

**TRANSPORTE DE GLUTAMINA, ALANINA E GLICOSE  
EM MUCOSA INTESTINAL DE COELHOS: Proposta de um  
Modelo Matemático para as Curvas Dose-Resposta**

**Alberto Melo Soares**

---

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA A COORDENAÇÃO DO  
CURSO DE POS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA, COMO REQUISITO  
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.

FC-00002614-5

Fortaleza - 1990.

Tese  
616.3627  
56256  
1990

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº	513270
	02 / 10 / 196

C298093  
R513270

<del>UFC</del>	<del>BIBLIOTECA CENTRAL</del>
<del>Nº</del>	<del>1043</del>
<del></del>	<del>04 / 12 / 192</del>

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Universitária ou na Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde desta Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

---

Alberto Melo Soares

Dissertação aprovada em: 18 / 10 / 90

---

Dr. Aldo Angelo Moreira Lima

---

Dr. Manassés Claudino Fonteles

---

Dr. Alberto Flávio Alves Aguiar

Dedico. . .

\*

\*

\*

\*

\* Aos meus pais

\* à minha espôsa

\* aos meus filhos

\* aos meus mestres

\* aos meus amigos.

\*

\*

\*

. . . uma constante hiperbólica!

## Agradecimentos

Desejo expressar meus agradecimentos ao Prof. Dr. Aldo Angelo Moreira Lima, pela orientação e criteriosa análise na elaboração e execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles, pelo especial incentivo e contínuo apoio durante estes últimos 15 anos.

Ao Prof. Dr. Alberto Flávio Alves Aguiar, pela infatigável paciência na revisão do modelo matemático.

Ao José Edvaldo Freire Júnior, por sua perícia no preparo das soluções e por suas sugestões para o aprimoramento do protocolo experimental. Ao Manassés Claudino Fonteles Júnior por suas contribuições filosóficas que norteiam grande parte deste trabalho.

Aos meus professores de Pós-Graduação, pela segurança e reconhecida capacidade de incentivar o estudo e o desenvolvimento da Farmacologia. Aos meus colegas de Pós-Graduação pelos bons momentos de estudo em equipe (especialmente nas vésperas das provas!).

Quero agradecer também a todo o pessoal que faz parte da Unidade de Pesquisas Clínicas do HEMOCE, onde este trabalho foi desenvolvido, pela ajuda, desde a aquisição dos animais até a manutenção do laboratório.

À bibliotecária Norma de Carvalho Linhares, que tão pacientemente me acolheu na parte de referência bibliográfica deste trabalho, minha gratidão.

Este trabalho teve como suporte financeiro a CAPES, o CNPq e a Rockffeler Foundation.

## INDICE

	página
ABSTRACT . . . . .	IX
RESUMO . . . . .	1
1. INTRODUÇÃO . . . . .	2
1.1 A magnitude do problema das doenças diarreicas . . . . .	3
1.2 Bases funcionais da TRO . . . . .	5
1.3 Formulação da TRO . . . . .	8
1.4 Indicações para o uso da TRO . . . . .	9
1.5 Estudos do melhoramento da TRO . . . . .	11
1.6 Modelo matemático para as curvas dose-resposta . . . . .	14
1.6.1 A teoria clássica . . . . .	14
1.6.2 A teoria do ritmo de interação . . . . .	16
1.6.3 A teoria alostérica . . . . .	17
1.6.4 Uma proposta alternativa . . . . .	19
2. MATERIAL E METODOS	
2.1 Procedimento experimental . . . . .	21
2.2 Soluções químicas. . . . .	23
2.3 Protocolo experimental . . . . .	24
2.4 Medidas elétricas . . . . .	26

2.5	Procedimento matemático . . . . .	29
2.5.1	Efeito médio e desvio padrão . . . . .	29
2.5.2	A regressão linear . . . . .	30
2.5.3	A EC <sub>50</sub> e pD <sub>2</sub> . . . . .	31
2.5.4	Ajuste dos pontos . . . . .	32
2.5.5	O cálculo do valor de "S" por aproximação . . . . .	33
2.5.6	Representação gráfica . . . . .	35
2.5.7	Alguns exemplos . . . . .	36
2.5.8	A área da curva experimental . . . . .	37
2.5.9	O valor de "S" calculado pela área da curva . . . . .	38
2.5.10	O valor de "S" calculado pelo método de HILL . . . . .	39
3.	RESULTADOS . . . . .	40
3.1	Apresentação das tabelas e gráficos . . . . .	40
3.1.1	Tabela 1 . . . . .	43
3.1.2	Tabela 2 . . . . .	49
3.1.3	Tabela 3 . . . . .	54
3.1.4	Tabela 4 . . . . .	62
3.1.5	Tabela 5 . . . . .	68
3.1.6	Tabela 6 . . . . .	71
3.1.7	Tabela 7 . . . . .	77
3.1.8	Tabela 8 . . . . .	84
3.1.9	Tabela 9 . . . . .	87
3.1.10	Tabela geral 1, 2, 3 . . . . .	92
3.1.11	Tabela geral 4, 5 . . . . .	93
3.1.12	Tabela geral 6, 7 . . . . .	94
3.1.13	Tabela geral 8, 9 . . . . .	95

4. DISCUSSÃO E ANALISE DOS RESULTADOS . . . . .	96
4.1 Análise geral dos resultados . . . . .	96
4.2 Análise dos resultados . . . . .	99
4.2.1 Tabela e figuras 1 . . . . .	99
4.2.2 Tabela e figuras 2 . . . . .	102
4.2.3 Tabela e figuras 3 . . . . .	103
4.2.4 Tabela e figuras 4 . . . . .	106
4.2.5 Tabela e figuras 5 . . . . .	108
4.2.6 Tabela e figuras 6 . . . . .	109
4.2.7 Tabela e figuras 7 . . . . .	110
4.2.8 Tabela e figuras 8 . . . . .	111
4.2.9 Tabela e figuras 9 . . . . .	112
5. CONCLUSÕES . . . . .	114
6. BIBLIOGRAFIA . . . . .	116

## ABSTRACT

Dehydration and malnutrition are the immediate cause of diarrheal diseases. To investigate the biological significance of glutamine, alanine and glucose on the transport of cation in the intestinal mucosal membrane we use the Ussing chamber model. The intestinal transport was measured by short-circuit current ( $I_{sc}$ ), potential difference (PD) and tissue resistance (TR) on control and mucosa treated with cholera toxin. Increasing doses ( $10^{-5}$  to  $10^{-1}$  M) of glutamine, alanine and glucose on the mucosa side cause a significant increase in the intestinal cation cotransport. Although glucose causes an earlier effect, glutamine (30 mM) and alanine (100 mM) increase twice as much the maximum effect of glucose (30 mM). The kinetic of the dose-response curves suggest that the intestinal mucosal transport of alanine is different from glutamine and glucose. The kinetic for glutamine and glucose are similar, however, the efficacy of the intestinal cotransport system for glutamine is greater than alanine and glucose. Replacing equimolar sodium by choline on luminal side, completely abolishes the intestinal effects of glutamine, alanine and glucose. The addition of alanine or glutamine, but not glucose, on the serosal side causes an increase in sodium cotransport, which was additive only for alanine when added on both sides (mucosal and serosal). All three substrates change the kinetic dose-response curves, when added together on the mucosal and serosal sides. The intestinal sodium cotransport was greater for glutamine, alanine and glucose when the mucosal solution's pHs were 7.4, 8.0

and 7.4, respectively. The combination of glutamine, alanine and glucose on Ringer's or WHO's solutions cause a significant, not additive, increase on sodium cotransport on the mucosal control and cholera toxin treated tissue. The mathematical model use to calculate the hyperbolic dose-response curves is appropriate since the theoretical points do not exceed the standart deviation of the experimental results. These results demonstrate that all three substrate cause a significant increase in intestinal sodium cotransport. The efficacy of glutamine is greater than alanine and glucose. The combination of alanine, glutamine and glucose should be further explore for the development of an oral rehydration solution to be used on the treatment of diarrheal diseases.

## RESUMO

Desidratação e desnutrição são conseqüências imediatas das doenças diarreicas. Para investigar a significância biológica da glutamina, alanina e glicose no transporte de iônico através da mucosa intestinal, utilizamos o modelo de câmaras de Ussing. A medida do transporte foi feita pelo registro da corrente de curto-circuito (CCC), diferença de potencial (DP) e resistência tecidual ( $R_t$ ) na mucosa de coelhos normais e com a toxina da cólera. Doses crescentes ( $10^{-5}$  -  $10^{-1}$  M) de glutamina, alanina e glicose no lado mucoso causam aumento significativo no co-transporte de cátion intestinal. Apesar da glicose causar um aumento no co-transporte de cátion com doses menores, glutamina (30 mM) e alanina (100 mM) tiveram um efeito máximo de aproximadamente o dobro do apresentado pela glicose (30 mM). As cinéticas das curvas dose-resposta sugerem que o co-transporte na mucosa intestinal para a alanina é diferente da glutamina e da glicose, (estes últimos apresentam semelhanças). Entretanto, o sistema de co-transporte de cátion com a glutamina é mais eficaz do que o da alanina e glicose. A substituição de sódio por colina no meio luminal abole completamente os efeitos da glutamina, alanina e glicose. A adição de alanina e glutamina, mas não de glicose, no lado seroso causam um aumento no co-transporte de cátion, o qual foi aditivo somente para alanina quando adicionada em ambos os lados da mucosa. Os três substratos causam alterações nas cinéticas das curvas dose-resposta quando adicionados no lado seroso. Os pHs ideais para a melhor eficácia dos sistema de co-transportes da glutamina, alanina e glicose foram 7.4, 8.0 e 7.4, respectivamente. A combinação glutamina, alanina

e glicose nas soluções de Ringer e WHO causam aumento significativo, mas não aditivo, no co-transporte de sódio na mucosa normal ou com a toxina da cólera. Em nenhuma das curvas experimentais obtivemos uma curva hiperbólica perfeita (desvio max. de S igual a zero), entretanto, considerando o critério de que a curva é hiperbólica desde que o ponto teórico correspondente não ultrapasse um desvio padrão, então, na maioria dos casos o modelo se mostrou adequado. Estes resultados demonstram que todos os três substratos causam um aumento significativo no co-transporte de cátion (dependente de sódio) no intestino. O efeito máximo da glutamina no co-transporte de sódio é significativamente maior do que o da alanina e glicose. A combinação de alanina, glutamina e glicose deve ser melhor estudada para o desenvolvimento de uma solução reidratante oral no tratamento da diarreia.

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1. A magnitude do problema das doenças diarreicas

Doenças diarreicas constituem um dos maiores problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento, e são consideradas como principal causa de morbidade e mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade. A diarreia constitui um importante fator para desnutrição infantil assim como a desnutrição favorece a uma maior predisposição para a diarreia (SCHORLING, J. B. e cols, 1990).

A magnitude do problema global de doenças diarreicas agudas foi revisado por Snyder e Merson (SNYDER e cols., 1982). Dados provenientes de vigilância ativa em 24 estudos publicados e usando a população mundial estimada para 1980, os autores encontraram 744-1.000 milhões de episódios e 4,6 milhões de mortes (equivalente a uma morte em cada 10 segundos) por diarreia em crianças menores do que cinco anos de vida na Africa, Asia (excluindo China) e América Latina.

Entre as maiores taxas de morbidade e mortalidade por diarreia no mundo estão aquelas localizadas no nordeste do Brasil (SCHORLING e cols., 1987), onde a taxa excede 6-12 episódios da doença por criança/ano nas áreas rurais e urbana, respectivamente. A mortalidade infantil nestas áreas atinge 25% durante os primeiros cinco anos de idade (GUERRANT e cols., 1983).

A desidratação constitui na principal causa de morbidade e mortalidade resultante da diarreia e decorre da perda de água e

eletrólitos nas fezes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1983). Um impacto imediato na mortalidade resultante da desidratação poderia ser encontrado no tratamento baseado na administração urgente da solução de glicose com sais e alimentação continuada, especialmente aleitamento materno (WALKER-SMITH, 1986; BROWN e cols, 1988; WHARTON e cos, 1988). O ponto crítico neste tratamento é a existência de uma solução de baixo custo, fácil de administrar por via oral e sua disponibilidade nos postos de saúde. Entretanto, a solução reidratante oral deve ser considerada como uma medida de salvar vidas e não uma cura para doenças diarreicas. Portanto, a redução a longo prazo na incidência e severidade da diarreia dependerá do desenvolvimento de pesquisas visando a melhora da solução de reidratação oral, descoberta de drogas específicas, desenvolvimento de vacinas, terapia nutricional, educação, higiene e melhores condições sanitárias (WARREN, 1988).

A terapia de reidratação oral (TRO) utilizando a solução de glicose com sais recomendada pela OMS /-UNICEF constitui no método preferido para o tratamento da maioria das crianças com desidratação resultante da diarreia e tem sido utilizada com sucesso em milhões de casos no mundo. Em muitos países esta solução é recomendada para o tratamento caseiro de crianças com diarreia após a visita ao posto de saúde, mesmo quando as mesmas não apresentam sinais de desidratação. A solução de glicose com sais funciona porque a glicose é rapidamente absorvida na maioria dos pacientes com diarreia e isto resulta também na reabsorção de sal e água, repondo, assim, as perdas fecais.

Apesar da reposição eficiente das perdas fecais de sais e água pela solução de glicose com sais, a mesma apresenta algumas desvantagens como: (a) não redução do volume fecal na diarreia ou (b)

não redução na duração da doença; as quais levam a pouca aceitação do uso da mesma por parte principalmente das mães e agentes de saúde. Se uma solução de rehidratação oral pode ser desenvolvida, a qual tivesse vantagens em relação a solução padrão de glicose e com sais como: baixo custo, segurança, estabilidade durante o processo de armazenamento, apreciável redução nas perdas fecais durante a doença e diminuição na duração da diarreia, isto poderia levar vantagem considerável sobre a solução de glicose com sais. Ainda mais importante, isto poderia promover um verdadeiro efeito antidiarreico, o qual levaria a melhor aceitação e uso da terapia de rehidratação oral pelas mães e agentes de saúde, e talvez também produzisse a redução no uso indiscriminado e inefetivo de drogas consideradas "antidiarreicas" e antibióticos. Isto poderia representar um maior avanço no esforço para controlar a morbidade e mortalidade resultantes da diarreia através de um melhor tratamento para a doença.

## 1.2. Bases Funcionais da TRO

Os princípios da TRO (Terapia de Reidratação Oral) foram desenvolvidos no final da década de 40 e começo dos anos 50, quando Darrow e Harrison relataram o sucesso obtido no uso de uma solução oral para manutenção de fluido e eletrólitos na terapia de crianças desidratadas (DARROW, 1946; DARROW e cols, 1949; HARRISON, 1954; HIRSCHHORN, 1980; FINBERG e cols, 1982).

Uma solução de glicose e sal foi utilizada com sucesso no tratamento de pessoas com cólera na Índia (CHATTERJEE, 1953). Em 1964, Phillips demonstrou que pessoas com cólera podiam absorver oralmente uma solução contendo glicose e eletrólitos, e em 1968 foi

realizado o primeiro estudo com balanço metabólico mostrando claramente que infusões orais com solução de glicose e eletrólitos poderiam manter o balanço de fluido e eletrólitos em pacientes com cólera (PHILLIPS, 1964; HIRSCHHORN e cols, 1968; NALIN e cols, 1968; PIERCE e cols, 1968).

CRANE, 1962; SCHULTZ e cols, 1970, demonstraram o co-transporte de sódio com glicose e outros substratos orgânicos ativamente transportados no intestino. Vários monossacarídeos são transportados ativamente, incluindo glicose, galactose, e, amino-ácidos como a glicina, alanina e glutamina (principal fonte energética para o metabolismo do enterócito), e alguns dissacarídeos e peptídios, demonstrando uma dependência parcial ou absoluta ao sódio para absorção ao nível intestinal (MAHALANABIS e cols, 1985; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1987). Concomitantemente, a taxa de absorção de sódio através da membrana mucosa está consideravelmente aumentada na presença desses substratos. Esses efeitos na absorção de sódio resultam no aumento da absorção de água e eletrólitos, seguindo o gradiente de concentração.

Os efeitos da TRO na absorção de água e sal foram primeiramente aplicados com sucesso em pacientes, após a demonstração do mecanismo intacto de co-transporte de sódio com glicose na cólera, resultando na restauração e manutenção normais do volume de sangue e concentrações de eletrólitos.

Resultados experimentais, principalmente resultantes de pesquisas em membrana isoladas, modelos animais e no homem, têm demonstrado que determinados critérios fisiológicos devem ser respeitados para a absorção adequada da solução oral de glicose e eletrólitos (HIRSCHHORN, 1980, 1982; MAHALANABIS e cols, 1981):

(a) a solução deve ser aproximadamente isosmótica com o plasma;

(b) há evidências consideráveis na literatura de que a absorção de glicose e sódio são de aproximadamente 1:1 na relação molar. A concentração de glicose deve ser entre 20-50 g/litro no sentido de promover o máximo na absorção de água e eletrólitos;

(c) a concentração de sódio de 90 mmol/litro na solução promove uma relação ótima de sódio para glicose para correção do déficit de sódio e água na desidratação por diarreia. Quando a concentração de sódio é baixa em relação à concentração no conteúdo jejunal, secreção pode ocorrer mesmo na presença de glicose;

(d) a perda de potássio na diarreia aguda, pode ser fatal na criança. A absorção de potássio é passiva, dependente do gradiente de concentração, sendo que uma concentração de potássio maior do que aquela no plasma induzirá absorção. Na TRO, a concentração de potássio de 20 mmol/litro é bem tolerada e adequada para a terapia de reposição;

(e) o bicarbonato corrige a acidose e aumenta a absorção de sódio na presença de cloreto. A concentração de 30-48 mmol/litro pode ser usada para corrigir a acidose produzida pela diarreia;

(f) perdas fecais volumosas (acima de 10 ml/min) reduzem a absorção da solução oral, substancialmente;

(g) a glicose é melhor absorvida no jejuno humano do que no íleo;

(h) na diarreia infantil aguda severa, a média de perdas de sódio varia de 76 a 109 mmol/litro de fluidos.

### 1.3. Formulação da TRO

A fórmula recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) / United Nations Children's Fund (UNICEF) é mostrada na tabela 1 e satisfaz os critérios fisiológicos para uma absorção intestinal eficaz de água e eletrólitos.

Tabela 11 - Composição da solução de rehidratação oral recomendada pela OMS / UNICEF.

Ingredientes	Concentração (g/litro de água)	Componente (mmol/litro de água)
Cloreto de sódio	3,5	sódio (90)
Citrato de trisódio desidratado ou bicarbonato de sódio	2,9	cloreto (80)
Cloreto de potássio	1,5	potássio (20)
Glicose (anidro)	20,0	glicose (111)

Em alguns países onde a glicose apresenta alto custo e é pouco disponível, a sacarose pode ser utilizada, apesar da mesma ser inferior comparada a glicose, especialmente, em pacientes com diarreia profusa e com vômitos (MOENGINAH e cols, 1975; NALIN, 1975; NALIN e cols, 1978; SACK e cols, 1978). No sentido de obter a mesma osmolaridade da glicose, a concentração de sucrose usada (g/litro) é de duas vezes àquela da glicose.

#### 1.4. Indicações para o uso da TRO

Muitas décadas de estudo foram necessárias para o entendimento da fisiopatologia da diarreia aguda e melhor conhecimento da fisiologia de transporte intestinal e suas aplicações na terapia da diarreia aguda.

Os principais pontos na TRO, conhecidos desde os trabalhos iniciais de Darrow (DARROW e cols, 1949), são:

(a) restauração rápida das perdas de água e eletrólitos com correção simultânea da acidose e administração de potássio;

(b) uso da solução de glicose com eletrólitos para desidratação, e para manutenção em todas as idades; e uso de uma solução simples contendo vários eletrólitos para infusão endovenosa;

(c) iniciar alimentação com alimentos de fácil digestão e toleráveis.

Estes conhecimentos têm sido usados com sucesso em várias partes do mundo, incluindo hospitais bem estruturados ou áreas em desenvolvimento como em Bangladesh, Brasil e Peru (MAHALANABIS e cols, 1972, 1973; NALIN, 1972; HIRSCHHORN e cols, 1973; RAHMAN e cols, 1979; McLEAN e cols, 1981; World Health Organization 1983; MAHALANABIS e cols, 1985; WALKER-SMITH, 1986; BROWN e cols, 1988; WHARTON e cols, 1988).

A alta mortalidade por doenças diarreicas ocorre usualmente após a admissão no hospital, e resulta significativamente da inadequada correção do volume e balanço hidroeletrolítico, o qual mostra a importância da absorção de sódio e água no primeiro dia de tratamento da desidratação (ALEXANDER, 1948; AHMED e cols, 1963; NALIN, 1972; KINGSTON, 1973)

Apesar da crítica de alguns, no conceito do uso de uma simples solução para o tratamento de todos os tipos de diarreia, independente da variação nas concentrações de sódio nas fezes, muitos estudos têm mostrado que a solução de glicose com eletrólitos é eficaz no tratamento dos diferentes tipos de diarreia com poucas limitações (NICHOLS e cols., 1977). Isto tem sido demonstrado na cólera, onde a concentração de sódio é alta (80-120 mmol/litro) (NALIN e cols., 1976), na diarreia pelo rotavírus, cuja concentração de sódio é baixa (20-25 mmol/litro) (SACK e cols., 1978; NALIN e cols., 1979b), e na shigelose e outras diarreias cujas concentrações de sódio são intermediárias (40-50 mmol/litro) (HIRSCHHORN e cols., 1972, 1973). Esta solução, recomendada pela OMS / UNICEF, com concentração de sódio de 90 mmol/litro pode ser utilizada para o tratamento de crianças e adultos. Em crianças de baixo peso (<2.500 g de peso corporal) esta mesma solução mostrou-se inteiramente satisfatória (PIZARRO e cols, 1979, 1983; ABDALLA e cols, 1984; MARIN e cols, 1987).

.Entretanto, algumas limitações devem ser citadas no uso da TRO:

(a) em casos de vômitos, quando pacientes em choque não estejam completamente hidratados (MAHALANABIS e cols, 1974), ou no início da cólera severa (NALIN e cols, 1979a);

(b) intolerância à glicose, a qual pode levar ao aumento das perdas fecais, lesão intestinal, crescimento bacteriano excessivo, isquemia intestinal, e intolerância a outros substratos (WATTEN e cols, 1959; HIRSCHHORN e cols, 1973);

(c) em pacientes com alto grau de perdas fecais, acima de 10 ml/hora durante várias horas e talvez resultante de fadiga por exagerada ingestão de líquidos (PALMER e cols, 1977).

## 1.5 Estudo do melhoramento da TRO

Moléculas orgânicas como D-hexoses, aminoácidos neutros, dipeptídios e tripeptídios de aminoácidos neutros e vitaminas hidrossolúveis podem aumentar a absorção de sódio, seguida da absorção de água no intestino. Este co-transporte de sódio com outros compostos orgânicos apóiam a hipótese de que uma combinação de vários diferentes substratos podem levar ao desenvolvimento de uma melhor solução reidratante oral, a qual reponha não só as perdas de sais e água na diarreia, mas também induza uma maior absorção da secreção endógena intestinal, reduzindo assim o volume e a duração da diarreia, isto é, agindo como uma droga antidiarreica, bem como, promovendo uma absorção. O benefício nutricional é uma outra vantagem deste tipo de formulação para solução reidratante oral, porque reduzida a duração e severidade da diarreia favorecerá a introdução mais rápida do regime alimentar (LIMA e MAHALANABIS, 1988).

Estudos recentes mostrando o sucesso clínico no tratamento de cinco pacientes com colite por irrigação local do segmento afetado com ácidos graxos de cadeia curta (HARIG e cols., 1989), evidencia uma outra hipótese: de que a desnutrição local da mucosa intestinal resulta em doença e pode ser tratada pela reposição de nutrientes. Na década de 1940, vários autores demonstraram em estudos *in vitro*, os altos índices de glicólise aeróbica e anaeróbica pela mucosa intestinal (DICKENS e WEIL-MAHERBE, 1941). Em uma série elegante de experimentos, Windmueller e Spaeth documentaram, utilizando experimentos de perfusão arterial e luminal no jejuno de ratos, a importância da glutamina como fonte energética para o intestino no estado de jejum (WINDMUELLER e SPAETH, 1974, 1978, 1980; WINDMUELLER, 1984).

Com o lúmen intestinal vazio, a glutamina é responsável por 46% da produção de CO<sub>2</sub> respiratório, seguida de corpos cetônicos 11% e da glicose 10%. Conjuntamente, no lado vascular e luminal intestinal, glutamina, glutamato e aspartato são responsáveis por aproximadamente 77% da produção de CO<sub>2</sub> respiratório. Apesar da importância metabólica da glutamina para a mucosa intestinal, o possível papel deste substrato no co-transporte de cátion e seu potencial uso para o tratamento da diarreia não tem sido amplamente explorado.

Após um jejum demorado (16 horas), o padrão da utilização de fontes energéticas no intestino modifica-se: corpos cetônicos contribuem com 50% do CO<sub>2</sub> respiratório produzido, seguido de glutamina 35% (SALLEH e ARDAWI, 1988). Esta modificação se assemelha à diminuição observada no metabolismo da glutamina em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina.

Experimentos utilizando mitocôndrias isoladas e fatias de tecido intestinal de ratos pós-natal, sugerem também que a glutamina é o substrato preferido (KIMURA, 1984, 1987; KIMURA e WARSHAW, 1988). Este achado, se comprovado *in vivo*, favorecerá em muito o uso potencial da glutamina para o tratamento da diarreia, particularmente pela reposição de nutrientes e fontes energéticas na mucosa intestinal.

A importância da glutamina como substrato oxidativo, bem como fornecedora de nitrogênio para síntese de bases purinas e pirimidinas para células intestinais, ressaltam características de um epitélio que apresenta uma alta taxa de renovação celular, absorção de íons e nutrientes, modificações nos nutrientes absorvidos e secreção. Estas observações fortalecem a importância de investigações no uso da glutamina como substrato para co-transporte de cátion, e no seu uso como fator trófico para mucosa intestinal.

Estudos em ratos (JACOBS e cols., 1988) têm demonstrado um aumento da espessura da mucosa, conteúdo de ADN e proteínas intestinais correlacionado-as com o uso da glutamina em nutrição parenteral. O uso de glutamina foi também relacionado com hiperplasia da mucosa, após resseção do intestino delgado (JACOBS e cols., 1988), preservação da mucosa intestinal durante nutrição parenteral (O'DWYER e cols., 1986), e regeneração celular após lesão tóxica (fluorouracil) no intestino delgado (O'DWYER e cols., 1987).

## 1.6 Modelo matemático para as curvas dose-resposta

São três as principais teorias que relacionam o efeito biológico com a concentração de uma determinada droga:

I - A teoria clássica ( A. J. CLARK, E. J. ARIENS e R. P. STEPHENSON).

II - A teoria do ritmo de interação ( W. D. M. PATON).

III - A teoria alostérica (A. J. CHANGUEX e cols, e A. J. KARLIN)

### 1.6.1 - A teoria clássica

A. J. CLARK, propôs em 1933 que:

- 1 - A magnitude do efeito é diretamente proporcional à concentração do complexo droga-receptor.
- 2 - O efeito máximo ocorre quando todos os receptores estão ocupados.

E. J. ARIENS, em 1954 transformou estes postulados na seguinte equação matemática:

$$E_m = \alpha * n \quad e \quad E = \frac{E_m A}{A + K}$$

onde:

$E_m$  : efeito máximo

$E$  : percentagem de efeito

$\alpha$  : constante de proporcionalidade (atividade intrínseca)

$A$  : concentração da droga.

$n$  : número total de receptores.

$K$  : constante de dissociação aparente do complexo droga-receptor (numéricamente igual à concentração necessária para produzir a metade do efeito máximo).

LINEWEAVER e BURK propuseram o uso da escala linear com plotagem de  $1/E$  no eixo das ordenadas e  $1/A$  no eixo das abscissas (plotagem duplamente recíproca), cuja equação da reta é:

$$\frac{1}{E} = \frac{K}{E_m} * \frac{1}{A} + \frac{1}{E_m}$$

onde:

o coeficiente angular =  $K/E_m$

o ponto de intersecção da ordenada =  $1/E_m$

HILL propôs o uso de uma escala duplamente logaritmica, plotando nas ordenadas o  $\text{Log} (E_m/E - 1)$  e nas abscissas, o  $\text{Log} (A)$ , cuja equação da reta é:

$$\text{Log} (E_m/E - 1) = \text{Log} (A) - \text{Log} (K)$$

o gráfico de HILL só representa a equação de Ariens se o coeficiente angular da reta for igual a um.

Stephenson, em 1956, modificou a teoria clássica através dos seguintes postulados: (STEPHENSON, 1956)

- 1 - O efeito máximo pode ser obtido sem a ocupação total dos receptores ( $n$ ).
- 2 - A magnitude do efeito é função, não necessariamente linear, do número de receptores ocupados.
- 3 - O complexo droga-receptor promove um estímulo diretamente proporcional à fração de receptores ocupados.

A principal consequência destes postulados é que a constante de dissociação não é numericamente igual à concentração necessária para produzir a metade do efeito máximo ( $EC_{50}$ ).

### 1.6.2 - A teoria do ritmo de interação

PATON, em 1961, propôs que o efeito biológico de uma determinada droga é diretamente proporcional ao ritmo de ocupação do receptor (em contraste com a teoria clássica, onde se assume, implicitamente, a persistência de efeito enquanto o receptor estiver ocupado).

O principal avanço desta teoria, em relação à de CLARK é tentar explicar o significado da constante  $\alpha$  (atividade intrínseca de ARIENS), ou seja, drogas com diferentes valores de  $k_1$  ou  $k_2$  apresentam atividade intrínseca (eficácia de STEPHENSON) diferentes, ou seja, através desta teoria se pode explicar que drogas agonistas e antagonistas se diferenciam por possuírem diferentes ritmos de interação com o receptor. Propôs as seguintes equações matemáticas (PATON, 1961 cit. TALLARIDA e JACOBS, 1979).

$$V_{\text{assoc.}} = \frac{k_2 n A}{A + k_2/k_1} \quad e \quad E = \frac{\phi k_2 n A}{A + k_2/k_1}$$

onde:

$V_{\text{assoc.}}$  : velocidade de associação.

$n$  : número total de receptores.

$k_1$  e  $k_2$  : constantes de dissociação.

$A$  : concentração da droga.

$E$  : percentagem de efeito.

$\phi$  : constante de proporcionalidade (igual para todas as drogas)

### 1.6.3 - A teoria alostérica

CHANGEUX e cols e KARLIN, observaram que a curva dose resposta de muitas drogas não se apresentava como uma hipérbole (hipótese das duas teorias anteriores), e sim como uma curva do tipo sigmóide (quando representamos no eixo das abcissas a concentração e no eixo das ordenadas o efeito da droga).

Para explicar este comportamento, estes autores postularam a existência de dois estados conformacionais diferentes no receptor.

Na terminologia de KARLIN, o receptor R é a forma ativa e T é a forma inativa. Na ausência de drogas, estas formas estão em equilíbrio. KARLIN chamou de L (constante alostérica) a relação entre T/R, e a eficácia de uma determinada droga depende da afinidade relativa entre as formas R e T (KARLIN, 1967).

A propósito, o termo *efeito alostérico* foi criado por MONOD e JACOB para descrever o controle da catálise enzimática através da capacidade de determinadas enzimas existirem em duas conformações diferentes.

THRON e CALQUHOUN estudaram, individualmente, este modelo e chegaram à conclusão que a teoria alostérica era experimentalmente indistinguível da teoria clássica para o cálculo de K, em pelo menos duas situações:

- 1) Antagonismo competitivo
- 2) Antagonismo máximo comparado com um agonista parcial.

A eficácia para o agonista é definida como:

$$\epsilon_A = \frac{K_{AT}}{K_{AR}} - 1$$

onde:

AT = Complexo agonista / forma T

AR = Complexo agonista / forma R

e, para o antagonistas:

$$\epsilon_B = \frac{K_{BT}}{K_{BR}} - 1$$

onde:

BT = Complexo antagonista / forma T

BR = Complexo antagonista / forma R

Nesta teoria, a constante de dissociação ( K ) é, numericamente, igual a EC<sub>50</sub>. A diferença entre o modelo clássico e o modelo alostérico só aparece quando é usado o método da inativação parcial irreversível do receptor para a investigação do valor da constante de dissociação (TALLARIDA e JACOB, 1979).

#### 1.6.4 - Uma proposta alternativa

Do exposto, concluímos que existe pelo menos dois padrões de comportamento para curvas dose-resposta: a do tipo hiperbólico e a do tipo sigmóide. É importante lembrar que as do tipo hiperbólica, quando esboçadas com logaritmos na abscissa, também apresentam uma curva sigmóide.

A equação de ARIENS é adequada às curvas do tipo Michaelis-Menten (hiperbólica) e a de CHANGEUX e KARLIN se adapta às do tipo sigmóide e, dependendo do tipo de método utilizado para a estimar o valor da constante de dissociação (K), ambas podem ser igualmente válidas.

Uma proposta alternativa seria modificar a equação de ARIENS de

$$E_m/E - 1 = K/A \quad \text{para} \quad E_m/E - 1 = (K/A)^p$$

Assim, quando "p" for igual a um temos uma curva hiperbólica Michaeliana.

Para estimar o valor de p usamos o método de HILL, no qual se esboça no eixo das ordenadas o  $\text{Log}-(E_m/E - 1)$  e nas abscissas o  $\text{Log}(1/\text{DOSE})$ , e, através da regressão linear, calculamos os coeficientes da equação da reta e o coeficiente de correlação.

Fazendo Y igual a zero, calculamos o  $pD_2$  e conseqüentemente a  $EC_{50}$ ; fazendo X igual a zero calculamos a relação entre o efeito máximo definido experimentalmente e o efeito máximo esperado.

Fazendo  $p$  igual a  $\text{Log}(S)$ , podemos demonstrar que:

$$E = \frac{E_m}{1 + S (\text{Log} A - \text{Log} K)}$$

Chamamos o coeficiente  $S$  de constante hiperbólica.

## 1.7 Objetivos

7.1 - Analisar a importância da cinética dos co-transportes de glutamina, alanina e glicose no lúmen intestinal em função de diferentes concentrações de sódio no meio luminal.

7.2 - Determinar a variação da cinética dos co-transportes de glutamina, alanina e glicose no lúmen intestinal relacionados com diferentes pHs (5.6, 7.4 e 8.0) no meio luminal.

7.3 - Estudar os efeitos metabólicos da glutamina, alanina e glicose no transporte de eletrólitos no lado seroso e mucoso do intestino.

7.4 - Analisar os efeitos nos co-transportes de cátion intestinal utilizando a combinação glutamina, alanina e glicose em duas soluções padrão (solução de Ringer e solução reidratante oral indicada pela WHO / UNICEF) no intestino normal de coelhos.

7.5 - Determinar o potencial terapêutico da combinação de glutamina, alanina e glicose no modelo de diarreia secretória, utilizando duas soluções padrão (Ringer e WHO) no meio luminal.

7.6 - Analisar a validade de um modelo matemático para determinação das curvas dose-resposta, que relacione o efeito biológico (co-transporte de cátion com substratos no intestino) em diferentes concentrações de glutamina, alanina e glicose no lúmen intestinal de coelhos normais e com diarreia secretória.

## 2 - MATERIAL E METODOS

### 2.1 - Procedimento experimental

Coelhos albinos Califórnia, de ambos os sexos, pesando entre 1.5 e 2.0 quilos foram sacrificados por decapitação. Todos os animais foram mantidos em jejum com água "ad libitum" durante 24 horas antes do sacrifício.

O abdômen foi aberto na linha mediana e o íleo terminal foi identificado pela junção íleo-cecal. Seccionamos 20 a 25 cm de íleo distal e após uma rápida imersão em solução de Ringer à 4º centígrados, o segmento foi vareteado com uma pipeta de 10 ml. A seguir, foi feita uma incisão superficial à margem da inserção mesentérica e retirada a camada serosa.

O corte foi aprofundado e exposta a superfície mucosa, a qual foi limpa de eventual conteúdo intestinal e desprezado os 5 centímetros extremos. A faixa de tecido restante foi subdividida, e eliminadas as que apresentassem placas de tecido linfóide. Todos estes procedimentos foram feitos sobre uma placa de Petri, em contato com gelo.

Cada um dos segmentos de tecido foi colocado entre duas hemi-câmaras de acrílico de um centímetro quadrado de área circular interna, fixadas no suporte das câmaras, e, simultaneamente, preenchidas com 0,8 ml de solução de Ringer (ou outra solução teste), previamente aerada. Em seguida conectamos as câmaras e liberamos a circulação do perfusato.

O modelo de diarreia secretória foi semelhante ao descrito por Lima, (LIMA e cols, 1989). O procedimento experimental se iniciava 4 horas antes com a anestesia (Uretana, 1.2 g/Kg, via intra-peritoneal e Pentobarbital, 40 mg/Kg, via intra-muscular), e, após a abertura abdominal, o íleo foi ligado em quatro segmentos de aproximadamente 5 cm, observando-se a manutenção do fluxo sanguíneo nos segmentos adjacentes. Em cada segmento foi alternadamente injetado 1 ml de solução de Ringer normal e 1 ml de Ringer juntamente com 1 µg de enterotoxina da cólera (CT); em seguida, repúnhamos a alça intestinal na cavidade abdominal e suturávamos a parede.

Para a circulação e aeração dos 10 ml do perfusato em cada hemi-câmara e o tubo de circulação correspondente usamos uma mistura gasosa de 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico (mistura carbogênica). A temperatura do perfusato foi mantida em 38.5 graus centígrados pela circulação de água entre as paredes da camisa dos tubos conectada a uma bomba de circulação termo-estável, (ver esquema na página 25). A evaporação foi minimizada pela temperatura ambiente de 20 a 25 graus centígrados. Entretanto, o volume final sempre tende a diminuir em até 7% no final de 165 minutos. Esta diminuição foi monitorizada por uma marcação na parede do tubo que nos permitia observar variações mínimas em até 2% do volume. O controle foi feito durante todo o tempo experimental, exceto durante a manipulação das drogas a serem testadas.

As medidas elétricas (corrente de curto circuito, diferença de potencial elétrico e resistência transmembrana) eram feitas em intervalos regulares de 10 minutos durante todo o tempo experimental (165 minutos).

## 2.2 - Soluções químicas

### 2.2.1 - Soluções estoque . . . . . (500 mililitros)

	Ingredientes	Ringer	WHO
Estoque A . . . . .	NaCl	70.0 g	1.75 g
Estoque B . . . . .	KCl	3.5 g	0.75 g
Estoque C . . . . .	NaHCO <sub>3</sub>	42.0 g	1.25 g
Estoque D . . . . .	CaCl <sub>2</sub>	1.85 g	-
Estoque E . . . . .	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.95 g	-
	Glicose (anidro)	-	10.0 g
		Ringer Colina	
Estoque F . . . . .	Cloreto de Colina	167.6 g	

### 2.2.2 - Preparo das soluções

Tanto para a solução de Ringer quanto para a solução WHO, diluíamos 50 ml de cada uma solução estoque em 740 ml de água destilada, borbulhamos a solução com gás carbogênio (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) durante 20 minutos, e ajustamos o pH com solução de NaOH ou HCl (1 Normal), a seguir, completávamos o volume para 1000 ml.

### 2.2.3 - Soluções das drogas

As soluções de Glutamina, Alanina e Glicose foram feitas de modo que a osmolaridade em cada uma das concentrações a serem testadas apresentassem uma osmolaridade final igual a 300 miliosmois, (isto foi possível combinando água destilada com solução de Ringer ou com a solução WHO durante a diluição).

## 2.3 - Protocolo experimental

### 2.3.1 - *Período inicial* (5 minutos)

As medidas elétricas durante este período foram usadas como critério de triagem das condições do tecido. Se estas medidas ultrapassassem muito a média das outras câmaras a membrana era substituída imediatamente por outra. Assim como Schultz e cols (SCHULTZ e ZALUSKY, 1964), atribuímos a estas variações, à dificuldade do controle do grau de distensão do tecido durante a montagem da câmara.

### 2.3.2 - *Período de estabilidade* (30 minutos)

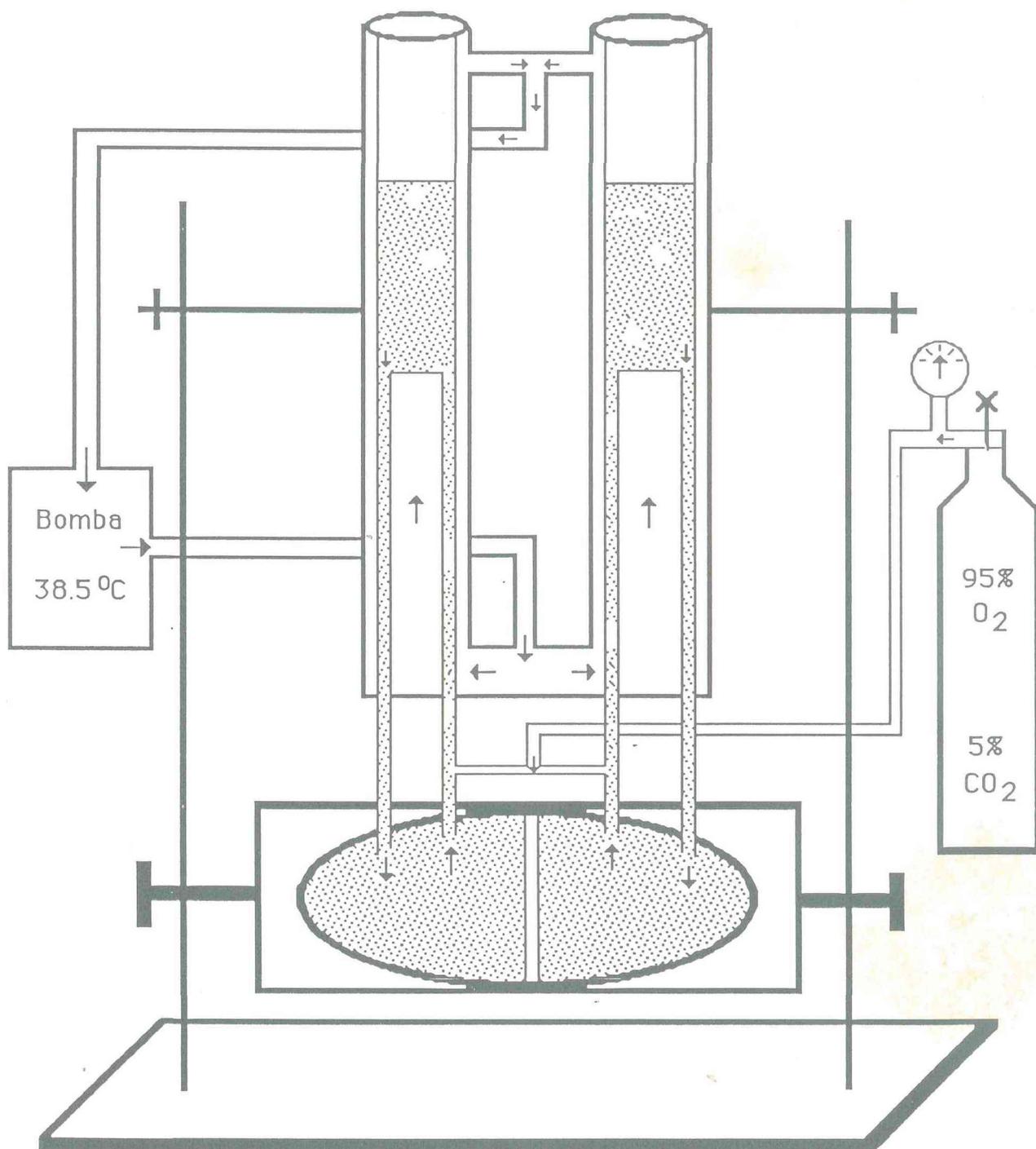
Neste período foi dada uma atenção especial às variações da corrente de curto circuito, se houvesse variação de mais de 10 microampères entre o final deste período e a leitura anterior, a câmara era eliminada do restante do experimento.

### 2.3.3 - *Período de adição de drogas* (100 a 120 minutos)

A primeira leitura foi usada para definir o estado elétrico basal do tecido, após o que, retirávamos 100 microlitros e adicionamos 100 microlitros a cada 20 minutos, em um total de 5 ou 6 adições.

### 2.3.4 - *Período de teste funcional* (30 minutos)

Independente do tipo de solução ou droga testada, no início deste período (após a retirada de 100  $\mu$ l), adicionávamos, no lado seroso, 100  $\mu$ l de uma solução de  $10^{-3}$  M de Teofilina, de modo que a concentração no perfusato ficava em  $10^{-5}$  M. O objetivo desta adição era testar o estado elétrico final da membrana, e, caso do clampeador apresentasse uma sobrecarga de corrente, os dados obtidos nesta eventual câmara foram eliminados dos resultados experimentais.



Sistema de circulação e aeração das câmaras de Üssing.

## 2.4 - Medidas elétricas

Pontes de Ringer-ágar de 10 cm x 1.57 mm de diâmetro interno foram conectadas nos orifícios proximais à aproximadamente 1 mm da área central da câmara. O outro lado da ponte foi conectada ao eletrodo de calomel imerso em solução saturada de cloreto de potássio. As outras pontes (10 cm x 2.15 mm de diâmetro interno) foram conectadas aos orifícios distais à 2.3 cm de distância da área central, e, por último, o outro lado conectado aos eletrodos de prata, também imersos em solução saturada de KCl. Os dois pares de eletrodos estavam conectados ao clampeador automático de voltagem BIC modelo ≠ AVC - 300 (ver esquema elétrico na página 28).

Após as câmaras serem conectadas aos tubos de circulação com todo o sistema de temperatura e aeração ligados e preenchidas com Ringer ou WIIO o potencial elétrico espontâneo foi feito zerando-se o amperímetro do clampeador. A condição limite imposta pelo protocolo foi de 0.9 mV, sendo eliminada qualquer câmara que eventualmente excedesse a estes limites.

Para medir a resistência elétrica do sistema, aumentamos o valor da corrente para 100  $\mu$ A e registramos o valor apresentado no Voltímetro. Com estas duas diferenças podíamos calcular a resistência do sistema usando a lei de Ohm.

$$\Delta E = \Delta i * R$$

onde:

$\Delta E$  : diferença de voltagem

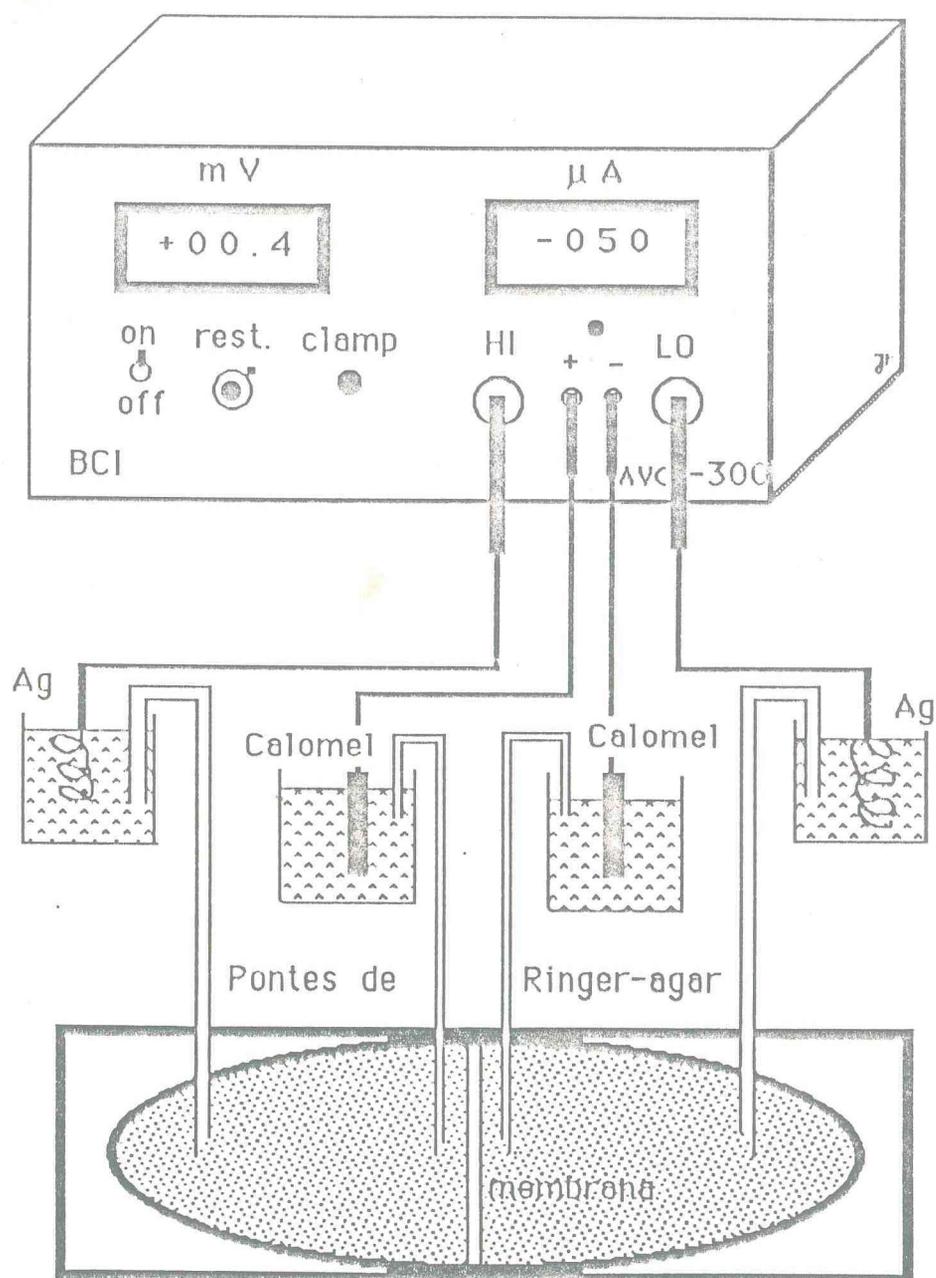
$\Delta i$  : diferença de intensidade de corrente

R : resistência elétrica

Este valor era imposto ao Ohmímetro com o objeivo de zerar a resistência oferecida pelo sistema, permitindo assim, medir a resistência oferecida apenas pela membrana.

Schultz e Zalusky alertaram para a possibilidade de que, sendo a resistência oferecida pelo perfusato muito alta e a do tecido (especialmente o íleo do coelho) muito baixa, a medida pode não representar a realidade. Neste sentido, estabelecemos também uma resistência elétrica entre o perfusato e os eletrodos mínimo e máximo, para o sistema de pontes de maior diâmetro interno, a resistência foi limitada entre 25 e 30 k $\Omega$  e a de menor diâmetro limitada entre 40 e 50 k $\Omega$ . Para estas medidas específicas, usamos um multímetro ICEL modelo IK-35. A propósito, o uso deste aparelho foi muito útil quando queríamos detectar problemas nas pontes, nos eletrodos ou na própria membrana!

Uma das especificações do clampeador automático de voltagem é que, para se calcular a resistência oferecida pelo tecido é necessário o uso da Lei de Ohm e o procedimento é o mesmo utilizado para o cálculo da resistência do perfusato. Entretanto, modificamos o protocolo, fazendo uma adição ou uma subtração de 100  $\mu$ A no valor registrado pelo Amperímetro, sempre tendendo a zero. Com isto, diminuimos ao máximo as variações de corrente impostas ao tecido (na verdade não houve diferenças nos valores obtidos entre este e o protocolo padrão).



Câmara de Ussing

Sistema elétrico de registro das câmaras de Ussing.

## 2.5 - Modelo matemático da curva dose-resposta

### 2.5.1 - Efeito médio e desvio padrão

Com os resultados de cada grupo experimental calculamos o percentual de efeito médio (% E) e o desvio padrão ( $SD_{(n-1)}$ ) em função da dose acumulada. O desvio padrão das doses mínimas e máximas foi estimado pela média do desvio padrão das doses intermediárias.

No gráfico, os valores da abscissa foram feitos de modo que o aumento de 100 vezes na concentração acumulada dista da anterior 100 unidades na escala (UE).

Os valores da tabela 2.5.1 foram obtidos em cinco animais experimentais, de um total de quinze câmaras. A unidade do efeito é o microampére.

Tabela 2.5.1

Concentração (M)	X	% E	SD
$3 \times 10^{-5}$	0	0.0	5.3
$10^{-4}$	25	3.3	3.3
$3 \times 10^{-4}$	50	18.0	5.6
$10^{-3}$	75	44.7	7.5
$3 \times 10^{-3}$	100	82.5	4.8
$10^{-2}$	125	100.0	5.3

### 2.5.2 - A regressão linear

Após determinarmos os três pontos mais próximos de 50% do efeito máximo ( $E_m$ ) apresentados na tabela 2.5.2, usamos o método da regressão linear para definirmos os coeficientes da equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ), em seguida, calculamos o valor da abscissa  $X_{50}$  para  $Y$  igual a 50% do efeito máximo. Na figura 2.5.2 apresentamos a reta de regressão linear com os valores de  $X$  não corrigidos.

Tabela 2.5.2

Concentração (M)	X	%E	SD
$3 \times 10^{-4}$	50	18.0	5.6
$10^{-3}$	75	44.7	7.5
$3 \times 10^{-3}$	100	82.5	4.8

$$Y = 1.3 X - 48$$

$$r^2 = 0.99$$

$$X'_{50} = 75.4 \text{ UE}$$

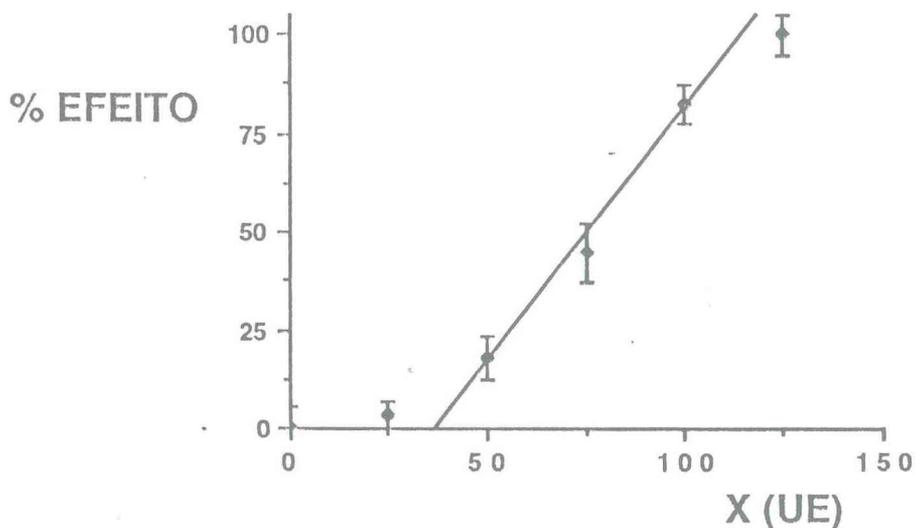


Fig. 2.5.2 - A reta de regressão linear

2.5.3 - A  $EC_{50}$  e  $pD_2$ 

Calculado o valor de  $X_{50}$  para  $Y$  igual a 50% do efeito máximo, a  $EC_{50}$  pode ser obtida através de duas regras de três, ou utilizando a seguinte equação:

$$EC_{50} = 10^{(0.02 X_{50} - 2)} * Dose_{100} \text{ UE}$$

$$100 \text{ UE} \text{ ----- } 2 \quad \text{e} \quad 10^2 \text{ ----- } 10^{-2}$$

$$X'_{50} \text{ UE} \text{ ----- } D \quad 10^D \text{ ----- } EC_{50}$$

$$D = 1.508 \quad EC_{50} = 9.7 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Usando a definição de  $pD_2$  podemos calcular:

$$pD_2 = -\text{Log}(ED_{50})$$

$$pD_2 = -\text{Log}(9.7 \times 10^{-4})$$

$$pD_2 = 3.0$$

A tabela 2.5.3 representa a tabela 2.5.1, juntamente com o inverso do logaritmo da concentração, e, em negrito, os valores de  $X$  para  $Y = 50$ , a  $EC_{50}$  e o  $pD_2$ .

Tabela 2.5.3

Concentração (M)	-Log(D)	X	% E	SD
$3 \times 10^{-5}$	4.5	0	0.0	5.3
$10^{-4}$	4.0	25	3.3	3.3
$3 \times 10^{-4}$	3.5	50	18.0	5.6
$10^{-3}$	3.0	75	44.7	7.5
<b><math>9.7 \times 10^{-4}</math></b>	<b>3.0</b>	<b>75.4</b>	<b>50.0</b>	--
$3 \times 10^{-3}$	2.5	100	82.5	4.8
$10^{-2}$	2.0	125	100.0	5.3

### 2.5.4 - Ajuste dos pontos

O ajuste das abscissas é feito subtraindo-se de  $X_{50}$ , 50 UE e, em seguida, diminui-se este resultado de todas as outras abscissas, de modo que o ponto correspondente a  $EC_{50}$  tenha como abscissa 50 UE. A tabela 2.5.4 apresenta estes valores e a figura 2.5.4 representa graficamente a reta de regressão linear com os valores de X corrigidos ( $X'$ ).

$$X'_{50} = 75.4 \text{ U} \quad \Delta X = X'_{50} - 50 \quad \Delta X = 25.4 \text{ U E}$$

Tabela 2.5.4

X	X'	% E	SD
0	-25.4	0.0	5.3
25	-0.4	3.3	3.3
50	24.6	18.0	5.6
75	49.6	44.7	7.5
74.5	50.0	50.0	—
100	74.6	82.5	4.8
125	99.6	100.0	5.3

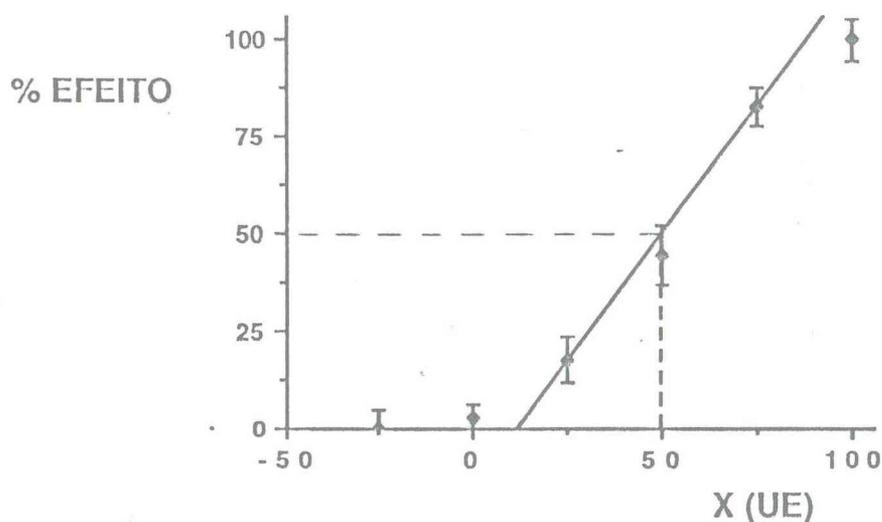


Fig. 2.5.4 - A reta de regressão linear corrigida

### 2.5.5 - O cálculo do valor de "S" por aproximação.

A equação proposta para descrever a curva dose - resposta é:

$$T = \frac{E_m}{1 + S(1 - X'/50)}$$

onde:

T : percentagem do valor esperado.

$E_m$  : percentagem do efeito máximo

S : constante hiperbólica

X' : valor de X corrigido

Os passos da aproximação são:

Passo 1: Incrementando-se o valor de S e fazendo X' assumir os valores correspondentes às concentrações, podemos calcular a percentagem do valor teórico (T) e, a diferença entre esta e a percentagem do efeito (E) para cada ponto experimentalmente determinado. O módulo da diferença  $|E - T|$  deve ser armazenado.

Passo 2: Reexecutando-se o passo 1 podemos calcular o módulo da diferença entre o valor de cada um dos pontos experimentais e o valor teórico obtido no passo 1. O maior valor ( $\Delta M$ ), deve ser armazenado

Passo 3: Reexecuta-se o passo 2 subtraindo o valor de  $\Delta M$  armazenado com o novo valor de  $\Delta M$  até que o módulo desta diferença aumente (o que indica que a curva gerada por este valor de S se afasta de pelo menos um ponto experimental).

Passo 4: Estima-se o valor de  $S$ , subtraindo-se uma unidade do atual valor de  $S$ .

Em princípio, o valor de  $S$  é confiável se o módulo da diferença entre qualquer dos pontos teóricos não ultrapasse o desvio padrão de qualquer dos pontos experimentais correspondentes (Tabela 5.5).

Para  $S = 29$ , o módulo da diferença máxima é igual a 4.6%.

Tabela 5.5

$X'$	$-\text{Log}(D)$	% E	% T	$(E - T)\%$	SD
-25.4	4.5	0.0	0.6	-0.6	5.3
-0.4	4.0	3.3	3.2	0.1	3.3
24.6	3.5	18.0	15.3	2.7	5.6
49.6	3.0	44.7	49.3	-4.6	7.5
50.0	3.0	50.0	50.0	0.0	0.0
74.6	2.5	82.5	84.0	-1.5	4.8
99.6	2.0	100.0	96.6	3.4	5.3

Na tabela abaixo apresentamos os valores para  $S = 28, 29$  e  $30$ , juntamente com os módulos das diferenças. O ponto que limita o incremento de  $S$  está em negrito.

$X'$	%E	$S = 28$	$ (E-T) $	$S = 29$	$ (E-T) $	$\Delta M$	$S = 30$	$ (E-T) $	$\Delta M$
-25.4	0.0	0.653	0.653	0.619	0.619	0.034	0.589	0.5890	0.030
<b>-0.4</b>	<b>3.3</b>	<b>3.361</b>	<b>0.061</b>	<b>3.248</b>	<b>0.052</b>	<b>0.009</b>	<b>3.142</b>	<b>0.158</b>	<b>0.106</b>
24.6	18.0	15.541	2.459	15.309	2.691	0.232	15.087	2.913	0.222
49.6	44.7	49.334	4.634	49.327	4.627	0.007	49.320	4.620	0.007
74.6	82.5	83.746	1.246	83.980	1.480	0.234	84.203	1.703	0.223
99.6	100	96.462	3.538	96.579	3.421	0.117	96.688	3.312	0.109

### 5.5 - Representação gráfica

Dados:  $pD_2 = 3.0$      $S = 29$      $E_m = 100\%$

No ponto correspondente a 50 UE esboçamos o valor de  $pD_2$ . A cada 50 UE à esquerda somamos uma unidade e a cada 50 UE à direita subtraímos uma unidade do valor de  $pD_2$ , de modo que a concentração da dose aumente 100 vezes em 100 UE.

Substituindo-se o valor do efeito máximo e de  $S$  na equação podemos calcular o valor do efeito teórico fazendo  $X'$  variar em torno de 50UE.

Na figura 5.5 além de esboçarmos os valores teóricos (linha contínua), representamos também o valor do efeito e o desvio padrão em função da dose acumulada.

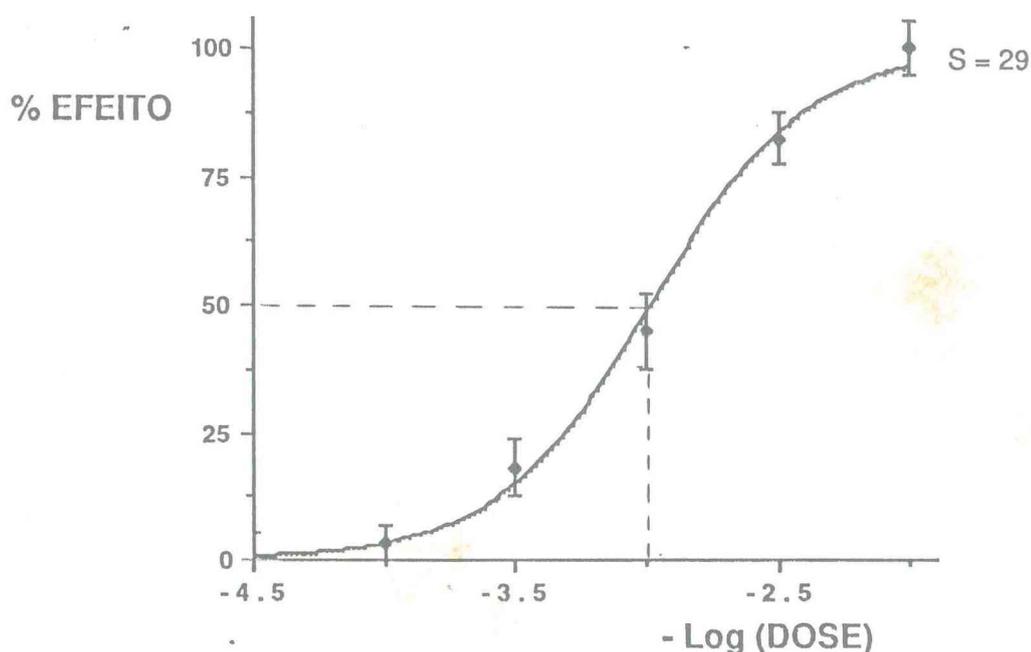
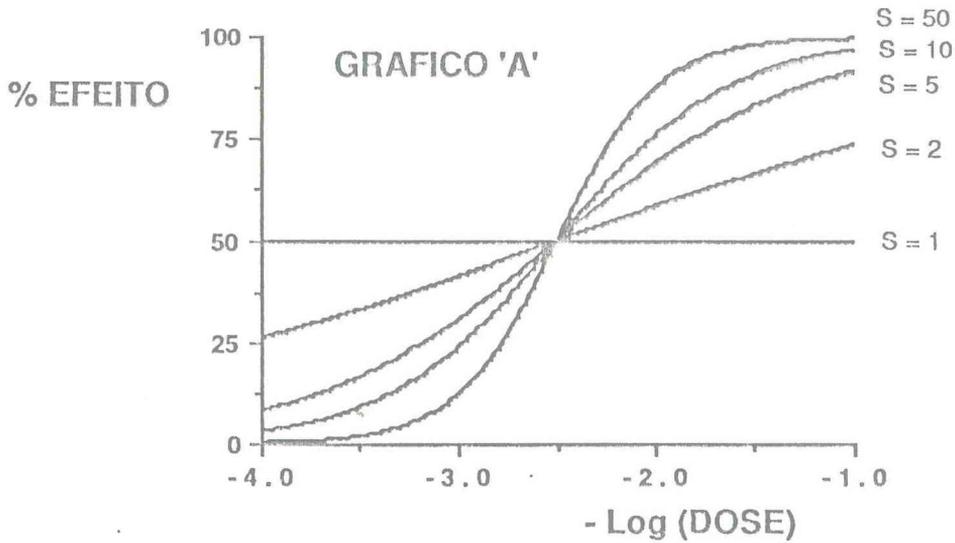


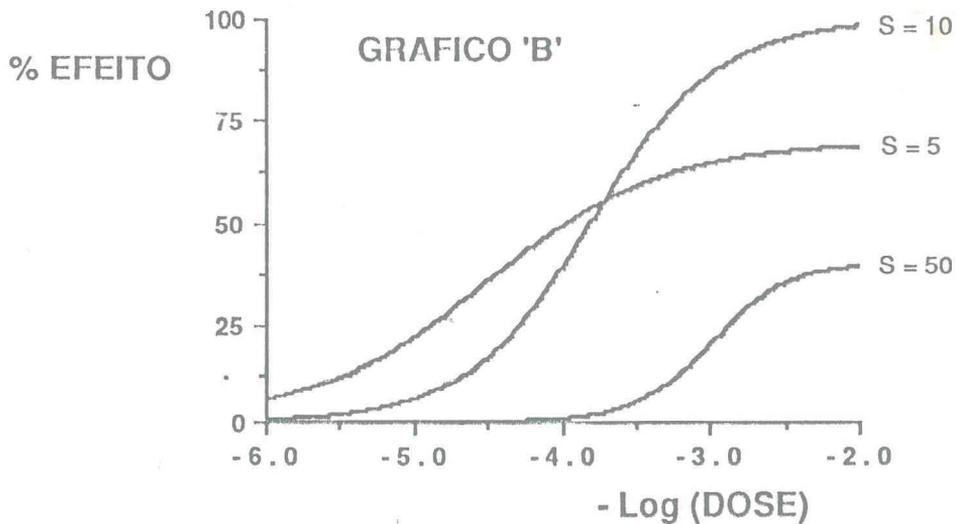
Fig. 5.5 - Curva teórica com os pontos experimentais.

### 5.7 - Alguns exemplos

Os gráficos abaixo são hipotéticos. No Gráfico A mantivemos  $pD_2 = 2.5$  e o EM = 100%, variando apenas S. No Gráfico B variamos os três parâmetros da curva dose-resposta.



$pD_2 = 3.8$	S = 10	EM = 100%
$pD_2 = 4.5$	S = 5	EM = 70%
$pD_2 = 3.0$	S = 50	EM = 40%



### 5.8 - A área da curva experimental

Calculamos a área sob a curva abaixo de  $X'_{50}$  ( $AE_b$ ) e a área sobre a curva acima de  $X'_{50}$  ( $AE_c$ ); a média aritmética entre estas duas áreas é igual à metade da área experimental ( $AE_{/2}$ ). Em princípio, a continuação do procedimento determina que 100 menos a percentagem deste índice (IC) deve ser menor ou igual a duas vezes o desvio padrão médio. Estes valores estão apresentados na tabela 5.8 e na figura 5.8.

Tabela 5.8

X	- Log(conc.)	%E	Area	
0	4.5	0.0	0	$AE_c = 1049$ UE
25	4.0	3.3	41	$AE_b = 1110$ UE
50	3.5	18.0	266	$AE_{/2} = 1080$ UE
75	3.0	44.7	784	IC = 5.5%
75.4	3.0	50.0	19	$2 \times SD = 10.6 \%$
100	2.5	82.5	830	
125	2.0	100.0	219	

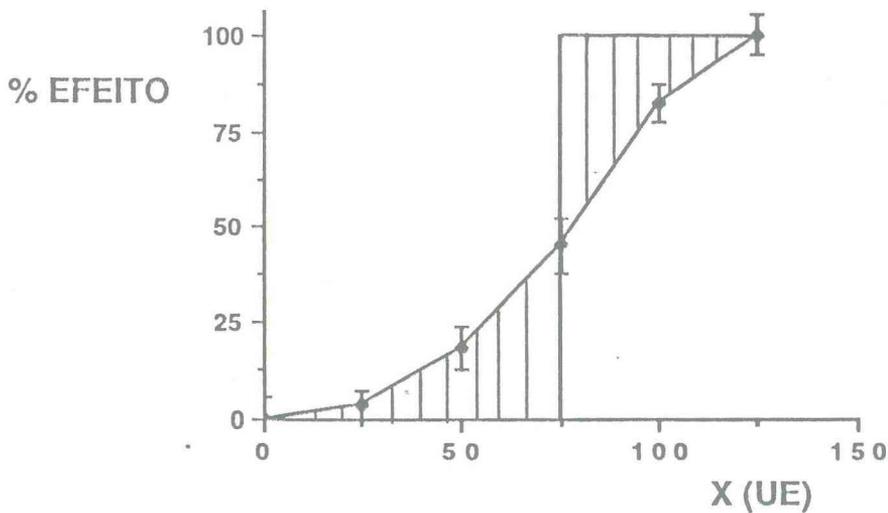


Fig. 5.8 - A área da curva experimental

### 5.9 - O valor de "S" calculado pela área da curva.

A área sob a curva teórica ( $AT_b$ ) pode ser calculada pela integral entre  $(X' - 50)$  até 50 UE. A área sobre a curva acima de 50 UE ( $AT_c$ ) envolve, primeiro a área do retângulo e depois a subtração desta da integral entre 50 e  $(50 + X')$  UE. Podemos demonstrar que a curva é simétrica em torno de 50 UE e, portanto, a área compreendida entre 50 e  $50 - X'$  é igual à área compreendida entre 50 e  $50 + X'$  UE.

O resultado da integral da curva teórica é expresso por:

$$\Lambda = \frac{50 * E_m}{\text{Ln}(S)} \text{Ln} |e^{(1 - X'/50)} + S| + C, \text{ onde } S = 24 + C$$

Calculando-se o valor de S para  $AE_{1/2} = 1080$  UE temos:

$$\text{Ln}(S) = \frac{50 * E_m * \text{Ln} 2}{AT_{1/2}}, \text{ onde } S = 25$$

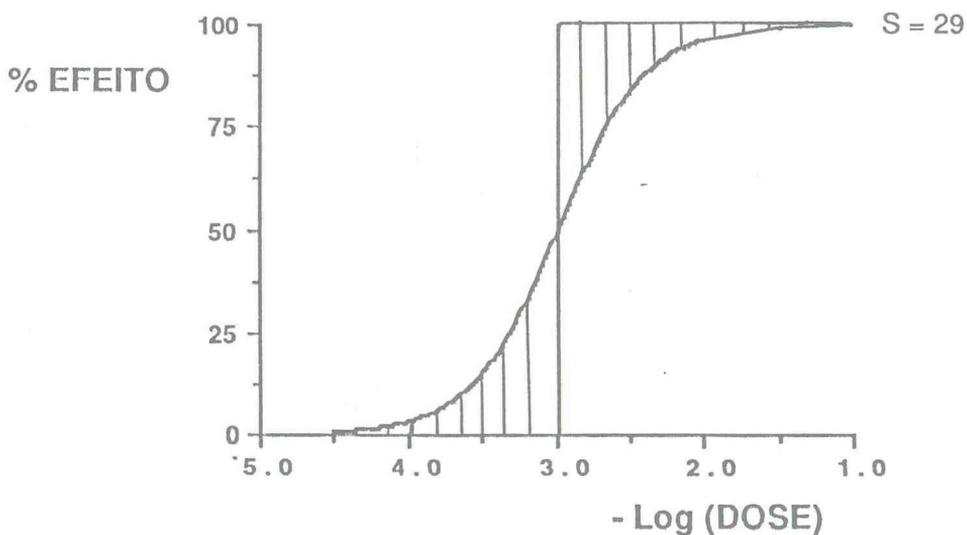
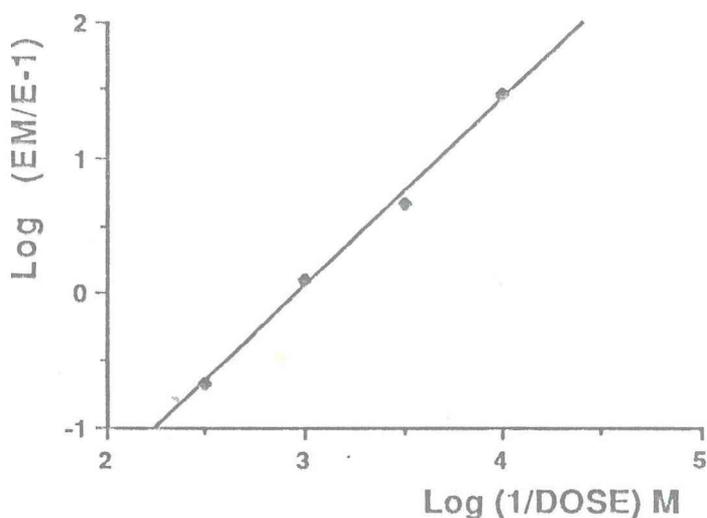


Fig. 5.9 - Area da curva teórica.

### 5.10 - O valor de "S" calculado pelo método de HILL.

Inicialmente esboçamos no eixo das abscissas o  $\text{Log} (1/\text{DOSE})$  e nas ordenadas o  $\text{Log} (E_m/E - 1)$  (ver figura 5.10). Calculamos os coeficientes da equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) pelo método da regressão linear.



$$Y = 1.40 X - 4.2 \quad r^2 = 1.00$$

Figura 5.10 - Gráfico de HILL.

Fazendo  $Y = 0$  podemos calcular o valor de  $pD_2 = 3.0$ , e como consequência, encontramos o valor de  $EC_{50} = 1.0 \times 10^{-3}$  M.

Elevando-se o coeficiente angular (1.40) a 10, encontramos o valor de  $S$ , isto é,  $S = 25$ .

Fazendo  $X = 0$ , podemos calcular a relação entre o efeito máximo e o efeito esperado (no caso igual a 1.00)

Finalmente, substituindo-se os valores no modelo proposto, temos:

$$E = \frac{100}{1 + 25 (pD_x - pD_2)}$$

e, portanto, podemos calcular o efeito para qualquer dose desejada.

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 - Apresentação das tabelas e gráficos

Em todas as tabelas, apresentamos os resultados experimentais e teóricos obtidos de membrana de íleo terminal de coelhos usando a solução de Ringer ou a da WHO com manitol do lado mucoso e Ringer glicose do lado seroso da membrana. Os substratos foram adicionados, de modo que o incremento na concentração obedecesse uma escala logarítmica. Além dos valores de  $pD_2$ , de  $EC_{50}$ , o coeficiente  $S$  (calculado por aproximação) e seu desvio, do Efeito Máximo ( $E_m$ ) em relação à substância que apresentou maior resposta e do valor da variação da resposta com um desvio padrão ( $n-1$ ) apresentamos também a equação da reta de regressão linear juntamente com o coeficiente de correlação ( $r$ ), usada para se definir o ponto correspondente a  $EC_{50}$  (ver Material e Métodos - Modelo matemático da curva dose-resposta - ítem B). O valor da metade da área da curva experimental também é apresentado (ver ítem H) e o cálculo de  $S$  foi feito segundo o procedimento apresentado no ítem I. A equação da reta de regressão linear usando-se o método de HILL foi apresentada, (para diferenciar da equação da reta de regressão dos pontos centrais usamos o indexador  $L$ ), juntamente com o coeficiente de correlação linear. Por fim, calculamos o valor de  $S$  por este método (ver ítem J) e o apresentamos também indexado a  $L$ .

Em todas as Figuras nA, ( $n =$  indexador inteiro) que seguem as tabelas esboçamos os pontos experimentais (logaritmo do inverso da concentração acumulada  $\times$  percentagem do efeito relativo), juntamente com o desvio padrão, e, usando a equação apresentada no ítem E, calculamos e representamos graficamente os pontos teóricos para todas as concentrações compreendidas entre a menor e a maior concentração acumulada no perfusato das câmaras (ver também ítem F).

Nas Figuras nB1 ( $n =$  indexador inteiro) apresentamos nos gráficos de colunas as variações máximas de aumento da  $I_{sc}$  entre os diferentes substratos, e seus respectivos desvios padrão. Nas Figuras nB2 as abscissas e ordenadas são as mesmas usadas nas Figuras nA, exceto que, ao invés de usarmos o valor de  $S$  para o cálculo dos pontos teóricos, nos limitamos a uni-los por um segmento de reta com o objetivo de compararmos com o gráfico da página anterior.

Nas Figuras nC apresentamos os resultados experimentais usando o método gráfico de HILL (no eixo das abscissas representamos o logaritmos do inverso da dose acumulada e, no eixo das ordenadas o logaritmo do efeito máximo dividido pelo efeito correspondente à dose acumulada menos um - Representação duplamente logaritmica). Usando os coeficientes da reta calculamos os valores de  $pD_2$ , da  $EC_{50}$ , de  $S$  e a relação entre o efeito máximo e o efeito acumulado, cuja metodologia já foi apresentada no ítem J (ver modelo matemático da curva dose-resposta).

Nas Figuras nD usamos o modelo gráfico de LINEWEAVER - BURK para a apresentação dos resultados. Neste modelo, o gráfico é feito representando-se, na eixo das abscissas o inverso da dose acumulada e, no eixo das ordenadas, o inverso do efeito correspondente (Representação duplamente inversa). Assim como nas

Figuras nC, apresentamos a reta de regressão linear e o coeficiente de correlação. Com os coeficientes da equação calculamos (quando possível), o valor de K ( $pD_2$ ), a  $EC_{50}$ , e o Efeito máximo esperado.

Além destas tabelas e gráficos, alguns outros também foram apresentados com o objetivo de facilitar a análise e discussão dos resultados (ver 4 - ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS)

## TABELA 1

Coelho califórnia, íleo normal, drogas no lado mucoso.

GLUTAMINA (n = 15)

Conc.(M)	%E	SD	%T	pD <sub>2</sub> = 3.0 S = 29Δ4.6%	EC <sub>50</sub> = 1.0 x 10 <sup>-3</sup> M EmGln = 100%
3 x 10 <sup>-5</sup>	0.0	5.3	0.6	ΔR = 224 ± 37 μA. Y = 1.29X - 48.3 r <sup>2</sup> = 0.99 AE <sub>/2</sub> = 1080 UE S <sub>A</sub> = 25 Y <sub>L</sub> = 1.40X <sub>L</sub> - 4.2 r <sup>2</sup> = 1.00 S <sub>L</sub> = 25	
10 <sup>-4</sup>	3.3	3.3	3.1		
3 x 10 <sup>-4</sup>	18.0	5.6	14.6		
10 <sup>-3</sup>	44.7	7.5	49.3		
3 x 10 <sup>-3</sup>	82.5	4.8	83.2		
10 <sup>-2</sup>	100.0	5.3	96.4		

ALANINA (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	pD <sub>2</sub> = 2.4 S = 23Δ6.1%	EC <sub>50</sub> = 4.3 x 10 <sup>-3</sup> M EmGln = 66%
10 <sup>-4</sup>	0.0	7.0	0.6	ΔR = 148 ± 27 μA. Y = 1.14X - 42.5 r <sup>2</sup> = 0.96 AE <sub>/2</sub> = 1204 UE S <sub>A</sub> = 18 Y <sub>L</sub> = 0.97X <sub>L</sub> - 2.3 r <sup>2</sup> = 0.97 S <sub>L</sub> = 9	
3 x 10 <sup>-4</sup>	9.0	4.8	2.9		
10 <sup>-3</sup>	17.8	9.0	12.4		
3 x 10 <sup>-3</sup>	35.7	8.4	40.5		
10 <sup>-2</sup>	74.6	5.6	76.5		
3 x 10 <sup>-2</sup>	100.0	7.0	94.0		

GLICOSE (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	pD <sub>2</sub> = 3.5 S = 10Δ4.1%	EC <sub>50</sub> = 3.3 x 10 <sup>-4</sup> M EmGln = 35%
10 <sup>-5</sup>	0.0	10.3	3.0	ΔR = 80 ± 35 μA. Y = 1.20X - 40.8 r <sup>2</sup> = 1.00 AE <sub>/2</sub> = 1400 UE S <sub>A</sub> = 12 Y <sub>L</sub> = 0.96X <sub>L</sub> - 3.4 r <sup>2</sup> = 0.98 S <sub>L</sub> = 9	
3 x 10 <sup>-5</sup>	12.5	10.1	8.8		
10 <sup>-4</sup>	19.7	7.9	23.5		
3 x 10 <sup>-4</sup>	47.4	14.9	49.2		
10 <sup>-3</sup>	79.5	11.4	75.4		
3 x 10 <sup>-3</sup>	89.8	7.3	90.7		
10 <sup>-2</sup>	100.0	10.3	96.8		

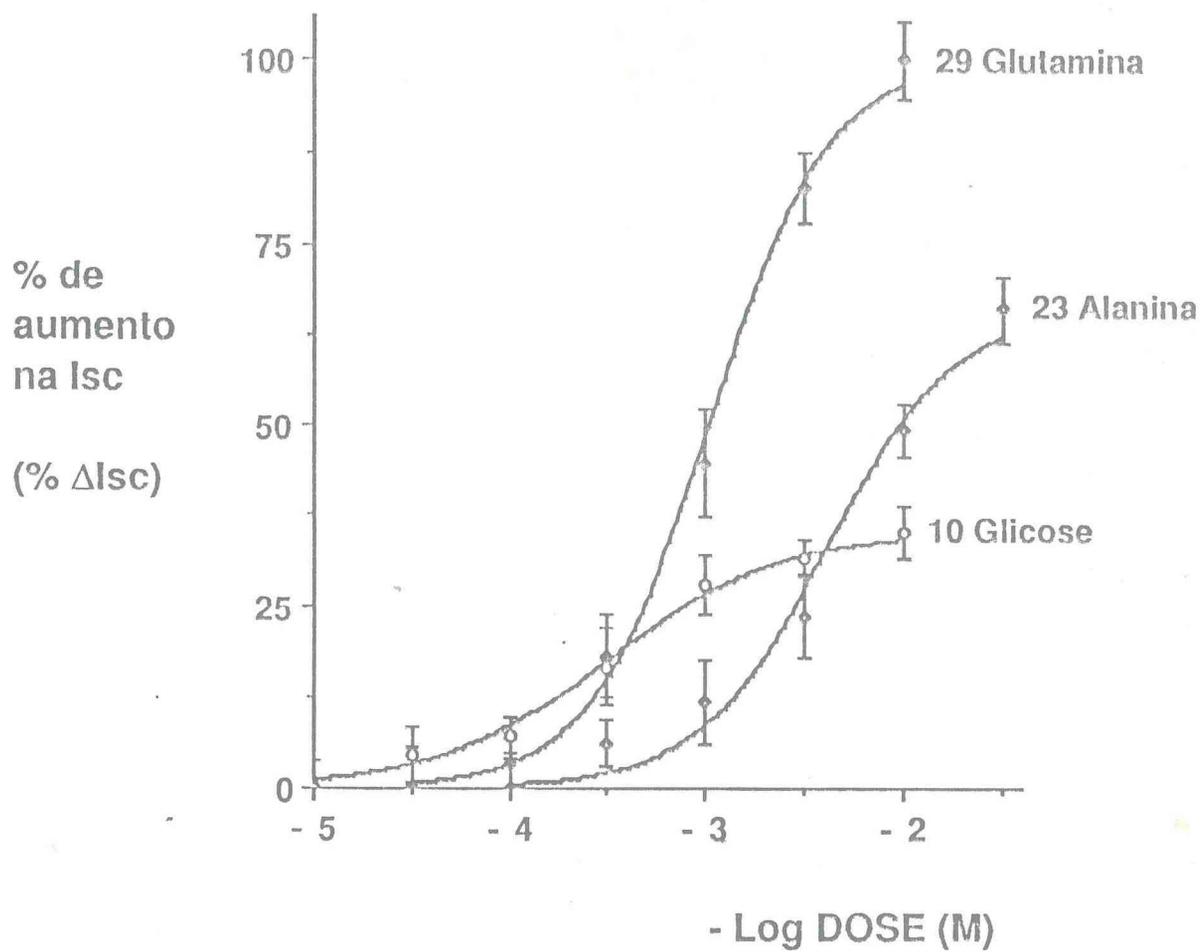


Figura 1A - Ringer normal. Drogas no lado mucoso.

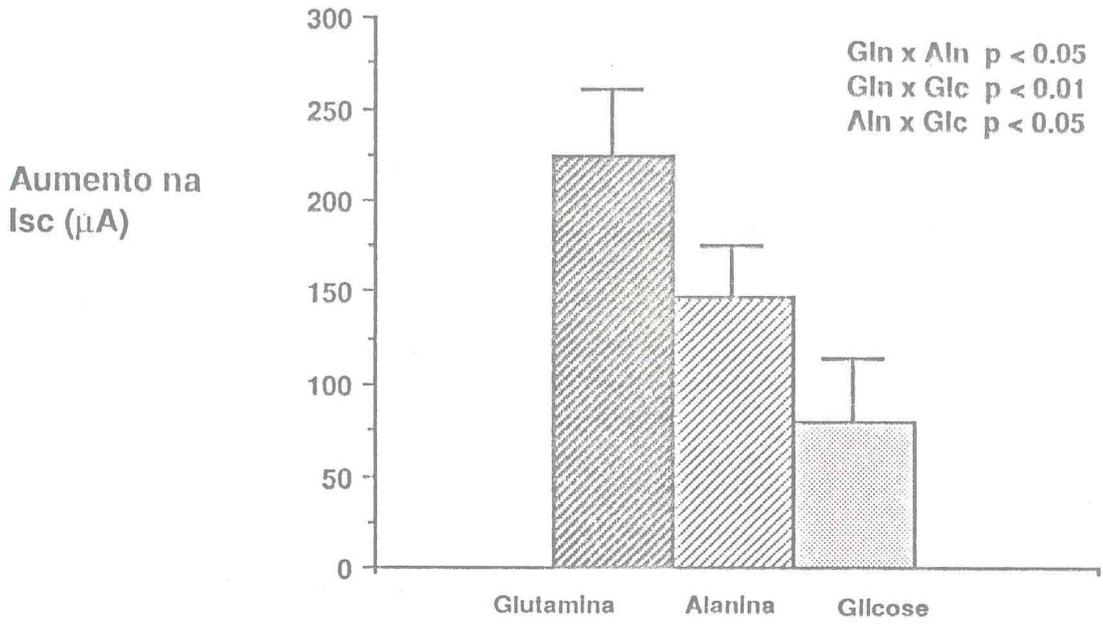


Figura 1B1 - Respostas máximas das drogas nas variações da corrente de curto circuito.

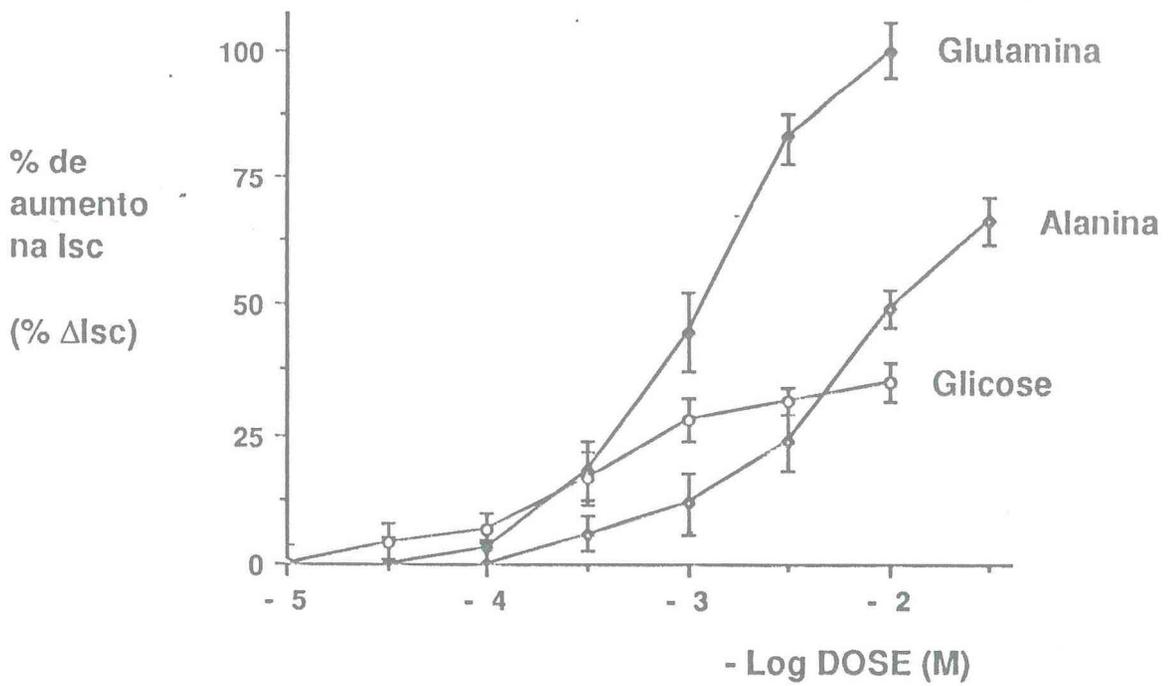


Figura 1B2 - % de aumento na Isc. Drogas no lado mucoso.

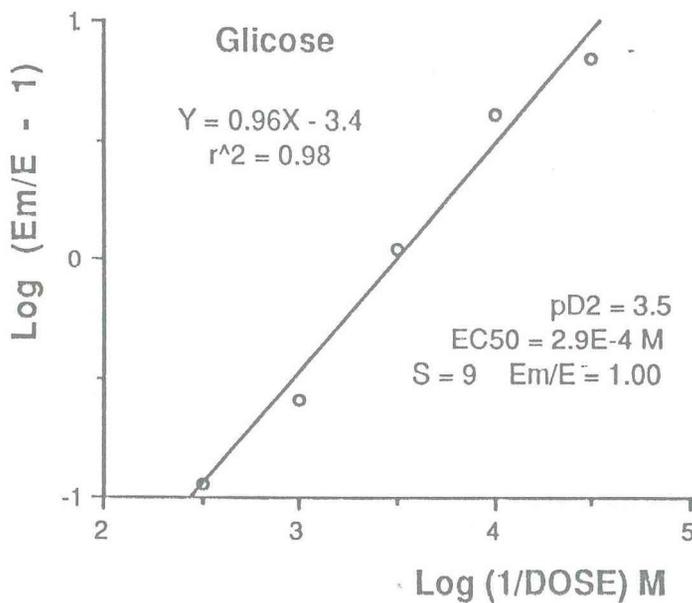
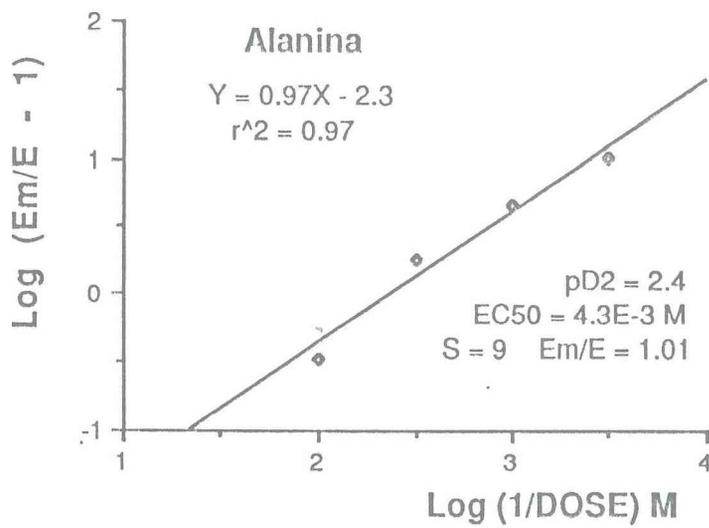
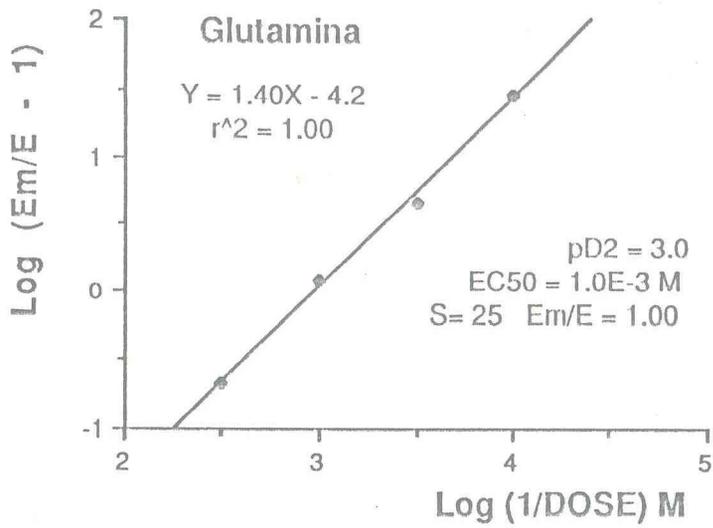


Figura 1C - Gráfico de Hill.  
Drogas no lado mucoso.

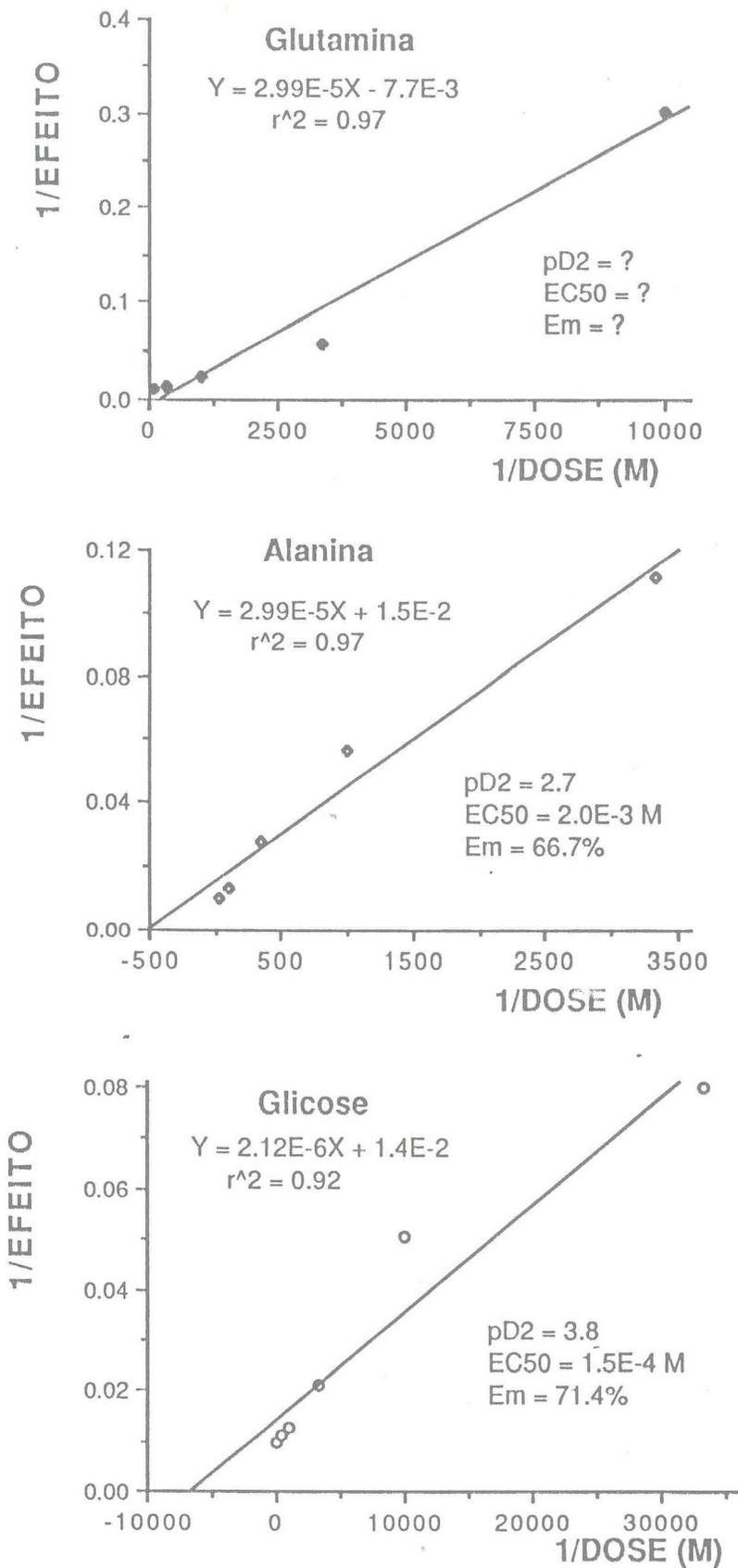


Figura 1D - Gráfico de Lineweaver-Burk.  
 Drogas no lado mucoso.

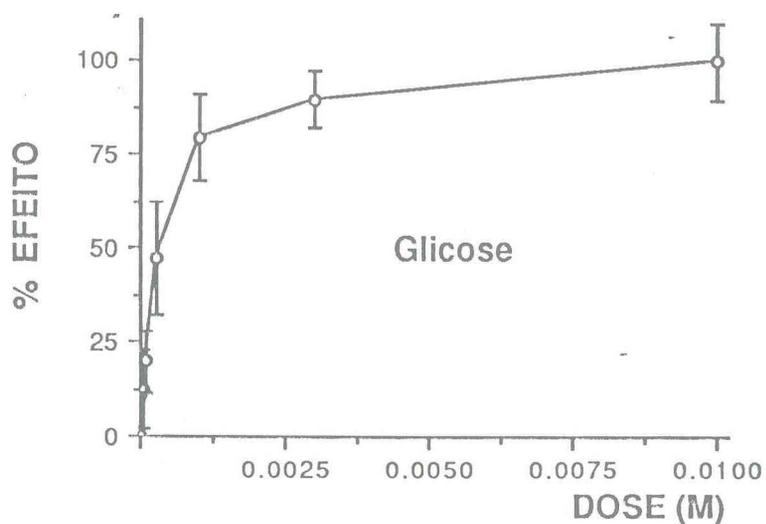
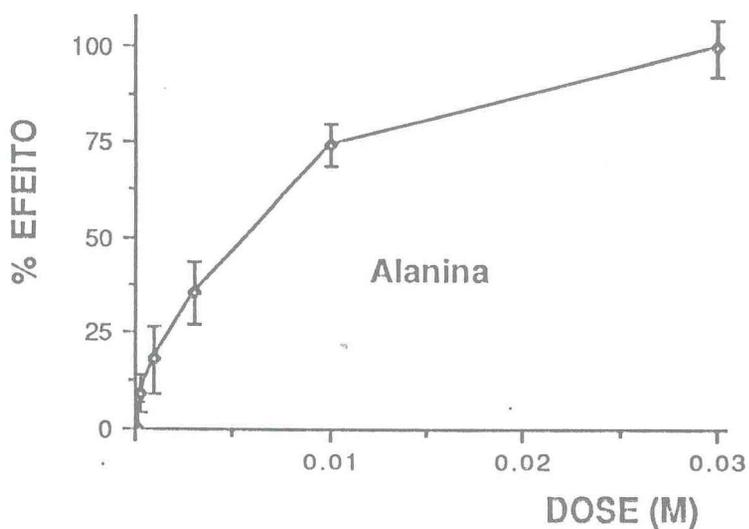
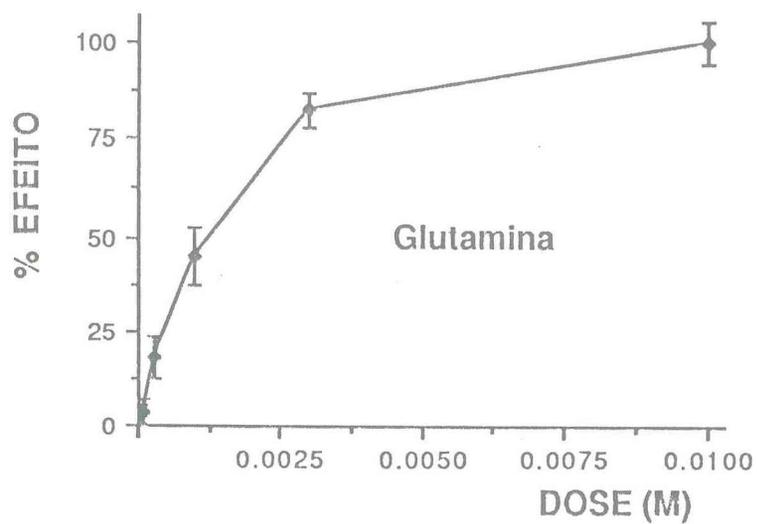


Figura 1E - Gráfico de Michaelis-Menten.  
Drogas no lado mucoso.

## TABELA 2

Coelho Califórnia, íleo normal, drogas no lado seroso.

ALANINA (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				pD <sub>2</sub> = 2.2    EC <sub>50</sub> = 6.4 x 10 <sup>-3</sup> M S = 56Δ5.7%    Em <sub>Aln</sub> = 100%
10 <sup>-4</sup>	0.0	8.8	0.1	ΔR = 71 ± 33 μA.
3 x 10 <sup>-4</sup>	2.6	6.7	0.5	Y = 1.18X - 56.4    r <sup>2</sup> = 0.99
10 <sup>-3</sup>	4.4	5.3	3.8	AE <sub>/2</sub> = 1006 UE    S <sub>A</sub> = 31
3 x 10 <sup>-3</sup>	28.4	10.9	22.8	Y <sub>L</sub> = 1.27X <sub>L</sub> - 2.7    r <sup>2</sup> = 0.96
10 <sup>-2</sup>	63.4	12.3	68.8	S <sub>L</sub> = 19
3 x 10 <sup>-2</sup>	100.0	8.8	94.3	

GLUTAMINA (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				pD <sub>2</sub> = 2.8    EC <sub>50</sub> = 1.5 x 10 <sup>-3</sup> M S = 21Δ8.2%    Em <sub>Aln</sub> = 42%
3 x 10 <sup>-5</sup>	0.0	11.1	0.6	ΔR = 30 ± 12 μA.
10 <sup>-4</sup>	3.5	10.5	2.5	Y = 0.89X - 25.9    r <sup>2</sup> = 1.00
3 x 10 <sup>-4</sup>	18.5	12.8	10.4	AE <sub>/2</sub> = 1319 UE    S <sub>A</sub> = 14
10 <sup>-3</sup>	41.0	9.2	34.8	Y <sub>L</sub> = 1.10X <sub>L</sub> - 3.1    r <sup>2</sup> = 0.97
3 x 10 <sup>-3</sup>	63.0	11.9	71.0	S <sub>L</sub> = 13
10 <sup>-2</sup>	100.0	11.1	91.8	

GLICOSE (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	
			Em <sub>Aln</sub> = 5%
10 <sup>-5</sup>	0.0	10.0	ΔR = 7 ± 6 μA.
3 x 10 <sup>-5</sup>	20.0	20.0	
10 <sup>-4</sup>	70.0	30.0	
3 x 10 <sup>-4</sup>	30.0	15.0	
10 <sup>-3</sup>	40.0	20.0	
3 x 10 <sup>-3</sup>	90.0	40.0	
10 <sup>-2</sup>	100.0	30.0	

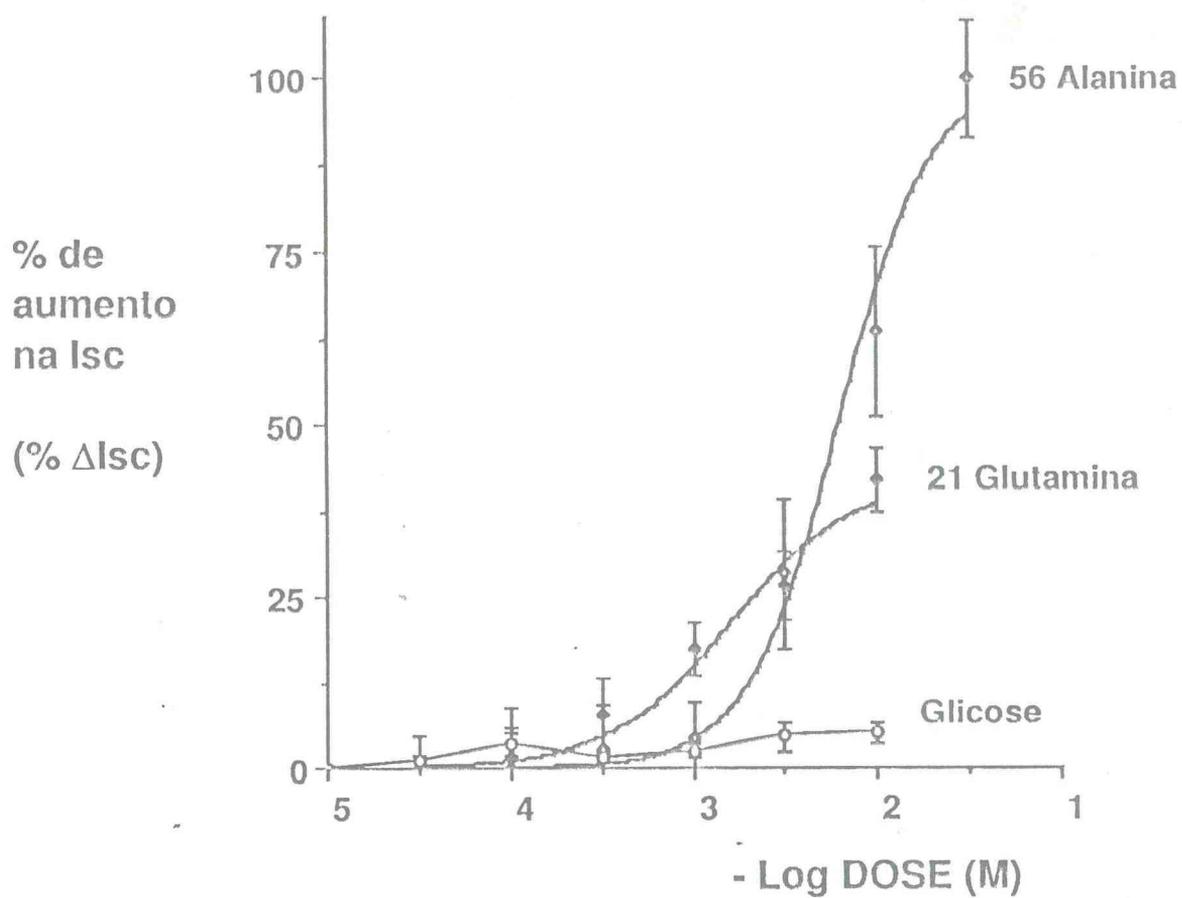


Figura 2A - Ringer normal.  
Drogas no lado seroso.

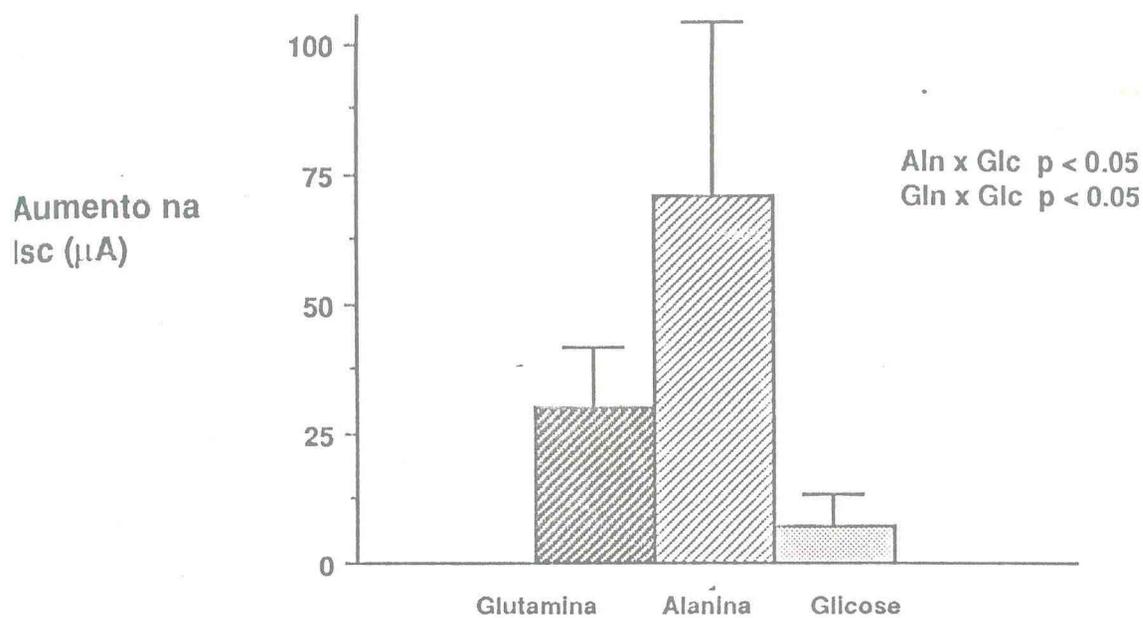


Figura 2B1 - Respostas máximas das drogas nas variações da corrente de curto circuito.

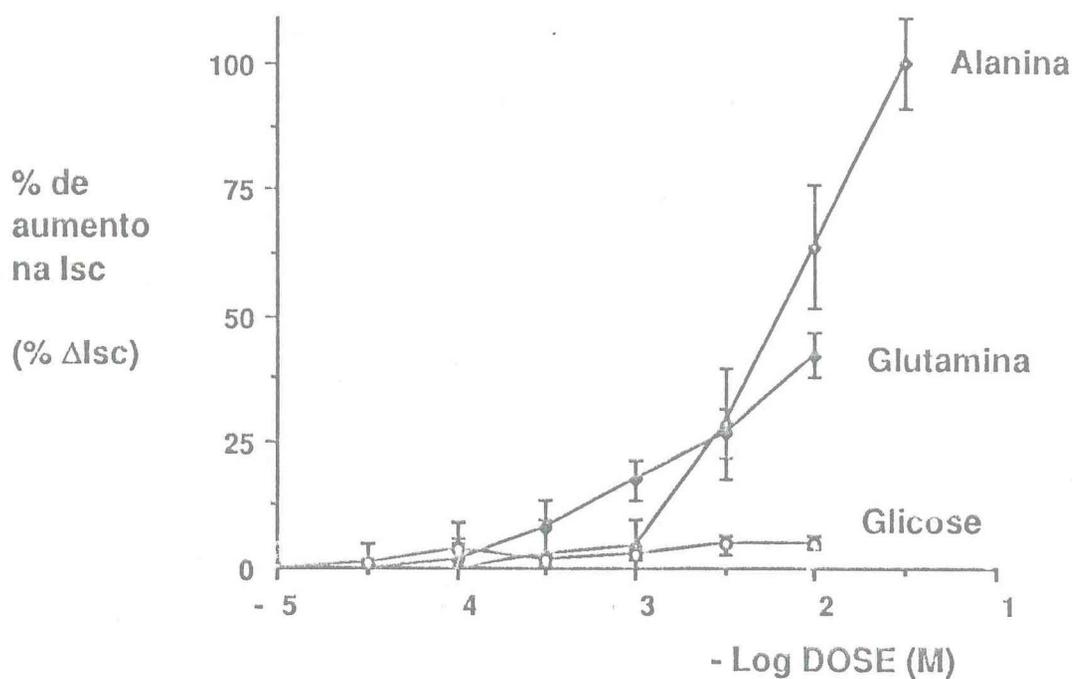
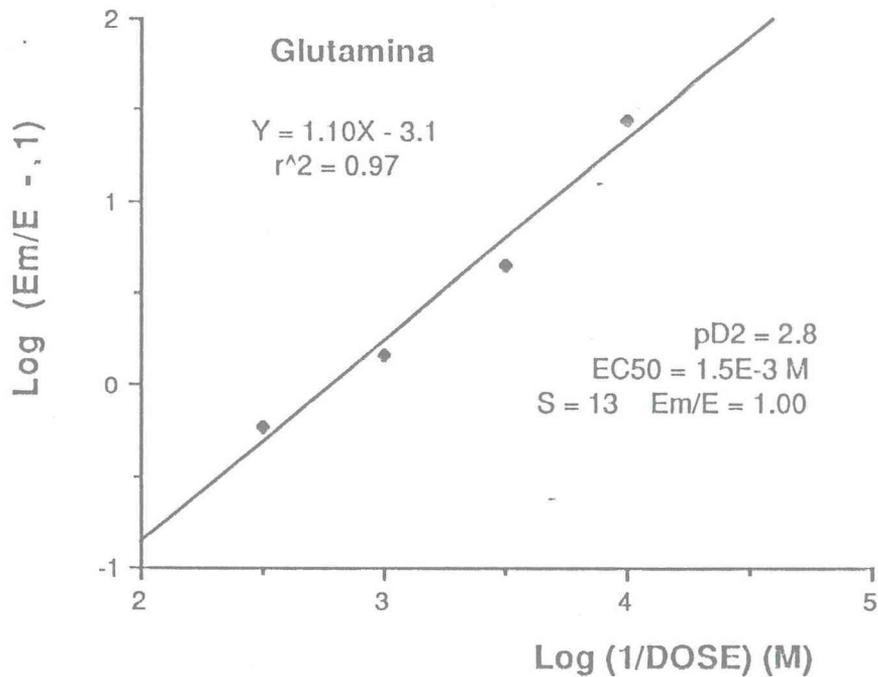
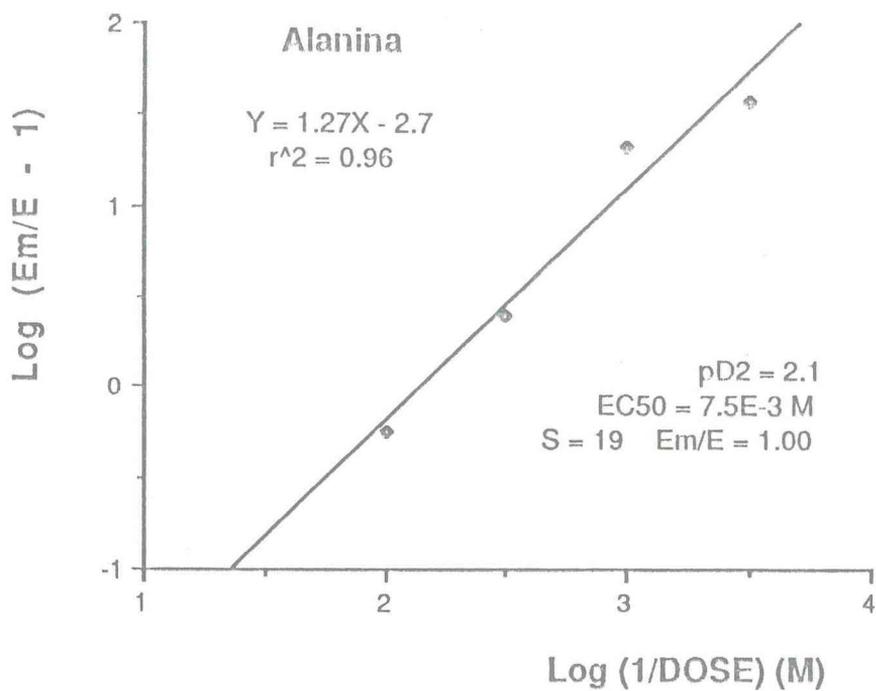


Figura 2B2 - % de aumento na Isc.  
Drogas no lado seroso.



**Figura 2C - Gráfico de Hill.  
Drogas no lado seroso.**

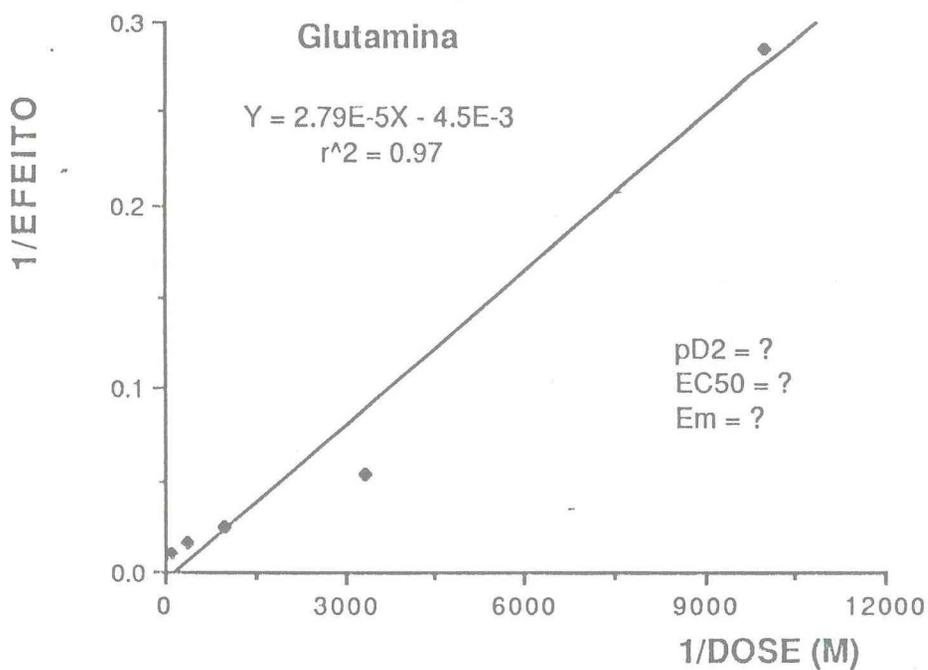
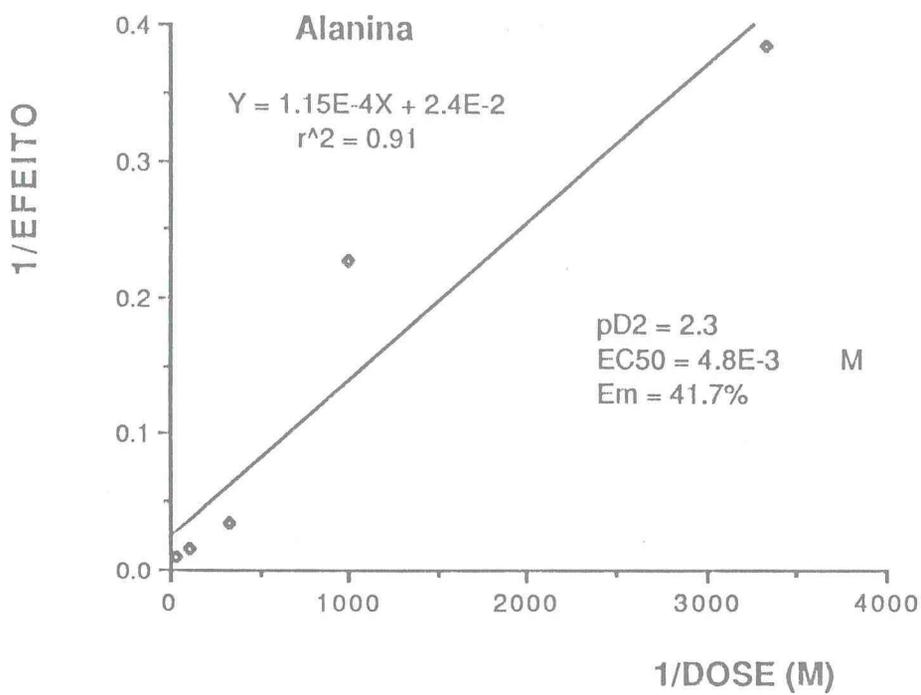


Figura 2D - Gráfico de Lineweaver-Burk.  
 Drogas no lado seroso.

## TABELA 3

Coelho Califórnia, íleo normal, drogas no lado mucoso e seroso.

ALANINA (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				pD <sub>2</sub> = 2.4    EC <sub>50</sub> = 4.4 x 10 <sup>-3</sup> M S = 38Δ4.2%    Em <sub>Aln</sub> = 100%
10 <sup>-4</sup>	0.0	6.4	0.3	ΔR = 251 ± 26 μA.
3 x 10 <sup>-4</sup>	3.0	8.0	1.6	Y = 1.24X - 51.6    r <sup>2</sup> = 0.98
10 <sup>-3</sup>	13.0	5.9	8.9	AE <sub>/2</sub> = 852 UE    S <sub>A</sub> = 58
3 x 10 <sup>-3</sup>	36.3	5.6	37.6	Y <sub>L</sub> = 1.31X <sub>L</sub> - 3.1    r <sup>2</sup> = 1.00
10 <sup>-2</sup>	75.0	6.2	78.8	S <sub>L</sub> = 20
3 x 10 <sup>-2</sup>	100.0	6.4	95.8	

GLUTAMINA (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				pD <sub>2</sub> = 2.5    EC <sub>50</sub> = 2.8 x 10 <sup>-3</sup> M S = 48Δ8.4%    Em <sub>Aln</sub> = 65%
3 x 10 <sup>-5</sup>	0.0	3.1	0.1	ΔR = 163 ± 28 μA.
10 <sup>-4</sup>	0.7	2.1	0.5	Y = 1.52X - 93.1    r <sup>2</sup> = 0.98
3 x 10 <sup>-4</sup>	6.4	2.6	3.2	AE <sub>/2</sub> = 1032 UE    S <sub>A</sub> = 29
10 <sup>-3</sup>	24.0	4.6	18.5	Y <sub>L</sub> = 1.45X <sub>L</sub> - 3.8    r <sup>2</sup> = 0.98
3 x 10 <sup>-3</sup>	52.7	3.0	61.1	S <sub>L</sub> = 28
10 <sup>-2</sup>	100.0	3.1	91.6	

GLICOSE (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				pD <sub>2</sub> = 2.9    EC <sub>50</sub> = 1.3 x 10 <sup>-3</sup> M S = 49Δ3.2%    Em <sub>Aln</sub> = 40%
10 <sup>-4</sup>	0.0	5.7	1.2	ΔR = 100 ± 7 μA.
3 x 10 <sup>-4</sup>	9.0	4.6	8.1	Y = 1.38X - 27.6    r <sup>2</sup> = 0.99
10 <sup>-3</sup>	37.3	7.0	38.1	AE <sub>/2</sub> = 967 UE    S <sub>A</sub> = 36
3 x 10 <sup>-3</sup>	78.1	5.6	81.2	Y <sub>L</sub> = 1.56X <sub>L</sub> - 4.4    r <sup>2</sup> = 1.00
10 <sup>-2</sup>	100.0	5.7	96.8	S <sub>L</sub> = 36

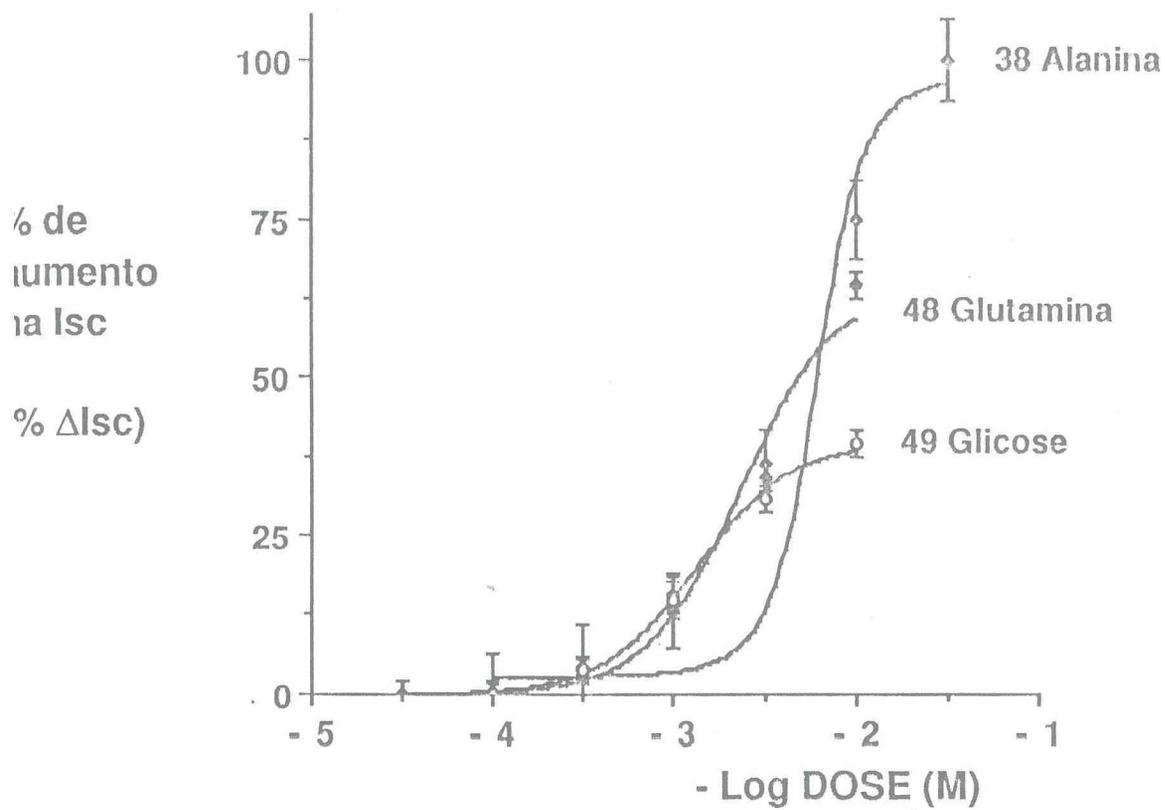


Figura 3A - Ringer normal.  
Drogas no lado mucoso/seroso.

imento na  
: ( $\Delta\mu\text{A}$ )



Figura 3B1 - Respostas máximas das drogas nas variações da corrente de curto circuito.

% de  
aumento  
na Isc  
(%  $\Delta\text{Isc}$ )

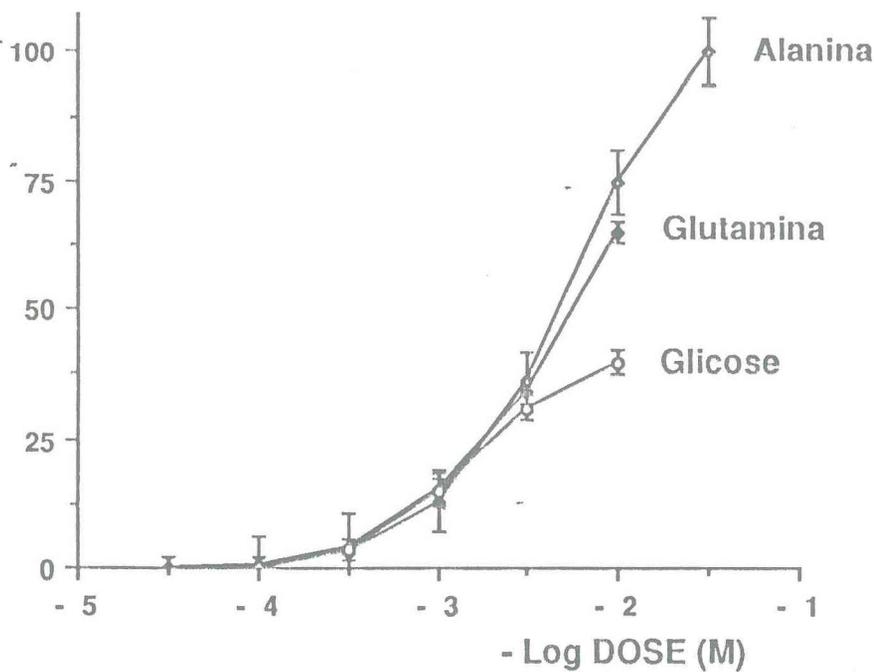
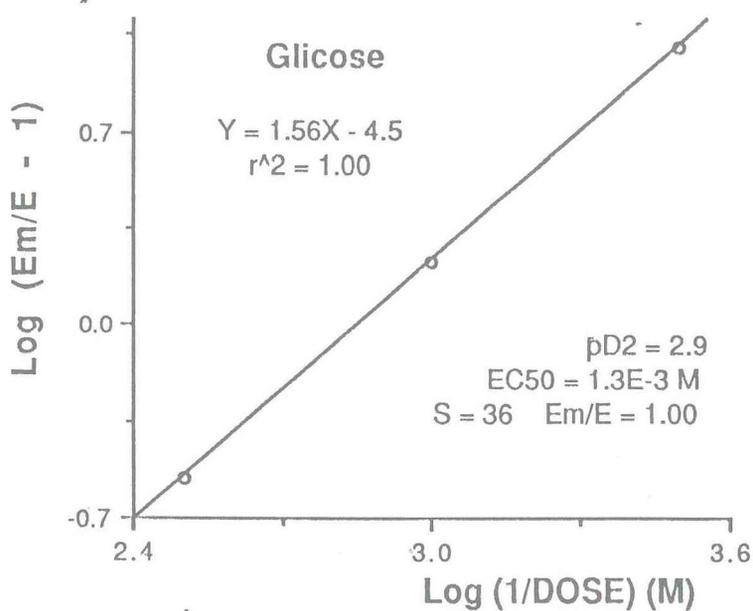
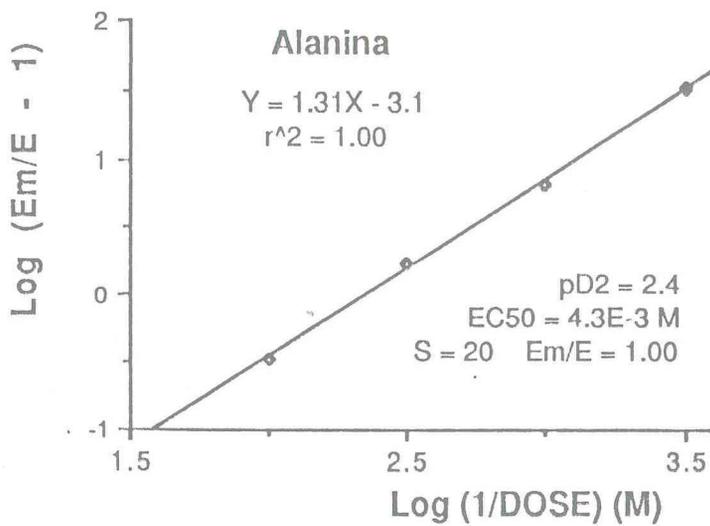
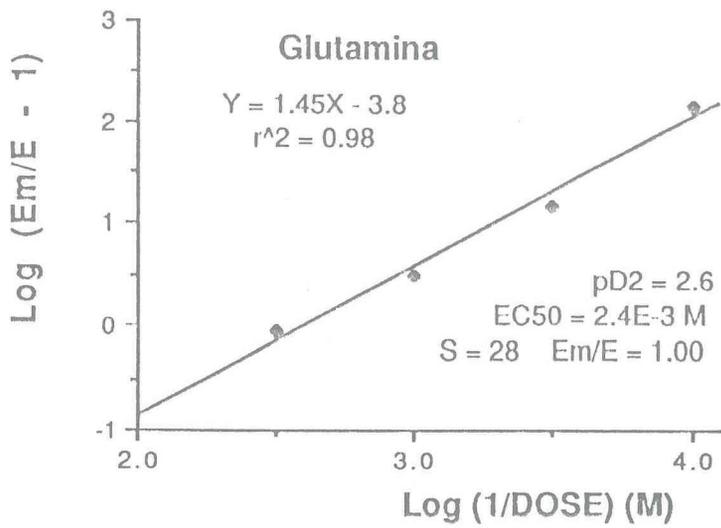


Figura 3B2 - % de aumento na Isc.  
Drogas no lado mucoso/seroso.



**Figura 3C - Gráfico de Hill.**  
**Drogas no lado mucoso/seroso.**

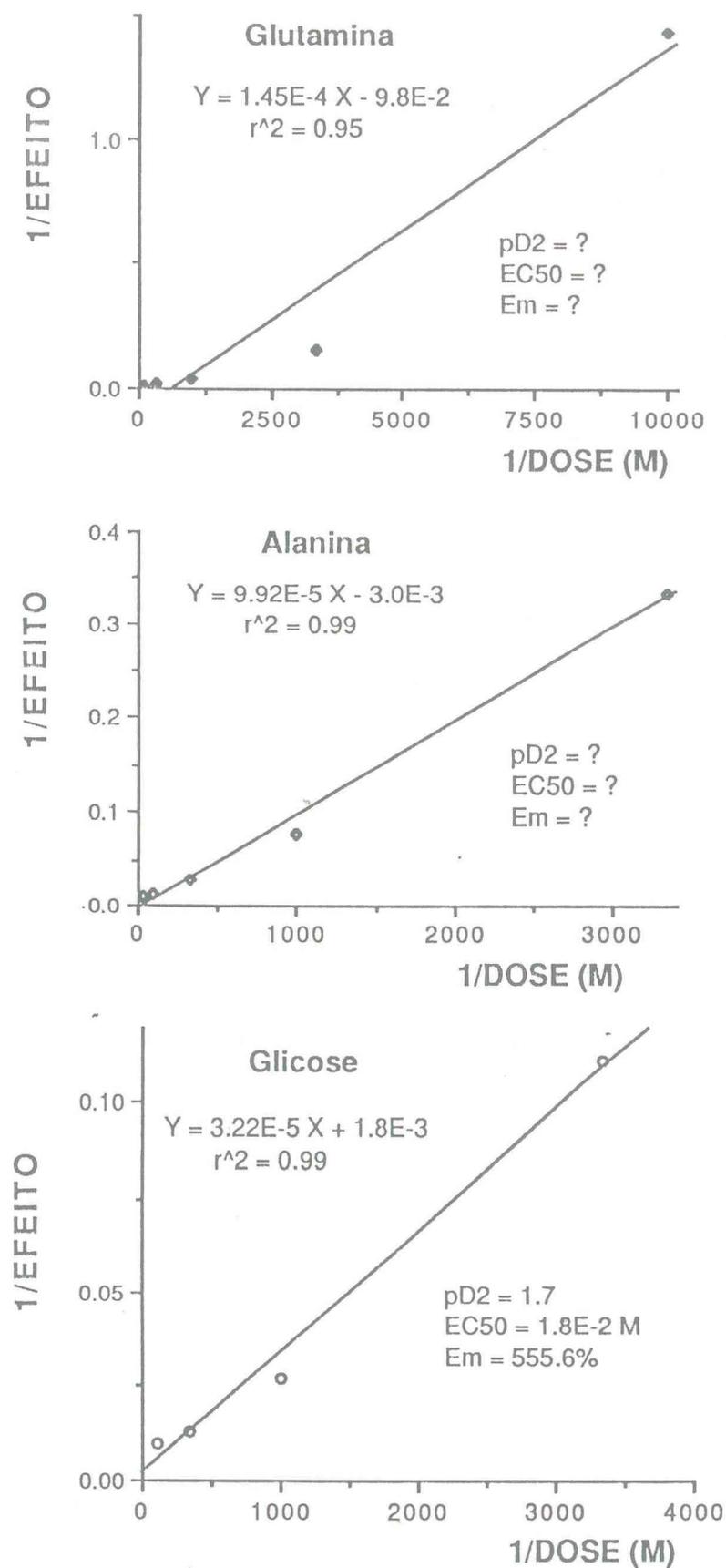
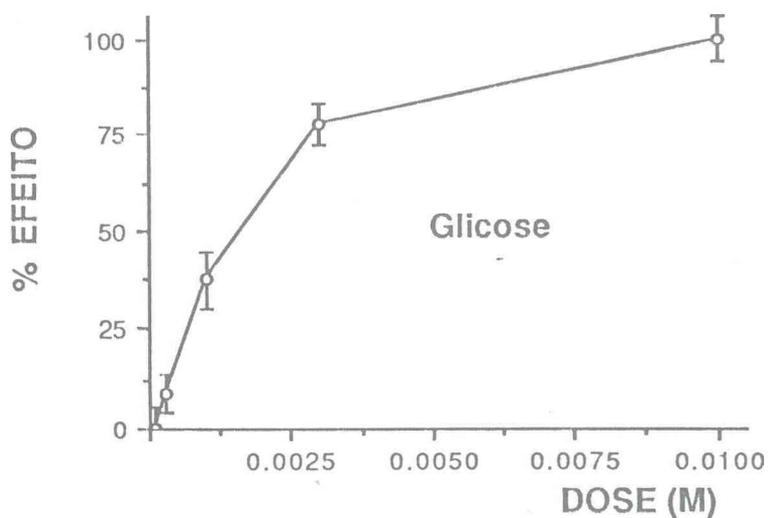
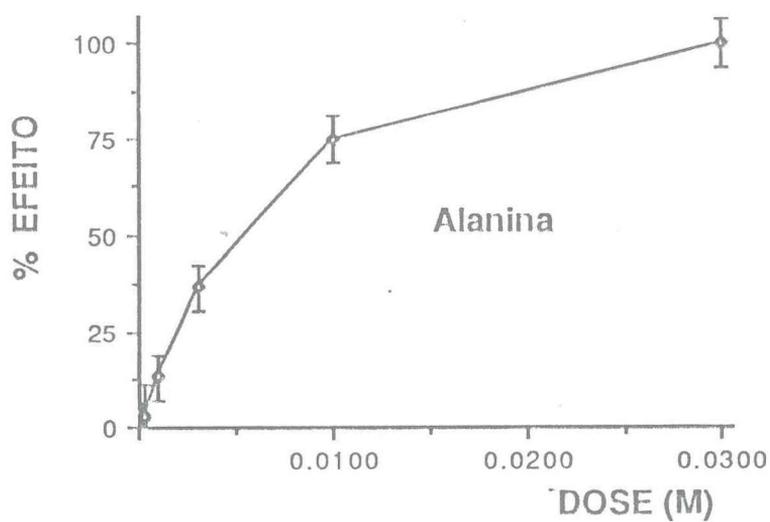
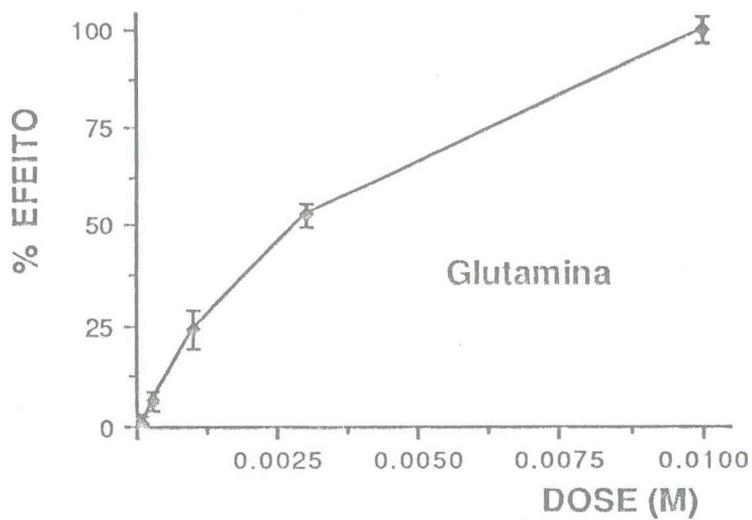


Figura 3D - Gráfico de Lineweaver-Burk.  
 Drogas no lado mucoso/seroso.



Figuras 3E - Gráfico da equação de ARIENS.  
Drogas do lado mucoso/seroso.

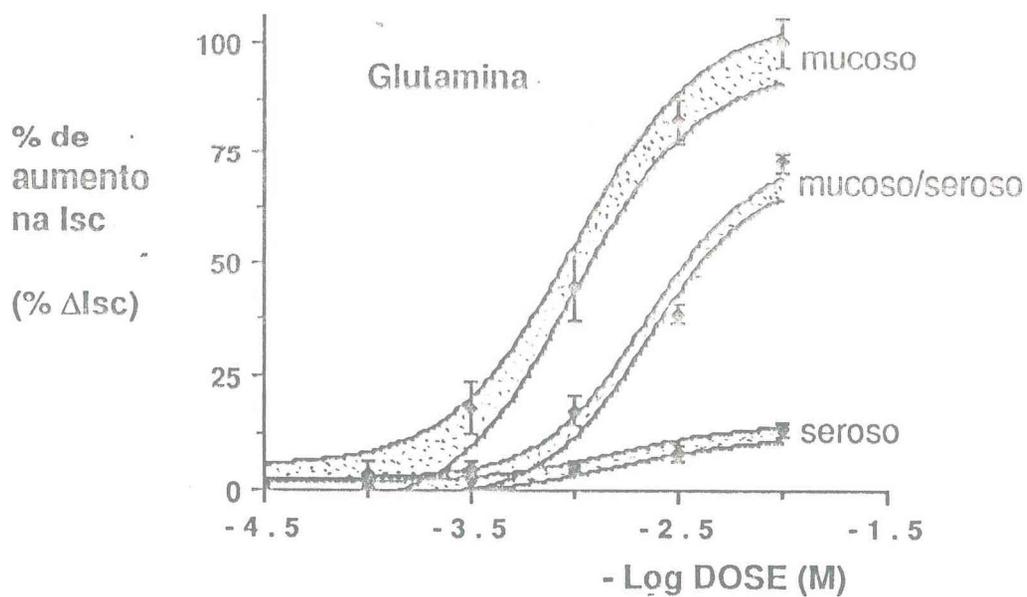
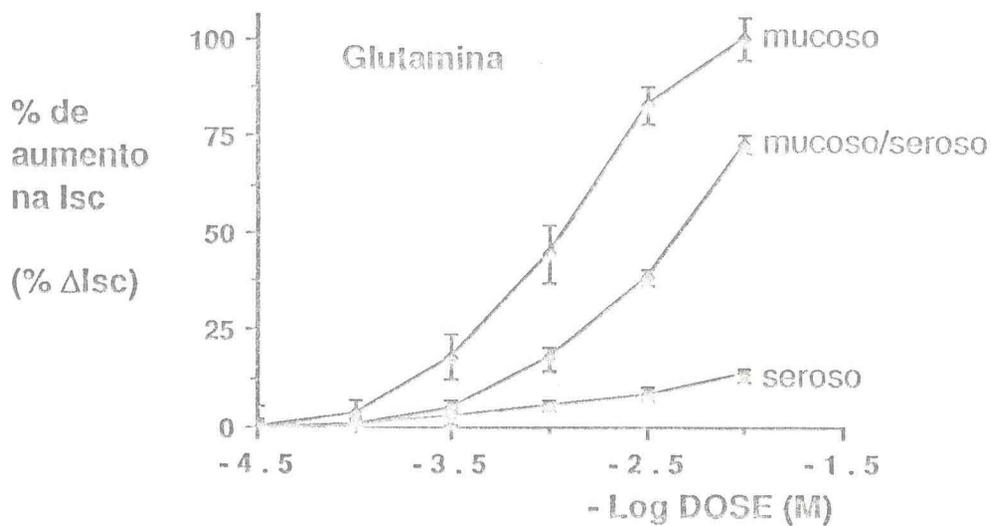


Figura 3F - Glutamina nos lados mucoso, seroso e mucoso/seroso.

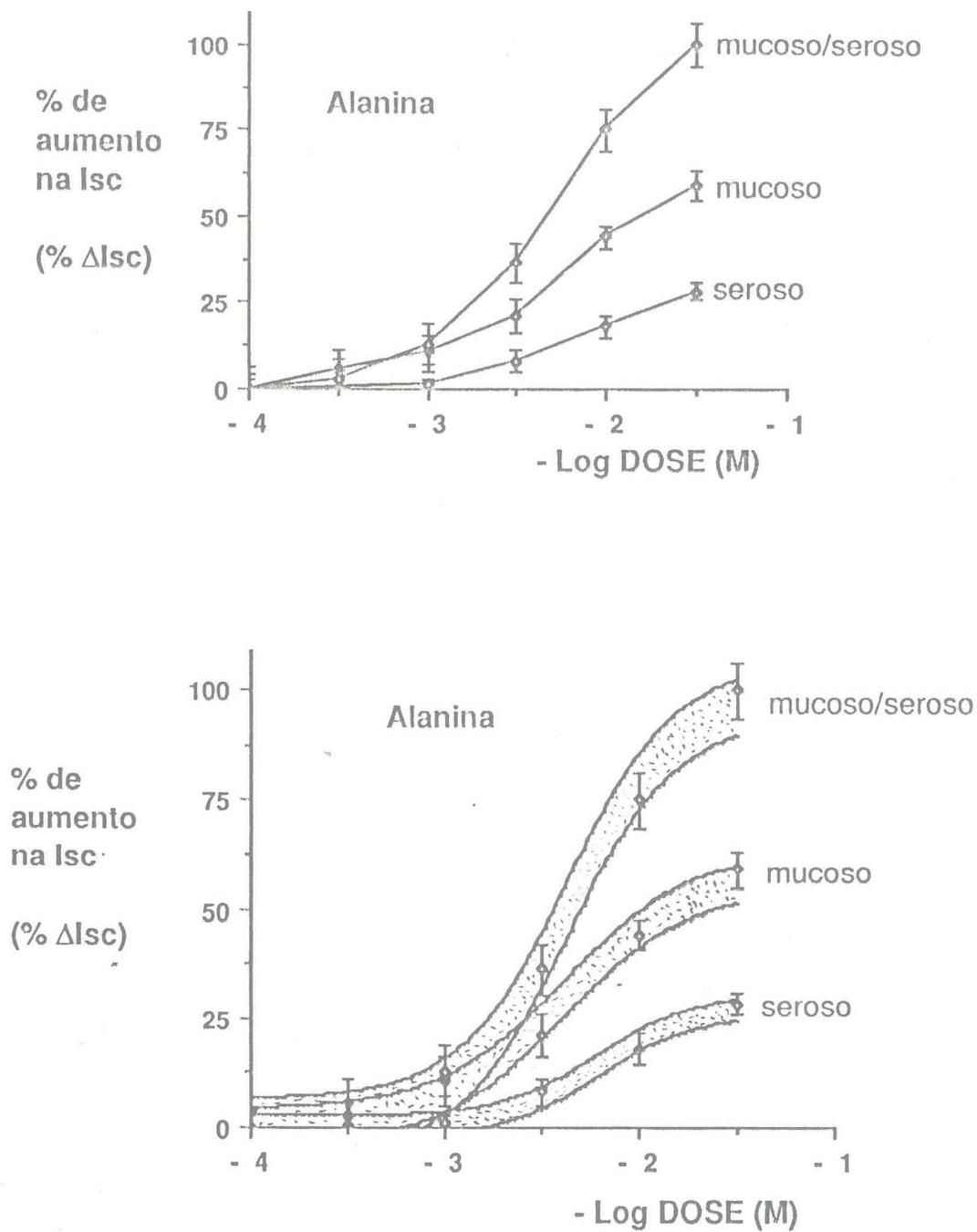


Figura 3G - Alanina nos lados mucoso, seroso e mucoso/seroso.

## TABELA 4

Coelho Califórnia, íleo normal, drogas no lado mucoso, Colina/Na<sup>+</sup>:1/1ALANINA (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				pD <sub>2</sub> = 2.0    EC <sub>50</sub> = 1.0 x 10 <sup>-2</sup> M S = 66Δ12.2%    Em <sub>Δln</sub> = 100%
10 <sup>-4</sup>	0.0	9.9	0.0	ΔR = 45 ± 18 μA.
3 x 10 <sup>-4</sup>	6.0	12.0	0.2	Y = 0.82X - 33.2    r <sup>2</sup> = 0.93
10 <sup>-3</sup>	11.0	3.5	1.3	ΔE <sub>/2</sub> = 1121 UE    S <sub>A</sub> = 22
3 x 10 <sup>-3</sup>	22.0	13.0	9.8	Y <sub>L</sub> = 0.81X <sub>L</sub> - 1.6    r <sup>2</sup> = 0.97
10 <sup>-2</sup>	52.0	11.0	46.9	S <sub>L</sub> = 6
3 x 10 <sup>-2</sup>	100.0	9.9	87.8	

GLUTAMINA (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				pD <sub>2</sub> = 2.8    EC <sub>50</sub> = 1.5 x 10 <sup>-3</sup> M S = 14Δ10.6%    Em <sub>Δln</sub> = 96%
3 x 10 <sup>-5</sup>	0.0	12.6	1.2	ΔR = 43 ± 16 μA.
10 <sup>-4</sup>	5.3	10.0	4.3	Y = 0.80X - 17.0    r <sup>2</sup> = 0.97
3 x 10 <sup>-4</sup>	25.0	18.0	14.4	ΔE <sub>/2</sub> = 1378 UE    S <sub>A</sub> = 12
10 <sup>-3</sup>	39.0	13.5	38.7	Y <sub>L</sub> = 0.97X <sub>L</sub> - 2.8    r <sup>2</sup> = 0.96
3 x 10 <sup>-3</sup>	65.0	9.0	70.2	S <sub>L</sub> = 9
10 <sup>-2</sup>	100.0	12.6	89.8	

GLICOSE (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				pD <sub>2</sub> = 3.0    EC <sub>50</sub> = 1.1 x 10 <sup>-3</sup> M S = 31Δ3.7%    Em <sub>Δln</sub> = 51%
3 x 10 <sup>-5</sup>	0.0	7.6	0.5	ΔR = 23 ± 12 μA.
10 <sup>-4</sup>	3.0	6.0	2.7	Y = 1.28X - 49.0    r <sup>2</sup> = 0.99
3 x 10 <sup>-4</sup>	17.0	13.0	13.3	ΔE <sub>/2</sub> = 1082 UE    S <sub>A</sub> = 24
10 <sup>-3</sup>	43.0	8.2	46.0	Y <sub>L</sub> = 1.40X <sub>L</sub> - 4.1    r <sup>2</sup> = 1.00
3 x 10 <sup>-3</sup>	81.0	3.1	82.6	S <sub>L</sub> = 25
10 <sup>-2</sup>	100.0	7.6	96.3	

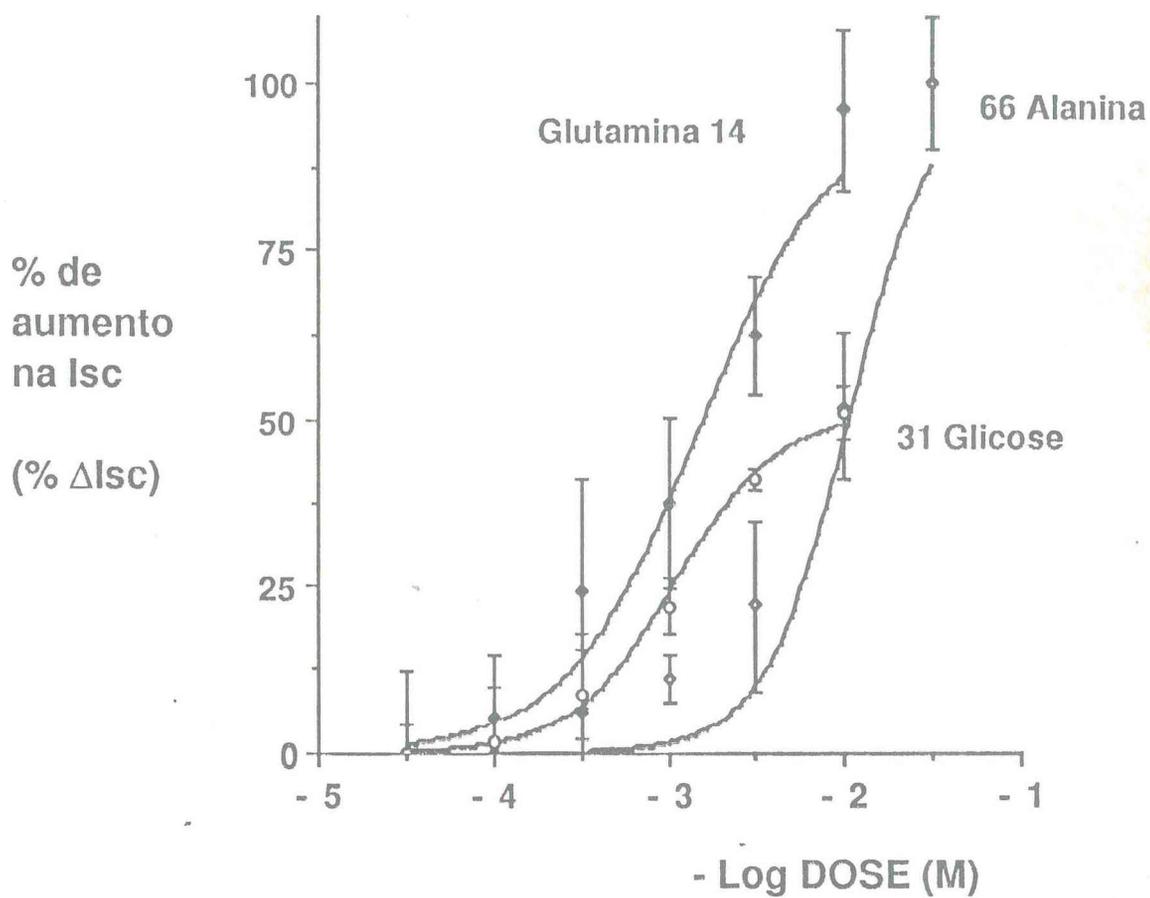


Figura 4A - Drogas no lado mucoso. Ringer colina/ Na<sup>+</sup> : 1/1

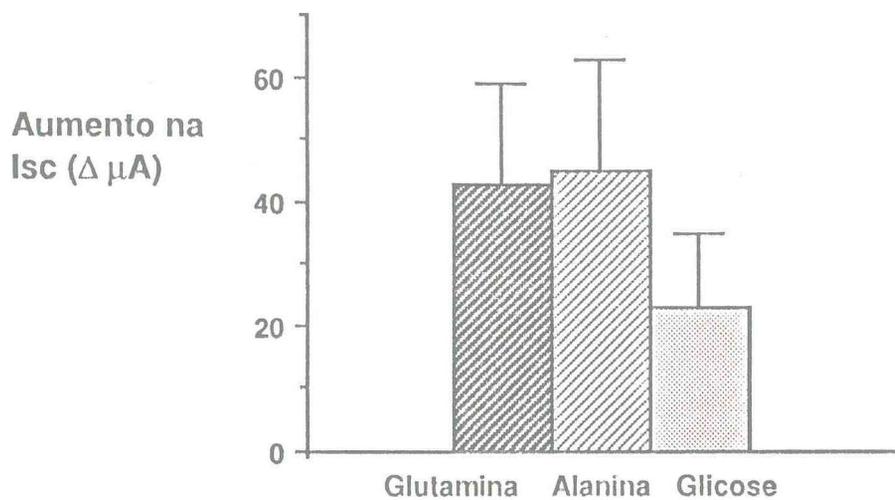


Figura 4B1 - Respostas máximas das drogas nas variações da corrente de curto circuito.

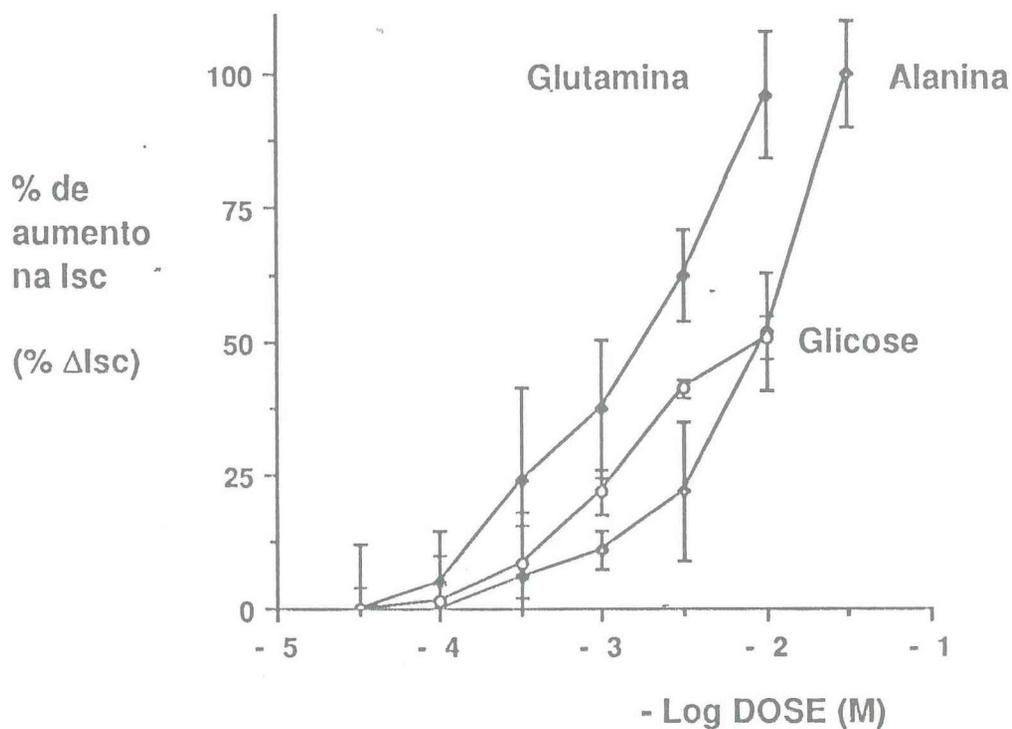
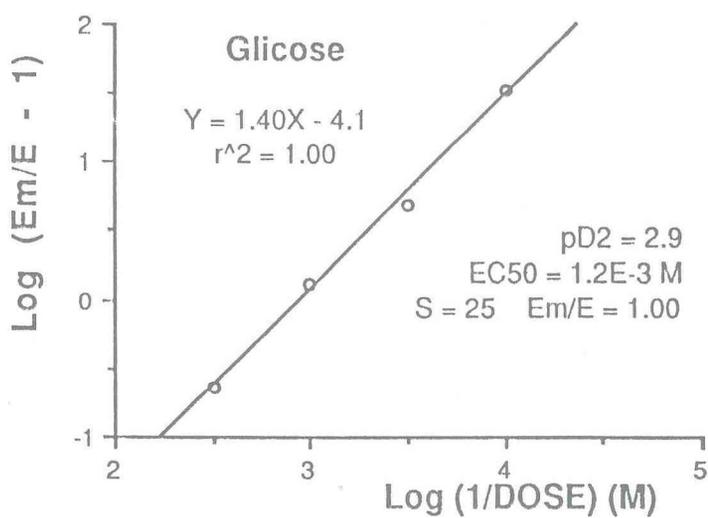
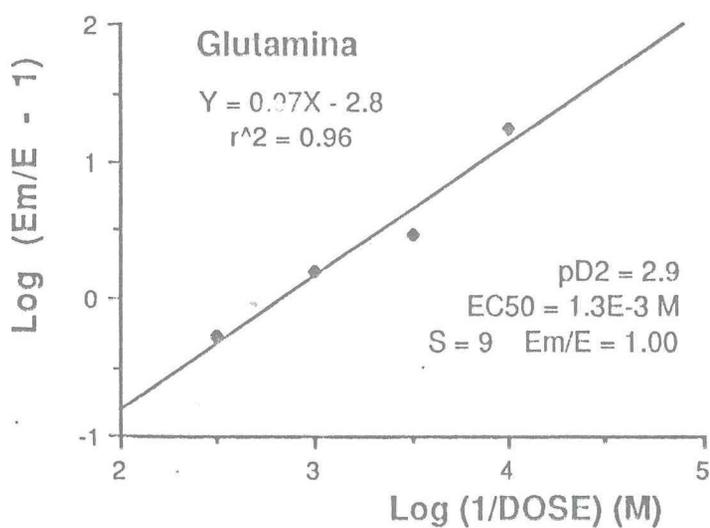
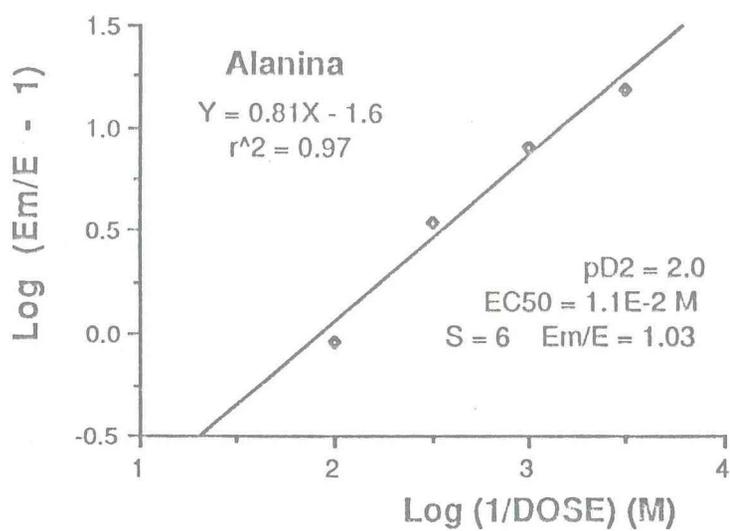
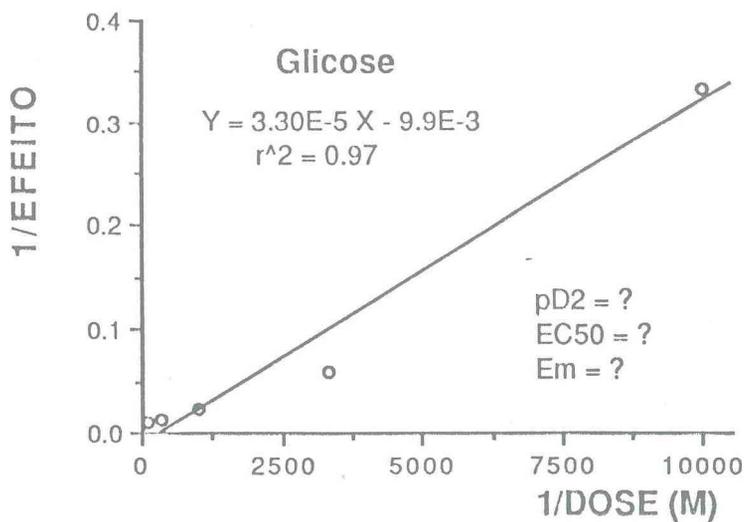
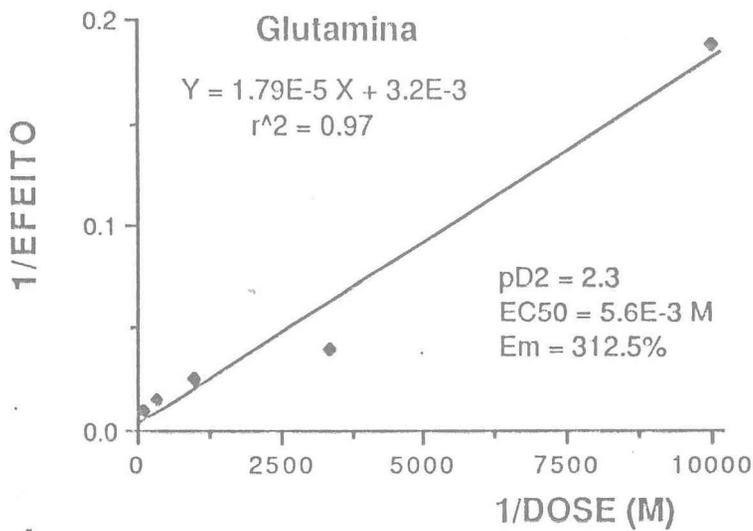
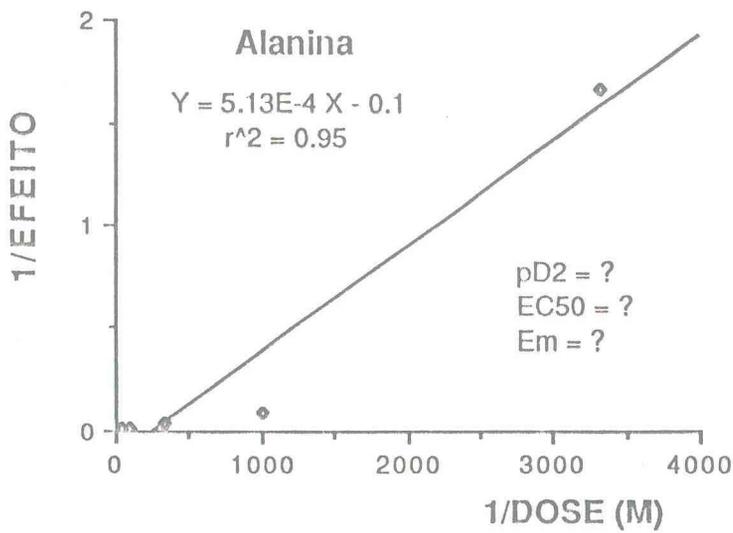


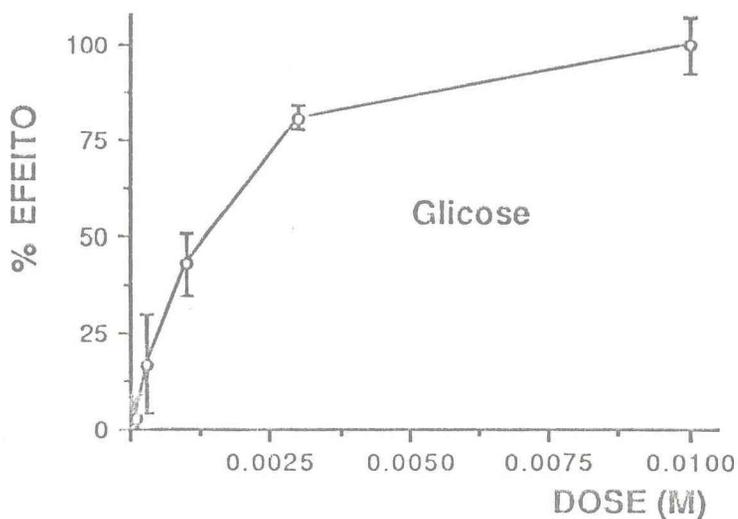
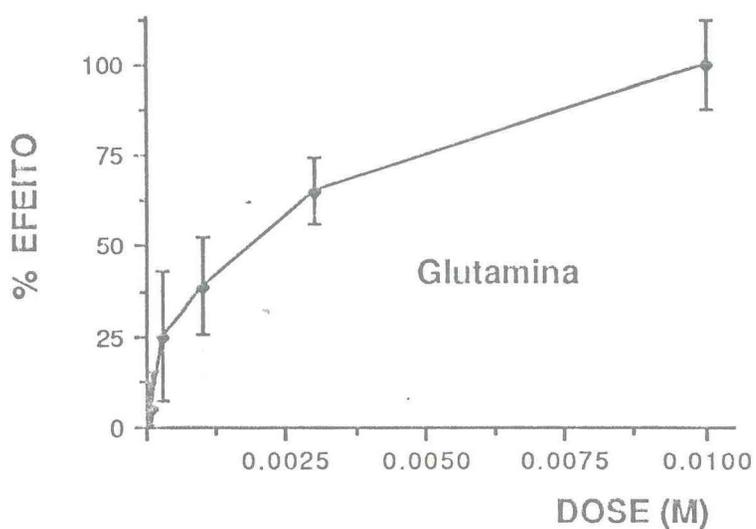
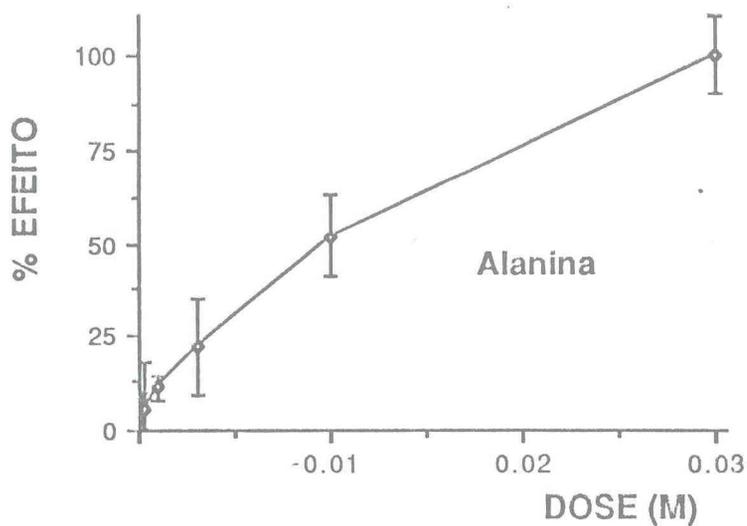
Figura 4B2 - % de aumento na Isc. Drogas no lado mucoso. Colina/ $Na^+$  = 1/1.



· Figura 4C - Gráfico de Hill.  
Drogas no lado mucoso. Colina/Na<sup>+</sup>:1/1



Figuras 4D - Gráficos de Lineweaver-Burk.  
 Colina/Na<sup>+</sup> : 1/1. Drogas no lado mucoso.



Figuras 4E -Gráfico de Michaelis-Menten.  
Drogas do lado mucoso. Colina/Na<sup>+</sup> : 1/1

## TABELA 5

Coelho Califórnia, íleo normal, drogas no lado mucoso, Colina/Na<sup>+</sup>:1/0ALANINA (n = 6)

Conc.(M)	μA	SD
3 x 10 <sup>-4</sup>	-7.8	13.7
10 <sup>-3</sup>	-17.5	30.1
3 x 10 <sup>-3</sup>	-10.5	21.7
10 <sup>-2</sup>	-6.5	22.9
3 x 10 <sup>-2</sup>	22.5	21.7

GLUTAMINA (n = 6)

Conc.(M)	μA	SD
10 <sup>-4</sup>	-2.5	10.9
3 x 10 <sup>-4</sup>	-7.3	13.1
10 <sup>-3</sup>	-12.8	10.1
3 x 10 <sup>-3</sup>	-12.5	17.1
10 <sup>-2</sup>	-3.8	27.1

GLICOSE (n = 6)

Conc.(M)	μA	SD
10 <sup>-4</sup>	-16.5	26.4
3 x 10 <sup>-4</sup>	-12.3	13.6
10 <sup>-3</sup>	-14.3	14.9
3 x 10 <sup>-3</sup>	-7.8	19.4
10 <sup>-2</sup>	4.8	18.1

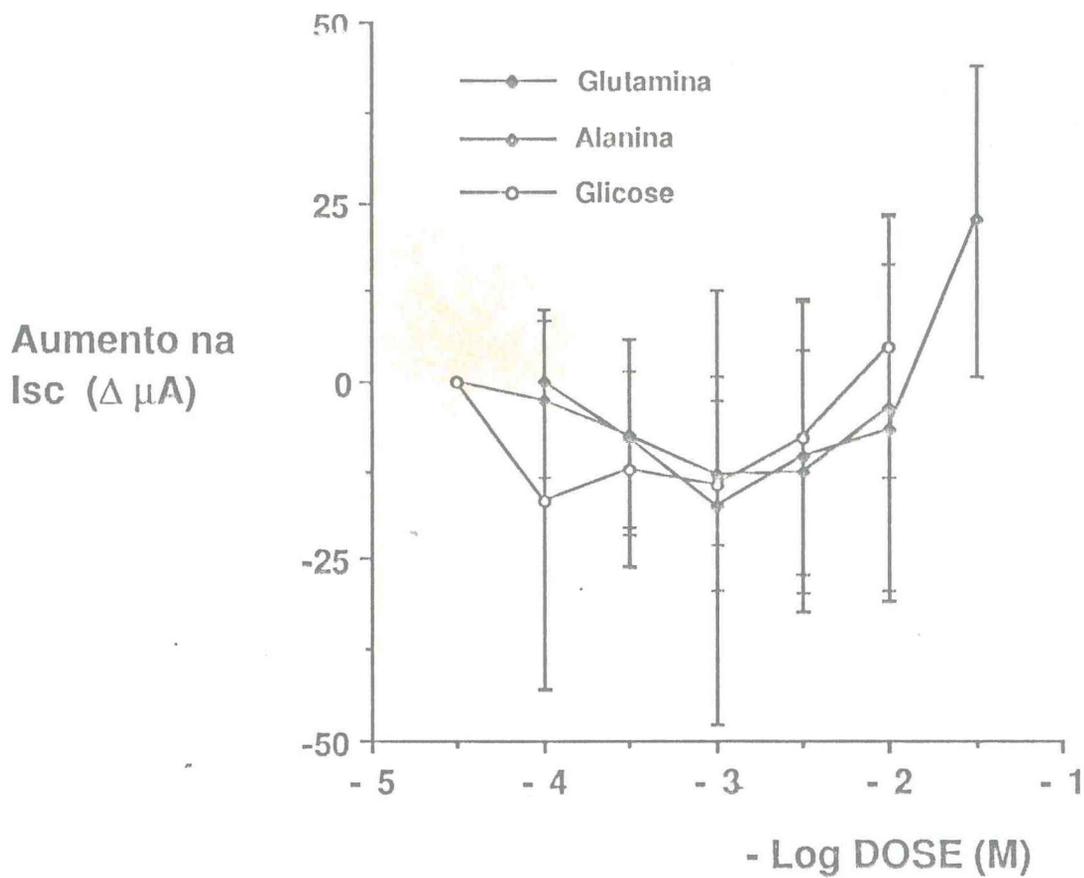
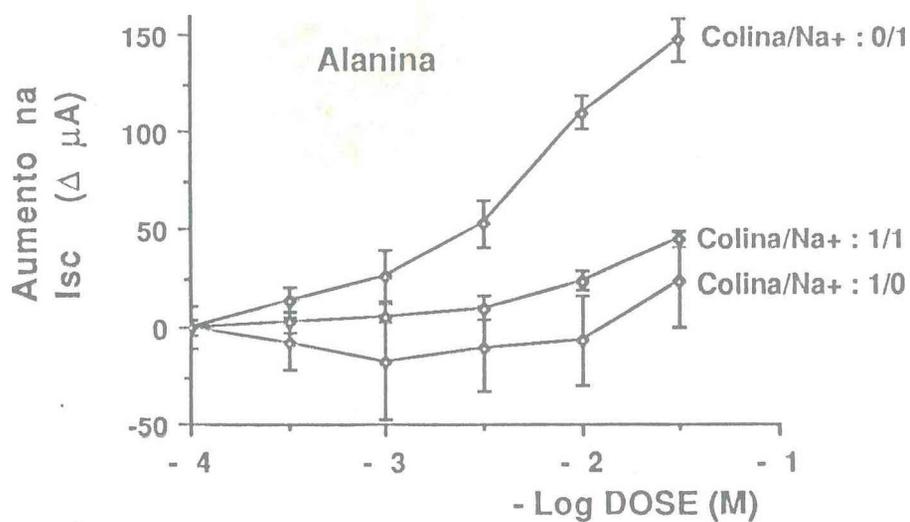
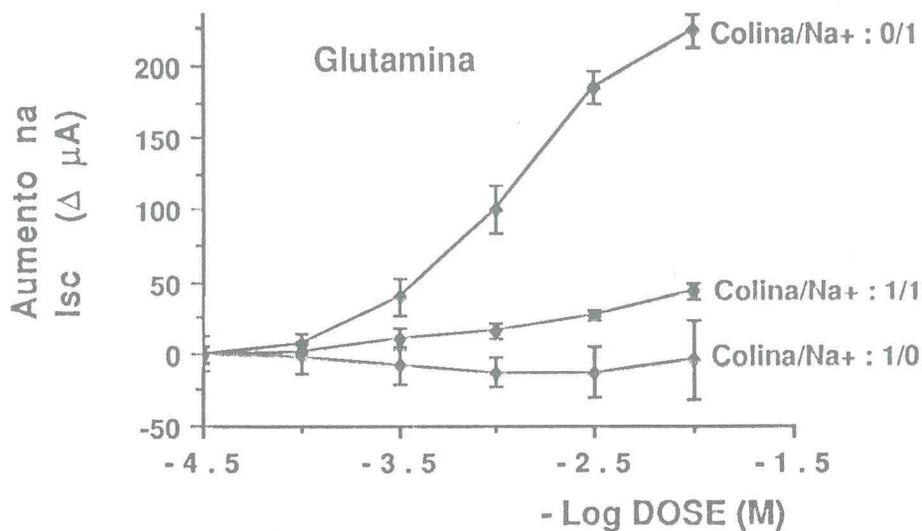


Figura 5A - Respostas máximas nas variações de Isc, na ausência de  $\text{Na}^+$  no lado mucoso. Drogas (m).



Figuras 5B- Respostas máximas nas variações da corrente de curto circuito em diferentes concentrações de Na<sup>+</sup>.

## TABELA 6

Coelho Califórnia, íleo normal, drogas no lado mucoso,  $pH_{muc.} = 5.6$

ALANINA (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				$pD_2 = 2.7$ $EC_{50} = 2.1 \times 10^{-3} M$ $S = 71\Delta 5.9\%$ $Em_{\Delta ln} = 100\%$
$10^{-4}$	0.0	5.9	0.0	$\Delta R = 109 \pm 35 \mu A.$
$3 \times 10^{-4}$	2.1	3.4	0.3	$Y = 1.13X - 53.8$ $r^2 = 0.97$
$10^{-3}$	6.0	7.0	2.7	$\Delta E_{/2} = 949 UE$ $S_A = 39$
$3 \times 10^{-3}$	25.0	6.0	19.2	$Y_L = 1.28X_L - 2.7$ $r^2 = 0.99$
$10^{-2}$	62.7	7.0	66.7	$S_L = 19$
$3 \times 10^{-2}$	100.0	5.9	94.4	

GLUTAMINA (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				$pD_2 = 2.5$ $EC_{50} = 3.5 \times 10^{-3} M$ $S = 16221\Delta 10.0\%$ $Em_{\Delta ln} = 39\%$
$10^{-4}$	0.0	13.0	0.0	$\Delta R = 43 \pm 19 \mu A.$
$3 \times 10^{-4}$	0.0	13.0	0.0	$Y = 1.81X - 89.6$ $r^2 = 0.91$
$10^{-3}$	9.3	13.0	0.5	$\Delta E_{/2} = 363 UE$ $S_A = 14009$
$3 \times 10^{-3}$	30.0	13.0	39.8	$Y_L = 1.24X_L - 2.7$ $r^2 = 1.00$
$10^{-2}$	100.0	13.0	98.8	$S_L = 17$

GLICOSE (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				$pD_2 = 2.5$ $EC_{50} = 2.9 \times 10^{-3} M$ $S = 80\Delta 9.0\%$ $Em_{\Delta ln} = 28\%$
$10^{-4}$	0.0	15.0	0.2	$\Delta R = 31 \pm 9 \mu A.$
$3 \times 10^{-4}$	2.0	4.0	1.5	$Y = 1.72X - 75.5$ $r^2 = 0.98$
$10^{-3}$	14.2	9.9	11.8	$\Delta E_{/2} = 795 UE$ $S_A = 78$
$3 \times 10^{-3}$	45.4	13.3	54.4	$Y_L = 1.61X_L - 4.0$ $r^2 = 0.99$
$10^{-2}$	100.0	15.0	91.4	$S_L = 41$

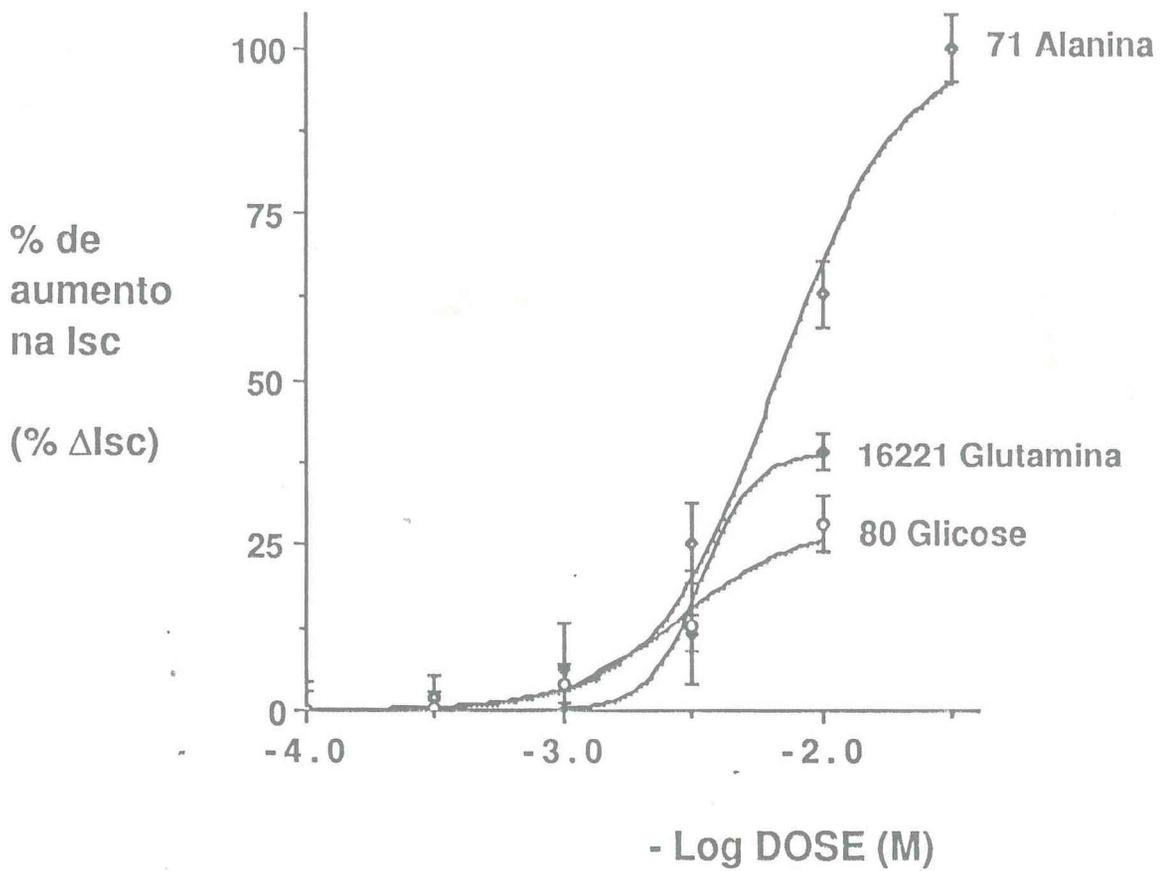


Figura 6A - Drogas no lado mucoso, Ringer com pH = 5.6

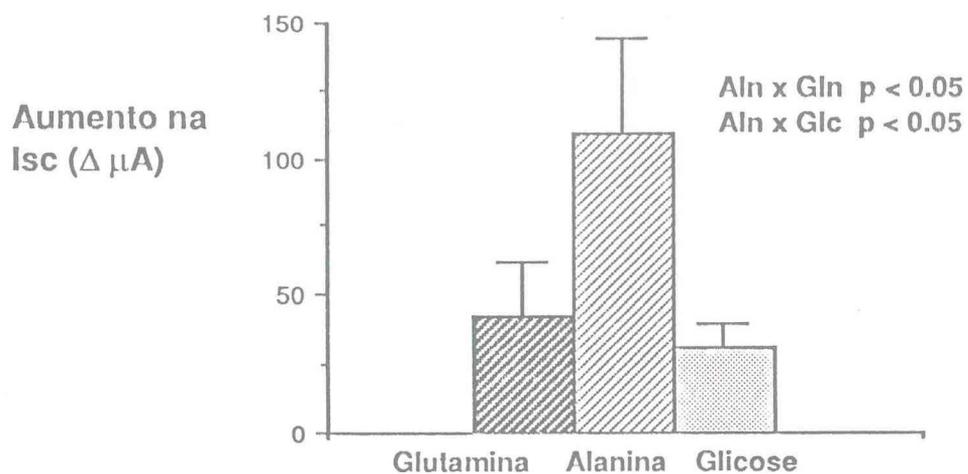


Figura 6B1 - Respostas máximas das drogas nas variações da corrente de curto circuito.

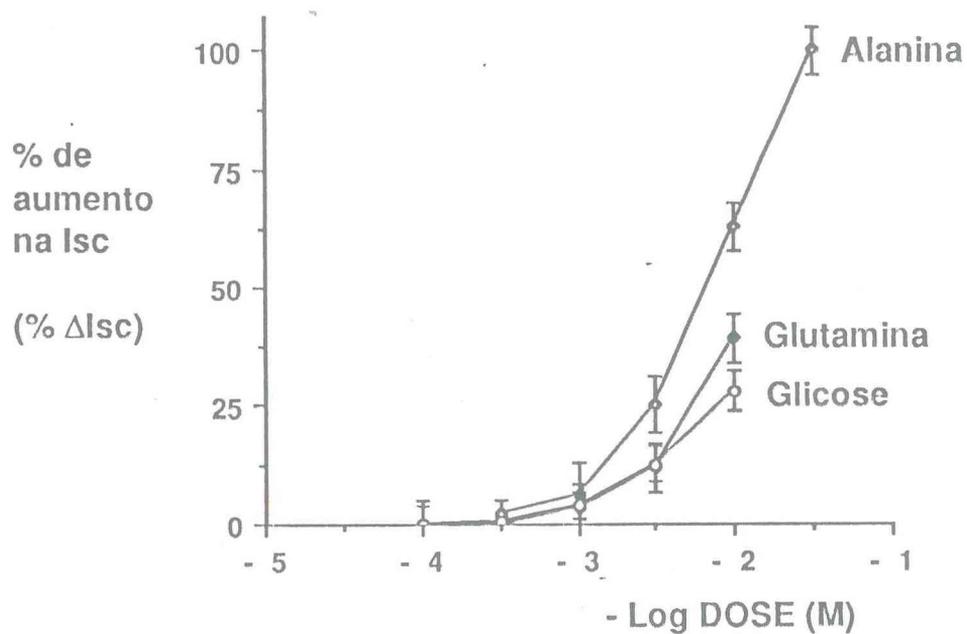
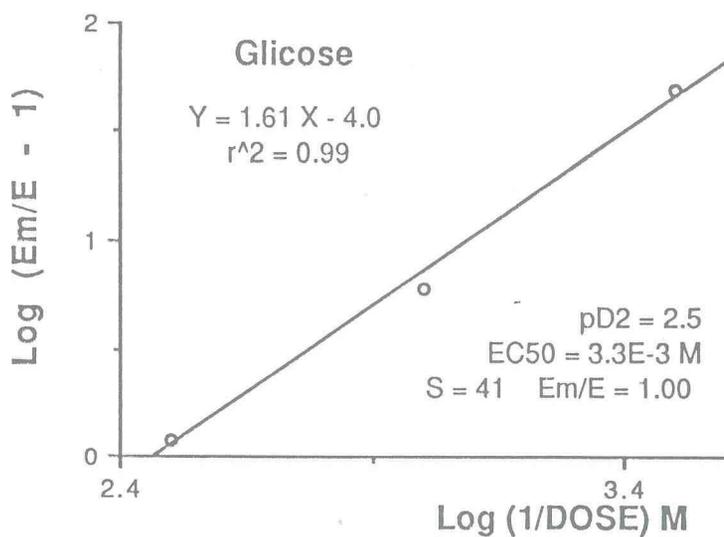
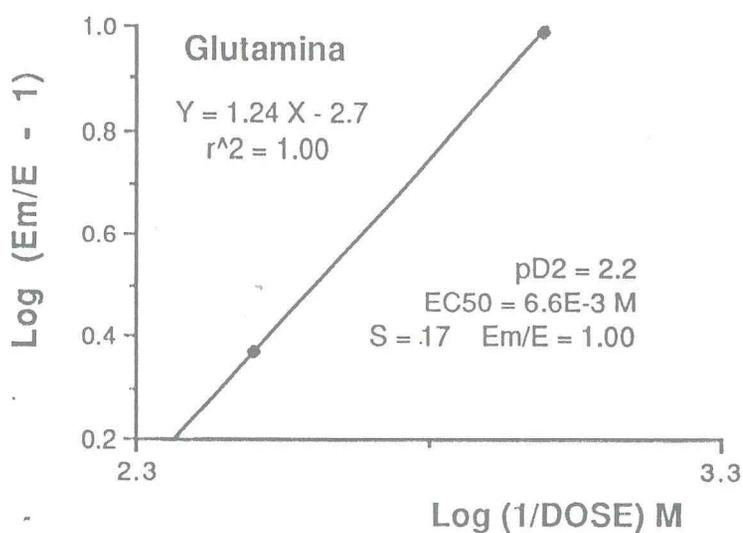
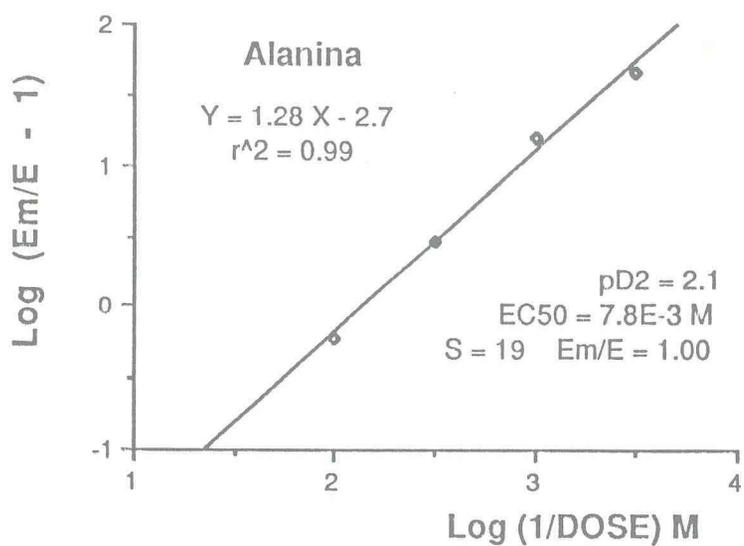
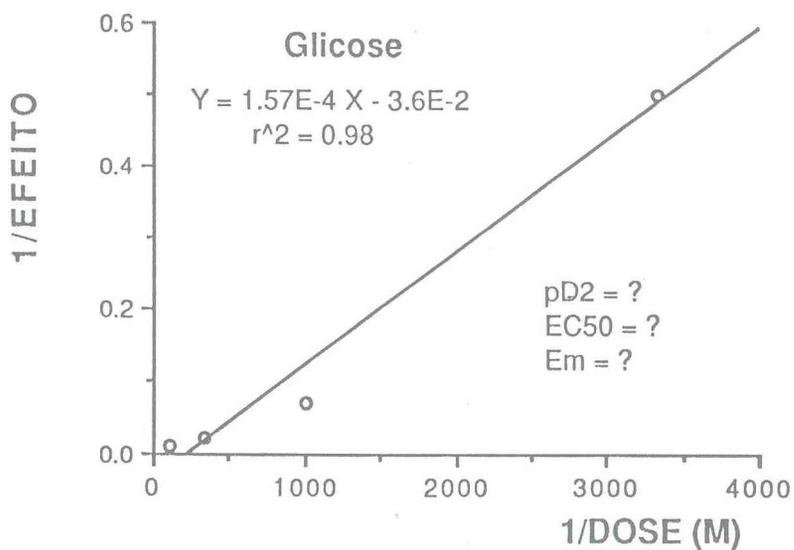
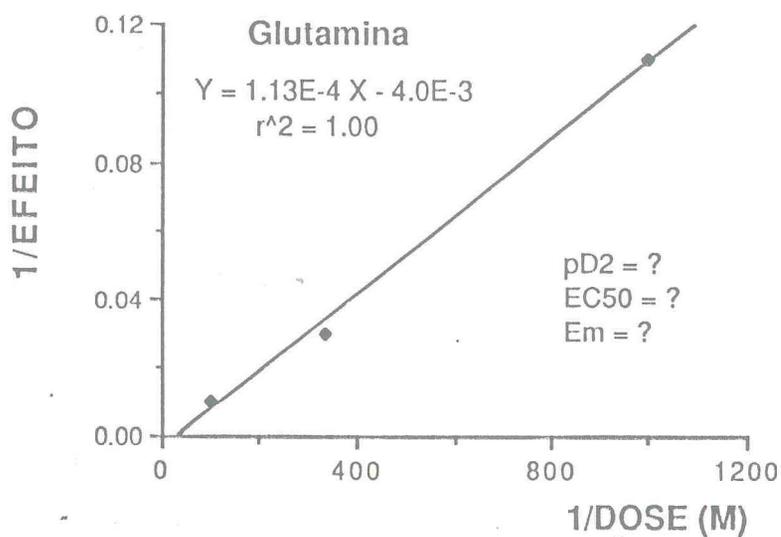
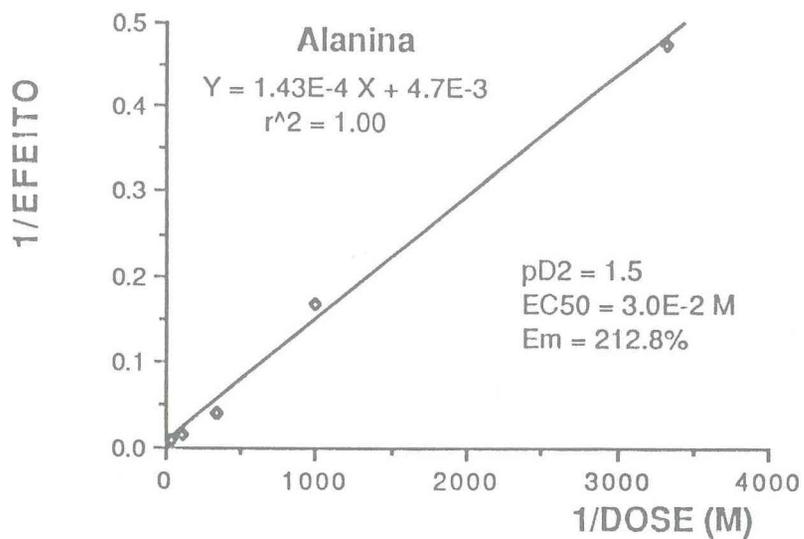


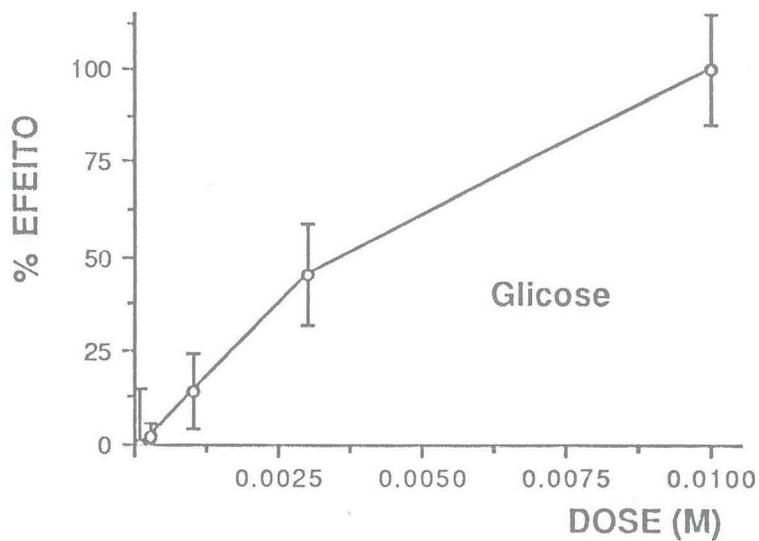
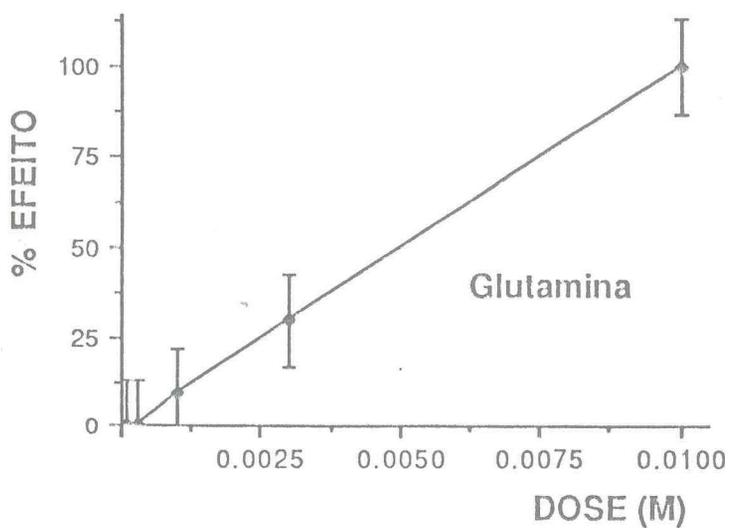
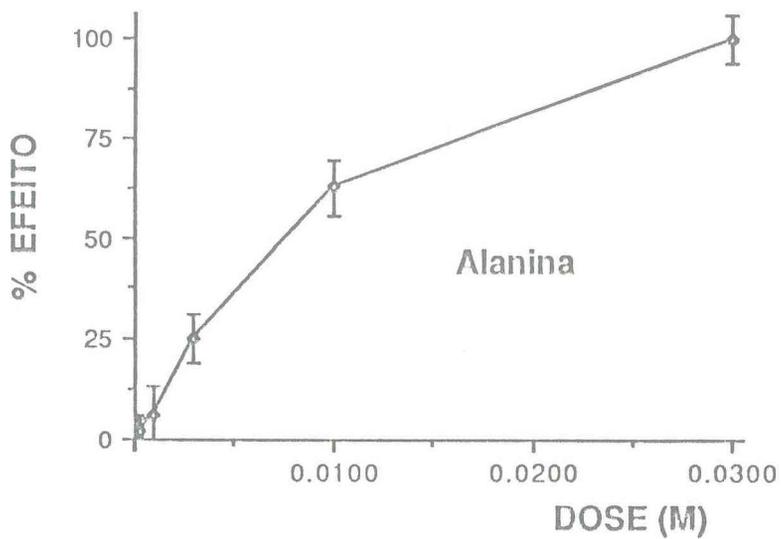
Figura 6B2 - Drogas no lado mucoso. Ringer com pH = 5.6



Figuras 6C - Gráficos de Hill.  
 $pH(m) = 5.6$ . Drogas no lado mucoso.



Figuras 6D - Gráficos de Lineweaver-Burk.  
 pH(m) = 5.6. Drogas no lado mucoso.



Figuras 6E - Gráfico de Michaelis-Menten.  
Drogas no lado mucoso. pH = 5.6

## TABELA 7

Coelho Califórnia, íleo normal, drogas no lado mucoso,  $pH_{muc.} = 8.0$ ALANINA (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				$pD_2 = 2.8$ $EC_{50} = 1.7 \times 10^{-3} M$ $S = 221\Delta 3.7\%$ $Em_{Aln} = 100\%$
$10^{-4}$	0.0	4.3	0.0	$\Delta R = 217 \pm 30 \mu A.$
$3 \times 10^{-4}$	1.3	1.0	0.2	$Y = 1.54X - 80.8$ $r^2 = 0.92$
$10^{-3}$	2.8	2.5	2.2	$AE_{/2} = 756 UE$ $S_A = 98$
$3 \times 10^{-3}$	21.9	6.6	25.5	$Y_L = 1.69X_L - 3.8$ $r^2 = 0.95$
$10^{-2}$	79.9	7.1	83.6	$S_L = 49$
$3 \times 10^{-2}$	100.0	4.3	98.7	

GLUTAMINA (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				$pD_2 = 2.8$ $EC_{50} = 3.5 \times 10^{-3} M$ $S = 47\Delta 4.1\%$ $Em_{Aln} = 69\%$
$3 \times 10^{-5}$	0.0	4.1	0.2	$\Delta R = 152 \pm 9 \mu A.$
$10^{-4}$	1.1	1.1	1.1	$Y = 1.37X - 65.0$ $r^2 = 0.99$
$3 \times 10^{-4}$	5.1	3.8	6.8	$AE_{/2} = 957 UE$ $S_A = 37$
$10^{-3}$	35.0	6.9	33.4	$Y_L = 1.64X_L - 4.6$ $r^2 = 0.99$
$3 \times 10^{-3}$	73.7	4.4	77.5	$S_L = 44$
$10^{-2}$	100.0	4.1	95.9	

GLICOSE (n = 6)

Conc.(M)	%E	SD	%T	
				$pD_2 = 2.9$ $EC_{50} = 1.2 \times 10^{-3} M$ $S = 18\Delta 11.9\%$ $Em_{Aln} = 17\%$
$3 \times 10^{-5}$	0.0	11.3	0.9	$\Delta R = 38 \pm 15 \mu A.$
$10^{-4}$	13.7	10.0	3.8	$Y = 1.26X - 51.9$ $r^2 = 0.90$
$3 \times 10^{-4}$	26.3	15.3	14.4	$AE_{/2} = 1503 UE$ $S_A = 10$
$10^{-3}$	36.8	11.0	41.6	$Y_L = 1.01X_L - 3.1$ $r^2 = 0.88$
$3 \times 10^{-3}$	86.8	8.9	75.1	$S_L = 10$
$10^{-2}$	100.0	11.3	92.8	

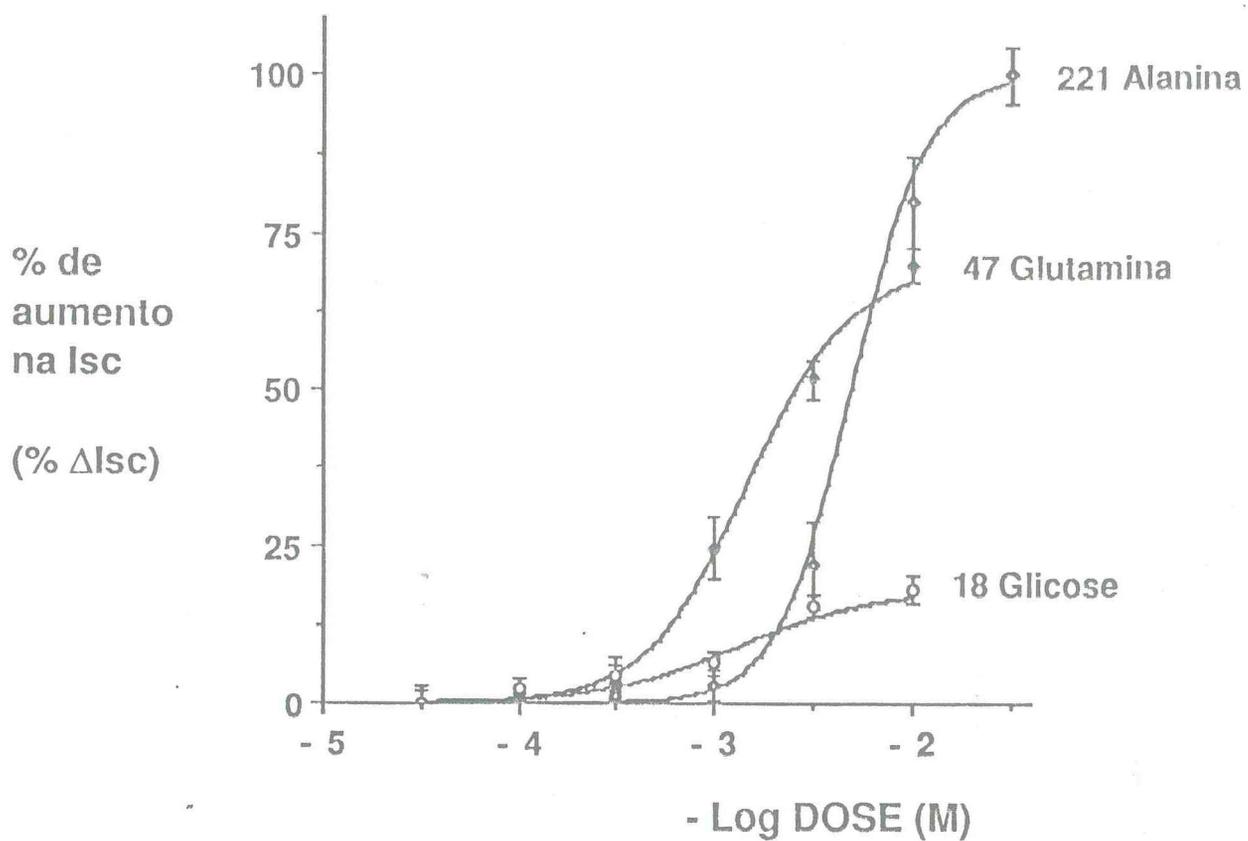


Figura 7A - Drogas e no lado mucoso, Ringer com pH = 8.0

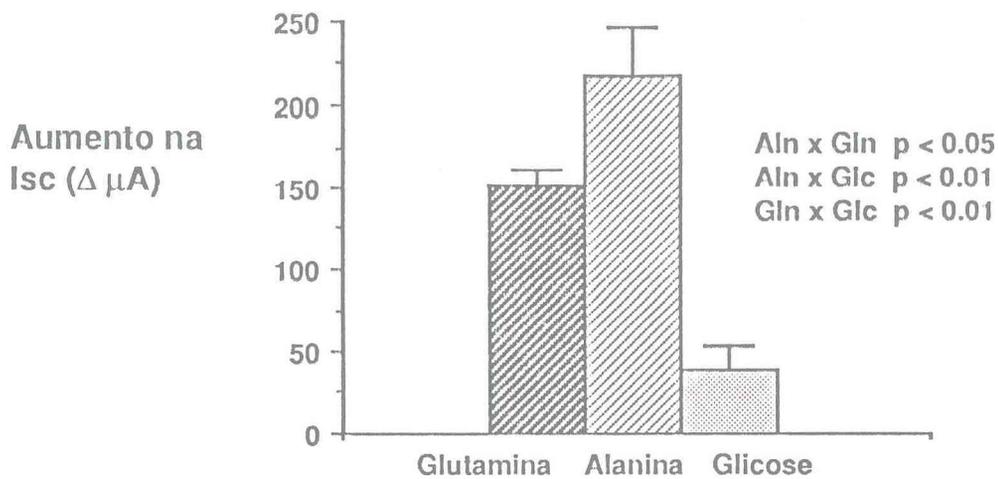


Figura 7B1 - Respostas máximas das drogas nas variações da corrente de curto circuito.

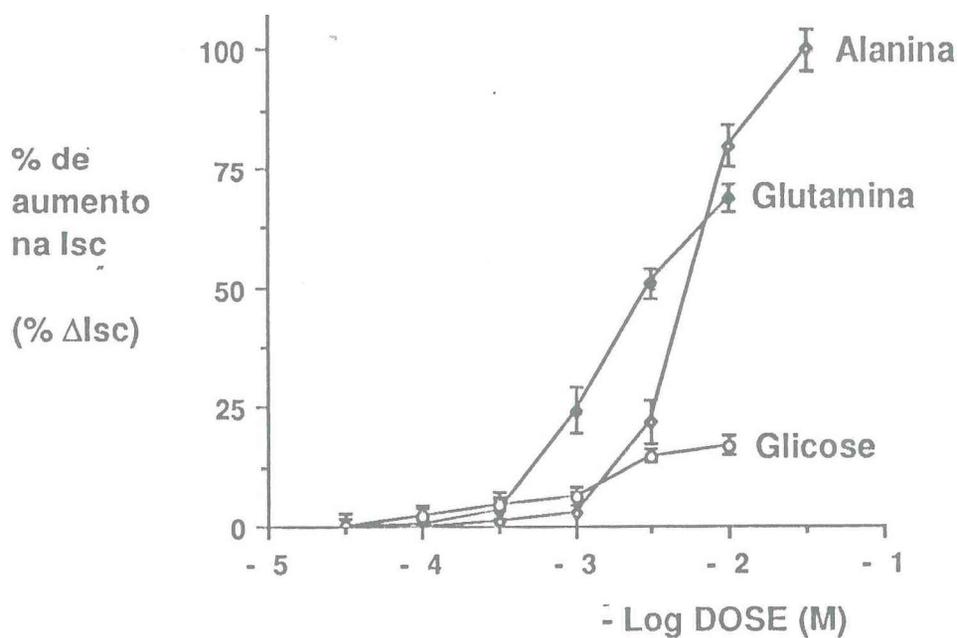
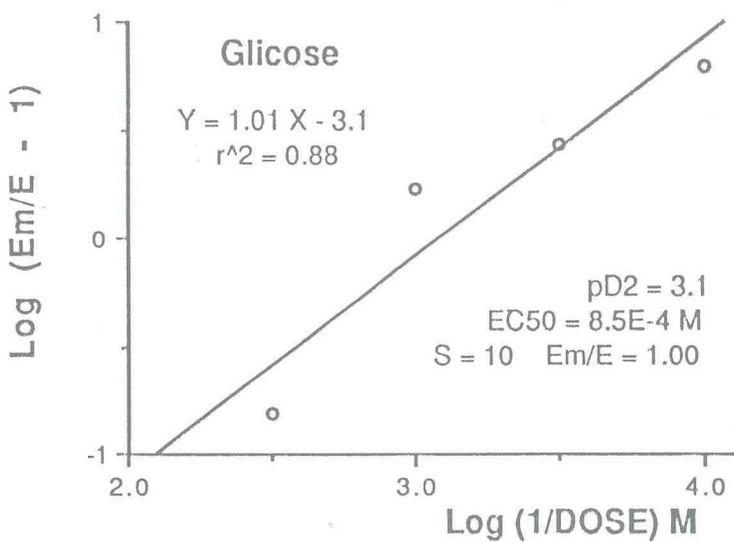
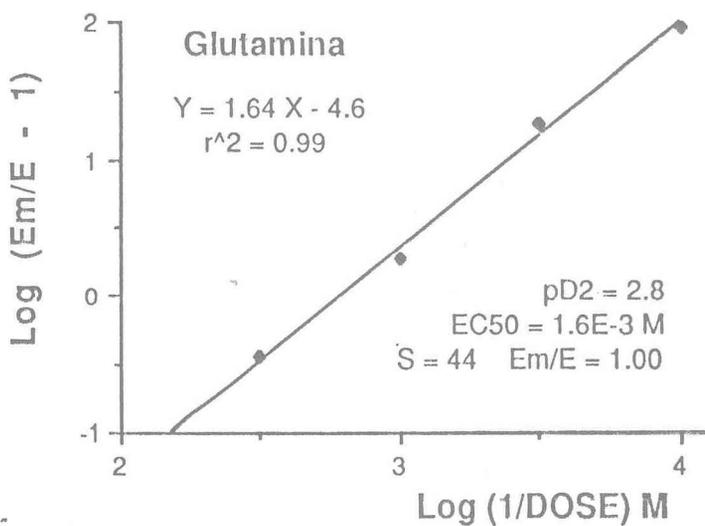
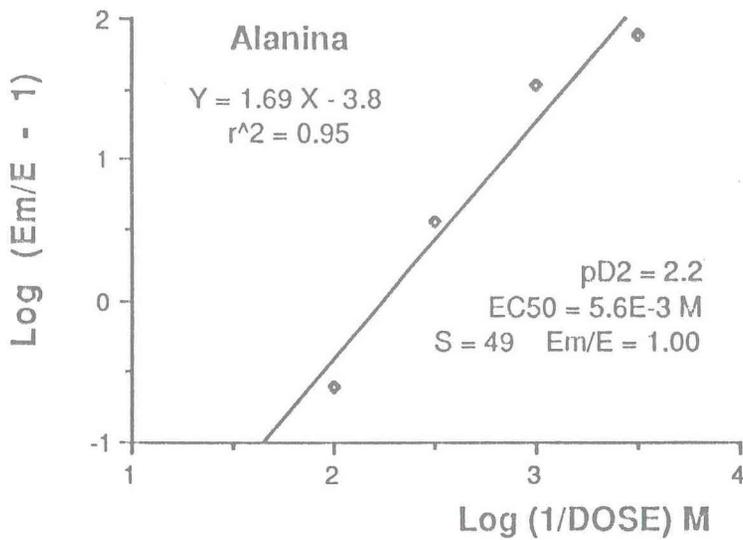
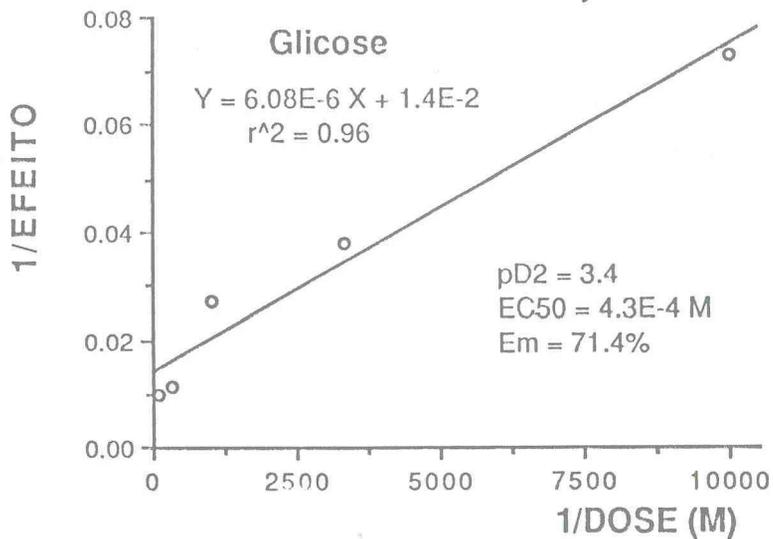
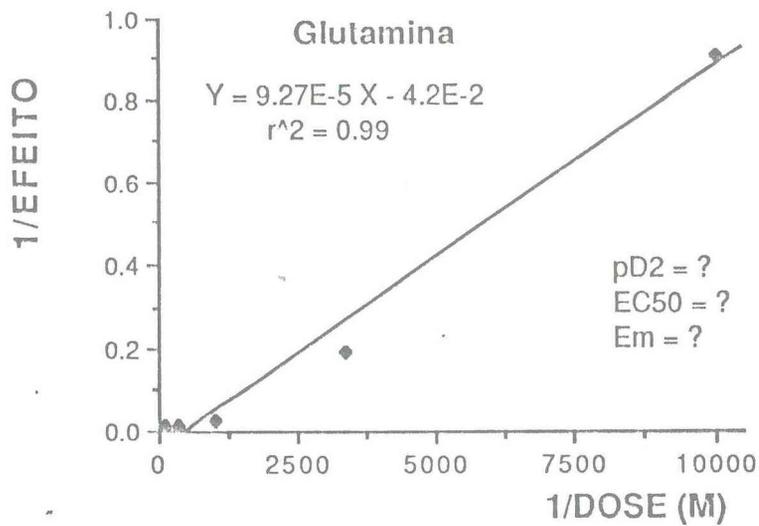
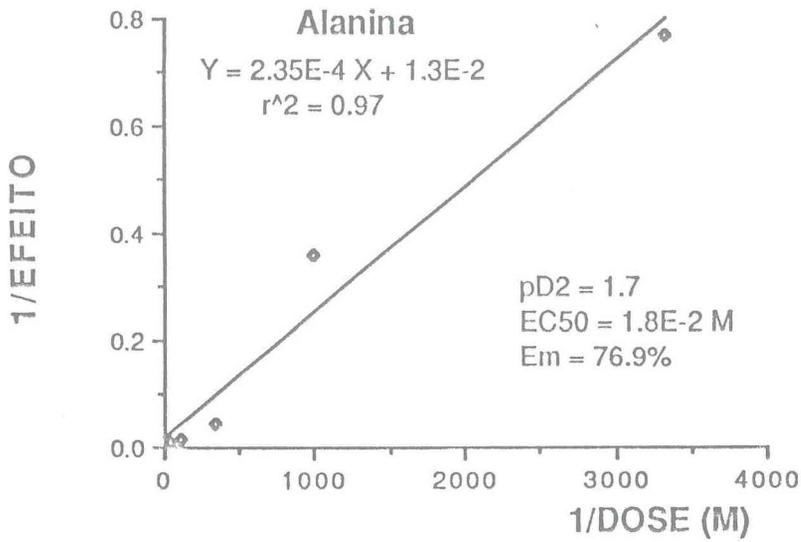


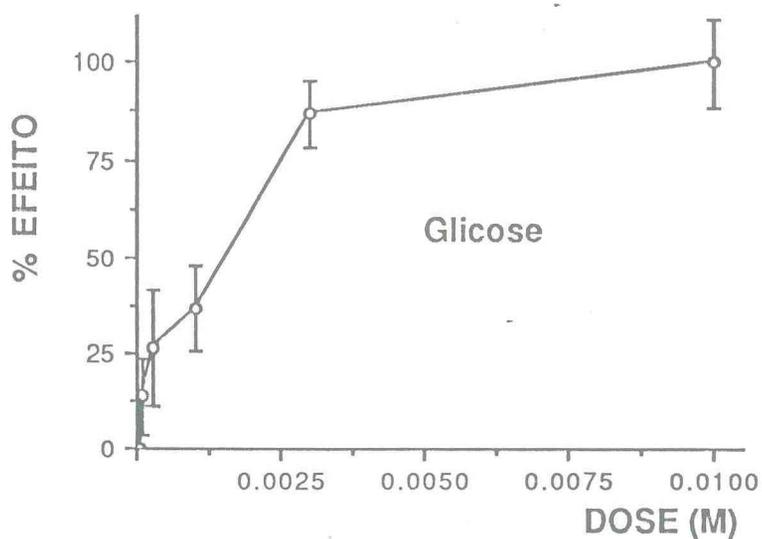
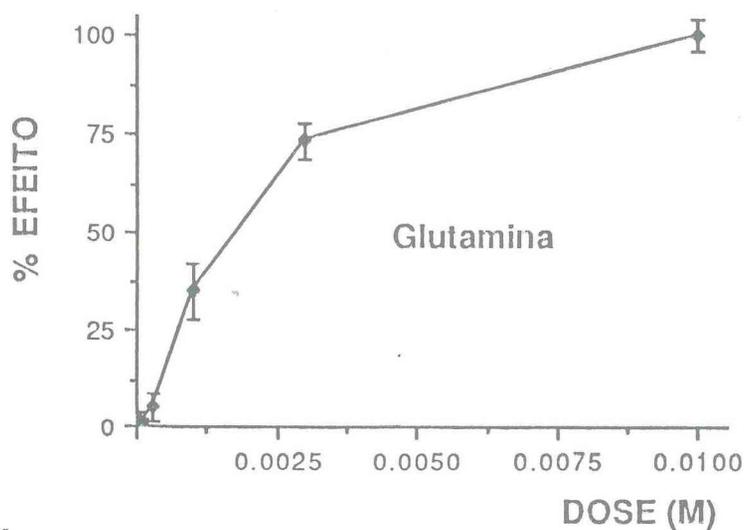
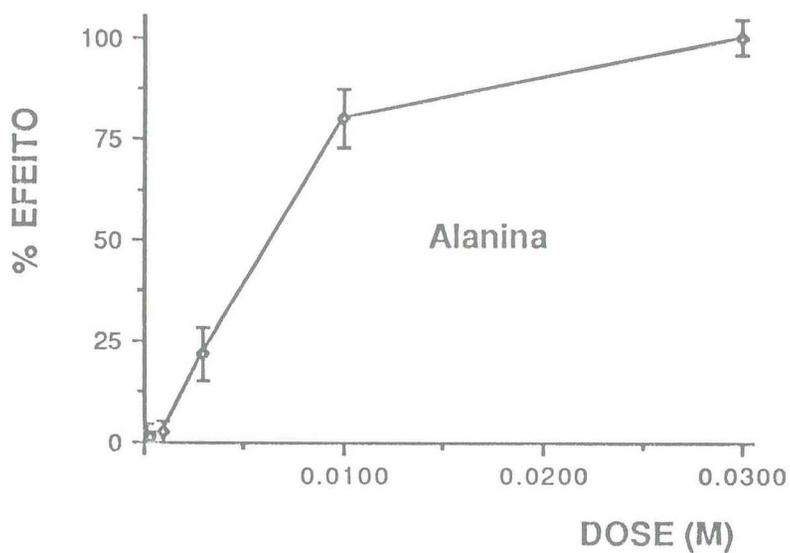
Figura 7B2 - Drogas no lado mucoso. Ringer com pH = 8.0



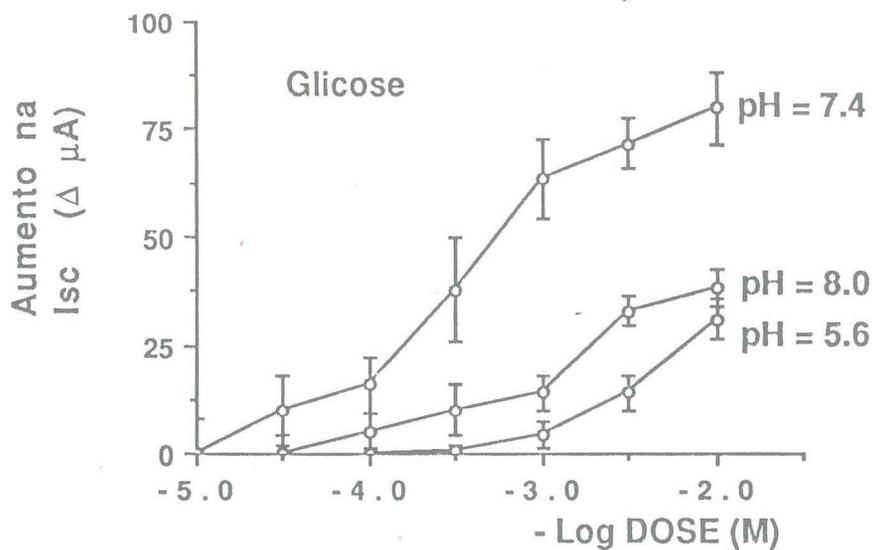
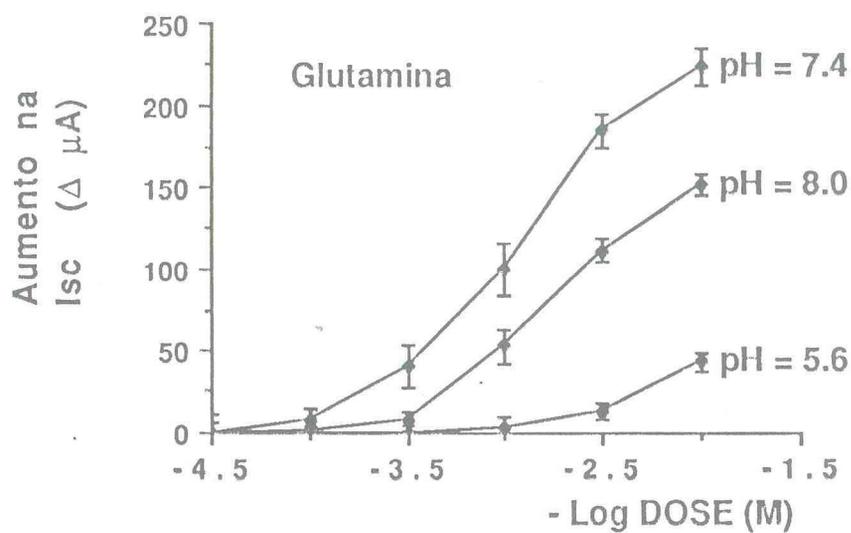
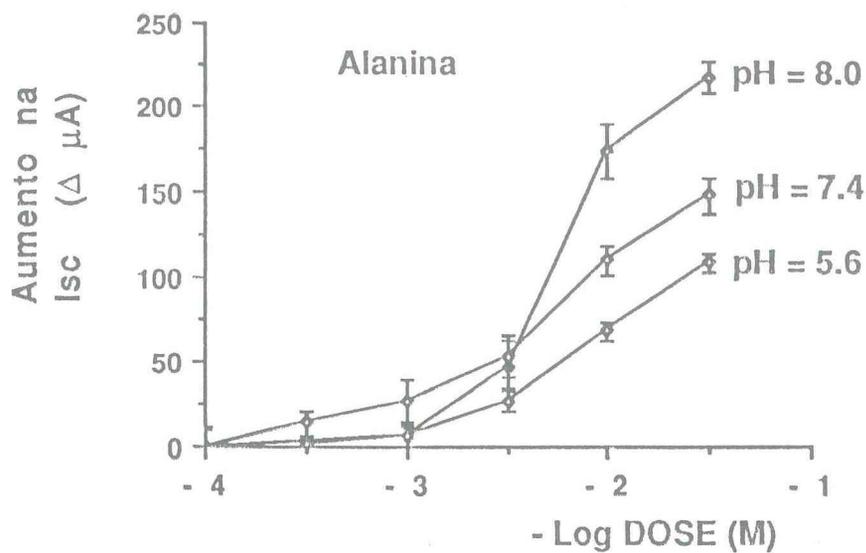
Figuras 7C - Gráficos de Hill.  
 $pH(m) = 8.0$ . Drogas no lado mucoso.



Figuras 7D - Gráficos de Lineweaver-Burk.  
 $pH(m) = 8.0$ . Drogas no lado mucoso.



**Figura 7E - Gráficos de Michaelis-Menten.  
Drogas no lado mucoso. pH = 8.0**



Figuras 7F - Respostas máximas das drogas nas variações da corrente de curto circuito.

## TABELA 8

Coelho Califórnia, íleo normal, drogas no lado mucoso.

Ringer no lado mucoso.

GLUTAMINA, ALANINA e GLICOSE (n = 6)

$X_{50}$	%E	SD	%T	$X_{50} = 3.9$ $S = 31\Delta 3.8\%$	$E_{mRN} = 100\%$
6	0.0	10.3	2.6	$\Delta R = 111 \pm 43 \mu A.$	
5	15.1	12.1	13.0	$Y = 1.27X - 16.9$	$r^2 = 1.00$
4	45.7	13.7	45.4	$\Delta E_{/2} = 1073 \text{ UE}$	$S_A = 25$
3	78.4	5.9	82.2	$Y_L = 1.31X_L - 4.5$	$r^2 = 1.00$
2	100.0	10.3	96.3	$S_L = 20$	
1	89.7	9.4	-	Gln $pD_2 = 3.5$	$EC_{50} = 3.5 \times 10^{-4} \text{ M}$
				Aln $pD_2 = 3.0$	$EC_{50} = 1.1 \times 10^{-3} \text{ M}$
				Gln $pD_2 = 3.5$	$EC_{50} = 3.5 \times 10^{-4} \text{ M}$

WHO no lado mucoso.

GLUTAMINA, ALANINA e GLICOSE (n = 6)

$X_{50}$	%E	SD	%T	$X_{50} = 2.7$ $S = 25\Delta 6.5\%$	$E_{mRN} = 65\%$
6	0.0	13.0	0.5	$\Delta R = 72 \pm 21 \mu A.$	
5	9.0	15.4	2.5	$Y = 1.38X - 62.7$	$r^2 = 1.00$
4	5.3	14.3	11.5	$\Delta E_{/2} = 1108 \text{ UE}$	$S_A = 23$
3	42.7	15.6	39.4	$Y_L = 1.10X_L - 3.1$	$r^2 = 0.81$
2	74.3	6.5	76.5	$S_L = 13$	
1	100.0	13.0	94.2	Gln $pD_2 = 2.9$	$EC_{50} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ M}$
				Aln $pD_2 = 2.4$	$EC_{50} = 4.5 \times 10^{-3} \text{ M}$
				Gln $pD_2 = 2.9$	$EC_{50} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ M}$
Glutamina	+	Alanina	+	Glicose	
6 - $3 \times 10^{-5} \text{ M}$		$10^{-4} \text{ M}$		$3 \times 10^{-5} \text{ M}$	
5 - $10^{-4} \text{ M}$		$3 \times 10^{-4} \text{ M}$		$10^{-4} \text{ M}$	
4 - $3 \times 10^{-4} \text{ M}$		$10^{-3} \text{ M}$		$3 \times 10^{-4} \text{ M}$	
3 - $10^{-3} \text{ M}$		$3 \times 10^{-3} \text{ M}$		$10^{-3} \text{ M}$	
2 - $3 \times 10^{-3} \text{ M}$		$10^{-2} \text{ M}$		$3 \times 10^{-3} \text{ M}$	
1 - $10^{-2} \text{ M}$		$3 \times 10^{-2} \text{ M}$		$10^{-2} \text{ M}$	

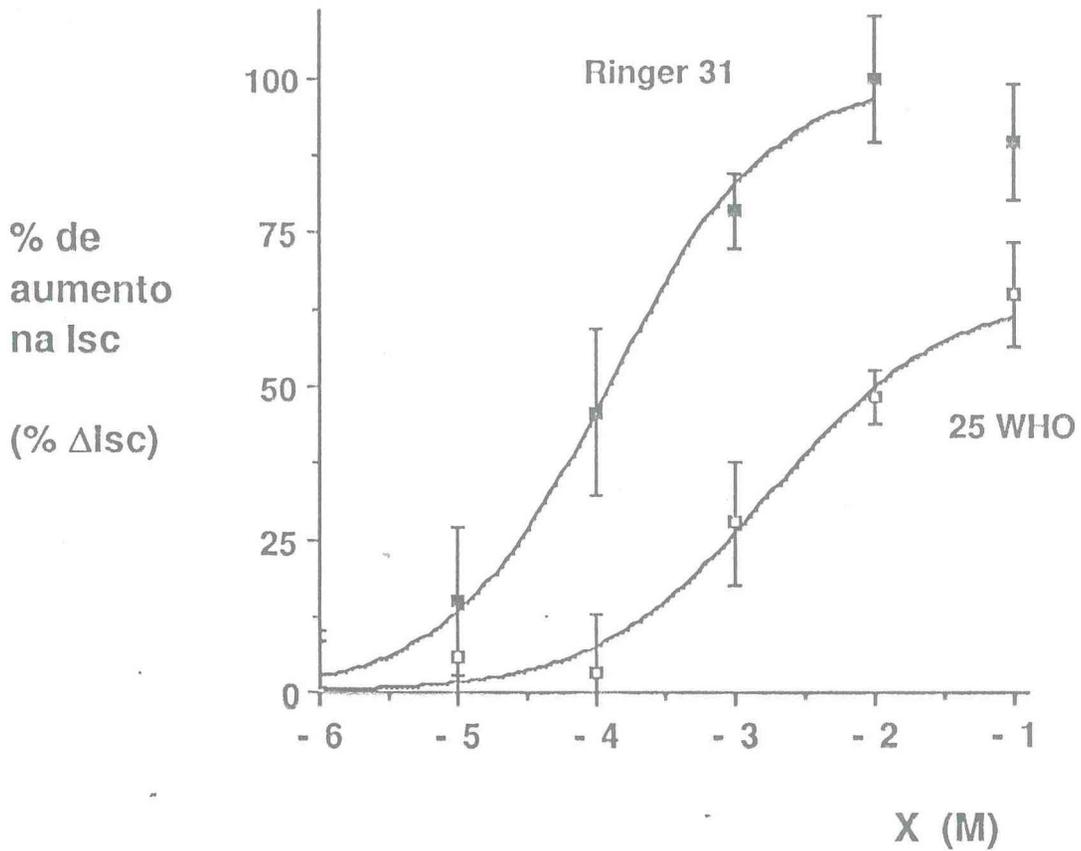


Figura 8A - Ringer e WHO no lado mucoso.  
Glutamina + Alanina + Glicose no lado mucoso.

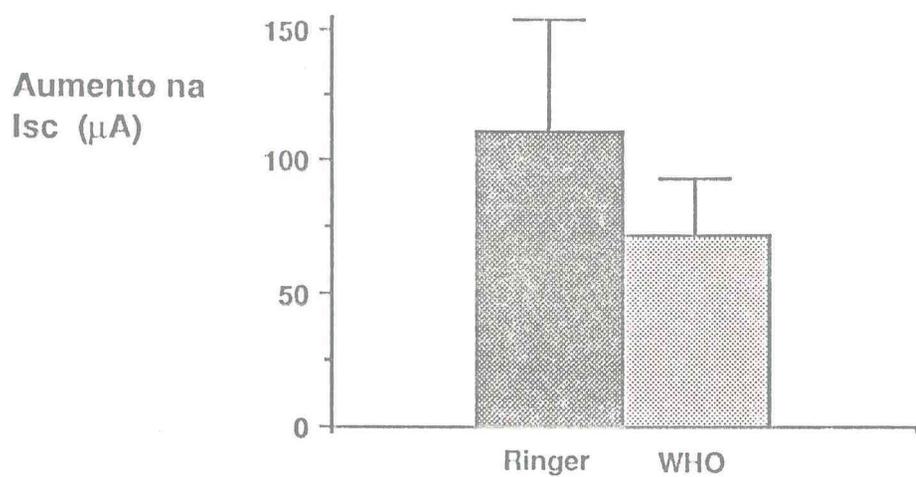


Figura 8B1 - Respostas máximas das drogas, a diferentes soluções do lado mucoso.

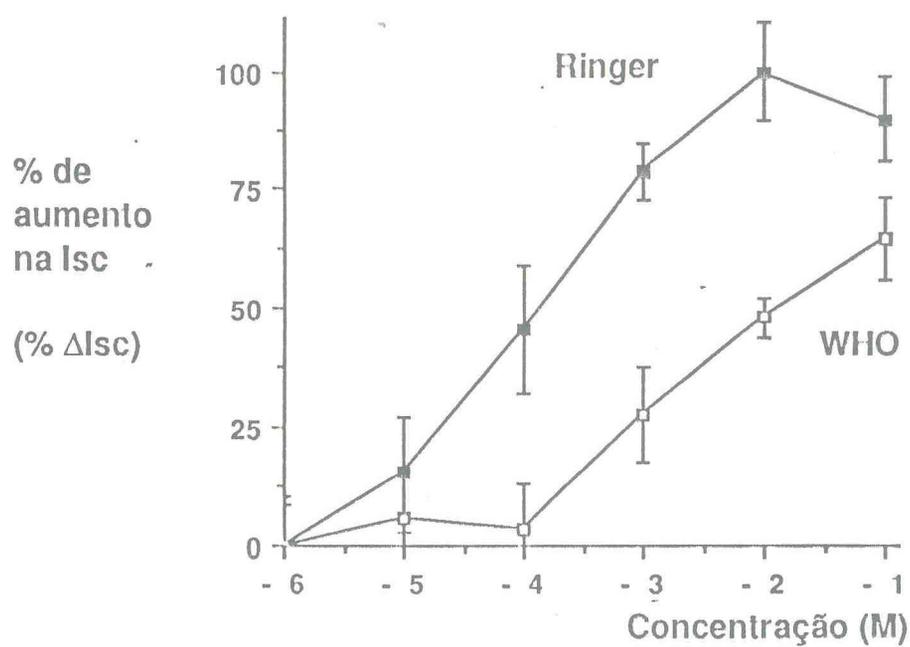


Figura 8B2 - Ringer e WHO no lado mucoso.  
Gln + Aln + Glicose no lado mucoso.

## TABELA 9

Coelho Califórnia, fêo infectado com CT, drogas no lado mucoso.

Ringer no lado mucoso.

GLUTAMINA, ALANINA e GLICOSE (n = 6)

X <sub>50</sub>	%E	SD	%T	X <sub>50</sub> = 3.1 S = 118Δ8.1%	E <sub>mWHO</sub> = 90%
6	0.0	10.1	0.1	ΔR = 76 ± 27 μA.	
5	4.3	7.4	0.9	Y = 1.77X - 80.1	r <sup>2</sup> = 0.92
4	11.6	4.1	8.8	ΔE <sub>/2</sub> = 844 UE	S <sub>A</sub> = 61
3	45.9	16.5	51.2	Y <sub>L</sub> = 1.28X <sub>L</sub> - 3.7	r <sup>2</sup> = 0.98
2	100.0	10.1	91.9	S <sub>L</sub> = 19	
1	59.1	12.5	-	Gln pD <sub>2</sub> = 3.1	EC <sub>50</sub> = 8.9 x 10 <sup>-4</sup> M
				Aln pD <sub>2</sub> = 2.6	EC <sub>50</sub> = 1.4 x 10 <sup>-3</sup> M
				Gln pD <sub>2</sub> = 3.1	EC <sub>50</sub> = 8.9 x 10 <sup>-4</sup> M

WHO no lado mucoso.

GLUTAMINA, ALANINA e GLICOSE (n = 6)

X <sub>50</sub>	%E	SD	%T	X <sub>50</sub> = 3.1 S = 25Δ6.6%	E <sub>mRN</sub> = 100%
6	0.0	7.1	0.9	ΔR = 84 ± 62 μA.	
5	8.2	10.1	4.4	Y = 1.09X - 29.2	r <sup>2</sup> = 1.00
4	24.3	9.9	18.8	ΔE <sub>/2</sub> = 1319 UE	S <sub>A</sub> = 14
3	54.1	2.6	53.7	Y <sub>L</sub> = 1.08X <sub>L</sub> - 3.3	r <sup>2</sup> = 1.00
2	78.7	5.8	85.3	S <sub>L</sub> = 12	
1	100.0	7.1	96.7	Gln pD <sub>2</sub> = 3.1	EC <sub>50</sub> = 8.9 x 10 <sup>-4</sup> M
				Aln pD <sub>2</sub> = 2.6	EC <sub>50</sub> = 2.8 x 10 <sup>-4</sup> M
				Gln pD <sub>2</sub> = 3.1	EC <sub>50</sub> = 8.9 x 10 <sup>-4</sup> M

Glutamina	+	Alanina	+	Glicose
6 - 3x10 <sup>-5</sup> M		10 <sup>-4</sup> M		3x10 <sup>-5</sup> M
5 - 10 <sup>-4</sup> M		3x10 <sup>-4</sup> M		10 <sup>-4</sup> M
4 - 3x10 <sup>-4</sup> M		10 <sup>-3</sup> M		3x10 <sup>-4</sup> M
3 - 10 <sup>-3</sup> M		3x10 <sup>-3</sup> M		10 <sup>-3</sup> M
2 - 3x10 <sup>-3</sup> M		10 <sup>-2</sup> M		3x10 <sup>-3</sup> M
1 - 10 <sup>-2</sup> M		3x10 <sup>-2</sup> M		10 <sup>-2</sup> M

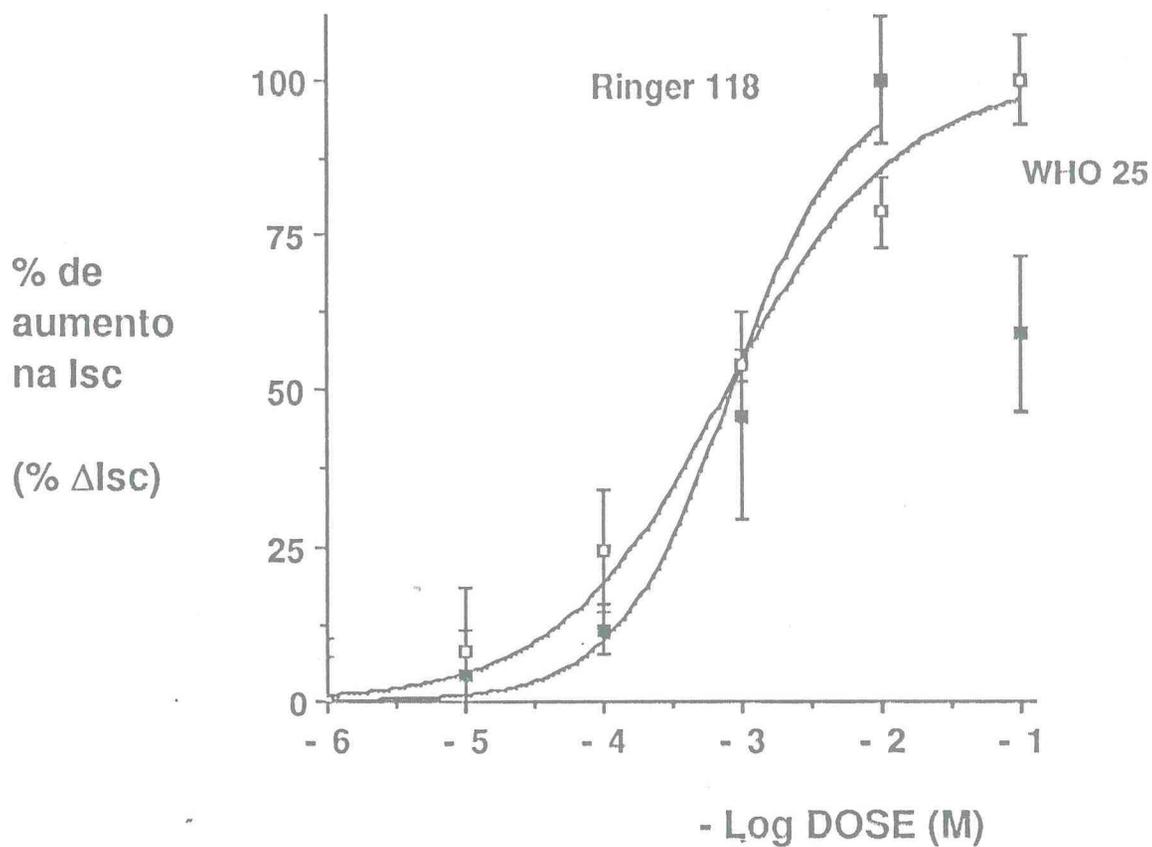


Figura 9A - Ringer e WHO no lado mucoso com CT.  
Glutamina + Alanina + Glicose no lado mucoso.

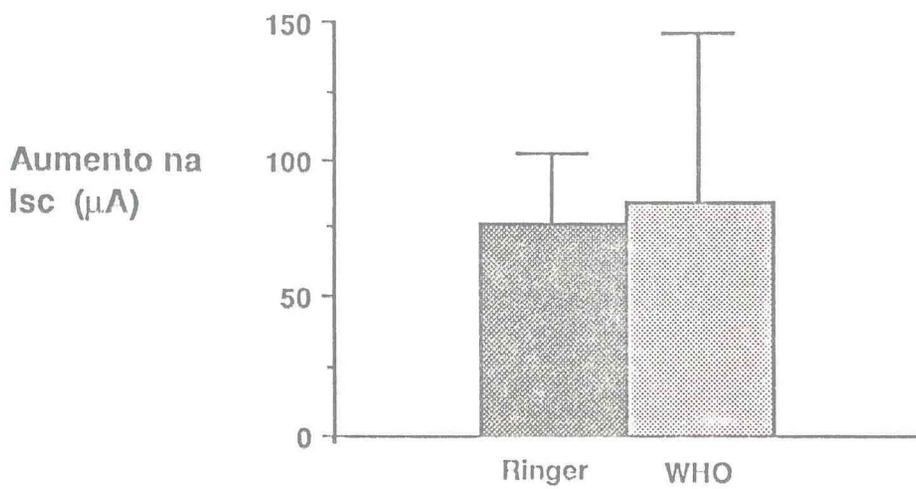


Figura 9B1 - Respostas máximas das drogas a diferentes soluções do lado mucoso com CT.

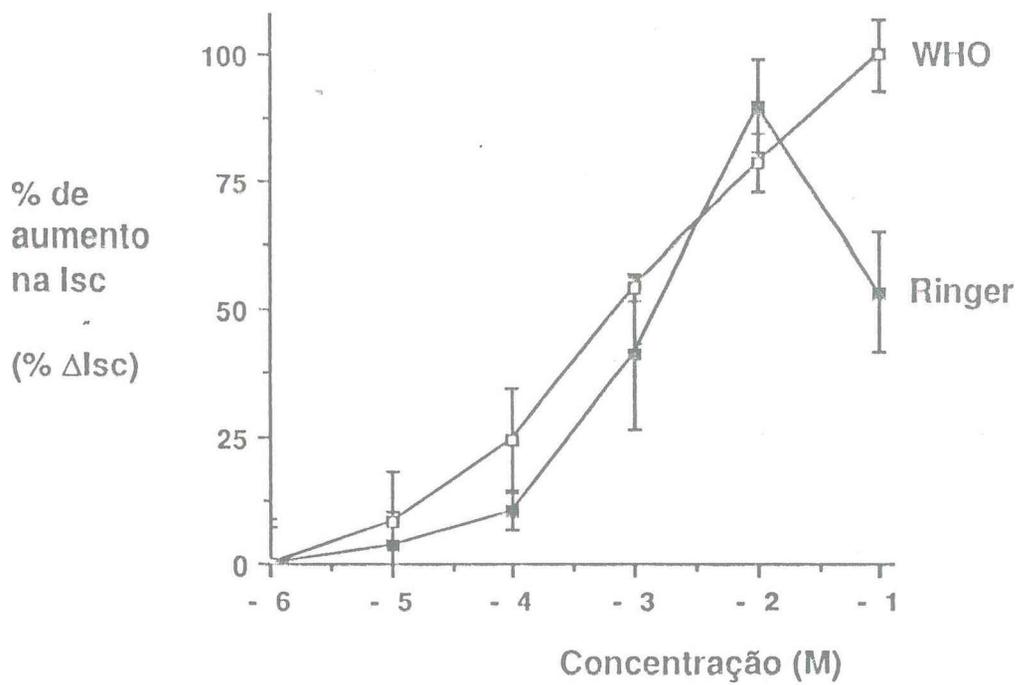


Figura 9B2 - Ringer e WHO no lado mucoso com CT. Glutamina + Alanina + Glicose no lado mucoso.

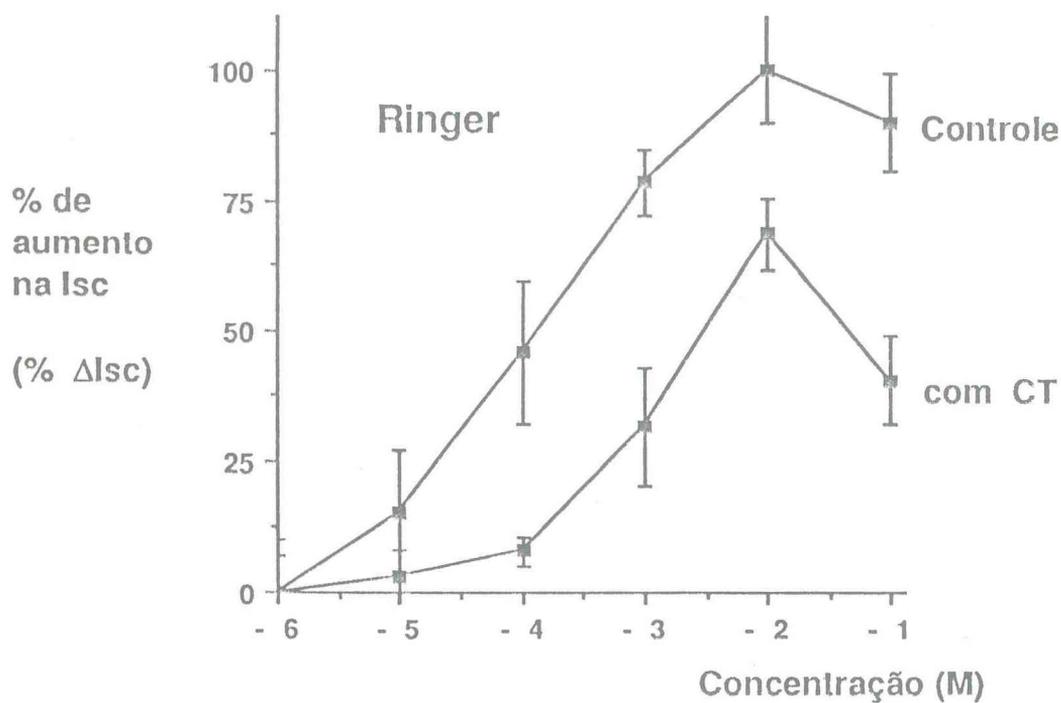


Figura 9C1 - Gln + Aln + Glicose no lado mucoso. Comparação entre o controle e o inoculado com CT.

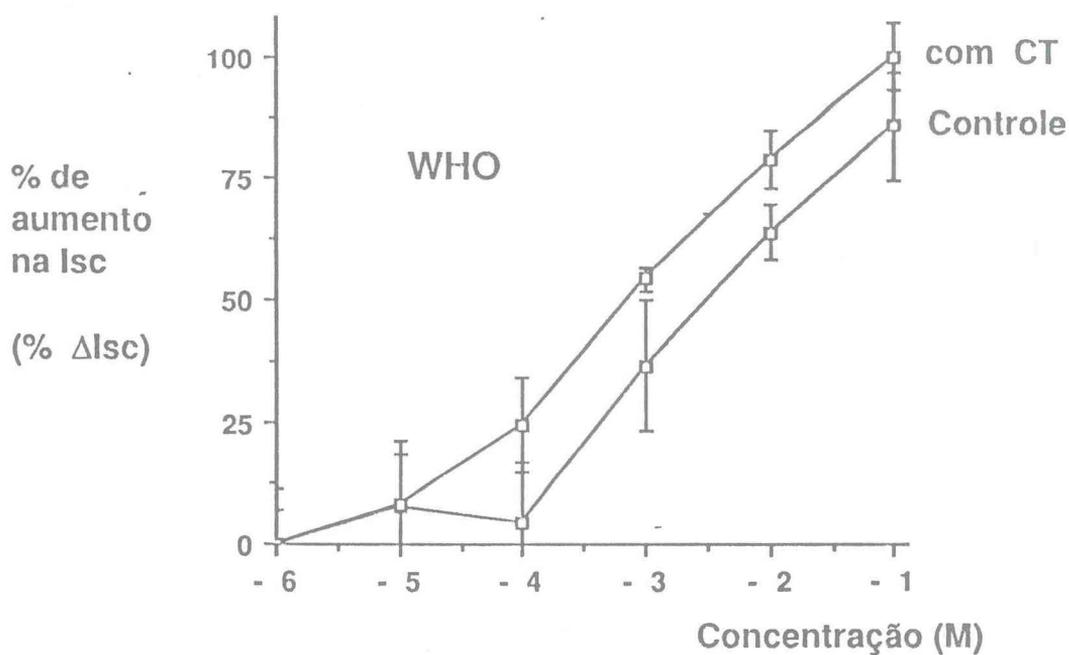


Figura 9C2 - Gln + Aln + Glicose no lado mucoso. Comparações entre o controle e inoculado com CT.

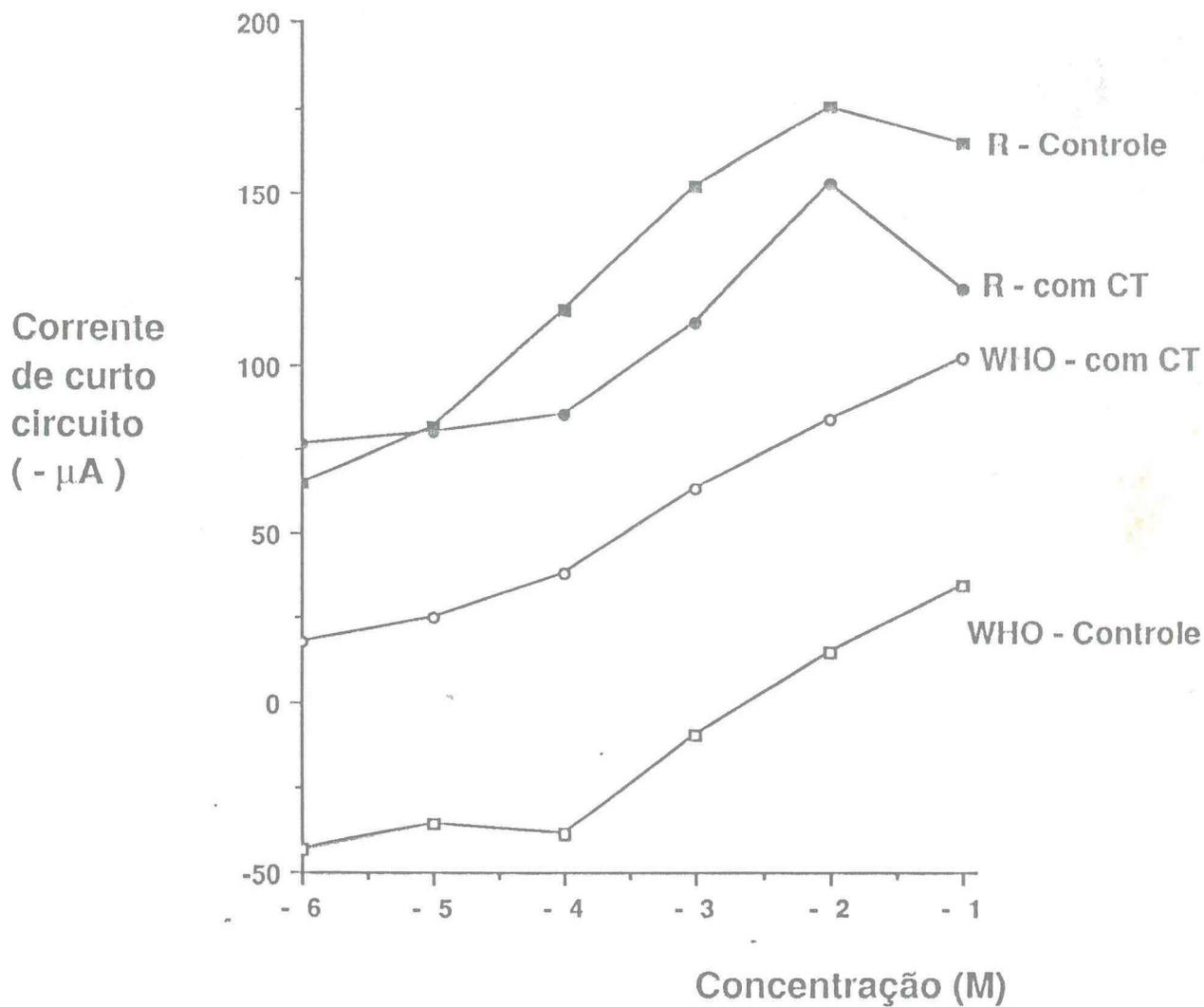


Figura 9D - Comparações de resposta da Gln + Aln + Glicose, na presença de Ringer e WHO, controle e com CT.

## TABELA GERAL

TABELA 1

Ileo normal  
Ringer normal  
Drogas no lado mucoso

### Glutamina

$EC_{50} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$   
 $pD_2 = 3.0$   $Em_{Gln} = 100\%$   
 $S = 29 \Delta 3.6\%$   $\Delta R = 224 \pm 37 \mu A.$

### Alanina

$EC_{50} = 4.3 \times 10^{-3} \text{ M}$   
 $pD_2 = 2.4$   $Em_{Gln} = 66\%$   
 $S = 23 \Delta 6.1\%$   $\Delta R = 148 \pm 27 \mu A.$

### Glicose

$EC_{50} = 3.3 \times 10^{-4} \text{ M}$   
 $pD_2 = 3.5$   $Em_{Gln} = 35\%$   
 $S = 10 \Delta 4.1\%$   $\Delta R = 80 \pm 35 \mu A.$

TABELA 2

Ileo normal  
Ringer normal  
Drogas no lado seroso

### Glutamina

$EC_{50} = 1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$   
 $pD_2 = 2.8$   $Em_{Aln} = 42\%$   
 $S = 21 \Delta 8.2\%$   $\Delta R = 30 \pm 12 \mu A.$

### Alanina

$EC_{50} = 6.4 \times 10^{-3} \text{ M}$   
 $pD_2 = 2.2$   $Em_{Aln} = 100\%$   
 $S = 56 \Delta 5.7\%$   $\Delta R = 71 \pm 33 \mu A.$

### Glicose

$EC_{50} = ?$   
 $pD_2 = ?$   $Em_{Gln} = ?$   
 $S = ?$   $\Delta R = 7 \pm 6 \mu A.$

TABELA 3

Ileo normal  
Ringer normal  
Drogas no lado mucoso/seroso

### Glutamina

$EC_{50} = 2.8 \times 10^{-3} \text{ M}$   
 $pD_2 = 2.5$   $Em_{Aln} = 65\%$   
 $S = 48 \Delta 8.4\%$   $\Delta R = 163 \pm 28 \mu A.$

### Alanina

$EC_{50} = 4.4 \times 10^{-3} \text{ M}$   
 $pD_2 = 2.4$   $Em_{Aln} = 100\%$   
 $S = 38 \Delta 4.2\%$   $\Delta R = 251 \pm 26 \mu A.$

### Glicose

$EC_{50} = 1.3 \times 10^{-3} \text{ M}$   
 $pD_2 = 2.9$   $Em_{Gln} = 40\%$   
 $S = 49 \Delta 3.2\%$   $\Delta R = 100 \pm 7 \mu A.$

## TABELA 4

Ileo normal

Colina/Na<sup>+</sup> : 1/1 (m)

Drogas no lado mucoso

### Glutamina

$$EC_{50} = 1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$pD_2 = 2.8 \quad Em_{Aln} = 96\%$$

$$S = 14\Delta 10.6\% \quad \Delta R = 43 \pm 16 \mu A.$$

### Alanina

$$EC_{50} = 1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$$

$$pD_2 = 2.0 \quad Em_{Aln} = 100\%$$

$$S = 66\Delta 12.2\% \quad \Delta R = 45 \pm 18 \mu A.$$

### Glicose

$$EC_{50} = 1.1 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$pD_2 = 3.0 \quad Em_{Aln} = 51\%$$

$$S = 31\Delta 3.7\% \quad \Delta R = 23 \pm 12 \mu A.$$

## TABELA 5

Ileo normal

Colina/Na<sup>+</sup> : 1/0 (m)

Drogas no lado seroso

### Glutamina

$$EC_{50} = ?$$

$$pD_2 = ? \quad Em = ?$$

$$S = ? \quad \Delta R = ?$$

### Alanina

$$EC_{50} = ?$$

$$pD_2 = ? \quad Em = ?$$

$$S = ? \quad \Delta R = ?$$

### Glicose

$$EC_{50} = ?$$

$$pD_2 = ? \quad Em = ?$$

$$S = ? \quad \Delta R = ?$$

## TABELA 6

Ileo normal

Ringer muc. pH =5.6

Drogas no lado mucoso

### Glutamina

$$EC_{50} = 3.5 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$pD_2 = 2.5 \quad Em_{Aln} = 39\%$$

$$S = 16221 \Delta 10.0\% \quad \Delta R = 43 \pm 19 \mu A.$$

### Alanina

$$EC_{50} = 2.1 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$pD_2 = 2.7 \quad Em_{Aln} = 100\%$$

$$S = 71 \Delta 5.9\% \quad \Delta R = 109 \pm 35 \mu A.$$

### Glicose

$$EC_{50} = 2.9 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$pD_2 = 2.5 \quad Em_{Aln} = 28\%$$

$$S = 80 \Delta 9.0\% \quad \Delta R = 31 \pm 9 \mu A.$$

## TABELA 7

Ileo normal

Ringer muc. pH = 8.0

Drogas no lado mucoso

### Glutamina

$$EC_{50} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$pD_2 = 2.8 \quad Em_{Aln} = 69\%$$

$$S = 47 \Delta 4.1\% \quad \Delta R = 159 \pm 9 \mu A.$$

### Alanina

$$EC_{50} = 1.7 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$pD_2 = 2.8 \quad Em_{Aln} = 100\%$$

$$S = 221 \Delta 3.7\% \quad \Delta R = 217 \pm 30 \mu A.$$

### Glicose

$$EC_{50} = 1.2 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$pD_2 = 2.9 \quad Em_{Aln} = 17\%$$

$$S = 18 \Delta 11.9\% \quad \Delta R = 38 \pm 15 \mu A.$$

## TABELA 8

Ileo controle

Ringer mucoso

Drogas no lado mucoso

**Glutamina + Alanina + Glicose**

$$EC_{50} = 3.4 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$pD_2 = 3.5 \quad Em_{RN} = 100\%$$

$$S = 31 \Delta 3.8\% \quad \Delta R = 111 \pm 43 \mu A.$$

Ileo controle

WHO mucoso

Drogas no lado mucoso

**Glutamina + Alanina + Glicose**

$$EC_{50} = 1.3 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$pD_2 = 2.9 \quad Em_{RN} = 65\%$$

$$S = 25 \Delta 6.5\% \quad \Delta R = 72 \pm 21 \mu A.$$

TABELA 9

Ileo inoculado c/CT

Ringer mucoso

Drogas no lado mucoso

Glutamina + Alanina + Glicose

$$EC_{50} = 1.6 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$pD_2 = 2.8 \quad Em_{WHO} = 90\%$$

$$S = 118 \Delta 8.1\% \quad \Delta R = 76 \pm 27 \mu A.$$

Ileo inoculado c/CT

WHO mucoso

Drogas no lado mucoso

Glutamina + Alanina + Glicose

$$EC_{50} = 8.5 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$pD_2 = 3.1 \quad Em_{WHO} = 100\%$$

$$S = 25 \Delta 6.6\% \quad \Delta R = 84 \pm 62 \mu A.$$

## 4 - DISCUSSÃO E ANALISE DOS RESULTADOS

### 1 - Análise geral dos resultados

Tomados em conjunto, os resultados experimentais demonstram que o maior aumento na corrente de curto circuito ( $I_{sc}$ ) é causada pela adição de glutamina na solução de Ringer no lado mucoso da membrana. Em qualquer outra condição, a alanina apresenta melhor resultado. A glicose, por sua vez, é o substrato que menos interfere na  $I_{sc}$ , em geral menos da metade do desenvolvido por qualquer dos dois substratos anteriores.

Por outro lado, a menor concentração necessária para se obter a metade do efeito máximo ( $EC_{50}$ ) é de glicose, exceto quando há aumento na acidez do lado mucoso, além disto, a solubilidade da glicose em solução aquosa é a maior, seguida pela alanina, e, finalmente pela glutamina.

A diminuição na concentração de íons sódio do lado mucoso da membrana causa uma grande diminuição tanto na  $I_{sc}$  basal quanto na resposta aos substratos. A sua total substituição acarreta completa ausência de resposta, e uma ainda maior queda na  $I_{sc}$  basal, sem, entretanto, interferir significativamente na resposta à Teofilina ( $10^{-3}$  M) adicionada no perfusato do lado seroso no final do experimento com o objetivo de se avaliar o estado funcional elétrico da membrana.

O aumento na acidez do lado mucoso pouco interfere na reposta causada pela alanina, mas provoca uma significativa inibição nas repostas à glutamina e à glicose. O aumento no pH aumenta a reposta à alanina mas inibe a reposta aos outros dois substratos.

As repostas obtidas pela adição simultânea de glutamina, alanina e glicose à solução de Ringer no lado mucoso demonstram que seus efeitos não são aditivos (a resposta máxima da glutamina, quando usada isoladamente, é aproximadamente, o dobro da obtida quando associada às outras). Inoculando-se previamente o íleo com CT, a resposta era ainda menor; infelizmente, não temos dados a respeito do comportamento da membrana quando inoculada e na presença de glutamina, isoladamente.

A presença da solução WHO no lado mucoso, provoca uma intensa queda na  $I_{sc}$ , semelhante à observada quando substituíamos os íons sódio por colina na solução de Ringer. Quando inoculávamos previamente o íleo com CT, a diminuição na  $I_{sc}$  basal era menor. Estes fatos levam à hipótese de que o mecanismo de ação da CT envolva alterações na concentração de íons sódio no fluido intestinal. As repostas causadas pela adição simultânea dos três substratos também foram pequenas, tanto no controle, quanto no inoculado com CT.

Uma análise detalhada dos resultados obtidos envolve também a constante de inclinação da curva (o coeficiente S). Matematicamente, este coeficiente mede a relação entre o aumento na concentração do substrato e o aumento da reposta obtida. Farmacologicamente, podemos interpretar este coeficiente como o valor da sensibilidade do tecido a uma determinada droga, de modo que, se um tecido apresenta um valor de S muito grande, a droga deve

ser usada com cautela, posto que, pequenas variações de concentração em torno de  $pD_2$  apresentam grandes variações de resposta.

Outro problema para se encontrar o real valor de  $S$ , decorre da metodologia empregada para se definir o valor do  $pD_2$ . Usando o método da regressão linear (pontos próximos de  $E_m/2$ ) para estimar o valor da abscissa deveríamos, pelo menos teoricamente, encontrar o mesmo valor do obtido pelo método gráfico de HILL, e isto, não se verificou em diversos experimentos. Portanto, um dos dois métodos é mais indicado (pode-se argumentar que o de HILL deve ser o melhor, uma vez que neste, usa-se todos os pontos experimentais, exceto os extremos, para o cálculo do valor de  $pD_2$ , ao passo que o da regressão, usa-se apenas os três valores centrais).

Se este argumento é procedente, então, um terceiro método que utilizasse todos os pontos, inclusive os extremos, seria ainda melhor. Isto é possível se, após o cálculo do valor de  $S$ , variássemos o valor da abscissa correspondente a  $pD_2$ , e, recalculássemos o valor de  $S$  até encontrarmos a abscissa que causasse a menor diferença entre o valor teórico e o correspondente valor experimental. Como este valor sempre pode ser encontrado, qualquer que seja a forma da curva obtida a partir dos pontos experimentais, resta discutir a validade do próprio modelo proposto.

Partindo-se do princípio de que um modelo é válido desde que os resultados previstos sejam compatíveis com os resultados experimentais, então, o modelo proposto pode ser ou não válido, a menos que se defina o que se entende por "compatível". A equação proposta por ARIENS não é compatível (na maioria dos experimentos) pelo simples fato que os pontos experimentais se afastam da curva hiperbólica de constante " $S$ " igual a 10.

Consequentemente, o modelo gráfico de LINEWEAVER - BURK também não é compatível. O modelo de HILL, que também deriva da equação de ARIENS, demonstra que a própria equação não é compatível; se o fôsse, o coeficiente de inclinação da reta de regressão seria igual a um.

Por outro lado, o coeficiente de correlação, na maioria dos experimentos está próximo de um, o que indica que o modelo de HILL é compatível, e também que os pontos experimentais não se alinham quando representados em escala duplamente logaritmica, em pelo menos alguns experimentos. Curiosamente, nem sempre o valor de S calculado pelo método de HILL é muito próximo do valor de S calculado por aproximação, mesmo quando o coeficiente de correlação era próximo de um. Por fim, a estimativa do valor de S por aproximação é o que melhor se ajusta aos pontos experimentais. Portanto, concluímos que este método, e a equação proposta, é, no mínimo, a mais compatível.

## 2 - Análise dos resultados

### TABELA 1 e FIGURAS 1

A análise dos dados experimentais apresentados na Tabela 1 (drogas no lado mucoso, solução de Ringer e íleo normais) a maior resposta foi obtida com a glutamina, seguida pela alanina, e finalmente pela glicose, (ver Figura 1B2). A mesma ordem foi seguida pelo valor de S, implicando que a sensibilidade da membrana no lado mucoso é maior para a glutamina. A menor EC<sub>50</sub> foi da glicose, seguida pela glutamina e depois pela alanina.

Exceto para a alanina, o valor de  $S$ , calculado tanto por aproximação, quanto pela área, quanto pelo método de HILL, se mostram muito próximos. Um destaque especial é dado pelo valor de  $S$  para a glicose ( $S = 10$ ), ou seja, a curva é tipicamente Michaeliana, e, como já nos referimos, a equação de ARIENS só é adequada para representar a curva dose-resposta quando o valor de  $S$  é igual ou muito próximo de 10. A propósito, Cori (CORI, 1925), mediu as velocidades relativas das hexoses e pentoses no intestino e demonstrou que estas velocidades obedeciam a uma cinética química de Michaelis-Menten.

No gráfico apresentado na Figura 1A, podemos observar que a dose de alanina correspondente a  $3 \times 10^{-4}$  M apresenta um efeito muito maior do que o esperado; a verdade, este é o único ponto, entre 19 outros, no qual o valor teórico esperado não está contido no desvio padrão do ponto experimental correspondente. A possibilidade de um erro de cálculo no valor de  $pD_2$ , em princípio, deve ser descartada, uma vez que tanto o método da regressão linear, quanto o método de HILL, apresentaram exatamente, o mesmo valor de  $pD_2$ . Além disto, podemos observar no gráfico da Figura 1C-Alanina que este ponto não se alinha com os demais pontos experimentais.

Outro fato que também diz respeito à curva da alanina, é que o valor de  $S$ , calculado pelo método de HILL ( $S = 9$ ) é muito menor que o calculado por aproximação ( $S = 23$ ), e ambos são diferentes do valor de  $S$  calculado pela área ( $S = 18$ ). Se, o valor de  $S$  calculado pelo método de HILL estivesse correto, então a curva seria Michaeliana, e, o método de LINEWEAVER - BURK, apresentado na Figura 1D-Alanina seria adequado para calcularmos tanto o valor de  $pD_2$  quanto o valor do efeito máximo, o que não se verifica. Na verdade, toda discussão que

envolva a possibilidade do valor de S calculado por aproximação estar errado deve ser descartada, uma vez que por este método encontramos a curva mais próxima possível (na medida do incremento arbitrariamente imposto) onde estes pontos poderiam ser distribuídos de acordo com uma curva de tipo hiperbólica. Conclui-se, portanto, que o valor de S calculado pela área também está incorreto.

De qualquer forma, se, por algum erro, o valor deste ponto fosse um pouco menor, o valor de S seria um pouco maior, uma vez que a diferença dos valores entre os efeitos para as concentrações de  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M e a dos esperados já estão muito próximos do desvio máximo de S.

Outra possibilidade é que o valor deste ponto seja exato, assim como o valor de S, e a diferença entre o valor experimental e o teórico decorra da estimativa do  $pD_2$ , uma vez que, se este fosse um pouco maior, a curva se deslocaria para a esquerda e provavelmente passaria dentro dos desvios padrões de todos os pontos experimentais. (Lembramos que o valor de  $pD_2$  foi calculado usando-se apenas os três pontos centrais, e, portanto, o ponto em questão não foi utilizado.

A análise dos dados apresentados na Figura 1C-Glutamina, não oferecem dificuldades, uma vez que, com o valor de S muito maior que 10, era de se esperar que - a equação de ARIENS, e conseqüentemente a representação duplamente inversa não se mostrasse adequada para o cálculo de  $pD_2$  ou do efeito máximo. Por outro lado, a estimativa do efeito máximo apresentado na Figura 1C - Glicose é intrigante: apenas 71.4% ao invés de 100%, e, assim como MCGILVERY, 1972 e WEST, 1969, também achamos que os pontos de menor valor interferem substancialmente com o coeficiente "b" da reta

de regressão, causando fortes distorções na estimativa do efeito máximo.

Os gráficos apresentados na Figura 1E têm como objetivo a comparação visual da convexidade das curvas hiperbólicas e sua relação com o valor de  $S$ . Entretanto, como as concentrações são diferentes, então as comparações devem ser feita com outras Figuras nE que apresentem as mesmas concentrações representadas no eixo das abscissas.

#### TABELA 2 e FIGURAS 2

Os dados experimentais apresentados na Tabela 2, (drogas no lado seroso, solução de Ringer e íleo normais) tanto a resposta (Figura 2B1) quanto o valor de  $S$  foram maiores para a alanina do que para a glutamina. O menor  $pD_2$  foi da glutamina, a glicose não apresentou resposta significativa (Figura 2B2).

Comparando estes dados com os da Tabela 1, podemos constatar que as respostas obtidas do lado seroso são muito menores que as do lado mucoso da membrana, com o  $pD_2$  apenas ligeiramente menor, entretanto, o lado seroso apresenta uma sensibilidade muito alta para a alanina ( $S = 56$ ) quando comparada com o lado mucoso ( $S = 23$ ). Com relação à glutamina, os valores de  $pD_2$  e  $S$  são apenas discretamente menores que os do lado mucoso, entretanto a resposta é cerca de 7 vezes menor.

Supomos que tanto a glutamina quanto a alanina possam se difundir para o lado mucoso através da via para-celular e assim explicar tanto a semelhança entre os valores de  $pD_2$  e de  $S$  quanto à

diminuição na resposta. Considerando que o peso molecular da glutamina (146.1) é maior que da alanina (89.1), então, esta última poderia se difundir em maior quantidade e portanto, a queda na resposta seria menor (mas não tanto) que a da glutamina. Se isto for verdadeiro, então podemos interpretar o alto valor de S para a alanina como uma capacidade desta, no lado seroso de interferir com a sensibilidade da membrana no lado mucoso, além de apresentar também algum efeito, independentemente no lado seroso.

### TABELA 3 e FIGURAS 3

Os dados experimentais apresentados na Tabela 3 (drogas adicionadas simultaneamente tanto do lado mucoso quanto do lado seroso, solução de Ringer e íleo normais), a maior resposta obtida foi da alanina, seguida pela glutamina e, finalmente, a glicose (Figura 3B1). O valor de  $pD_2$  foi maior para a glicose (2.9) e praticamente iguais para a glutaminã e alanina (2.5 e 2.4, respectivamente), os valores de S para a glutamina e glicose foram de 48 e 49, sendo menor para a alanina ( $S = 38$ ).

A principal dificuldade de análise dos dados apresentados nesta tabela diz respeito aos da glutamina, por três motivos:

- 1 - A distribuição dos pontos experimentais não obedecem a uma curva hiperbólica, uma vez que os pontos abaixo e acima de  $pD_2$  são muito assimétricos.

- 2 - Os maiores desvios em relação à curva hiperbólica mais próxima ( $S = 48 \Delta 8.4\%$ ) ocorrem acima do valor de  $pD_2$ .

3 - O desvio padrão dos pontos experimentais evidenciam uma boa estabilidade da membrana.

Entretanto, a análise da Figura 3A - Glutamina, mostra que o valor do ponto correspondente ao efeito máximo parece ter sido superestimado, ou seja, nesta condição, poderíamos obter uma resposta ainda maior se aumentássemos a concentração. Este argumento é ratificado também pela análise do gráfico da Figura 3B2 - Glutamina onde podemos observar o paralelismo entre os efeitos da alanina e da glutamina, de modo que o efeito máximo da glutamina parece realmente ter sido superestimado. Se considerarmos esta possibilidade, a diminuição do valor deste efeito causaria uma grande diminuição no valor de S e, deslocando-se a curva para a esquerda, aumentaríamos o valor de  $pD_2$ . Considerando esta possibilidade, a curva dose-resposta da glutamina quando aplicada em ambos os lados seria semelhante a obtida quando aplicamos apenas no lado mucoso.

A alta resposta da alanina neste experimento indica que os efeitos são aditivos. Entretanto, o valor de  $pD_2$  não ajuda na interpretação, uma vez que ele é praticamente o mesmo de quando a alanina é administrada isoladamente (ver Tabela 1 e Tabela 2); por outro lado, o valor de S (38) é intermediário (lado mucoso S= 23 e lado seroso S = 56). Nossa interpretação é que pelo menos parte do efeito da alanina no lado seroso é independente do efeito do lado mucoso, e portanto, as duas curvas devem ser somadas. Como o valor de  $pD_2$  é um pouco menor no lado seroso, onde S é maior, concluímos que a contribuição do efeito no lado seroso é maior quando a concentração neste lado for maior que do  $pD_2$  do lado mucoso.

As respostas obtidas na presença de glicose neste experimento, são particularmente interessantes, uma vez que quando

aplicadas no lado seroso, isoladamente, a glicose não tem efeito significativo. Com a administração de glicose em ambos os lados, a resposta também não é significativamente diferente de quando ela é administrada isoladamente no lado mucoso. Entretanto, o valor do  $pD_2$  diminui e a sensibilidade do tecido aumenta de 10 para 49; nossa interpretação, é de que, assim como alanina, a glicose no lado seroso também interfere na sensibilidade do lado mucoso.

Nas Figuras 3F, 3G e 3H, apresentamos dois gráficos em cada uma. Nos gráficos superiores nos limitamos a representar os pontos experimentais e seus respectivos desvios padrão unidos por um segmento de reta, objetivando comparar o efeito relativo de cada uma das drogas utilizadas quando aplicadas no lado mucoso, seroso e mucoso/seroso. Nos gráficos inferiores, também esboçamos os pontos experimentais e seus respectivos desvios padrão, mas, ao invés de unilos por uma reta, primeiramente calculamos os valores teóricos usando o valor da constante hiperbólica  $S$  (da mesma maneira que nas Figuras nA), após o que somamos a média dos desvios padrão e representamos o ponto correspondente. O mesmo procedimento foi repetido, só que ao invés de somarmos, subtraímos aquele valor do correspondente teórico. Portanto, as áreas pontilhadas, correspondem a um conjunto de curvas com o mesmo valor de  $S$ .

Nos gráficos inferiores destas Figuras, podemos constatar que a maioria dos pontos médios experimentais e pelo menos parte do seu desvio padrão estão contidos dentro da área pontilhada. Acreditamos que seja possível encontrar um coeficiente de correlação entre o desvio máximo de  $S$  e o número de pontos experimentais contidos neste desvio. Se pudéssemos encontrar esta relação, a diferenciação entre os lados da membrana poderia ser feita com qualquer precisão desejada.

Na Figura 3F - Glutamina (gráfico inferior) podemos constatar que o lado mucoso se diferencia dos dois outros experimentos quando a concentração é pouco menor de  $3 \times 10^{-4}$  M, já a diferenciação entre os experimentos envolvendo os lados seroso e mucoso/seroso só ocorre em concentrações maiores que este valor.

Na Figura 3G - Alanina (gráfico inferior), a diferenciação entre os três experimentos só ocorre acima de  $10^{-3}$  M (para o lado seroso), entre o lado mucoso e mucoso/seroso, só a partir de  $3 \times 10^{-2}$  M.

Na Figura 3H - Glicose (gráfico inferior) a diferenciação é mais difícil, uma vez que só existem pequenas áreas, especialmente na concentração de  $3 \times 10^{-3}$  M onde é possível se distinguir se o efeito é mucoso ou mucoso/seroso (a despeito de não existir resposta no lado seroso).

Obviamente que em se tratando de câmaras de Üssing, estas observações não são particularmente importantes, uma vez que nós sabemos de que lado a droga está sendo administrada, entretanto, se considerarmos a possibilidade do estudo de segmentos de membrana, ou células isoladas, então estas observações são pertinentes.

#### TABELA 4 e FIGURAS 4

Os dados experimentais apresentados na Tabela 4 ( drogas no lado mucoso, íleo normal e solução de Ringer colina/Na<sup>+</sup> na proporção de 1/1) demonstram uma relação inversa entre concentração de íons sódio no lado mucoso e a magnitude da corrente de curto circuito. Este fato já haviam sido observado por WILSON e cols, 1960; MATTHEWS, 1965 e CURRAN, 1968; estes autores demonstraram que as formas

levóginas (L) de vários aminoácidos apresentavam uma cinética química compatível com a existência de carreador sódio dependente.

Analisando apenas as respostas obtidas, podemos constatar que a inibição é menor para a alanina (3 vezes) e maior para a glutamina (4 vezes), entretanto, a  $pD_2$  da glutamina praticamente não varia, ao passo que ela aumenta para as outras duas, quando comparados com a Tabela 1.

Por outro lado, uma análise mais detalhada indica que o valor do  $pD_2$  da alanina deve estar incorreto, uma vez que os valores teóricos estão (exceto o primeiro), todos abaixo dos valores experimentais, e, o baixo valor de correlação linear da reta de regressão dos pontos centrais também indica que estes pontos estão longe do alinhamento necessário para o cálculo de  $pD$ , além disto, o gráfico apresentado na Figura 4B2 indica que o valor do efeito máximo tanto para a alanina quanto para a glutamina foi subestimado.

Na Figura 4A-Alanina, podemos notar que, se deslocássemos a curva da alanina para a esquerda, além de aproximarmos melhor a curva hiperbólica dos pontos experimentais, aumentaríamos o valor do  $pD_2$  desta droga, e, assim concluir que a alteração na concentração de sódio não altera o  $pD_2$  nem da glutamina nem da alanina.

A Figura 4C mostra que os valores intermediários estão muito desalinhados, com baixos coeficientes de correlação tanto para alanina quanto para a glutamina, isto associado com os altos desvios padrão apresentados na Tabela 4 indicando uma baixa estabilidade da membrana quando submetida a esta concentração de sódio.

Entretanto, o alto valor de S para a alanina e glicose e sua diminuição para a glutamina quando comparados com os dados da Tabela 1 abre a possibilidade de que as propriedades do carreador sofra alterações diferenciais com a variação da concentração de sódio no lado mucoso da membrana.

#### TABELA 5 e FIGURAS 5

Na Tabela 5 apresentamos os dados experimentais obtidos com drogas no lado mucoso, íleo normal e solução de Ringer onde os íons de sódio foram totalmente substituídos pela colina. Como podemos constatar, não houve variação significativa na corrente de curto circuito. Portanto, estes dados corroboram com a interpretação apresentada no ítem anterior, ou seja, a resposta da glutamina, alanina e glicose é totalmente dependente da presença de íons de sódio.

Na Figura 5A apresentamos um gráfico com a respectiva alteração na corrente de curto circuito na condição de ausência de íons de sódio, além disto, o desvio padrão dos pontos experimentais evidenciam o alto grau de instabilidade da corrente quando a concentração de íons de sódio é zero.

Na Figura 5B apresentamos a alteração na corrente de curto circuito para cada uma das drogas testadas em diferentes concentrações de íons de sódio no lado mucoso da membrana. Estes dados demonstram que a alteração na resposta não é uma função linear da variação da concentração de íons de sódio. É possível, entretanto, que esta função também seja hiperbólica!.

TABELA 6 e FIGURAS 6

Os resultados experimentais apresentados na Tabela 6 foram obtidos com a administração das drogas no lado mucoso, íleo normal e solução de Ringer com pH igual a 5.6. Neste pH não há interferência significativa na resposta à alanina; há porém, uma acentuada inibição na resposta tanto da glicose quanto da glutamina, quando comparadas com os dados da Tabela 1.

Em termos de magnitude de resposta, a maior foi da alanina, seguido-se a glutamina e depois a glicose. Comparando-se os dados da alanina desta Tabela com a Tabela 1, constatamos que além de não haver variação significativa na resposta, o  $pD_2$  também pouco variou. Entretanto, o valor de  $S$  aumentou bastante, não só para ela, como também para a glutamina e a glicose, o que demonstra que a sensibilidade do lado mucoso da membrana aumenta com a diminuição do pH.

O principal destaque da Figura 6A é o altíssimo valor de  $S$  (16221) para a glutamina e, a análise da Figura 6B2 indica uma superestimativa no valor do efeito máximo, além disto, o valor do desvio máximo para  $S$  é muito grande (10%); assim como os desvios padrão dos pontos experimentais. Pode-se questionar se estes pontos realmente se distribuem conforme uma curva hiperbólica. Como já nos referimos, a constante  $S$  só tem validade se, os pontos experimentais se distribuírem segundo uma curva hiperbólica e, como o único critério para definir se determinado conjunto de pontos experimentais formam ou não uma curva hiperbólica é que o valor calculado esteja contido dentro do desvio padrão do ponto experimental correspondente, então, o valor de  $S$  poderia diminuir muito ( $S = 750$ ), e, ainda assim, os

pontos teóricos estariam contidos no desvio padrão destes pontos experimentais. Obviamente que a quantidade de pontos experimentais representados pelo valor de  $S$  também diminuiria.

O efeito deste altíssimo valor de  $S$  no gráfico pode ser visto na Figura 6E - Glutamina, onde a curva hiperbólica se aproxima de uma reta. A propósito, se compararmos estes dados com os da tabela 4, 5 e 6 podemos perceber que as variações nos parâmetros da curva dose-resposta da glutamina vem sendo acompanhados por variações semelhantes nos parâmetros da glicose, exceto pelo valor de  $S$  apresentado na tabela 4.

#### TABELA 7 e FIGURAS 7

Os dados experimentais apresentados na Tabela 7 (drogas no lado mucoso, íleo normal e solução de Ringer com pH igual a 8.0 comparados com os das tabelas 1, 4, 5 e 6 continuam demonstrando uma grande diferença entre o comportamento dos parâmetros dose-resposta da alanina em relação a glutamina e a glicose e a semelhança entre estas duas últimas.

O aumento no pH causou um grande aumento tanto na resposta à alanina quanto no valor de  $S$ , sem, praticamente, alteração no  $pD_2$ . Com relação à glutamina e à glicose, as respostas diminuíram, e o aumento de  $S$  foi menor do que o da alanina, com decréscimo no valor de  $pD_2$  para a glicose.

A distribuição dos pontos experimentais e teóricos apresentados na Figura 7A apresenta boa correlação, e a Figura 7B2 indica uma distribuição compatível com uma curva senoidal. Exceto

pelo cálculo do valor de  $S$  para a alanina e para a glicose, o método de HILL da Figura 7C apresenta valores muito semelhantes ao calculado pelos dois métodos anteriores. Os gráficos de LINEWEAVER - BURK nas figuras 7D continuam apresentando fortes discrepâncias entre os pontos experimentais e a reta de regressão, especialmente quando o valor de  $S$  se distancia de 10.

Na Figura 7E apresentamos o gráfico dos pontos experimentais ligados por segmentos de reta, que, exceto para a glicose na concentração de  $10^{-3}$  M, apresenta uma distribuição compatível com uma curva hiperbólica.

Finalmente, os gráficos apresentados na Figura 7F mostram, o comportamento diferenciado da alanina em relação ao da glutamina e da glicose, além da semelhança entre estas duas. Como podemos ver, o aumento do pH aumenta a resposta a alanina, mas diminui a resposta tanto da glutamina quanto da glicose e, por outro lado, a diminuição do pH causa acentuada diminuição na resposta da corrente de curto circuito a todas as drogas testadas.

#### TABELA 8 e FIGURAS 8

Os dados experimentais apresentados na Tabela 8 (glutamina + alanina + glicose lado mucoso, íleo controle, solução de Ringer e solução WIIO no lado mucoso). As alterações na corrente de curto circuito não se mostraram significativamente diferente entre as duas soluções. O valor correspondente ao  $pD_2$  foram estimados a partir do valor de  $X_{50}$  e apresentados na parte inferior da tabela (o valor de  $pD_2$  é maior quando usamos a solução de Ringer no íleo controle). O valor

da constante hiperbólica  $S$ , entretanto, deve ser bem inferior ao apresentado, uma vez que o cálculo não obedeceu o critério do aumento logaritmo na concentração acumulada, podendo, entretanto servir de comparação entre estes dados e os dados apresentados na Tabela 9.

Na Figura 8A apresentamos o gráfico com os valores da variação da corrente de curto circuito. A diminuição da resposta à solução de Ringer observada na concentração de glutamina  $10^{-2}$  M, alanina  $3 \times 10^{-2}$  M e glicose  $10^{-2}$  M não é estatisticamente significativa.

Na Figura 8B1 apresentamos as variações nas respostas em função das diferentes soluções, e na Figura 8B2 nos limitamos a unir os pontos experimentais com segmentos de reta.

#### TABELA 9 e FIGURAS 9

Os dados experimentais apresentados na Tabela 8 (glutamina + alanina + glicose lado mucoso, íleo inoculado com  $1 \mu\text{g}$  de enterotoxina da cólera, solução de Ringer e solução WHO no lado mucoso). As alterações na corrente de curto circuito não se mostraram significativamente diferente entre as duas soluções. O valor correspondente ao  $\text{pD}_2$  foram estimados a partir do valor de  $X_{50}$  e, comparados com os dados da Tabela 8, os valores das respostas apresentadas na Tabela 9, também não são estatisticamente significativos. O valor de  $X_{50}$  na solução de Ringer e a solução WHO são iguais, e o valor de  $S$  (25) da curva quando usada a solução de WHO é igual ao obtido quando no experimento do íleo controle.

Na Figura 9A, entretanto, mostra um alto valor de S para a curva dose-resposta usando a solução de Ringer no lado mucoso como perfusato. Se compararmos com os valores correspondentes de cada uma das drogas isoladamente, a interpretação dos valores de S é duvidosa, a razão para tanto decorre do fato deste valor não ter obedecido a padronização apresentada na metodologia. Na Figura 9B1 apresentamos os valores das alterações máximas das correntes e na Tabela 9C2 apresentamos os valores da corrente de curto circuito, nossa interpretação para a acentuada redução no valor da corrente de curto circuito basal decorra, pelo menos em parte, da baixa concentração de íons sódio na solução WHO.

## 5 - CONCLUSÕES

1 - As cinéticas das curvas dose-resposta sugerem que o co-transporte na mucosa intestinal para a alanina é diferente daqueles apresentados pela glutamina e glicose. Os resultados demonstram que todos os substratos utilizados causam um aumento significativo na corrente de curto-circuito e na diferença de potencial, sugerindo um aumento no sistema de co-transporte intestinal de cátion da mucosa para serosa. O sistema de co-transporte de cátion com a glutamina é mais eficaz do que o da alanina e glicose. Ambos, glutamina e alanina apresentaram um efeito máximo de aproximadamente o dobro da glicose.

2 - A substituição de sódio por colina no meio luminal abole completamente os efeitos da glutamina, alanina e glicose, demonstrando a dependência exclusiva de sódio para o sistema de co-transporte dos três substratos no lado luminal.

3 - A adição de alanina e glutamina no lado seroso da mucosa causa um aumento da corrente de curto-circuito, o qual foi aditivo para alanina quando adicionado em ambos os lados da mucosa intestinal. A resposta máxima para glutamina no lado mucoso foi parcialmente inibida quando da adição de glutamina no lado seroso. Glicose no lado seroso não altera a corrente de curto-circuito, quando comparamos com a adição no lado mucoso, embora a cinética inicial da curva tenha mudado, sem contudo alterar o efeito máximo. Estes resultados sugerem uma importante influência metabólica da alanina e glutamina no sistema de co-transporte destes substratos no intestino.

4 - Variações no pH (5.6, 7.4 e 8.0) no lado luminal do intestino altera sensivelmente os sistemas de co-transportes da glutamina, alanina e glicose. Os pHs ideais para melhor eficácia dos sistemas de co-transportes da glutamina, alanina e glicose foram 7.4, 8.0 e 7.4, respectivamente.

5 - A combinação de glutamina, alanina e glicose à solução de ringer ou da WHO /UNICEF demonstram que seus efeitos não são aditivos e que a resposta da glutamina é parcialmente inibida. O estudo das cinéticas individuais das curvas sugerem um antagonismo parcial, provavelmente não-competitivo, indicando uma influência metabólica negativa na combinação dos três substratos.

6 - No modelo de diarreia secretória, utilizando a toxina da cólera a combinação glutamina, alanina e glicose apresentam efeitos semelhantes a do intestino sem toxina controle. Estes resultados demonstram a persistência intacta dos sistemas de co-transporte para glutamina, alanina e glicose mesmo na presença de diarreia secretória.

7 - O cálculo de "S" no modelo matemático proposto para analisar as curvas dose-resposta, demonstram que a equação sugerida é, no mínimo, a mais compatível comparada com as outras originalmente citadas, para o melhor reajuste dos pontos experimentais e, provavelmente mais adequado para o cálculo do  $pD_2$  das curvas.

## 6 - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

01. ABDALLA, S.; HELMY, N. & ESSAILY, M. E. *Oral rehydration for the low-birthweight baby with diarrhoea.* Lancet, 2: 818-9, 1984.
02. AHMED, I. & WEBB, J. K. G. *Childhood diarrhoea in S. India with particular reference to fluid and eletrolyte disturbance.* Indian J. Child. Health, 12: 85-90, 1963.
03. ALEXANDER, M. B. *Infantile diarrhoea and vomiting: a review of 456 infants treated in a hospital unit for enteritis.* Br. Med. J., 2: 973-8, 1948.
04. ANNEGERS, J. H. *Some effects of hexoses on the absorption of amino acids.* Am. J. Physiol., 210: 701, 1966.
05. BATSCHELET, E. Introdução à matemática para biocientistas. 2. ed. São Paulo, EDUSP, 325-31, 1978.
06. BROWN, K. H.; GASTARRADUY, A. S. & SAAVECHA, J. M. *Effects of continued oral feeding on clinical and nutritional outcomes of acute diarrhea in children.* J. Pediatr., 112: 191-200, 1988.
07. CHATTERJEE, H. N. *Control of vomiting in cholera and oral replacement fluid.* Lancet, 2: 1063-8, 1953.

08. CORI, C. F. *Fate of sugar in animal body; rate of absorption of hexoses and pentoses from intestinal tract.* J. Biol. Chem., **66**: 691, 1925.
09. CRANE, R. K. *Hypotesis for mechanisms of intestinal active transport of sugars.* Fed. Proc., **21**: 891, 1962.
10. CURRAN, P. F. *Coupling between transport processes in the intestine.* Physiologist, **11**: 3, 1968.
11. DARROW, D. C. *The retention of electrolyte during recovery from severe dehydration due to diarrhea.* J. Pediatr., **28**: 515-40, 1946.
12. DARROW, D. C.; PRATT, E. L.; FLETT, J. Jr.; GAMBLE, A. H. & WIESE, H. F. *Disturbances of water and electrolytes in infantile diarrhea.* Pediatrics, **3**: 129, 1949.
13. DE LEAN, A.; MUNSON, P. J. & RODBARD, D. *Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: applications of bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves.* Am. J. Physiol., **235(2)**: E97-102, 1978.
14. DICKENS, F. & WEIL-MALHERBE, H. *Metabolism of normal and tumor tissue. The metabolism of intestinal mucous membrane.* Biochem. J., **35**: 7-15, 1941.
15. FINBERG, L.; HARPER, P. A.; HARRISON, H. E. & SACK, B. *Oral rehydration for diarrhea.* J. Pediatr., **101**: 497-9, 1982.

16. FRIDHANDLER, L. & QUASTEL, J. H. *Absorption of sugar from isolated surviving intestine.* Arch. Biochem., **56**: 412, 1955.
17. GUERRANT, R. L.; KIRCHHOFF, L. V. & SHIELDS, D. S. *Prospective study of diarrheal illness in northeastern Brazil: patterns of diseases, nutritional impact, etiologies, and risk factors.* J. Infect. Dis., **148**: 986-97, 1983.
18. HARIG, J. M.; SOERGEL, K. H.; KOMOROWSKI, R. A. & WOOD, C. M. *Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation.* N. Engl. J. Med., **320**: 23-8, 1989.
19. HARRISON, H. E. *The treatment of diarrhea in infancy.* Pediatr. Clin. North Am., **1**: 335-48, 1954.
20. HISCHHORN, N. *Oral rehydration therapy for diarrhea in children- a basic primer.* Nutr. Rev., **40**: 97-104, 1982.
21. HISCHHORN, N. *The treatment of acute diarrhea in children: an historical and physiological perspective.* Am. J. Clin. Nutr., **33**: 637-63, 1980.
22. HISCHHORN, N.; CASH, R. A.; WOODWARD, A. & SPIVEY, G. H. *Oral fluid therapy of Apache children with acute infectious diarrhoea.* Lancet, **1**: 15-20, 1972.

23. HISCHHORN, N.; KINZIE, J. L. & SACHAR D. B. *Decrease in net stool output in cholera during intestinal perfusion with glucose-containing solutions.* N. Engl. J. Med., **279**: 176-81, 1968.
24. HISCHHORN, N.; McCARTY, B. J. & RANNEY, B. *Ad-libitum oral glucose-electrolyte therapy for acute diarrhea in Apache children.* J. Pediatr., **83**: 562-7, 1973.
25. JACOBS, D. O.; EVANS D. A.; MEALY, K.; O'DWYER, S. T.; SMITH, R. J. & WILMORE, D. W. *Combined effect of glutamine and epidermal growth factor on the rat intestine.* Surgery, **104**: 358-364, 1988.
26. KENAKIN, T. P. *The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues.* Pharmacol. Rev., **36(3)**:165-221, 1984.
27. KIMURA, R. F. *Glutamine in the preferred oxidative substrate for small intestine of suckling rat.* Pediatr. Res., **18**: 295A, 1984.
28. KIMURA, R. F. & WARSHAW, J. B. *Control of fatty acid oxidation by intramitochondrial NADH/NAD<sup>+</sup> in developing rat small intestine.* Pediatr. Res., **23**: 262-5, 1988.
29. KINGSTON, M. *Electrolyte disturbances in Liberian children with kwashiorkor.* J. Pediatr., **83**: 859-64, 1973.

30. LIMA, A. A. M & MAHALANABIS, D. *New approaches to oral rehydration therapy.* Baillière's Clin. Trop. Med. Commun. Dis., **3**: 3, 627-36, 1988.
31. LIMA, A. A. M.; INNES, D. J.; CHADEE, K.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D. & GUERRANT, R. L. *Clostridium difficile Toxin A: Interactions with mucus and early sequential histopathologic effects in rabbit small intestine.* Lab. Invest., **61(4)**: 419-425, 1989.
32. MAHALANABIS, D. & MERSON, M. *Development of an improved formulation of oral rehydration salts (ORS) with anti-diarrhoeal and nutritional properties: a 'Super ORS'.* In Holmgren, J.; Lindberg, A. and Mollby, R. (eds): *Development of Vaccines and Drugs Against Diarrhea*, pp 240-56. Studentlitteratur: 11th Nobel Conference, Stockholm. 1985.
33. MAHALANABIS, D.; MERSON, M. H. & BARUA, D. *Oral rehydration therapy-recent advances.* World Health Forum, **2**: 245-9, 1981.
34. MAHALANABIS, D.; BRAYTON, J. B.; MONDALE, A. & PIERCE, N. F. *The use of Ringer's lactate in the treatment of children with cholera and acute cholera diarrhoea.* Bull. World Health Organ., **46**: 311-6, 1972.
35. MAHALANABIS, D.; CHOUDHURI, A. B. & BAGCHI, N. O. *Oral fluid therapy of cholera among Bangladesh refugees.* Johns Hopkins Med. J., **132**: 197-205, 1973.

36. MAHALANABIS, D.; SACK, R. B. & JACOBS, B. *Use of an oral electrolyte solution in the treatment of pediatric cholera - a controlled study.* J. Trop. Pediatr. Environ. Child Health, **20**: 82-7, 1974.
37. MARIN, L.; SOKNEN, S. & GUNOZ, H. *Salt water homeostasis during oral rehydration therapy in neonates and young infants with acute diarrhoea.* Acta Paediatr. Scand., **6**: 1-5, 1987.
38. MATTHEWS, D. M. & LASTER, L. *The kinetics of intestinal active transport of five neutral amino acids.* Am. J. Physiol., **208**: 593, 1965.
39. McLEAN, M.; BRENNAN, R. & HUGHES, J. M. *Etiology and oral rehydration therapy of childhood diarrhea in Northeastern Brasil.* Bull. Pan Am. Health Organ., **15**: 318-26, 1981.
40. MOENGINAH, P. A.; SUPRAPTO, J. & SOENARTO, M. *Oral sucrose therapy for diarrhea.* Lancet, **2**: 323-28, 1975.
41. MONOD, J.; CHANGEUX, J. P. & JACOB, F. *Allosteric proteins and cellular control mechanisms.* J. Mol. Biol., **6**: 306, 1963.
42. NALIN, D. R. *Mortality from cholera and other diarrheal diseases at a cholera hospital.* Trop. Geogr. Med., **24**: 101-6, 1972.
43. NALIN, D. R. *Sucrose in oral therapy for cholera and related diarrhoeas.* Lancet, **1**: 1400-2, 1975.

44. NALIN, D. R. & CASH, R. A. *Sodium content in oral therapy for diarrhea.* Lancet, **2**: 957-62, 1976.
45. NALIN, D. R.; CASH, R. A. & ISLAM R. *Oral maintenance therapy for cholera in adults.* Lancet, **2**: 370-3, 1968.
46. NALIN, D. R.; LEVINE, M. M. & HORNICK, R. *The problem of emesis during oral glucose-electrolytes therapy given from the onset of severe cholera.* Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **73**: 10-15, 1979b
47. NALIN, D. R.; LEVINE, M. M. & MATA, L. *Oral rehydration and maintenance of children with rotavirus and bacterial diarrhoeas.* Bull. World Health Organ., **57**: 453-8, 1979a
48. NALIN, D. R.; MATA, L. & VARGAS, W. *Comparison of sucrose with glucose in oral therapy of infant diarrhoea.* Lancet, **2**: 277-9, 1978.
49. NICHOLS, B. L. & SORIANO, H. A. *A critique of oral therapy of dehydration due to diarrheal syndromes.* Am. J. Clin. Nutr., **30**: 1457-62, 1977.
50. O'DWYER, S. T.; SCOTT, T.; SMITH, R. J. & WILMORE, D. W. *5-Fluorouracil toxicity on small intestinal mucosa but not white blood cells in decrease by glutamine.* Clin. Res., **35**: 369, 1987

51. O'DWYER, S. T.; SCOTT, T.; SMITH, R. J. and WILMORE, D. W.: *Preservation of small bowel mucosa using glutamine supplemented parenteral nutrition. Surg. Forum, 37: 56-8, 1986.*
52. PALMER, D. L.; KOSTER, F. T. & ISLAM, F. M. R. *Comparison of sucrose and glucose in the oral electrolyte therapy of cholera and other severe diarrheas. N. Engl. J. Med., 297: 1107-11, 1977.*
53. PHILLIPS, A. R. *Water and electrolyte losses in cholera. Fed. Proc., 23: 705-12, 1964.*
54. PIERCE, N. F.; BANWEEL, J. & MITRA, R. *Effect of intragastric glucose-electrolyte infusion upon water and electrolyte balance in Asiatic cholera. Gastroenterology, 55: 333-43, 1968.*
55. PIZARRO, D.; POSADA, G. & MATA, L. *Oral rehydration of neonates with dehydrating diarrhoeas. Lancet, 2: 1209-10, 1979.*
56. PIZARRO, D.; POSADA, G. & MATA, L. *Treatment of 242 neonates with dehydrating diarrhea with an oral glucose-electrolyte solution. J. Pediatr., 102: 153-6, 1983.*
57. RAHMAN, M. M.; AZIZ, K. M. S.; PATWANI, Y. & MUNSHI, M. H. *Diarrhoeal mortality in two Bangladeshi villages with and without community based oral rehydration therapy. Lancet, 2: 809-12, 1979.*

58. SACK, D. A.; CHOWDHURY A. M.A. K. & EUSOF, A. *Oral hydration in rotavirus diarrhoea: a double comparison of sucrose with glucose electrolyte solution.* Lancet, **2**: 280-5, 1978.
59. SALLEH, M. & ARDAWI, M. *Glutamine and ketone body metabolism in the gut of streptozotocin-diabetic rats.* Bioch. J., **249**: 565-72, 1988.
60. SCHORLING, J. B., McAULIFFE, J. F., DE SOUZA, M. A. & GUERRANT, R. L. *Malnutrition predisposes to greater diarrhea incidence and duration among in urban Brazilian slum.* Int. J. Epidem., 1990 (in Press).
61. SCHORLING, J. B., SHORLING, S. & McAULIFFE, J. F. *Epidemiology of prolonged diarrhea in an urban Brazilian slum.* Clin. Res., **35**: 489 (abstract), 1987.
62. SCHULTZ, S. G. & CURRAN, P. F. *Coupled transport of sodium and organic solutes.* Physiol. Rev., **50**: 637-718, 1970.
63. SCHULTZ, S. G. & CURRAN, P. F. *Intestinal absorption of sodium chloride and water.* In Code, C. F., editor, *Alimentary canal section: Handbook of Physiology*, Baltimore. The Williams & Wilkins co., **3**: 1968.
64. SCHULTZ, S. G. & ZALUSKY, R. *Ion transport in isolated rabbit ileum.* J. Gen. Physiol., **47**: 567 - 84, 1964.

65. SCHWENK, M. *Drug transport in intestine, liver and kidney.* Arch. Toxicol., **60**: 37-42, 1987.
66. SNYDER, J. D. & MERSON, M. II. *The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data.* Bull. World Health Organ., **60**: 605-13, 1982.
67. TALLARIDA, R. J. & JACOB, L. S. *The Dose-Response Relation in Pharmacology.* New York, Springer-Verlag, pp 14, 1979.
68. ÜSSING, H. H. & ZERAHIN, K. Active transport of sodium as the source of electrical current in the short circuited frog skin. Acta Physiol. Scand., **23**: 110, 1951.
69. WALKER-SMITH, J. A. *Nutritional management of gastroenteritis rehydration and realimentation.* Hum. Nutr., **40A(S1)**: 39-43, 1986.
70. WARREN, K. S. *Protecting the world's children: an agenda for the 1990s.* Lancet, **1**: 659, 1988.
71. WATTEN, R. H.; MORGAN, F. M. & SONGKHLA, V. N. *Water and electrolytes studies in cholera.* - J. Clin. Invest., **38**: 1879-84, 1959.
72. WAUD, D. R. & PARKER, R. B. *On dose-response curves and anesthetics.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **117**: 13, 1970.

73. WHARTON, B. A.; PUGH, R. E. & TRAITZ, L. S. *Dietary management of gastroenteritis in Britain.* Br. Med. J., **296**: 450-2, 1988.
74. WILSON, T. H.; LIN, E. C.; LANDAN, B. R. & JORGENSEN, C. R. *Intestinal transport of sugar and amino acids.* Fed. Proc., **19**: 870, 1960.
75. WINDMUELLER, H. G. *Metabolism of vascular and luminal glutamine by intestinal mucosa in vivo.* In: Haussinger D, Sies H, eds. Glutamine metabolism in mammalian tissues. Berlin, Springer-Verlag, 1984. p. 63-77
76. WINDMUELLER, H. G. & SPAETH, A. E. *Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for posabsorptive rat small intestine.* J. Biol. Chem., **253**: 69-76, 1978.
77. WINDMUELLER, H. G. & SPAETH, A. E. *Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats.* J. Biol. Chem., **255**: 107-12, 1980.
78. WINDMUELLER, H. G. & SPAETH, A. E. *Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine.* J. Biol. Chem., **249**: 5070-9, 1974.
79. WORLD HEALTH ORGANIZATION: *Diarrhoeal diseases control programme.* Interim Report WHO/CDD/CMT/87.3, Geneva, 1987. p. 3-5

80. WORLD HEALTH ORGANIZATION: *Programme for control of diarrhoeal diseases*. Interim Report WHO/CDD/844. 14, Geneva, 1983. p.12-3