3     | 2,3  | 1,6   | 2,2  |          |   | 1,9   | 0,2   |
| 0,00166  | 1,7 | 3,4  | 1,6     | 3,0  | 2,7   | 2,8  |          |   | 2,5   | 0,3   |

|          | Resistência |    | Glicose |    | Jejuo |    | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------|----|-------|----|----------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3       | 4  | 5     | 6  | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 32          | 35 | 25      | 23 | 18    | 19 |          |   | 25,3  | 2,8   |
| 0,00001  | 29          | 34 | 26      | 27 | 20    | 25 |          |   | 26,8  | 1,9   |
| 0,00016  | 22          | 32 | 21      | 41 | 21    | 37 |          |   | 29,0  | 3,6   |
| 0,00166  | 15          | 22 | 15      | 38 | 24    | 41 |          |   | 25,8  | 4,6   |

### Anexo 3 – Glicose sobre Jejuo no Grupo Toxina

|          | Corrente |    | Glicose |     | Jejuo |    | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|----|---------|-----|-------|----|--------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2  | 3       | 4   | 5     | 6  | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 79       | 73 | 121     | 128 | 81    | 57 | 47     |   | 83,7  | 11,5  |
| 0,00001  | 84       | 71 | 113     | 117 | 66    | 60 | 66     |   | 82,4  | 8,9   |
| 0,00006  | 86       | 71 | 113     | 96  | 60    | 62 | 65     |   | 79,0  | 7,6   |
| 0,00016  | 92       | 78 | 116     | 92  | 64    | 64 | 69     |   | 82,1  | 7,2   |
| 0,00066  | 103      | 84 | 120     | 97  | 70    | 72 | 69     |   | 87,9  | 7,4   |
| 0,00166  | 148      | 96 | 147     | 109 | 81    | 79 | 72     |   | 104,6 | 12,0  |

|          | DDP |     | Glicose |     | Jejuo |      | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|-----|-----|---------|-----|-------|------|--------|---|-------|-------|
|          | 1   | 2   | 3       | 4   | 5     | 6    | 7      | 8 |       |       |
| V. Clamp | 0,4 | 0,3 | 0,0     | 0,0 | 0,0   | -0,8 | 0,0    |   |       |       |
| 0,000001 | 4,2 | 4,2 | 1,8     | 2,0 | 2,5   | 2,1  | 1,0    |   | 2,5   | 0,5   |
| 0,00001  | 4,8 | 4,5 | 2,1     | 3,5 | 3,7   | 2,5  | 2,2    |   | 3,3   | 0,4   |
| 0,00016  | 5,3 | 5,1 | 2,6     | 3,9 | 3,6   | 3,3  | 3,2    |   | 3,9   | 0,4   |
| 0,00166  | 5,5 | 5,3 | 3,4     | 4,0 | 3,7   | 3,7  | 3,8    |   | 4,2   | 0,3   |

|          | Resistência |    | Glicose |    | Jejuo |    | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------|----|-------|----|--------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3       | 4  | 5     | 6  | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 53          | 57 | 14      | 16 | 32    | 38 | 22     |   | 33,1  | 6,5   |
| 0,00001  | 56          | 64 | 19      | 29 | 55    | 42 | 34     |   | 42,7  | 6,2   |
| 0,00016  | 56          | 64 | 22      | 41 | 55    | 51 | 47     |   | 48,0  | 5,1   |
| 0,00166  | 37          | 55 | 22      | 37 | 47    | 47 | 53     |   | 42,6  | 4,3   |

### Anexo 4 – Glicose sobre Óleo no Grupo Controle

|          | Corrente |     | Glicose |    | Óleo |     | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|-----|---------|----|------|-----|----------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2   | 3       | 4  | 5    | 6   | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 82       | 79  | 126     | 40 | 42   | 45  |          |   | 69,0  | 13,7  |
| 0,00001  | 76       | 79  | 111     | 31 | 46   | 50  |          |   | 65,5  | 11,8  |
| 0,00006  | 75       | 82  | 107     | 34 | 59   | 57  |          |   | 69,0  | 10,2  |
| 0,00016  | 75       | 92  | 114     | 43 | 61   | 84  |          |   | 78,2  | 10,1  |
| 0,00066  | 80       | 103 | 124     | 58 | 79   | 102 |          |   | 91,0  | 9,5   |
| 0,00166  | 93       | 134 | 167     | 93 | 110  | 157 |          |   | 125,7 | 13,1  |

|          | DDP |     | Glicose |     | Óleo |      | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-----|-----|---------|-----|------|------|----------|---|-------|-------|
|          | 1   | 2   | 3       | 4   | 5    | 6    | 7        | 8 |       |       |
| V. Clamp | 0,0 | 0,2 | -0,1    | 0,0 | 0,0  | -0,6 |          |   |       |       |
| 0,000001 | 2,9 | 2,9 | 2,8     | 1,1 | 1,2  | 1,1  |          |   | 2,0   | 0,4   |
| 0,00001  | 2,6 | 2,6 | 2,7     | 0,9 | 1,3  | 1,2  |          |   | 1,9   | 0,3   |
| 0,00016  | 2,9 | 2,9 | 2,5     | 1,1 | 1,7  | 2,0  |          |   | 2,2   | 0,3   |
| 0,00166  | 3,5 | 3,9 | 3,2     | 2,3 | 3,1  | 3,9  |          |   | 3,3   | 0,2   |

|          | Resistência |    | Glicose |    | Óleo |    | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------|----|------|----|----------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3       | 4  | 5    | 6  | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 36          | 35 | 22      | 28 | 28   | 25 |          |   | 29,0  | 2,3   |
| 0,00001  | 36          | 34 | 24      | 28 | 27   | 24 |          |   | 28,8  | 2,1   |
| 0,00016  | 38          | 31 | 22      | 26 | 27   | 25 |          |   | 28,2  | 2,3   |
| 0,00166  | 37          | 29 | 19      | 25 | 28   | 24 |          |   | 27,0  | 2,5   |

### Anexo 5 – Glicose sobre Óleo no Grupo Toxina

|          | Corrente |     | Glicose |     | Óleo |     | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|-----|---------|-----|------|-----|--------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2   | 3       | 4   | 5    | 6   | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 135      | 198 | 162     | 162 | 66   | 68  | 44     |   | 119,3 | 22,5  |
| 0,00001  | 128      | 164 | 140     | 135 | 64   | 65  | 42     |   | 105,4 | 17,9  |
| 0,00006  | 122      | 155 | 133     | 121 | 64   | 67  | 62     |   | 103,4 | 14,5  |
| 0,00016  | 120      | 145 | 123     | 113 | 67   | 88  | 73     |   | 104,1 | 10,9  |
| 0,00066  | 115      | 135 | 113     | 106 | 72   | 94  | 88     |   | 103,3 | 7,8   |
| 0,00166  | 162      | 145 | 123     | 117 | 88   | 118 | 94     |   | 121,0 | 9,9   |

|          | DDP  |     | Glicose |     | Óleo |     | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|------|-----|---------|-----|------|-----|--------|---|-------|-------|
|          | 1    | 2   | 3       | 4   | 5    | 6   | 7      | 8 |       |       |
| V. Clamp | -0,5 | 0,8 | -0,5    | 0,7 | -0,3 | 0,7 | -0,3   |   |       |       |
| 0,000001 | 3,9  | 4,0 | 2,8     | 3,5 | 3,1  | 1,8 | 1,2    |   | 2,9   | 0,4   |
| 0,00001  | 4,4  | 3,7 | 3,1     | 3,8 | 3,6  | 1,8 | 1,0    |   | 3,1   | 0,5   |
| 0,00016  | 4,8  | 3,7 | 3,3     | 3,8 | 4,1  | 3,1 | 3,1    |   | 3,7   | 0,2   |
| 0,00166  | 4,9  | 4,5 | 3,3     | 4,2 | 5,0  | 5,4 | 5,2    |   | 4,6   | 0,3   |

|          | Resistência |    | Glicose |    | Óleo |    | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------|----|------|----|--------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3       | 4  | 5    | 6  | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 28          | 19 | 17      | 22 | 48   | 28 | 35     |   | 28,1  | 4,0   |
| 0,00001  | 34          | 21 | 22      | 28 | 57   | 28 | 29     |   | 31,3  | 4,6   |
| 0,00016  | 39          | 25 | 26      | 37 | 61   | 35 | 47     |   | 38,6  | 4,7   |
| 0,00166  | 29          | 31 | 27      | 36 | 57   | 45 | 59     |   | 40,6  | 5,0   |

### Anexo 6 – Glutamina sobre Jejuno no Grupo Controle

|          | Corrente |    | Glutamina |    | Jejuno |   | Controle |  | 8 | Média | e.p.m |
|----------|----------|----|-----------|----|--------|---|----------|--|---|-------|-------|
|          | 1        | 2  | 3         | 4  | 5      | 6 | 7        |  |   |       |       |
| 0,000001 | 28       | 34 | 60        | 68 |        |   |          |  |   | 47,5  | 9,7   |
| 0,00001  | 33       | 36 | 80        | 45 |        |   |          |  |   | 48,5  | 10,8  |
| 0,00006  | 37       | 44 | 110       | 47 |        |   |          |  |   | 59,5  | 17,0  |
| 0,00016  | 40       | 53 | 130       | 59 |        |   |          |  |   | 70,5  | 20,2  |
| 0,00066  | 51       | 69 | 150       | 71 |        |   |          |  |   | 85,3  | 22,0  |
| 0,00166  | 81       | 83 | 165       | 80 |        |   |          |  |   | 102,3 | 20,9  |

|          | DDP  |     | Glutamina |      | Jejuno |   | Controle |  | 8 | Média | e.p.m |
|----------|------|-----|-----------|------|--------|---|----------|--|---|-------|-------|
|          | 1    | 2   | 3         | 4    | 5      | 6 | 7        |  |   |       |       |
| V. Clamp | -0,6 | 0,0 | 0,5       | -0,1 |        |   |          |  |   |       |       |
| 0,000001 | 0,6  | 0,9 | 1,5       | 1,8  |        |   |          |  |   | 1,2   | 0,3   |
| 0,00001  | 0,3  | 1,0 | 2,0       | 1,4  |        |   |          |  |   | 1,2   | 0,4   |
| 0,00016  | 0,7  | 1,4 | 3,0       | 2,5  |        |   |          |  |   | 1,9   | 0,5   |
| 0,00166  | 1,3  | 2,0 | 3,6       | 4,6  |        |   |          |  |   | 2,9   | 0,7   |

|          | Resistência |    | Glutamina |    | Jejuno |   | Controle |  | 8 | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|-----------|----|--------|---|----------|--|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3         | 4  | 5      | 6 | 7        |  |   |       |       |
| 0,000001 | 17          | 25 | 23        | 27 |        |   |          |  |   | 23,0  | 2,2   |
| 0,00001  | 16          | 27 | 23        | 31 |        |   |          |  |   | 24,3  | 3,2   |
| 0,00016  | 17          | 26 | 23        | 40 |        |   |          |  |   | 26,5  | 4,9   |
| 0,00166  | 16          | 25 | 22        | 56 |        |   |          |  |   | 29,8  | 8,9   |

### Anexo 7 – Glutamina sobre Jejuno no Grupo Toxina

|          | Corrente |    | Glutamina |    | Jejuno |     | Toxina |  | 8 | Média | e.p.m |
|----------|----------|----|-----------|----|--------|-----|--------|--|---|-------|-------|
|          | 1        | 2  | 3         | 4  | 5      | 6   | 7      |  |   |       |       |
| 0,000001 | 76       | 80 | 50        | 67 | 130    | 122 |        |  |   | 87,5  | 12,9  |
| 0,00001  | 72       | 82 | 54        | 75 | 100    | 92  |        |  |   | 79,2  | 6,6   |
| 0,00006  | 71       | 82 | 55        | 77 | 120    | 88  |        |  |   | 82,2  | 8,9   |
| 0,00016  | 70       | 78 | 59        | 76 | 140    | 80  |        |  |   | 83,8  | 11,7  |
| 0,00066  | 85       | 81 | 62        | 78 | 161    | 88  |        |  |   | 92,5  | 14,2  |
| 0,00166  | 182      | 88 | 72        | 82 | 183    | 100 |        |  |   | 117,8 | 20,8  |

|          | DDP |     | Glutamina |     | Jejuno |     | Toxina |  | 8 | Média | e.p.m |
|----------|-----|-----|-----------|-----|--------|-----|--------|--|---|-------|-------|
|          | 1   | 2   | 3         | 4   | 5      | 6   | 7      |  |   |       |       |
| V. Clamp | 0,1 | 0,0 | 0,6       | 0,6 | 0,8    | 0,1 |        |  |   |       |       |
| 0,000001 | 2,1 | 1,8 | 2,0       | 2,5 | 2,3    | 1,9 |        |  |   | 2,1   | 0,1   |
| 0,00001  | 2,7 | 2,3 | 2,6       | 3,7 | 2,1    | 2,5 |        |  |   | 2,7   | 0,2   |
| 0,00016  | 3,6 | 2,9 | 2,9       | 4,9 | 2,9    | 2,7 |        |  |   | 3,3   | 0,3   |
| 0,00166  | 4,4 | 3,4 | 4,2       | 5,7 | 4,1    | 3,8 |        |  |   | 4,3   | 0,3   |

|          | Resistência |    | Glutamina |    | Jejuno |    | Toxina |  | 8 | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|-----------|----|--------|----|--------|--|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3         | 4  | 5      | 6  | 7      |  |   |       |       |
| 0,000001 | 29          | 22 | 39        | 37 | 17     | 15 |        |  |   | 26,5  | 4,1   |
| 0,00001  | 38          | 28 | 47        | 49 | 21     | 27 |        |  |   | 35,0  | 4,7   |
| 0,00016  | 50          | 36 | 49        | 63 | 21     | 34 |        |  |   | 42,2  | 6,0   |
| 0,00166  | 33          | 38 | 62        | 68 | 22     | 38 |        |  |   | 43,5  | 7,2   |

### Anexo 8 – Glutamina sobre Óleo no Grupo Controle

|          | Corrente |    |    |    | Glutamina Óleo |     |     |    | Controle |    |    |    | Média | e.p.m |
|----------|----------|----|----|----|----------------|-----|-----|----|----------|----|----|----|-------|-------|
|          | 1        | 2  | 3  | 4  | 5              | 6   | 7   | 8  | 9        | 10 | 11 | 12 |       |       |
| 0,000001 | 39       | 25 | 55 | 69 | 35             | 70  | 62  | 37 |          |    |    |    | 49,0  | 6,1   |
| 0,00001  | 41       | 43 | 57 | 78 | 35             | 114 | 58  | 54 |          |    |    |    | 60,0  | 9,0   |
| 0,00006  | 44       | 52 | 58 | 81 | 36             | 112 | 66  | 64 |          |    |    |    | 64,1  | 8,4   |
| 0,00016  | 54       | 56 | 60 | 84 | 31             | 100 | 77  | 57 |          |    |    |    | 64,9  | 7,5   |
| 0,00066  | 65       | 62 | 63 | 84 | 47             | 110 | 96  | 99 |          |    |    |    | 78,3  | 7,8   |
| 0,00166  | 72       | 66 | 65 | 89 | 88             | 165 | 103 | 96 |          |    |    |    | 93,0  | 11,4  |

|          | DDP  |     |     |     | Glutamina Óleo |      |     |      | Controle |    |    |    | Média | e.p.m |
|----------|------|-----|-----|-----|----------------|------|-----|------|----------|----|----|----|-------|-------|
|          | 1    | 2   | 3   | 4   | 5              | 6    | 7   | 8    | 9        | 10 | 11 | 12 |       |       |
| V. Clamp | -0,6 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,5            | -0,3 | 0,6 | -0,1 |          |    |    |    |       |       |
| 0,000001 | 1,6  | 1,1 | 3,9 | 4,3 | 0,8            | 1,2  | 1,1 | 0,8  |          |    |    |    | 1,9   | 0,5   |
| 0,00001  | 2,0  | 2,0 | 4,0 | 4,9 | 0,7            | 1,2  | 1,4 | 1,1  |          |    |    |    | 2,2   | 0,5   |
| 0,00016  | 3,3  | 3,4 | 4,4 | 5,5 | 0,7            | 0,9  | 2,1 | 1,4  |          |    |    |    | 2,7   | 0,6   |
| 0,00166  | 5,7  | 5,6 | 4,7 | 5,7 | 1,6            | 1,7  | 2,6 | 2,4  |          |    |    |    | 3,8   | 0,7   |

|          | Resistência |    |    |    | Glutamina Óleo |    |    |    | Controle |    |    |    | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|----|----|----------------|----|----|----|----------|----|----|----|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3  | 4  | 5              | 6  | 7  | 8  | 9        | 10 | 11 | 12 |       |       |
| 0,000001 | 38          | 38 | 70 | 62 | 21             | 18 | 19 | 21 |          |    |    |    | 35,9  | 7,2   |
| 0,00001  | 49          | 44 | 70 | 62 | 19             | 12 | 25 | 20 |          |    |    |    | 37,6  | 7,7   |
| 0,00016  | 61          | 60 | 72 | 72 | 18             | 9  | 27 | 22 |          |    |    |    | 42,6  | 9,2   |
| 0,00166  | 78          | 83 | 71 | 64 | 18             | 10 | 25 | 26 |          |    |    |    | 46,9  | 10,6  |

### Anexo 9 – Glutamina sobre Óleo no Grupo Toxina

|          | Corrente |     |    |    | Glutamina Óleo |   |   |   | Toxina |    |    |    | Média | e.p.m |
|----------|----------|-----|----|----|----------------|---|---|---|--------|----|----|----|-------|-------|
|          | 1        | 2   | 3  | 4  | 5              | 6 | 7 | 8 | 9      | 10 | 11 | 12 |       |       |
| 0,000001 | 88       | 90  | 71 | 66 | 59             |   |   |   |        |    |    |    | 74,8  | 6,1   |
| 0,00001  | 64       | 80  | 79 | 68 | 80             |   |   |   |        |    |    |    | 74,2  | 3,4   |
| 0,00006  | 66       | 81  | 79 | 66 | 81             |   |   |   |        |    |    |    | 74,6  | 3,5   |
| 0,00016  | 82       | 93  | 79 | 68 | 81             |   |   |   |        |    |    |    | 80,6  | 4,0   |
| 0,00066  | 101      | 105 | 81 | 69 | 82             |   |   |   |        |    |    |    | 87,6  | 6,7   |
| 0,00166  | 146      | 141 | 86 | 72 | 83             |   |   |   |        |    |    |    | 105,6 | 15,7  |

|          | DDP |     |     |      | Glutamina Óleo |   |   |   | Toxina |    |    |    | Média | e.p.m |
|----------|-----|-----|-----|------|----------------|---|---|---|--------|----|----|----|-------|-------|
|          | 1   | 2   | 3   | 4    | 5              | 6 | 7 | 8 | 9      | 10 | 11 | 12 |       |       |
| V. Clamp | 0,0 | 0,0 | 0,5 | -0,6 | -0,7           |   |   |   |        |    |    |    |       |       |
| 0,000001 | 1,9 | 1,4 | 3,9 | 3,8  | 2,1            |   |   |   |        |    |    |    | 2,6   | 0,5   |
| 0,00001  | 1,5 | 1,3 | 4,8 | 3,6  | 3,3            |   |   |   |        |    |    |    | 2,9   | 0,7   |
| 0,00016  | 1,7 | 1,4 | 5,1 | 3,9  | 3,6            |   |   |   |        |    |    |    | 3,1   | 0,7   |
| 0,00166  | 2,6 | 2,4 | 5,3 | 4,1  | 3,6            |   |   |   |        |    |    |    | 3,6   | 0,5   |

|          | Resistência |    |    |    | Glutamina Óleo |   |   |   | Toxina |    |    |    | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|----|----|----------------|---|---|---|--------|----|----|----|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3  | 4  | 5              | 6 | 7 | 8 | 9      | 10 | 11 | 12 |       |       |
| 0,000001 | 21          | 16 | 53 | 59 | 37             |   |   |   |        |    |    |    | 37,2  | 8,5   |
| 0,00001  | 25          | 18 | 61 | 54 | 41             |   |   |   |        |    |    |    | 39,8  | 8,2   |
| 0,00016  | 21          | 16 | 64 | 57 | 43             |   |   |   |        |    |    |    | 40,2  | 9,5   |
| 0,00166  | 18          | 16 | 61 | 52 | 44             |   |   |   |        |    |    |    | 38,2  | 9,1   |

### Anexo 10 – Alanina sobre Jejuno no Grupo Controle

|          | Corrente |     | Alanina |   | Jejuno |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|-----|---------|---|--------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2   | 3       | 4 | 5      | 6 | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 65       | 89  | 46      |   |        |   |          |   | 66,7  | 12,4  |
| 0,00001  | 65       | 95  | 44      |   |        |   |          |   | 68,0  | 14,8  |
| 0,00006  | 81       | 96  | 50      |   |        |   |          |   | 75,7  | 13,5  |
| 0,00016  | 100      | 104 | 68      |   |        |   |          |   | 90,7  | 11,4  |
| 0,00066  | 149      | 133 | 160     |   |        |   |          |   | 147,3 | 7,8   |
| 0,00166  | 179      | 161 |         |   |        |   |          |   | 170,0 | 9,0   |

|          | DDP |     | Alanina |   | Jejuno |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-----|-----|---------|---|--------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1   | 2   | 3       | 4 | 5      | 6 | 7        | 8 |       |       |
| V. Clamp | 0,7 | 0,8 | 0,6     |   |        |   |          |   |       |       |
| 0,000001 | 1,0 | 0,9 | 1,0     |   |        |   |          |   | 1,0   | 0,0   |
| 0,00001  | 1,1 | 1,1 | 1,2     |   |        |   |          |   | 1,1   | 0,0   |
| 0,00016  | 1,4 | 1,4 | 1,9     |   |        |   |          |   | 1,6   | 0,2   |
| 0,00166  | 2,3 | 2,3 | 2,3     |   |        |   |          |   | 2,3   | 0,0   |

|          | Resistência |    | Alanina |   | Jejuno |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------|---|--------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3       | 4 | 5      | 6 | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 16          | 10 | 22      |   |        |   |          |   | 16,0  | 3,5   |
| 0,00001  | 28          | 12 | 27      |   |        |   |          |   | 22,3  | 5,2   |
| 0,00016  | 14          | 13 | 28      |   |        |   |          |   | 18,3  | 4,8   |
| 0,00166  | 12          | 14 | 20      |   |        |   |          |   | 15,3  | 2,4   |

### Anexo 11 – Alanina sobre Jejuno no Grupo Toxina

|          | Corrente |     | Alanina |   | Jejuno |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|-----|---------|---|--------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2   | 3       | 4 | 5      | 6 | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 50       | 78  | 45      |   |        |   |        |   | 57,7  | 10,3  |
| 0,00001  | 50       | 72  | 71      |   |        |   |        |   | 64,3  | 7,2   |
| 0,00006  | 59       | 85  | 79      |   |        |   |        |   | 74,3  | 7,9   |
| 0,00016  | 65       | 100 | 79      |   |        |   |        |   | 81,3  | 10,2  |
| 0,00066  | 76       | 123 | 84      |   |        |   |        |   | 94,3  | 14,5  |
| 0,00166  | 84       | 138 | 90      |   |        |   |        |   | 104,0 | 17,1  |

|          | DDP  |      | Alanina |   | Jejuno |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|------|------|---------|---|--------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1    | 2    | 3       | 4 | 5      | 6 | 7      | 8 |       |       |
| V. Clamp | -0,1 | -0,5 | 0,1     |   |        |   |        |   |       |       |
| 0,000001 | 1,8  | 1,5  | 1,5     |   |        |   |        |   | 1,6   | 0,1   |
| 0,00001  | 1,7  | 1,5  | 2,7     |   |        |   |        |   | 2,0   | 0,4   |
| 0,00016  | 2,4  | 2,8  | 3,3     |   |        |   |        |   | 2,8   | 0,3   |
| 0,00166  | 3,7  | 4,6  | 3,9     |   |        |   |        |   | 4,1   | 0,3   |

|          | Resistência |    | Alanina |   | Jejuno |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------|---|--------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3       | 4 | 5      | 6 | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 35          | 19 | 34      |   |        |   |        |   | 29,3  | 5,2   |
| 0,00001  | 33          | 22 | 38      |   |        |   |        |   | 31,0  | 4,7   |
| 0,00016  | 35          | 28 | 42      |   |        |   |        |   | 35,0  | 4,0   |
| 0,00166  | 44          | 33 | 43      |   |        |   |        |   | 40,0  | 3,5   |

### Anexo 12 – Alanina sobre Óleo no Grupo Controle

|          | Corrente |    | Alanina |   | Óleo |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|----|---------|---|------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2  | 3       | 4 | 5    | 6 | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 99       | 30 | 110     |   |      |   |          |   | 79,7  | 25,0  |
| 0,00001  | 86       | 38 | 85      |   |      |   |          |   | 69,7  | 15,8  |
| 0,00006  | 85       | 47 | 98      |   |      |   |          |   | 76,7  | 15,3  |
| 0,00016  | 65       | 57 | 111     |   |      |   |          |   | 77,7  | 16,8  |
| 0,00066  | 82       | 65 | 121     |   |      |   |          |   | 89,3  | 16,6  |
| 0,00166  | 117      | 81 | 147     |   |      |   |          |   | 115,0 | 19,1  |

|          | DDP |     | Alanina |   | Óleo |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-----|-----|---------|---|------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1   | 2   | 3       | 4 | 5    | 6 | 7        | 8 |       |       |
| V. Clamp | 0,1 | 0,5 | -0,7    |   |      |   |          |   |       |       |
| 0,000001 | 1,5 | 1,0 | 1,9     |   |      |   |          |   | 1,5   | 0,3   |
| 0,00001  | 1,2 | 1,2 | 1,7     |   |      |   |          |   | 1,4   | 0,2   |
| 0,00016  | 1,0 | 1,7 | 2,2     |   |      |   |          |   | 1,6   | 0,3   |
| 0,00166  | 1,9 | 2,2 | 2,9     |   |      |   |          |   | 2,3   | 0,3   |

|          | Resistência |    | Alanina |   | Óleo |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------|---|------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3       | 4 | 5    | 6 | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 15          | 33 | 17      |   |      |   |          |   | 21,7  | 5,7   |
| 0,00001  | 13          | 33 | 22      |   |      |   |          |   | 22,7  | 5,8   |
| 0,00016  | 15          | 30 | 20      |   |      |   |          |   | 21,7  | 4,4   |
| 0,00166  | 17          | 28 | 19      |   |      |   |          |   | 21,3  | 3,4   |

### Anexo 13 – Alanina sobre Óleo no Grupo Toxina

|          | Corrente |     | Alanina |   | Óleo |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|-----|---------|---|------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2   | 3       | 4 | 5    | 6 | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 108      | 119 | 112     |   |      |   |        |   | 113,0 | 3,2   |
| 0,00001  | 113      | 136 | 110     |   |      |   |        |   | 119,7 | 8,2   |
| 0,00006  | 109      | 145 | 112     |   |      |   |        |   | 122,0 | 11,5  |
| 0,00016  | 113      | 146 | 118     |   |      |   |        |   | 125,7 | 10,3  |
| 0,00066  | 121      | 136 | 123     |   |      |   |        |   | 126,7 | 4,7   |
| 0,00166  | 137      | 129 | 132     |   |      |   |        |   | 132,7 | 2,3   |

|          | DDP |     | Alanina |   | Óleo |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|-----|-----|---------|---|------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1   | 2   | 3       | 4 | 5    | 6 | 7      | 8 |       |       |
| V. Clamp | 0,9 | 0,2 | 0,2     |   |      |   |        |   |       |       |
| 0,000001 | 2,8 | 2,0 | 3,1     |   |      |   |        |   | 2,6   | 0,3   |
| 0,00001  | 3,0 | 2,5 | 3,7     |   |      |   |        |   | 3,1   | 0,3   |
| 0,00016  | 3,6 | 3,5 | 3,6     |   |      |   |        |   | 3,6   | 0,0   |
| 0,00166  | 4,6 | 4,8 | 3,4     |   |      |   |        |   | 4,3   | 0,4   |

|          | Resistência |    | Alanina |   | Óleo |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------|---|------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3       | 4 | 5    | 6 | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 26          | 17 | 28      |   |      |   |        |   | 23,7  | 3,4   |
| 0,00001  | 27          | 19 | 34      |   |      |   |        |   | 26,7  | 4,3   |
| 0,00016  | 31          | 23 | 31      |   |      |   |        |   | 28,3  | 2,7   |
| 0,00166  | 33          | 37 | 26      |   |      |   |        |   | 32,0  | 3,2   |

### Anexo 14 – Glicina sobre Jejuno no Grupo Controle

|          | Corrente |    | Glicina |    | Jejuno |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|----|---------|----|--------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2  | 3       | 4  | 5      | 6 | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 30       | 14 | 25      | 59 |        |   |          |   | 32,0  | 9,6   |
| 0,00001  | 42       | 18 | 35      | 78 |        |   |          |   | 43,3  | 12,6  |
| 0,00006  | 54       | 25 | 42      | 83 |        |   |          |   | 51,0  | 12,2  |
| 0,00016  | 62       | 42 | 51      | 88 |        |   |          |   | 60,8  | 10,0  |
| 0,00066  | 74       | 46 | 62      | 88 |        |   |          |   | 67,5  | 8,9   |
| 0,00166  | 81       | 51 | 69      | 81 |        |   |          |   | 70,5  | 7,1   |

|          | DDP  |     | Glicina |      | Jejuno |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|------|-----|---------|------|--------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1    | 2   | 3       | 4    | 5      | 6 | 7        | 8 |       |       |
| V. Clamp | -0,5 | 0,5 | -0,7    | -0,6 |        |   |          |   |       |       |
| 0,000001 | 0,8  | 0,6 | 0,8     | 0,9  |        |   |          |   | 0,8   | 0,1   |
| 0,00001  | 1,2  | 1,1 | 1,2     | 1,4  |        |   |          |   | 1,2   | 0,1   |
| 0,00016  | 1,8  | 1,9 | 1,4     | 2,0  |        |   |          |   | 1,8   | 0,1   |
| 0,00166  | 2,7  | 2,3 | 2,3     | 2,6  |        |   |          |   | 2,5   | 0,1   |

|          | Resistência |    | Glicina |    | Jejuno |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------|----|--------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3       | 4  | 5      | 6 | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 29          | 40 | 33      | 15 |        |   |          |   | 29,3  | 5,3   |
| 0,00001  | 28          | 40 | 34      | 19 |        |   |          |   | 30,3  | 4,5   |
| 0,00016  | 32          | 40 | 29      | 23 |        |   |          |   | 31,0  | 3,5   |
| 0,00166  | 33          | 44 | 34      | 32 |        |   |          |   | 35,8  | 2,8   |

### Anexo 15 – Glicina sobre Jejuno no Grupo Toxina

|          | Corrente |     | Glicina |    | Jejuno |    | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|-----|---------|----|--------|----|--------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2   | 3       | 4  | 5      | 6  | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 95       | 110 | 123     | 55 | 54     | 48 |        |   | 80,8  | 13,3  |
| 0,00001  | 94       | 111 | 100     | 74 | 57     | 69 |        |   | 84,2  | 8,4   |
| 0,00006  | 101      | 105 | 93      | 73 | 55     | 81 |        |   | 84,7  | 7,7   |
| 0,00016  | 108      | 93  | 93      | 73 | 53     | 98 |        |   | 86,3  | 8,1   |
| 0,00066  | 110      | 92  | 94      | 76 | 51     | 97 |        |   | 86,7  | 8,4   |
| 0,00166  | 113      | 94  | 94      | 78 | 50     | 90 |        |   | 86,5  | 8,6   |

|          | DDP  |     | Glicina |      | Jejuno |     | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|------|-----|---------|------|--------|-----|--------|---|-------|-------|
|          | 1    | 2   | 3       | 4    | 5      | 6   | 7      | 8 |       |       |
| V. Clamp | -0,4 | 0,2 | 0,0     | -0,5 | 0,4    | 0,0 |        |   |       |       |
| 0,000001 | 2,9  | 3,0 | 2,9     | 3,0  | 2,5    | 1,7 |        |   | 2,7   | 0,2   |
| 0,00001  | 3,3  | 4,4 | 4,3     | 3,1  | 3,2    | 1,7 |        |   | 3,3   | 0,4   |
| 0,00016  | 3,7  | 4,6 | 4,5     | 3,4  | 4,0    | 1,5 |        |   | 3,6   | 0,5   |
| 0,00166  | 4,3  | 4,6 | 4,5     | 3,7  | 4,2    | 1,9 |        |   | 3,9   | 0,4   |

|          | Resistência |    | Glicina |    | Jejuno |    | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------|----|--------|----|--------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3       | 4  | 5      | 6  | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 31          | 26 | 23      | 55 | 39     | 35 |        |   | 34,8  | 4,7   |
| 0,00001  | 35          | 40 | 44      | 44 | 50     | 26 |        |   | 39,8  | 3,4   |
| 0,00016  | 34          | 47 | 47      | 50 | 68     | 16 |        |   | 43,7  | 7,1   |
| 0,00166  | 37          | 48 | 48      | 51 | 74     | 20 |        |   | 46,3  | 7,2   |

### Anexo 16 – Glicina sobre Íleo no Grupo Controle

|          | Corrente |    | Glicina |    | Íleo |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|----|---------|----|------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2  | 3       | 4  | 5    | 6 | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 48       | 52 | 48      | 61 | 30   |   |          |   | 47,8  | 5,0   |
| 0,00001  | 45       | 52 | 52      | 78 | 33   |   |          |   | 52,0  | 7,4   |
| 0,00006  | 55       | 59 | 47      | 63 | 39   |   |          |   | 52,6  | 4,3   |
| 0,00016  | 65       | 70 | 47      | 87 | 42   |   |          |   | 62,2  | 8,1   |
| 0,00066  | 76       | 68 | 50      | 92 | 45   |   |          |   | 66,2  | 8,6   |
| 0,00166  | 87       | 82 | 56      | 95 | 45   |   |          |   | 73,0  | 9,6   |

|          | DDP |     | Glicina |      | Íleo |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-----|-----|---------|------|------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1   | 2   | 3       | 4    | 5    | 6 | 7        | 8 |       |       |
| V. Clamp | 0,0 | 0,1 | 0,0     | -0,5 | 0,0  |   |          |   |       |       |
| 0,000001 | 1,1 | 1,6 | 1,8     | 1,7  | 0,9  |   |          |   | 1,4   | 0,2   |
| 0,00001  | 0,9 | 1,6 | 2,0     | 1,4  | 1,4  |   |          |   | 1,5   | 0,2   |
| 0,00016  | 1,2 | 1,9 | 2,0     | 1,5  | 2,1  |   |          |   | 1,7   | 0,2   |
| 0,00166  | 1,6 | 2,3 | 2,5     | 1,9  | 2,7  |   |          |   | 2,2   | 0,2   |

|          | Resistência |    | Glicina |    | Íleo |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------|----|------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3       | 4  | 5    | 6 | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 26          | 31 | 39      | 28 | 34   |   |          |   | 31,6  | 2,3   |
| 0,00001  | 22          | 31 | 42      | 17 | 42   |   |          |   | 30,8  | 5,1   |
| 0,00016  | 19          | 27 | 44      | 17 | 50   |   |          |   | 31,4  | 6,7   |
| 0,00166  | 19          | 28 | 45      | 20 | 65   |   |          |   | 35,4  | 8,7   |

### Anexo 17 – Glicina sobre Íleo no Grupo Toxina

|          | Corrente |     | Glicina |     | Íleo |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|-----|---------|-----|------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2   | 3       | 4   | 5    | 6 | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 127      | 109 | 120     | 77  | 123  |   |        |   | 111,2 | 9,1   |
| 0,00001  | 132      | 99  | 111     | 108 | 127  |   |        |   | 115,4 | 6,1   |
| 0,00006  | 134      | 100 | 112     | 112 | 120  |   |        |   | 115,6 | 5,6   |
| 0,00016  | 135      | 98  | 108     | 118 | 112  |   |        |   | 114,2 | 6,1   |
| 0,00066  | 133      | 97  | 110     | 116 | 105  |   |        |   | 112,2 | 6,1   |
| 0,00166  | 136      | 98  | 114     | 108 | 102  |   |        |   | 111,6 | 6,7   |

|          | DDP |      | Glicina |      | Íleo |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|-----|------|---------|------|------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1   | 2    | 3       | 4    | 5    | 6 | 7      | 8 |       |       |
| V. Clamp | 0,0 | -0,6 | 0,7     | -0,2 | 0,6  |   |        |   |       |       |
| 0,000001 | 4,5 | 4,7  | 4,6     | 1,8  | 2,6  |   |        |   | 3,6   | 0,6   |
| 0,00001  | 5,0 | 5,1  | 5,0     | 2,5  | 3,3  |   |        |   | 4,2   | 0,5   |
| 0,00016  | 5,5 | 5,2  | 5,1     | 3,2  | 4,0  |   |        |   | 4,6   | 0,4   |
| 0,00166  | 5,7 | 5,3  | 5,1     | 3,3  | 4,4  |   |        |   | 4,8   | 0,4   |

|          | Resistência |    | Glicina |    | Íleo |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------|----|------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3       | 4  | 5    | 6 | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 35          | 43 | 38      | 23 | 22   |   |        |   | 32,2  | 4,2   |
| 0,00001  | 36          | 50 | 44      | 23 | 25   |   |        |   | 35,6  | 5,2   |
| 0,00016  | 39          | 54 | 48      | 26 | 34   |   |        |   | 40,2  | 5,0   |
| 0,00166  | 41          | 54 | 43      | 30 | 42   |   |        |   | 42,0  | 3,8   |

### Anexo 18 – Alanil-Glutamina sobre Jejuo no Grupo Controle

|          | Corrente |    | Ala-Glutamina |    | Jejuo |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|----|---------------|----|-------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2  | 3             | 4  | 5     | 6 | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 32       | 33 | 51            | 44 | 31    |   |          |   | 38,2  | 4,0   |
| 0,00001  | 28       | 37 | 51            | 42 | 34    |   |          |   | 38,4  | 3,9   |
| 0,00003  | 26       | 40 | 63            | 54 | 34    |   |          |   | 43,4  | 6,7   |
| 0,00014  | 31       | 43 | 60            | 49 | 31    |   |          |   | 42,8  | 5,5   |
| 0,0003   | 32       | 46 | 67            | 60 | 32    |   |          |   | 47,4  | 7,1   |
| 0,0013   | 39       | 55 | 86            | 80 | 34    |   |          |   | 58,8  | 10,5  |

|          | DDP |     | Ala-Glutamina |     | Jejuo |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-----|-----|---------------|-----|-------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1   | 2   | 3             | 4   | 5     | 6 | 7        | 8 |       |       |
| V. Clamp | 0,0 | 0,9 | 0,4           | 0,7 | 0,0   |   |          |   |       |       |
| 0,000001 | 0,7 | 1,4 | 1,6           | 1,4 | 1,4   |   |          |   | 1,3   | 0,2   |
| 0,00001  | 0,7 | 1,6 | 1,6           | 1,4 | 2,0   |   |          |   | 1,5   | 0,2   |
| 0,00003  | 0,8 | 1,8 | 1,6           | 1,5 | 2,3   |   |          |   | 1,6   | 0,2   |
| 0,00014  | 0,8 | 2,1 | 1,8           | 1,7 | 2,4   |   |          |   | 1,8   | 0,3   |
| 0,0003   | 0,8 | 2,4 | 2,1           | 2,4 | 2,4   |   |          |   | 2,0   | 0,3   |
| 0,0013   | 2,4 | 2,6 | 2,6           | 3,0 | 2,5   |   |          |   | 2,6   | 0,1   |

|          | Resistência |    | Ala-Glutamina |    | Jejuo |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------------|----|-------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3             | 4  | 5     | 6 | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 25          | 39 | 31            | 33 | 51    |   |          |   | 35,8  | 4,4   |
| 0,00003  | 22          | 43 | 25            | 27 | 70    |   |          |   | 37,4  | 8,9   |
| 0,0003   | 22          | 50 | 31            | 39 | 78    |   |          |   | 44,0  | 9,7   |
| 0,0013   | 20          | 43 | 29            | 37 | 77    |   |          |   | 41,2  | 9,7   |

### Anexo 19 – Alanil-Glutamina sobre Jejuo no Grupo Toxina

|          | Corrente |     | Ala-Glutamina |     | Jejuo |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|-----|---------------|-----|-------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2   | 3             | 4   | 5     | 6 | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 86       | 55  | 57            | 100 | 64    |   |        |   | 72,4  | 8,8   |
| 0,00001  | 84       | 68  | 57            | 87  | 66    |   |        |   | 72,4  | 5,7   |
| 0,00003  | 82       | 87  | 57            | 82  | 68    |   |        |   | 75,2  | 5,5   |
| 0,00014  | 83       | 100 | 62            | 80  | 69    |   |        |   | 78,8  | 6,5   |
| 0,0003   | 86       |     | 67            | 83  | 71    |   |        |   | 76,8  | 4,6   |
| 0,0013   | 96       | 106 | 107           | 144 | 98    |   |        |   | 110,2 | 8,7   |

|          | DDP |      | Ala-Glutamina |      | Jejuo |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|-----|------|---------------|------|-------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1   | 2    | 3             | 4    | 5     | 6 | 7      | 8 |       |       |
| V. Clamp | 0,2 | -0,5 | 0,9           | -0,5 | 0,9   |   |        |   |       |       |
| 0,000001 | 3,8 | 1,7  | 3,2           | 2,7  | 4,2   |   |        |   | 3,1   | 0,4   |
| 0,00003  | 4,7 | 3,4  | 3,2           | 3,1  | 4,6   |   |        |   | 3,8   | 0,4   |
| 0,00014  | 4,7 | 3,4  | 3,3           | 3,4  | 4,6   |   |        |   | 3,9   | 0,3   |
| 0,0003   | 4,8 |      | 3,4           | 3,8  | 4,6   |   |        |   | 4,2   | 0,3   |
| 0,0013   | 4,8 | 4,4  | 4,1           | 3,9  | 4,6   |   |        |   | 4,4   | 0,2   |

|          | Resistência |    | Ala-Glutamina |    | Jejuo |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------------|----|-------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3             | 4  | 5     | 6 | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 44          | 34 | 55            | 27 | 64    |   |        |   | 44,8  | 6,7   |
| 0,00003  | 55          | 38 | 54            | 38 | 64    |   |        |   | 49,8  | 5,1   |
| 0,00014  | 55          | 38 | 51            | 42 | 63    |   |        |   | 49,8  | 4,5   |
| 0,0003   | 55          |    | 50            | 45 | 60    |   |        |   | 52,5  | 3,2   |
| 0,0013   | 49          | 48 | 38            | 26 | 51    |   |        |   | 42,4  | 4,7   |

### Anexo 20 – Alanil-Glutamina sobre Óleo no Grupo Controle

|          | Corrente |    | Ala-Glutamina |     | Óleo |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|----|---------------|-----|------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2  | 3             | 4   | 5    | 6 | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 68       | 42 | 49            | 57  | 78   |   |          |   | 58,8  | 6,5   |
| 0,00001  | 68       | 45 | 53            | 60  | 71   |   |          |   | 59,4  | 4,8   |
| 0,00003  | 62       | 49 | 53            | 68  | 88   |   |          |   | 64,0  | 6,9   |
| 0,00014  | 73       | 54 | 63            | 85  | 121  |   |          |   | 79,2  | 11,7  |
| 0,0003   | 72       | 62 | 106           | 99  | 135  |   |          |   | 94,8  | 13,0  |
| 0,0013   | 84       | 87 | 121           | 131 | 155  |   |          |   | 115,6 | 13,5  |

|          | DDP |     | Ala-Glutamina |      | Óleo |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-----|-----|---------------|------|------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1   | 2   | 3             | 4    | 5    | 6 | 7        | 8 |       |       |
| V. Clamp | 0,0 | 0,0 | -0,6          | -0,1 | -0,1 |   |          |   |       |       |
| 0,000001 | 1,3 | 1,3 | 1,0           | 1,5  | 1,5  |   |          |   | 1,3   | 0,1   |
| 0,00003  | 1,5 | 1,7 | 1,1           | 1,6  | 1,8  |   |          |   | 1,5   | 0,1   |
| 0,00014  | 1,5 | 1,7 | 1,4           | 2,0  | 2,9  |   |          |   | 1,9   | 0,3   |
| 0,0003   | 1,5 | 1,8 | 2,2           | 2,6  | 3,4  |   |          |   | 2,3   | 0,3   |
| 0,0013   | 1,6 | 2,3 | 3,0           | 3,0  | 4,1  |   |          |   | 2,8   | 0,4   |

|          | Resistência |    | Ala-Glutamina |    | Óleo |   | Controle |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------------|----|------|---|----------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3             | 4  | 5    | 6 | 7        | 8 |       |       |
| 0,000001 | 22          | 30 | 21            | 25 | 21   |   |          |   | 23,8  | 1,7   |
| 0,00003  | 24          | 36 | 21            | 24 | 26   |   |          |   | 26,2  | 2,6   |
| 0,0003   | 23          | 31 | 22            | 26 | 26   |   |          |   | 25,6  | 1,6   |
| 0,0013   | 20          | 26 | 24            | 23 | 25   |   |          |   | 23,6  | 1,0   |

### Anexo 21 – Alanil-Glutamina sobre Óleo no Grupo Toxina

|          | Corrente |     | Ala-Glutamina |     | Óleo |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|----------|-----|---------------|-----|------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1        | 2   | 3             | 4   | 5    | 6 | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 52       | 91  | 140           | 60  | 45   |   |        |   | 77,6  | 17,5  |
| 0,00001  | 55       | 94  | 145           | 69  | 43   |   |        |   | 81,2  | 18,1  |
| 0,00003  | 60       | 96  | 178           | 100 | 46   |   |        |   | 96,0  | 23,0  |
| 0,00014  | 64       | 104 | 155           | 119 | 54   |   |        |   | 99,2  | 18,5  |
| 0,0003   | 68       | 115 | 143           | 116 | 61   |   |        |   | 100,6 | 15,6  |
| 0,0013   | 73       | 136 | 140           | 116 | 80   |   |        |   | 109,0 | 13,9  |

|          | DDP |     | Ala-Glutamina |      | Óleo |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|-----|-----|---------------|------|------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1   | 2   | 3             | 4    | 5    | 6 | 7      | 8 |       |       |
| V. Clamp | 0,0 | 0,7 | 0,4           | -0,4 | -0,6 |   |        |   |       |       |
| 0,000001 | 3,0 | 4,4 | 5,0           | 2,8  | 1,5  |   |        |   | 3,3   | 0,6   |
| 0,00003  | 3,8 | 4,6 | 5,2           | 4,3  | 1,5  |   |        |   | 3,9   | 0,6   |
| 0,0003   | 4,8 | 4,9 | 6,3           | 5,6  | 2,3  |   |        |   | 4,8   | 0,7   |
| 0,0013   | 5,4 | 4,2 | 6,6           | 5,9  | 2,6  |   |        |   | 4,9   | 0,7   |

|          | Resistência |    | Ala-Glutamina |    | Óleo |   | Toxina |   | Média | e.p.m |
|----------|-------------|----|---------------|----|------|---|--------|---|-------|-------|
|          | 1           | 2  | 3             | 4  | 5    | 6 | 7      | 8 |       |       |
| 0,000001 | 60          | 50 | 34            | 47 | 35   |   |        |   | 45,2  | 4,4   |
| 0,00003  | 65          | 44 | 29            | 43 | 37   |   |        |   | 43,6  | 6,0   |
| 0,0003   | 68          | 44 | 50            | 47 | 37   |   |        |   | 49,2  | 5,2   |
| 0,0013   | 73          | 31 | 46            | 53 | 32   |   |        |   | 47,0  | 7,7   |