

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

MECANISMO DE TRANSPORTE IÔNICO, EM ÍLEO DE COELHO,
INDUZIDO POR MICROCISTINA – LR DE *Microcystis aeruginosa*:
PARTICIPAÇÃO DE MACRÓFAGOS, IL1 β , TNF α E MEDIADORES
PRO-INFLAMATÓRIOS.

GEORGE CHAVES JIMENEZ

FORTALEZA – CE
2003

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

MECANISMO DE TRANSPORTE IÔNICO, EM ÍLEO DE COELHO,
INDUZIDO POR MICROCISTINA-LR DE *Microcystis aeruginosa*:
PARTICIPAÇÃO DE MACRÓFAGOS, IL1 β , TNF α E MEDIADORES
PRO-INFLAMATÓRIOS.

GEORGE CHAVES JIMENEZ

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará, sob
Orientação do Prof. Dr. Aldo Ângelo
Moreira Lima, como requisito parcial
Para a obtenção do título de Doutor
Em Farmacologia.

FORTALEZA-CE
2003

Jimenez, George Chaves

Mecanismo da atividade eletrogênica, em íleo de coelho, induzida por microcistina-LR de *Microcystis aeruginosa*: Participação de macrófagos, IL- β , TNF- α , e mediadores pró-inflamatórios./ George Chaves Jimenez – Fortaleza, 2003.

239f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Departamento de Fisiologia e Farmacologia

CDD576

1. *Microcystis aeruginosa*
2. Microcistina-LR
3. Macrófagos
4. Secreção intestinal
5. Mediadores inflamatórios
6. IL= 1β
7. Coeficiente de Hurst
8. Fractais

I Título

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

Esta tese foi submetida à apreciação da Banca Examinadora abaixo assinalada, com o fim de cumprir parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará; ficando à disposição dos interessados à Biblioteca Setorial da Instituição supra citada.

George Chaves Jimenez

Data da Defesa: 09.05.2003

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (UFC)

Prof. Dr. Marcos Hiraki Toyama (UNICAMP)

Prof. Dr. Marcos Fabio Gadelha Rocha (UECE)

Prof. Dr^a. Helena Serra Azul Monteiro (UFC)

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao (UFC)

Dedico:

A meus pais “in memoriam”,

*(...) que constituíram em Jesus Cristo,
um referencial de harmonia, amor,
verdade e justiça para com todos os
seres.*

Dedico:

À minha esposa Solange e filhos,

*(...) cuja presença transcende as
distâncias e os desígnios do tempo.*

AGRADECIMENTOS

Simpatia – são dois galhos
Banhados de bons orvalhos
Nas mangueiras do jardim;
Bem longe às vezes nascidos,
Mas que se juntam crescidos
E que se abraçam por fim.

C. de Abreu.

Com este pequeno soneto de Cassimiro de Abreu, procuro registrar uma das características mais relevantes das pessoas da cidade de Fortaleza, a simpatia.

A cada lugar que fui, encontrei no mínimo um sorriso; que para mim serviu de alento e atenuador dos efeitos da distância, que me separava dos meus.

Assim, venci cada dia, e cumpri o meu destino.

Portanto, desejo expressar os mais sinceros votos de agradecimento a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para que fosse possível a minha estadia na cidade de Fortaleza com a conseqüente realização deste trabalho.

Também, alguns agradecimentos especiais se fazem necessários:

Ao Prof. Dr. **Aldo Ângelo Moreira Lima**, pelo estímulo ao compromisso pelo conhecimento, pela orientação prestimosa e pela perseverança externada perante os seus orientandos.

Aos Professores Dr. Alberto Melo Soares, Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha e Dr. Eduardo Torres, pelas orientações técnicas e amplas discussões, sem as quais, não seria possível a realização do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, na condição de Coordenador do Curso de Pós-graduação, pela atenção e incentivo ao corpo discente dos Cursos de Mestrado e Doutorado em Farmacologia.

Aos Professores Dr. Krishnamurti Moraes de Carvalho, e Dr. Manassés Claudino Fonteles, pelo contagiante entusiasmo à pesquisa científica, e por terem propiciado o meu ingresso ao presente Programa de Pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Helio Rolla, por nos ter alertado sobre os perigos de uma visão de mundo contundente, mesmo que pretensamente científica.

Ao Prof. Dr. Rui Capaz pela dedicação e amizade sincera.

Enfim, a todos os Professores do Curso de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, pelo compromisso com o mesmo.

Gostaria também de agradecer aos funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas, em especial a Maria do Carmo N. Pinho, Kátia Maria L. Nogueira, José A. de Souza, Jociê A. Silva, Bento F. de Oliveira pela atenção e carinho despendidos. À Terezinha F. França e Joana M. Tavares gostaria de externar mais do que um simples agradecimento, por toda ajuda técnica que conferiram, como também pela convivência agradável no ambiente de laboratório.

Agradeço também à médica Cristina Benevides, pela dedicação às atividades do laboratório, mas principalmente pela significativa participação nos ensaios de cultura de macrófagos, sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

Não posso deixar de agradecer aos amigos: Prof. Dr^a. Falba Bernadete Ramos dos Anjos, Prof. Iberê Freitas e Prof. Eduardo Cole; sem a ajuda dos quais, a minha estadia na cidade de Fortaleza seria impossível.

Agradecimentos especiais também gostaria de dirigir aos Professores: Dr^a. Helena Simões Duarte e Dr. Manoel Adrião Gomes Filho, Dr. José Abelardo Alves de Souza, todos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, pela amizade e compreensão quanto ao cumprimento das exigências pertinentes ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia.

Ao amigo e companheiro de disciplina, Prof. Armando José Ribeiro Samico, também Prefeito da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo incentivo e apoio logístico quanto às questões pertinentes à burocracia desta Universidade.

Aos Professores Dr. Emídio Cantídio de Oliveira, Reitor da Universidade Federal Rural de Pernambuco e Dra. Áurea Virshal, Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação da mesma Universidade, pela compreensão e apoio quanto aos encaminhamentos legais pertinentes ao cumprimento do Programa PICDT.

Ao Programa PICDT, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo apoio financeiro conferido durante o período de realização do Curso de Pós-graduação em Farmacologia.

A Silvia Maria A. de Lima, pela atenção e apoio na Coordenação do Curso de Farmacologia, como também à Áurea, pela gentileza.

A todos os colegas do Laboratório de Patologia Celular, em especial os Professores Raimundo Bezerra e Regina Fátima, a nutricionista Sandra Nunes e o biólogo Manoel Serra Azul, além de todos os companheiros do Curso de Pós-graduação, pelo ambiente cordial que proporcionaram.

Agradecimentos especiais, também ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC, à própria Universidade UFC; à Unidade de Pesquisas Clínicas e Instituto de Biomedicina do Hemocentro do Ceará – UPC/IBIMED/HEMOCE, e para a Fundação “Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior – CAPES”.

SUMÁRIO

	Página
Dedicatória	iv
Agradecimentos	vi
Sumário	ix
Lista de tabelas	Xvii
Lista de figuras	xxii
Abreviaturas utilizadas no trabalho	xxvii
Resumo	xxix
Abstract	xxxii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Doenças diarréicas	2
1.3 <i>Microcystis aeruginosa</i>	5
1.3.1 As principais toxinas produzidas por <i>Microcystis aeruginosa</i>	9
1.3.2 As microcistinas e suas ações sobre o organismo animal	12
1.4 Os macrófagos e o processo inflamatório	16
1.5 Aspectos fisiológicos e imunofarmacológicos da mucosa intestinal: diferentes níveis de interação entre células e mediadores	18
1.6 Algumas considerações sobre o universo operacional das junções firmes	25
1.7 Os canais apicais de cloreto	35
1.7.1 Modulação dos canais apicais de cloreto	35
1.7.2 Teoria fractal na avaliação da modulação dos canais apicais de cloreto	36
1.8 Justificativa	40
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44

3.1	Animais	44
3.1.1	Ratos	44
3.1.2	Coelhos	44
3.2	Toxinas	44
3.3	Drogas	45
3.4	Soluções e meio de cultura	46
3.5	Cultura de macrófagos	48
3.5.1	Obtenção dos macrófagos	48
3.5.2	Manuseio dos macrófagos <i>in vitro</i>	50
3.5.3	Análise da viabilidade celular.	52
3.6	Dosagem das citocinas	54
3.6.1	Ensaio para detecção e dosagem de IL-1 β	54
3.6.2	Ensaio para detecção e dosagem de TNF α	56
3.7	Câmaras de Üssing	58
3.7.1	Preparo das soluções de perfusão	58
3.7.2	Preparação e fiação do tecido ileal às câmaras de Üssing	58
3.7.3	Montagem e funcionamento das câmaras de Üssing	60
3.8	Protocolos experimentais	63
3.8.1	Determinação e caracterização farmacológica do fator de “secreção intestinal”, liberado de macrófagos estimulados por MCLR de <i>Microcystis aeruginosa</i>	63
3.8.1.1	Efeito secretório intestinal promovido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por diferentes doses de MCLR	63
3.8.1.2	Cinética tempo-efeito da secreção intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	63
3.8.1.3	Efeito da toxina MCLR diretamente nas câmaras de Üssing	64
3.8.1.4	Efeito da polimixina B sobre o efeito secretório intestinal induzido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	64
3.8.1.5	Atividade das toxinas da Bordetella pertussis sobre a liberação do fator responsável pela secreção intestinal	65

3.8.1.6	Efeito de um inibidor de síntese de proteína perante a gênese do fator de “secreção intestinal”.	65
3.8.1.7	Participação das proteases na síntese do fator de “secreção intestinal”.	66
3.8.1.8	Efeito de inibidores de fosfolipase A ₂ , cicloxigenases, lipoxigenases e antagonistas de PAF na síntese do fator de “secreção intestinal”.	66
3.8.1.9	Efeito de inibidores da síntese de TNF- α na gênese do fator de secreção intestinal	67
3.8.1.10	Dosagem de TNF- α no sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR	68
3.8.1.11	Ação do antagonista do receptor de interleucina-1 na secreção intestinal	68
3.8.1.12	Efeito dos anticorpos monoclonais anti-IL-1 α e anti-IL-1 β Na secreção intestinal	68
3.8.1.13	Determinação da concentração de IL-1 β no sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	69
3.8.1.14	Atividade da interleucina-1 β na “secreção intestinal”.	69
3.8.2	Participação de canais iônicos, mediadores pro-inflamatórios e do sistema nervoso entérico; na modulação do efeito secretório intestinal mediado por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR.	70
3.8.2.1	Ação da bumetanida na atividade secretora intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR.	70
3.8.2.2	Efeito do pré-tratamento da mucosa ileal com tetrodotoxina, indometacina e HOE, sobre a “secreção intestinal” mediada por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR.	70
3.8.3	Determinação do nível de aleatoriedade dos efeitos eletrogênicos em preparações de íleo de coelho, em câmaras de Üssing; sob a ação do sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR.	71

3.8.3.1	Avaliação do “efeito secretório intestinal” mediado por IL-1 β ou sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, aplicando-se a análise R/S de Hurst.	71
3.8.3.2	Cálculo da dimensão fractal associada ao “efeito secretório intestinal” mediado por IL-1 β ou sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	72
3.8.4	Determinação do nível de aleatoriedade associado à variação da resistência transepitelial, em preparações de tecido ileal, em câmaras de Üssing; sob a ação do sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	73
3.8.4.1	Determinação da variação da resistência e da tensão elétrica transepitelial durante a ocorrência do “efeito secretório intestinal” mediado por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	73
3.8.4.2	Determinação da variação do coeficiente de Hurst e dimensão fractal, em relação à variação da resistência transepitelial associada à resposta secretora induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	74
3.8.5	Determinação das curvas de dose – resposta, para a variação de corrente de curto circuito, variação da tensão elétrica e resistência transepiteliais; associadas à resposta secretora induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	74
3.8.6	Dinâmica de liberação de IL-1 β e TNF- α em macrófagos estimulados com MCLR, de <i>Microcystis aeruginosa</i> ou <i>Clostridium difficile</i> .	75
3.8.6.1	Cinética de liberação de TNF- α e IL-1 β em sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR	75
3.8.6.2	Comparação entre as atividades cinéticas de liberação de TNF α e IL-1 β do sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A de <i>Clostridium difficile</i> e MCLR de <i>Microcystis aeruginosa</i>	76

3.9	Análise estatística e matemática	76
4.	RESULTADOS	79
4.1	Determinação e caracterização farmacológica do “fator de secreção intestinal” liberado de macrófagos estimulados com MCLR de <i>Microcystis aeruginosa</i> .	79
4.1.1	“Efeito secretório intestinal” promovido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	79
4.1.2	Variação temporal da “secreção intestinal” induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	81
4.1.3	Efeito da toxina MCLR diretamente nas câmaras de Üssing	83
4.1.4	Efeito da polimixina B sobre o “efeito secretório intestinal” induzido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	85
4.1.5	Atividade das toxinas <i>Bordetella pertussis</i> sobre a liberação do fator responsável pela “secreção intestinal”.	87
4.1.6	Efeito de um inibidor de síntese protéica perante o fator de “secreção intestinal”.	89
4.1.7	Participação das proteases na síntese do fator de “secreção intestinal”.	91
4.1.8	Efeito da dexametasona na gênese do fator de “secreção intestinal”.	93
4.1.9	Efeito do bloqueador de fosfolipase A ₂ sobre a gênese do fator de ‘secreção intestinal’	95
4.1.10	Efeito do bloqueador dual de ciclo e lipoxigenase sobre a síntese do fator de “secreção intestinal”.	97
4.1.11	Efeito do inibidor de cicloxigenase na síntese do fator de “secreção intestinal”.	99
4.1.12	Efeito do inibidor de lipoxigenase na síntese do fator de “secreção intestinal”	101
4.1.13	Efeito do bloqueador de cicloxigenase 2 sobre a síntese do fator de “secreção intestinal”.	103

4.1.14	Participação do fator de agregação plaquetária nos processos metabólicos de formação do fator de “secreção intestinal”.	105
4.1.15	Efeito da pentoxifilina sobre a síntese do “fator de secreção intestinal”.	107
4.1.16	Efeito da talidomida sobre os processos metabólicos de formação do fator de “secreção intestinal”.	109
4.1.17	Dosagem de TNF- α no sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	111
4.1.18	Efeito do antagonista do receptor de interleucina-1 na “secreção intestinal”.	113
4.1.19	Efeito dos anticorpos anti-IL-1 α anti-IL-1 β no processo de “secreção intestinal” induzido por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR.	115
4.1.20	Determinação da concentração de IL-1 β no sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR.	117
4.1.21	Caracterização da IL-1 β como principal fator na “secreção intestinal” induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR.	119
4.2	Participação de canais iônicos, mediadores pró-inflamatórios e do sistema nervoso entérico, na modulação do efeito secretório mediado por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	121
4.2.1	Efeito da bumetanida sobre a “secreção intestinal” induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	121
4.2.2	Envolvimento das prostaglandinas na atividade secretora intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	125
4.2.3	Participação do sistema nervoso entérico na “secreção intestinal” induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	125
4.2.4	Efeito do bloqueador do receptor de bradicinina sobre a	127

	secreção intestinal induzia por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	
4.3	Determinação do nível de aleatoriedade dos efeitos eletrogênicos em preparações de íleo de coelho, em câmaras de Üssing; sob a ação do sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	129
4.3.1	Avaliação do “efeito secretório intestinal” mediado por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, aplicando-se a análise R/S de Hurst	129
4.4	Determinação do nível de aleatoriedade associados à variação de resistência transepitelial em preparações de tecido ileal em câmaras de Üssing; sob a ação do sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	133
4.4.1	Variação da resistência e do potencial elétrico transepitelial em preparações do íleo de coelho em câmara de Üssing, mediante o emprego de sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR	133
4.4.2	Avaliação do coeficiente de Hurst e da dimensão fractal com referência à variação da resistência transepitelial, em preparações de tecido ileal montadas em câmaras de Üssing; sob ação do sobrenadante de macrófagos estimulados com várias concentrações de MCLR.	136
4.5	Curva dose-resposta obtida para a variação de corrente de curto-circuito, variação de resistência transepitelial e variação de tensão elétrica transepitelial; em preparações de tecido ileal montadas em câmaras de Üssing, sob ação do sobrenadante de macrófagos estimulados com várias concentrações de MCLR.	140
4.6	Avaliação da dinâmica de produção de TNF- α e IL-1 β liberados a partir de macrófagos estimulados com MCLR de <i>Microcystis aeruginosa</i> e Toxina A de <i>Clostridium difficile</i> .	145

5.	DISCUSSÃO	150
6.	CONCLUSÕES	175
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	177
8	ANEXO	210
8.1	Tabelas de dados experimentais utilizados para o delineamento dos resultados do presente trabalho.	210
	Publicações geradas à partir dos estudos pertinentes aos objetivos do presente trabalho	238
8.1.1	Trabalhos completos publicados e em preparação	238
8.1.2	Resumos apresentados em Congresso Nacional e Internacional	239

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Meio de Cultura RPMI	46
Tabela 2	Solução de tioglicolato a 3%	46
Tabela 3	Solução salina tamponada com fosfato (PBS)	47
Tabela 4	Composição da solução de Ringer para mamíferos	47
Tabela 5	Viabilidade de macrófagos, em termos percentuais, à partir dos procedimentos finais de cultura e estimulação	53
Tabela 6	Valores de ΔI_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR, diferentes concentrações (Figura 11)	210
Tabela 7	Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI - controle (Figura 12)	210
Tabela 8	Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) (Figura 12)	211
Tabela 9	Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + RINGER (Figura 13)	211
Tabela 10	Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) (Figura 13)	212
Tabela 11	Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), diretamente nas câmaras (Figura 13)	212
Tabela 12	Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI - controle (Figura 14)	213
Tabela 13	Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) (Figura 14)	213
Tabela 14	Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) + PMXB ($6,9 \cdot 10^{-5}M$) (Figura 14)	214
Tabela 15	Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI - controle (Figura 15)	214
Tabela 16	Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$)	215

	(Figura 15)	
Tabela 17	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + Txp ($9,5 \cdot 10^{-7}\text{M}$) (Figura 15)	215
Tabela 18	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + Txpm ($9,5 \cdot 10^{-7}\text{M}$) (Figura 15)	216
Tabela 19	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI – controle (Figura 16)	216
Tabela 20	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) (Figura 16)	217
Tabela 21	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + CHX (10^{-5}M) (Figura 16)	217
Tabela 22	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI - controle (Figura 17)	218
Tabela 23	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) (Figura 17)	218
Tabela 24	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + I.Prot. (1mg/ml) (Figura 17)	219
Tabela 25	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + DEXA (10^{-5}M) (Figura 18)	219
Tabela 26	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + QUINAC (10^{-5}M) (Figura 19)	220
Tabela 27	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + NDGA (10^{-5}M) (Figura 20)	220
Tabela 28	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI – controle (Figura 21)	221
Tabela 29	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) (Figura 21)	221
Tabela 30	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + INDO (10^{-5}M) (Figura 21)	222
Tabela 31	Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) +	222

	MK886 ($10^{-5}M$) (Figura 22)	
Tabela 32	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI – controle (Figura 23)	223
Tabela 33	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) (Figura 23)	223
Tabela 34	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) + NS398 ($10^{-5}M$) (Figura 23)	224
Tabela 35	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) + WEB 2086 ($10^{-5}M$) (Figura 24)	224
Tabela 36	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) + PTF ($5 \cdot 10^{-4}M$) (Figura 25)	225
Tabela 37	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) + TAL ($1,5 \cdot 10^{-3}M$) (Figura 26)	225
Tabela 38	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI – controle (Figura 28)	226
Tabela 39	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) + Anti IL1-ra ($1,5 \cdot 10^{-6}M$) (Figura 28)	226
Tabela 40	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) + Anti IL-1 α (Figura 29)	227
Tabela 41	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) + Anti IL-1 β (Figura 29)	227
Tabela 42	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) + Anti IL-1 α + Anti IL-1 β (Figura 29)	228
Tabela 43	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), Aplicação de IL-1 β diretamente às câmaras (Figura 31)	228
Tabela 44	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), RINGER (Figura 32)	229
Tabela 45	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) , em câmaras com tecido ileal, preparadas previamente com BUM ($10^{-5}M$) (Figura 32)	229
Tabela 46	Valores de Isc ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) , em	230

	câmaras com tecido ileal, preparadas previamente com INDO (10^{-6}M) (Figura 33)	
Tabela 47	Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) , em câmaras com tecido ileal, preparadas previamente com TTX $3,2 \cdot (10^{-7}\text{M})$ (Figura 34)	230
Tabela 48	Valores de ΔI_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) , em câmaras com tecido ileal, preparadas previamente com HOE (10^{-5}M) (Figura 35)	231
Tabela 49	Valores de R_{te} ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + - controle (Figura 38)	231
Tabela 50	Valores de R_{te} ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) (Figura 38)	232
Tabela 51	Valores de V_{te} ($\text{mV} \cdot \text{cm}^{-2}$) S.M ϕ S + RPMI - controle (Figura 39)	232
Tabela 52	Valores de V_{te} ($\text{mV} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) , (Figura 39)	232
Tabela 53	Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI – controle ; valores usados para o cálculo da constante de Hurst (Figuras 36 e 37)	233
Tabela 54	Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}\text{M}$) , valores usados para o cálculo da constante de Hurst (Figuras 36 e 37)	233
Tabela 55	Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($9,6 \cdot 10^{-7}\text{M}$) , valores usados para o cálculo da constante de Hurst (Figuras 36 e 37)	234
Tabela 56	Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) , valores usados para o cálculo da constante de Hurst (Figuras 36 e 37)	234
Tabela 57	Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), IL-1 β diretamente às câmaras de Üssing, valores estes utilizados para o cálculo da constante de Hurst (Figuras 36 e 37)	235

Tabela 58	Valores de Rte ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI controle; valores usados para o cálculo da constante de Hurst (Figura 40)	235
Tabela 59	Valores de Rte ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S +MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}\text{M}$); valores usados para o cálculo da constante de Hurst (Figura 40)	236
Tabela 60	Valores de Rte ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($9,6 \cdot 10^{-7}\text{M}$); valores usados para o cálculo da constante de Hurst (Figura 40)	236
Tabela 61	Valores de Rte ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S +MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$); valores usados para o cálculo da constante de Hurst (Figura 40)	236
Tabela 62	Articulação de valores de Isc da 1 ^a . coluna da tabela 51, afim de exemplificar o cálculo do coeficiente de Hurst.	237

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Microcystis aeruginosa	6
Figura 2	Estrutura molecular da microcistina-LR de <i>Microcystis aeruginosa</i>	11
Figura 3	Diagrama esquemático sobre os principais elementos constituintes de uma junção firme	28
Figura 4	Modelo equivalente elétrico que retrata os fenômenos eletrogênicos ao nível dos enterócitos, segundo Torres (2002)	30
Figura 5	Obtenção de macrófagos em monocamadas	49
Figura 6	Preparação de monocamadas de macrófagos para obtenção do sobrenadante contendo os mediadores farmacológicos para estudo.	51
Figura 7	Ensaio para a determinação dos níveis de IL-1 β	55
Figura 8	Ensaio para a determinação dos níveis de TNF- α	57
Figura 9	Preparação do íleo para as câmaras de Üssing	59
Figura 10	Câmaras de Üssing, sistemas de aeração, aquecimento, perfusão, fixação de voltagem e registro de sinais elétricos	62
Figura 11	“Efeito secretório intestinal” do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR	80
Figura 12	Variação temporal da “secreção intestinal” induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR	82
Figura 13	Efeito da toxina MCLR diretamente nas câmaras de Üssing	84
Figura 14	Efeito da polimixina B sobre o “efeito secretório intestinal” do S.M ϕ S estimulados com MCLR	86
Figura 15	Atividade das toxinas de <i>Bordetella pertussis</i> sobre a liberação do fator responsável pela “secreção intestinal”	88
Figura 16	Efeito de um inibidor de síntese protéica perante a liberação do fator de “secreção intestinal”	90

Figura 17	Participação das proteases na síntese do fator de “secreção intestinal”	92
Figura 18	Efeito da dexametasona na gênese do fator de “secreção intestinal”	94
Figura 19	Efeito do bloqueador de fosfolipase A ₂ sobre a gênese do fator de “secreção intestinal”	96
Figura 20	Efeito do bloqueador dual de ciclo e lipoxigenase sobre a síntese do fator de “secreção intestinal”	98
Figura 21	Efeito do inibidor de cicloxigenase na síntese do fator de “secreção intestinal”	100
Figura 22	Efeito do inibidor de lipoxigenase na síntese do fator de “secreção intestinal”	102
Figura 23	Efeito do bloqueador de cicloxigenase 2 sobre a síntese do fator de “secreção intestinal”	104
Figura 24	Participação do fator de agregação plaquetária nos processos metabólicos de formação do fator de “secreção intestinal”	106
Figura 25	Efeito da pentoxifilina sobre a síntese do fator de “secreção intestinal”	108
Figura 26	Efeito da talidomida sobre os processos metabólicos de formação do fator de “secreção intestinal”	110
Figura 27	Dosagem de TNF α no sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR	112
Figura 28	Efeito do antagonista do receptor de interleucina-1 na “secreção intestinal”	114
Figura 29	Efeitos dos anticorpos anti IL-1 α e anti IL-1 β no processo e “secreção intestinal” induzido por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	116
Figura 30	Dosagem de IL1 β no sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR	118

Figura 31	Caracterização da interleucina-1 β como principal fator na “secreção intestinal” induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	120
Figura 32	Efeito da bumetanida sobre a “secreção intestinal” induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	122
Figura 33	Envolvimento das prostaglandinas na “atividade secretora intestinal” do sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	124
Figura 34	Participação do sistema nervoso entérico na “secreção intestinal” induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	126
Figura 35	Participação dos componentes da cascata das cininas sobre a “secreção intestinal” induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR	128
Figura 36	Determinação do coeficiente de Hurst para a variação de corrente de curto-circuito (Isc), em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, em presença de sobrenadante de macrófagos estimulados com diferentes concentrações de MCLR	131
Figura 37	Variação do coeficiente de Hurst em relação às alterações eletrogênicas (Isc), em função da variação da concentração molar de MCLR, empregada para estimular macrófagos em meio de cultura,	132
Figura 38	Resistência transepitelial avaliada em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, em presença do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR	134
Figura 39	Potencial elétrico transepitelial avaliado em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, em presença do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR	135

Figura 40	Determinação do coeficiente de Hurst para a variação de resistência transepitelial em preparações de íleo em câmaras de Üssing, em presença de sobrenadante de macrófagos estimulados com diferentes concentrações de MCLR	138
Figura 41	Caracterização da função matemática que descreve a variação do coeficiente de Hurst, em função da variação da concentração molar de MCLR, utilizada para estimular macrófagos em meio de cultura; objetivando a obtenção dos S.MφS, para a aplicação nas preparações de íleo, em câmaras de Üssing; e posterior registro das alterações da resistência transepitelial	139
Figura 42	Curva dose-resposta, que relaciona as variações do potencial transepitelial (Vte), em preparações de tecido ileal em câmaras de Üssing submetidas à várias dosagens de MCLR	142
Figura 43	Curva dose-resposta referente à variação de corrente de curto-circuito em preparações de tecido ileal montadas em câmaras de Üssing, submetidas à ação do sobrenadante de macrófagos estimulados com diferentes concentrações de MCLR	143
Figura 44	Curva dose-resposta, que relaciona a resistência transepitelial (Rte), em preparações de tecido ileal em câmaras de Üssing, submetidas à várias dosagens de MCLR	144
Figura 45	Concentração de TNF- α e IL-1 β no S.MφS estimulados com diferentes concentrações de MCLR	148
Figura 46	Concentração de TNF- α e IL-1 β no sobrenadante de macrófagos estimulados com diferentes concentrações de toxina A de <i>Clostridium difficile</i>	149
Figura 47	Resumo esquemático dos resultados obtidos à partir dos protocolos experimentais, até a etapa correspondente ao uso de bloqueadores de TNF	171
Figura 48	Resumo esquemático: Resultados dos protocolos experimentais entre as dosagens de TNF α e IL-1 β	172

Figura 49	Resumo esquemático: Resultados dos protocolos experimentais referentes à fase de pré-tratamento da mucosa ileal com diferentes tipos de bloqueadores	172
Figura 50	Possível mecanismo para os efeitos secretórios induzidos por sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, em preparações de tecido ileal, em câmaras de Üssing.	174

ABREVIATURAS UTILIZADAS NO TRABALHO

Abreviaturas	Denominações
ANOVA	Análise de variância
BUMET	Bumetanida
CHX	Cicloheximida
Cl ⁻	Ion cloro
D	Dimensão fractal de auto afinidade
DEXA	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
dx/dy	Representa que representa a derivada primeira de uma função
e	Base neperiana que vale aproximadamente 2,73
E	Dimensão euclidiana
E _A	Tensão elétrica de membrana no enterócito - região luminal
E _B	Tensão elétrica de membrana no enterócito – R. basolateral
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
epm	Erro padrão da media
FSI	Fator de secreção intestinal
H	Coefficiente de Hurst
HOE	Inibidor de receptor B ₂ de bradicinina
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-1ra	Antagonista de receptor para IL-1
INDO	Indometacina
Isc	Corrente de curto-circuito
I. PROT.	Inibidores de proteases
K	Coefficiente angular de uma função exponencial
IL-1ra	Inibidor de receptor de IL-1
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar

MCLR	Microcistina-LR
MK886	Inibidor de lipoxigenase
MS	Macrófagos
($m \pm epm$)	Media mais ou menos o erro padrão da media
n	Número de preparações de pelo menos quatro animais (coelhos)
NDGA	Ácido nordihidroguaiarético -
NS398	Inibidor específico de ciclooxigenase 2
PAF	Fator de agregação plaquetária
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PTF	Pentoxifilina
QUIN	Quinacrina
R	Coeficiente de correlação
RPMI	Meio de cultura
R/S	Análise R/S de Hurst – avaliação de extensão escalonada
Rte	Resistência transepitelial
S.M ϕ S	Sobrenadante de macrófagos
T-84	Linhagem de células epiteliais humanas
TALID	Talidomida
TNF- α	Fator de necrose tumoral do tipo α
TTX	Tetrodotoxina
TxP	Toxina pertusis ativa
TxPm	Toxina pertusis mutante
Vte	Tensão transepitelial
V	Unidade de tensão elétrica – Volts
WEB2086	Antagonista de PAF
μA	Unidade de corrente elétrica, 10^{-6} Ampéres
Ω	Ohms – unidade de resistência elétrica
ΔI_{sc}	Variação da corrente de curto-circuito
ΔR_{te}	Variação de resistência transepitelial
ΔV_{te}	Variação da tensão elétrica transepitelial

RESUMO

MECANISMO DE TRANSPORTE IÔNICO, EM ÍLEO DE COELHO, INDUZIDO POR MICROCISTINA-LR DE *Microcystis aeruginosa*: PARTICIPAÇÃO DE MACRÓFAGOS, IL-1 β , TNF- α E MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS.

George Chaves Jimenez. Tese de doutoramento; Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, 2003.

Este trabalho teve-se como principal objetivo, avaliar os efeitos eletrogênicos em preparações de íleo de coelho fixadas em câmaras de Üssing, em presença de sobrenadante de macrófagos (S.M ϕ S) estimulados com microcistina-LR MCLR de *Microcystis aeruginosa*. S.M ϕ S estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}$ M; $9,6 \cdot 10^{-7}$ M e $3,2 \cdot 10^{-6}$ M), produz, de forma dose-dependente; sendo que a variação temporal (t) da corrente de curto-circuito (Isc), pode ser descrita por uma equação do tipo $Isc = a \cdot e^{kt}$; para um coeficiente de correlação $r = 0,9988$ e $Isc_{\text{maximo}} = 128,16 \pm 14,54 \mu^a \text{cm}^{-2}$. Posteriormente, observou-se que os processos metabólicos associados à gênese do fator de " secreção intestinal" (FSI), a partir de macrófagos estimulados, requer a participação de uma proteína G sensível à toxina pertusis ativa. Verificou-se também que inibidores de síntese protéica, proteases, fosfolipase A₂, cicloxigenases, lipoxigenases,; síntese de TNF- α e antagonista do PAF, reduziram a síntese de FSI. Com o emprego de anticorpos monoclonais, verificou-se que IL-1 β era o principal FSI; como também, que macrófagos estimulados com MCLR, nas concentrações acima, reduziu IL-1 β e TNF- α , de forma dose-dependente. O pré-tratamento da mucosa ileal com bumetanida, indometacina, tetrodotoxina e HOE, revelou que o efeito secretório mediante ação do S.M ϕ S estimulados com MCLR, é dependente da secreção de íons cloreto, com a participação de PAF, prostaglandinas e mediadores do sistema nervoso entérico. A este efeito associa-se a diminuição da resistência transepitelial (Rte), também mediada por, prostaglandinas, PAF, TNF- α e, indiretamente, IL-1 β . A análise do coeficiente de Hurst (H), revelou que estes efeitos não ocorreram ao acaso, mas envolveram alterações significativas nos parâmetros cinéticos dos efeitos eletrogênicos, ao nível da mucosa ileal. Macrófagos estimulados com MCLR produz e libera mais TNF α do que IL-1 β , à taxas constantes ; sendo esta uma característica atrelada ao tipo de estímulo

empregado. Conclui-se, portanto, que MCLR estimula macrófagos a produzir substâncias que podem atuar como fator de “secreção intestinal” ao nível da mucosa ileal, envolvendo canais de cloreto, diminuição de Rte; requisitando para isto, a participação de mediadores pró-inflamatórios e do sistema nervoso entérico.

Palavras-chave: *Microcystis aeruginosa*, microcistina-LR, macrófagos, secreção intestinal, mediadores inflamatórios, interleucina-1 β , coeficiente de Hurst e fractal.

ABSTRACT

MECHANISM OF IONIC TRANSPORT, IN ILEUM OF RABBIT, INDUCED BY MICROCYSTIN-LR OF *Microcystis aeruginosa*: ROLE OF MACROPHAGES, IL-1 β , TNF- α AND PRO-INFLAMMATORY MEDIATORS.

George Chaves Jimenez giving the degree of a doctor. Orientation: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima. Faculty of Medicine, Ceará Federal University.

This work as main objective to evaluate the eletrogenic effect in preparations of ileum of rabbit fixes in chambers of Üssing, in presence of supernatant of macrophages (S.M ϕ S), stimulated with microcistin-LR (MCLR), of *Microcystis aeruginosa*. S.M ϕ S stimulated with MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}$ M; $9,6 \cdot 10^{-7}$ M e $3,2 \cdot 10^{-6}$ M), produces effect secretion, of the form dose-dependent; being that short circuit current (Isc), the secular chain variation (t) can be described for an equation of the type $Isc = a \cdot e^{kt}$ for a correlation coefficient $r = 0,9988$ and $Isc_{maximo} = 128,16 \pm 14,54 \mu A \cdot cm^{-2}$. Later, was observed that the metabolic processes associates' geneses of the FSI, from stimulated macrophages, require the participation of a protein G, sensible pertussis active toxin. It was also verified that inhibing of protéic synthesis, proteases, phosfolipase A₂, ciclooxygenases, lipoxigenases, synthesis TNF- α , and antagonists of the PAF, they had reduced the FSI synthesis. With the application of monoclonal antibodies, it was verified that interleukin- β (IL-1 β), was the main FSI; as also, that macrophages stimulated with MCLR, in the concentrations above, produced IL-1 β and TNF- α , of form dose-dependent. The pay-treatment of the ileum mucosal with bumetanide, indomethacin, tetrodotoxin and HOE, disclosed that the secretory effect, by means of stimulated action of the S.M ϕ S with MCLR is dependent of the secretion of ions chloride, with the participation of PAF, prostaglandins and mediators of the enteric nervous system. With this effect, it associates reduction of the transepitelial resistance (Rte), also mediated for prostaglandins, TNF- α , and indirectly IL-1 β . The analysis of the coefficient of Hurst, disclosed that these effect had not occurred of random form, but had involved significant alterations in the kinetic parameters of the eletrogênic effect, to the level of the ileum mucosal. Macrophages stimulated for MCLR, produces and liberate more TNF- α of that

IL-1 β , to the Constant taxes, being this a linked characteristic to the type of employed stimulation. It is concluded, therefore, that MCLR stimulates macrophages to produce substances that can act as intestinal secretion factor, to the level of the ileum mucosal, involving chloride canals, reduction of the Rte, requesting for this, the participation of pro-inflammatory mediators and the enteric nervous system.

Keywords: *Microcystis aeruginosa*, microcystin-LR macrophage, intestinal secretion, pro-inflammatory mediators, interleukin-1 β , coefficient of Hurst and fractal.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

O mundo moderno tem submetido o ser humano a grandes desafios; que abrangem não só às questões materiais, social-política, cultural e econômica; mas envolvem também questões relacionadas às suas dimensões míticas e a sua natureza biológica.

O grande aumento da população mundial nos últimos anos, tem forçado o homem a uma abrupta mudança de hábitos, objetivando à adaptação aos recursos disponíveis; principalmente nos grandes centros urbanos; muito embora, algumas vezes assumindo uma postura contraditória à sua própria natureza biológica.

A distribuição de bens sociais não é homogênea na maioria dos lugares no mundo; e isto faz com que o desenvolvimento social seja desordenado. Assim, grande parte da população, se vê obrigada a assumir uma postura precária de subsistência, muitas vezes situada num ambiente insalubre às margens das grandes cidades; ficando os seus integrantes vulneráveis, quanto à possibilidade de contato com agentes contaminantes diversos e assim afetar a sua condição de saúde.

Também é digna de nota, a precária manutenção dos serviços públicos essenciais de algumas destas regiões, geralmente culminando com o oferecimento deficiente de serviços básicos, como o fornecimento de água e saneamento; contribuindo também com a persistência de vetores para a disseminação de muitas doenças.

Seja como for, a cada dia, novos tipos de doenças surgem no cenário social, e filas e mais filas se acumulam nos hospitais. Algumas soluções até que existem para algumas destas doenças; mas, muitas vezes, não se consegue oferecer ao paciente os recursos necessários para que este se recupere do seu estado debilitado, e apresente melhorias perante a sua qualidade de vida.

Talvez, o equilíbrio entre o conhecimento adquirido, o bom-senso e a prática da afetividade ao próximo, possa ser a grande chave para se encontrar não a solução de todos os problemas de saúde do mundo, mas para se minimizar ao máximo, o sofrimento daqueles que clamam por melhores condições de vida.

Acreditando que o que foi dito acima seja verdadeiro, neste trabalho pode ser encontrada uma ampla discussão sobre a ocorrência de “eleito secretório” intestinal mediado por sobrenadante de macrófagos estimulados por microcistina-LR (MCLR) de *Microcystis aeruginosa*.

Como será visto em seguida, esta é uma possibilidade interessante de ser discutida, não só pelo interesse acadêmico, mas pelo impacto que os seus dados podem representar junto à sociedade, haja vista a quantidade de pessoas que ainda nos nossos dias, utilizam-se de água não tratada; estando assim, numa condição de risco eminente de vir a manifestar um quadro de doença diarréica.

1.2. As doenças diarréicas

A diarréia pode ser considerada como um distúrbio nos parâmetros funcionais do intestino; onde os episódios de evacuações diárias aumentam, liberando um conteúdo liquefeito de fezes (Guerrant e cols, 2001).

Este tipo de enfermidade pode atingir todas as faixas etárias, podendo gerar desde um simples desconforto, até a morte (Gorbach, 1997).

Bem, aí começam as dificuldades; uma vez que a problemática das doenças diarréicas no mundo começou a ser dimensionada, de forma objetiva, à partir dos trabalhos de Snyder e Marson (1982); que, na verdade, efetuaram a primeira estimativa da magnitude do problema das doenças diarréicas no mundo. Este trabalho acabou estimulando o desenvolvimento de outros estudos mais pormenorizados, constatando-se, por exemplo, que a cada ano morria cerca de 6 milhões de crianças, considerando-se regiões como a América Latina, Ásia e África (Snyder & Marson 1982; Guerrant e cols, 1990).

Bern e cols. (1992), constataram que os programas de controle de doenças diarréicas desenvolvidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), conseguiram reduzir a mortalidade infantil de cerca de 30%, mediante o emprego das soluções de reidratação oral (SRO).

Guerrant e cols. (1983, 1992), estudaram o problema das doenças diarréicas na região Nordeste do Brasil, verificando que nos casos de diarréia persistente (pelo menos 14

dias de duração), associada à desnutrição; a solução de reidratação oral preconizada pela OMS, não era suficiente para reverter o quadro, para maioria dos enfermos.

Em uma comunidade rural do Estado do Ceará, foi verificado que cerca de 70% das mortes na primeira infância eram devidas à diarreia, e que cerca de 50% dos óbitos estavam associados à ocorrência de diarreia persistente (Lima e cols, 1992; 2000).

Felizmente, estudos prospectivos realizados por Lima e cols, (1992) na comunidade urbana Gonçalves Dias em Fortaleza desde 1989, em 223 crianças com menos de 5 anos de idade, mostraram que a média de episódios de diarreia por criança/ano que já atingiu um valor de 6,2 em 1992, foi reduzida e vem se mantendo estável em torno de 3,7 episódios, desde 1994.

Na verdade, a diarreia pode ser induzida por vários fatores, entre estes, alguns patógenos como vírus, bactérias e protozoários; e em algumas situações, proveniente de quadros de intoxicação, onde a mais comum é a do tipo alimentar, (Lifshitz e cols, 1971); embora alguns autores admitam que em cerca de 50% dos casos de diarreia, os agentes patogênicos específicos não conseguem ser identificados (Laney & Cohen, 1993).

Seja como for, os agentes infecciosos parecem constituir as causas mais frequentes das doenças diarreicas, dentre os diferentes tipos etiopatológicos desta enfermidade. A diarreia infecciosa caracteriza-se por uma resposta inespecífica do hospedeiro a diferentes tipos de patógenos intestinais, gerando manifestações clínicas bem diversificadas, podendo, nos casos mais graves, levar o enfermo à morte, devido à grande perda fecal de líquidos e eletrólitos (Field e cols. 1989; Binder, 1990; Guerrant & Bobak, 1991; Tamai e cols., 1992; Lima, 1994; Sack e cols, 1997).

A perda de fluidos num indivíduo acometido por esta doença pode chegar à 200ml por quilo de peso corpóreo; que em termos de crianças isto pode significar a perda de cerca de 20% do peso do corpo. Neste caso, um perigoso desequilíbrio ácido-base se acentua, conjuntamente com uma diminuição dos níveis de potássio teciduais, levando o organismo à um quadro de insuficiência renal, distúrbios cardíacos e circulatórios e descompensação respiratória.

Guerrant, (1994), estabeleceu que as diarreias infecciosas podem ser classificadas em inflamatória e não-inflamatória, com base na presença ou não, respectivamente, de leucócitos nas fezes. Esta identificação de leucócitos pode ser efetuada aplicando-se

alíquotas de solução contendo o conteúdo fecal, em lâminas coradas com azul de metileno (Harris e cols., 1972).

Na detecção de doenças diarréicas de característica inflamatória, causada por *Shigella* sp e *Clostridium difficile*, recomenda-se a determinação dos níveis de lactoferrina, liberada a partir de neutrófilos, como forma mais eficaz (sensibilidade em torno de 95%) de detecção deste tipo de patologia (Guerrant e cols., 1992).

A diarréia não-inflamatória, geralmente, é provocada por vírus, protozoários ou bactérias produtoras de enterotoxinas, as quais promovem diarréias aquosas, com variáveis graus de severidade (Bobak & Guerrant, 1992; Sears & Kaper, 1996; Sack e cols., 1997). Neste contexto, destacam-se aquelas causadas por *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* enterotoxigênica. A adesão destes microrganismos ao epitélio não chega a provocar lesões que despertem respostas orgânicas que justifiquem o envio de leucócitos para a região afetada; portanto as fezes dos portadores desta patologia são desprovidas de leucócitos. (Avery e cols., 1992; Bobak & Guerrant, 1992). Contudo, alguns patógenos, como o *Vibrio cholerae*; podem produzir grande aumento na concentração de íons cloreto nas fezes, podendo gerar sérias conseqüências no metabolismo hidro-salino (Powell & Szauter, 1993).

Normalmente, a disenteria acompanhada de resposta inflamatória, afeta mais a parte distal do intestino delgado e cólon. Microrganismos invasivos, como, *Salmonella* sp, *Shigella* sp e *Campylobacter* sp, ou agentes que liberam toxinas lesivas para o tecido, tais como o *Clostridium difficile* e a *Escherichia coli* enterohemorrágica; geralmente, promovem uma destruição do revestimento mucoso do intestino, com a conseqüente liberação de componentes do sangue, serosidade e leucócitos nas fezes (Baret, 1992; Tomai e cols, 1992; Guerrant e cols, 1992; Guerrant, 1994; Sears & Kaper, 1996; Sack e cols, 1997).

Muitas pesquisas vêm sendo efetuadas com diferentes agentes infecciosos causadores de diarréia, em especial o *Clostridium difficile*; considerado um dos mais importantes patógenos hospitalares (McFarland e cols, 1989; Lima & Lima, 1993; Lima e cols, 1993; Anglim & Farr, 1994; Samore e cols, 1996; Katz e cols., 1997; Starr e cols., 1997). Mas, evidências têm apontado que algumas toxinas produzidas por microalgas ou

cianobactérias podem também provocar secreção intestinal, em especial a microcistina-LR de *Microcystis aeruginosa* (Lambert e cols, 1994; Rocha e cols, 2000)

1.3. *Microcystis aeruginosa*

Microcystis aeruginosa, é uma variedade de cianobactéria, também denominada por alguns de microalga verde-azulada; devido à presença, em algumas espécies, do pigmento denominado de ficobilina azul ou ficocianina. Este microrganismo, importante componente do fitoplâncton, tem ampla distribuição ambiental; cumprindo um papel ecológico importante quanto a cadeia alimentar em seu habitat, como também na participação do delineamento do conteúdo de oxigênio na atmosfera (Pelczar Jr. E cols., 1996a, Balbach & Bliss, 1991,). Em condições anormais, portanto, podem concentrar resíduos metabólicos e toxinas; no meio circunvizinho, conseqüentemente, provocando sérios danos a muitos organismos que estabeleçam alguma interação com este tipo de ambiente (Watanabe e cols, 1996, Ueno e cols, 1996.).

Na Figura 1, pode-se observar como se configura, macroscopicamente, a distribuição da *Microcystis aeruginosa*, num ambiente lótico.

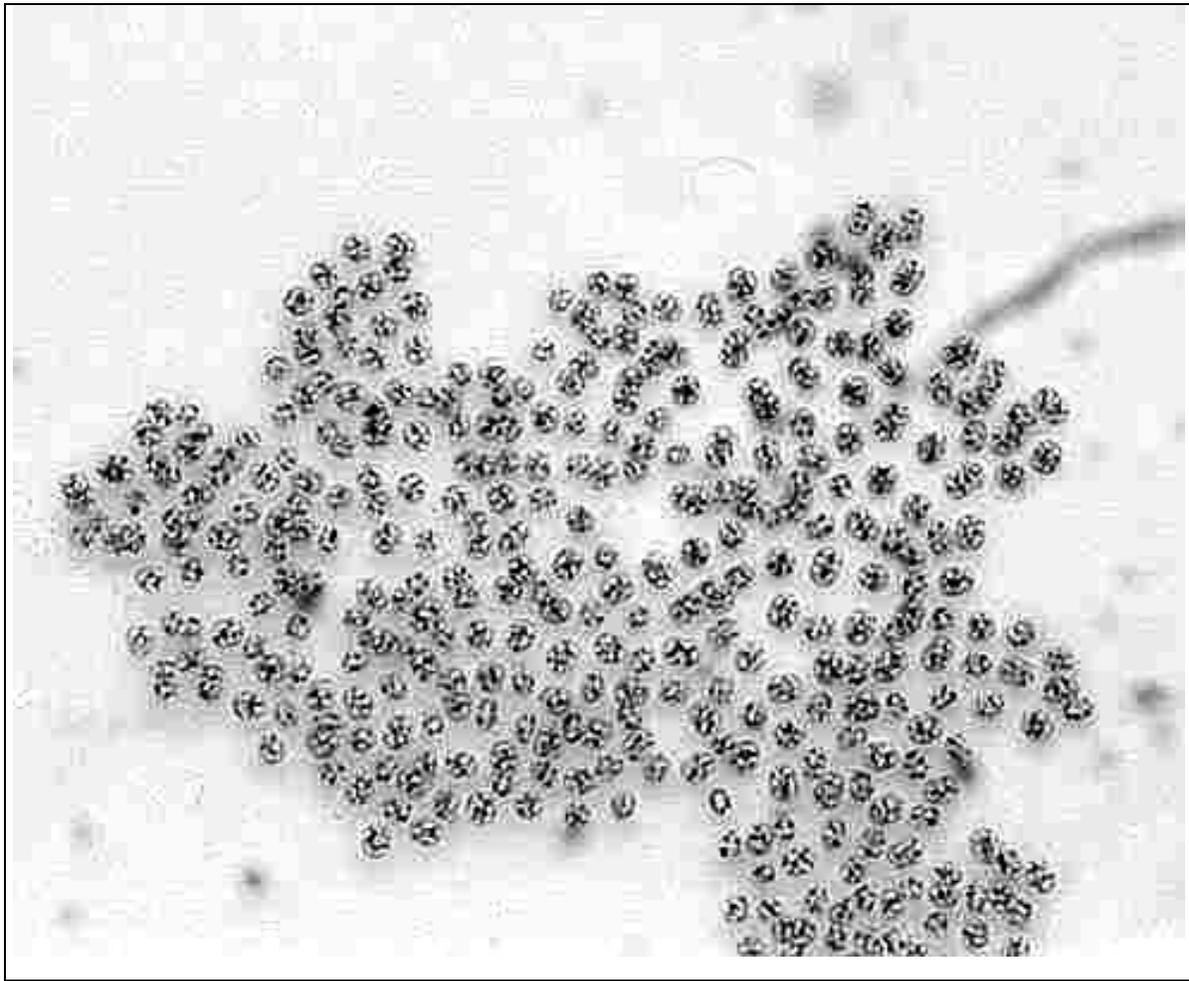


Figura 1. *Microcystis aeruginosa*. Amostra de *Microcystis aeruginosa*, corada com azul de metileno e o corante de Fisher, em preparação para microscopia óptica, com fator de ampliação, 800X. Na região central deste tipo de cianobactéria, observa-se uma região fortemente corada, relacionada com a presença pigmentos e ácido desoxirribonucléico (Watanabe e cols, 1996).

Das 40 espécies diferentes de cianobactérias que liberam toxinas no ambiente (Skulberg e cols. 1993), pode-se verificar que em alguns gêneros como *Anabaena sp.* e *Oscillatoria sp.*, são produzidas e liberadas tanto anatoxinas, uma espécie de alcalóide neurotóxico; como microcistinas, como um metabólito secundário de ação tóxica sobre vários tecidos, principalmente o tecido hepático. Já no gênero *Hapalosiphon sp.* são liberadas tanto microcistinas como citotoxinas (Prinsep e cols, 1992).

Microcystis aeruginosa, geralmente alocada próximo às áreas urbanas, ou mesmo em reservatórios de água para consumo (Reynolds, 1984), produz e libera somente microcistinas.

Os níveis recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para a concentração microcistina na água para consumo, não devem ultrapassar a 1µg/l, que correspondem a 5000 células de *Microcystis aeruginosa* por mililitro (Watanabe e cols. 1996).

Na verdade, relatos referentes à morte de organismos pelo consumo de água com cianobactérias, vêm sendo divulgados desde o século XIX, sendo o primeiro registro devidamente documentado, apresentado por Francis (1878), onde descrevia inúmeros casos de morte de animais domésticos, após a ingestão de água contaminada por cianobactérias. A partir de então, muitos outros casos surgiram de vários lugares do mundo (Steyn, 1945; Dillenberg & Dehnel, 1960; Main e cols, 1977; Beasley e cols., 1989; Devries e cols.; 1993).

Lawton & Codd, (1991); relataram que vinte ovelhas e quinze cães morreram por ingerir água contendo cianobactérias, especialmente *Microcystis aeruginosa*.

De certa forma, o contato com toxinas produzidas por cianobactérias tem sido associado a epidemias de gastroenterite (Tisdale, 1931; Veldee, 1931; Byth, 1980; Billings, 1981; Teixeira e cols., 1993); embora casos de reações alérgicas tenham sido descritos quando seres humanos nadam em águas contendo florações de cianobactérias (Carmichael & Falconer, 1993).

Na década de sessenta, na região do Zimbábue; casos de gastroenterite, acompanhados de convulsão, febre e acidose respiratória foram observados em crianças que consumiam água de fontes com florações de cianobactérias; sendo a ocorrência acentuada

no verão, época em que *Microcystis aeruginosa* era mais abundante (Zilberg, 1966; Marshall, 1991).

Na Inglaterra, em 1989, foram relatados casos relacionados aos sintomas do vírus influenza, decorrentes de indivíduos que entraram em contato com água contaminada por *Microcystis aeruginosa* (Lawton & Cood, 1991).

Casos de diarreia e vômitos em crianças que se banhavam em lagos contendo cianobactérias foram relatados por Harada e cols.; (1991); sendo encontrado nas fezes de uma delas, células de *Anabaena*, que produz significativas quantidades de microcistina-LR.

Lambert e cols.; (1994), assinalaram casos de gastroenterites associados à sintomas como cefaléia, náuseas e diarreia, a partir de indivíduos que ingeriram água contaminada por *Microcystis aeruginosa*, sendo que nas fezes destes indivíduos podiam ser encontradas células destes microrganismos.

Na China, a incidência de carcinoma hepatocelular em humanos, é extremamente aumentada, sendo associada à elevada concentração de cianobactérias nas águas que abastecem algumas regiões urbanas (Shun-Zhang, 1989; YU, 1995).

Em algumas regiões da Austrália, foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis séricos da enzima γ - glutamiltranspeptidase e os níveis de *Microcystis aeruginosa* nos reservatórios de água para consumo. A presença desta enzima neste tipo de substrato, geralmente caracteriza lesões no tecido hepático (Falconer e cols.; 1983).

Teixeira, e cols.; (1993), relataram a ocorrência de 2000 casos de gastroenterites na região de Paulo Afonso, Estado Bahia; associados à presença de cianobactérias nos reservatórios de água para consumo; sendo que em 42 dias, contabilizou-se um total de oitenta e oito óbitos.

Em Caruaru, uma cidade do Estado de Pernambuco, Região Nordeste do Brasil; entre os dias 17 e 20 de fevereiro de 1996, partindo-se de um Centro de hemodiálise (Instituto de Doenças Renais), verificou-se que 116 pacientes (89% do total de internados) apresentaram distúrbios visuais, náuseas e vômitos como consequência do consumo de água não devidamente tratada. Em 10 meses, contabilizou-se um total de 69 óbitos, configurando-se no primeiro relato de vítimas de intoxicação humana por microcistina-LR (Jochimsen e cols.,1998).

Estes dados acima revelam a necessidade de se manter uma permanente discussão sobre as pertinências do controle ambiental relacionadas com a ecologia urbana; estimulando estudos não só relacionados à ocorrência das cianobactérias nos diferentes tipos ambientes, mas acima de tudo, estudos referentes à ação das microcistina sobre os organismos, em todas as suas dimensões; possibilitando que se encontrem meios que venham amenizar os agravos nos pacientes acometidos (Watanabe e cols., 1996).

1.3.1As principais toxinas produzidas por *Microcystis aeruginosa*

A identificação de peptídeos, a partir de *Microcystis aeruginosa*, foi feita, pela primeira vez, por Brishop e cols. (1959), embora tenham sido denominadas como microcistinas a partir dos trabalhos de Konst e cols. (1965); e Carmichael e cols. (1988).

Na verdade, a partir do desenvolvimento do primeiro método eficaz de isolamento e purificação de microcistinas (Murthy & Capindale, 1970); descobriu-se que não só as cepas denominadas de NRC-1 produzem microcistinas; mas, a partir de muitas outras, também era possível de se obter microcistinas (Rabin & Darbre, 1975); inclusive de *Microcystis aeruginosa* de outras regiões como a África do Sul (Toerien e cols., 1976) e da Austrália (Elleman e cols., 1978).

Botes e cols. (1982, 1984, 1985), partindo de cepas de *Microcystis aeruginosa*, originárias da África do Sul, isolaram vários tipos distintos de microcistinas (-LA, -LR, -YR, -YA e -YM); determinando a estrutura básica destas formas e denominando-a de cianoginosina. Uma característica interessante de ser assinalada, é que estas cadeias são todas monocíclicas; compostas de D-aminoácido, alanina (Ala), erito- β -ácido metilaspártico (β - Me - Asp), ácido glutâmico (Glu) e dois L-aminoácidos variáveis com combinações conhecidas como: leucina e alanina (microcistina-LA), leucina e arginina (microcistina-LR) tirosina e arginina (microcistina-YR), tirosina e alanina (microcistina-YA), tirosina e metionina (microcistina-YM), ou dois aminoácidos não usuais, N-metilhidroalanina (Mdha) e 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico (Adda). A estereoquímica de Adda foi determinada e designada como 2S, 3S, 8S e 9S; assim completando a estrutura absoluta das microcistinas (Rinehart e cols., 1988).

De maneira geral, as microcistinas podem ser consideradas como um heptapeptídeo cíclico, quimicamente muito estável; solúvel em solventes como água, metanos, sulfóxido dimetil (DMSO) ou acetonitrila (Watanabe e cols., 1996).

Hoje, são conhecidas mais de 50 tipos diferentes de microcistinas (Krishnamurthy e cols., 1986 1989; Harada e cols., 1988, 1990, 1991 a, b; Kusumi e cols., 1987; Meriluoto e cols., 1989; Namikoshi e cols., 1990, 1992 a, b, c, d; Sivonen e cols., 1990, 1992 a, b, c; Gathercole & Thile, 1987; Stoner e cols., 1989; Watanabe e cols., 1988; Kiviranta e cols., 1992; Harada, 1999). As diferenças estruturais entre os diversos tipos de microcistinas, dependem, principalmente, da configuração dos dois L-aminoácidos variáveis e, secundariamente, da presença ou ausência dos grupos metil da β - Me - Asp e (ou) Mdha (Carmichael, 1992).

A hepatotoxicidade característica de microcistina-LR (figura 2), parece estar associada à presença do grupamento Adda e de resíduos de glutamina (Stotts e cols., 1993).

Long e cols., (2001), verificaram que a taxa de produção de microcistina a partir de *Microcystis aeruginosa* era de 0,155 fmol/célula/ dia.

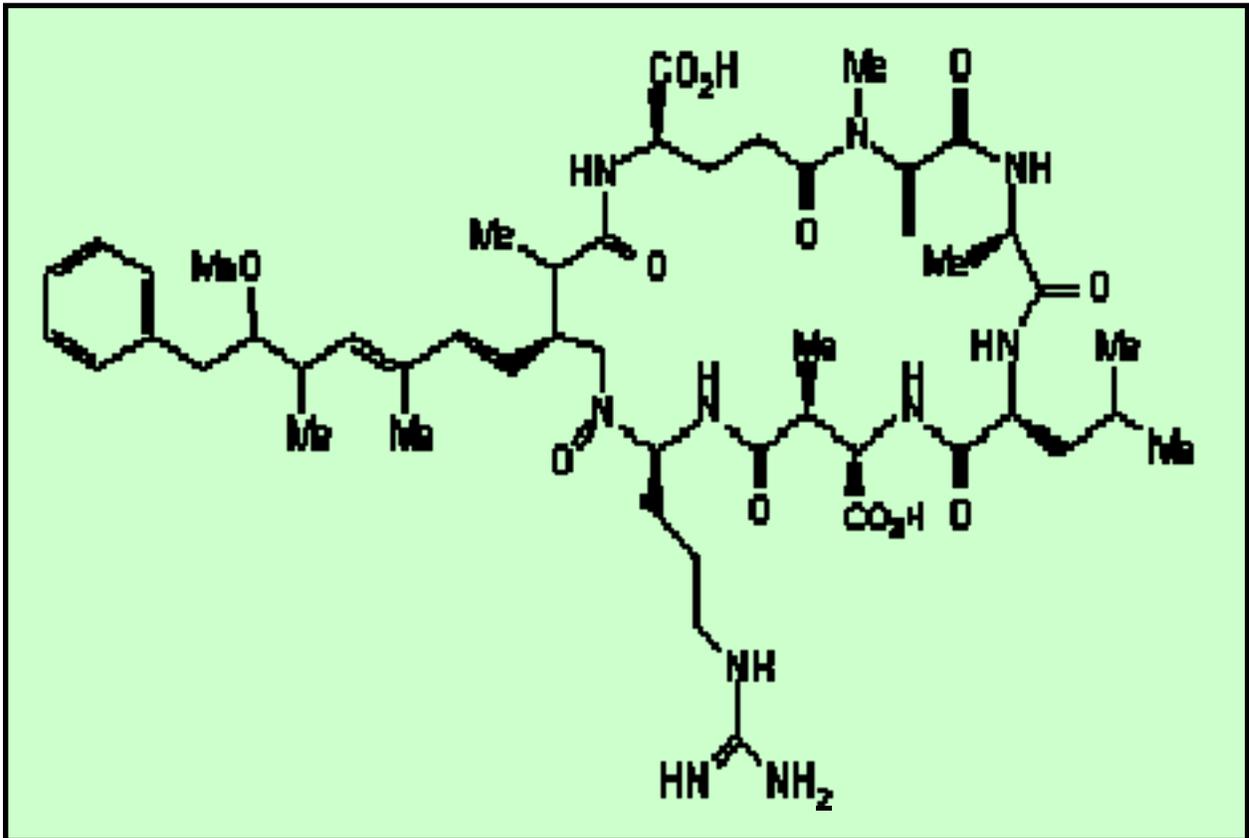


Figura 2. Estrutura molecular da microcistina-LR de *Microcystis aeruginosa* (Charmichael, 1994).

1.3.2. As microcistinas e suas ações sobre o organismo animal

Em vertebrados, os principais sinais clínicos de intoxicação pela microcistina são: palidez de mucosas, diminuição da atividade motora, apatia, diarreia, choque e morte. Estes sinais podem estar manifestos em poucas horas ou mesmo até alguns dias após ingestão de água contaminada com a microcistina (Zin & Edwards 1979; Galey e cols., 1987; Beasley e cols., 1989; Yu 1989; Drevries e cols., 1993; Carmichael & Falconer 1993).

Como já foi assinalado acima, em muitas circunstâncias de contato ou ingestão de água contendo *Mycrocistis aeruginosa*, ou quantidades significativas de microcistina-LR; pode levar um organismo a apresentar diferentes configurações de gastroenterite (Teixeira e cols., (1993), ou ainda, a exemplo do que assinala Yu, (1989) e Fujiki & Suganuma, (1993), um organismo pode vir a desenvolver câncer hepático.

Testes de sensibilização e irritação ocular em coelhos albinos e cobaias; permitiram a constatação, experimentalmente, de que MCLR podia provocar irritação da pele e dos olhos, quando empregada, topicamente, em concentrações de 1,5 mg/ml (Torokne e cols, 2001).

Seja como for, as microcistinas, parecem afetar mais severamente o tecido hepático, promovendo ampla destruição de suas células parenquimatosas e diminuição da adesão celular. Estas alterações, num segundo momento, podem levar a estrutura hepática a um colapso, comprometendo a disposição e a estabilidade funcional do sistema de vasos sinusóides, gerando hemorragia, choque circulatório e morte (Kaya & Watanabe, 1990).

Hermansky e cols., (1993), assinalaram que a microcistina-LR causava a morte de roedores por choque hipovolêmico associado a um quadro hemorrágico do tecido hepático. Pace e cols. (1991) demonstraram que 0,3 e 0,5µg/ ml de microcistina-LR em fígado de rato perfundido, causava glicogenólise e bloqueio do fluxo biliar. Material fibrilar eosinofílico preencheu os capilares glomerulares destes ratos, após 9 horas de exposição à microcistina. Houve também uma moderada vacuolização do epitélio tubular proximal, com leve dilatação tubular.

Hepatócitos intactos e pequena quantidade de debris hepáticos têm sido observados nas veias pulmonares de organismos infectados por microcistina (Hooser e cols., 1989).

Lesões e danos celulares também foram encontrados em glomérulos e nos túbulos renais (Hooser e cols., 1990; Meriluoto e cols., 1989; Radbergh e cols., 1991).

Nobre e cols., (1999, 2001) demonstraram, pela primeira vez, que microcistina-LR podia promover alterações significativas sobre diferentes parâmetros da função renal, em modelos de rim isolado de rato; sugerindo a participação de fosfolipase A₂ e ciclooxigenase na modulação dos efeitos tóxicos observados.

Apesar disto, efeitos da microcistina sobre os sistemas gastroentérico, renal e respiratório, não têm sido caracterizados pela severidade, em relação à extensão dos agravos, geralmente observados sobre o tecido hepático. Como consequência, muita discussão ainda se faz necessária sobre os possíveis mecanismos de ação das microcistinas nestes outros tecidos (Lambert e cols., 1994).

Evidências sugerem que a microcistina é capturada por um mecanismo ativo, fortemente dependente da temperatura, que necessita de uma energia de ativação da ordem de 18 Kcal/moles (Runnegar e cols., 1991).

Ensaio em membrana de hepatócitos tem revelado a presença de um mecanismo carreador ativo (uptake active), responsável pela captura de ácidos biliares. Estes carreadores parecem atuar de maneira multiespecífica; Isto é, transportando também outras substâncias orgânicas (Hooser e cols., 1991).

Seja como for, a incorporação de microcistina nos hepatócitos é inibida pela presença de ácidos biliares e por inibidores do transporte destes ácidos, como antamanide (5µM), sulfobroftaleína (50µM) e rifampicina (30µM). Isto corrobora com a idéia de que o sistema transportador de ácidos biliares pode ser importante no mecanismo induzido por microcistina-LR (Watanabe e cols., 1996; Eriksson e cols., 1990).

Frimmer & Zeigler, (1988); e Alberts e cols., (1989), demonstraram que este tipo de transportador pode ser encontrado em células do intestino, como também em células renais; embora alguns pesquisadores tenham assinalado que ambos os mecanismos transportadores encontrados no intestino e rim, diferiam daquele encontrado no tecido hepático (Burckhardt e cols., 1987).

A inibição da enzima fosfatase e a ativação das enzimas fosfolipase A₂ e ciclooxigenase em hepatócitos, parecem ser as principais causas da ação tóxica da microcistina sobre o tecido hepático (Yoshizawa e cols., 1990; Honkanen e cols., 1990; Mackintosh e cols., 1990).

Runnegar e cols., 1987), verificaram que microcistina inibia a fosforilase A em células hepáticas. Ohta e cols., (1992) e Watanabe e cols., (1996), demonstraram, especificamente, que microcistina-LR (MCLR), podia inibir as enzimas fosfatase tipo 1 (IC₅₀ = 1,7 nM) e fosfatase tipo 2 A (IC₅₀ = 0,04nM); concluindo que, microcistina-LR (1µM) era capaz de induzir a fosforilação de várias proteínas em hepatócitos de rato. Uma importante consequência disto, foi o fato de que a hiperfosforilação das citoqueratinas 8 e 18 (proteínas de hepatócitos de rato), induziam alterações topográficas na estrutura celular, decorrentes de mudanças no arranjo da rede de filamentos internos, no citoplasma destas células

Um resultado semelhante, foi obtido por Chou e cols., (1989), quando observavam o perfil de ocorrência de células mitóticas em rim de hamster; submetidos aos efeitos da microcistina.

Li, e cols.; (2001), verificaram a ocorrência de alterações nas membranas e no citoesqueleto de hepatócitos de carpas induzida por microcistina-LR.

Yoshizawa e cols., (1990), verificaram que microcistina e nodularina, uma outra variedade de toxina bacteriana, podiam inibir, *in vitro*, a atividade tanto de fosfatase tipo 1 como fosfatase do tipo 2. Neste caso, os substratos derivados do tecido hepático dos animais estudados, apresentavam um aumento do número de estruturas protéicas fosforiladas. Posteriormente, verificou-se que o nível de fosforilação de proteínas nestes substratos, era dependente da ativação relativa de determinados tipos de enzimas do tipo quinase em relação às fosfatases (Hermansky e cols., 1990).

Nishiwaki-Matsushima e cols., (1991), verificaram que microcistina-LR podia induzir a formação de neoplasias em tecido hepático de rato; mediante a inibição das enzimas fosfatase tipo 1 e 2, gerando efeitos semelhantes àqueles decorrentes do emprego do ácido ocadaico (Nishiwaki-Matsushima e cols., 1992). Estes resultados têm sugerido que o processo de inibição de ambos os tipos de fosfatases configura-se como principal fator responsável pelo surgimento de tumores hepáticos; uma vez que esta ação pode comprometer a relação existente entre substâncias ativadoras e supressoras, que controlam a expressão de determinadas atividades metabólicas dentro das células (Lambert e cols., 1994; Humpage e cols., 2000; Bischoff, 2001).

De tudo isto, pode-se assinalar que as microcistinas atuam preferencialmente sobre um dos principais mecanismos de transdução e regulação da atividade celular, que é o processo de fosforilação reversível, empregado numa ampla variedade de processos celulares (Mumby & Walter, 1993). Desta forma, a inibição da enzima fosfatase serina/treonina, mediante inativação das subunidades catalíticas tipo 1 (PP – 1c) e tipo 2^A (PP 2Ac), traz conseqüências diretas e indiretas sobre contração muscular, divisão celular, expressão gênica, regulação metabólica, transcrição gênica e mecanismos de transporte de substâncias (Li & Damuni, 1994; Honkanen e cols., 1990; Tillett e cols., 2000).

Também existem muitas evidências de que microcistina pode ativar a produção de componentes da via do ácido araquidônico, especialmente através da ativação das ciclooxigenases (Naseem & Hines, 1989; Naseem e cols., 1990); com a produção de prostaciclina 6-ceto F 1 α e tromboxano B₂ (Naseem e cols., 1990).

Macrófagos derivados do tecido pulmonar de ratos, quando estimulados por microcistina-LR aumentaram a produção de prostaglandinas E₂ (175%), PGF_{2 α} (140%) e tromboxano B₂ (169%), (Naseem e cols., 1989). Já culturas de macrófagos derivados da cavidade peritoneal de camundongos; quando estimulados com 7 desmetilmicrocistina, da cepa K-139 de *Microcystis aeruginosa*, apresentam níveis elevados de interleucina IL1 (Nakano e cols., 1989; 1991)

Um aumento na expressão de mRNA para TNF, em células do baço e em macrófagos derivados da cavidade peritoneal de camundongos que receberam extratos de *Microcystis aeruginosa* K-139, foi observado (Nakano e cols., 1991). Aumento da expressão de mRNA para TNF também foi observado em preparações de tecido hepático estimuladas por microcistina-LR e nodularina, sendo esta resposta associada à liberação de IL-1 e fator ativador de plaquetas – PAF; todos estes componentes associados aos mecanismos pró-inflamatórios (Watanabe e cols., 1996).

1.4.Os macrófagos e o processo inflamatório

Os macrófagos, formados a partir de uma linhagem de células mononucleares na medula óssea, após uma seqüência de estágios de maturação e diferenciação; os monoblastos dão origem aos monócitos da corrente sanguínea, e aos histiócitos (macrófagos fixos ou também denominados macrófagos residentes), associados aos diferentes núcleos de tecido conjuntivo no organismo (Van Furth, 1988; Ogle e cols., 1994; Laskin & Pendino, 1995; incluir Roitt e cols., 1999).

Assim, encontrados praticamente em todos os tecidos e fluidos do organismo (Van Furth, 1988; Johnston, 1988), os macrófagos podem apresentar características bioquímicas e estruturais distintas, dependendo das características de seu microambiente (Johnston, 1988; Ogle e cols., 1994). Portanto, dependendo da sua localização, estas células podem receber denominações diferentes, tais como células de Kupffer (tecido hepático), macrófagos alveolares (tecido pulmonar, macrófagos pleurais e peritoneais, de cavidades serosas), células microgliais (sistema nervoso central), osteoclastos (tecido ósseo), assim por diante.

Num determinado momento fisiológico de um organismo, macrófagos podem ser encontrados em diferentes estados de ativação, conforme o perfil metabólico do tecido de residência; muito embora, estes possam também estar ativados por estímulos externos.

No estado ativado, macrófagos apresentam-se modificados quanto à capacidade de resposta, como também à disposição de suas estruturas internas, como citoplasma mais irregular, aumento do número de mitocôndrias, maior quantidade de enzimas e elevada atividade microbicida e tumoricida (Cohn, 1978; North, 1978; Takemura & Werb, 1984).

Muitas evidências apontam que a ativação de macrófagos pode ser induzida por citocinas ou mediante interações com componentes moleculares específicos, derivados, por exemplo, de certas estruturas do organismo hospedeiro.

Segundo alguns autores (Adams & Hamilton, 1987; Nathan, 1987; Laskin & Pendino, 1995), o interferon gama, um tipo de citocina, exerce um importante papel perante os processos de ativação endógena de macrófagos.

Também existem evidências de que macrófagos, quando expostos a substâncias irritantes, tais como: tioglicolato, óleo mineral, caseína, proteose-peptona, ovalbumina ou

glicogênio; apresentam-se sensibilizados quanto à presença de um agente de estimulação exógena, embora não necessariamente com exarcebação das respostas bactericida ou tumoricida (North, 1978; Adams & Hamilton, 1987).

Seja como for, acredita-se que macrófagos residentes exerçam um papel de célula sinalizadora; as quais, quando em contato com agentes nocivos, podem acionar sistemas de reconhecimento e triagem seletiva, mediante a produção e liberação de diferentes tipos de enzimas; substâncias inibidoras de certos sistemas enzimáticos, fatores ligados à cascata da coagulação sangüínea, componentes do sistema complemento, citocinas diversas, componentes associados ao metabolismo do oxigênio, derivados lipídios; todos envolvidos, direta ou indiretamente, com a gênese dos eventos que caracterizam a reação inflamatória aguda (Ogle e cols., 1994; Laskin & Pendino, 1995).

Após esse estágio mais precoce do processo inflamatório, os macrófagos se tornam abundantes e dão início à ação fagocitária de microrganismos, debris celulares, complexos antígeno-anticorpo, células neoplásicas e outras substâncias reconhecidamente estranhas para o organismo (Lê Fevre e cols., 1979; Ferreira, (1980); Takemura & Werb, 1984; Unanue & Allen, 1987; Nathan, 1987).

É importante assinalar que macrófagos alveolares extraídos do exudato bronco-alveolar de primatas são importantes para o acúmulo de neutrófilos num processo de inflamação aguda (Kazmierowski e cols, 1977).

Assim, foi também demonstrado que a infiltração neutrofílica induzida pela carragenina, hemácias de carneiro ou soro heterólogo, em cavidades peritoneais de ratos; pode ser bloqueada ou potencializada, pelo tratamento prévio com soro anti-macrófago e tioglicolato, respectivamente (Souza & Ferreira, 1985).

Souza e cols., (1988), revelaram também, que a migração de neutrófilos provocada pela carragenina, zymozan ou LPS foi bastante reduzida em cavidades peritoneais depletadas de macrófagos. Posteriormente, Rocha e cols., (1997), e Souza e cols., (1997) revelaram que macrófagos exerciam um importante papel na migração de neutrófilos em cavidade peritoneal e bolsa de ar subcutânea de ratos, quando eram empregadas as toxinas A e B de *Clostridium difficile*, como fatores de estimulação.

Bem, vários trabalhos foram idealizados, procurando-se demonstrar a importância de certas citocinas, liberadas a partir de macrófagos, tais como: IFN- γ , IL-1, TNF- α e IL-8,

todas envolvidas à sua maneira, na mediação da migração de neutrófilos para o foco inflamatório (Cunha & Ferreira, 1986; Faccioli e cols., 1990; Ribeiro e cols., 1990; Ribeiro e cols., 1991).

Em Rocha e cols, 2000, macrófagos estimulados com microcistina-LR, derivada de *Microcystis aeruginosa*, produziu um sobrenadante que induziu uma resposta secretória em preparações de íleo de coelho, montadas em câmara de Üssing. A partir deste trabalho se levantou a questão:

Que substâncias estariam sendo liberadas à partir de macrófagos afim de proporcionar este efeito secretório?

1.5.Aspectos Fisiológicos e imunofarmacológicos da mucosa intestinal: diferentes níveis de interação entre células e mediadores

Muitas evidências apontam para uma participação significativa do sistema imunológico na resposta secretora intestinal, principalmente quando esta vem associada à presença de fatores patogênicos (Hinterleitner & Powell, 1991; Schreiber e cols., 1992; McKay & Perdue, 1993; Perdue & McKay, 1994; Stack e cols., 1995; Theodorou e cols., 1996).

Algumas células imunocompetentes (macrófagos, neutrófilos, mastócitos e linfócitos), podem ser localizadas próximo ao epitélio, ou lâmina própria intestinal, em relação espacial e funcional contígua com estruturas do sistema nervoso entérico (Stead e cols., 1987; Schreiber e cols., 1992; Ciancio & Chang, 1992; Perdue & McKay, 1994).

Assim, a síntese e liberação por parte destas células, de determinados mensageiros químicos, como metabólitos do ácido araquidônico, fator de agregação plaquetária, substâncias oxidantes, aminas biogênicas e citocinas, podem alterar as funções do epitélio intestinal, direta ou indiretamente; mediante a ativação de diferentes sistemas celulares associados (Schreiber e cols., 1992; McKay & Perdue, 1993; Perdue & McKay, 1994; Eberhart & Dubois, 1995; Stack e cols., 1995; Theodorou e cols., 1996).

Altos índices de prostaglandinas, secreção de cloreto e água, têm sido observados tanto nas diarreias de ocorrência natural como nos modelos de diarreia para a experimentação animal (McKay & Perdue, 1993; Eberhart & Dubois, 1995; Stack e cols., 1995); sendo a principal fonte destes eicosanóides, macrófagos e mastócitos da região subepitelial (Bern e cols., 1989; Calderaro e cols., 1991; Schreiber e cols., 1992; McKay & Perdue, 1993; Perdue & McKay, 1993; Eberhart & Dubois, 1995).

Racussen e cols., (1980) e Heintze e cols., (1983), evidenciaram que a aplicação de PGE₂ e PGE₁, em alça intestinal de coelho, *in vitro*, produz um aumento significativo na corrente de curto-circuito, decorrente da secreção de cloreto; podendo este efeito ser bloqueado pela indometacina, um inibidor de ciclooxigenase (Smith e cols., 1981). Musch e cols., (1987), verificaram que a secreção de cloreto nestes sistemas podia estar associada a um mecanismo dependente de cAMP.

Também foi verificado, que em preparações de monocamadas de células T-84, estimuladas por eicosanóides; podiam ser observados, basicamente, os mesmos efeitos secretórios, visualizados nas preparações de mucosa intestinal, montadas em câmaras de Üssing (Halm e cols., 1988; McKay & Perdue, 1993).

Calderaro e cols., (1991), verificaram significativa elevação da atividade da enzima ciclooxigenase, após a pré-incubação de fragmentos de cólon, *in vitro*, com ácido araquidônico exógeno ou cálcio ionóforo A23187; obtendo como resposta, PGF_{2α}, PGE₂, PGI₂ e TXB₂. Dentre esses mediadores, somente a PGE₂ foi capaz de estimular a secreção intestinal, em câmara de Üssing, sendo tanto a síntese de prostaglandinas ou a secreção intestinal inibida por indometacina.

Por outro lado, muitos trabalhos revelam que fMLP (Finley & Smith, 1989; Baret e cols., 1990), PAF (Hanglow e cols., 1989; Powell, 1992), H₂O₂ (Powell, 1992), leucotrienos (Smith e cols., 1988; Smith e cols., 1992), IL-1 (Chiossone e cols., 1990; Chang e cols., 1990), IL-3 (Chang e cols., 1990) e TNF-α (Kandil e cols., 1992), podem atuar indiretamente, estimulando a produção de prostaglandinas em células do sistema imune, alocadas nas imediações da lâmina própria e submucosa intestinal.

Leucotrienos derivados de estruturas intestinais, tanto em modelos de inflamação intestinal, como em indivíduos com colite ulcerativa, revelaram a importância da participação desses agentes na patogênese das doenças inflamatórias do intestino (Schreiber

e cols., 1992; Smith, 1992; McKay & Perdue, 1993). Mas, Berns e cols., (1989), não evidenciaram associação entre o efeito secretório de cloreto em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, com os produtos da lipoxigenase; como Calderaro e cols. (1991), não encontraram tal relação.

De qualquer forma, tem sido relatado que LTB_4 , não necessariamente participa do transporte de íons em preparações intestinais; mas teria ação preponderante como potente quimiotático; na estimulação da migração de neutrófilos para o intestino, com conseqüente indução de lesão na mucosa intestinal (Elton e cols., 1989; Smith, 1992; McKay & Perdue, 1993).

Têm sido, também, revelado que macrófagos, mastócitos e células endoteliais, alocadas na lâmina própria intestinal, são importantes fontes do fator de agregação plaquetária (Snyder, 1990). Da mesma forma que muitas evidências clínicas, histopatológicas, ou provenientes de modelos experimentais, associam, positivamente, a ocorrência de PAF com a incidência de doenças inflamatórias no tecido intestinal (Schreiber e cols., 1992; McKay & Perdue, 1993; Morteau e cols., 1993; Fonteles e cols., 1995; Meenam e cols., 1996).

Em preparações de intestino de coelho ou de rato, em câmaras de Üssing, verificou-se que o fator de agregação plaquetária – PAF, era capaz de produzir alterações na corrente de curto-circuito, de forma dose-dependente, mas que este efeito era dependente da síntese de prostaglandinas e da participação do sistema nervoso entérico (Hanglow e cols., 1989; Berne e cols., 1989; Powell, 1992).

O peróxido de hidrogênio também parece ser um importante fator envolvido na secreção intestinal. A sua participação pode ser delineada tanto por mecanismos diretos como indiretos, envolvendo sempre a participação do sistema nervoso local. Na primeira situação, este agente interage com o epitélio intestinal, através de um mecanismo dependente de cálcio, alterando a absorção de NaCl e a secreção de cloreto (Powell, 1992; Tamai e cols., 1992). Com relação ao efeito indireto do peróxido de hidrogênio, foi verificado que este metabólito realiza a sua ação mediante a síntese de prostaglandinas. Normalmente, as prostaglandinas alteram a dinâmica dos mecanismos de transporte intestinal, por processos moleculares associados aos nucleotídeos cíclicos. Assim, como acontece com PAF, o peróxido de hidrogênio produz alterações na corrente de curto-

circuito, que apresentou, em ambos os casos, uma curva com dois picos de efeitos máximos. Um máximo relativo, logo após a aplicação do estímulo, e outro máximo após 15 minutos (Karayalcin e cols., 1990; Powell, 1992).

Muitas citocinas, atuando de maneira autócrina, parácrina ou endócrina; parecem agir como importantes coadjuvantes; nos processos relacionados com os efeitos secretórios intestinais, principalmente na condição patológica (Sartor e cols., 1988; Kusagami e cols., 1991; Isaacs e cols., 1992; Young e cols., 1993; Hyams e cols., 1993; McKay & Perdue, 1993; Sartor, 1994).

Na lâmina própria do intestino, tipos celulares como, linfócitos, macrófagos e mastócitos podem produzir o fator de necrose tumoral – TNF; que na condição de uma citocina pro-inflamatória, pode constituir-se num dos mediadores implicados nas modulações estruturais e funcionais do epitélio intestinal sob condições adversas (Berschneider & Goralska, 1992; McKay & Perdue, 1993; McKay & Perdue, 1994; Sartor, 1994).

Evidências também apontam TNF como elemento responsável pelo aumento da população de células residentes da lâmina própria e epitélio intestinal. Esta atividade, que pode ser desempenhada de forma autócrina e/ou parácrina, estimula a liberação de outros mediadores, tais como citocinas, derivados lipídeos, enzimas, substâncias oxidantes, e neurotransmissores; muitos dos quais, por sua vez, são capazes de provocar secreção intestinal e lesão na própria mucosa (Berschneider & Goralska, 1992; Kandil e cols., 1992; McKay & Perdue, 1994).

Foi também demonstrado que o TNF- α induz atividade secretora, tanto em preparações de mucosa ileal, *in vitro*, como em cultura de fibroblastos com células T-84, por mecanismos dependentes da síntese de prostaglandinas (Kandil e cols., 1992).

Mas, dentre as células imunocompetentes que compõe a mucosa intestinal, os macrófagos têm se destacado por sua elevada capacidade de sintetizar e liberar rapidamente a interleucina-1; cuja atividade desempenha um papel marcante na fisiopatologia da lesão e secreção intestinal (Cominelli e cols., 1989; Cominelli e cols., 1990; Chang e cols., 1990; Chiossone e cols., 1990; Morteau e cols., 1993; Theodorou e cols., 1994; Rocha e cols., 1998).

Alguns pesquisadores, como Cominelli e cols., (1992); Dinarello & Wolff, (1993); e Ferreti e cols., (1994), demonstraram que a indução da formação de um imunocomplexo com IL-1 e IL-1ra, um inibidor de receptor para IL-1; promove significativa diminuição do efeito lesivo intestinal, como também da síntese de eicosanóides.

Baggioline e cols., (1989); Dinarello & Wolff, (1993); Sartor, (1994), demonstraram que IL-1 pode estimular a síntese de leucotrieno LTB₄; cuja liberação, pode desempenhar uma função quimiotátil, atraindo neutrófilos em direção ao foco do processo inflamatório intestinal.

Chang e cols., (1990); e Chiossone e cols., (1990), demonstraram que IL-1 produz uma intensa secreção intestinal, em mucosa ileal de coelho ou galinha, montada em câmaras de Üssing; por um mecanismo sensível à ação da indometacina. Este trabalho clássico sugere que as prostaglandinas, possivelmente de fontes subepiteliais, seriam os mediadores finais da atividade secretória dessa citocina.

Os resultados obtidos por Chiossone e cols., (1990), demonstraram que a adição de IL-1 α ou IL1 β provocava um aumento na corrente de curto circuito, de forma concentração-dependente se estas citocinas fossem aplicadas no lado seroso das preparações. Assim, atingia-se um efeito máximo na dose de 5ng/ml e no tempo de 40-min. Também demonstraram que a atividade secretora intestinal dessas citocinas foi similar, tanto na magnitude do efeito quanto no delineamento cinético; sugerindo, que as duas formas de IL-1 poderiam utilizar-se do mesmo receptor nas preparações de íleo de coelho.

Algumas evidências, portanto, têm indicado que a interleucina-6 tem forte participação nos mecanismos de amplificação da resposta inflamatória intestinal. Nesse contexto, tem sido evidenciados elevados níveis de IL-6 no intestino de indivíduos com colite ulcerativa. Observou-se, ainda, que os macrófagos residentes, presentes na lâmina própria intestinal de pacientes com doenças inflamatórias, são aptos a sintetizar grandes quantidades dessa citocina (Kusagami e cols., 1991; Schreiber e cols., 1992; Reinecker e cols., 1993).

Já com relação à produção de IL-8, por células epiteliais e macrófagos residentes, as evidências mostram que esta citocina é capaz de amplificar o processo inflamatório agudo no intestino, através de seus mecanismos relacionados com atividade quimiotática para

neutrófilos (McCain e cols., 1993; Eckmann e cols., 1993). Aqui, é importante salientar que Sartor, (1994), verificou, experimentalmente, que a exposição do intestino a determinadas citocinas, dentre elas a interleucina-8, reproduz muitas características da inflamação intestinal, tais como: ativação de células imunes, endoteliais e epiteliais e recrutamento de células inflamatórias circulantes.

Steiner, e cols., (1998), realizando um estudo prospectivo com crianças provenientes da comunidade Gonçalves Dias, da Cidade de Fortaleza, no Nordeste do Brasil; verificaram que linhagens de *Escherichia coli* enteroagregativas (EaggEC), produziam diarreia persistente, com liberação significativa de lactoferrina, bem como de interleucinas IL-8 e IL-1 β . Verificaram também que crianças portadoras da EaggEC sem manifestação de diarreia, apresentavam um desenvolvimento orgânico precário, com liberação de elevadas taxas de lactoferina e IL-1 β . Após a verificação de que cultura de células do tipo Caco-2 podiam liberar IL-8 em presença de EaggEC, mediante a presença de uma proteína termo-estável liberada pela bactéria; concluíram que EaggEC tinha um importante papel no acentuamento das complicações orgânicas derivadas da deficiência nutricional, como também podia gerar inflamação intestinal nos indivíduos portadores..

Neste ponto, é importante destacar a significativa contribuição que o grupo de pesquisadores do Laboratório de Doenças Infecciosas, UPC & IBIMED, vem conferindo aos estudos relacionados à participação de células e mediadores na imunofisiopatologia de enterotoxinas bacterianas.

Com os trabalhos de Lima e cols., (1988, 1989), foi demonstrado que a administração de toxina A ce *Clostridium difficile* provocava potente secreção intestinal; sendo esta resposta semelhante àquela obtida pelo emprego da toxina do *Vibrio cholerae*. A presença de infiltrados de células mononucleares, principalmente macrófagos na mucosa dos animais infectados, permitiu que se considerasse a participação das mesmas na fisiopatologia da diarreia inflamatória provocada pelo *Clostridium difficile*.

Este achado, na verdade, deu origem a uma importante seqüência de trabalhos, cujos resultados permitiram que se verificasse, por exemplo, que a atividade secretora induzida por toxina A de *Clostridium difficile* e a reação inflamatória associada podia ser reduzida com a aplicação de inibidores da fosfolipase A₂, ciclooxigenases e antagonistas do fator de agregação plaquetária (Fang e cols, 1994; Fonteles e cols, 1995).

Santos-Neto, e cols., (1996), verificaram que Toxina A e não toxina B de *Clostridium difficile* podia reduzir a absorção de água e eletrólitos, in vivo; em modelos de perfusão intestinal em ratos.

Posteriormente, Rocha e cols., (1997) e Souza e cols., (1997), observaram que ambas as toxinas A e B de *Clostridium difficile* podiam atuar como potentes indutoras da migração de neutrófilos, em cavidade peritoneal e bolsa de ar subcutânea em ratos, através da liberação de fatores quimiotáticos, em especial leucotrienos, IL1 β e TNF α , mediante a participação de macrófagos residentes nestes compartimentos. Com isto, Rocha, e cols., (1998), demonstraram a partir do procedimento de ELISA, que sobrenadante de macrófagos estimulados com Toxina A de *Clostridium difficile* liberavam IL1 β , com a participação de proteína G sensível a toxina pertusis, PAF e TNF α ; e que esta era capaz de induzir secreção intestinal em preparações de mucosa montadas em câmaras de Üssing. Assinalaram ainda, que este efeito ocorria de forma indireta, mediante a síntese liberação de prostaglandinas por células da lâmina própria intestinal, com a participação de mediadores do sistema nervoso entérico.

O conjunto de trabalhos acima assinalado formou um importante referencial, que serviu de subsídio para que outras toxinas fossem avaliadas dentro da mesma sistemática. Assm, Rocha, e cols., (2000), verificaram que macrófagos estimulados com microcistina-LR de *Microcystis aeruginosa* podiam liberar TNF α e IL1 β , sendo esta última capaz de produzir um potente efeito secretório em preparações de íleo de coelho montadas em câmaras de Üssing. LPS aplicado em culturas de macrófagos produziu TNF α , mas toxina do *Vibrio cholerae*, não foi capaz de estimular macrófagos a produzir os tipos de mediadores identificados acima. É importante assinalar que estes resultados motivaram a realização do presente trabalho, que como veremos a seguir, tenderá aumentar os subsídios do grupo, perante o estudo da ação das toxinas bacterianas sobre a fisiopatologia das doenças diarréicas.

Finalmente, pode-se dizer que as evidências têm sido amplas; no sentido de que a participação dos mediadores pró-inflamatórios cumpre um importante papel na infiltração celular, lesão tecidual, ulceração, secreção, motilidade e fibrose intestinal. Não obstante, a compreensão dos mecanismos de ação dos diferentes mediadores e tipos celulares envolvidos na resposta intestinal a substratos especiais, bem como o envolvimento dos

diferentes sistemas associados, como o sistema nervoso entérico, ainda, esta longe de ser alcançada (Schreiber e cols., 1992; Perdue & McKay, 1994; Sartor, 1994).

1.6.O universo operacional das junções firmes, entre as células do epitélio intestinal

Para se tentar compreender um pouco do que ocorre em termos de respostas secretoras ao nível do epitélio intestinal, se faz necessário o reconhecimento estrutural e funcional das junções firmes, também denominadas de junções compactas, “tight junctions” ou “zonulae ocludens”; em relação à sua vizinhança (Gunbiner, 1987, 1993).

As junções firmes são estruturas complexas, associadas a um mecanismo multifatorial de regulação, que dentro de determinadas condições, procura controlar o que se poderia denominar de transporte paracelular de substâncias (Diamond, 1977).

Podendo ser encontrada em diferentes tipos de tecidos; geralmente, as junções firmes, estão formadas por várias famílias de proteínas associadas, tanto no domínio intracelular, como nos domínios extracelulares; de maneira que seus filamentos de estrutura primária, secundária e terciária, venham a formar uma espécie de rede, que circunda o perímetro apical das estruturas celulares, como por exemplo, nos enterócitos (Mitic, e cols., 2000; Nusrat, e cols, 2000).

Das famílias de proteínas associadas ao domínio transmembrana, destacam-se as ocludinas e claudinas, que desempenham um importante papel estrutural na formação das junções firmes, como também contribuem para a definição de suas características fisiológicas (Mitic, e cols., 2000).

As ocludinas são fosfoproteínas de 65Kda, que transpassam algumas vezes as membranas citoplasmáticas, voltando para o citoplasma as extremidades NH₂ e COOH e para a região extracelular, duas alças ricas em glicina e tirosina (Mitic, e cols, 2000). O domínio extracelular das ocludinas interage com estruturas homólogas, provenientes de células vizinhas (Stevenson e cols, 1986, Nusrat, e cols, 2000).

Estas estruturas protéicas parecem cumprir um importante papel nos processos de adesão celular, de forma Ca⁺⁺- dependente (Van Italie & Anderson, 1997); sendo que

mutação ou expressão excessiva das mesmas parecem afetar a permeabilidade das junções firmes, modificando a resistência transepitelial do espaço paracelular.

As claudinas constituem proteínas com peso molecular de aproximadamente 22Kda, contendo duas alças extracelulares, e suas terminações NH₂ e COOH, voltadas para a região citoplasmática (Tsukita & Furuse, 1999). Sua participação nos processos de formação da barreira paracelular parece ampla, principalmente devido a capacidade de polimerizar-se em fibrilas lineares (Furuse, e cols, 1998).

Muitos tipos diferentes de claudinas já foram identificados, assinalando-se que a expressão de claudina-1 pode conferir alterações na resistência transepitelial, interferindo no transporte de substratos via espaço paracelular (Balda & Matter, 1998); enquanto que as claudinas 3 e 4 funcionam como receptores para enterotoxinas do *Clostridium perfringens*, conferindo significativas alterações no arranjo e expressão destas proteínas; conseqüentemente podendo reduzir de forma significativa a resistência transepitelial (Sonoda, e cols., 1999).

A terminação COOH de ambas proteínas ocludinas e claudinas, ligam-se a uma ampla família de proteínas citoplasmáticas denominadas de ZOs (ZO-1,ZO-2 e ZO-3), contendo cerca de 210 Kda cada (Fanning, e cols, 1998; Itoh, e cols., 1999); que por sua vez, constituem parte de um outro amplo sistema enzimático associado às membranas citoplasmáticas, as guanilato-quinases (Jesaitis & Goodenough, 1994; Nusrat e cols, 2000).

Estas formações protéicas acima descritas podem estar organizadas de forma a caracterizar pelo menos três domínios; denominados de PDZ (associado a grandes discos protéicos extracelulares formados pela associação de ZO-1 e proteínas do tipo PSD, DLG), SH-3 (associado a estruturas protéicas que conservam entre si homologias estruturais e funcionais), e GUK (associado a uma guanilato quinase inativa, intracelular). Este sistema de proteínas, associado a outros sistemas enzimáticos como, por exemplo, as Rho quinases, podem desempenhar um papel significativo na regulação dos parâmetros funcionais das junções firmes (Mitic, e cols, 2000).

Os domínios PDZ e GUK parecem também estar associados a um anel de microfilamentos de actina, contendo miosina II, relacionados ao complexo juncional; cujo papel funcional atrela-se a regulação da permeabilidade paracelular (Fanning, e cols, 1998; Wittchen e cols., 1999).

Recentemente, foram identificadas fosfoproteínas, denominadas de cingulinas, com aproximadamente 140Kda, que estão associadas diretamente com as proteínas ZO-1. Não se sabe ao certo qual a sua participação no processo de configuração dos diferentes sistemas de filamentos associados às junções firmes; mas as evidências insinuam que estas proteínas parecem cumprir um papel semelhante ao da miosina (Cordenonsi, e cols, 1999).

Nas imediações inferiores das junções compactas, um outro grupo de proteínas transmembrana, geralmente denominadas de caderinas, também envolve todo o perímetro celular, formando um cinto de adesão. O domínio extracelular das caderinas é caracterizado por ligações específicas entre moléculas da mesma natureza, de células vizinhas. No citoplasma, este sistema está intimamente associado ao complexo Actina-miosina II, que conserva estreitas ligações com o citoesqueleto celular (Madara e cols, 1987; Madara e cols, 1992, Madara, 1998).

Em linhas gerais, a cada dia, novas estruturas moleculares associadas, direta ou indiretamente, com as junções firmes são descobertas, e novas implicações funcionais entre estas estruturas são propostas, o que demonstra a complexidade dos mecanismos que delinham e controlam os diferentes aspectos funcionais deste complexo juncional.

Na figura 3, tem-se um modelo esquemático de uma junção firme, onde podem ser observados alguns dos seus componentes. Nesta figura, pode ser visualizada a íntima relação entre os diferentes tipos de sistemas enzimáticos do tipo Kinases, com outras moléculas mais associadas ao complexo juncional. Pode-se verificar também, que as ocludinas estão mais associadas às proteínas do tipo ZO-1; como também, que as caderinas estão mais próximas do complexo de fibras do tipo actina-miosina, integrando-se a estas, para promoverem as alterações conformacionais do complexo juncional. As claudinas parecem também transpassar o espaço juncional, estando associadas às proteínas do tipo ZO-2 (Mitic e cols, 2000).

0

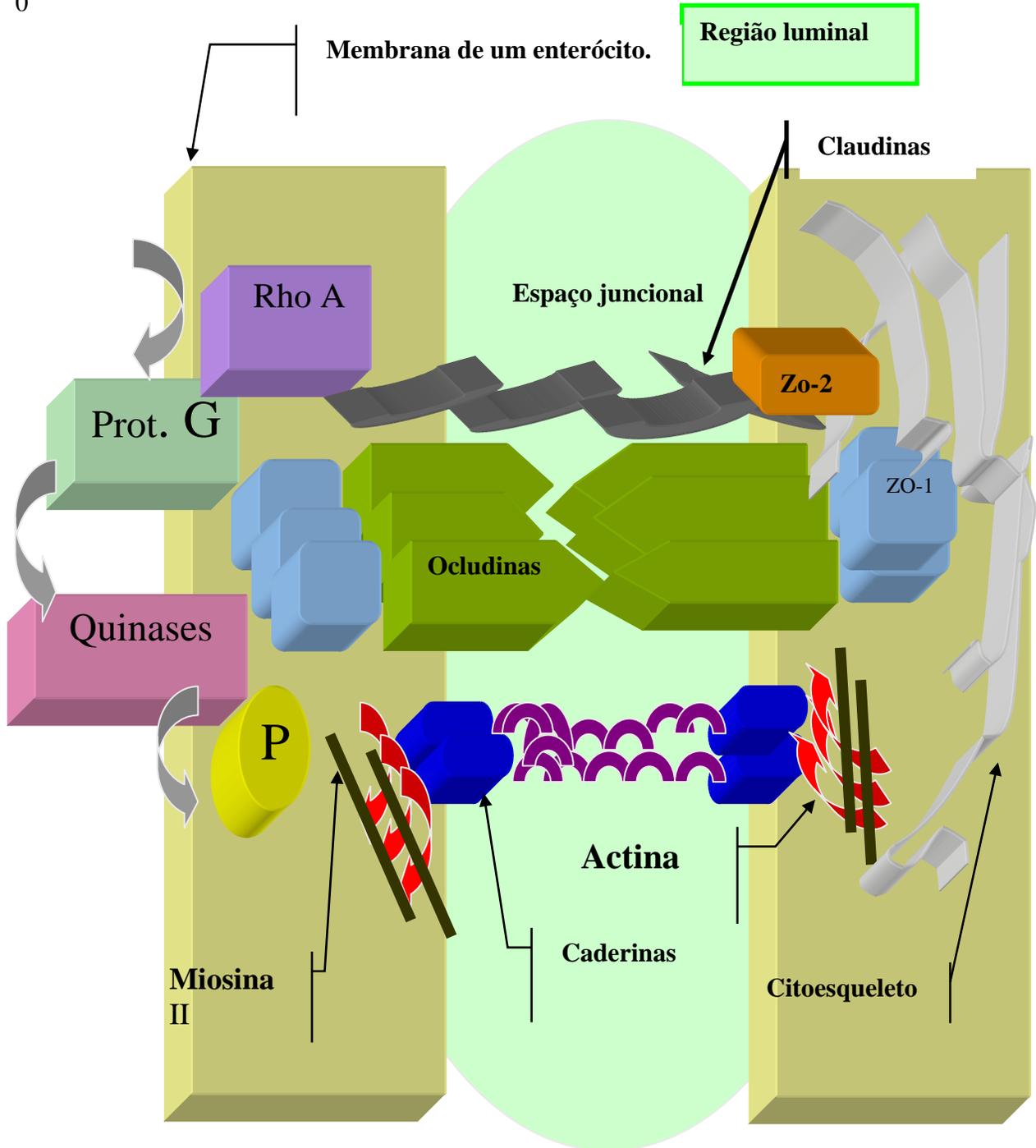


Figura 3. Diagrama esquemático sobre os principais elementos constituintes de uma “Junção firme”.

Seja como for, a presença das junções firmes, regulando a extensão do espaço entre os enterócitos na região paracelular; contribui, conjuntamente com os outros mecanismos de transporte de íons e solutos nas membranas adjacentes, para a administração dos fenômenos eletrogênicos ao nível da mucosa intestinal.

Torres, (2002), propôs um modelo equivalente elétrico, para explicar os efeitos eletrogênicos na mucosa ileal, decorrentes das alterações dos diferentes mecanismos envolvidos no transporte de íons atrelados às diferentes porções da membrana do enterócito e da região paracelular.

Assim, conforme mostra a Figura 4, os fenômenos resistivos operacionalizados pela junção firme estão representados por uma resistência de natureza ôhmica “ R_{te} ”, a resistência transepitelial; que na verdade, configura o somatório de todas as impedâncias geradas na região paracelular. É importante frisar que todo transporte transepitelial, de alguma forma, envolve a sua participação (Torres, 2002).

É importante que se diga que, sobre esta resistência transepitelial, paira uma tensão de natureza elétrica, a tensão transepitelial “ V_{te} ”, que determina a intensidade e a orientação dos gradientes iônicos formados na região paracelular (Torres, 2002).

Esta tensão “ V_{te} ”, na verdade, é uma resultante da diferença de duas outras tensões eletrônica. Uma é a tensão “ E_A ”, cuja natureza associa-se aos mecanismos de transporte de íons e outros substratos, que ocorrem nas imediações da região apical do enterócito. E a outra, uma tensão elétrica “ E_B ”, cuja natureza associa-se aos mecanismos de transporte de íons e outros substratos que ocorrem ao nível da membrana basolateral do enterócito. A cada um destes mecanismos, em suas respectivas regiões, deve-se associar uma resistência resultante, que estará representando no modelo, a contribuição de cada mecanismo de transporte ao movimento de íons, conforme as orientações dos gradientes iônicos locais, bem como os resíduos de tensões provocados pelo translocamento dos íons entre estes compartimentos (Torres, 2002).

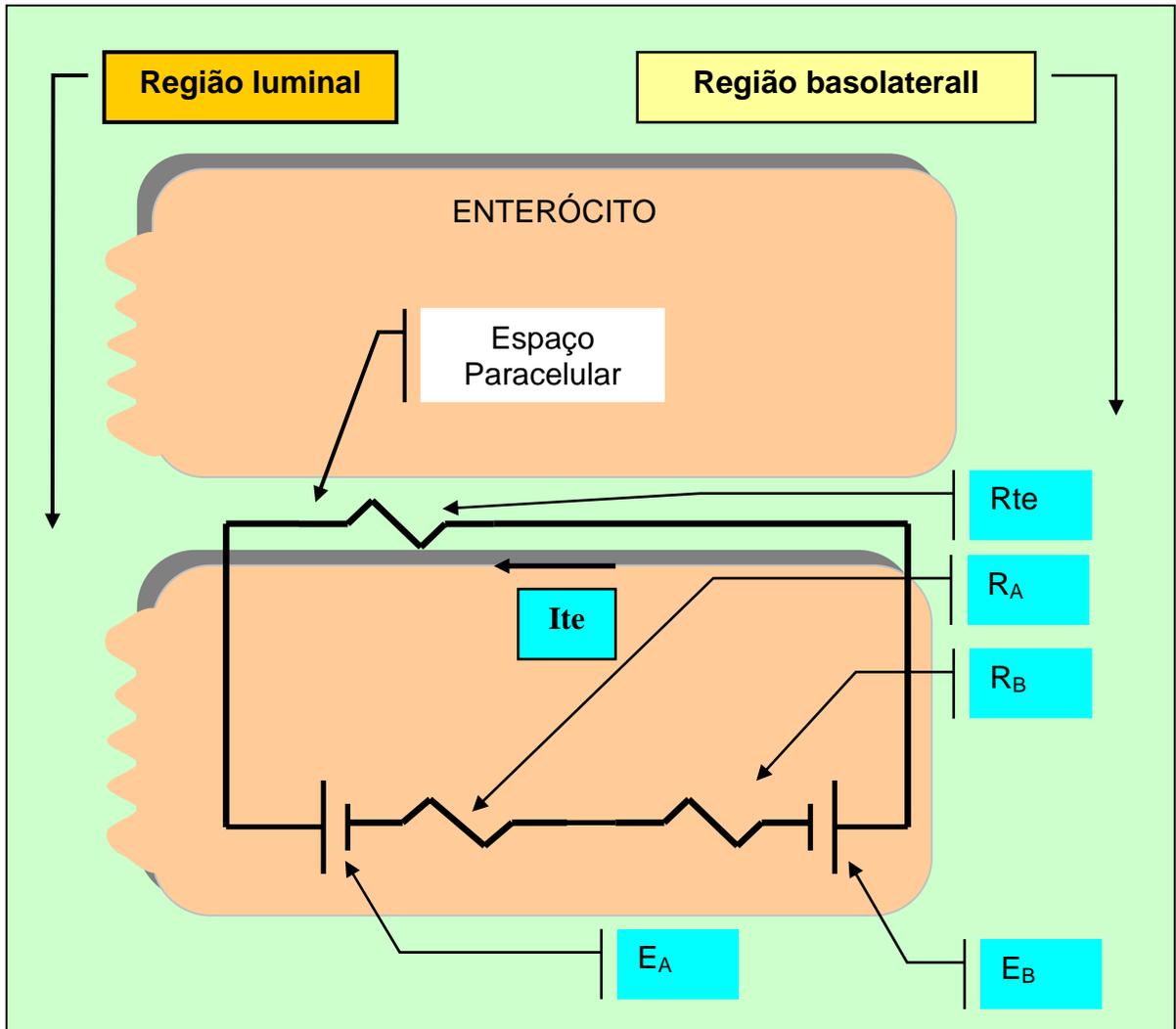


Figura 4: Modelo equivalente elétrico que retrata os fenômenos eletrogênicos ao nível dos enterócitos, segundo Torres (2002). “ R_A ” e “ R_B ” são as resistências decorrentes dos mecanismos de transporte de íons, nas regiões luminal e basolateral, respectivamente. “ E_A ” e “ E_B ” são as tensões elétricas nestas resistências. “ I_{te} ” e “ R_{te} ” representam, respectivamente, a corrente elétrica e a resistência transepitelial.

Pode-se verificar, por exemplo, que na região apical de um enterócito, localizam-se os mecanismos de absorção de Na^+ via canal seletivo, que pode ser inibido por amilorida, um conhecido diurético, poupador de potássio. Já nas depressões de membrana da região apical, podem ser localizados os mecanismos de co-transporte Na^+ dependente de substratos como a glicose e aminoácidos. Nesta região também podem ser encontrados os canais de cloreto que podem ser ativados por sistemas enzimáticos específicos, bem como os sistemas de antiporte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Já na região basolateral do mesmo enterócito, encontram-se, por exemplo, os mecanismos de co-transporte eletroneutro de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$; como também as bombas ATPásicas de Na^+/K^+ , e os mecanismos de co-transporte de Na^+/Cl^- , etc (Field e cols, 1989).

Com uma observação atenta ao circuito elétrico equivalente, verifica-se ainda, que a tensão transepitelial “ V_{Te} ”; é equivalente a tensão resultante entre os pontos “a” e “b” do circuito; portanto, pela aplicação das leis de Kirchoff, para a obtenção de relações entre tensões, correntes e impedâncias num circuito elétrico, Torres, (2002), encontrou a seguinte relação:

$$V_{\text{ab}} = [\mathbf{R}_{\text{te}} (\mathbf{E}_{\text{A}} - \mathbf{E}_{\text{B}})] / \mathbf{R}_{\text{A}} + \mathbf{R}_{\text{B}} + \mathbf{R}_{\text{te}} = V_{\text{te}}$$

Assim, verifica-se que este sistema funciona baseado numa espécie de lei de compensação; onde se pode perceber, que a simples entrada de íons Na^+ , por via direta ou por um mecanismo de co-transporte eletroneutro, provocará a despolarização da membrana próximo à região apical. Após algum tempo, estes mesmos íons, agora na região basolateral, estarão sendo transportados para fora da célula por um mecanismo eletrogênico, ativo; sendo que a concomitante entrada passiva de íons K^+ , fará com que a membrana permaneça numa condição mais hiperpolarizada em relação à região apical do mesmo enterócito. Desta forma, a diferença $E_{\text{A}} - E_{\text{B}} > 0$, ou seja, haveria um potencial diferencial entre estas duas regiões do enterócito.

Mas, é interessante notar que para cada íons de Na^+ que entra no enterócito por este processo, deixa uma carga relativa (negativa) na região luminal. Logo, a fim de se eliminar

este acúmulo de cargas na região luminal, o sistema procura deslocar íons de Cl^- para contrabalancear.

Considerando-se agora que a entrada de íons de Na^+ pela região apical, não pode vir acompanhada pela entrada de íons Cl^- da região luminal; uma vez que o potencial de membrana na região e os mecanismos disponíveis são desfavoráveis a este processo; este íon deve então atingir os interstícios celulares, via junção compacta, ou melhor dizendo, via paracelular, desde que esta região não ofereça resistência a este processo. Desta forma, forma-se uma corrente transepitelial “Ite” que numa situação normal, esta estará presente, até que os potenciais se equilibrem.

Um outro aspecto a ser citado sobre as junções firmes, é que quinases associadas às subunidades RhoA, RhoB e RhoC, todas participantes do processo de hidrólise de GTP, no complexo de ativação da proteína G; participam dos mecanismos associados à formação da estrutura das vilosidades em diferentes tipos de tecidos (Oshiro e cols, 1997). Evidências também apontam para que estas proteínas participem da organização da estrutura filamentosa do esqueleto de actina que transpassa uma grande quantidade de tipos celulares (Ridley 1998, Saha, e cols., 2001).

Hasegawa e cols. (1998), trabalhando com células (Madin-Darby) de rim de cão, verificaram que a presença de um receptor denominado de $\text{EP3}\beta$ para prostaglandinas, podia modificar as condições de permeabilidade paracelular mediante a ativação de proteínas do tipo Rho.

É importante assinalar que a ativação da proteína do tipo RhoA normalmente aumenta a resistência transepitelial (Fujita e cols, 1999); uma vez que esta proteína relaciona-se com o sistema que controla a sinalização de processos requeridos para a reorganização do citoesqueleto (Sahai, e cols, 1997). Em outras palavras, proteína RhoA regula a permeabilidade das junções compactas (Fujita e cols, 2000).

Walsh e cols, (2001), verificaram que uma proteína do tipo Rho quinase (Rock), participava da regulação das junções compactas, em modelo experimental envolvendo cultura de células Intestinais T84. Verificaram também que a Inibição da quinase do tipo Rock induz reorganização de fibras de actina apical e aumenta a permeabilidade paracelular. A diminuição dos níveis de Ca^{++} bloqueia Rock e interfere na permeabilidade regulada pelas junções compactas. Trischitta e cols., (2001), trabalhando com intestino

médio de aves, verificou que a aplicação de verapamil, um bloqueador de canais de Ca^{++} , ou do composto TMB-8 (3,4,5- trimethoxybenzoic acid 8 – (diethylamina) acetyl éster (hidrochloride)), que é um composto que bloqueiam os estoques de Ca^{++} intracelulares; reduz a resistência transepitelial, interferindo na permeabilidade paracelular.

Cox e cols, (2001), trabalhando com monocamadas de células intestinais do tipo Caco-2, verificaram que uma proteína elaborada à partir de *Vibrio cholerae* - Zot (zona occludens toxin); podia aumentar a permeabilidade das junções compactas, de forma reversível.

Simonovic e cols, (2001), demonstraram que a presença de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica induzia fosforização de proteínas de regulação do tipo “ezrin”, interferindo nos mecanismos de regulação da permeabilidade em junções compactas. Nas formas mutantes de ezrin, esta atividade não se caracteriza, embora a proteína fique fosforilada em presenças de enterotoxinas bacterianas.

Em cultura de células renais do tipo LLC-PK1, foi verificado que TNF, uma citocina pro-inflamatória, podia diminuir a resistência transepitelial, com conseqüente aumento da permeabilidade paracelular (Marano, e cols., 1993).

Hoje, sabe-se que TNF pode induzir um aumento da polimerização de fibras de actina e modificações espaciais nos arranjos das caderinas (Mitic, e cols., 2000; Nusrat e cols., 2000). TNF também pode estar associado à inibição da expressão de proteínas do tipo ocludinas, mas não de proteínas do tipo ZO-1 em astrócitos cerebrais de camundongos (Wojciak, cols, 1998, Wong, e cols, 1999; Poritz e cols., 2001).

Schmitz e cols., (1999), mostrou que em cultura de células intestinais do tipo HT29 e Caco-2, TNF induzia diminuição da resistência transepitelial.(

Gitter e cols., (2000), trabalhando com monocamadas de colônias de enterócitos HT-29/B6, verificaram que a presença de TNF diminuía o número de junções compactas nestas preparações, como também podiam ser identificados os sinais decorrentes do acionamento do mecanismo de apoptose celular.

Heyman & Desjeux (2000), revisando registros sobre a ocorrência de casos de intoxicação alimentar e alergias associadas à determinados tipos de alimentos, perante as alterações funcionais no trato gastroentérico; revelaram que a presença de $\text{TNF}\alpha$,

decorrente de uma resposta inflamatória associada, aumentava a permeabilidade paracelular e a presença de $\text{INF}\gamma$ aumentava a taxa de transcitose.

Usami e cols., (2001), revelaram que produtos oriundos da via do ácido araquidônico podiam controlar a permeabilidade intestinal em monocamadas de células Ca-co-2.

Huang e cols., (2001), demonstraram que corticosteróide podia retardar a maturação de junções compactas em astrócitos do cérebro de carneiro, e com isso interferir no efeito de capilaridade, neste tipo de tecido.

A exposição de monocamadas de células do tipo Ca-co-2 à 1000u/ml de interferon-gama ($\text{IFN}\gamma$), por seis dias, aumentou a expressão de óxido nítrico sintetase - iNOS, e também a permeabilidade transepitelial. O uso de bloqueadores específicos para iNOS, não reduziram a permeabilidade das monocamada estimuladas, mas substâncias destruidoras de NO, conseguiram reduzir a permeabilidade nestas preparações Satake e cols (2001).

Nishiyama e cols, (2001), trabalhando com cultura de células epiteliais humanas do tipo T-84, assinalaram que a interleucina IL15 era capaz de regular a formação de junções do tipo compacta; e que esta regulação dependia da ativação de receptores para $\text{IL}2\text{R}\beta$, que estariam controlando os sinais para o recrutamento de claudinas 1 e 2, hiperfosforilação de ocludinas, como também de ZO1 e 2, além de outros complexos protéicos associados às junções compactas.

Gassler e cols. (2001), assinalaram que processos inflamatórios instalados no trato gastroentérico contribuem para alterar funcionalmente proteínas que compõe as denominadas junções compactas, principalmente as caderinas, contribuindo, assim, para o aumento da permeabilidade transepitelial.

Uma enterotoxina isolada de *Clostridium perfringens*, quando aplicada em preparações de células do tipo CaCo-2, podia interferir na formação de junções do tipo compacta, aumentando a permeabilidade paracelular; contribuindo assim, para a formação de doenças diarréicas (Singh, e cols, 2001).

Sakisaka e cols., (2001), estudando a disposição das junções compactas em células do trato biliar em duas situações patológicas: doenças hepáticas colestáticas crônica e esclerose colangitis, verificaram que apesar do aumento da permeabilidade paracelular,

observado nos dois casos, que as alterações estruturais nas junções compactas diferiram significativamente.

Nusrat e cols. (2001), trabalhando com culturas de células do epitélio intestinal, verificaram que toxina A e Toxina B de *Clostridium difficile*, tornava inativa a proteína Rho, do complexo de GTPases, envolvidas com os mecanismos de regulação de junções firmes, uma vez que estas toxinas seriam na verdade, formações moleculares do tipo UDP-glucosiltransferases.

Evidências apontam que muitas citocinas podem estar envolvidas com os mecanismos que regulam as atividades fisiológicas das junções firmes, entre estas IL1, IL4, IL10, e TGF α (Huang, e cols., 1993; Gautam, e cols., 1998; Nusrat, e cols., 2000).

Frente a tudo que foi dito acima, pode-se dizer que os processos de regulação da permeabilidade transcelular e transepitelial conservam em seus mecanismos uma complexidade intrínseca, uma vez que os seus parâmetros funcionais estariam sob a anuência dos padrões de atividade de diferentes sistemas moleculares, destacando-se entre estes, os sistemas enzimáticos locais, os mediadores pró-inflamatórios e os derivados da cascata do ácido araquidônico.

1.7.Os canais apicais de cloreto

1.7.1.Modulação dos canais apicais de cloreto

Varias evidências apontam para a existência de canais de íons cloreto, localizados na região apical dos enterócitos (Field, 1971a, Chappe e cols. 1998; Mohammad – panah, e cols, 2001).

Como também vários trabalhos têm assinalado uma possível relação entre a inibição de fosfodiesterases com teofilina, por exemplo, e o aumento dos níveis de cAMP ou de cGMP, induzindo em consequência, a secreção de íons cloreto (Field, 1971; Chappe e cols, 1998; Cermak, 1998). Experimentos com monocamadas de células T84 e enterotoxinas de *Escherichia coli*; forma termo-estável e forma termo-lábil, as quais estimulam respectivamente a guanilato-ciclase e a adenil-ciclase, promovem o efluxo de íons Cl⁻, a partir da participação de canais de cloro apical (Forte e cols, 1992).

Evidências assinalam que este efluxo de cloreto apical é geralmente compensado por um influxo de cloro na região basolateral, promovido por um mecanismo de co-transporte eletro-neutro, o $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$, que por conta desta eletroneutralidade, esta desacoplado do potencial elétrico da célula; porém, função das razões das concentrações dos íons envolvidos. Este co-transportador basolateral foi bloqueado pelo diurético furosemida (Dharmasathaphorn e cols, 1985; Field, e cols. 1989; O'Grady e cols (1987).

Geralmente o abundante aporte de Cl^- ao ambiente luminal da cripta reduz a eletroneutralidade deste espaço, cuja correção será mediada pela difusão de Na^+ pela via paracelular, com conseqüente secreção de água para o ajuste da osmolaridade.

Toxina da cólera também pode estimular um aumento intracelular de cAMP e como conseqüência uma secreção de íons cloreto aumentada, devido a ativação das Kinases do tipo A pelo cAMP e inibição (fosforila serinas ou treoninas dos canais apicais de cloro das células da cripta) e inibição do co-transporte Na^+/Cl^- nas células dos vilos (Musch, e cols, 1987; Sears, 2000).

1.7.2. Teoria fractal na avaliação da modulação dos canais apicais de cloreto

A medida em que se adentra no universo molecular dos sistemas biológicos, mais se percebe que os mecanismos atrelados a estes processos são multifatoriais; ou seja, a função biológica parece ser uma conseqüência da participação integrada de vários sistemas bioquímicos, cujos produtos iteram sob constantes cinéticas próprias, concorrendo para um objetivo funcional comum (Liebovitch, 1989). Mas isto, de certa forma, tem gerado alguns problemas; quando se procura descrever um fenômeno biológico, através de um modelo teórico; uma vez que nem sempre os seus resultados são bem descritos pelos procedimentos matemáticos convencionais, tais como os sistemas de equações lineares, medidas de tendência central, entre tantas outras possibilidades (Feder, 1988).

Liebovitch e Sullivan (1987), observando a cinética de abertura e fechamento de canais de potássio, em endotélio da córnea de coelho, por intermédio da técnica de Patch Clamp; verificaram que a constante cinética deste mecanismo dependia da resolução da

escala temporal empregada para registro dos sinais elétricos. Posteriormente verificaram, que os seus resultados não podiam ser descritos por um modelo markoviano convencional. Em outras palavras, isto significava dizer, que as taxas de transição entre os estados de abertura e fechamento do canal de potássio não eram constantes.

Estudos posteriores, ainda sobre a cinética de abertura e fechamento dos canais de potássio, revelaram que este mecanismo podia ser melhor descrito por um modelo matemático construído segundo a teoria dos fractais (Liebovitch, 1989).

Toib e cols. (1998) verificaram que a relação entre o tempo de atividade de canais de Na⁺ de baixa inativação do cérebro de mamíferos, frente ao tempo de duração dos procedimentos de registro não era constante; sendo os seus resultados melhor descritos também descritos por um modelo fractal.

A teoria dos fractais foi proposta por Mandelbrot (1983), como resultado de suas observações sobre a ocorrência de ruídos na transmissão de sinais telefônicos. Geralmente, Mandelbrot assinala que a maneira mais simples de se conceber o conceito de “Fractal”, seria avaliando a relação das medidas de comprimentos de litorais e fronteiras de territórios e países. As linhas descritas por uma fronteira ou litoral, geralmente, têm propriedades diferentes daquelas observadas nas medidas de objetos descritos no universo Euclidiano; A diferença entre a medida do comprimento de uma linha que descreve a extensão de um litoral qualquer e uma reta, reside no fato de que o comprimento de uma reta independe da unidade de escala utilizada para efetuar a medida; enquanto a linha que descreve a extensão do litoral é dependente da unidade de escala empregada na sua media. Ou seja, quanto menor e mais delgada for a unidade de escala de um mapa, mais detalhes serão revelados, de maneira que o comprimento “L“ dependerá da escala “E” empregada ara efetuar as medidas; sendo a relação entre os parâmetros L e E descrita por uma equação do tipo:

$$L = A \cdot E^{De - D}$$

onde, “A” é uma constante de proporcionalidade “De” a dimensão euclidiana do objeto a ser medido e “D” é a dimensão fractal.

A dimensão euclidiana sempre assume um valor numérico inteiro, sendo igual a um, dois ou três, em se tratando de linhas, superfícies ou volumes. Já a dimensão fractal pode

assumir valores fracionários, como $D = 1,25$ para as medidas de extensão do litoral da Costa da Bretanha (Mandelbrot, 1967). É importante assinalar que a porção fracionada relaciona-se com a extensão das irregularidades do objeto a ser medido.

Estes estudos, somados aos esforços de tantos outros pesquisadores (Horsfield & Cummings, 1967; Vauculeurs, 1970; Voss, 1992), fomentaram as bases conceituais para o emprego da teoria dos fractais na resolução de diferentes problemas na área biológica (Liebovitch, 1990).

Os objetos ou fenômenos fractais apresentam propriedades características, como a autossimilaridade e autoafinidade (Feder, 1988).

A auto-similaridade configura a condição de que mesmo que se varie a escala de medida de um objeto ou o fenômeno descrito pela teoria dos fractais, preservam-se as suas características topográficas fundamentais, embora numa extensão fenomenológica diferente (Feder, 1988).

A autoafinidade relaciona-se com a correlação de medidas efetuadas em unidades de escalas diminutas contra medidas efetuadas em unidades de escala maiores (Schepers, e cols, 1992).

Acessar um objeto fractal, muitas vezes não é tarefa fácil; por isso, muitas vezes, tem-se que utilizar ferramentas matemáticas e estatísticas um pouco diferentes daquelas que habitualmente se empregam nos trabalhos.

Um destes procedimentos é o que se poderia denominar de Análise R/S de Hurst (Feder, 1989). Este método, na verdade, procura estabelecer uma espécie de correlação entre medidas em séries temporais, efetuadas em diferentes escalas de tempo. Se os dados configurarem um fenômeno ou um objeto fractal, as medidas efetuadas em pequenas escalas temporais estarão correlacionadas com medidas efetuadas em grandes escalas temporais.

Portanto, o principal parâmetro obtido por este procedimento de análise, o coeficiente “H” de Hurst, só poderá variar entre zero e um. Se $H = 0,5$, o fenômeno será dito aleatório, uma vez que não se obteve uma correlação entre as medidas efetuadas em pequenas escalas temporais, para com aquelas em escalas maiores. Alguns pesquisadores atribuem a esta condição a denominação de fenômeno sem memória. Para $0,5 < H < 1$, existiria uma correlação entre as medidas efetuadas em pequenas escalas temporais e

aquelas efetuadas em escalas temporais maiores. Neste caso, seria atribuído ao fenômeno o termo “memória persistente”; ou seja, medidas crescentes em pequenas escalas temporais deveriam ser acompanhadas de medidas crescentes em escalas temporais maiores. Finalmente para $0,5 > H > 0$, existiria uma correlação baixa entre medidas efetuadas em escalas temporais curtas perante aquelas medidas efetuadas em escalas temporais mais longas; neste caso, o termo a ser atribuído seria o de memória antipersistente; uma vez que medidas crescentes em pequenas escalas estariam mais correlacionadas com medidas decrescentes em escalas temporais futuras (Neremberg e Essex, 1990; Varanda e cols., 2000).

Em Schepers e cols. (1992), verifica-se que a constante “H” de Hurst relaciona-se com a dimensão fractal de autoafinidade; de maneira que uma relação matemática do tipo: $D = E + 1 - H$; pode ser efetuada; onde “D” é a dimensão fractal do fenômeno, “E” seria a dimensão Euclidiana onde o fenômeno se realiza e “H” o coeficiente de Hurst. Pode-se verificar facilmente que se H for igual a zero ou igual a um, $D = E$ ou $D = E + 1$; em ambos os casos, não haveria um fenômeno fractal; uma vez a dimensão “D” seria igual ou proporcional a dimensão Euclidiana “E”. Mas, se a constante “H” for diferente de zero ou um; aí sim, teríamos a possibilidade do fenômeno poder vir a ser descrito por um modelo matemático não linear, bem provavelmente, um modelo fractal.

A análise R/S de Hurst, desde a sua proposição, tem sido empregada com sucesso em diferentes tipos de estudos que compreendem desde a avaliação do movimento de células de mamíferos em diferentes meios de cultura (Giaever & Keese 1989); até estudos de cinética de canais de potássio ativados por cálcio, em preparações de células de Leydig, em, Patch Clamp System (Liebovitch & Sullivan, 1987; Carnio & Varanda; 1995, Varanda, 2000).

Frente ao que foi dito acima, espera-se com a análise R/S de Hurst verificar se os efeitos eletrogênicos em preparações de membrana de íleo de coelho, sob a ação do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR de *Microcystis aeruginosa*, são decorrentes de um processo aleatório; onde configuraria um quadro de destruição dos prováveis mecanismos de regulação iônica ao nível da mucosa; ou se os processos cinéticos ao nível da mucosa estariam atrelados a uma mudança radical nos parâmetros de regulação da permeabilidade transmembrana e transepitelial, devido a presença do provável fator de

secreção intestinal liberado a partir de macrófagos estimulados com microcistina-LR. Como será visto a seguir, a análise R/S de Hurst empregada nos dados do presente trabalho, proporcionou a obtenção de resultados interessantes.

1.8. Justificativa

Como foi visto acima, as doenças diarréicas assolam em diferentes regiões do planeta, configurando-se num grave problema para as sociedades subdesenvolvidas ou em desenvolvimento, em decorrência de afetarem, com severidade, grande parcela da população, principalmente crianças (Lima, e cols, 1992, 2000; Guerrant, e cols, 2001). Geralmente, os agravos orgânicos se acentuam, quando os pacientes estão inseridos num quadro de desnutrição (Lima, e cols., (2000).

Verificou-se também que concentrações de cianobactérias podem ser encontradas nos reservatórios de água para consumo, sendo que alguns destes microrganismos podem liberar quantidades significativas de toxinas, que, por sua vez, podem contaminar organismos que se utilizarem destas águas, apresentando sérios problemas de saúde (Carmichael & Falconer, 1993).

Relatos apontam a *Microcystis aeruginosa* como o microrganismo mais abundante nos reservatórios de água das áreas urbanas, sendo a microcistina-LR uma potente toxina, capaz de proporcionar graves lesões hepáticas (Hermansky, e cols, 1993; Lambert, e cols, 1994), gastroenterites (Yu, 1989 Watanabe, 1996), além de outras enfermidades (Radbergh e cols, 1991).

O incidente de Caruaru, Cidade do Estado de Pernambuco, ganhou notoriedade; em decorrência do número de óbitos entre os pacientes de uma clínica de hemodiálise, que continha uma concentração significativa de *Microcystis aeruginosa* no reservatório de água da mesma (Jochimsen, e cols, 1998).

A ocorrência de gastroenterite em decorrência do consumo de água contendo concentrações significativas de *Microcystis aeruginosa* também é frequente; sendo o relatado de Teixeira e cols., (1993), um dos mais significativos, devido ao montante de 82 casos de óbito em quatro meses na região de Paulo Afonso, Estado da Bahia.

Mas, considerando-se os dados obtidos por Rocha e cols. (2000); que verificaram a ocorrência de um potente efeito secretório em preparações e tecido ileal de coelho, montadas em câmaras de Üssing; mediante a aplicação de sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR de *Microcystis aeruginosa*; observa-se que mesmo em doses subletais desta toxina, alguns sistemas emitem respostas diretas, ou mesmo indiretas, com a participação de mediadores pró-inflamatórios, por exemplo; podendo o organismo modificar os parâmetros funcionais do seu metabolismo, para uma condição não favorável.

Não seria este um dos motivos pelos quais crianças, que vivem em regiões paupérrimas; submetidas a todo tipo de interação com agentes contaminantes, apresentam um acentuado estado de desnutrição além de um desenvolvimento orgânico deficitário? É curioso o fato de que tão poucos trabalhos tenham abordado esta questão acima, como também tentado identificar os mecanismos fisiológicos atrelados à resposta secretora intestinal induzida pelas toxinas de uma cianobactéria tão importante. Justifica-se, portanto a realização do presente trabalho; que parte da hipótese de que os efeitos indiretos proporcionados pela microcistina-LR de *Microcystis aeruginosa* sobre macrófagos, gerando atividade secretora intestinal em preparações de tecido ileal montadas em câmaras de Üssing, modificavam as condições de permeabilidade das junções compactas, conseqüentemente diminuindo a resistência transepitelial e aumentando o transporte paracelular, mediante a participação de diferentes mediadores, incluindo as prostaglandinas.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Com o presente trabalho procurou-se determinar a intensidade do efeito secretório proporcionado pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por microcistina-LR de *Microcystis aeruginosa*; avaliando-se a participação de mediadores, tanto na produção do fator de secreção, como na elicitação do efeito secretório. Um dimensionamento das alterações na resistência transepitelial e a influência disto na permeabilidade paracelular também foi objeto deste estudo, como também a caracterização das alterações eletrogênicas quanto a intensidade do fator aleatoriedade associado ao processo, mediante o emprego da análise R/S de Hurst.

Objetivos específicos:

Neste trabalho, teve-se como pretensão:

1. Determinar a intensidade do efeito secretório em preparações de íleo de coelho, montadas em câmaras de Üssing, mediante o emprego do sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-lr de *Microcystis aeruginosa* (MCLR);
2. Investigar a participação de proteína G na síntese do(s) possível(eis) fator(es) de secreção intestinal presente(s) neste material biológico;
3. Avaliar o efeito de diferentes bloqueadores farmacológicos na produção do(s) referido(s) fator(es) oriundo(s) das culturas de macrófagos estimulados com MCLR;
4. Estabelecer uma relação de dose-efeito pertinente aos efeitos secretórios proporcionados pela ação indireta de MCLR sobre o tecido animal;
5. Identificar o(s) fator(es) de secreção intestinal presente(s) no sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR;
6. Determinar o mecanismo de ação desse(s) fatores na mucosa ileal de coelho, em câmaras de Üssing;

7. Estabelecer uma relação entre as taxas de liberação das interleucinas TNF α e IL-1 β por micocistina-LR de *Microcystis aeruginosa*;
8. Caracterizar os efeitos eletrogênicos associados com a variação da corrente de curto-circuito e resistência transepitelial mediante avaliação do coeficiente de Hurst e da dimensão fractal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

3.1.1. Ratos

Neste trabalho foram utilizados ratos da variedade Wistar, *Ratus norvegicus*, de ambos os sexos, pesando cerca de 180 - 200g; obtidos à partir de cepas do Biotério Central da Unidade de Pesquisas Clínicas & Instituto de Biomedicina (UPC – IBIMED) da Universidade Federal do Ceará. Estes animais eram mantidos sob condições normais de laboratório, sob temperatura ambiente, com ciclo de luminosidade natural; nutridos com comercial e água *ad libitum*.

3.1.2. Coelhos

Coelhos albinos, da variedade Nova Zelândia, de ambos os sexos, pesando de 1,5 a 2,7 Kg, eram obtidos à partir do criatório da Universidade Federal do Ceará, localizado no Campus do PICI. Estes animais eram também mantidos sob condições normais de laboratório, com ciclo de luminosidade natural, nutridos com ração comercial e água “ad libitum”.

3.2. Toxinas

Microcistina-LR de *Microcystis aeruginosa* (C₄₉H₇₄N₁₀O₁₂), com peso molecular de 995,2da, purificada (~ 95%), mediante cromatografia líquida de grande performance (Honkanen, e cols., 1990), e comercialmente, adquirida da Sigma Chemical Company: (St. Louis, MO, USA).

As toxinas ativa e mutante da *Bordetella pertussis* foram doadas pelo Dr. E. L. Hewlett (Universidade da Virgínia, VA – USA). A toxina pertussis ativa e a toxina

pertussis mutante foram purificadas (~ 96%), a partir de preparações de meio de cultura com *Bordetella Pertussis* identificadas, respectivamente, pelas referências 165 e 165-9K/129G. Estas preparações foram obtidas mediante cromatografia com o emprego de hidroxiapatita e cromatografia de afinidade com fetuína (Pizza e cols, 1989).

As toxinas A e B de *Clostridium difficile* foram gentilmente cedidas pelo Dr. David M. Lysterly (TECLAB, VA-USA). É interessante mencionar que, estas toxinas foram obtidas à partir da linhagem “VPI strain 10463”, onde eram mantidas, anaerobicamente em recipientes apropriados, contendo infusão de caldo de cérebro-coração, de acordo com o método pré-estabelecido (Lysterly e cols., 1982; Sullivan e cols., 1982). A purificação das toxinas A e B foi realizada por precipitação em sulfato de amônio, através de cromatografia de troca iônica em coluna de dietilaminoetil sefarose e cromatografia de imunoafinidade. A homogeneidade dessas toxinas foi demonstrada por imunoeletroforese cruzada e eletroforese de gel de poliacrilamida (Lysterly e cols., 1982).

3.3. Drogas

As substâncias fluoreto de fenilmetilsulfonil, indometacina, quinacrina, ácido nordihidroguaiarcético (NDGA), pentoxifilina, cicloheximida, inibidor de tripsina, meio de cultura do tipo RPMI 1640, anticorpos monoclonais anti-IL-1 α e anti -IL-1 β , IL-1 β , tetrodotoxina e azul de tripan foram adquiridos da Empresa Sigma (St. Louis, MO, USA). O IL-1-ra, tioglicolato, talidomida, dexametasona, MK 886 e bumetanida foram adquiridos por sua vez junto à Bachem Bioscience Inc. (King of Prússia, PA, USA), Difco (Detroit, MI, USA), ICN Biomedical Inc. (Aurora, OH, USA), Merck Sharp & Dohme (São Paulo, SP, Brasil) Merck Sharp & Dohme (NJ, USA) e Sintofarma (São Paulo, SP, Brasil), respectivamente.

3.4. Soluções e Meio de cultura

Nas tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 pode-se verificar a composição das soluções e meio de cultura empregados ao longo do desenvolvimento dos protocolos experimentais, destacando-se também a massa empregada e o fornecedor, conforme o volume de solução empregado.

Tabela 1. Meio de Cultura RPMI

Composição	Massa (g)	Volume (l)	Fornecedor
RPMI	10,400	-	^a Sigma
Bicarbonato de Sódio	2,200	-	^b Gibco
Tampão Hepes	2,381	-	^a Sigma
Água deionizada	-	1,000	-

*O pH foi corrigido para 7,4

^aSigma: St. Louis, MO, USA; ^bGibco: Gaithersburg, MD, USA

Tabela 2. Solução de tioglicolato a 3%

Composição	Massa (g)	Volume (l)	Fornecedor
Meio tioglicolato desidratado	3,00	-	^a Difco
Água deionizada	-	0,100	-

*O pH foi ajustado para 7,4

^aDifco: Detroit, MI, USA

Tabela 3. Solução salina tamponada com fosfato (PBS)

Composição	Massa (g)	Volume (l)	Fornecedor
Cloreto de sódio	8,00	-	^a Reagem
Cloreto de potássio	0,20	-	^a Reagem
Fosfato de sódio dibásico	1,15	-	^b Fisher
Fosfato de sódio monobásico	0,20	-	^a Reagem
Água destilada	-	1,000	-

*O pH foi ajustado para 7,4

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

Tabela 4. Composição da solução de Ringer para mamíferos.

Composição	Concentração (mEq/l)	Fornecedor
Na ⁺	145,00	^a Sigma
K ⁺	4,60	^a Sigma
Ca ⁺⁺	3,40	^a Sigma
Mg ⁺⁺	0,80	^a Sigma
Cl ⁻	119,00	^a Sigma
HCO ₃ ⁻	25,00	^a Sigma
SO ₄ ⁻	0,80	^a Sigma

*O pH foi ajustado para 7,4

^aSigma: St. Louis, MO, USA

3.5. Cultura de macrófagos

3.5.1. Obtenção dos macrófagos

Tomando-se como referência a metodologia descrita em Ribeiro e cols, 1991, verificou-se que os macrófagos podiam ser obtidos da cavidade peritoneal de ratos, que recebiam, 4 dias antes, 10 ml de solução de tioglicolato a 3,0 %, intraperitonealmente. Para a coleta dos macrófagos, os ratos eram sacrificados com éter etílico e imediatamente recebiam, por via intraperitoneal, 10 ml de meio de cultura RPMI, contendo heparina na proporção de 0,1 ml de heparina / 100 ml de meio de cultura. Após uma rápida e leve massagem na região ventral do animal, era providenciada a retirada de cerca de 70 % do volume inicialmente injetado, por intermédio da utilização de seringas estéreis de 10 ml e agulhas fenestradas de 40x12. O volume do exudato peritoneal colhido, era devidamente acondicionado em tubos do tipo Falcon.

Na Figura 5, que vem a seguir, pode-se verificar os principais passos associados ao procedimento acima descrito.

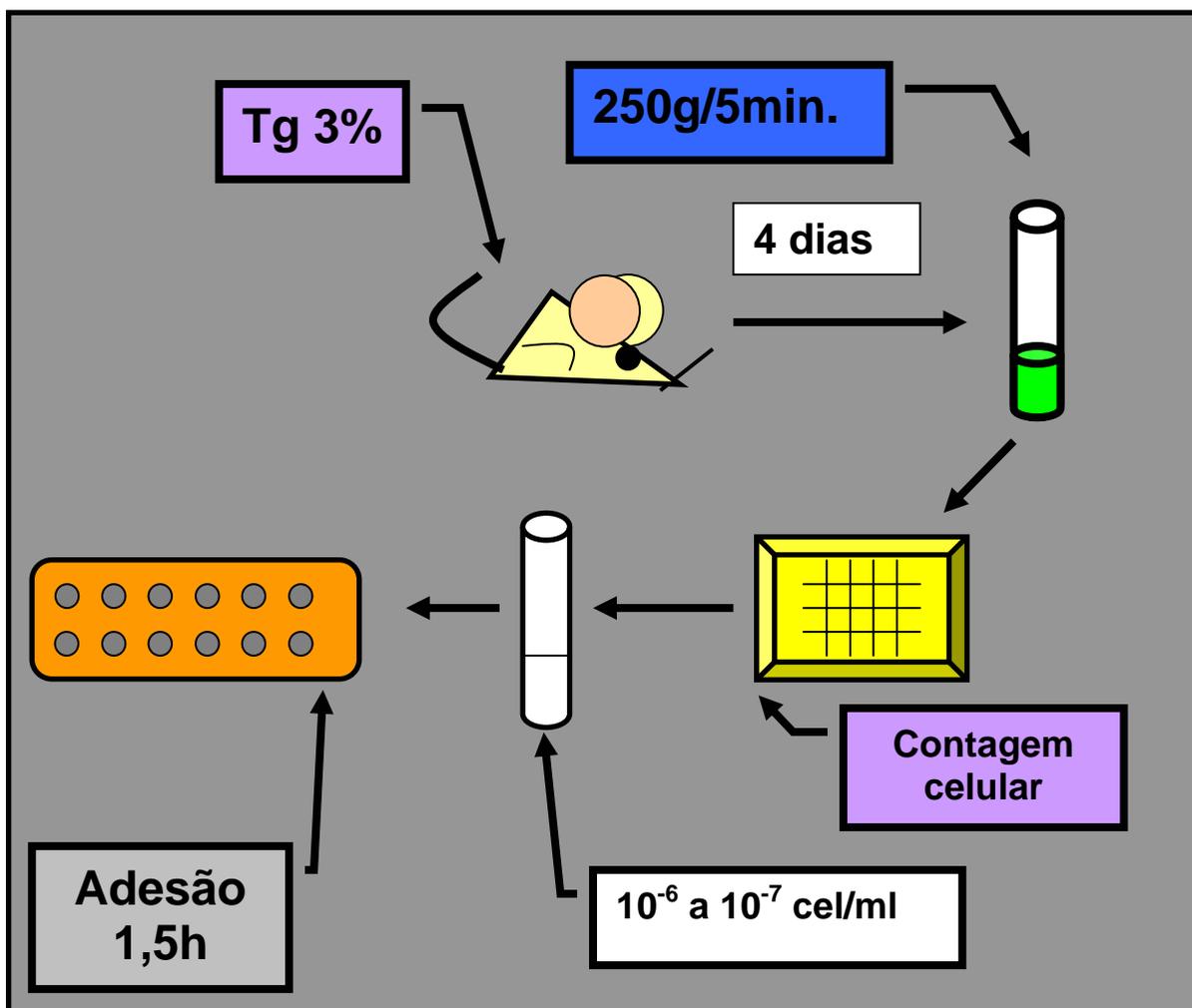


Figura 5. Obtenção de macrófagos em monocamadas. Este diagrama procura assinalar as principais etapas referentes ao processo de obtenção de macrófagos em monocamadas, desde a aplicação de tioglicolato, coleta do exudato peritoneal, ajuste celular e adesão celular.

3.5.2. Manuseio dos macrófagos *in vitro*

A partir da coleta do exsudato peritoneal, as células presentes neste material eram lavadas, duas vezes, por centrifugação a 250g por 5 minutos, em centrífuga refrigerada. Logo em seguida, as células eram ressuspensas em RPMI, de forma a se obter, com base na contagem total em câmaras de Neubauer, uma suspensão celular com 10^6 células/ml.

A seguir essa suspensão era distribuída em placas de 12 poços, em um volume de 2,0 ml por poço, sendo a seguir colocadas para incubação, por um período de uma hora e meia, em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. Espera-se que ao final deste período os macrófagos presentes fiquem aderidos à superfície interna do fundo do poço. Desta forma, o sobrenadante pode ser descartado, e as células remanescentes que ficaram aderidas podem então ser submetidas à três lavagens com meio RPMI.

Os macrófagos aderidos podiam ser estimulados com microcistina-LR durante uma hora. Em seguida, o sobrenadante era prontamente descartado e as monocamadas de macrófagos eram submetidas à nova lavagem, por três vezes. A seguir adicionava-se 1,00 ml de meio RPMI, contendo soro fetal bovino a 10%, sem estímulo, por cada poço da placa de cultura, e duas horas depois o sobrenadante era colhido, centrifugado e imediatamente utilizado para os ensaios em câmaras de Üssing.

No diagrama abaixo, Figura 6, pode-se observar, resumidamente, as principais etapas do processo de obtenção, fixação, estimulação de macrófagos e obtenção de mediadores.

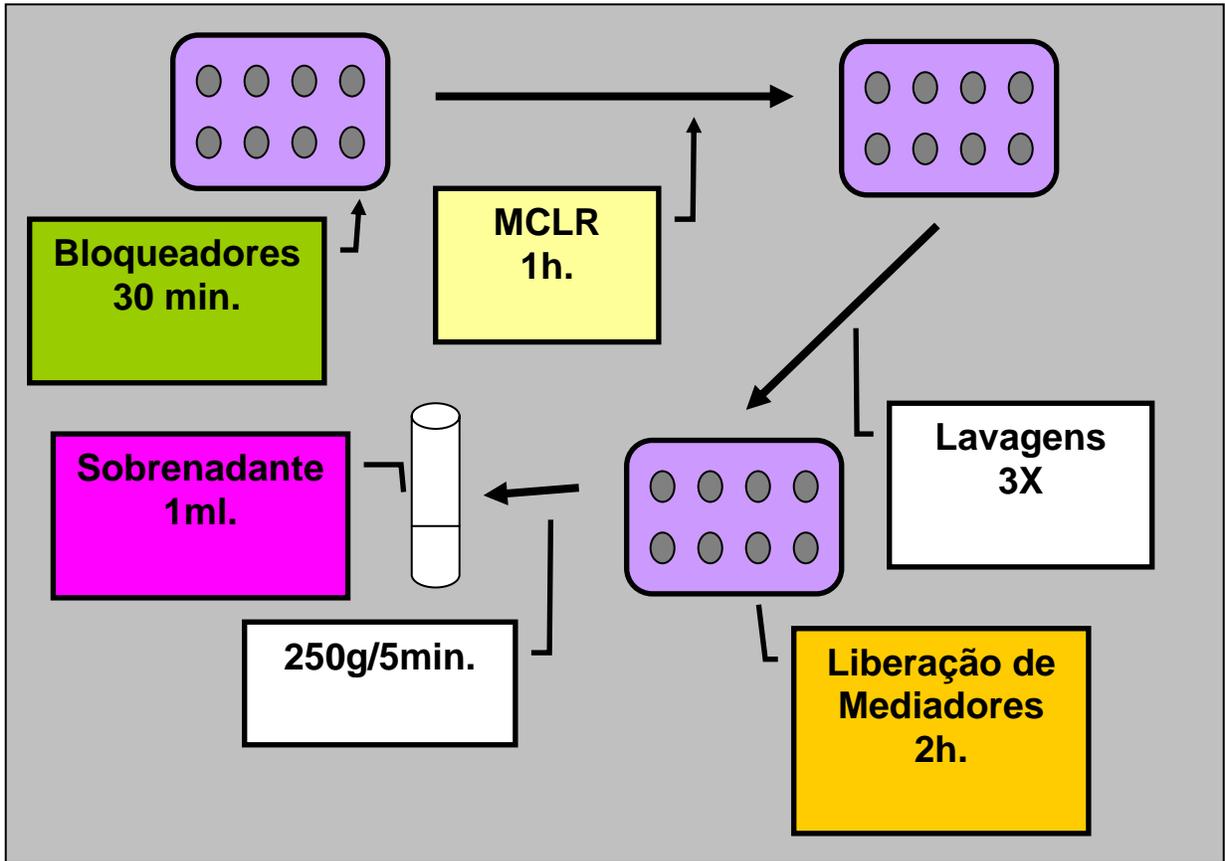


Figura 6: Preparação de monocamadas de macrófagos para obtenção do sobrenadante contendo os mediadores farmacológicos para estudo.

3.5.3. Análise da viabilidade celular

A viabilidade celular era determinada ao final de cada procedimento de cultura de macrófagos. Após a coleta do sobrenadante de cada poço da placa de cultura, o fundo de cada placa era devidamente raspado com bastão de vidro delgado, e ao conteúdo resultante de células despreendidas, adicionava-se em seguida, 200µl de meio RPMI. Após isto, retirava-se desta suspensão um volume de 20µl; que, por sua vez, era adicionado a 5µl do corante azul de tripan, em uma lâmina para microscopia óptica. Com base na morfologia celular e na disposição para impregnação do corante, observavam-se as células com aspecto fluorescente e as coradas em tom azul, considerando-as como viáveis e não viáveis, respectivamente. O percentual de células viáveis em cada lâmina, a cada procedimento, era tomado como melhor estimativa da viabilidade celular em cada placa de cultura.

Na tabela 6, pode-se verificar o percentual de viabilidade celular para cada cultura de macrófagos efetuada conforme a seqüência de protocolos experimentais deste trabalho. Convém assinalar, que o sobrenadante de macrófagos era considerado apropriado aos experimentos, quando o percentual de viabilidade era superior a 80%.

Verifica-se ainda na Tabela 6, conforme cada protocolo, a forma de diluição, concentração molar das drogas e toxinas empregadas. É importante salientar que a partir do protocolo MφS+ MCLR+PMXB; a toxina MCLR foi usada na dose $3,2 \cdot 10^{-6}$ M. Portanto, a partir daí, as doses observadas nesta tabela representam as concentrações dos bloqueadores farmacológicos utilizados em cada experimento.

Tabela 6: Viabilidade de macrófagos, em termos percentuais; à partir dos procedimentos finais de cultura e estimulação.

Protocolo	Diluição	Dose	Viabilidade (%)
MS+RPMI	RPMI	-	98
MS+MCLR	RPMI	$3,2 \cdot 10^{-7}M$	93
MS+MCLR	RPMI	$9,6 \cdot 10^{-7}M$	94
MS+MCLR	RPMI	$3,2 \cdot 10^{-6}M$	91
MS+MCLR+PMXB	PBS	$6,9 \cdot 10^{-5}M$	87
MS+MCLR+TxP	RPMI	$9,5 \cdot 10^{-7}M$	93
MS+MCLR+TxPm	RPMI	$9,5 \cdot 10^{-7}M$	93
MS+MCLR+CHX	PBS	$10^{-5}M$	96
MS+MCLR+I. PROT.	PBS	1mg/ml	97
MS+MCLR+DEXA	RPMI	$10^{-5}M$	98
MS+MCLR+QUINAC	PBS	$10^{-5}M$	98
MS+MCLR+INDO	NaHCO ₃ 5%	$10^{-5}M$	87
MS+MCLR+MK886	Metilcelulose 0,1%	$10^{-5}M$	90
MS+MCLR+NDGA	Etanol	$10^{-5}M$	94
MS+MCLR+NS398	PBS	$10^{-5}M$	98
MS+MCLR+WEB2086	Etanol	$10^{-5}M$	91
MS+MCLR+PTF	DMSO	$5 \cdot 10^{-4}M$	95
MS+MCLR+TALID	DMSO	$1,5 \cdot 10^{-5}M$	96

3.6.Dosagem de citocinas

3.6.1. Ensaio para detecção e dosagem de IL-1 β

Os sobrenadantes foram obtidos de forma análoga à descrita na seção 3.5.2. Contudo, as amostras foram estocadas a -70°C até o uso. A concentração de IL-1 β foi determinada através de um ELISA específico (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; Rat IL-1 β ; Biosource International, Camarillo, Califórnia, USA).

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

Na etapa seguinte, 100 μl de anti-IL-1 β foram adicionados a cada poço e aí permaneceram por 1h, a temperatura ambiente (25°C). Em seguida, as soluções foram desprezadas e os poços novamente lavados, por mais quatro vezes, com a solução tampão. Após este procedimento, 100 μl de estreptavidina-HRP foram distribuídos em cada poço. A placa foi coberta a seguir e deixada por mais um período de 30 min. À temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, essa placa foi esvaziada e lavada de acordo com o método há pouco descrito.

A fase subsequente consistiu na adição de 100 μl de cromógeno a cada poço. Nessa etapa, a placa foi levada à incubação, por 30 min. a temperatura ambiente (25°C), em local escuro. Logo em seguida, 100 μl da solução bloqueadora de reação foram adicionados aos poços. Por fim, a leitura da absorbância foi realizada a 450 nm, sendo os níveis de IL-1 β expressos em picogramas por mililitro (pg/ml).

As curvas referentes ao substrato padrão foram construídas, para cada experimento, de forma análoga aos procedimentos anteriormente descritos. Contudo, inicialmente, foram adicionados aos poços 100 μl dos padrões de IL-1 β nas respectivas concentrações (46,9; 93,7; 187,0; 375,0; 750,0; 1500,0; e 3000,0 pg/ml), em substituição aos sobrenadantes de macrófagos.

Os principais procedimentos referentes à detecção dos níveis de interleucina-1 β , em sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR; desde a fase de diluição até a leitura espectrofotométrica dos produtos finais, podem ser visualizadas na figura 7.

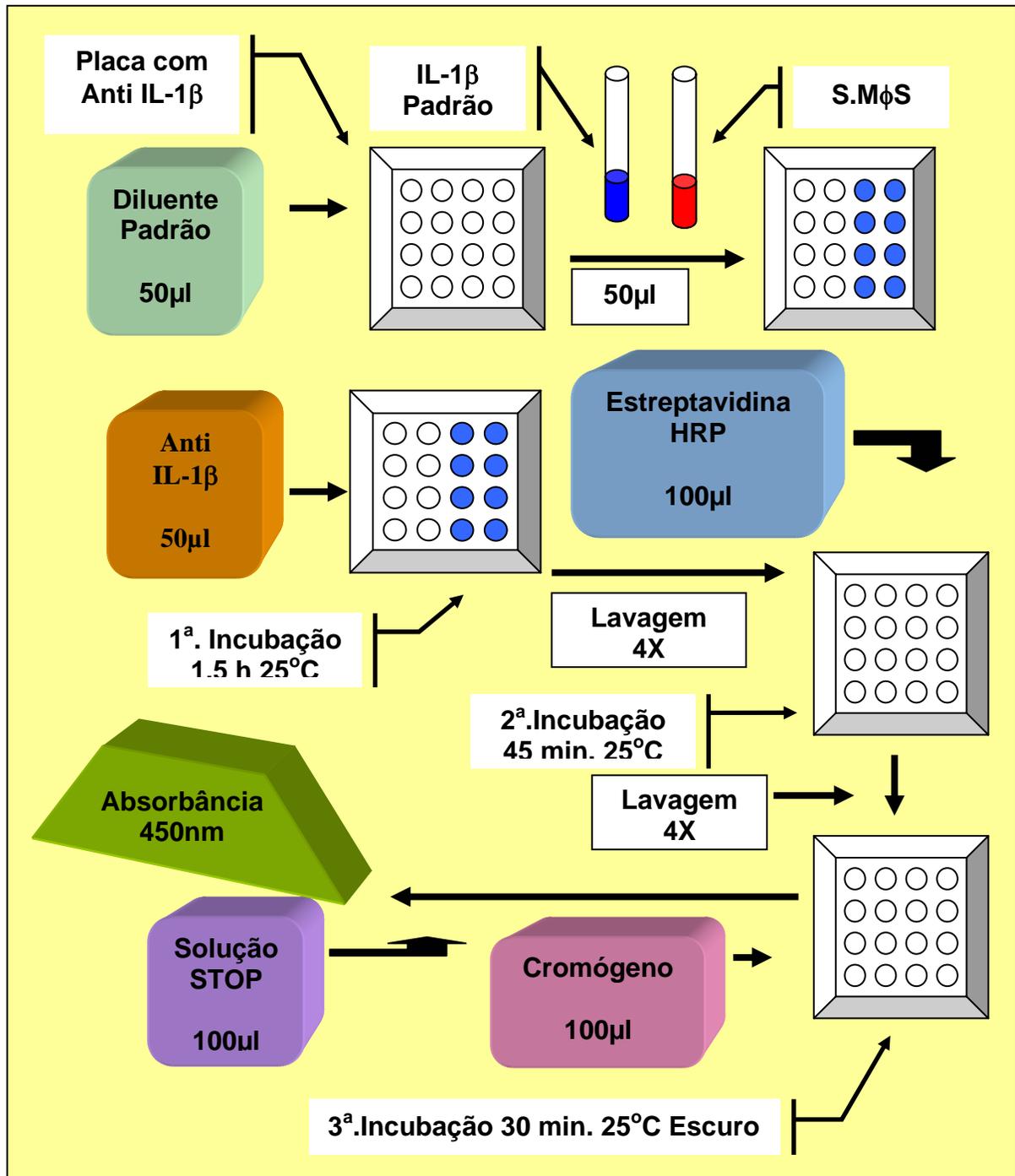


Figura 7. Seqüência resumida de ensaios para detecção de IL-1 β

3.6.2. Ensaio para detecção e dosagem de TNF- α

Os níveis de TNF- α no sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR foram avaliados por meio de um *Kit* para ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), específico para esta citocina (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; Rat TNF- α ; Biosource International, Camarillo, Califórnia, USA).

Inicialmente, eram colocados 50 μ l do diluente padrão em cada poço que, continha um anticorpo específico para TNF- α de rato. A seguir, 50 μ l das amostras, assim como 50 μ l dos padrões, nas respectivas concentrações (15,6; 31,2; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0; e 1000,0 pg/ml), foram distribuídos em cada poço da placa. A etapa subsequente constou da adição de 50 μ l contendo o segundo anticorpo anti- TNF- α . Após este procedimento, a placa foi incubada a temperatura ambiente (25°C), por 1,5 h. Passado esse período, as amostras e padrões foram descartados e os poços lavados, quatro vezes, com uma solução tampão fornecida pelo próprio fabricante.

A seguir, foram distribuídos 100 μ l de estreptavidina-HRP, por poço, e logo em seguida, a placa foi incubada por mais 45 min., a 25°C. Posteriormente, o conteúdo dessa placa foi descartado e repetiu-se o procedimento de lavagem, de acordo com a metodologia descrita.

Por fim, foram adicionados 100 μ l de cromógeno a cada poço e, subsequentemente, a placa foi incubada por 30 min., a temperatura ambiente (25°C), no escuro. Logo após esta etapa, foram adicionados 100 μ l da solução bloqueadora de reação, em cada poço. A leitura da absorbância foi realizada imediatamente, a 450 nm, sendo os níveis de TNF- α expressos em picogramas por ml.

Os principais passos do procedimento acima descrito podem ser visualizados, de forma diagramatizada, na figura 8.

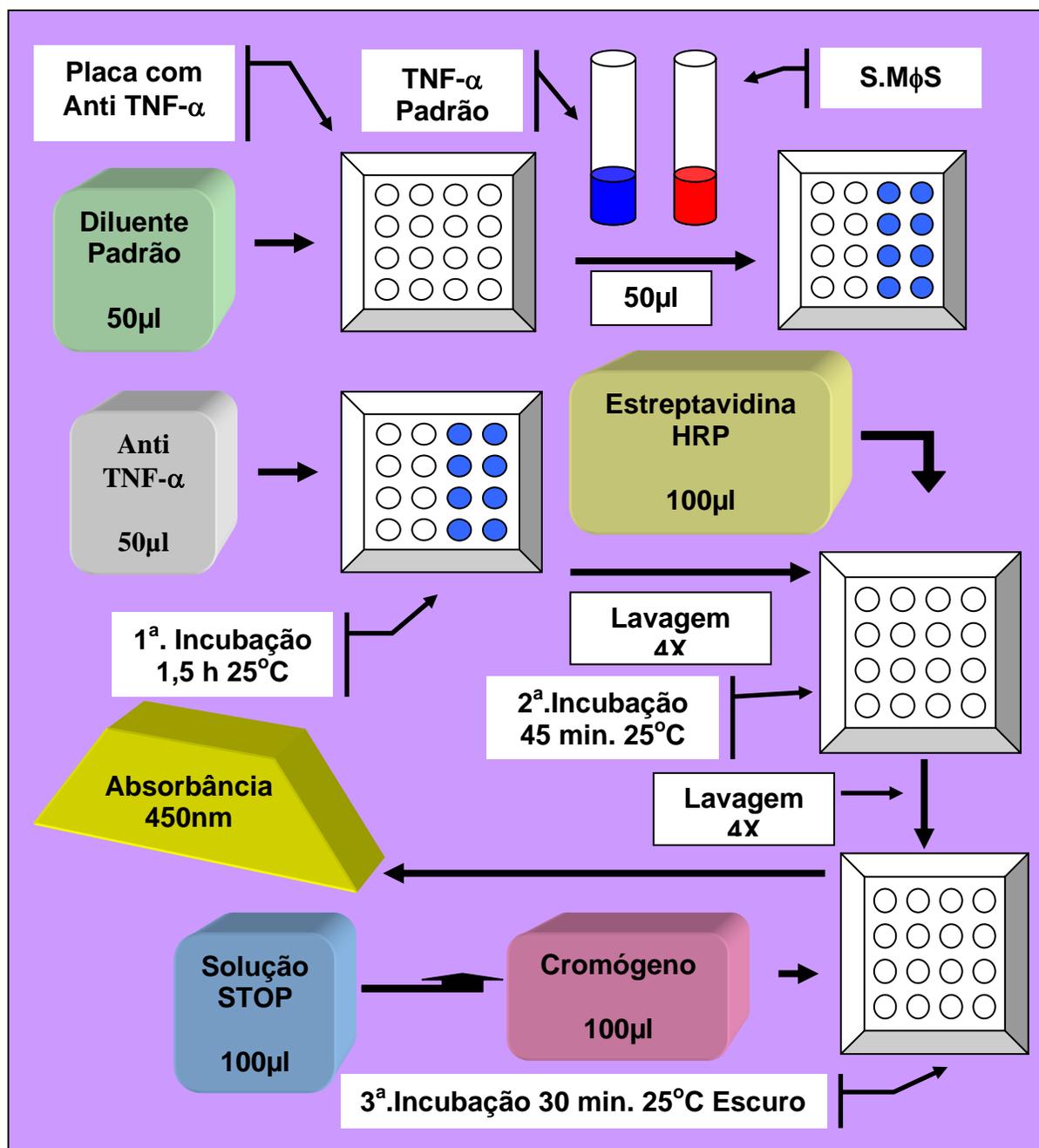


Figura 8. Ensaio para a detecção de TNF- α

3.7.Câmaras de Üssing

3.7.1. Preparo das soluções de perfusão

As soluções empregadas na perfusão das câmaras de Üssing tem por base uma solução de Ringer para mamíferos, idealizada segundo a formulação preconizada por Field e cols., 1971. Os constituintes desta solução podem ser visualizados na Tabela 3. Após adição dos componentes, a solução era saturada por 15 min. com uma mistura carbogênica, contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂, tendo ao final, o pH corrigido para 7,40. Para a perfusão do lado seroso, a solução de Ringer recebia D(+) glicose na concentração de 5 mM (Sigma; St. Louis, MO). Para a solução perfusora do lado mucoso, adicionava-se à solução de Ringer D(+) manitol na concentração de 100 mM (Sigma; St. Louis, MO); (Soares e cols., 1991).

3.7.2.Preparação e fixação do tecido Ileal às câmaras de Üssing

Os coelhos, após um jejum de 24h, eram devidamente sacrificados, tendo em seguida o abdome aberto por incisão na linha mediana. Após rápida exploração abdominal o íleo era identificado, tomando-se como referência a junção ileocecal.

Ainda tomando-se como base a junção ileocecal, 25 cm de íleo distal era seccionado e colocado em solução de Ringer a 4°C. Em seguida, após lavagem da luz do conduto ileal com PBS a 4°C, era introduzida uma pipeta de 10ml, no segmento ileal e, logo após, era feita uma incisão superficial ao longo da margem da linha mesentérica para posterior retirada da camada serosa. Após isto, a incisão era aprofundada, e desta forma, obtinha-se a superfície mucosa exposta, que era mantida em uma placa de pectri, em banho de gelo. .

O retângulo assim obtido era dividido em fragmentos de cerca de 3cm em um dos lados e colocado entre duas hemi-câmaras de acrílico, com 1cm² de área circular interna.

Na figura 9, pode-se verificar, de forma diagramatizada, os principais procedimentos relacionados com a preparação do tecido ileal, até a sua fixação nas câmaras

de Üssing, de acordo com a metodologia descrita em Üssing & Zerahn, 1951; Schultz & Zalusky, 1964.

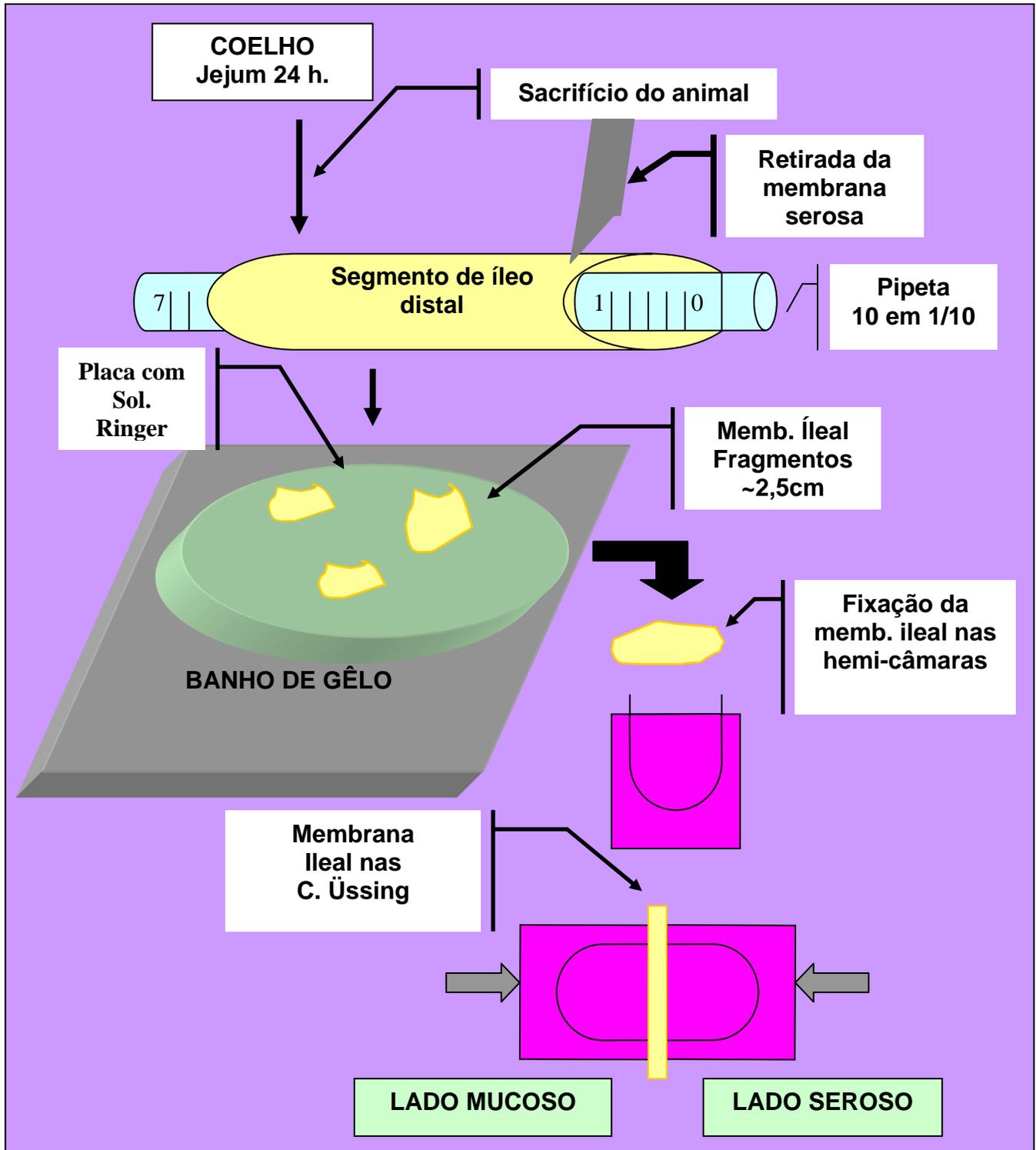


Figura 9. Preparação do íleo para fixação nas câmaras de Üssing.

3.7.3. Montagem e funcionamento das câmaras de Üssing

Cada câmara era fixada em suporte adequado e simultaneamente preenchida com 0,8 ml de solução de Ringer glicosado e Ringer manitol nos lados serosos e mucoso, respectivamente, sendo em seguida, liberada a circulação dos 9,2 ml de perfusado, contidos nos tubos de circulação, previamente aquecidos e aerados, de acordo com o método descrito em Soares e cols., 1991.

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

A temperatura do perfusado era mantida a 37,8°C através de um sistema de circulação de água que envolvia as paredes de uma camisa de vidro que envolviam os tubos que recebiam o perfusado. Desta forma, o aquecimento homogêneo era mantido por meio de uma bomba de circulação de fluxo contínuo, com termostato ajustável.

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

Cada uma das pontes de polietileno de 1,57 mm de diâmetro interno foi conectada no orifício central de cada uma das hemi-câmaras, sendo o outro extremo imerso numa solução saturada de cloreto de potássio (KCl), juntamente com o eletrodo de calomel. Por outro lado, a ponte de 2,15 mm de diâmetro interno, foi conectada ao orifício distal de cada hemi-câmara e o outro extremo imerso em outros recipientes com solução saturada de KCL, contendo eletrodo de prata. A seguir, os pares de eletrodos, dois de calomel e dois de prata, eram conectados a um sistema de clampeamento de voltagem (Soares e cols., 1991).

Após todo este aparato técnico, os clampeadores eram ligados e o amperímetro zerado a fim de ser medido e registrado o potencial elétrico espontâneo, gerado pelo sistema. Caso o potencial espontâneo ultrapassasse os limites de +1,0 ou -1,0 mV, o sistema elétrico era desmontado e imediatamente refeito.

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

O funcionamento das câmaras de Üssing era dividido nos seguintes períodos.

- Período inicial. As medidas elétricas monitoradas durante este período eram usadas como critério de triagem das condições do tecido. Caso estas medidas ultrapassassem muito a média das outras câmaras, a membrana era imediatamente substituída.
- Período de estabilização. (30 min.) Nesse período, foi dada uma atenção especial às variações de corrente de curto-circuito; se houvesse variações maiores que 20%, entre o final deste período e as leituras anteriores, a câmara era automaticamente eliminada do experimento.
- Período de adição. (60 min.) . Após o período de estabilização, as câmaras eram divididas de acordo com cada protocolo experimental. A seguir, era retirado 1,0 ml do perfusado. Os sobrenadantes de macrófagos, testes e controles, eram adicionados no volume de 1,0 ml, de tal maneira que o volume perfusado retornasse aos 10 ml.
- Período de teste funcional. (20 min). Independentemente do protocolo experimental empregado, no início deste período, eram retirados 200µl do perfusado e adicionado um volume equivalente de uma solução de teofilina a 10^{-3} M, no lado seroso, com o objetivo de testar o estado elétrico final da membrana. Caso o clampeador de voltagem apresentasse uma sobrecarga de corrente, indicada no instrumento de registro como “*over-load*”, os dados obtidos nesta câmara eram descartados do protocolo considerado como válido experimentalmente.

Na figura 10 podem ser visualizados, resumidamente, os principais elementos integrantes do sistema de clameamento de voltagem acoplado às câmaras de Üssing.

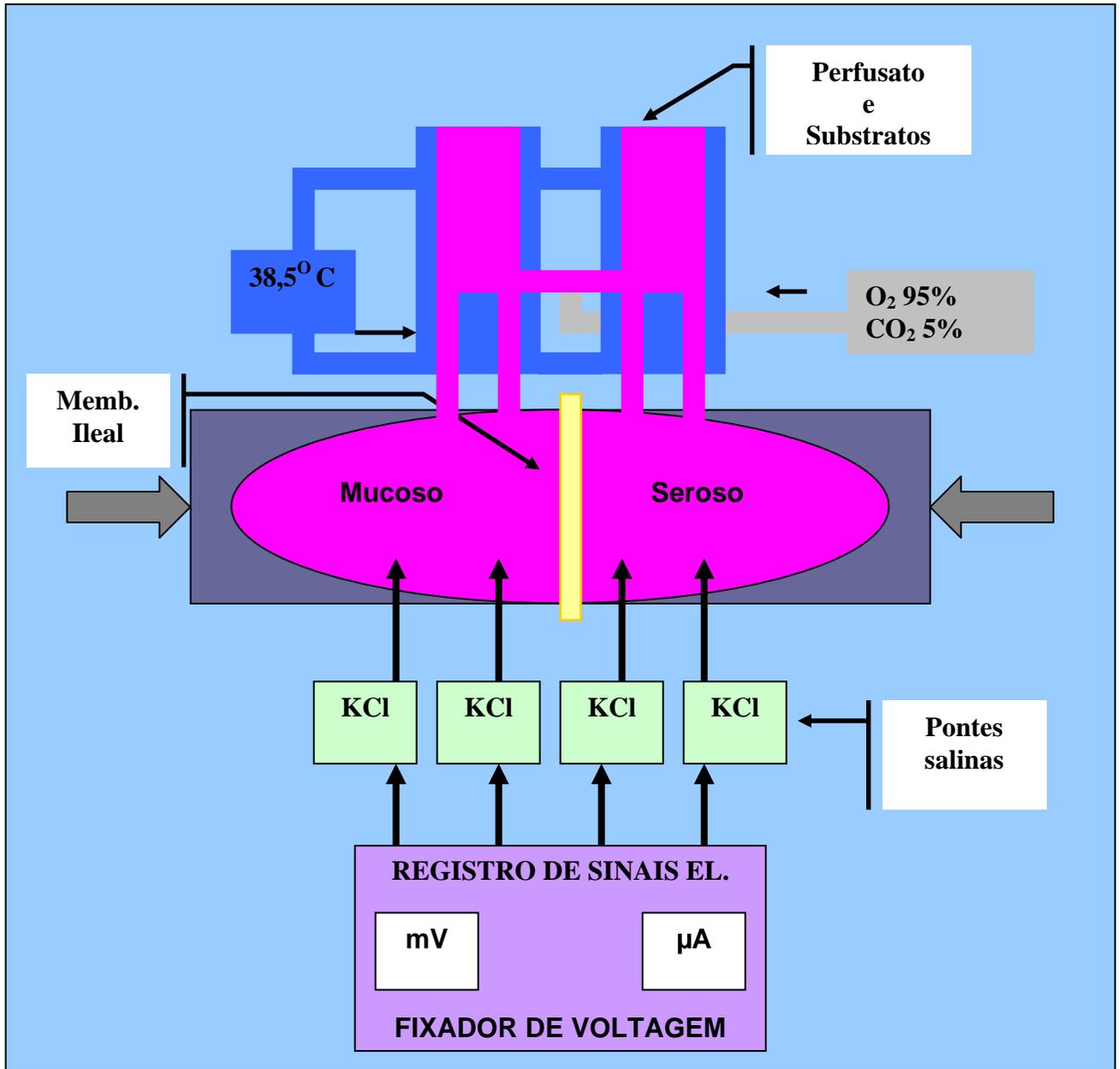


Figura 10. Câmara de Üssing e sistemas de aeração, aquecimento, fixação de voltagem e registro de sinais elétricos.

3.8. Protocolos experimentais

3.8.1. Determinação e caracterização farmacológica do fator de “secreção intestinal”, liberado de macrófagos estimulados por MCLR de *Microcystis aeruginosa*

3.8.1.1. Dose-efeito secretório intestinal promovido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por diferentes doses de MCLR

A partir das monocamadas de macrófagos, conforme protocolo descrito anteriormente (3.5.2), macrófagos eram estimulados durante uma hora com MCLR de *Microcystis aeruginosa* em diferentes concentrações ($3,2 \cdot 10^{-7} \text{M}$; $9,6 \cdot 10^{-7} \text{M}$ e $3,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$). Após esta etapa, o sobrenadante era descartado e as monocamadas lavadas, três vezes, com meio de cultura RPMI, sendo em seguida adicionado uma nova preparação de meio RPMI enriquecido com soro fetal bovino a 10%. Após duas horas em incubação, os sobrenadantes eram recolhidos, centrifugados e imediatamente testados nas câmaras de Üssing.

3.8.1.2. Cinética tempo-efeito da “secreção intestinal” induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

Sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$) era aplicado sobre preparações de tecido ileal montadas em câmaras de Üssing, e os respectivos valores de corrente de curto-circuito (Isc) eram registrados em função do tempo de averiguação. Os valores de Isc foram plotados em função da variação temporal, e a função matemática que melhor descrevia o efeito foi registrada.

As inclinações das funções obtidas foram comparadas estatisticamente, considerando-se um grau de confiabilidade de pelo menos 95%.

3.8.1.3. Efeito da toxina MCLR diretamente nas câmaras de Üssing

Toxina MCLR de *Mycrocistis aeruginosa* na concentração de $3,2 \cdot 10^{-6}$ M foi adicionada diretamente nas câmaras de Üssing, após o período de estabilização, e as medidas de corrente de curto-circuito, resistência tecidual e diferença de potencial elétrico sobre o epitélio ileal foram registradas a cada 10 min, conforme procedimento descrito em 3.7.2 e 3.7.3.

Como no ítem anterior, os valores de I_{sc} foram plotados em função da variação temporal, e a função matemática que melhor descrevia o efeito foi registrada.

As inclinações das funções obtidas foram comparadas estatisticamente, considerando-se um grau de confiabilidade de pelo menos 95%.

3.8.1.4. Efeito da polimixina B sobre o “efeito secretório intestinal” induzido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

Uma vez obtidas as monocamadas de macrófagos, conforme metodologia descrita no item 3.5.2; nestas, eram adicionadas soluções com polimixina B, na concentração de $6,9 \cdot 10^{-5}$ M (equivalente a $100 \mu\text{g/ml/well}$), incubada com microcistina ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M), por 30 minutos, em temperatura ambiente. As culturas, assim, permaneciam por 1 hora, até o final do período de estimulação. Em seguida, os sobrenadantes eram descartados, e as monocamadas lavadas por três vezes com RPMI. Após esta fase, os macrófagos eram deixados em incubação com novo RPMI por mais duas horas, sendo ao final, os sobrenadantes obtidos para serem testados nas câmaras de Üssing.

3.8.1.5. Atividade das toxinas da *Bordetella pertussis* sobre a liberação do fator responsável pela “secreção intestinal”

Uma vez obtidas as monocamadas conforme metodologia descrita no item 3.5.2, toxina pertussis ativa, na concentração de $9,5 \cdot 10^{-7} \text{M}$ e toxina pertussis mutante, também na concentração de $9,5 \cdot 10^{-7} \text{M}$, foram adicionadas separadamente às culturas, uma hora antes da estimulação dos macrófagos com MCLR na concentração de $3,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$, e aí permaneceram durante todo o tempo do estímulo, ou seja, uma hora. Após este período, os sobrenadantes foram descartados, as monocamadas foram lavadas, três vezes, com RPMI e os macrófagos deixados em incubação com novo RPMI por mais duas horas. A seguir, os sobrenadantes obtidos foram testados nas câmaras de Üssing.

Da mesma maneira, como nos itens anteriores, os valores de I_{sc} foram plotados em função da variação temporal, e a função matemática que melhor descrevia o efeito foi registrada.

As inclinações das funções obtidas foram comparadas estatisticamente, considerando-se um grau de confiabilidade de pelo menos 95%.

3.8.1.6. Efeito de um inibidor de síntese de proteína perante a gênese do fator de “secreção intestinal”

Após a obtenção das monocamadas de macrófagos, conforme metodologia descrita no item 3.5.2, cicloheximida, na concentração de 10^{-5}M (um inibidor de síntese protéica), foi adicionado às culturas trinta minutos antes da estimulação dos macrófagos com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$), permanecendo também durante todo o período subsequente de estimulação. Após este período, os sobrenadantes eram desprezados, as monocamadas lavadas três vezes, e os macrófagos deixados em nova incubação, por mais duas horas. Em seguida, os sobrenadantes eram recolhidos, centrifugados e testados nas câmaras de Üssing, conforme metodologia descrita nos itens 3.7.2 e 3.7.3.

Neste item, os valores de I_{sc} também foram plotados em função da variação temporal, e a função matemática que melhor descrevia o efeito foi registrada.

As inclinações das funções obtidas foram comparadas estatisticamente, considerando-se um grau de confiabilidade de pelo menos 95%.

3.8.1.7. Participação de proteases na síntese do fator de “secreção intestinal”

Os macrófagos, *in vitro*, foram estimulados durante uma hora com MCLR na concentração de $3,2 \cdot 10^{-6}$ M. Após este período, os sobrenadantes foram desprezados e as monocamadas lavadas três vezes para receberem finalmente, um novo RPMI contendo soro fetal bovino a 10% . Posteriormente, os macrófagos eram deixados em incubação por um período de duas horas. No início dessa fase, os inibidores de proteases, fluoreto de fenilmetilsulfonil (1,0 mg/ml) e inibidor de tripsina (1,0 mg/ml), foram adicionados às monocamadas de macrófagos, permanecendo aí até o final da cultura. Por fim, os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados e imediatamente testados nas câmaras de Üssing.

Os valores de I_{sc} obtidos foram então plotados em relação à variação temporal, e a função matemática que melhor descrevia o efeito foi registrada.

As inclinações das funções obtidas foram comparadas estatisticamente, considerando-se um grau de confiabilidade de pelo menos 95%.

3.8.1.8. Efeito de inibidores de fosfolipase A_2 , ciclooxigenases, lipoxigenase e antagonista de PAF na síntese do fator de “secreção intestinal”

Após a obtenção das preparações de macrófagos como descrito no item 3.5.2, dexametasona (10^{-5} M; inibidor de síntese protéica e fosfolipase A_2), quinacrina (10^{-5} M; inibidor seletivo de fosfolipase A_2), indometacina (10^{-5} M; inibidor de ciclooxigenase), NS398 (10^{-5} M; inibidor de ciclooxigenase 2), NDGA (10^{-6} M, inibidor dual de ciclo e lipoxigenase), MK886 (10^{-5} M; inibidor de lipoxigenase), e WEB2086 (10^{-5} M; um

antagonista do fator de agregação plaquetária), foram adicionados, conforme seus respectivos protocolos, nos meios de cultura de macrófagos, trinta minutos antes da estimulação dos macrófagos com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$) permanecendo também durante o período de estímulo com esta toxina. Logo após, os sobrenadantes eram desprezados, as monocamadas lavadas, três vezes, com RPMI, e novo RPMI era adicionado com soro fetal bovino a 10%, sendo os macrófagos deixados agora para incubação por duas horas. Finalmente, os sobrenadantes eram recolhidos, centrifugados e seus efeitos avaliados nas câmaras de Üssing.

Em cada protocolo experimental, os valores de I_{sc} obtidos foram então plotados em relação à variação temporal, e a função matemática que melhor descrevia o efeito foi registrada.

As inclinações das funções obtidas foram comparadas estatisticamente, considerando-se um grau de confiabilidade de pelo menos 95%.

3.8.1.9. Efeito de inibidores da síntese de $\text{TNF-}\alpha$ na gênese do fator de “secreção intestinal”

Com a obtenção das monocamadas de macrófagos, como descrito no item 3.5.2, efetuou-se ensaios onde foram empregados, por sua vez, os fármacos pentoxifilina ($5,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$; inibidor de síntese de $\text{TNF-}\alpha$) e talidomida ($1,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$; inibidor de síntese de $\text{TNF-}\alpha$), adicionados às culturas, trinta minutos antes da estimulação dos macrófagos com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$), permanecendo também durante todo o período destinado à estimulação. Após esta etapa, os sobrenadantes eram desprezados, as monocamadas lavadas e os macrófagos deixados em incubação por mais duas horas. A seguir, os sobrenadantes eram recolhidos, centrifugados e utilizados nas câmaras de Üssing.

3.8.1.10. Dosagem de TNF- α no sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR

O sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}M$; $9,6 \cdot 10^{-7}M$ e $3,2 \cdot 10^{-6}M$) foi obtido conforme descrição no item 4.5.2, sendo ao final do procedimento estocado à $-70^{\circ}C$, para uso posterior. A concentração de TNF- α foi determinada através do procedimento ELISA, específico para este tipo de citocina, conforme descrição no item 4.6.2.

3.8.1.11. Ação do antagonista do receptor de interleucina-1 na “secreção intestinal”

O sobrenadante de macrófago estimulado com MCLR na concentração de $3,2 \cdot 10^{-6}M$ foi obtido como descrito no item 3.5.2. O sobrenadante assim obtido, foi testado na mucosa ileal pré-tratada, trinta minutos antes, com o antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1ra) ($4,5 \cdot 10^{-6}M$) adicionado no lado seroso das câmaras de Üssing.

3.8.1.12. Efeito dos anticorpos monoclonais anti-IL-1 α e anti-IL-1 β na “secreção intestinal”

O sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR foi incubado com os anticorpos anti IL-1 α e anti-IL-1 β isolados ou associados, na concentração de $250\mu g/ml$, durante trinta minutos, e logo em seguida, foi ensaiado em câmaras de Üssing. As medidas elétricas foram executadas de acordo com a descrição nos itens 3.7.2 e 3.7.3.

3.8.1.13. Determinação da concentração de IL-1 β no sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

O sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}M$; $9,6 \cdot 10^{-6}M$ e $3,2 \cdot 10^{-6}M$), foi obtido de forma similar à metodologia descrita no item 3.5.2, sendo ao final do procedimento estocados à $-70^{\circ}C$ para posterior uso. A concentração de IL-1 β foi determinada através do procedimento ELISA específico para este tipo de citocina (IL-1 β de rato), conforme protocolo descrito no item 3.6.1.

3.8.1.14. Atividade da interleucina-1 β na “secreção intestinal”

Após o período de estabilização no sistema de câmaras de Üssing, avaliou-se o “efeito secretório intestinal” produzido em presença de IL-1 β ($10^{-7}M$), quando adicionada no lado seroso das câmaras de Üssing, comparando-se este efeito com aquele obtido pela aplicação do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$).

Num primeiro momento, comparou-se os valores finais de variação de corrente I_{sc} (ΔI_{sc}), avaliando-se a significância estatística das diferenças encontradas.

Num segundo momento, comparou-se a curva de variação de I_{sc} em função do tempo, para ambos os tratamentos, focalizando-se as comparações ao nível da constante angular (constante de inclinação da curva), para um intervalo de confiabilidade de pelo menos 95%.

3.8.2. Participação de canais iônicos, mediadores pró-inflamatórios e do sistema nervoso entérico na modulação do “efeito secretório intestinal” mediado por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

3.8.2.1. Ação da bumetanida na “atividade secretória intestinal” do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR

O sobrenadante de macrófagos foi obtido conforme descrição do item 3.5.2. Seguindo-se a metodologia sugerida por Chang e cols., (1990), procurou-se adicionar a bumetanida na concentração de 10^{-5} M no lado seroso da câmara de Üssing, 10 minutos antes da adição do sobrenadante. As medidas de corrente de curto-circuito, diferença de potencial elétrico e resistência transmembrana registradas a cada 10 minutos, de acordo com o descrito nos itens 3.7.2 e 3.7.3..

3.8.2.2. Efeito do pré-tratamento da mucosa ileal com tetrodotoxina, indometacina e HOE sobre a “secreção intestinal” mediada por sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR

Várias preparações foram efetuadas, de mucosa ileal fixada em câmara de Üssing, sob pré-tratamento com indometacina (inibidor de síntese de prostaglandinas, 10^{-6} M), tetrodotoxina (inibidor de canais de Na^+ , em determinados tipos de células nervosas, 10^{-7} M), e HOE (antagonista de receptor de bradicinina, 10^{-5} M), vinte minutos antes da adição do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M). Os valores de I_{sc} foram registrados conforme os termos dos itens 4.7.2 e 4.7.3, mas para efeito de comparação, foram considerados apenas os valores finais de ΔI_{sc} .

3.8.3. Determinação do nível de aleatoriedade dos efeitos eletrogênicos em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, sob a ação do sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

3.8.3.1. Avaliação do “efeito secretório intestinal” mediado por IL1 β ou sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, aplicando-se análise R/S de Hurst

Os valores de “Isc” obtidos à partir das preparações de tecido ileal que receberam ora sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR nas concentrações de ($3,2 \cdot 10^{-7}M$; $9,6 \cdot 10^{-7}M$ e $3,2 \cdot 10^{-6}M$), ora sobrenadante de macrófagos que receberam apenas RPMI ou ainda IL1 β ($10^{-7}M$) adicionado diretamente às câmaras; foram aplicados a um protocolo específico de cálculo para a obtenção do coeficiente de Hurst, tomando-se como referência a metodologia descrita em Feder (1989).

No método de Hurst tem-se que inicialmente definir uma função dependente do tempo $F(t)$, onde o tempo (t), assume valores inteiros de 1, 2,3... até “T”.

Num segundo momento, se faz necessário calcular, a cada intervalo temporal, o valor médio da variável $\langle F \rangle$ e o respectivo desvio padrão da mesma “S”. Uma vez isto obtido, deve-se, dentro do intervalo, verificar o desvio de cada valor nominal da função e o valor medio da mesma $X(t) = F - \langle F \rangle$. Assim, ao final, podemos ter uma idéia da maior variação possível da variável num determinado intervalo temporal. Isto é o que se poderia denominar de Range $R(t) = \max (t, T) - \min. (t, T)$.

A razão entre (R) (Range) e o respectivo desvio padrão (S) para um determinado intervalo temporal, permite que, posteriormente, sejam estes valores plotados em função da variação temporal, em escala log x log, e que seja determinado o valor do coeficiente angular (a inclinação) da curva obtida. Este é o valor do coeficiente (H) de Hurst.

É importante lembrar, que a validade do coeficiente H, está atrelada ao valor do coeficiente de correlação estabelecido entre as variáveis R/S e T. Quanto mais próximo da unidade for o seu valor, mais fidedigno será o valor de H.

Uma vez obtido o valor do coeficiente de Hurst para cada protocolo acima mencionado, procurou-se empregar os critérios descritos em Varanda e cols. (2000), afim de que fosse possível a caracterização do “efeito secretório”, segundo a sua condição de aleatoriedade.

Para $H = 0$, temos uma função dita de baixa memória, uma vez que os valores no tempo presente seriam independentes dos valores da função do passado. Em outras palavras, teríamos uma função cujos valores seriam aleatórios em relação ao tempo. Quando $H \neq 0$, a função $F(t)$ tem memória. Se $1,0 > H > 0,5$; temos uma função dita persistente, uma vez que um aumento nos seus valores no presente, significa um aumento dos mesmos no tempo futuro. Se $0 < H < 0,5$, a função $F(t)$ será dita antipersistente, uma vez que um aumento nos valores da mesma no presente, significa uma diminuição dos mesmos no tempo futuro.

3.8.3.2. Cálculo da dimensão fractal associada ao “efeito secretório intestinal” mediado por IL1 β ou sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

Uma vez obtido os respectivos valores da constante de Hurst para o efeito secretório promovido por IL1 β ou por sobrenadante de macrófagos estimulados por diferentes concentrações de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}M$; $9,6 \cdot 10^{-7}M$ e $3,2 \cdot 10^{-6}M$); empregou-se a expressão matemática $D = E + 1 - H$, onde “D” é a dimensão fractal, “E” é a dimensão topográfica de referência, onde o processo será conduzido, e H é o coeficiente de Hurst, conforme metodologia sugerida por Echeperes (1992).

Com os valores de D, procurou-se determinar as relações de correlação para fractais que evoluem no tempo seguindo o critério sugerido em Echeperes (1992). Para $1 < D < 1,5$ correlação de auto-afinidade positiva. Para $D = 1,5$ correlação de auto-afinidade randômica. Para valores de $1,5 < D < 2$, correlação de auto-afinidade negativa.

3.8.4.Determinação do nível de aleatoriedade associado à variação de resistência transepitelial, em preparações de tecido ileal em câmaras de Üssing, sob a ação do sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

3.8.4.1. Determinação da variação da resistência e da tensão elétrica transepitelial durante a ocorrência do “efeito secretório intestinal”, mediado por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

Inicialmente, os valores da resistência e da tensão transepitelial, R_{te} e V_{te} respectivamente, foram aferidos durante os experimentos e devidamente tabulados, metodologicamente adquiridos, conforme descrição no item 3.7.3.

Deve-se lembrar que para o cálculo dos valores de V_{te} , teve-se de se levar em conta o valor do potencial de referência estabelecido durante a fase de calibração dos instrumentais. A partir destes valores pode-se se calcular pela aplicação direta da lei de ohm, um segundo valor para a resistência transepitelial, que posteriormente foi comparado com os valores de resistência lidos diretamente através dos instrumentais de registro. Esta comparação se fez necessária para que se descartasse a possibilidade de geração de impedância elétrica por componentes de natureza não ôhmica.

3.8.4.2. Determinação da variação do coeficiente de Hurst e dimensão fractal em relação a variação da resistência transepitelial associada à resposta secretória induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

Neste procedimento, serão aplicados os mesmos preceitos descritos nos ítems 3.8.3.1 e 3.8.3.2; acrescentando que os valores empregados para cálculo são os respectivos valores de resistência aferidos experimentalmente.

3.8.5. Determinação das curvas de dose – resposta para variação de corrente de curto circuito, variação da tensão elétrica e resistência transepiteliais, associadas à resposta secretora induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

A determinação das curvas de dose – resposta assinaladas acima, foram obtidas plotando-se os valores da variação de corrente de curto – circuito ΔI_{sc} , como os valores da variação da tensão transepitelial ΔV_{te} , ou ainda os valores da variação da resistência transepitelial ΔR_{te} , cada um à sua vez; correspondente à concentração de MCLR empregada para promover a estimulação dos macrófagos e obtenção dos sobrenadantes.

Uma vez obtidas as funções, serão averiguadas as melhores expressões matemáticas para a descrição dos respectivos comportamentos gráficos.

3.8.6. Dinâmica de liberação de IL1 β e TNF α em macrófagos estimulados por MCLR de *Microcystis aeruginosa* ou Toxina A de *Clostridium difficile*

3.8.6.1. Cinética de liberação de TNF- α e IL1 β em sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR

A expressão matemática que melhor descrevia a variação da concentração de TNF α ou IL1 β em função da variação da concentração de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}$ M; $9,6 \cdot 10^{-7}$ M e $3,2 \cdot 10^{-6}$ M), segundo os protocolos descritos em 3.8.1.10 e 3.8.1.13; foi determinada respectivamente; sendo a natureza destas expressões qualificadas segundo uma avaliação do correspondente coeficiente de correlação.

A seguir, cada uma destas expressões foi submetida a um processo de derivação, para que fosse possível de se conhecer a taxa de variação infinitesimal de produção destes mediadores em função da concentração do substrato empregado.

Uma razão entre estas taxas infinitesimais foi também obtida, afim de que se pudesse avaliar a relação entre a produção de TNF α e IL1 β à partir de macrófagos estimulados pela toxina MCLR.

3.8.6.2. Comparação entre as atividades cinéticas de liberação de TNF α e IL1 β do sobrenadantes de macrófagos estimulados com Toxina A de *Clostridium difficile* e MCLR de *Microcystis aeruginosa*

Um mesmo procedimento, semelhante aos descritos nos itens 4.8.1.10. e 4.8.1.13 foi efetuado; só que se utilizando a toxina A de *Clostridium difficile* em diferentes concentrações ($3,2 \cdot 10^{-7}M$; $9,6 \cdot 10^{-7}M$ e $3,2 \cdot 10^{-6}M$) (Rocha, 1998).

Da mesma forma que no ítem 3.8.6.1, as expressões matemáticas e as respectivas taxas infinitesimais foram determinadas para a produção de TNF α e IL1 β em sobrenadante de macrófagos estimulados com diferentes concentrações de MCLR.

Finalmente, as relações de produção de TNF α e IL1 β obtidas tanto para MCLR de *Microcystis aeruginosa* como para Toxina A de *Clostridium difficile*, foram comparadas.

3.9. Análise estatística e matemática

Os principais parâmetros obtidos experimentalmente foram: corrente de curto-circuito (Isc), resistência transepitelial (Rte) e tensão elétrica transepitelial (Vte).

Quando necessário “Rte” podia ser calculada com a aplicação da lei de Ohm, considerando-se como “Vte” a diferença entre os valores de tensão lidos diretamente no Instrumento e o valor de tensão de referência, estabelecido no momento da calibração do sistema de clampeamento de voltagem.

A natureza dos protocolos experimentais empregados neste trabalho exigiu que os dados obtidos experimentalmente fossem expressos em termos de média \pm epm (erro padrão da média).

Desta forma, para uma avaliação do “efeito secretório” obtido em cada protocolo experimental, foi empregado, numa primeira abordagem; a análise de variância (ANOVA), pois segundo o teste de Fisher, a distribuição dos desvios em relação aos valores médios, em cada medida, obedecia a uma distribuição gaussiana, também conhecida como

distribuição normal. Testes de Tukey e de Bonferroni também foram aplicados, para uma avaliação da significância das diferenças entre os valores médios obtidos, para um intervalo de confiabilidade de pelo menos 95% ou $P < 0,05$.

Convém mencionar, que os cálculos acima foram efetuados mediante a utilização de um pacote estatístico do programa computacional do Prisma - Graph Pad versão 3.0.

Quando os dados eram expressos em relação à uma variável temporal, aplicava-se a Análise de Regressão, para a obtenção da melhor função que se ajustava aos valores experimentais obtidos. Para isto, também era utilizado o pacote estatístico acima descrito.

Optou-se por este procedimento acima, para que realmente ficasse configurado o efeito secretório como uma função variante no tempo. Isto, na verdade também foi importante, pois permitia uma comparação entre os efeitos secretórios obtidos mediante protocolos distintos, mediante a comparação do coeficiente angular das funções obtidas. A análise de variância (ANOVA) também foi aplicada para estes dados, a fim de se obter a significância das diferenças entre as taxas de variação de corrente de curto-circuito (I_{sc}).

Com relação às curvas de dose-resposta, optou-se pela determinação da melhor função matemática que se ajustava aos valores definidos pela combinação da variável independente, ΔI_{sc} , ΔR_{te} e ΔV_{te} ; variação de corrente de curto-circuito, variação da resistência transepitelial e variação do potencial elétrico transepitelial, num dado intervalo temporal, respectivamente.

É importante também mencionar que para cada função obtida, obtinha-se um coeficiente de correlação apropriado, como melhor estimativa da fidedignidade da relação matemática empregada para descrever o conjunto de dados num relação funcional.

A análise R/S de Hurst e o cálculo da dimensão fractal de auto-afinidade, foram efetuados segundo metodologia escrita em Feder (1988) e Echeperes e cols (1992), apresentada em detalhes nos itens 3.8.3 e 3.8.4. Para estes cálculos foram desenvolvidas planilhas específicas, no programa computacional da Excel da Microsoft.

A variação do coeficiente de Hurst (H), em função da concentração de MCLR empregada para estimular macrófagos em meio de cultura, foi plotada e a função matemática correspondente obtida. Para isto, utilizou-se das planilhas de regressão do programa estatístico Prisma Graph Pad.

Finalmente, para uma avaliação da capacidade de produção de IL-1 β e TNF- α , em função da concentração de MCLR ou Toxina A de *Clostridium difficile*, utilizada para estimular macrófagos, foram empregados métodos de regressão para funções lineares e não lineares conforme planilhas do programa estatístico Prisma Graph Pad.

As taxas infinitesimais de liberação das citocinas acima assinaladas, foram determinadas mediante a aplicação de métodos de cálculo diferencial e integral descritos em Johnson & Kiokemeister, (1964),. Cochran e cols. (1950);. Snedecor, (1937).

A ordem de grandeza das diferenças entre as taxas infinitesimais obtidas foi determinada pelo cálculo de uma razão matemática entre as mesmas.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação e caracterização farmacológica do fator de secreção intestinal, liberado de macrófagos estimulados por MCLR de *Microcystis aeruginosa*

4.1.1. "Efeito secretório intestinal" promovido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

O sobrenadante de macrófagos estimulados com doses crescentes de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}M$, $9,6 \cdot 10^{-7}M$ e $3,2 \cdot 10^{-6}M$), promoveu um significativo efeito secretório, de forma concentração – dependente, em preparações de tecido ileal montadas em câmaras de Üssing, cujos valores médios \pm erro padrão da media ($m \pm epm$), da variação de corrente de curto circuito foram: $\Delta I_{scS.M\emptyset S+MCLR (3,2 \cdot 10^{-7} M)} = 57,60 \pm 12,4 \mu A.cm^{-2}$, $n=5$, $p<0,05$; $\Delta I_{scS.M\emptyset S+MCLR (9,6 \cdot 10^{-7} M)} = 50,80 \pm 13,90 \mu A.cm^{-2}$, $n=6$, $p<0,05$; $\Delta I_{scS.M\emptyset S+MCLR (3,2 \cdot 10^{-6} M)} = 103,30 \pm 18,20 \mu A.cm^{-2}$, $n=8$, $p<0,001$; contra $\Delta I_{scS.M\emptyset S+RPMI (controle)} = 19,60 \pm 12,4 \mu A.cm^{-2}$, $n=9$; conforme ilustram os dados plotados na Figura 11.

Para a comparação estatística destes valores acima mencionados, foi efetuada análise de variância (ANOVA), e o emprego dos testes de Bonferroni e Tukey; considerando-se um número “n” de preparações com tecido ileal, de no mínimo quatro animais.

Deve-se salientar que o grupo controle sempre será caracterizado pela aplicação do sobrenadante provenientes de macrófagos não estimulados por MCLR, ou seja, que receberam apenas o meio de cultura denominado de RPMI.

Na tabela 6 dos anexos, podem ser observados os valores médios de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 11.

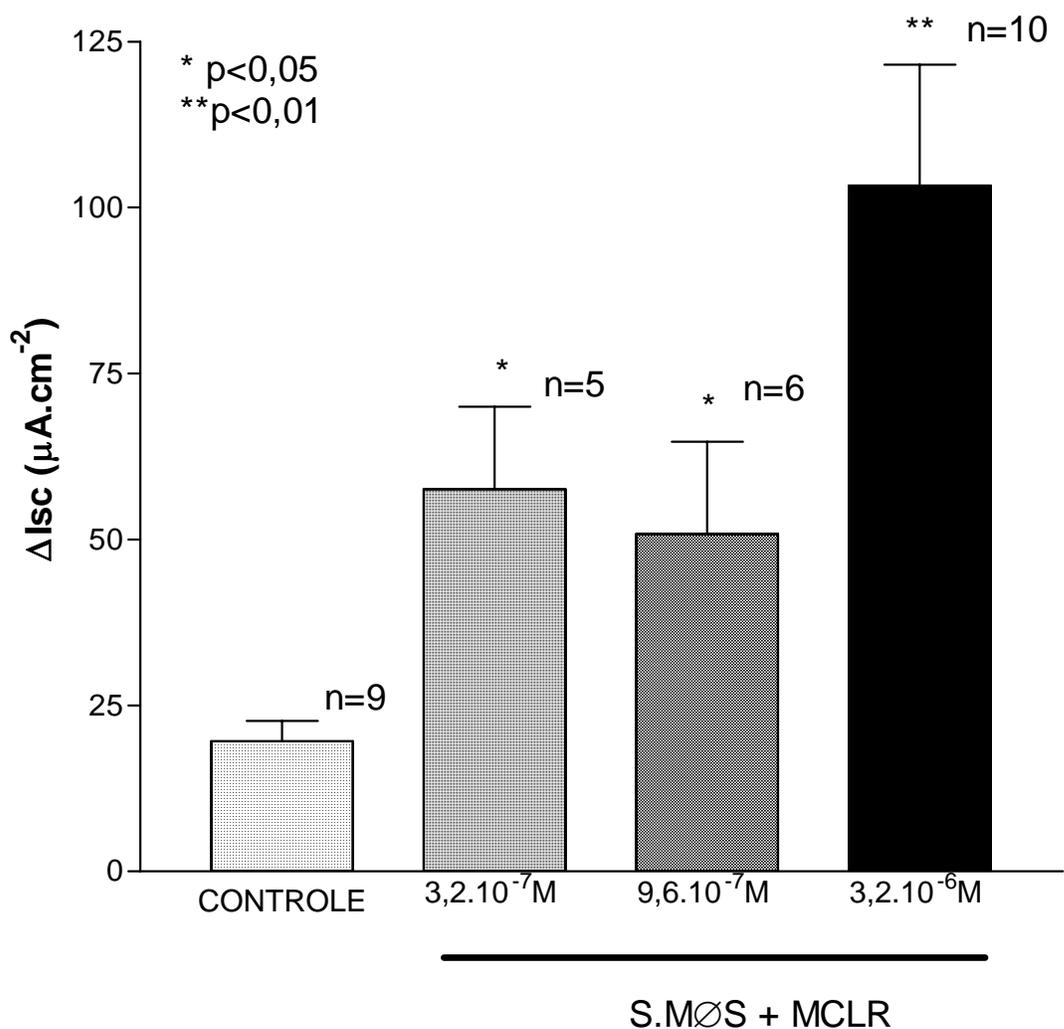


Figura 11. Efeito secretório intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR. Macrófagos estimulados com doses crescentes de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}$ M, $9,6 \cdot 10^{-7}$ M e $3,2 \cdot 10^{-6}$ M), liberaram um sobrenadante capaz de provocar secreção em íleo de coelho, de forma concentração –dependente. Os valores de ΔI_{sc} ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados e a ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey).

4.1.2. Variação temporal da “secreção” intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

O sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$ ou $1\mu g/ml$) induziu “secreção intestinal” em preparações de tecido ileal de forma tempo-dependente, cujos valores de I_{sc} puderam ser descritos por uma função do tipo $I_{sc}=I_{sc_0} \cdot e^{kt}$; onde $I_{sc_0}=51,24\pm 2,25 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k= 20,65\pm 1,2 \cdot 10^{-3}$, $n=13$, para um valor de coeficiente de correlação $r=0,9988$. Estes valores foram significativamente diferentes, para um valor de $p<0,0001$ em relação ao grupo controle (Testes de Bonferroni e Tukey), onde $I_{sc_0}=30,70\pm 1,15 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k=10,0\pm 1,05 \cdot 10^{-3}$, $n=11$. Estes dados podem ser visualizados na Figura 12.

Após 50 min., a partir do período de estabilização, os valores ($m\pm epm$) da variação de corrente de curto circuito (ΔI_{sc}) passaram a ser significativos (Testes de Bonferroni e Tukey), para um valor de $p<0,01$; onde $\Delta I_{sc_{50}}=93,15\pm 16,26 \mu A \cdot cm^{-2}$, contra um valor de $\Delta I_{sc_{controle}}=19,60\pm 3,10 \mu A \cdot cm^{-2}$.

É importante lembrar que, graficamente, os valores de I_{sc} foram plotados em termos de ($m\pm epm$), o que deixa a impressão de que os valores de I_{sc} do grupo que recebeu MCLR em relação ao grupo controle, distam significativamente à partir do valor de $t = 10$ min.

Nas tabelas 7 e 8 dos anexos, podem ser observados os valores médios de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 12.

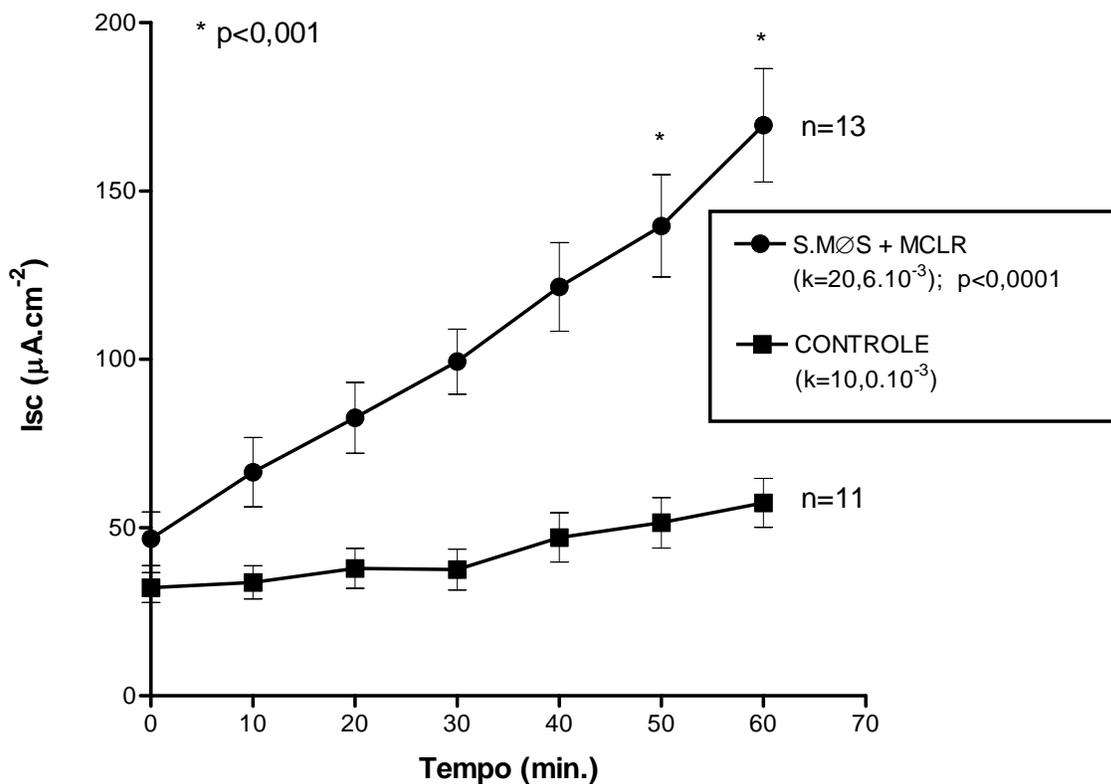


Figura 12. Variação temporal da “secreção intestinal” induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR. Nesta figura, observa-se que o S.MØS estimulados com MCLR ($1\mu\text{g/ml} - 3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$), provocou “secreção intestinal” de forma tempo-dependente, cujos valores de Isc ($m \pm \text{epm}$), de “n” preparações, podem ser descritos por uma função do tipo $\text{Isc} = \text{Isc}_0 \cdot e^{kt}$, onde $\text{Isc}_0 = 51,24 \pm 2,25 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ e $k = 20,6 \pm 1,20 \cdot 10^{-3}$, com um valor de $p < 0,0001$, em relação ao grupo controle, onde $\text{Isc}_0 = 30,70 \pm 1,15 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ e $k = 10,0 \pm 1,05 \cdot 10^{-3}$. Após 50 min., a variação de “Isc” passou a ser significativa em relação ao grupo controle.

4.1.3. Efeito da toxina MCLR diretamente nas câmaras de Üssing

A aplicação da toxina MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), diretamente nas preparações de íleo de coelho montadas em câmaras de Üssing, não gerou “secreção” neste tecido; apresentando um valor para $\Delta I_{SC_{MCLR}} = 13,85 \pm 1,87 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=7$; que não diferiu estatisticamente de $\Delta I_{SC_{RINGER}} = 8,83 \pm 0,30 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=6$, $p>0,05$. Já as preparações que receberam o sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) gerou, ao final de 60 min., um valor de $\Delta I_{SC_{S.M\O S+MCLR}} = 132,12 \pm 7,61 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=8$, $p<0,01$.

Na Figura 13, pode-se observar os valores ($m \pm epm$) de I_{sc} plotados, segundo uma função matemática do tipo $I_{sc} = I_{sc_0} \cdot e^{kt}$, onde para o grupo que recebeu MCLR diretamente às preparações $I_{sc_0} = 21,94 \pm 1,64 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k = 9,8 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$, enquanto que para as preparações que receberam S.MØS+MCLR, $I_{sc_0} = 55,62 \pm 2,69 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k = 20,2 \pm 1,3 \cdot 10^{-3}$, com $p<0,001$ em relação ao grupo que recebeu solução Ringer, onde $I_{sc_0} = 29,14 \pm 2,67 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k = 4,3 \pm 2,5 \cdot 10^{-3}$.

Aqui é interessante assinalar, que as inclinações das funções obtidas em cada caso, assinalam um comportamento distinto da variação de I_{sc} como função temporal, quando estes valores forem significativamente diferentes; como ocorreu, de certa forma, entre as preparações que receberam MCLR diretamente às câmaras, contra aquelas que receberam o sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR.

Nas tabelas 9, 10 e 11 dos anexos, podem ser observados os valores médios de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 13.

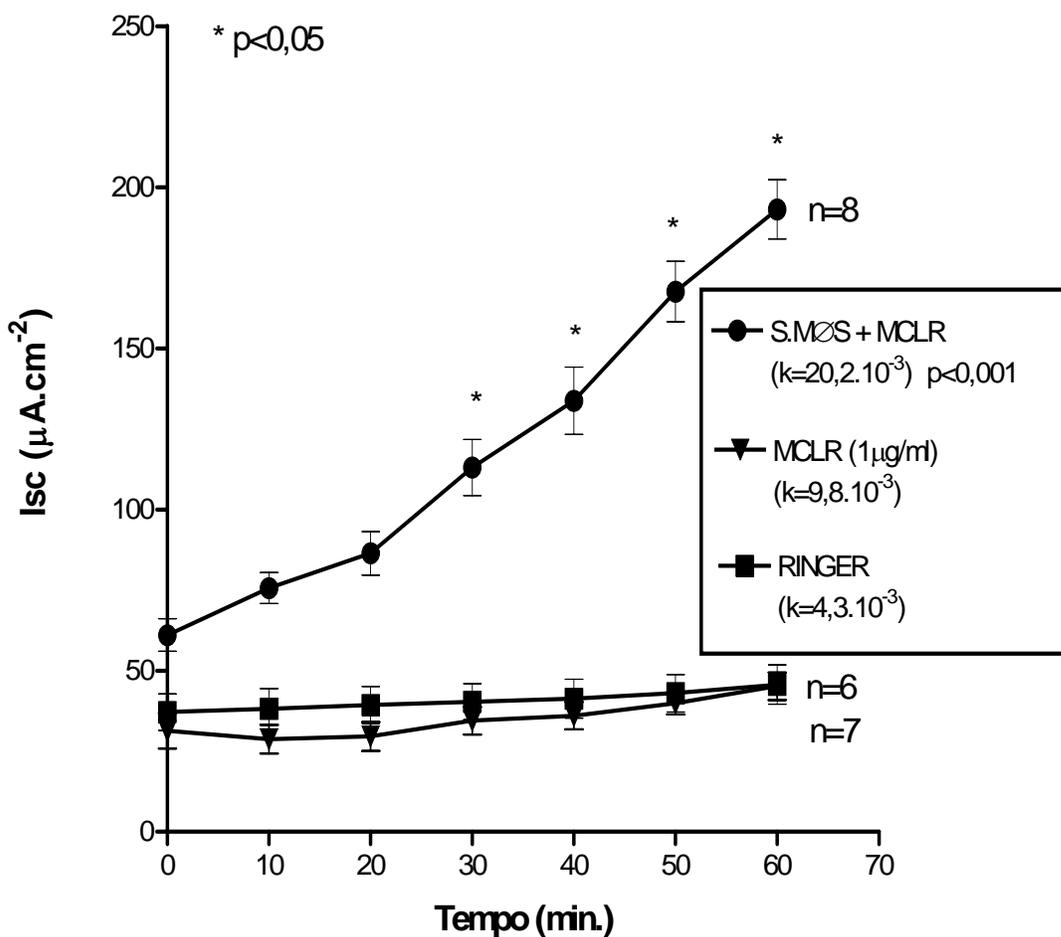


Figura 13. Efeito da toxina MCLR diretamente nas câmaras de Üssing. A aplicação de MCLR (1µg/ml – $3,2 \cdot 10^{-6}M$), diretamente às câmaras de Üssing, no lado seroso; não provocou efeito secretório. Os valores de Isc ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $Isc = Isc_0 \cdot e^{kt}$, sendo avaliado, estatisticamente, pelo teste de Tukey.

4.1.4.Efeito da polimixina B sobre o efeito “secretório intestinal” induzido pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

Polimixina B (PMXB; $6,9 \cdot 10^{-5}M$) foi incubada com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), em temperatura ambiente, por 30 minutos. Macrófagos estimulados por este substrato produziram sobrenadante que provocou “secreção intestinal”; ou seja, a presença de polimixina B não alterou a capacidade do sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR em produzir o “efeito secretório”, quando testado em preparações de íleo montadas em câmaras de Üssing, cujos valores de variação de corrente de curto-circuito ($m \pm epm$), de “n” preparações foram: $\Delta I_{ScS.M\emptyset S+MCLR +PMXB} = 126,70 \pm 12,80 \mu A.cm^{-2}$, $n=8$, $p<0,001$; $\Delta I_{ScS.M\emptyset S+MCLR (3,2 \cdot 10^{-6} M)} = 159,71 \pm 10,51 \mu A.cm^{-2}$, $n=10$, $p<0,001$; contra $\Delta I_{ScS.M\emptyset S+RPMI (controle)} = 19,60 \pm 12,4 \mu A.cm^{-2}$, $n=9$; conforme ilustram os dados plotados na Figura 14.

Nas tabelas 12., 13 e 14 dos anexos, podem ser observados os valores de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 14

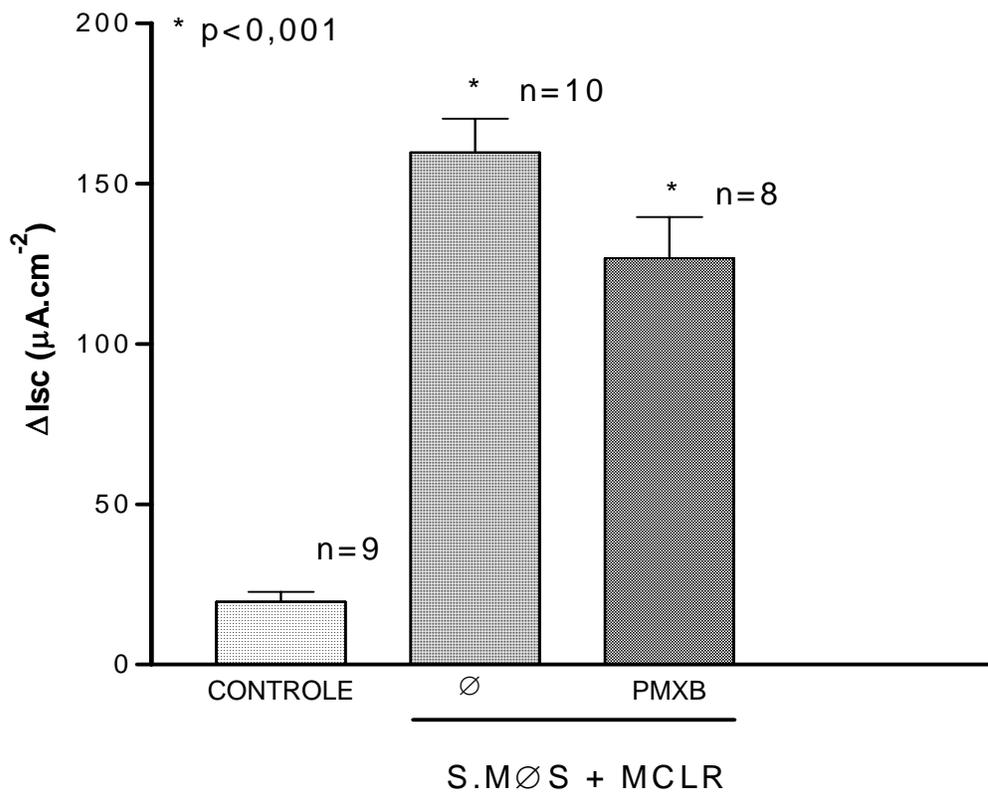


Figura 14. Efeito da polimixina B sobre o “efeito secretório intestinal” do S.MØS estimulados com MCLR. Macrófagos estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) + Polimixina B ($6,9 \cdot 10^{-5}M$), produziram um S.MØS capaz de provocar secreção em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing. Os valores de I_{sc} ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $I_{sc} = I_{sc_0} \cdot e^{kt}$, sendo avaliado, estatisticamente, pelo teste de Tukey. Como controle, foram testados S.MØS não estimulados com MCLR.

4.1.5. Atividade das toxinas de *Bordetella pertussis* sobre a liberação do fator responsável pela “secreção intestinal”

O tratamento prévio das monocamadas de macrófagos estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M), com a toxina ativa da *Bordetella pertussis* ($9,5 \cdot 10^{-7}$ M); sendo esta uma importante ferramenta farmacológica no estudo de transdução de sinal, devido à sua capacidade de promover ADP-ribosilação na subunidade α de proteína G, desacoplando-a do seu sitio de ligação; inibiu a atividade secretora em preparações de íleo nas câmaras de Üssing ($\Delta I_{sc_{S.M\O S+MCLR+TxP}} = 23,71 \pm 7,80 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=7$; com $p > 0,05$ contra ($\Delta I_{sc_{S.M\O S+RPMI}}$ (controle) = $24,85 \pm 3,84 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=7$). Já as preparações que receberam o sobrenadante com a toxina mutante de *Bordetella pertussis*, apresentaram atividade secretora com ($\Delta I_{sc_{S.M\O S+MCLR+TxPm}} = 96,71 \pm 20,71 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=7$; com $p < 0,01$; de forma similar à preparações que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, onde ($\Delta I_{sc_{S.M\O S+MCLR}} = 109,28 \pm 15,16 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=7$, com um valor de $p < 0,001$, ambos em relação ao grupo controle, cujas preparações receberam sobrenadante de macrófagos não estimulados com MCLR.

Os respectivos valores médios de I_{sc} ($m \pm epm$), de "n" preparações foram plotados (Figura 15), sendo estes, descritos por uma função do tipo $I_{sc} = I_{sc_0} \cdot e^{kt}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, $I_{sc_0} = 27,35 \pm 2,94 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k = 28,2 \pm 2,7 \cdot 10^{-3}$, com $p < 0,001$ contra o grupo controle em que $I_{sc_0} = 24,25 \pm 3,75 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k = 6,4 \pm 4,4 \cdot 10^{-3}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos pré-tratados com TxP, $I_{sc_0} = 42,64 \pm 3,35 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k = 7,5 \pm 2,1 \cdot 10^{-3}$, com $p > 0,05$ e para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos pré-tratados com TxPm $I_{sc_0} = 39,14 \pm 3,48 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k = 17,9 \pm 2,4 \cdot 10^{-3}$, com $p < 0,001$. Aqui é importante assinalar que, dependendo do tipo de toxina pertussis empregada, obteve-se um coeficiente angular diferente; ou seja, uma inclinação da curva mais próxima da vertical para as preparações que receberam TxPm, o que assinala a ocorrência de “efeito secretório”, de forma semelhante às preparações que receberam o sobrenadante de macrófagos estimulados somente com MCLR.

Nas tabelas 15, 16, 17 e 18 dos anexos, podem ser observados os valores médios de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 15.

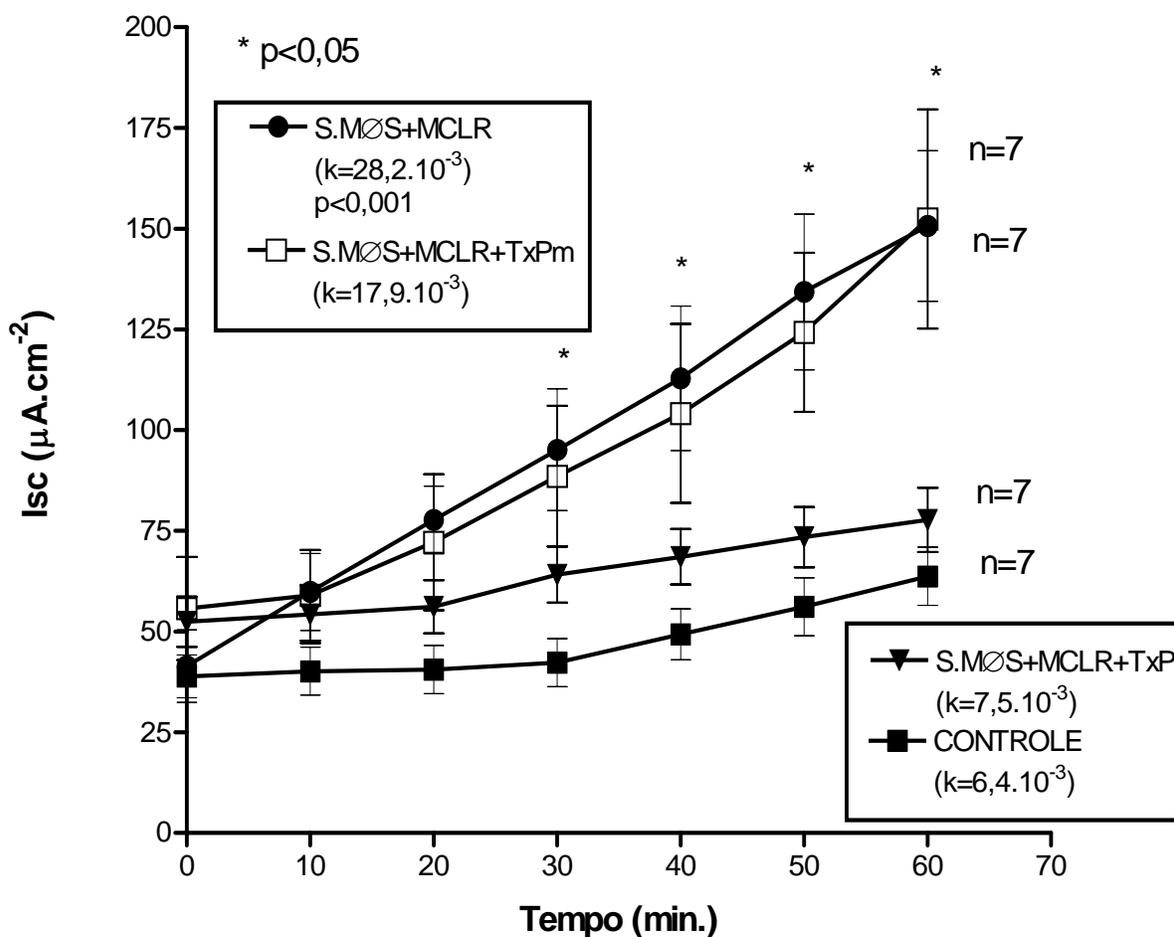


Figura 15. Atividade das toxinas de Bordetella pertussis sobre a liberação do fator responsável pela “secreção intestinal”. A “secreção intestinal” em íleo de coelho foi reduzida (84%), mediante o emprego de S.MØS estimulados com MCLR ($3,2\cdot 10^{-6}\text{M}$) + toxina pertussis (TxP, $9,5\cdot 10^{-7}\text{M}$); embora não se tenha conseguido um efeito similar, com a utilização da toxina pertussis mutante (TxPm, $9,5\cdot 10^{-7}\text{M}$). Os valores de Isc ($m\pm\text{epm}$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $\text{Isc} = \text{Isc}_0 \cdot e^{kt}$, sendo avaliado, estatisticamente, pelo teste de Tukey. Como controle, foram testados S.MØS não estimulados com MCLR.

4.1.6. Efeito de um inibidor de síntese protéica perante o fator de “secreção intestinal”

A aplicação do inibidor de síntese de proteína, cicloheximida (CHX; 10^{-5} M) na cultura de macrófagos estimulados por MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M), proporcionou a obtenção de um sobrenadante que não produziu efeito secretório em preparações de íleo em câmaras de Üssing ($\Delta I_{sc_{S.M\emptyset S+MCLR+CHX}} = 32,12 \pm 7,10 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=8$; com $p > 0,05$; em relação ao grupo controle, que teve ($\Delta I_{sc_{S.M\emptyset S+RPMI(CTROLE)}} = 24,71 \pm 3,75 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=7$). As preparações que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, tiveram $\Delta I_{sc_{S.M\emptyset S+MCLR}} = 98,42 \pm 20,70 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=7$, com um valor de $p < 0,001$.

Na Figura 16. pode-se verificar os valores de I_{sc} ($m \pm epm$), de “n” preparações foram plotados, segundo uma função do tipo $I_{sc} = I_{sc_0} \cdot e^{kt}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, $I_{sc_0} = 27,35 \pm 2,94 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k = 28,2 \pm 2,7 \cdot 10^{-3}$, com $p < 0,001$ contra o grupo controle em que $I_{sc_0} = 24,25 \pm 3,75 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k = 6,4 \pm 4,4 \cdot 10^{-3}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos pré-tratados com CHX, $I_{sc_0} = 16,95 \pm 3,29 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k = 8,1 \pm 5,5 \cdot 10^{-3}$, com $p > 0,05$.

É interessante observar, que a curva que assinala variação de corrente de curto-circuito (I_{sc}), tem uma inclinação, significativamente, maior do que aquelas apresentadas pelo grupo controle ou grupo que recebeu pré-tratamento com CHX.

Nas tabelas 19, 20 e 21 dos anexos, podem ser observados os valores médios de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 16.

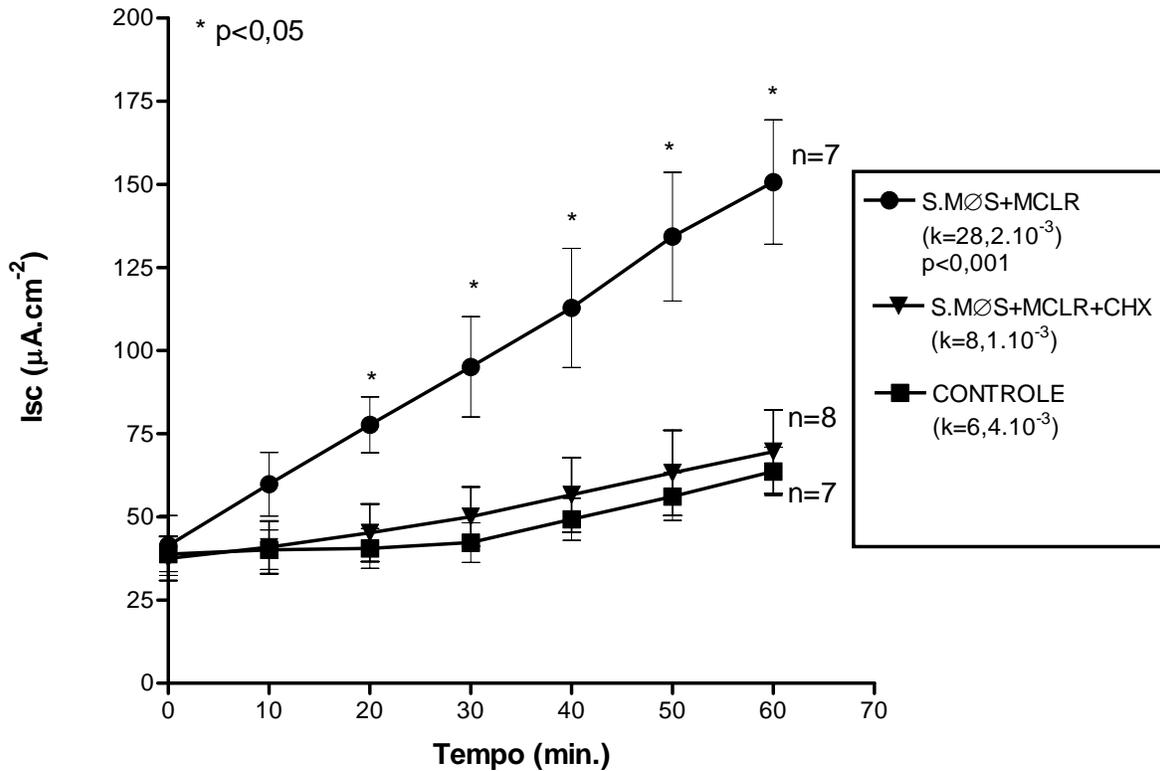


Figura 16. Efeito de um inibidor de síntese de proteína perante a liberação do fator de “secreção intestinal”. Não ocorreu “secreção intestinal” quando era aplicado às câmaras, S.MØS estimulados com cicloheximida (CHX, 10^{-5}M) e MCLR ($3,2\cdot 10^{-6}\text{M}$). Os valores de Isc ($m\pm\text{epm}$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $\text{Isc} = \text{Isc}_0 \cdot e^{kt}$, sendo avaliado, estatisticamente, pelo teste de Tukey. Como controle, foram testados S.MØS não estimulados com MCLR.

4.1.7. Participação das proteases na síntese do fator de “secreção intestinal”

A aplicação do inibidor de protease (1mg/ml), do tipo inibidor de tripsina e fluoreto de fenilmetilsulfonil, no período em que os macrófagos estariam liberando o fator de indução de secreção, após estimulação com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), proporcionou a obtenção de um sobrenadante que não produziu efeito secretório em preparações de íleo em câmaras de Üssing ($\Delta I_{sc_{S.M\emptyset S+MCLR+I.PROT}} = 30,50 \pm 3,57 \mu A.cm^{-2}$, $n=8$; com $p>0,05$; em relação ao grupo controle, que teve ($\Delta I_{sc_{S.M\emptyset S+RPMI(CONTROLE)}} = 24,71 \pm 3,75 \mu A.cm^{-2}$, $n=7$). As preparações que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, tiveram $\Delta I_{sc_{S.M\emptyset S+MCLR}} = 98,42 \pm 20,70 \mu A.cm^{-2}$, $n=7$, com um valor de $p<0,001$.

Na Figura 17. pode-se verificar que os valores de I_{sc} ($m \pm epm$), de “n” preparações foram plotados, segundo uma função do tipo $I_{sc} = I_{sc_0} \cdot e^{kt}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, $I_{sc_0} = 27,35 \pm 2,94 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 28,2 \pm 2,7 \cdot 10^{-3}$, com $p<0,001$ contra o grupo controle em que $I_{sc_0} = 24,25 \pm 3,75 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 6,4 \pm 4,4 \cdot 10^{-3}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos pré-tratados com I.PROT, $I_{sc_0} = 16,95 \pm 3,29 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 8,1 \pm 5,5 \cdot 10^{-3}$, com $p>0,05$.

Aqui também é interessante verificar, que a curva que assinala variação de corrente de curto-circuito (I_{sc}), tem uma inclinação, significativamente, maior do que aquelas apresentadas pelo grupo controle ou grupo que recebeu pré-tratamento com I. PROT.

Nas tabelas 22, 23 e 24 dos anexos, podem ser observados os valores médios de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 17.

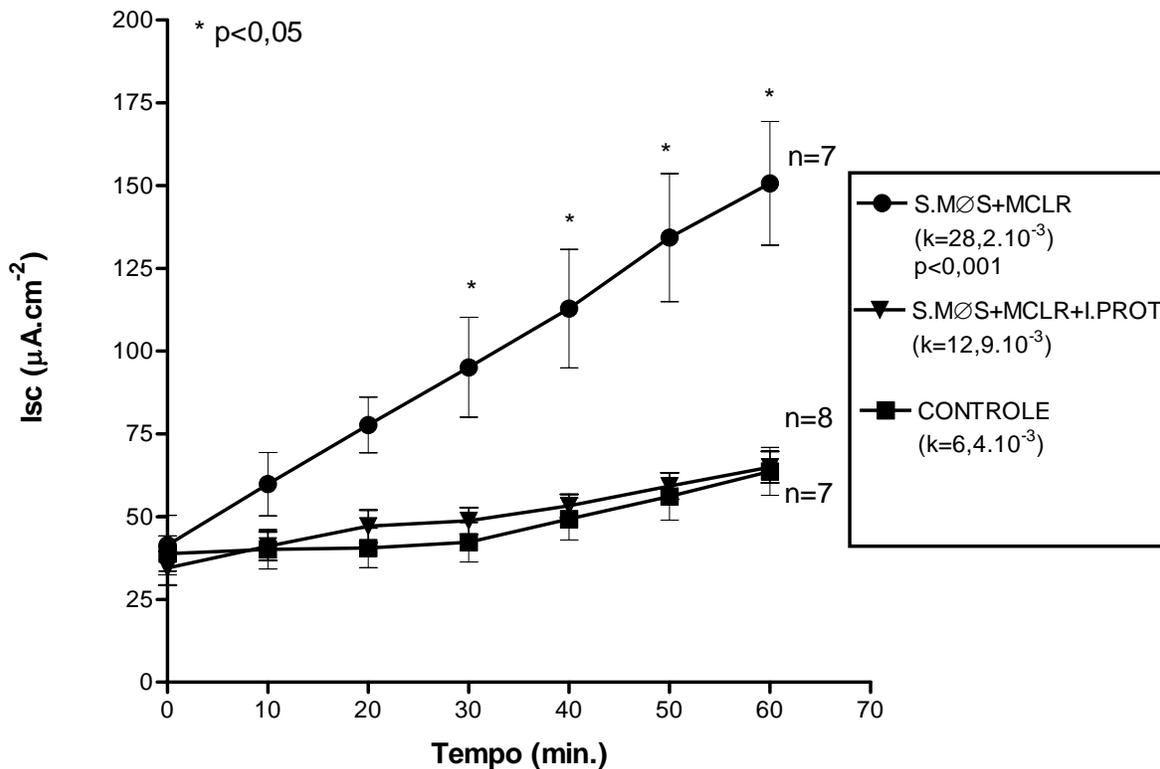


Figura 17. Participação de proteases na síntese do fator “de secreção intestinal”. Após a de macrófagos por uma hora com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6} M$), foi providenciada a incubação destes com inibidores de proteases (fluoreto de fenilmetilsulfonil e inibidor de tripsina, 1mg/ml). Este sobrenadante não promoveu efeito secretório quando adicionado em preparações de íleo de coelho. Os valores de Isc ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $Isc = I_{sc_0} \cdot e^{kt}$, sendo avaliado, estatisticamente, pelo teste de Tukey. Como controle, foram testados S.MØS não estimulados com MCLR.

4.1.8. Efeito da dexametasona na gênese do fator de “secreção intestinal”

A utilização de dexametasona (DEXA; 10^{-5} M), 30 min. antes e durante a aplicação de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M), proporcionou a obtenção de um sobrenadante que produziu efeito secretório reduzido em preparações de íleo em câmaras de Üssing ($\Delta I_{SCS.M\emptyset S+MCLR+DEXA} = 53,25 \pm 7,94 \mu A.cm^{-2}$, $n=8$; com $p > 0,05$; em relação ao grupo controle, que teve ($\Delta I_{SCS.M\emptyset S+RPMI(CONTROLE)} = 24,71 \pm 3,75 \mu A.cm^{-2}$, $n=7$). As preparações que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, tiveram $\Delta I_{SCS.M\emptyset S+MCLR} = 98,42 \pm 20,70 \mu A.cm^{-2}$, $n=7$, com um valor de $p < 0,001$.

Na Figura 18. pode-se verificar que os valores de I_{sc} ($m \pm epm$), de “n” preparações foram plotados, segundo uma função do tipo $I_{sc} = I_{sc0}.e^{kt}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, $I_{sc0} = 27,35 \pm 2,94 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 28,2 \pm 2,7 \cdot 10^{-3}$, com $p < 0,001$; contra o grupo controle em que $I_{sc0} = 24,25 \pm 3,75 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 6,4 \pm 4,4 \cdot 10^{-3}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos pré-tratados com DEXA, $I_{sc0} = 25,92 \pm 1,89 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 20,5 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$, com $p < 0,05$.

Neste caso, é interessante verificar, que ambas as curvas que assinalam variação de corrente de curto-circuito (I_{sc}), tem uma inclinação, significativamente, maior do que aquela apresentada pelo grupo controle; muito embora o efeito secretório produzido por S.M \emptyset S+MCLR tenha sido mais pronunciado do que aquele produzido por S.M \emptyset S+MCLR+DEXA, mas com inclinações não diferindo do ponto de vista estatístico, com $p > 0,05$.

Nas tabelas 19, 20 e 25 dos anexos, podem ser observados os valores médios de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 18.

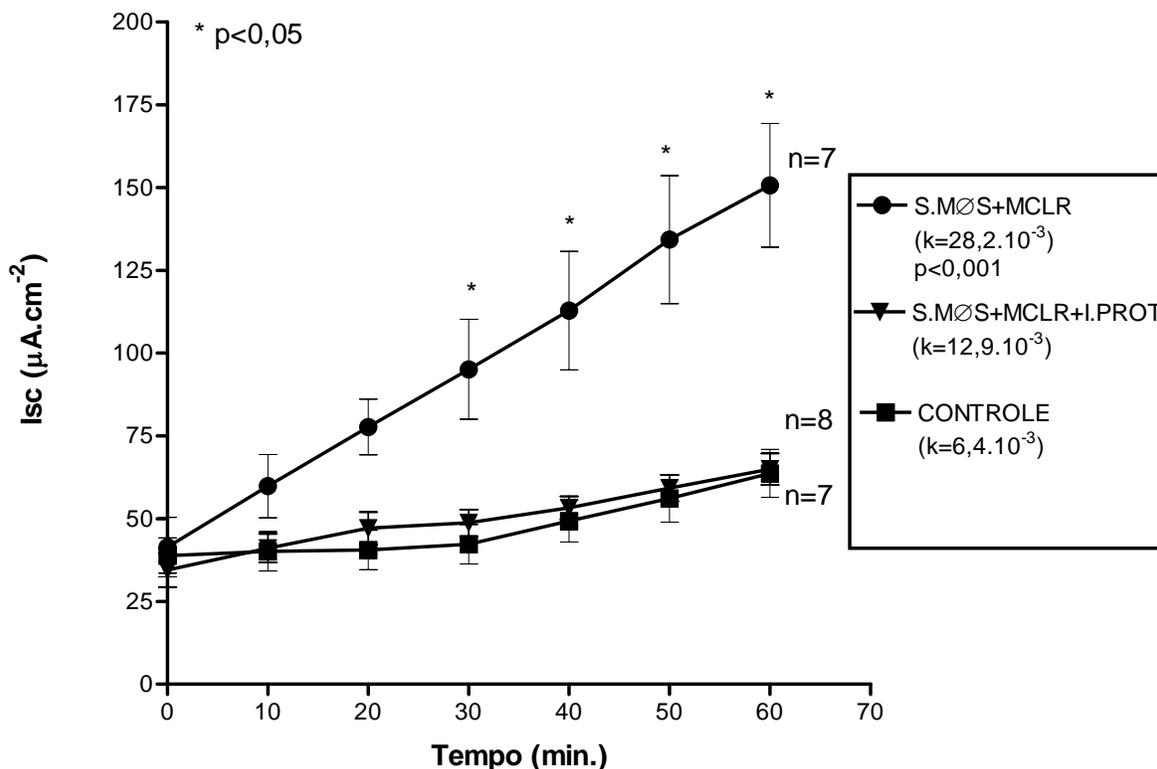


Figura 18. Efeito da dexametasona na gênese do fator de “secreção intestinal”. S.MØS estimulados com dexametasona (DEXA 10^{-5} M), 30 min. antes e ao longo do período de estimulação com MCLR ($3,2\cdot 10^{-6}$ M), não produziu efeito secretório em preparações de íleo de coelho; sugerindo um possível bloqueio na gênese do fator secretório. Os valores de Isc ($m\pm\text{epm}$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $\text{Isc} = \text{Isc}_0 \cdot e^{kt}$, sendo avaliado estatisticamente pelo teste de Tukey.

4.1.9. Efeito do bloqueador de fosfolipase A₂ sobre a gênese do fator de “secreção intestinal”

A aplicação de quinacrina (QUINAC; 10⁻⁵M), 30 min. antes e durante o período de aplicação de MCLR (3,2. 10⁻⁶M), proporcionou a obtenção de um sobrenadante que não produziu efeito secretório em preparações de íleo em câmaras de Üssing ($\Delta I_{sc_{S.M\emptyset S+MCLR+QUINAC}} = 22,12 \pm 3,73 \mu A.cm^{-2}$, n=8; com p>0,05; em relação ao grupo controle, que teve ($\Delta I_{sc_{S.M\emptyset S+RPMI(CTROLE)}} = 24,71 \pm 3,75 \mu A.cm^{-2}$, n=7). As preparações que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, tiveram $\Delta I_{sc_{S.M\emptyset S+MCLR}} = 98,42 \pm 20,70 \mu A.cm^{-2}$, n=7, com um valor de p<0,001.

Na Figura 19, pode-se verificar que os valores de Isc (m \pm epm), de “n”preparações, foram plotados, segundo uma função do tipo $I_{sc} = I_{sc_0}.e^{kt}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, $I_{sc_0} = 27,35 \pm 2,94 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 28,2 \pm 2,7. 10^{-3}$, com p<0,001 contra o grupo controle em que $I_{sc_0} = 24,25 \pm 3,75 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 6,4 \pm 4,4. 10^{-3}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos pré-tratados com QUINAC, $I_{sc_0} = 37,96 \pm 2,00 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 7,6 \pm 1,48. 10^{-3}$, com p>0,05.

É importante assinalar, que a curva que descreve uma significativa variação de corrente de curto-circuito (Isc), tem uma inclinação, significativamente, maior do que aquelas apresentadas pelo grupo controle ou grupo que recebeu pré-tratamento com QUINAC.

Nas tabelas 19,20 e 26 dos anexos, podem ser observados os valores médios de Isc que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 19.

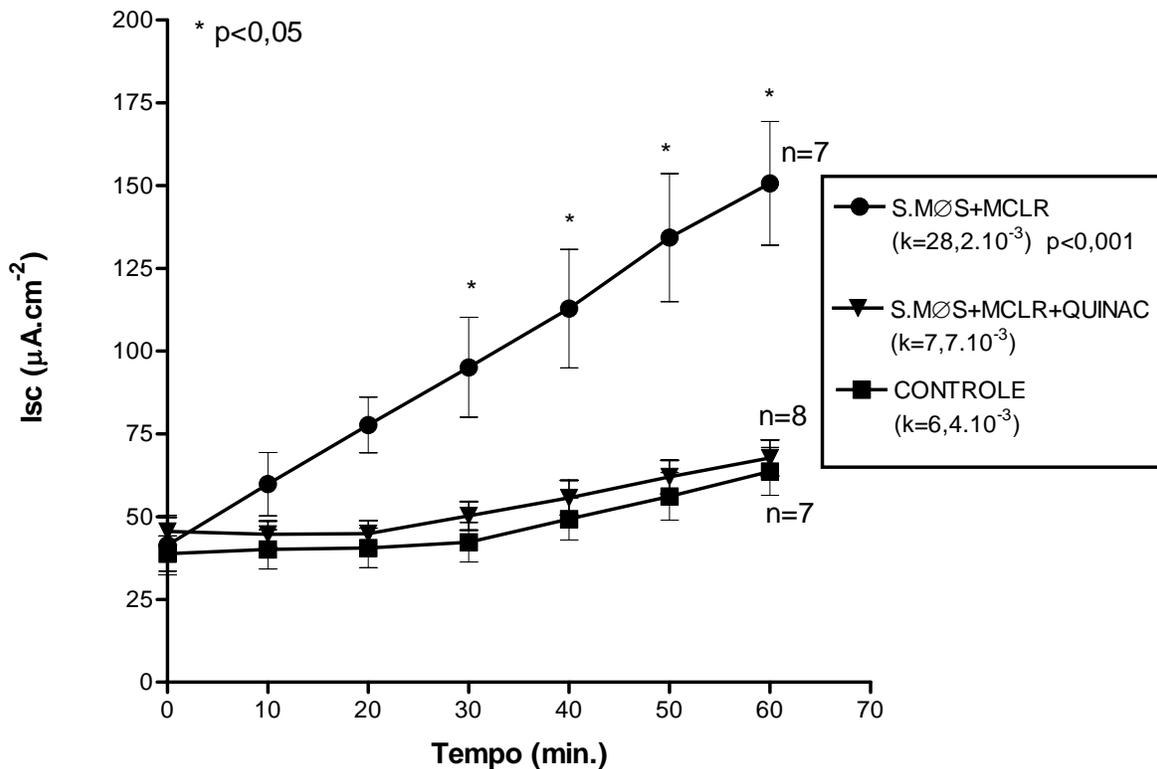


Figura 19. Efeito do bloqueador de fosfolipase A₂ sobre a gênese do fator de “secreção intestinal”. A aplicação de quinacrina (QUINAC.; 10⁻⁵M), à cultura de macrófagos antes e durante a estimulação com MCLR (3,2.10⁻⁶M), proporcionou a obtenção de um sobrenadante que não produziu efeito secretório em preparações de íleo de coelho; sugerindo um possível bloqueio na gênese do fator secretório. Os valores de Isc (m±epm), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $Isc = Isc_0 \cdot e^{kt}$, sendo avaliado estatisticamente pelo teste de Tukey.

4.1.10. Efeito do bloqueador dual de ciclo e lipoxigenase sobre a síntese do fator de “secreção intestinal”

O emprego de NDGA ($10^{-5}M$), um inibidor dual de ciclo e lipoxigenase, às culturas de macrófagos estimulados com ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), proporcionou a obtenção de um sobrenadante que não produziu efeito secretório em preparações de íleo em câmaras de Üssing ($\Delta I_{sc_{S.M\O S+MCLR+NDGA}} = 28,28 \pm 8,11 \mu A.cm^{-2}$, $n=7$; com $p>0,05$; em relação ao grupo controle, que teve ($\Delta I_{sc_{S.M\O S+RPMI(CONTROLE)}} = 24,71 \pm 3,75 \mu A.cm^{-2}$, $n=7$). As preparações que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, tiveram $\Delta I_{sc_{S.M\O S+MCLR}} = 98,42 \pm 20,70 \mu A.cm^{-2}$, $n=7$, com um valor de $p<0,001$.

Na Figura 20 pode-se verificar que os valores de I_{sc} ($m \pm epm$), de “n” preparações foram plotados, segundo uma função do tipo $I_{sc} = I_{sc_0} \cdot e^{kt}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, $I_{sc_0} = 27,35 \pm 2,94 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 28,2 \pm 2,7 \cdot 10^{-3}$, com $p<0,001$ contra o grupo controle em que $I_{sc_0} = 24,25 \pm 3,75 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 6,4 \pm 4,4 \cdot 10^{-3}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos pré-tratados com NDGA, $I_{sc_0} = 36,12 \pm 3,09 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 7,5 \pm 2,4 \cdot 10^{-3}$, com $p>0,05$.

É importante assinalar, que a curva que descreve uma significativa variação de corrente de curto-circuito (I_{sc}), tem uma inclinação, significativamente, maior do que aquelas apresentadas pelo grupo controle ou grupo que recebeu pré-tratamento com NDGA.

Nas tabelas 19, 20 e 27 dos anexos, podem ser observados os valores médios de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 20.

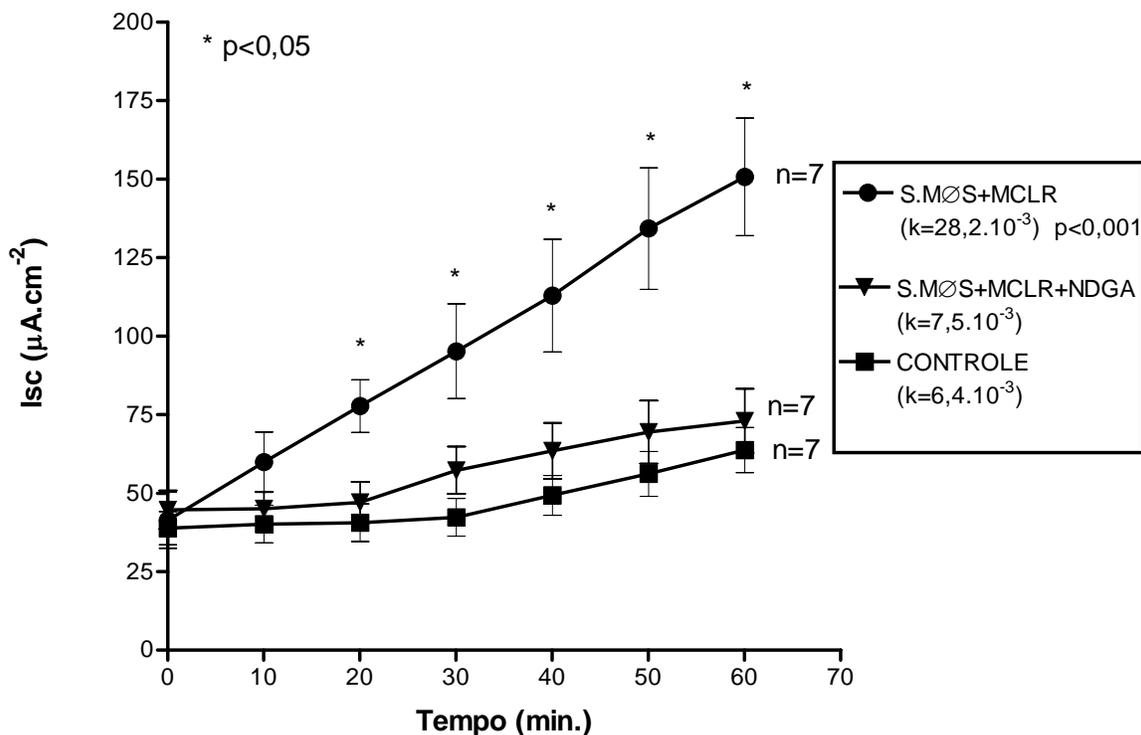


Figura 20. Efeito do bloqueador dual de ciclo e lipoxigenase sobre a síntese do fator de “secreção intestinal. NDGA ($10^{-5}M$), quando aplicado às culturas de macrófagos estimulados com MCLR ($3,2.10^{-6}M$), produziu uma redução do fator responsável pela secreção intestinal em preparações de íleo de coelho, sugerindo um possível bloqueio nos mecanismos metabólicos envolvidos com a gênese deste possível fator secretório. Os valores de Isc ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $Isc = Isc_0. e^{kt}$, sendo avaliado estatisticamente pelo teste de Tukey.

4.1.11. Efeito do inibidor de ciclooxigenase na síntese do fator de secreção intestinal

O emprego de indometacina (INDO; 10^{-5}M), um inibidor inespecífico de ciclooxigenase, às culturas de macrófagos estimulados com ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$), proporcionou a obtenção de um sobrenadante que não produziu efeito secretório em preparações de íleo em câmaras de Üssing ($\Delta\text{Isc}_{\text{S.MØS+MCLR+INDO}} = 21,61 \pm 5,68 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n=8$; com $p>0,05$; em relação ao grupo controle, que teve ($\Delta\text{Isc}_{\text{S.MØS+RPMI(CONTROLE)}} = 26,00 \pm 2,96 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n=7$). As preparações que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, tiveram $\Delta\text{Isc}_{\text{S.MØS+MCLR}} = 151,87,42 \pm 20,96 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n=8$, com um valor de $p<0,001$.

Na Figura 21. pode-se verificar que os valores de Isc ($m \pm \text{epm}$), de “n” preparações foram plotados, segundo uma função do tipo $\text{Isc} = \text{Isc}_0 \cdot e^{kt}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, $\text{Isc}_0 = 23,10 \pm 2,25 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $k = 31,37 \pm 2,6 \cdot 10^{-3}$, com $p<0,001$ contra o grupo controle em que $\text{Isc}_0 = 29,55 \pm 2,20 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $k = 9,5 \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos pré-tratados com INDO, $\text{Isc}_0 = 35,75 \pm 3,84 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $k = 4,4 \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$, com $p>0,05$.

Aqui, também é importante assinalar, que a curva que descreve uma significativa variação de corrente de curto-circuito (Isc), tem uma inclinação, significativamente, maior do que aquelas apresentadas pelo grupo controle ou grupo que recebeu pré-tratamento com INDO.

Nas tabelas 28, 29 e 30 dos anexos, podem ser observados os valores médios de Isc que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 21.

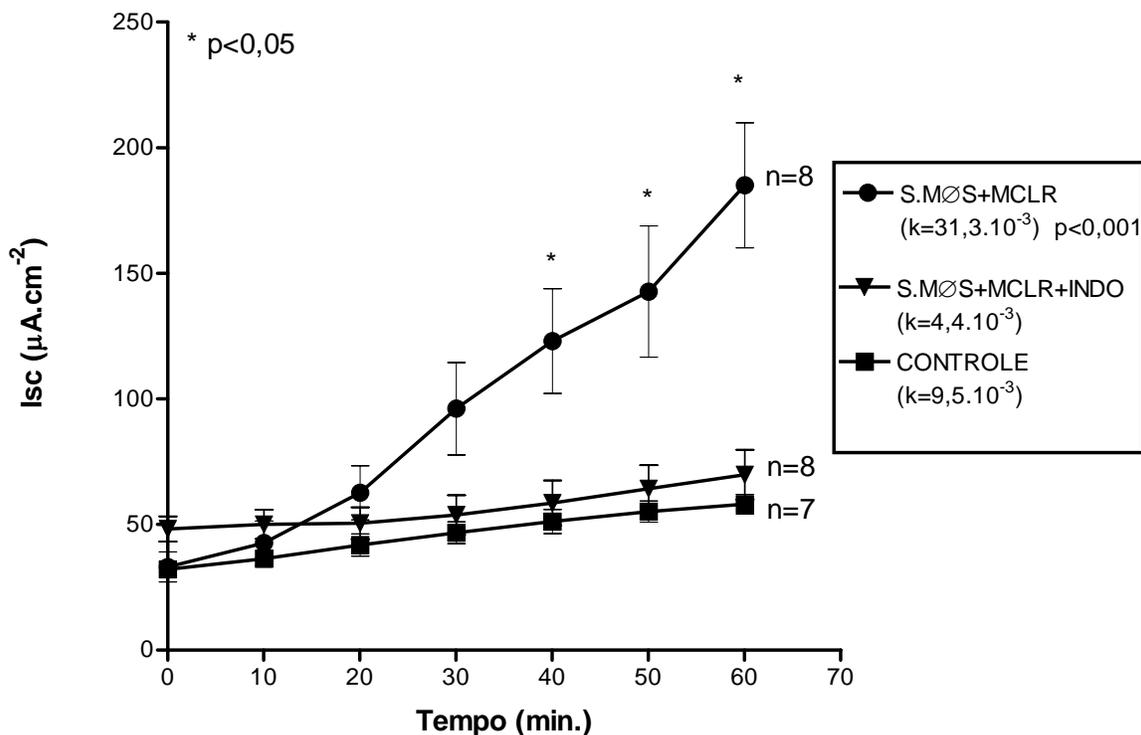


Figura 21. Efeito do inibidor de ciclooxigenase na síntese do fator de “secreção intestinal”. A aplicação prévia de indometacina (INDO, 10^{-5}M), às culturas de macrófagos estimulados MCLR ($3,2\cdot 10^{-6}\text{M}$), não produziu efeito secretório em preparações de íleo de coelho; sugerindo um possível bloqueio na produção do fator de secreção intestinal, nestas preparações. Os valores de Isc ($m\pm\text{epm}$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $\text{Isc} = \text{Isc}_0 \cdot e^{kt}$, sendo avaliado estatisticamente pelo teste de Tukey.

4.1.12. Efeito do inibidor de lipoxigenase na síntese do fator de “secreção intestinal”

O emprego de MK886 (10^{-5} M), um inibidor específico de lipoxigenase às culturas de macrófagos estimulados com ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M), proporcionou a obtenção de um sobrenadante que produziu efeito secretório parcial em preparações de íleo em câmaras de Üssing ($\Delta I_{sc_{S.M\emptyset S+MCLR+MK886}} = 79,42 \pm 3,30 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=7$; com $p < 0,01$; em relação ao grupo controle, que teve ($\Delta I_{sc_{S.M\emptyset S+RPMI(CONTROLE)}} = 20,00 \pm 3,40 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=7$). As preparações que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, tiveram $\Delta I_{sc_{S.M\emptyset S+MCLR}} = 151,87 \pm 20,96 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=8$, com um valor de $p < 0,001$.

Na Figura 22. pode-se verificar que os valores de I_{sc} ($m \pm epm$), de “n” preparações plotados, segundo uma função do tipo $I_{sc} = I_{sc_0} \cdot e^{kt}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, $I_{sc_0} = 23,10 \pm 2,25 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k = 31,3 \pm 2,6 \cdot 10^{-3}$, com $p < 0,001$ contra o grupo controle em que $I_{sc_0} = 24,25 \pm 3,75 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k = 6,4 \pm 4,4 \cdot 10^{-3}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos pré-tratados com MK886, $I_{sc_0} = 35,88 \pm 2,22 \mu A \cdot cm^{-2}$ e $k = 19,1 \pm 1,6 \cdot 10^{-3}$, com $p < 0,01$.

É importante assinalar, que a curva que descreve uma significativa variação de corrente de curto-circuito (I_{sc}), tem uma inclinação, significativamente, maior do que aquelas apresentadas pelo grupo controle ou grupo que recebeu pré-tratamento com MK886.

Nas tabelas 28, 29 e 31 dos anexos, podem ser observados os valores médios de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 22.

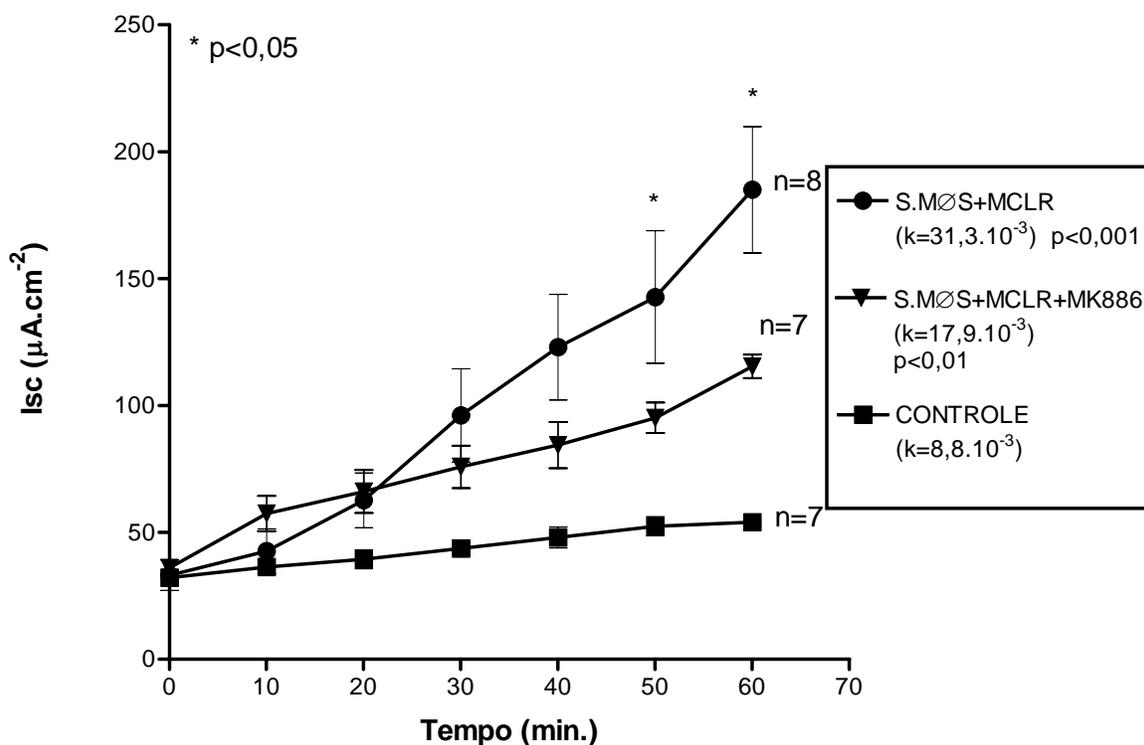


Figura 22. Efeito do inibidor de lipoxigenase na síntese do fator de “secreção intestinal”. A adição de MK886 ($10^{-5}M$), às culturas de macrófagos, antes e durante o período de estímulo com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), provocou um bloqueio parcial dos processos de produção do fator de secreção intestinal; uma vez que os efeitos secretórios foram diminuídos de 46,5%. Os valores de Isc ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $Isc = I_{sc_0} \cdot e^{kt}$, sendo avaliado estatisticamente pelo teste de Tukey.

4.1.13. Efeito do bloqueador de ciclooxygenase 2 sobre a síntese do fator de “secreção intestinal”

A aplicação de NS398 (10^{-5}M), 30 min. antes e durante o período de aplicação de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$), proporcionou a obtenção de um sobrenadante que produziu efeito secretório parcial em preparações de íleo em câmaras de Üssing ($\Delta\text{Isc}_{\text{S.MØS+MCLR+NS398}} = 49,33 \pm 2,06 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n=6$; com $p>0,05$; em relação ao grupo controle, que teve ($\Delta\text{Isc}_{\text{S.MØS+RPMI(CONTROLE)}} = 24,71 \pm 3,79 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n=7$). As preparações que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, tiveram $\Delta\text{Isc}_{\text{S.MØS+MCLR}} = 98,42 \pm 20,70 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n=7$, para um valor de $p<0,001$.

Na Figura 23. pode-se verificar que os valores de Isc ($m \pm \text{epm}$), de “n” preparações foram plotados, segundo uma função do tipo $\text{Isc} = \text{Isc}_0 \cdot e^{kt}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, $\text{Isc}_0 = 27,35 \pm 2,94 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $k = 28,2 \pm 2,7 \cdot 10^{-3}$, com $p<0,001$ contra o grupo controle em que $\text{Isc}_0 = 24,25 \pm 3,75 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $k = 6,4 \pm 4,4 \cdot 10^{-3}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos pré-tratados com NS398, $\text{Isc}_0 = 49,99 \pm 1,86 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $k = 12,66 \pm 1,0 \cdot 10^{-3}$, com $p>0,05$.

É importante assinalar, que as curvas que descreveram uma significativa variação de corrente de curto-circuito (Isc), tem uma inclinação, significativamente, maior do que a curva apresentada pelo grupo controle, caracterizado por macrófagos que não receberam estímulo por MCLR.

Nas tabelas 32, 33 e 34 dos anexos, podem ser observados os valores médios de Isc que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 23.

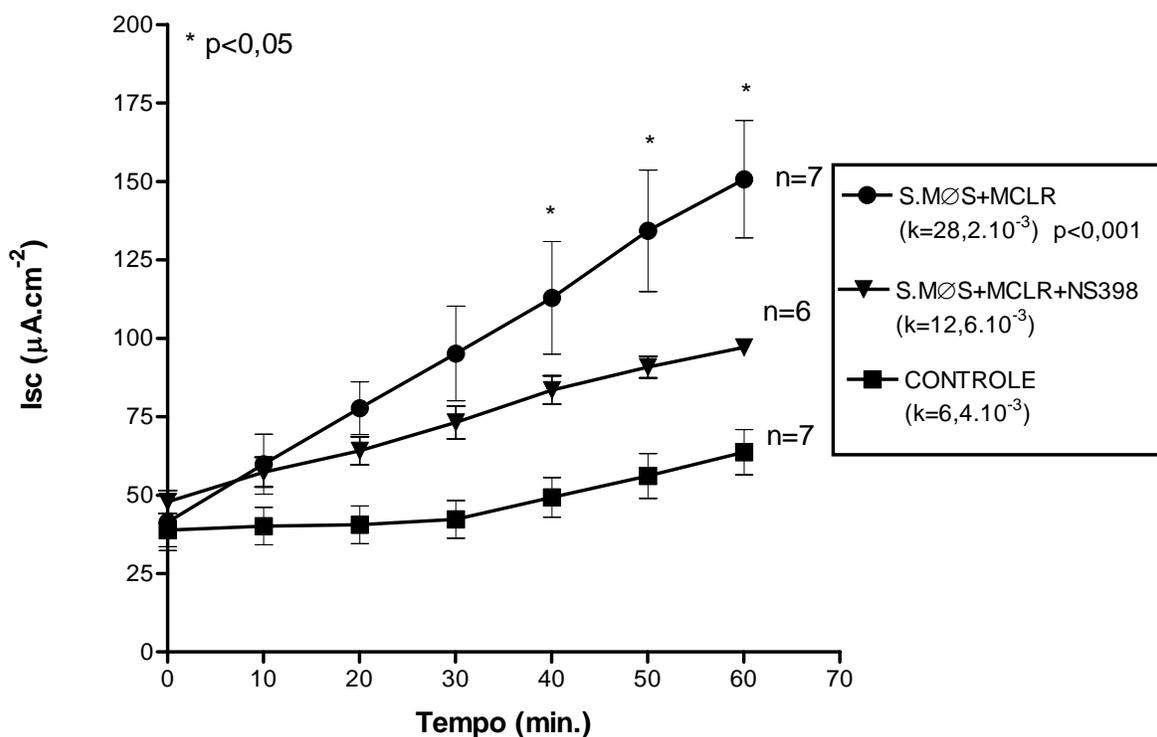


Figura 23. Efeito do bloqueador de ciclooxygenase 2 sobre a síntese do fator de “secreção intestinal”. NS398 (10^{-5}M), quando aplicado às culturas de macrófagos estimulados MCLR ($3,2\cdot 10^{-6}\text{M}$), produziu uma redução (49,8%) do fator responsável pela secreção intestinal em preparações de íleo de coelho, sugerindo um possível bloqueio na gênese do fator secretório. Os valores de Isc ($m\pm\text{epm}$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $\text{Isc} = \text{Isc}_0 \cdot e^{kt}$, sendo avaliado estatisticamente pelo teste de Tukey.

4.1.14. Participação do fator de agregação plaquetária nos processos metabólicos de formação do fator de “secreção intestinal”

A adição de WEB2086 (WEB; 10^{-5} M), 30 min. antes e durante o período de aplicação de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M), proporcionou a obtenção de um sobrenadante que produziu efeito secretório parcial em preparações de íleo em câmaras de Üssing ($\Delta I_{SCS.M\emptyset S+MCLR+WEB} = 87,12 \pm 6,47 \mu A.cm^{-2}$, $n=8$; com $p < 0,01$; em relação ao grupo controle, que teve ($\Delta I_{SCS.M\emptyset S+RPMI(CONTOLE)} = 20,00 \pm 3,4 \mu A.cm^{-2}$, $n=7$). As preparações que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, tiveram $\Delta I_{SCS.M\emptyset S+MCLR} = 151,87 \pm 20,96 \mu A.cm^{-2}$, $n=8$, para um valor de $p < 0,001$.

Na Figura 24. pode-se verificar que os valores de I_{sc} ($m \pm epm$), de “n” preparações foram plotados, segundo uma função do tipo $I_{sc} = I_{sc0} \cdot e^{kt}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, $I_{sc0} = 23,10 \pm 2,25 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 31,3 \pm 2,6 \cdot 10^{-3}$, com $p < 0,001$ contra o grupo controle em que $I_{sc0} = 29,58 \pm 2,00 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 8,7 \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos pré-tratados com WEB2086, $I_{sc0} = 24,66 \pm 1,70 \mu A.cm^{-2}$ e $k = 26,0 \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$, com $p < 0,01$.

É importante assinalar, que as curvas que descreveram uma importante variação de corrente de curto-circuito (I_{sc}), tem uma inclinação, significativamente, maior do que a curva apresentada pelo grupo controle, caracterizado por macrófagos que não receberam estímulo por MCLR.

Nas tabelas 28, 29 e 35 dos anexos, podem ser observados os valores médios de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 24.

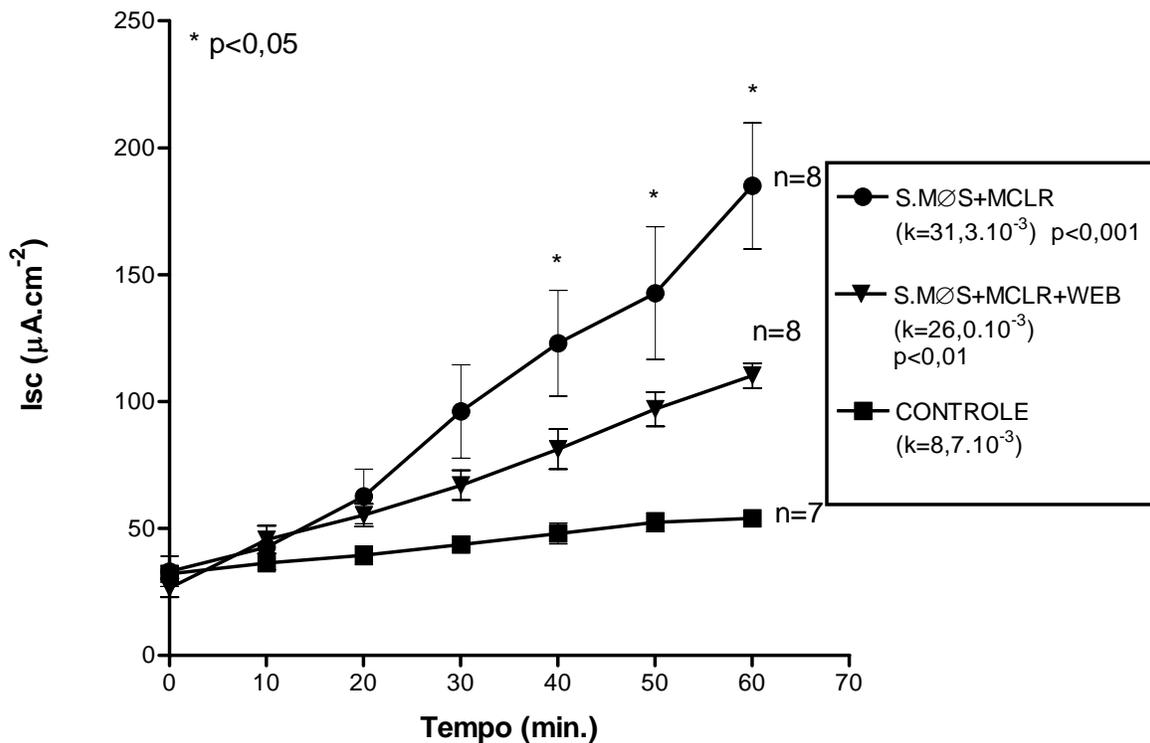


Figura 24. Participação do fator de agregação plaquetária nos processos metabólicos de formação do fator de “secreção intestinal”. Culturas de macrófagos pré-tratadas com WEB2086 (10^{-5}M), e estimuladas com MCLR ($3,2\cdot 10^{-6}\text{M}$), provocou um bloqueio parcial dos processos de produção do fator de secreção intestinal; uma vez que os efeitos secretórios foram diminuídos de 57,0%. Os valores de Isc ($m\pm\text{epm}$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $\text{Isc} = \text{Isc}_0 \cdot e^{kt}$, sendo avaliado estatisticamente pelo teste de Tukey.

4.1.15. Efeito da pentoxifilina sobre a síntese do fator de “secreção intestinal”

O adição de Pentoxifilina (PTF; $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$), 30 min. antes e durante o período de aplicação de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$), proporcionou a obtenção de um sobrenadante que produziu efeito secretório parcial em preparações de íleo em câmaras de Üssing ($\Delta I_{\text{SCS.M}\varnothing\text{S+MCLR+PTF}} = 82,37 \pm 4,87 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n=8$; com $p < 0,01$; em relação ao grupo controle, que teve ($\Delta I_{\text{SCS.M}\varnothing\text{S+RPMI(CTROLE)}} = 20,00 \pm 3,4 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n=7$). As preparações que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, tiveram $\Delta I_{\text{SCS.M}\varnothing\text{S+MCLR}} = 151,87 \pm 20,96 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n=8$, para um valor de $p < 0,001$.

Na Figura 25. pode-se verificar que os valores de I_{sc} ($m \pm \text{epm}$), de “n” preparações foram plotados, segundo uma função do tipo $I_{\text{sc}} = I_{\text{sc}_0} \cdot e^{kt}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, $I_{\text{sc}_0} = 23,10 \pm 2,25 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $k = 31,3 \pm 2,6 \cdot 10^{-3}$, com $p < 0,001$ contra o grupo controle em que $I_{\text{sc}_0} = 29,58 \pm 2,00 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $k = 8,7 \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos pré-tratados com PTF, $I_{\text{sc}_0} = 28,87 \pm 2,13 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $k = 23,7 \pm 1,9 \cdot 10^{-3}$, com $p < 0,01$.

Aqui também é importante assinalar, que as curvas que descreveram uma considerável variação de corrente de curto-circuito (I_{sc}), tem uma inclinação, significativamente, maior do que a curva apresentada pelo grupo controle, caracterizado por macrófagos que não receberam estímulo por MCLR.

Nas tabelas 28, 29 e 36 dos anexos, podem ser observados os valores médios de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 25.

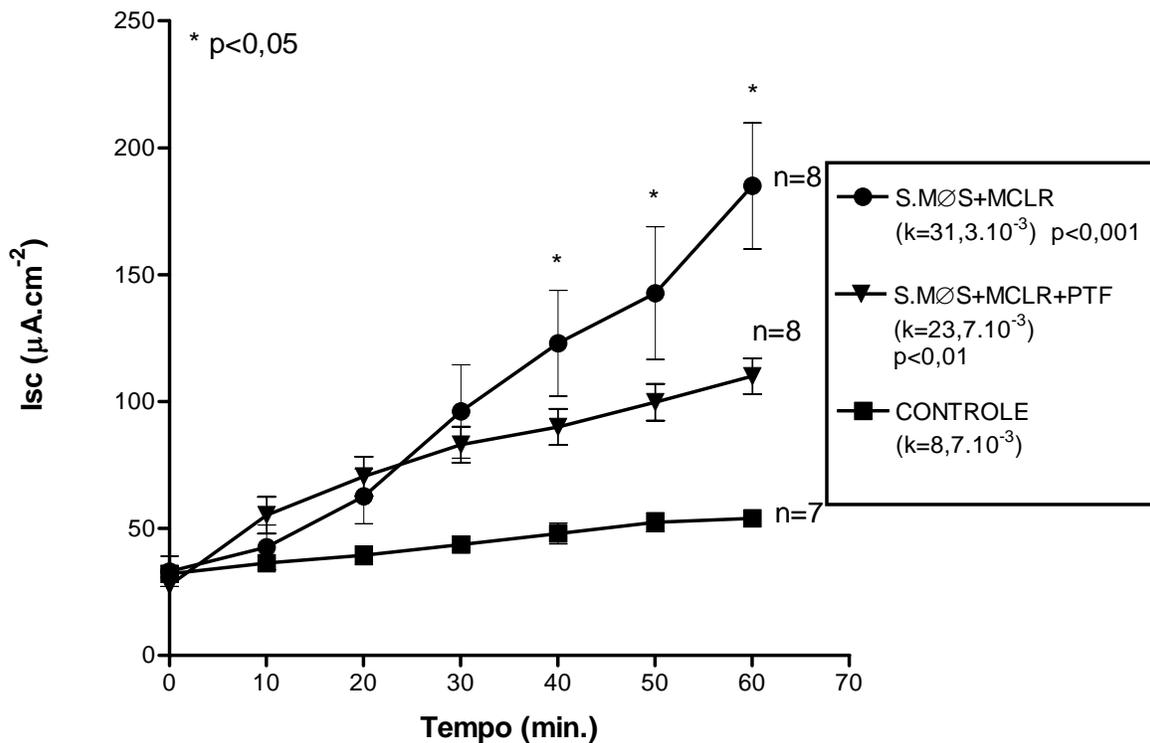


Figura 25. Efeito da pentoxifilina sobre a síntese do fator de “secreção intestinal”. A adição de pentoxifilina (PTF, $5,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$), às culturas de macrófagos antes e durante o período de estimulação com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$), provocou um bloqueio parcial dos processos de produção do fator de secreção intestinal; uma vez que os efeitos secretórios foram diminuídos de 57%. Os valores de Isc ($m \pm \text{epm}$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $\text{Isc} = \text{Isc}_0 \cdot e^{kt}$, sendo avaliado estatisticamente pelo teste de Tukey.

4.1.16. Efeito da talidomida sobre os processos metabólicos de formação do fator de “secreção intestinal”

A aplicação de talidomida (TAL; 10^{-5}M), 30 min. antes e durante o período de aplicação de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$), proporcionou a obtenção de um sobrenadante que produziu efeito secretório parcial em preparações de íleo em câmaras de Üssing ($\Delta\text{Isc}_{\text{S.M}\varnothing\text{S}+\text{MCLR}+\text{TAL}} = 53,77 \pm 3,00 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n=9$; com $p < 0,01$; em relação ao grupo controle, que teve ($\Delta\text{Isc}_{\text{S.M}\varnothing\text{S}+\text{RPMI}(\text{CONTROLE})} = 20,00 \pm 3,4 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n=7$). As preparações que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, tiveram $\Delta\text{Isc}_{\text{S.M}\varnothing\text{S}+\text{MCLR}} = 151,87 \pm 20,96 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n=8$, para um valor de $p < 0,001$.

Na Figura 26, pode-se verificar que os valores de Isc ($m \pm \text{epm}$), de “n” preparações foram plotados, segundo uma função do tipo $\text{Isc} = \text{Isc}_0 \cdot e^{kt}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, $\text{Isc}_0 = 23,10 \pm 2,25 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $k = 31,3 \pm 2,6 \cdot 10^{-3}$, com $p < 0,001$ contra o grupo controle em que $\text{Isc}_0 = 29,58 \pm 2,00 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $k = 8,7 \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$. Para os grupos que receberam sobrenadante de macrófagos pré-tratados com TAL, $\text{Isc}_0 = 24,70 \pm 1,54 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $k = 19,2 \pm 1,7 \cdot 10^{-3}$, com $p < 0,01$.

É importante destacar, que as curvas que descreveram uma considerável variação de corrente de curto-circuito (Isc), tem uma inclinação, significativamente, maior do que a curva apresentada pelo grupo controle, caracterizado por macrófagos que não receberam estímulo por MCLR.

Nas tabelas 28, 29 e 37 dos anexos, podem ser observados os valores médios de Isc que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 26.

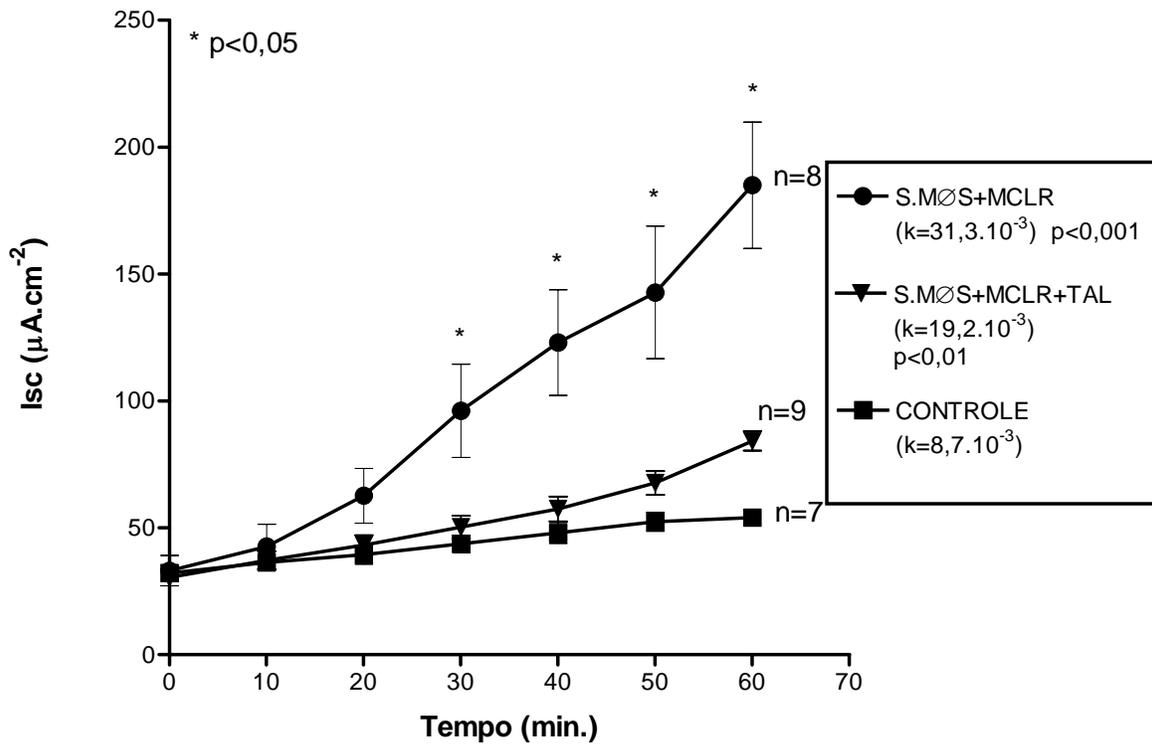


Figura 26. Efeito da talidomida sobre os processos metabólicos de formação do fator de “secreção intestinal”. Culturas de macrófagos pré-tratadas com talidomida (TAL, $1,5\cdot 10^{-5}\text{M}$), antes e durante o período de estimulação com MCLR ($3,2\cdot 10^{-6}\text{M}$), provocou um bloqueio parcial dos processos de produção do fator de secreção intestinal; uma vez que os efeitos secretórios foram diminuídos de 77,1%. Os valores de Isc ($m\pm epm$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular para uma função do tipo $Isc = Isc_0 \cdot e^{kt}$, sendo avaliado estatisticamente pelo teste de Tukey.

4.1.17. Dosagem de TNF- α no sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

Uma avaliação do conteúdo de TNF- α do sobrenadante de macrófagos estimulados por diferentes concentrações de MCLR, por intermédio do procedimento denominado de ELISA; permitiu a verificação das seguintes concentrações: S.MØS_{RPMI (CONTROLE)}=165,00±35,40 pg/ml, n=5; S.MØS_{MCLR(3,2.10⁻⁷ M)}=375,40±43,70 pg/ml, n=5; S.MØS_{MCLR(9,6.10⁻⁷ M)}=369,00±53,30 pg/ml, n=6; S.MØS_{MCLR(3,2.10⁻⁶ M)}=610,80±96,50 pg/ml, n=6, p<0,001. Os dados acima foram plotados na Figura 27.

Desta forma, verifica-se que a concentração de TNF- α no sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, aumenta, a medida em que a concentração de MCLR aumenta; podendo ser descrita por uma função matemática que relaciona ambas as variáveis. Pode-se, portanto, admitir a existência de uma relação de dose-dependência.

No item 4.6 deste mesmo capítulo referente aos resultados, a expressão matemática obtida à partir dos dados acima será utilizada para se avaliar a dinâmica de produção desta citosina em relação a ação de outras toxinas sobre macrófagos.

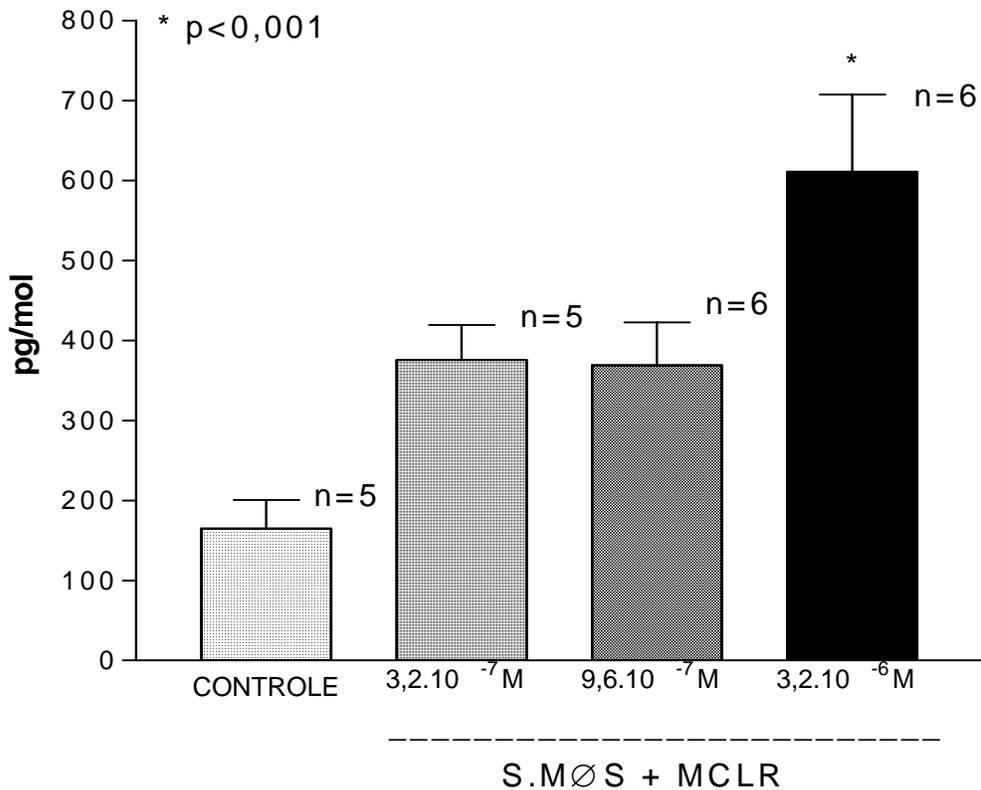


Figura 27. Dosagem de TNF- α no sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR. O conteúdo de TNF- α no S.MØS estimulados com doses crescentes de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $9,6 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ e $3,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$), foi avaliado por meio da técnica de ELISA, apresentando valores aumentados de forma dose-dependente. Os valores ($m \pm \text{epm}$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*).

4.1.18. Efeito do antagonista do receptor de interleucina-1 na “secreção intestinal”

A aplicação de IL-1ra ($4,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$), um antagonista do receptor de interleucina-1 no lado seroso das preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, trinta minutos antes da aplicação do sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$) ao sistema; promoveu um bloqueio significativo do efeito secretor ($\Delta \text{Isc}_{\text{S.MØS+MCLR}} = 159,71 \pm 10,51 \text{ } \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n=10$, $p < 0,001$; ($\Delta \text{Isc}_{\text{S.MØS+MCLR+IL-1ra}} = 23,50 \pm 3,24 \text{ } \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n=6$, $p > 0,05$; ($\Delta \text{Isc}_{\text{S.MØS+RPMI (CONTROLE)}} = 21,86 \pm 1,29 \text{ } \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n=8$).

Estes dados sugerem a participação deste tipo de receptor no processo secretório induzido por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR (Figura 28).

Nas tabelas 13, 38 e 39 dos anexos, podem ser observados os valores médios de Isc que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 28.

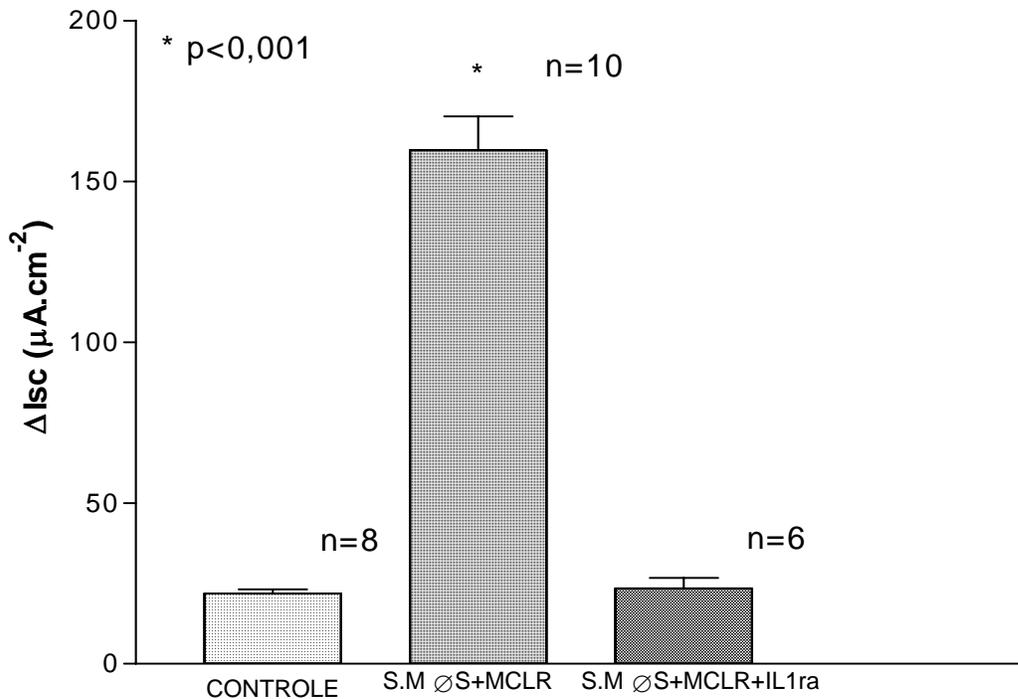


Figura 28. Efeito do antagonista do receptor de interleucina-1 na “secreção intestinal”. No lado seroso das preparações em câmaras de Üssing, era adicionado IL-1ra ($4,5 \cdot 10^{-6}M$), 30 min. antes do adição do S.MØS estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), provocando um bloqueio de 98,8% no processo de secreção intestinal. Os valores de Isc ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*).

4.1.19. Efeito dos anticorpos anti-IL1 α e anti-IL1 β no processo de “secreção intestinal” induzido por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

Verificou-se que a aplicação do anticorpo monoclonal anti-IL1 β (250 μ g/ml), ao sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR (3,2.10⁻⁶M), 30 minutos antes do seu adicionamento às câmaras de Üssing, diminui acentuadamente o efeito secretório nestas preparações; o que configura uma forte evidência da participação de IL1 β neste processo ($\Delta I_{scS.M\emptyset S+MCLR}=159,71\pm 10,51 \mu A.cm^{-2}$, n=10, p<0,001; $\Delta I_{scS.M\emptyset S+MCLR+ANTI-IL1\beta}=35,00\pm 1,98 \mu A.cm^{-2}$, n=6, p>0,05; $\Delta I_{scS.M\emptyset S+RPMI (CONTROLE)}=21,86\pm 1,29 \mu A.cm^{-2}$, n=8) (Figura 29).

Já com relação à aplicação do anticorpo monoclonal anti-IL1 α (250 μ g/ml), em condições semelhantes às anteriores, verificou-se que este não diminuía, de forma acentuada, o efeito secretório induzido por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, como ocorria com a aplicação de anti-IL-1 β . ($\Delta I_{scS.M\emptyset S+MCLR+ANTI-IL1\alpha}=75,00\pm 5,55 \mu A.cm^{-2}$, n=6, p<0,05, em relação ao grupo controle (Figura 29).

A adição associada dos dois tipos de anticorpos monoclonais (anti-IL1 α e anti-IL1 β ; 250 μ g/ml), no sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR; provocou uma forte inibição do efeito secretório, não diferindo estatisticamente daquele obtido pelo anticorpo monoclonal anti-IL1 β ($\Delta I_{scS.M\emptyset S+MCLR+ANTI-IL1\alpha/\beta}=28,00\pm 2,65 \mu A.cm^{-2}$, n=6, p>0,05) (Figura 29).

Esta também é uma boa evidência da participação de IL1 β , como principal elemento responsável pelo processo secretório induzido por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR (Figura 29).

Nas tabelas 13, 38, 40, 41 e 42, dos anexos, podem ser observados os valores médios de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 29.

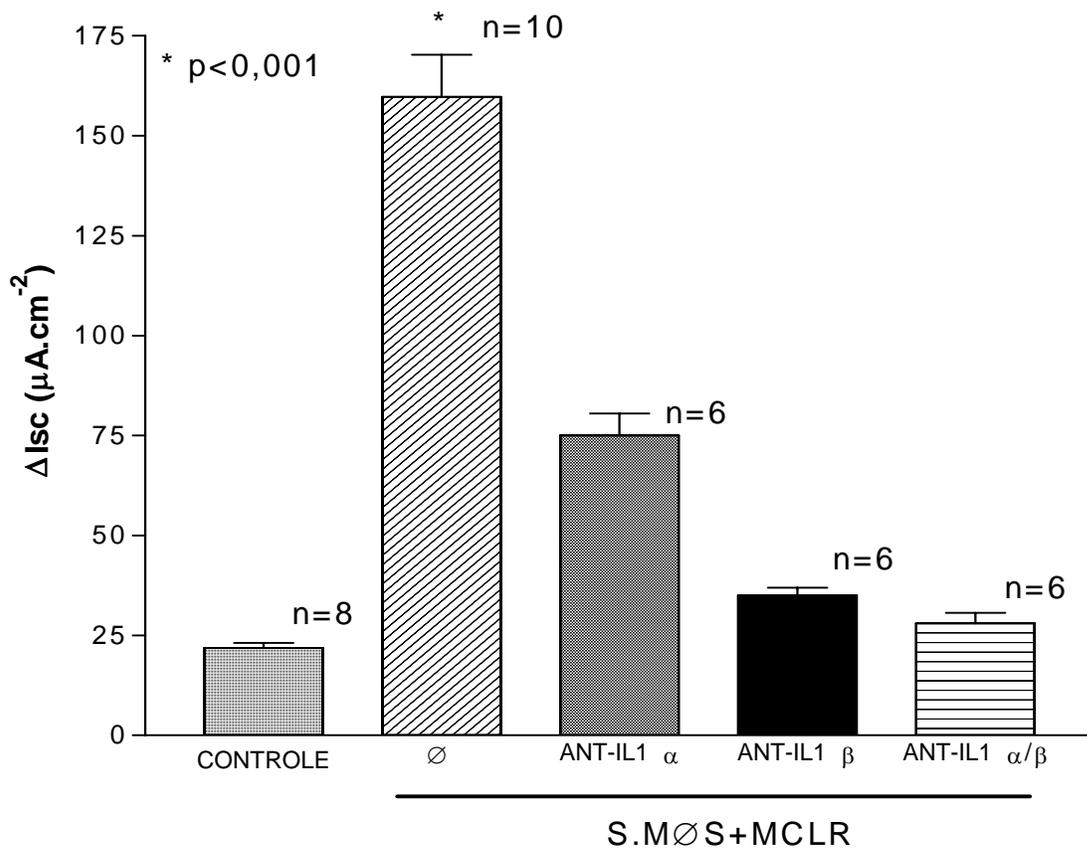


Figura 29. Efeito dos anticorpos anti-IL1 α e anti-IL1 β no processo de “secreção intestinal” induzida por S.MØS estimulados por MCLR. A incubação prévia do S.MØS estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), e anti-IL1 β e depois com anti-IL1 α e anti-IL1 β , conjuntamente, (250 μ l/ml); provocou um bloqueio no processo de secreção intestinal de 91,6% e 96,7%, respectivamente. Anti-IL1 α produziu um efeito inibitório de apenas 62%. Os valores de Isc ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*).

4.1.20.Determinação da concentração de IL1 β no sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

Uma relação dose-dependente foi encontrada, quando se verificou a variação da concentração de IL1 β em sobrenadante de macrófagos estimulados com doses crescentes de MCLR, por intermédio do procedimento denominado de ELISA (S.MØS_{RPMI (CONTROLE)}=39,7 \pm 14,5 pg/ml (n=4); S.MØS_{MCLR (3,2.10⁻⁷M)}=198,9 \pm 30,5 pg/ml, n=4, p<0,05; S.MØS_{MCLR (9,6.10⁻⁷M)}=189,3 \pm 29,7 pg/ml, n=4, p<0,05; S.MØS_{MCLR (3,2.10⁻⁶M)}=522,1 \pm 55,0 pg/ml, n=4, p<0,001).

Os dados acima apresentados podem ser visualizados na Figura 30.

É importante assinalar, que culturas de macrófagos estimulados com concentrações crescentes de MCLR, proporcionaram concentrações maiores de IL1 β ; sendo que esta relação pode ser descrita por uma função matemática (item 4.6); o que caracteriza uma relação de dose-dependência.

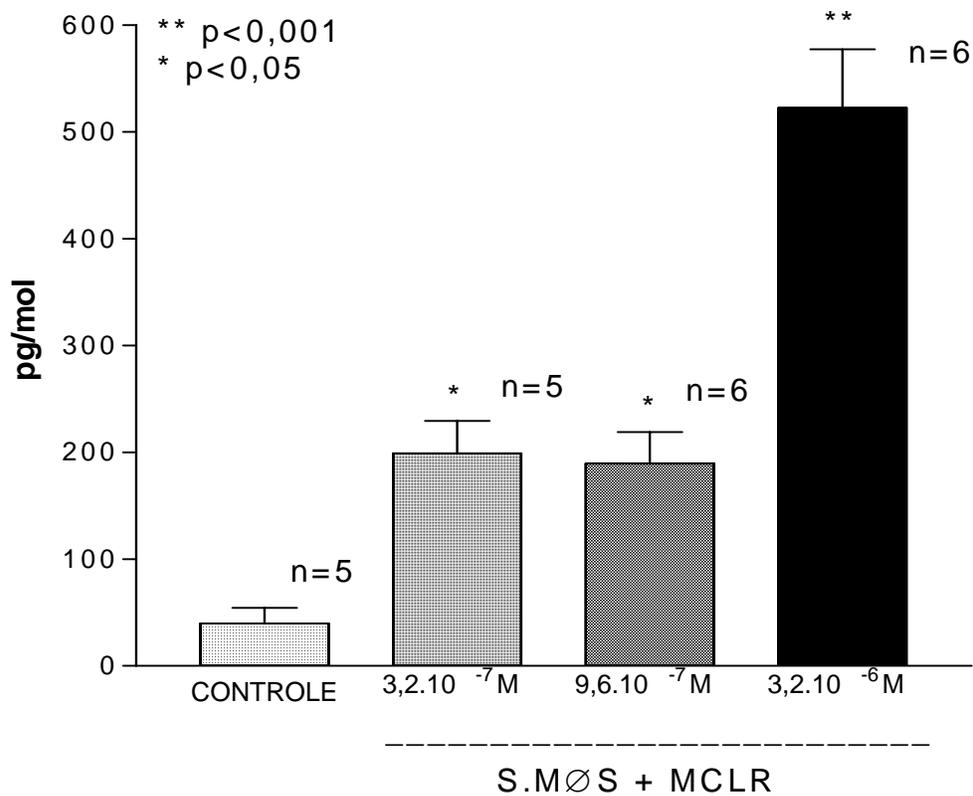


Figura 30. Dosagem de IL-1 β no S.MØS estimulados com MCLR. O conteúdo de IL-1 β no S.MØS estimulados com doses crescentes de MCLR (3,2.10⁻⁷M); 9,6.10⁻⁷M e 3,2.10⁻⁶M), foi avaliado por meio da técnica de ELISA, apresentando valores aumentados de forma dose-dependente. Os dados (m \pm epm), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*).

4.1.21. Caracterização da IL1 β como principal fator na “secreção intestinal” induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

A aplicação de IL1 β (10^{-7} M) no lado seroso das preparações de íleo em câmaras de Üssing, produziu efeito secretório de forma semelhante à aplicação do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M), revelando os seguintes valores médios para a variação final de corrente de curto-circuito em 60 minutos após o período de estabilização eletrônica do sistema: $\Delta I_{SCRINGER} = 17,4 \pm 6,5 \mu A \cdot cm^{-2}$, n=9; $\Delta I_{SCS.MØS+RPMI (CONTROLE)} = 21,86 \pm 1,29 \mu A \cdot cm^{-2}$, n=8; $\Delta I_{SCS.MØS+MCLR} = 159,71 \pm 10,51 \mu A \cdot cm^{-2}$, n=10, $p < 0,001$; $\Delta I_{SCIL1\beta} = 139,60 \pm 15,73 \mu A \cdot cm^{-2}$, n=7, $p < 0,001$ (Figura 31).

Estes dados reiteram a possibilidade de IL1 β vir a ser o principal fator responsável pelo efeito secretório; decorrente, principalmente, ao fato de que a extensão do efeito secretório desencadeado por esta interleucina nas preparações de íleo, ter uma mesma magnitude em relação ao efeito proporcionado pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, para um valor de $p > 0,05$, entre ambos.

Nas tabelas 13, 38 e 43 dos anexos, podem ser observados os valores médios de Isc que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 31.

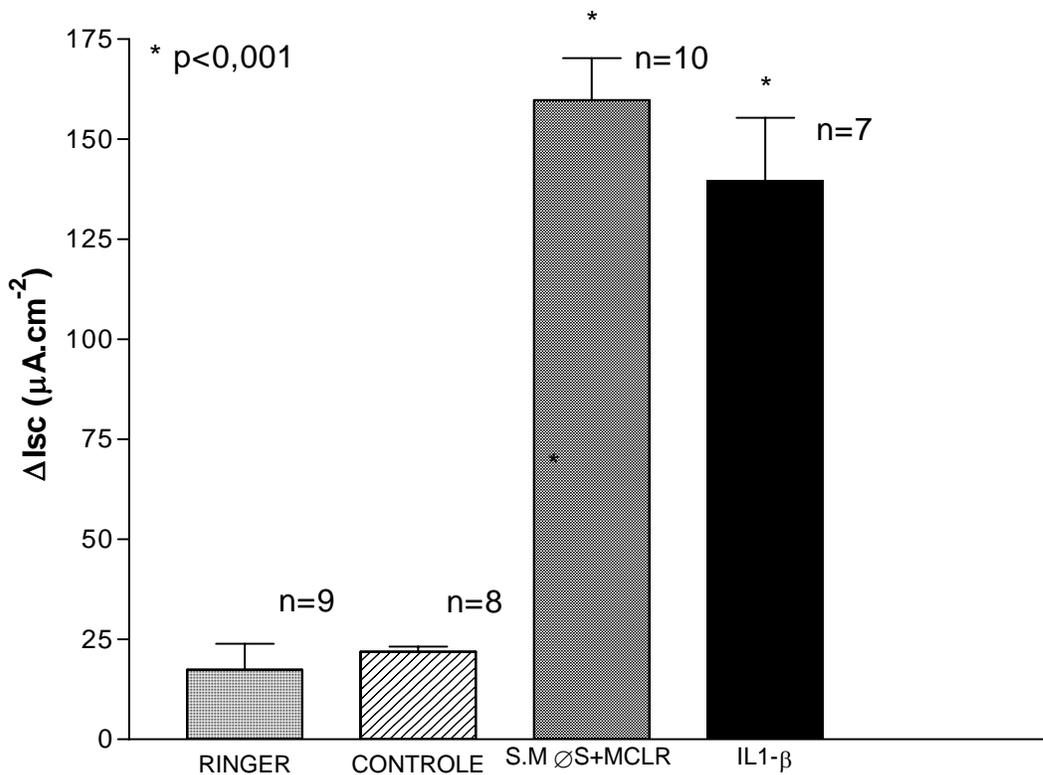


Figura 31. Caracterização da Interleucina IL-1 β como principal fator na “secreção intestinal” induzida por S.MØS estimulados com MCLR. A aplicação de IL-1 β diretamente no lado seroso das câmaras de Üssing, provocou um significativo efeito secretório, de forma muito similar ao efeito produzido por S.MØS estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$),. Aqui se fez necessário avaliar a resposta de preparações contendo somente Ringer, contra preparações (controle) que receberam S.MØS não estimulados com MCLR. Os valores de ΔI_{sc} ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*).

4.2.Participação de canais iônicos, mediadores pró-inflamatórios e do sistema nervoso entérico; na modulação do efeito secretório mediado por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

4.2.1.Efeito da bumetanida sobre a secreção intestinal induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

O tratamento prévio das preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, com bumetanida (BUM; 10^{-5} M), produziu um acentuado bloqueio no efeito secretório induzido por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M), cujos valores residuais de corrente foram: $\Delta I_{SC_{RINGER}} = 17,4 \pm 6,5 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=9$; $\Delta I_{SC_{S.MØS+RPMI}} (CONTROLE) = 21,86 \pm 1,29 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=8$; $\Delta I_{SC_{S.MØS+MCLR}} = 159,71 \pm 10,51 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=10$, $p < 0,001$; $\Delta I_{SC_{BUM}} = 18,60 \pm 11,47 \mu A \cdot cm^{-2}$, $n=8$, $p > 0,05$ (Figura 32).

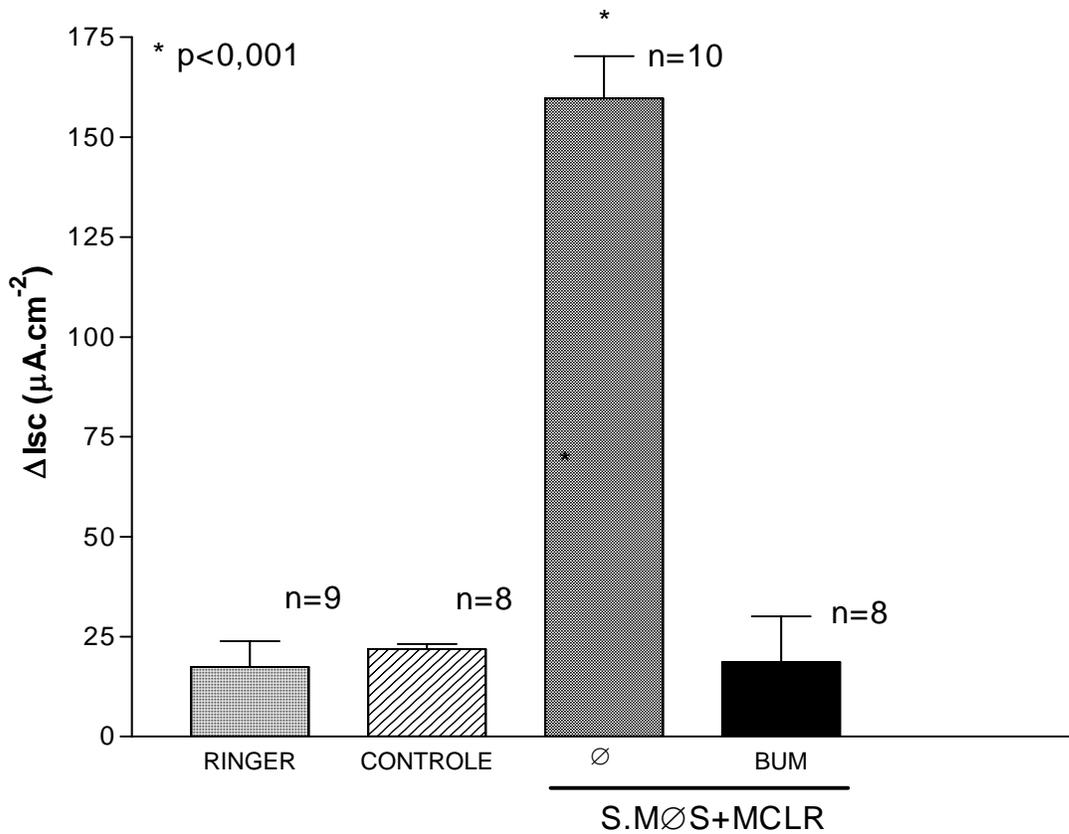


Figura 32. Efeito da bumetanida sobre a “secreção intestinal” induzida por S.MØS estimulados com MCLR. A aplicação bumetanida (BUM, 10^{-5} M), bloqueou a atividade secretória promovida por S.MØS estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M ou $1 \mu\text{g/ml}$), de 86,4%. Foi necessário avaliar a resposta de preparações contendo somente Ringer, contra preparações (controle) que receberam S.MØS não estimulados com MCLR. Os valores de ΔIsc ($m \pm \text{epm}$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*).

4.2.2. Envolvimento das prostaglandinas na atividade secretora intestinal induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

Ocorreu redução da atividade secretora em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, induzidas por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), quando os tecidos eram previamente tratados com indometacina (INDO; $10^{-6}M$), obtendo-se os seguintes valores residuais de corrente de curto-circuito: $\Delta I_{SCS.MØS+RPMI}$ (CONTROLE) = $21,86 \pm 1,29 \mu A \cdot cm^{-2}$, n=8; $\Delta I_{SCS.MØS+MCLR}$ = $159,71 \pm 10,51 \mu A \cdot cm^{-2}$, n=10, $p < 0,001$; ΔI_{SCINDO} = $36,40 \pm 9,70 \mu A \cdot cm^{-2}$, n=8, $p > 0,05$.

Os dados acima podem ser visualizados na Figura 33.

É interessante observar que indometacina pode bloquear ciclooxigenases, enzimas envolvidas no processo de produção de prostaglandinas. Em outras palavras, prostaglandinas parece ser um componente importante do processo secretório intestinal induzido por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR.

Nas tabelas 13, 38 e 46 dos anexos, podem ser observados os valores médios de I_{sc} que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 33.

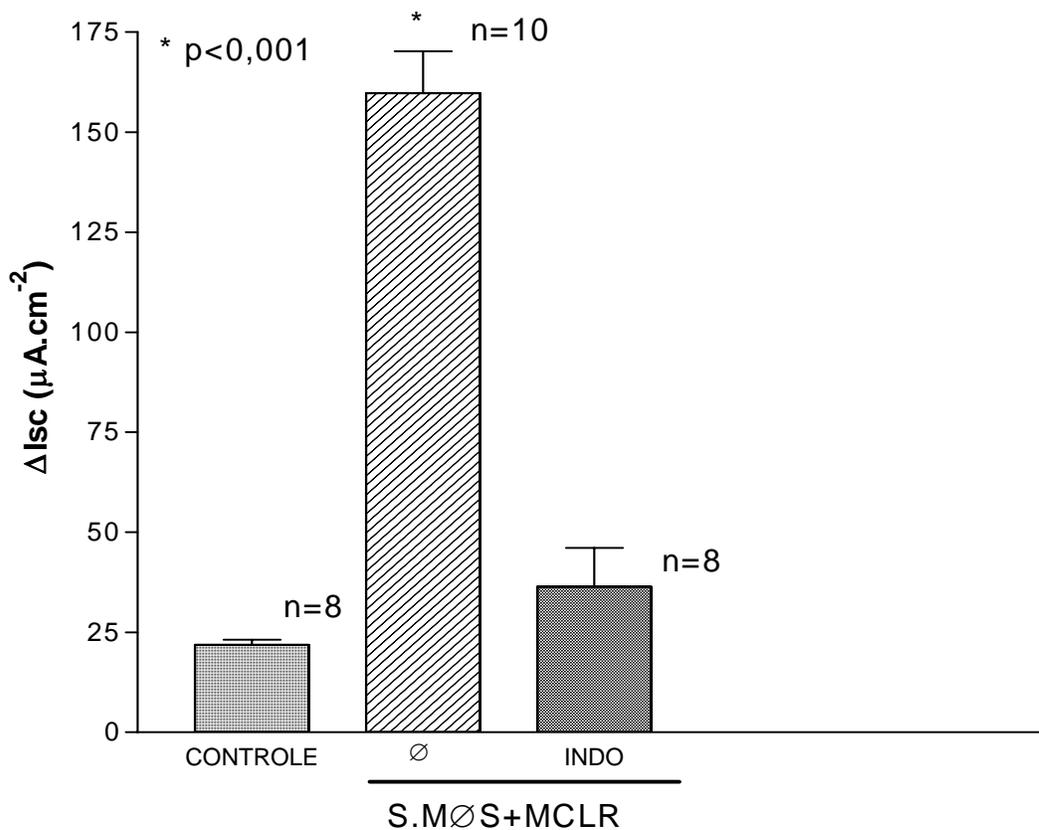


Figura 33. Envolvimento das prostaglandinas na atividade secretória intestinal do S. .MØS estimulados com MCLR. A “secreção intestinal” promovida pela presença de S.MØS estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$ ou $1\mu g/ml$), foi significativamente reduzida quando a mucosa foi pré-tratada com indometacina (INDO, $10^{-6}M$). Os valores de ΔI_{sc} ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*).

4.2.3. Participação do sistema nervoso entérico na “secreção intestinal” induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

O pré-tratamento das preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing com tetrodotoxina (TTX; 10^{-7} M), reduziu o efeito secretório induzido por sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M), obtendo-se os seguintes valores residuais de corrente de curto-circuito: $\Delta I_{sc_{S.MØS+RPMI}} (CONTROLE) = 21,86 \pm 1,29 \mu A \cdot cm^{-2}$, n=8; $\Delta I_{sc_{S.MØS+MCLR}} = 159,71 \pm 10,51 \mu A \cdot cm^{-2}$, n=10, $p < 0,001$; $\Delta I_{sc_{TTX}} = 42,40 \pm 6,90 \mu A \cdot cm^{-2}$, n=8, $p > 0,05$ (Figura 34).

Estes dados acima sugerem a participação do sistema nervoso entérico no processo de geração do efeito “efeito secretório”, em preparações de íleo de coelho fixadas em câmaras de “Ussing”, sobre ação de ma macrófagos estimulados com MCLR.

Nas tabelas 13, 38 e 47 dos anexos, podem ser observados os valores médios de Isc que serviram de base para a obtenção dos dados acima e a construção da figura 34.

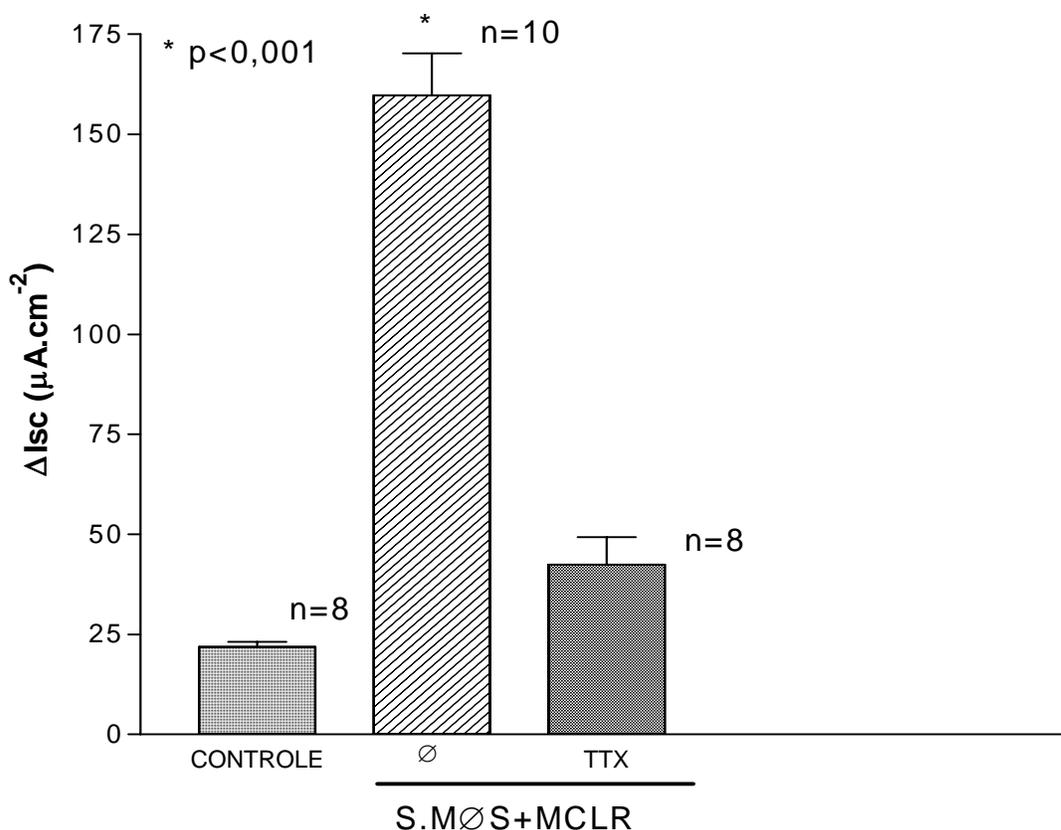


Figura 34. Participação do sistema nervoso entérico na “secreção intestinal” induzida por S.MØS estimulados com MCLR. A aplicação de tetrodotoxina (TTX, 10^{-7} M), no lado seroso das preparações de tecido ileal em câmaras de Üssing, 20 min. antes da aplicação do S.MØS estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M ou 1μg/ml); produziu bloqueio (69,09%) no efeito secretório. bumetanida (BUM, 10^{-5} M), bloqueou a atividade secretória promovida por de 86,4%. Os valores de ΔI_{sc} ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*).

4.2.4. Efeito do bloqueador do receptor de bradicinina sobre “secreção intestinal” induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

O pré-tratamento das preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing com HOE (10^{-5} M), não reduziu o efeito secretório induzido por sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M), obtendo-se os seguintes valores residuais de corrente de curto-circuito: $\Delta I_{sc_{S.MØS+RPMI}} (CONTROLE) = 21,86 \pm 1,29 \mu A \cdot cm^{-2}$, n=8; $\Delta I_{sc_{S.MØS+MCLR}} = 159,71 \pm 10,51 \mu A \cdot cm^{-2}$, n=10, p<0,001; $\Delta I_{sc_{HOE}} = 116,30 \pm 7,60 \mu A \cdot cm^{-2}$, n=5, p<0,001.

Os dados acima assinalados podem ser melhor visualizados na Figura 35.

Estes dados assinalam que mediadores associados à cascata das cininas não tiveram participação do processo secretório, em preparações de íleo de coelho em câmaras de Ussing, mediante ação de macrófagos estimulados com MCLR.

Nas tabelas 13, 38 e 48 dos anexos, podem ser visualizados os valores de “Isc” que geraram os dados acima, permitindo a construção da figura 35.

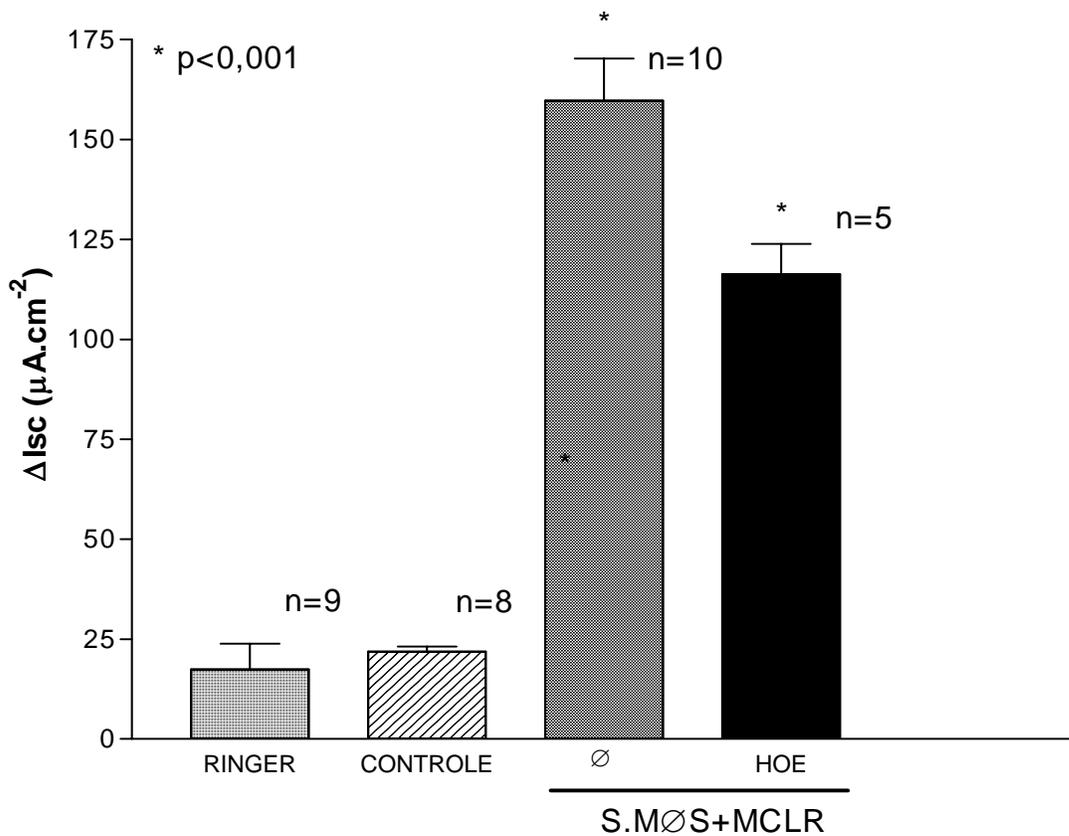


Figura 35. Participação dos componentes da cascata das cininas sobre a “secreção intestinal” induzida por S.MØS estimulados com MCLR. A aplicação de HOE (10^{-5} M), não bloqueou a atividade secretória promovida por S.MØS estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M ou $1 \mu\text{g/ml}$). Foi necessário avaliar a resposta de preparações contendo somente Ringer, contra preparações (controle) que receberam S.MØS não estimulados com MCLR. Os valores de ΔIsc ($m \pm \text{epm}$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*).

4.3. Determinação do nível de aleatoriedade dos efeitos eletrogênicos em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, sob a ação do sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

4.3.1. Avaliação do “efeito secretório intestinal” mediado por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, aplicando-se a análise R/S de Hurst

Aplicando-se a análise R/S de Hurst aos valores de corrente de curto circuito – I_{sc} , obtidos ao longo do tempo de experimentação, a partir de preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, que recebia alíquotas de sobrenadante de macrófagos estimulados com diferentes concentrações de MCLR; obteve-se os seguintes valores para o coeficiente de Hurst (H): $H_{S.MØS+RPMI (CONTROLE)}=0,890\pm0,023$; coeficiente de correlação $r=0,942$; $n=11$. $H_{S.MØS+MCLR(3,2.10^{-7})}=0,725\pm0,020$; coeficiente de correlação $r=0,928$; $n=5$, $p<0,01$. $H_{S.MØS+MCLR9,6.10^{-7}}=0,596\pm0,025$; coeficiente de correlação $r=0,933$; $n=5$, $p<0,001$. $H_{S.MØS+MCLR(3,2.10^{-6})}=0,424\pm0,018$; coeficiente de correlação $r=0,896$; $n=9$, $p<0,001$. $H_{IL1\beta}=0,482\pm0,035$; coeficiente de correlação $r=0,870$; $n=8$, $p<0,001$. Todos estes dados podem ser visualizados na Figura 36..

É interessante assinalar que a comparação estatística entre os valores de $H_{S.MØS+MCLR(3,2.10^{-6})}$ e $H_{IL1\beta}$ permitiu verificar que estes não diferiram estatisticamente, apresentando um valor de $p>0,05$.

Convém ainda destacar que H variou de forma concentração-dependente, sendo estes valores descritos por uma função matemática do tipo $H=(0,76\pm0,06).e^{-(0,20\pm0,05).MCLR}$, para um coeficiente de correlação exponencial $r=0,982$, contra um coeficiente de correlação linear $r=0,8183$; ou seja, a função tem um perfil muito mais exponencial do que linear (Figura.37).

Em decorrência disto, verificou-se também que, segundo o sistema de classificação de fenômenos dinâmicos em Varanda, et all, (2000), na ausência de MCLR ou de IL1 β ($H \cong 1$), o fenômeno parece caracterizar-se como possuidor de uma espécie de memória persistente; ou seja, um aumento de Isc no tempo presente, significaria um aumento de Isc no futuro. Mas, em presença de sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), o fenômeno transforma-se para uma condição de memória antipersistente; ou seja, um aumento de Isc no presente significaria uma diminuição de Isc no futuro; como se agora, nesta nova condição, o sistema buscasse uma espécie de restauração das condições iniciais.

A comparação de todos os valores do coeficiente de Hurst (H) apresentados acima, com os valores teóricos $H=0$ e $H=1$, mostrou que estes foram estatisticamente distintos para um valor de $p<0,001$.

Sendo assim, aplicando-se a equação $D = E + 1 - H$, onde D é a dimensão fractal do fenômeno; E é a dimensão euclidiana, e H o coeficiente de Hurst, determinou-se à dimensão fractal correspondente à evolução do fenômeno eletrogênico no tecido ileal, dependendo da condição de tratamento empregado. $D_{RPMI}=1,109\pm 0,067$, $n=11$; $D_{S.M\emptyset S+MCLR(3,2 \cdot 10^{-7}M)}=1,275\pm 0,045$, $n=5$, $p<0,01$; $D_{S.M\emptyset S+MCLR(9,6 \cdot 10^{-7}M)}=1,404\pm 0,062$, $n=6$, $p<0,001$; $D_{S.M\emptyset S+MCLR(3,2 \cdot 10^{-7}M)}=1,664\pm 0,053$, $n=9$, $p<0,001$; $D_{IL1\beta}=1,517\pm 0,129$, $n=8$, $p<0,001$. Em outras palavras, como existe a dimensão fractal, isto significa que o fenômeno eletrogênico induzido por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR é multifatorial; ou seja, a resposta eletrogênica observada seria uma consequência da participação de vários sistemas moleculares, como um verdadeiro sistema dinâmico; embora, tudo isto pareça estar sendo acionado por apenas alguns fatores presentes no sobrenadante, em especial IL1 β .

É importante também assinalar que, sendo possível a determinação da dimensão fractal, isto pode significar que as taxas de produção de corrente (Isc), em presença do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, não são constantes, sendo dependentes da escala temporal empregada para a efetuação das medidas.

Nas tabelas 53, 54, 55, 56 e 57 dos anexos, podem ser visualizados os valores de Isc que geraram os dados acima, permitindo a construção das figuras 36 e 37.

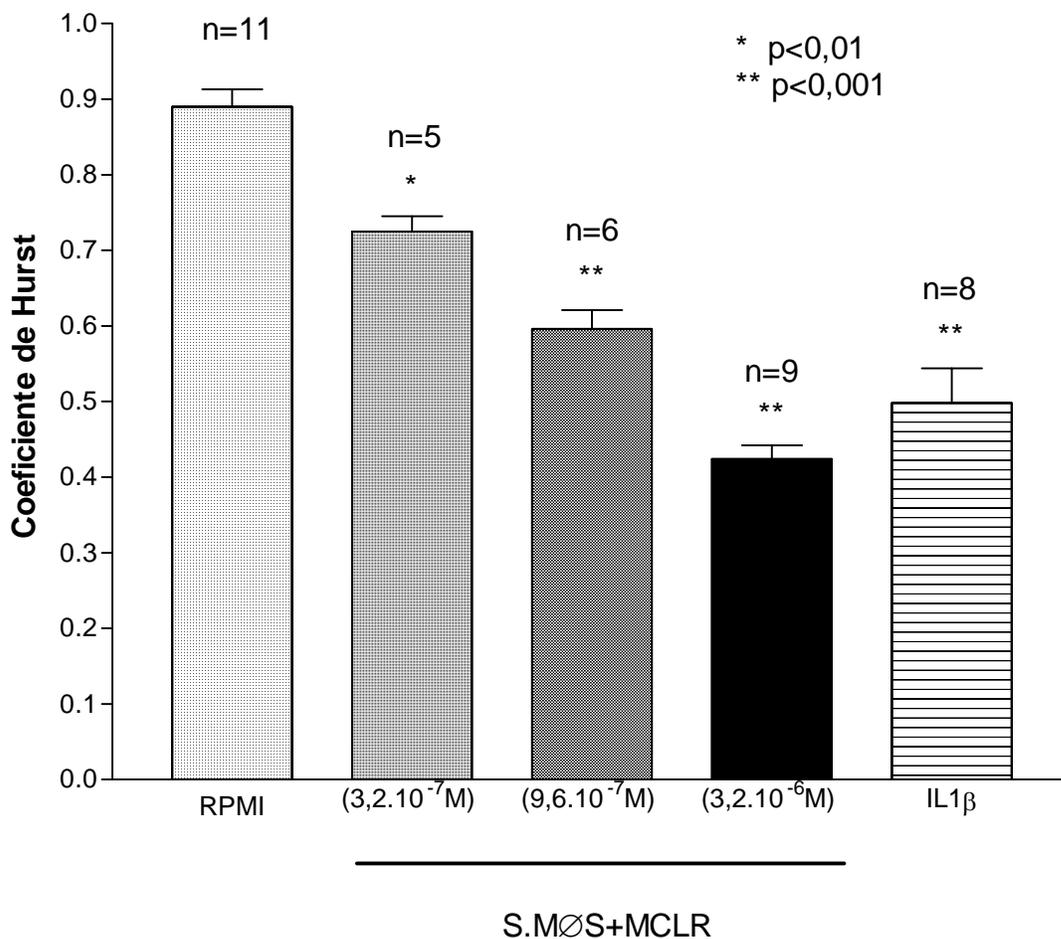


Figura 36. Determinação do coeficiente de Hurst para a variação de corrente de curto-circuito (I_{sc}) em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, em presença de S.MØS estimulados com diferentes concentrações de MCLR. O coeficiente de Hurst foi determinado para as variações de corrente de curto-circuito – I_{sc} , ocorridas em câmaras de Üssing com preparações de íleo de coelho, submetidas à ação do S.MØS estimulados com MCLR. O coeficiente de Hurst tende a diminuir, de forma dose-dependente, na medida em que a concentração de MCLR aumenta, $p < 0,001$. A aplicação de IL-1 β diretamente às câmaras proporcionou um coeficiente de Hurst bem semelhante àquele obtido com a maior concentração de MCLR, $p > 0,05$. Os valores de “H” ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*).

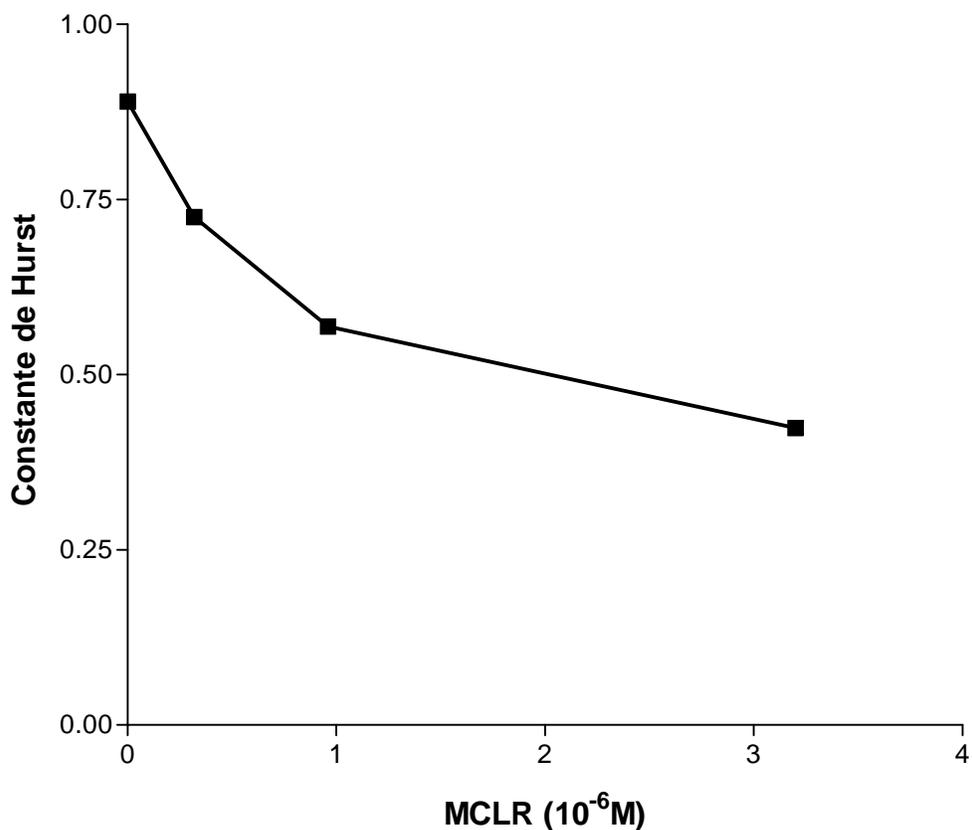


Figura 37. Variação do coeficiente de Hurst, em relação às alterações eletrogênicas (Isc), em função da variação da concentração molar de MCLR utilizada para estimular macrófagos em meio de cultura. Determinação do coeficiente de Hurst para a variação de corrente de curto-circuito (Isc) em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, em presença de S.MØS estimulados com diferentes concentrações de MCLR. Os valores de “H” ($m \pm \text{epm}$), de “n” preparações, foram plotados; sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os dados assim plotados caracterizam uma função matemática do tipo $H = (0,76 \pm 0,063) \cdot e^{-0,2 \pm (MCLR)}$, para um valor de coeficiente de correlação $r = 0,9822$, contra um valor de $r = 0,8183$ para uma função do tipo linear.

4.4.Determinação do nível de aleatoriedade associado à variação de resistência transepitelial, em preparações de tecido ileal em câmaras de Üssing, sob a ação do sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR

4.4.1.Variação da resistência e do potencial elétrico transepitelial em preparações de íleo de coelho em câmara de Üssing, mediante o emprego de S.MφS estimulados com MCLR

Fragmentos de tecido ileal foram montados em câmaras de Üssing e estimulados com S.MφS tratados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$). Em resposta, obteve-se uma variação temporal da resistência transepitelial R_{te} como também da tensão elétrica transepitelial V_{te} . Estas variações podem ser observadas nas figuras 38 e 39.

É importante frisar que a variação de resistência transepitelial obtida para o grupo que recebeu sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) pode ser descrita por uma função do tipo $R_{te} = a \cdot e^{-kt}$, onde $a = 9,91 \pm 3,36$, $k = -(10 \pm 10) \cdot 10^{-3}$; $r = 1,000$, o que sinaliza uma variação decrescente ao longo do tempo (figura 38). A variação do potencial transepitelial para as mesmas preparações acima descritas, também pode ser descrita por uma função do tipo $V_{te} = a \cdot e^{kt}$, onde $a = 0,11 \pm 0,048$ e $k = 0,04 \pm 9,7 \cdot 10^{-3}$, para um coeficiente de correlação $r = 0,998$; o que significa uma variação crescente ao longo do tempo (figura 39).

Nas tabelas 49, 50, 51 e 52 dos anexos, podem ser visualizados os valores de “ R_{te} ” e “ V_{te} ” que geraram os dados acima, permitindo a construção das figuras 38 e 39.

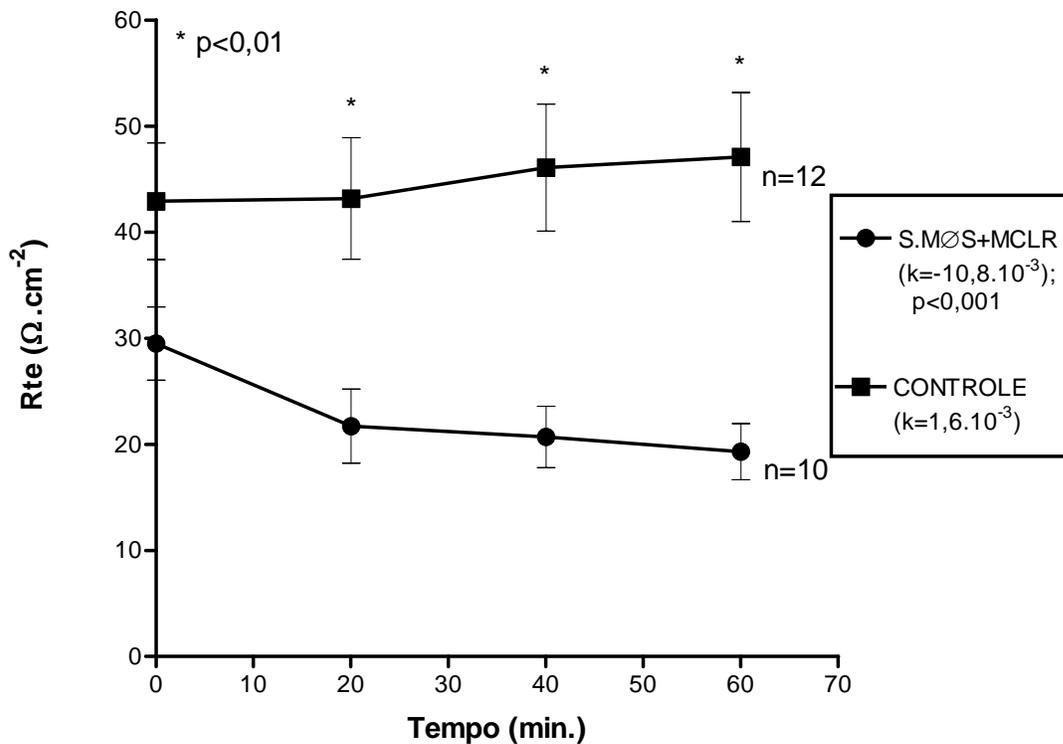


Figura 38. Resistência transepitelial avaliada em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, em presença de S.MØS estimulados com de MCLR. S.MØS estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), provocou variação da resistência transepitelial, em preparações de tecido ileal montadas em câmaras de Üssing. Os valores de Rte ($m \pm epm$) de “n” preparações foram plotados, sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular de uma função do tipo $Rte = A \cdot e^{kt}$, sendo os respectivos valores avaliados estatisticamente (Teste de Tukey).

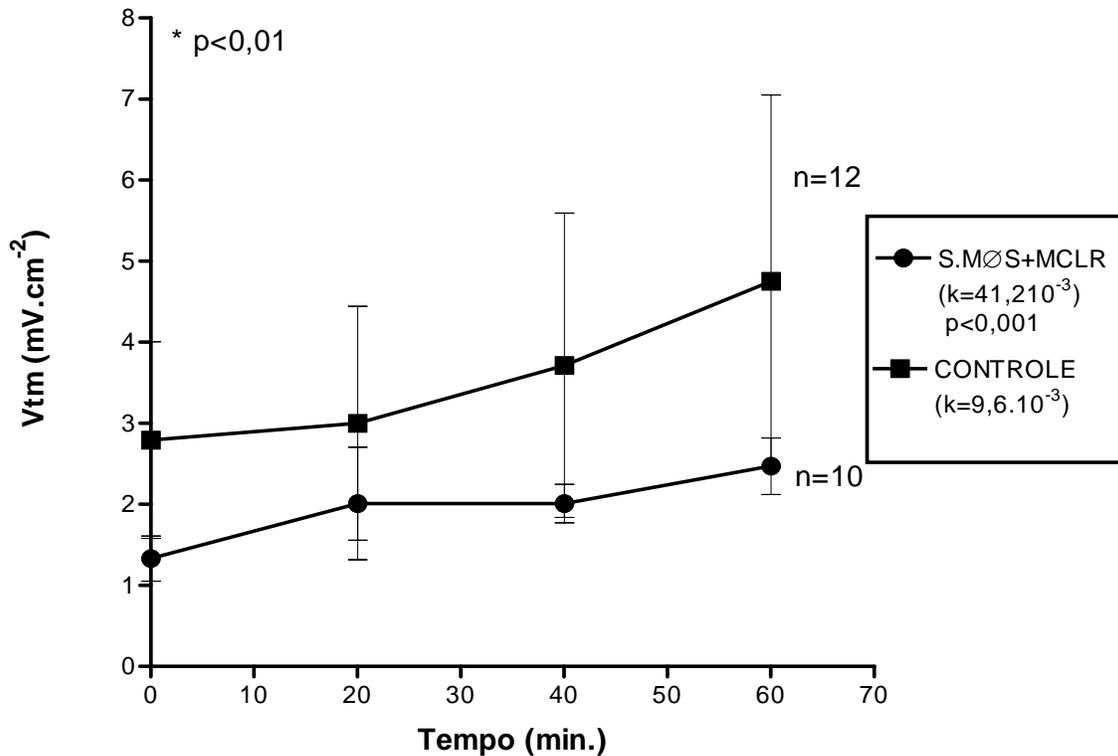


Figura 39. Potencial elétrico transepitelial avaliado em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, em presença de S.MØS estimulados com de MCLR. S.MØS estimulados com MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), provocou variação de potencial transepitelial, em preparações de tecido ileal montadas em câmaras de Üssing. Os valores de V_{te} ($m \pm epm$) de “n” preparações foram plotados, sendo as diferenças avaliadas mediante ANOVA (Testes de Bonferroni e Tukey) (*). Os valores de “k” representam o coeficiente angular de uma função do tipo $V_{te} = A \cdot e^{kt}$, sendo os respectivos valores avaliados estatisticamente (Teste de Tukey).

4.4.2. Avaliação da variação do coeficiente de Hurst e da dimensão fractal com referência à variação da resistência transepitelial em preparações de tecido ileal montadas em câmara de Üssing, sob ação do sobrenadante de macrófagos estimulados com várias concentrações de MCLR

A apreciação das variações ocorridas na resistência transepitelial, de preparações de mucosa ileal montadas em câmaras de Üssing, ao receber alíquotas de sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, motivou a averiguação do comportamento da constante de Hurst: $H_{MCLR(3,2.10^{-6}M)}=0,422\pm 0,043$, para $p<0,01$; $H_{MCLR(9,6.10^{-7}M)}=0,516\pm 0,141$; $H_{MCLR(3,2.10^{-7}M)}=0,311\pm 0,053$, para $p<0,01$; $H_{RPMI}=0,689\pm 0,055$; (figura 40).

Inicialmente, verificou-se que as variações na resistência transepitelial para o grupo controle, não ocorreram aleatoriamente; uma vez que a constante “H” foi diferente de 0,5 para um valor de $p < 0,05$. Verificou-se também que mesmo em presença de sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, o valor da constante de Hurst era alterado, mas continuava diferente estatisticamente de 0,5; para um valor de $p < 0,05$. Em outras palavras, os sistemas envolvidos na regulação da resistência transepitelial não operam aleatoriamente, mesmo em presença do fator de secreção intestinal e mediadores correlacionados.

Pode-se verificar que o valor da constante de Hurst diminui a medida que a concentração de MCLR aumenta como fator estimulante indireto, e esta variação pode ser descrita por uma função do tipo $H = a \cdot e^{kMCLR}$, onde $a = 0,39\pm 0,10$ e $k = 0,033\pm 0,10$; para um coeficiente de correlação $r = 0,778$, contra um coeficiente linear $r = 0,104$; (figura 41).

Considerando-se que a dimensão fractal “D” pode ser obtida a partir da relação $D = E + 1 - H$, então procurou-se calcular a dimensão fractal nas situações acima descritas; $D_{MCLR(3,2.10^{-6}M)}=1,604\pm 0,043$, para $p<0,01$; $D_{MCLR(9,6.10^{-7}M)}=1,484\pm 0,141$; $D_{MCLR(3,2.10^{-7}M)}=1,688\pm 0,053$, para $p<0,01$; $D_{RPMI}=1,364\pm 0,055$.

Sendo possível a determinação da dimensão fractal, da mesma forma como ocorreu com a variação de corrente de curto circuito, a taxa de variação da resistência transepitelial não foi constante, e parece depender das condições da escala temporal empregada para efetuar a sua medida.

Nas tabelas 58, 59, 60 e 61 dos anexos, podem ser visualizados os valores de R_{te} que geraram os dados acima, permitindo a construção das figuras 40 e 41.

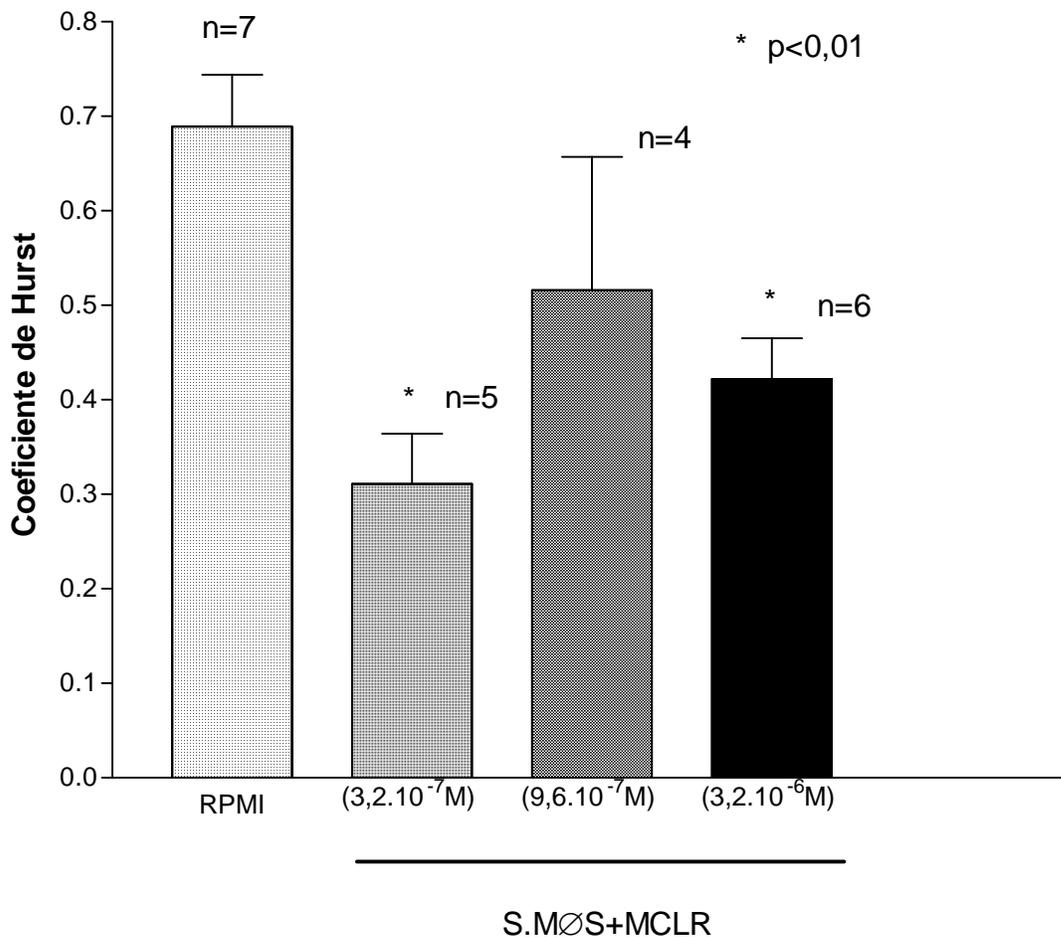


Figura 40. Determinação do coeficiente de Hurst, para a variação da resistência transepitelial, (Rte) em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, em presença de S.MØS estimulados com diferentes concentrações de MCLR. O coeficiente de Hurst foi determinado para as variações de resistência transepitelial – Rte, ocorridas em câmaras de Üssing com preparações de íleo de coelho, submetidas à ação do S.MØS, estimulados com MCLR, em diferentes concentrações. O coeficiente de Hurst tende a diminuir, de forma dose-dependente, à medida em que a concentração de MCLR aumenta, $p < 0,001$. Convém assinalar que os valores médios com os respectivos valores de epm, de “n” preparações, foram plotados e as diferenças avaliadas pela aplicação de ANOVA (Teste de Bonferroni e Tukey).

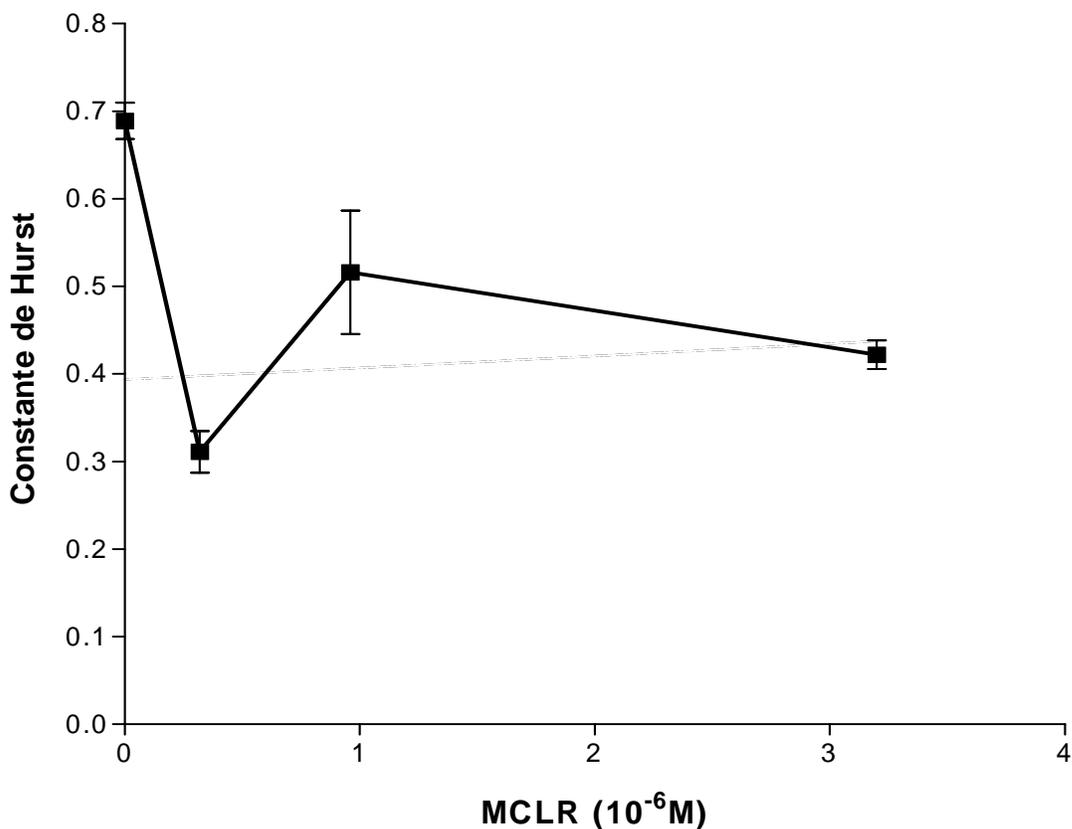


Figura 41. Caracterização matemática da função que descreve a variação do coeficiente de Hurst, em função da variação da concentração molar de MCLR, utilizada para estimular macrófagos em meio de cultura; objetivando a obtenção dos sobrenadantes para aplicação às preparações de íleo, em câmaras de Üssing, e posterior registro das alterações de resistência transepitelial. Cada ponto deste gráfico corresponde a um valor médio, considerando-se para efeito de cálculo os respectivos valores de epm, para cada coeficiente de Hurst, a cada concentração de MCLR empregada. Os dados assim plotados caracterizaram uma função do tipo $H=(0,39\pm 0,10).e^{-0,033\pm(McLR)}$, para um valor de coeficiente de correlação de $r = 0,778$, contra um valor de $r = 0,104$ para uma função do tipo linear

4.5. Curva dose-resposta obtida para variação de corrente de curto circuito, resistência transepitelial e tensão elétrica transepitelial; em preparações de tecido ileal montadas em câmara de Üssing, sob ação do sobrenadante de macrófagos estimulados com várias concentrações de MCLR

Procurando-se associar os valores finais da variação de corrente de curto-circuito “ ΔI_{sc} ” à concentração de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}M$, $9,6 \cdot 10^{-7}M$ e $3,2 \cdot 10^{-6}M$), empregada para estimular macrófagos em meio de cultura, obtendo-se assim, os respectivos sobrenadantes para serem testados em preparações de tecido ileal fixado em câmaras de Üssing, obteve-se os seguintes valores: $\Delta I_{sc_{RPMI}}=18,91 \pm 3,84$; $\Delta I_{sc_{MCLR(3,2 \cdot 10^{-7}M)}}=20,4 \pm 5,29$; $\Delta I_{sc_{MCLR(9,6 \cdot 10^{-7}M)}}=57,00 \pm 17,24$; $\Delta I_{sc_{MCLR(3,2 \cdot 10^{-6}M)}}=128,16 \pm 14,54$. Para a variação de resistência transepitelial; obtida também conforme a aplicação de diferentes concentrações de MCLR, nas mesmas condições descritas acima; obteve-se os seguintes valores: $\Delta R_{te_{RPMI}}=11,4 \pm 4,24$; $\Delta R_{te_{MCLR(3,2 \cdot 10^{-7}M)}}=19,2 \pm 5,67$; $\Delta R_{te_{MCLR(9,6 \cdot 10^{-7}M)}}=7,66 \pm 3,51$; $\Delta R_{te_{MCLR(3,2 \cdot 10^{-6}M)}}=8,83 \pm 2,34$. E, finalmente, para a variação de tensão transepitelial correspondente aos ensaios acima descritos; os valores foram: $\Delta V_{te_{RPMI}}=0,96 \pm 0,20$; $\Delta V_{te_{MCLR(3,2 \cdot 10^{-7}M)}}=1,54 \pm 0,38$; $\Delta V_{te_{MCLR(9,6 \cdot 10^{-7}M)}}=1,137,66 \pm 0,11$; $\Delta V_{te_{MCLR(3,2 \cdot 10^{-6}M)}}=1,15 \pm 0,22$.

Com os valores acima descritos, procurou-se obter relações matemáticas que melhor pudessem expressar as relações de dose-resposta referentes à variação de corrente de curto circuito “ ΔI_{sc} ”, a variação de resistência transepitelial “ ΔR_{te} ” e a variação de tensão elétrica transepitelial “ ΔV_{te} ”; conforme a aplicação de diferentes concentrações de MCLR nas culturas de macrófagos, e posterior obtenção dos sobrenadantes para serem testados em câmaras de Üssing, conforme assinalado acima. Estas curvas de dose-resposta podem ser visualizadas, respectivamente, nas Figuras 42, 43 e 44.

A variação de resistência transepitelial em função da quantidade de estímulo pode ser descrita por uma função do tipo $\Delta R_{te} = a \cdot e^{k \cdot [-\log MCLR]}$, onde $a = 0,95 \pm 3,38$ e $k = -1,2 \cdot 10^{-3}$, para um valor de coeficiente de correlação $r = 0,987$; isto caracteriza uma diminuição da

resistência transepitelial conforme o aumento da concentração de MCLR. .A variação de tensão elétrica transepitelial também pode ser descrita por uma função do tipo $\Delta V_{te} = a \cdot e^{k [- \log MCLR]}$, onde $a = 9,6.10^{-3} \pm 0,031$ e $k = -0,55 \pm 0,55$, para um valor de coeficiente de correlação $r=0,9157$; o que caracteriza, de certa forma, uma diminuição do valor potencial transepitelial conforme o aumento de estímulo induzido por MCLR. Finalmente, a variação de corrente de curto-circuito “ ΔI_{sc} ”, pode ser descrita por uma função do tipo $\Delta I_{sc} = a \cdot e^{k [- \log MCLR]}$, onde $a = 371,18$ e $k = 0,70$, para um valor de coeficiente de correlação $r=1,000$; significando que o aumento do estímulo provocado por MCLR aumenta o efeito secretório em preparações de tecido ileal montadas em câmaras de Üssing.

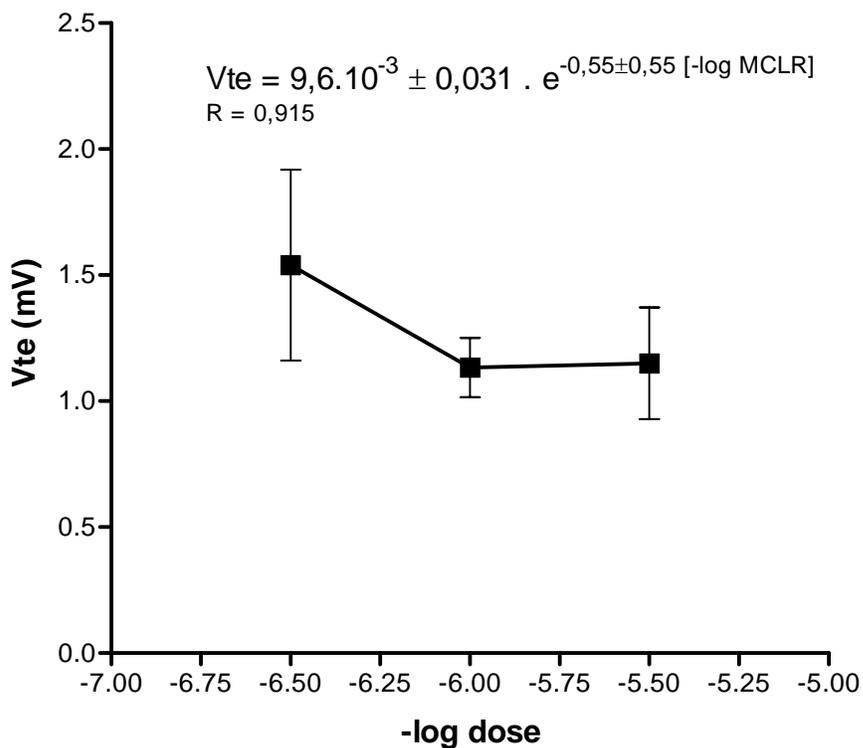


Figura 42. Curva dose-resposta, que relaciona o potencial transepitelial “Vte” em preparações de tecido ileal em câmaras de Üssing submetidas à várias dosagens de MCLR. Os valores de Vte (m±epm), de “n” preparações, foram plotados, referente à variação do potencial transepitelial em preparações de tecido ileal, em câmaras de Üssing, submetidas à diferentes estímulos de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}M$; $9,6 \cdot 10^{-7}M$ e $3,2 \cdot 10^{-6}M$).

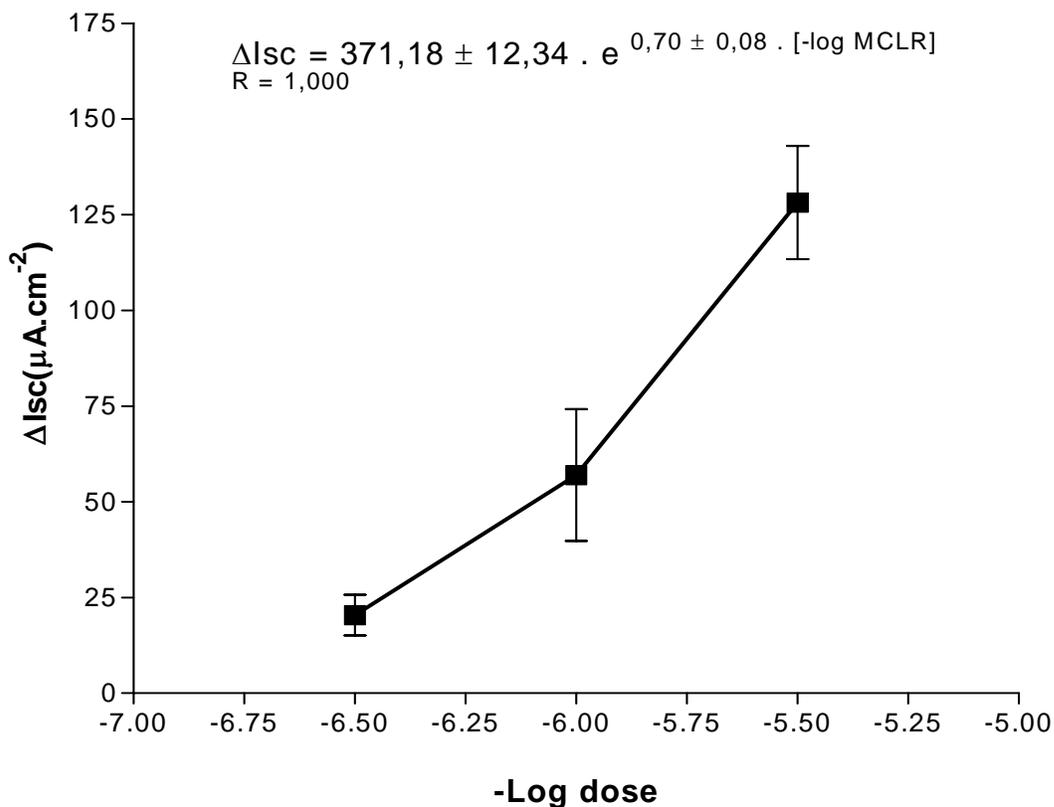


Figura 43. Curva dose-resposta, referente à variação de corrente de curto-circuito (ΔI_{sc}), em preparações de tecido ileal, montado em câmaras de Üssing, submetidas a S.MØS estimulados com diferentes concentrações de MCLR. Os valores de ΔI_{sc} ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados, referente à variação do potencial transepitelial em preparações de tecido ileal, em câmaras de Üssing; submetidas à diferentes estímulos de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}M$; $9,6 \cdot 10^{-7}M$ e $3,2 \cdot 10^{-6}M$).

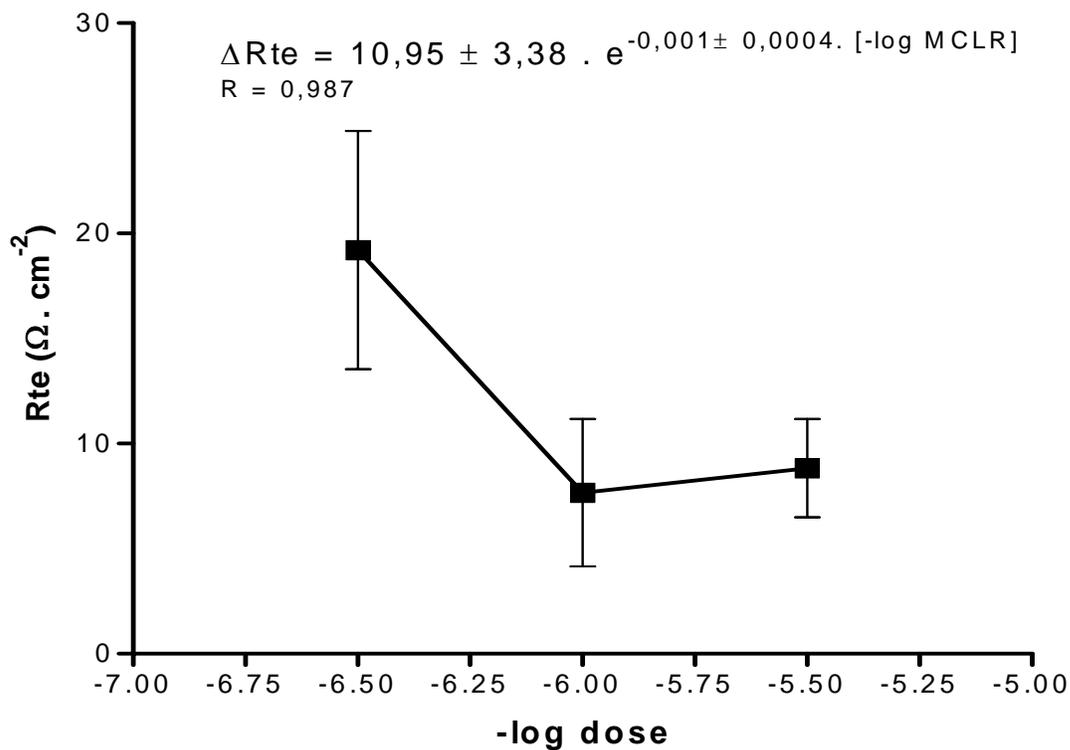


Figura 44. Curva dose-resposta, que relaciona a resistência transepitelial (R_{te}), em referente à variação de corrente de curto-circuito (ΔI_{sc}), em preparações de tecido ileal, montado em câmaras de Üssing, submetidas a várias dosagens de MCLR. Os valores de R_{te} ($m \pm epm$), de “n” preparações, foram plotados, referente à variação de resistência transepitelial, em preparações de tecido ileal, em câmaras de Üssing; submetidas à diferentes estímulos de MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}M$; $9,6 \cdot 10^{-7}M$ e $3,2 \cdot 10^{-6}M$).

4.6. Avaliação da dinâmica de produção de TNF α e IL1 β liberados a partir de macrófagos estimulados com MCLR de *Microcystis aeruginosa* e Toxina A de *Clostridium difficile*

Macrófagos estimulados com MCLR (0,1; 0,3 e 1 μ g/ml) liberaram em média (n= 4), respectivamente 375,4 \pm 43,7; 369,0 \pm 53,3 e 610,5 \pm 96,5 pg/ml de TNF α , de forma dose dependente; tendo o grupo controle, macrófagos estimulados com PBS, liberado 165,0 \pm 35,4 pg/ml de TNF α , conforme o método ELISA. Ainda sob mesmo estímulo, macrófagos liberaram em valores médios (n= 4), respectivamente, 198,9 \pm 30,5; 189,5 \pm 29,7 e 522,1 \pm 55,0 pg/ml de IL1 β , também de forma dose dependente, tendo o grupo controle com PBS liberado 39,7 \pm 14,5 pg/ml de IL1 β .

Dentro das condições em que foram efetuadas as dosagens, a variação da concentração média de TNF α , representada por [TNF α], em função da variação da concentração de MCLR, representada por [MCLR], pode ser descrita por uma função do tipo $y = a + b \cdot x$; onde $y = [\text{TNF}\alpha]$ (concentração de TNF α em g/ml), $x = [\text{MCLR}]$ (concentração de MCLR em μ g/ml), $a = 249,8 \cdot 10^{-12}$ (coeficiente linear) e $b = 372,1 \cdot 10^{-6}$ (coeficiente angular), para um coeficiente de correlação de $r = 0,92$ (Fig.45).

A variação de concentração média de IL1 β , representada por [IL1 β], em função da variação de [MCLR], pode ser descrita, por sua vez, por uma função também do tipo $y = a + b \cdot x$; onde $y = [\text{IL1}\beta]$ (concentração de IL1 β em g/ml), $x = [\text{MCLR}]$ (concentração de MCLR em μ g/ml), $a = 84,7 \cdot 10^{-12}$ (coeficiente linear) e $b = 436,5 \cdot 10^{-6}$ (coeficiente angular), para um coeficiente de correlação de $r = 0,96$ (Fig.4.5).

Derivando-se ambas as equações obtidas acima, pode-se verificar que a taxa infinitesimal de liberação de TNF α em função da concentração de MCLR, foi proporcional à uma constante, ou seja: $[\text{TNF}\alpha]' = 372,08$; e da mesma forma, a taxa infinitesimal de liberação de IL1 β em função da variação da concentração de MCLR foi proporcional

também à uma constante, ou seja: $[IL1\beta]' = 436,52$. Quando foi determinada a razão matemática entre a taxa de variação infinitesimal de $TNF\alpha$ e a taxa de variação infinitesimal de $IL1\beta$, verificou-se que esta era proporcional à uma constante, cujo valor foi de 0,852.

Disto, pode-se dizer que a taxa infinitesimal de liberação de $TNF\alpha$ é menor que a taxa de liberação de $IL1\beta$, sendo que esta relação permanecerá assim, independente da concentração de MCLR adicionada ao sistema.

Macrófagos estimulados com Toxina A (0,1; 0,3 e 1,0 $\mu\text{g/ml}$) liberaram em média ($n= 4$), respectivamente, $665,0 \pm 131,9$; $413,0 \pm 92,2$ e $3477,0 \pm 199,7$ pg/ml de $IL-1\beta$, de forma dose dependente, tendo o grupo controle, com macrófagos estimulados com PBS, liberado $40,0 \pm 14,5$ pg/ml de $IL1\beta$, segundo as dosagens efetuadas segundo o ELISA. Ainda sob mesmo estímulo, macrófagos liberaram, em valores médios, $803,0 \pm 17,4$; $828,0 \pm 15,30$ e $1040,0 \pm 1372$ de $TNF\alpha$ também de forma dose dependente, tendo o grupo controle com PBS liberado $182,0 \pm 39,9$ pg/ml de $TNF\alpha$.

Nas condições experimentais empregadas para este trabalho, a variação da concentração média de $IL-1\beta$, representada por $[IL-1\beta]$, em função da variação da concentração de Tox A, representada por $[ToxA]$, de *C. difficile*, pode ser descrita por uma função do tipo $y = a + b \cdot x^2$, onde $y = [IL-1\beta]$ (concentração de $IL-1\beta$ em g/ml), $x = [ToxA]$ (concentração de Tox A em $\mu\text{g/ml}$), $a = 3,43 \cdot 10^{-10}$ (coeficiente linear) e $b = 3,13 \cdot 10^9$ (coeficiente angular), para um coeficiente de correlação de $r = 0,987$ (Fig.46).

A variação da concentração média de $TNF\alpha$, representada por $[TNF\alpha]$, em função da variação de concentração de Tox A, representada por $[Tox A]$, pode ser descrita por uma função do tipo $y = a + b \cdot x^{1/3}$, onde $y = [TNF\alpha]$ (concentração de $TNF\alpha$ em g/ml), $x = [Tox A]$ (concentração de tox A em $\mu\text{g/ml}$), $a = 2,6 \cdot 10^{-10}$ e $b = 8,47 \cdot 10^{-8}$, respectivamente coeficientes linear e angular da expressão matemática obtida, para um coeficiente de correlação de $r = 0,957$ (Fig.46).

Cabe ressaltar, que a escolha das funções acima assinaladas foi efetuada tomando-se por base o maior valor obtido para o coeficiente de correlação entre as variáveis testadas.

Da mesma maneira, como foi efetuado para a MCLR, derivando-se ambas as equações acima obtidas, verificou-se que a taxa infinitesimal de liberação de $TNF\alpha$ era proporcional ao produto de uma constante pela concentração de Tox A adicionada ao sistema; ou seja, $[IL-1\beta]' = 6,6 \cdot 10^5 [Tox A]$; enquanto que a taxa infinitesimal de liberação de $TNF\alpha$ foi determinada pela relação: $[TNF\alpha]' = 6,2 \cdot 10^{-8} \cdot [Tox A]^{-2/3}$. A determinação da razão matemática entre a taxa de variação infinitesimal de $IL-1\beta$ e a taxa de variação infinitesimal de $TNF\alpha$, verificou-se que esta era proporcional a $1,06 \cdot 10^{13} \cdot [Tox A]^{5/3}$.

É interessante ressaltar que para a Tox A as taxas infinitesimais obtidas, na verdade foram funções da concentração da Tox A; apresentando estas, um comportamento matemático bastante distinto em relação àquele observado quando do emprego da MCLR. Estas mesmas considerações podem ser estendidas para a análise do perfil matemático da razão obtida entre as taxas infinitesimais de $TNF\alpha$ e $IL1\beta$; assinalando, acima de tudo, que Tox A promove a liberação de mediadores do tipo $TNF\alpha$ e $IL1\beta$ em uma razão matemática diferente daquela obtida quando o estímulo era efetuado pela toxina MCLR.

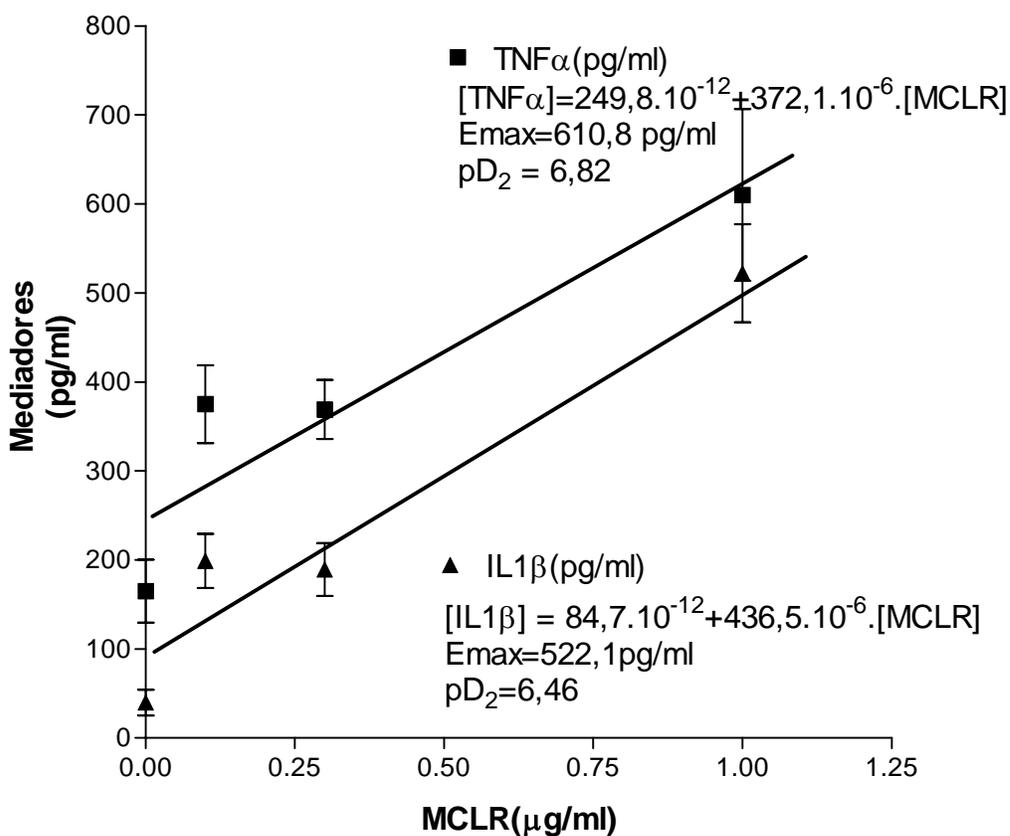


Figura 45. Concentração de TNF- α e IL-1 β no S.MØS estimulados com diferentes concentrações de MCLR. TNF- α é produzido e liberado mais intensivamente do que IL-1 β , sendo as taxas de produção e liberação constantes, independentemente da concentração do estímulo. Os valores da concentração de TNF- α e IL-1 β , ($m \pm epm$), foram plotados, conforme a variação de MCLR. A significância das diferenças foi avaliada mediante ANOVA.

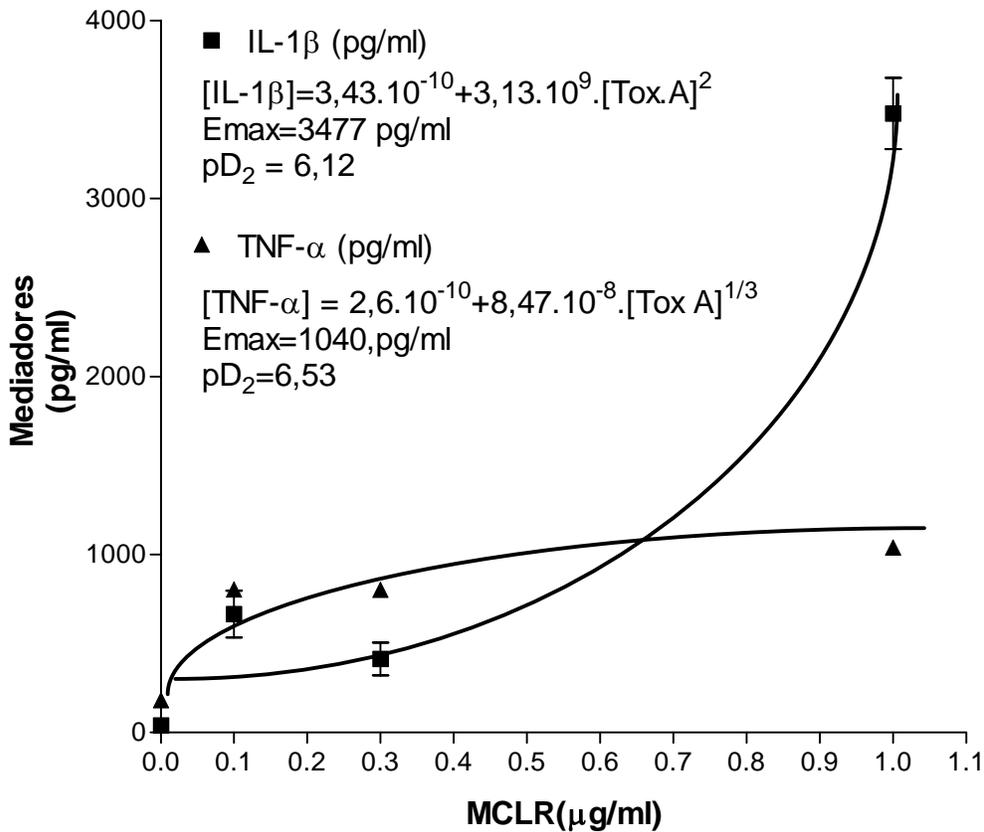


Figura 46. Concentração de TNF-α e IL-1β no S.MØS estimulados com diferentes concentrações de Toxina A de *Clostridium difficile*. As taxas de produção e liberação de TNF-α IL-1β, não são constantes, variando de forma característica. Com o aumento do estímulo, a produção e liberação de TNF-α tende a estagnar, enquanto a taxa de produção e liberação de IL-1β tende a aumentar, superando a de TNFα. Os valores da concentração de TNF-α e IL-1β, ($m \pm epm$), foram plotados, conforme a variação de Toxina A. A significância das diferenças foi avaliada mediante ANOVA.

5. DISCUSSÃO

Microcystis aeruginosa tem sido amplamente implicada na incidência de casos de intoxicação por ingestão de água, onde a concentração desta cianobactéria alcança níveis críticos (Carmichael & Falconer, 1993). Infelizmente, muitos destes casos atingiram dimensões catastróficas, como os já citados incidentes de Paulo Afonso; na Bahia; onde um surto de gastroenterite envolveu mais de 2000 pessoas com cerca de 84 óbitos em 4 meses; e o mais recente incidente ocorrido numa clínica de hemodiálise na cidade de Caruaru, envolvendo mais de uma centena de pacientes, com 69 óbitos em 10 meses (Teixeira, 1993, Jochinsen, e cols., 1998).

Das toxinas produzidas por *Microcystis aeruginosa*, a microcistina-LR é a que mais interesse tem despertado na comunidade científica, em decorrência dos seus efeitos tóxicos em diferentes tipos de sistemas, em diferentes espécies de organismos (Watanabe, e cols., 1996). Conseqüentemente, muito se tem cogitado sobre os possíveis mecanismos de ação da microcistina-LR (MCLR), em diferentes sistemas, como foi visto acima; embora muitas dúvidas ainda pairam sobre como estas atuam em sistemas como o gastroentérico.

No Laboratório de Patologia Celular da Unidade de Pesquisas Clínicas/ Instituto de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará, uma série de trabalhos vem sendo desenvolvida a respeito de como atuam determinadas tóxicas bacterianas, na promoção de efeitos secretórios e inflamatórios sobre o sistema gastroentérico (Lima, e cols., 1989; Rocha e cols, 1998; 2000; 2001; Souza, e Cols., 1997).

Neste sentido, previamente, havíamos identificado um significativo efeito secretório em preparações de tecido ileal de coelho, fixadas em câmara de Üssing; mediante a aplicação de sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR (1µg/ml) (Rocha, e cols., 2000). Neste trabalho, havia evidências de que as citocinas TNFα e IL1β podiam estar relacionados com este tipo de efeito.

Estes dados, somados à expectativa de que MCLR, mesmo em doses subletais, poderia produzir efeito secretório intestinal, motivaram a realização do presente trabalho; onde na figura 11, pode-se verificar uma confirmação dos dados acima; ou seja, um efeito secretório significativo, $p < 0,01$; foi conseguido com a concentração de MCLR de 1µg/ml que é o equivalente a $3,2 \cdot 10^{-6}M$.

Desta forma, esta concentração de microcistina foi tomada como referência para a realização da maioria dos ensaios farmacológicos.

Bem, antes de se iniciar toda a trama de experimentos com fármacos específicos, uma preocupação existia. Este efeito secretório teria realmente sido produzido mediante a presença de MCLR nos meios de cultura de macrófagos, ou este efeito secretório poderia ter sido provocado por uma contaminação por LPS nos meios de cultura?.

Assim, com a aplicação de polimixina B mais MCLR, por trinta minutos; às culturas de macrófagos, verificou-se que o efeito secretório em preparações de tecido ileal, não se alterava de forma significativa, conforme mostram os dados plotados na figura 14. Desta forma, partiu-se então para a caracterização do efeito secretório induzido por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, ao longo do tempo, como mostram os dados da figura 12.

Aqui, é interessante frisar, que o efeito secretório variava ao longo do tempo de exposição da preparação à ação do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, cujo comportamento pode ser descrito por uma função do tipo $I_{sc} = a \cdot e^{kt}$, para um valor de coeficiente de correlação $r = 0,998$; onde $k = 20,6 \cdot 10^{-3}$ e $a = 29,72 \pm 2,30$. Um efeito significativo desponta a partir dos 50 minutos de observação, $p < 0,01$; atingindo-se um valor de corrente de curto – circuito $I_{sc} = -93,15 \pm 16,26 \mu A \cdot cm^{-2}$.

Este fato foi de grande importância, uma vez que o valor do coeficiente angular “k” desta expressão permite que sejam feitas comparações entre o comportamento secretório proporcionado por diferentes protocolos experimentais, de uma forma muito mais confiável do que simplesmente se comparar valores de medidas posicionados à uma certa distância um do outro, por um método estatístico; principalmente quando se deseja assinalar um comportamento cinético proporcionado mediante um estímulo, ou algo parecido.

Neste primeiro momento, verificou-se que para as preparações que receberam sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, $k = 20,6 \cdot 10^{-3}$ e apresentavam um efeito secretório que diferenciava-se em relação ao grupo controle $k = 10 \cdot 10^{-3}$ para um valor de $p < 0,0001$.

Apesar disto tudo, foram mantidos os testes estatísticos para a avaliação da fidedignidade entre os valores aferidos.

Um outro aspecto digno de nota, é que o valor aferido da corrente de curto – circuito é negativo; devido naturalmente, não só a aspectos biológicos dos mesmos, mas também conforme a orientação da aplicação dos perfusatos, registradores, etc. Para efeito de praticidade, principalmente quanto aos cálculos matemáticos; na maioria das vezes, os valores foram considerados em módulo.

Teixeira e cols, (1993), Carmichael & Falconer, (1993), entre outros; já haviam assinalado a possibilidade de ocorrência do efeito secretório intestinal em decorrência da presença de microcistina, acompanhando os casos de gastroenterites decorrentes da ingestão de água não tratada; mas não propuseram um mecanismo farmacológico para caracterizar este tipo de efeito.

Seja como for, MCLR diretamente aplicado nas preparações ileais, não produziu efeito secretório em relação ao grupo controle, conforme mostram os dados plotados na figura 13. Isto é importante de se assinalar, porque caracteriza o “efeito secretório” induzido não diretamente pela toxina da cianobactéria, mas pela participação indireta de células residentes do próprio hospedeiro.

Esta parece ser uma característica para algumas famílias de toxinas isoladas de organismos bacterianos, como ocorre com toxina A de *Clostridium difficile* (Rocha e cols, 1998).

A aplicação prévia nas culturas de macrófagos de $9,5 \cdot 10^{-7}M$ da toxina ativa de *Bordetella pertussis*, inibiu de forma significativa o efeito secretório nas preparações em câmaras de Üssing. Tendo esta toxina a capacidade de promover a ADP – ribosilação sobre a subunidade α de proteína G, desacoplando-a do respectivo sítio receptor (Gierschik, 1992); sugere que os fatores metabólicos envolvidos na produção do possível fator de secreção intestinal envolvem a participação de um tipo de proteína G. Em contrapartida, é interessante notificar que a forma mutante desta toxina não modificou a extensão e intensidade de efeito secretório produzido por MCLR nas preparações em câmaras de Üssing. Todos estes dados estão plotados na figura 15.

Cicloheximida ($10^{-5}M$), um forte inibidor de síntese de proteína, inibiu significativamente a produção do fator de secreção intestinal induzido por MCLR, como também os inibidores de tripsina e fluoreto de fenilmetilsulfonil (1mg/ml), haja vista os baixos efeitos secretórios produzidos pelos sobrenadantes de macrófagos estimulados por

MCLR que receberam, em cultura, estes inibidores; conforme pode ser visualizado nas figuras 16 e 17 respectivamente.

Interessante também é o fato de macrófagos pré-tratados com dexametasona (10^{-5} M), produziu um sobrenadante não capaz de produzir um efeito secretório satisfatório, mas estatisticamente significativo, em relação às preparações de controle, conforme os dados plotados na figura 18. De certa forma, pode-se disto deduzir que a presença deste fármaco nas culturas, diminui a produção de fator de secreção intestinal, portanto uma participação mais quantitativa.

É importante mencionar que dexametasona pode interferir no mecanismo de transcrição de RNA mensageiro de determinadas citocinas, como também pode modular a produção de derivados do ácido araquidônico, aumentando a produção de lipocortina, que pode inibir a enzima fosfolipase A_2 (Wilckens & De Rijk, 1997).

Assim, pode-se dizer que os processos de síntese do fator de secreção intestinal envolveriam, provavelmente, a participação de componentes da cascata do ácido araquidônico.

Corroborando essa idéia, quinacrina (10^{-5} M), um competente inibidor de fosfolipase A_2 , conseguiu inibir a produção do “fator de secreção intestinal”, segundo revelam os dados plotados na figura 19.

Ensaio com o bloqueador dual de ciclo e lipoxigenase, NDGA (10^{-5} M) (Higgs & Vane, 1983), e um inibidor inespecífico de ciclooxigenase, a indometacina (10^{-5} M) (Higgs & Vane, 1983), produziram um significativo efeito inibitório no possível “fator de secreção intestinal”. Os efeitos secretórios proporcionados pelos sobrenadantes estimulados por MCLR em presença destes inibidores, podem ser visualizados nas figuras 20 e 21, respectivamente.

Os inibidores de lipoxigenase (MK886, 10^{-5} M) (Gillard e cols, Ménard e cols, 1990), de ciclooxigenase 2 (NS398, 10^{-5} M) (Yamaguchi e cols., 1997), e inibidor do fator de agregação plaquetária (WEB2086, 10^{-5} M) (Yamaguchi e cols., 1997), apresentaram todos um efeito inibitório parcial com relação à gênese do “fator de secreção intestinal”, com os percentuais de 46,50%, 49,48% e 57,00%, respectivamente. Os correspondentes efeitos secretórios podem ser visualizados nas figuras 22; 23 e 24.

Estes resultados corroboram com a idéia de que elementos pertinentes à cascata do ácido araquidônico participam, de alguma forma, em determinadas etapas específicas da gênese do fator de secreção intestinal induzido por MCLR.

Pentoxifilina ($5 \cdot 10^{-4}M$) e talidomida ($10^{-5}M$), inibiram, parcialmente, a formação do fator de secreção intestinal, com percentuais de inibição de 57% e 77,1%, respectivamente; sugerindo o envolvimento de TNF com o “fator de secreção intestinal” induzido por macrófagos estimulados por MCLR; dados que podem ser visualizados nas figuras 25 e 26.

A pentoxifilina é conhecida por sua ampla capacidade de inibir o aparecimento de TNF- α no soro de camundongos e ratos tratados com LPS (Schade, 1990, Noel e cols, 1990); mas relatos indicam que pentoxifilina pode reduzir a síntese e liberação de outros mediadores importantes à resposta inflamatória tais como as interleucinas IL-2 e IL-6 (LeMay e cols, 1990; Tilg e cols, 1993). Seu mecanismo de ação parece envolver a inibição da síntese de RNA mensageiro para TNF- α (Bergese e cols, 1995).

Já a talidomida, parece inibir de forma seletiva a síntese de TNF- α (Moreira e cols, 1993), configurando-se num importante medicamento o tratamento do eritema nodoso, característico na lepra.

Com tudo isto, verifica-se que TNF pode ser uma das substâncias liberadas por macrófagos estimulado por MCLR, possivelmente associado às respostas mediadas pelo “fator de secreção intestinal”.

A realização de dosagens de TNF, por intermédio do procedimento denominado de ELISA, confirmaram a presença de TNF no sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, de forma “dose-dependente” (figura 27).

Na literatura; alguns pesquisadores relatam que MCLR pode induzir a produção de TNF, aventando a hipótese de que o aumento da concentração desta citocina possa ser um importante fator para promover secreção intestinal (Watanabe e cols, 1996).

Seja como for, também alguns trabalhos vêm citando o fato de que TNF pode atuar sobre determinadas enzimas associadas à proteína G, atreladas às junções compactas, na altura da mucosa ileal, inibindo-as (Wojcjak e cols, 1998; Gitter e cols., 2000). Segundo estes mesmos autores, esta atuação promove alterações significativas, de forma a proporcionar aumento do transporte paracelular.

Kandil e cols., (1992), já haviam assinalado que, a atividade secretória observada em preparações de mucosa ileal ou em monocamadas de células T-84, eram decorrentes da presença de TNF com a participação de prostaglandinas.

A avaliação dos efeitos do antagonista IL1-ra ($4,5 \cdot 10^{-6}M$), coloca a interleucina IL1 como uma forte candidata a vir a ser o fator responsável pelo efeito secretório proporcionado por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR; uma vez que o efeito secretório intestinal obtido nas preparações, foi substancialmente deprimido, conforme os dados plotados na figura 28.

Na verdade, a interleucina-1 constitui-se numa família de polipeptídios, IL-1 α , IL-1 β e IL1-ra; que estão relacionadas estruturalmente e funcionalmente, atuando nos mesmos sistemas de receptores (Cominelli e cols, 1994). Portanto, se fez necessário uma avaliação da participação dos outros membros desta família de moléculas, uma vez que conservam entre si algumas diferenças em termos de sequenciamento de aminoácidos, podendo assim apresentar peculiaridades quanto a afinidade por certos sistemas bioquímicos (Dinarello & Wolf, 1993).

Uma aplicação dos anticorpos monoclonais anti-IL1 α e anti-IL1 β humanos (250 μ g/ml), adicionados, 30 minutos antes ao sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, e posteriormente às preparações de tecido ileal, revelou ser a interleucina IL1 β , o principal componente do fator de secreção intestinal, uma vez que o seu bloqueio proporcionava uma profunda redução do efeito secretório, conforme mostram os dados plotados na figura 29.

As dosagens de IL1 β no sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, mediante o procedimento denominado de ELISA, revelam a presença desta interleucina, numa relação “concentração-dependente” (figura 30).

Ensaio com a aplicação direta de IL1 β às câmaras com o material fixado, mostram que esta toxina realmente promove um forte efeito secretório, conforme mostram os dados da figura 31.

Por outro lado, ensaios com o emprego de bumetanida ($10^{-5}M$), um inibidor de canais de cloreto, como também dos mecanismos de co-transporte eletroneuro de íons como Na⁺, K⁺ e 2Cl (Chang e cols, 1990; Stack e cols, 1995), mostraram que o efeito secretório apontado nas preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing, sob a ação do

sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, envolve a secreção de íons cloreto (figura 32).

Bem, trabalhos, assinalam que MCLR pode ativar a produção de citocinas como TNF e IL1 β (Watanabe e cols, 1996; Rocha, e cols, 2000) e produtos da via do ácido araquidônico como prostaglandinas, tromboxano B₂, etc. (Nassem & Hines, 1989; Nassem e cols, 1990)

Estariam as prostaglandinas envolvidas também com o” efeito secretório intestinal” mediado indiretamente por MCLR?

O pré-tratamento da mucosa ileal com um potente inibidor de produção de prostaglandinas, via inibição de ciclooxigenase, indometacina (10⁻⁶M), antes do recebimento do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, produziu um efeito secretório intestinal reduzido (figura 33); sugerindo que prostaglandinas desempenham um importante papel sobre a “secreção intestinal” mediada por este tipo de substrato. Este resultado, de certa forma, esta de acordo com àqueles descritos com a aplicação de IL-1 α e IL-1 β , em modelos experimentais de secreção intestinal, tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” (Chang e cols., 1990; Chiossone, 1990; Hinterleitner, 1996).

Um resultado semelhante, também se obteve com o tratamento prévio da mucosa ileal com tetrodotoxina (10⁻⁷M), um inibidor de canais de sódio voltagem-dependente (Barchi, 1982; Miller, 1989), que após a aplicação do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, produziu um efeito secretório reduzido, porém apreciável em relação às preparações de controle (figura 34). Este resultado sugere a participação do sistema nervoso entérico no delineamento do efeito secretório mediado pelo sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR. Este dado concorda, de certa forma, com os resultados observados por Theodorou e cols, (1994), que trabalhando com modelos experimentais de secreção intestinal “*in vivo*”, observou também um potente efeito secretório induzido por rhIL-1 β , efeito este fortemente bloqueado por tetrodotoxina.

Ensaio com Hoe (10⁻⁵M), um antagonista de receptor B₂ de bradicinina (Zhang e cols., 2002; Yang, e cols., 2003), na condição de pré-tratamento de mucosa, antes da aplicação o estímulo, não revelaram interferência significativas sobre a intensidade do efeito secretório induzido por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR (figura 35). Embora ocorram evidências que antagonistas de receptor B₂ de bradicinina possam

interferir na dinâmica de liberação de TNF α e IL-1 β em muitos tecidos, inclusive sobre macrófagos da cavidade peritoneal (Böckmann e cols., 1996).

Considerando-se o foi dito até então, vale ressaltar que os efeitos sobre as células da lâmina própria da mucosa intestinal estariam sendo proporcionados, em primeira estância, pela ação de IL1 β , que poderia atuar em diferentes frentes; uma relacionada com a estimulação de produção de prostaglandinas, que, por sua vez, poderiam atuar sobre os mecanismos enzimáticos relacionados com os sistemas de fibras que regulam a permeabilidade das junções firmes; e a outra frente estaria relacionada com a inibição de segmentos enzimáticos associados à Proteína G; o que acarretaria no acúmulo de enzimas quinases ativadas por hiperfosforilação; que, por sua vez, ativariam os canais apicais de cloreto.

Quanto esta primeira frente de atuação do fator de secreção intestinal liberado a partir de macrófagos estimulados com MCLR, pode-se dizer que a literatura correlacionada aponta vários trabalhos cujos resultados corroboram com os resultados encontrados neste trabalho.

Racussem e cols, (1980), e Heintze e cols, (1983), trabalhando com modelo de alça intestinal de coelho, haviam observado que as prostaglandinas PGE₂ e PGE₁ promoviam aumento significativo na secreção de íons cloreto, sendo este efeito, para alguns pesquisadores, associado a um mecanismo dependente de cAMP (Musch e cols, 1987).

Já Chang, (1990), e Chiossone e cols, (1990); trabalhando com preparações de tecido ileal de galinha e coelho, respectivamente, em câmaras de Üssing, verificaram que a aplicação de IL-1 β no lado seroso das mesmas produzia um significativo efeito secretório, assinalando que prostaglandinas poderiam ser os mediadores finais deste processo.

Usami e cols, (2001), utilizando-se do modelo de cultura de células do tipo Caco-2, apresentaram um resultado semelhante ao acima descrito, assinalando que produtos da via do ácido araquidônico, controlavam a permeabilidade intestinal.

Interleucina IL1 β , também poderia regular, de forma autócrina, os processos metabólicos relacionados com a produção de IL-2, TNF- α (Camussi e cols, 1990); embora tanto IL1 β (Chiossone, e cols 1990), como TNF- α (Kandil e cols, 1992), poderiam estimular a produção de prostaglandinas.

Hinterleitner e cols, (1991_A, 1991_B, 1996, 1997), trabalhando com culturas de células do tipo T84, verificaram que tanto PAF como IL1 β podiam aumentar a secreção intestinal de íons cloreto, sugerindo que o sistema imune desempenharia um importante papel no controle da secreção intestinal.

De qualquer forma, uma grande quantidade de prostaglandinas, íons cloreto e água têm sido observados tanto em diarreias corriqueiras, como nos modelos de diarreia empregados na experimentação animal (Perdue, 1993).

Um fato importante a ser destacado relaciona-se aos resultados observados por Watanabe e cols, (1996), que trabalhando com MCLR, verificaram que tanto células do baço como macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos, apresentavam um aumento na expressão de RNAm para TNF- α , como também exibiam uma elevação dos níveis de Interleucina TNF- α e IL-1 β e PAF. Assinalou também que IL1 β poderia estimular a produção de PAF, que por sua vez, contribuiria gerar efeito secretório em preparações de íleo de coelho de forma dose-dependente, mas associada à presença de prostaglandinas e de mediadores do sistema nervoso entérico (Anglow e cols, 1989; Berne e cols, 1989, Pousele, 1992).

Nos trabalhos de Madara, (1998); e Nusrat, e cols (2000), fica evidente que Interleucinas e prostaglandinas regulam também as denominadas junções firmes, de maneira que a medida em que suas concentrações aumentam, o transporte paracelular torna-se maior. Essas ações também parecerem envolver componentes enzimáticos associados à proteína G, tais como o sistema de proteínas do tipo “Rho”, ou quinases do tipo “Rock” e quinase A.

Alguns trabalhos têm assinalado que TNF- α por si só, poderia aumentar a permeabilidade paracelular (Heymam & Desjoux, 2000), uma vez que esta citocina interfere no mecanismo de redistribuição das caderinas, (Wong e cols, 1999); ou mesmo sobre a polimerização de fibras de actina (Poritz, 2001), sendo todas estas estruturas pertencentes ao universo estrutural e funcional das junções firmes.

O curioso disto tudo é que, no presente trabalho, o uso de anticorpo monoclonal para IL-1 β bloqueou completamente o efeito secretório mediado por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, em preparações de íleo de coelho em câmaras de Üssing. Se TNF α tivesse uma participação direta neste processo, deveria ocorrer algum

resíduo de corrente significativo em relação aos efeitos eletrogênicos observados nos grupos de controle; uma vez que no sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR havia TNF α , como ficou constatado pela realização das dosagens desta interleucina no sobrenadante, por intermédio do método de ELISA.

Apesar disto, não se poderia descartar por completo a possibilidade de participação de TNF α sobre os efeitos eletrogênicos observados neste trabalho, uma vez que a resistência transepitelial era diminuída durante a aplicação do sobrenadante de macrófagos estimulado com MCLR às preparações de tecido ileal; o que contribuiu para a ocorrência das alterações de permeabilidade paracelular. Segundo a literatura disponível, em princípio, TNF α teria melhores chances de atuar sobre os mecanismos que regulam as junções firmes (Wong e cols, 1999; Nusrat e cols, 2000; Poritz, 2001).

Desta forma, é possível que a segunda frente de atuação do fator de secreção liberado a partir de macrófagos estimulados com MCLR, seja mais efetiva, na inicialização do processo secretório. Após algum tempo, a co-participação de outros mediadores tais como as prostaglandinas, e substâncias reguladoras, liberadas à partir do sistema nervoso entérico; contribuam para configurar o perfil funcional dos mecanismos relacionados com as alterações de permeabilidade paracelular. Deve-se lembrar, pelas equações que descrevem tanto a variação temporal de “Isc” como de “Rte, que o coeficiente angular para a variação de corrente é maior do que o coeficiente angular obtido para a variação de resistência transepitelial; ou seja, os dois fenômenos não ocorrem na mesma escala temporal,; significando que os efeitos eletrogênicos se iniciam, e depois de um certo tempo é que as alterações na resistência transepitelial passam a ser significativas.

É Importante também lembrar que, o pré-tratamento da membrana ileal com indometacina, que conforme visto acima, atua como um potente inibidor de ciclooxigenase; ou tetrodotoxina, um inibidor de canais de Na⁺ voltagem dependente, inibiram o efeito secretório mediado por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, apenas parcialmente. Assim, estes dados reforçam a idéia de a participação de outros mecanismos para propiciar o efeito secretório, se fez presente. Em contrapartida, a aplicação de bumetanida produziu um forte bloqueio do efeito secretório.

Frente a tudo o que foi dito acima, idealizou-se um possível modelo farmacológico para os efeitos eletrogênicos observados em preparações ileais montadas em câmaras de

Üssing, mediante aplicação de sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR. Nas figuras 47, 48 e 49, encontram-se resumidos os resultados obtidos dos protocolos experimentais, relacionados com especulação sobre os principais aspectos da gênese do fator de “secreção intestinal”; as evidências em favor de IL-1 β como principal fator de secreção intestinal e sua possível ação sobre a mucosa do tecido ileal. O modelo farmacológico proposto, pode ser visualizado na figura 50.

Um outro fato que seria importante de ser aventado, é que o efeito de variação de corrente de curto-circuito, em resposta ao estímulo recebido, na verdade é o resultado do somatório da contribuição de corrente de cada enterócito e estruturas correlacionadas, a cada instante. De certa forma, isto poderia configurar uma espécie de sistema dinâmico, onde a cada instante teríamos, num universo microscópico, vórtices sobre vórtices de correntes se superpondo.

Assim, a natureza de toda esta dinâmica, estaria também atrelada às características funcionais de cada canal iônico envolvido no processo, como também a extensão de superfície disponível na região das junções firmes.

Na tentativa de se entrar neste universo diminuto, procurou-se avaliar o processo de produção de corrente de curto-circuito em preparações ileais, em resposta ao efeito secretório induzido por macrófagos estimulados por MCLR; utilizando-se uma ferramenta estatística não convencional denominada “Análise R/S de Hurst” (Feder, 1988; Varanda, 2002).

O coeficiente de Hurst para o grupo não estimulado por MCLR foi $H = 0,890 \pm 0,023$ ($n = 11$). O curioso é que para os grupos que foram tratados com sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, “H” variou de forma concentração dependente, atingindo valores de $H = 0,424 \pm 0,018$, para um valor de $p < 0,01$, quando a concentração de MCLR empregada para estímulo de macrófagos era de $3,2 \cdot 10^{-6} M$ ($n = 9$). Esta variação foi descrita por uma função do tipo $H = a \cdot e^{k \cdot MCLR}$, onde $a = 0,76 \pm 0,06$ e $k = -0,20 \pm 0,05$, para um valor de coeficiente de correlação $r = 0,982$ (figura 37).

A variação de corrente produzida por IL-1 β ($10^{-7} M$) apresentou um valor para a constante de Hurst $H = 0,482 \pm 0,035$, ($n=8$), para um valor de coeficiente de correlação $r = 0,87$ e $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. Este valor se aproxima daquele obtido quando da aplicação do sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR; o que

assinala uma grande semelhança entre os mecanismos cinéticos acionados por cada um destes. Esta é uma evidência a mais em favor da IL-1 β como principal fator de secreção intestinal.

Baseando-se agora nos critérios de classificação de sistemas que exibem autocorrelação apresentado por Varanda e cols (2000), verificou-se que sem estímulo induzido por MCLR, “H” se aproxima de 1. Nesta condição, pode-se dizer, inicialmente, que por “H” ter sido diferente de 0,5, os mecanismos envolvidos no processo de produção de corrente não operaram aleatoriamente. Ou seja, os resíduos de corrente observados nas preparações de tecido ileal no grupo controle, seriam decorrentes de tentativas de ajustes na distribuição iônica nos espaços luminal, paracelular e intercelular, mediados pelos diferentes sistemas de transporte de íons associados com esta região funcional.

Assim, por “H” ter apresentado um valor próximo de 1, pode-se dizer que existiu uma correlação positiva entre os valores de corrente “Isc” mensurados em intervalos temporais pequenos em relação aos valores obtidos para “Isc” em intervalos temporais maiores. O sistema se comporta, em termos de evolução dinâmica dos processos secretórios, como se possuísse uma espécie de memória persistente, ou seja; uma resposta de elevação de corrente no momento presente, tende a gerar um aumento de resposta de corrente num tempo futuro.

Este tipo de abordagem é interessante, porque sugere que os mecanismos regulatórios envolvidos no processo secretório intestinal, quando o tecido não esta submetido a estímulos externos; conseguem compensar as perturbações iônicas tardiamente; como se seqüências muito rápidas de pulsos de correntes gerariam correntes cada vez maiores, até que todo o sistema se desestabilize.

Em presença de estímulos mediante a ação da MCLR, o sistema evolui para uma condição diferente, onde “H” agora assume valores cada vez mais próximos de zero. Nesta nova condição, a correlação entre as medidas de “Isc” em intervalos temporais pequenos apresentou uma correlação negativa em relação às medidas de “Isc em intervalos temporais maiores. Em outras palavras, o sistema dinâmico assumiria então, uma condição de memória antipersistente; onde nesta nova configuração, uma elevação de corrente no tempo presente, significaria num tempo futuro a geração de uma corrente menor.

Este fato acima é interessante, pois sugere que os mecanismos regulatórios associados aos processos secretórios, tende a evoluir na sua dinâmica, para promover a restauração das condições iniciais, anteriores ao recebimento dos estímulos”.

Desta forma, este dado acima assinalado, vai de encontro às idéias de Fasano (2000), que acreditava que as junções firmes seriam destruídas, irreversivelmente, em presença de determinados mediadores pro-inflamatórios. Bem, é possível que em casos extremos, as estruturas filamentosas assumam uma condição inviável, devido a inoperância dos sistemas reguladores, comprometidos pela presença deste ou daquele mediador. Desta forma, todo o mecanismo de regulação de trânsito paracelular sucumbiria. Mas os dados sugerem que a região paracelular seja possuidora de um mecanismo de regulação de resistência transepitelial, controlado pelos sistemas nervoso entérico, imunológico e endocrinológico; procurando acomodar o organismo às diferentes condições fisiológicas que corriqueiramente despontam, procurando sempre a melhor condição possível para se conciliar as necessidades eletrogênicas de momento, com o contexto iônico itinerante.

Enfim, seja qual tenha sido o tipo de mecanismo tecidual que tenha proporcionado o efeito secretório, este foi alterado devido à presença do fator de secreção presente no sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR.

Há ainda um outro aspecto interessante relacionado com o fato da constante Hurst ter sido diferente de um ou zero. Este fato sugere que o mecanismo envolvido na resposta secretora admite uma natureza fractal; que em outras palavras significa dizer que as taxas de produção de “Isc” não foram constantes ao longo do tempo; bem provavelmente, devido à contribuição de muitos fatores, que concorreram para uma mesma resposta final. Entre estes fatores poderiam ser destacados os aspectos relacionados com a dinâmica das junções firmes, bem como a natureza da variação cinética, dos diferentes sistemas de transporte de íons, na membrana apical e basolateral do enterócito.

Em princípio, isto pode parecer confuso; mas, observando-se atentamente o fenômeno, verifica-se, por exemplo, que as contribuições de corrente de cada enterócito, é que define a quantidade de corrente de curto-circuito total que despontará num determinado momento do experimento. Para cada centímetro quadrado e tecido fixado, tem-se um número específico de enterócitos, que não necessariamente estariam todos ativados num determinado instante do experimento. Verifica-se assim, que seria difícil, num modelo

convencional, de se saber quantos enterócitos seriam mobilizados numa resposta secretora qualquer.

Baseando-se ainda no ponto de vista de Fasano (2000), se as junções firmes seriam realmente destruídas irreversivelmente; ter-se-ia assim, um grande problema. Praticamente, para cada enterócito envolvido no processo secretório, atingido pelos mediadores de um processo infeccioso, ter-se-ia na mesma proporção, um conjunto de junções firmes destruídas; e isto, com certeza, tornaria cada vez mais difícil a recuperação das condições funcionais os tecido atingido. Em situações críticas, é possível que isto ocorra, mas em situações de contato com doses subletais de toxina MCLR; isto, bem provavelmente, não deve acontecer.

Desta forma, é sempre interessante se ter à disposição possibilidades explicativas alternativas para os fenômenos estudados; pois isto permite uma melhor contextualização entre os dados obtidos e as reais condições em que o fenômeno se processa.

Uma outra forma de se observar o caráter multifatorial do “efeito secretório” em preparações de tecido ileal, sob a ação do sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, é a verificação dos eventos moleculares necessários para elicitar a secreção de íons cloreto. A interação entre diferentes cascatas moleculares culmina com a disposição de um conjunto de enzimas do tipo quinases, numa condição especial de fosforilação, que ao interagir com os canais apicais de cloreto, podem alterar a sua condição de permeabilidade. Mas pode-se verificar, que este evento, nesta dimensão não é único, uma vez que estas enzimas podem também estar efetuando um bloqueio nos mecanismos de co-transporte eletroneutro de Na^+/Cl^- , na região apical.

Uma verificação no comportamento da resistência transepitelial verificou-se que esta variava ao longo do tempo, quando as preparações de tecido ileal recebiam como estímulo o sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR. Esta variação ocorreu segundo uma função do tipo $R_{te} = a \cdot e^{kt}$, onde $a = 9,91 \pm 3,36$ e $k = -(10 \pm 10) \cdot 10^{-3}$, para um coeficiente de correlação $r = 1,000$ (figura 4.3.1). Como K é negativo, isto significa que a resistência transepitelial diminuía ao longo do tempo (figura 38).

A diminuição da resistência transepitelial significa um aumento da permeabilidade ao nível das junções firmes, naturalmente concorrentes com a presença do fator secretório. Em outras palavras, a exemplo do que a literatura já assinala (Wojcjak e cols, 1997, Nusrat

e cols., 2000) a presença de TNF no fator de secreção intestinal pode contribuir para o acionamento dos sistemas enzimáticos associados à uma proteína G, que inicia as cascatas de eventos que visam controlar a dinâmica dos diferentes tipos de filamentos que compõem as denominadas junções firmes.

As variações do potencial transepitelial não diferiram de forma significativa em relação ao grupo controle (S.MφS + RPMI). Em princípio, isto poderia configurar a realização por parte dos enterócitos mecanismos compensatórios que teriam por finalidade compensar, por exemplo, o aumento da secreção de cloreto, permitindo a passagem de íons de Na⁺ em direção a região luminal, via região paracelular, a fim de minimizar os efeitos de elevação de tensão, devido ao aumento da concentração de cloreto na região luminal.

A constante de Hurst para a resistência transepitelial foi determinada, verificando-se que na ausência de estímulo $H = 0,689 \pm 0,053$ ($n = 7$). Em presença de estímulo, diminui de forma dose dependente, até atingir o valor de $H = 0,422 \pm 0,043$ ($n = 6$), $p < 0,01$; quando eram aplicados sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR na concentração de $3,2 \cdot 10^{-6} M$. Esta pode ser descrita por uma função do tipo $H = a \cdot e^{k \cdot MCLR}$, onde $a = 0,39 \pm 0,10$ e $k = 0,03 \pm 0,10$, para um valor de coeficiente de correlação de $r = 0,778$ (figuras 40 e 41).

Levando-se em conta a dificuldade de se calcular a constante “H” com relação aos dados referentes à resistência transepitelial, verificou-se que o valor obtido para as preparações que não receberam estímulo, não foi elevado como se esperava, mas por ter apresentado um valor diferente de “0,5”; sugere que os mecanismos associados à regulação da permeabilidade das junções firmes não operam aleatoriamente. Ou seja, as configurações da resistência transepitelial estariam associadas a mecanismos regulatórios multifatoriais. Os valores próximos de um da constante “H” conotam a ocorrência de uma correlação positiva entre os valores de resistência efetuados em intervalos temporais pequenos, com medidas efetuadas em intervalos temporais maiores. Este sistema assim comporta-se como também possuidor de uma memória persistente; ou seja, um estímulo de aumento de permeabilidade no tempo presente, pode significar um aumento de permeabilidade num tempo futuro.

Também é interessante frisar, que este comportamento descrito acima, sugere que seqüências rápidas de perturbações nos mecanismos regulatórios das junções firmes, podem

gerar alterações na condição de resistência transepitelial, de maneira a levar o sistema à uma condição de desestabilização.

Mas, em presença de estímulo, o sistema evoluiu para uma condição de memória antipersistente; ou seja, um estímulo de aumento de permeabilidade no presente, significaria agora, uma diminuição desta permeabilidade num tempo futuro, pois a correlação entre as medidas efetuadas em pequenos intervalos temporais perante as medidas de resistência efetuadas em intervalos temporais maiores, tende a ser negativa. É importante assinalar que agora o sistema passa a se comportar como se ocorressem mecanismos restauradores, que tendem a recompensar as alterações ocasionadas inicialmente.

Como “H” apresentou valores diferentes de zero 0,5 e um; verificou-se que a dinâmica de variação da resistência transepitelial admitia uma dimensão fractal. Em outras palavras, isto significa dizer que as taxas de variação da resistência transepitelial não foram constantes no tempo, como também os valores de R_{te} , pareciam depender da escala temporal empregada para efetuar a sua medida.

É importante que se diga que nas condições em que foram realizados os experimentos, neste trabalho, não permite que sejam descritos os modelos matemáticos, que atrelam as variações de I_{sc} e R_{te} , à dimensão fractal. Para isto, seriam necessários estudos, que avaliassem, mais pormenorizadamente a forma como os canais apicais de cloreto, e as junções firmes, por exemplo; conduzem íons, que concerrem para caracterização da “secreção intestinal”, sob determinados tipos de estímulos.

Mas, espera-se com estes resultados apresentados até então, que se considere o efeito secretório intestinal produzido pela participação integrada de diferentes tipos de mediadores e sistemas, numa perspectiva diferente da forma fragmentada, como normalmente é abordado.

Apesar de ser mais cômodo o registro de parâmetros macroscopicamente, não se deve perder de vista que estes efeitos representam o resultado da participação efetiva de cada componente celular do tecido ileal, bem como de cada unidade metabólica que conserve alguma pertinência com os mecanismos associados ao efeito de secreção intestinal.

Portanto, um modelo que procure descrever este fenômeno da forma mais fidedigna possível, deverá considerar estas participações individuais, e as diferentes dimensões em que os seus efeitos iteram.

As variáveis que definem a variação de corrente de curto-circuito - ΔI_{sc} , a variação resistência transepitelial - ΔR_{te} e a variação de tensão transepitelial - ΔV_{te} , puderam ser descritas numa relação de dose e efeito, cujos dados podem ser observados nas figuras 42, 43 e 44 respectivamente. Como não poderia deixar de ser, com o aumento da concentração de MCLR, obteve-se um aumento na corrente de curto-circuito, uma diminuição na resistência transepitelial e uma discreta diminuição no potencial transepitelial.

Finalmente, uma questão interessante; conforme já foi assinalado acima, é que Toxina A de *Clostridium difficile* também estimula macrófagos a produzir um fator molecular, que promove um significativo efeito secretório em preparações de tecido ileal montadas em câmara de Üssing. A questão que fica é, macrófagos agiria da mesma forma frente a esta toxina e a MLCR de *Microcystis aeruginosa*?

A busca de relações matemáticas entre grandezas que possam ser aferidas e quantificadas num ensaio experimental, pode possibilitar a descoberta de peculiaridades que dificilmente poderiam ser acessadas, diretamente, por um instrumento específico, por melhor que fosse o protocolo experimental realizado.

Tendo-se como verdadeiro os termos acima assinalados, foi idealizado um conjunto de análises matemáticas, que permitiu a verificação da validade da hipótese acima levantada; ou seja, de que a relação entre as taxas de liberação de $IL1\beta$ e $TNF\alpha$ seriam diferentes para diferentes estímulos químicos aplicados sobre a cultura de macrófagos. Isto, de certa forma, também serviu de motivação para que fosse possível tentar responder algumas questões curiosas, como: a- Quando um macrófago é estimulado por uma toxina, o que ele irá produzir ou liberar primeiro? ou ainda; b- Que mediador é necessário que se produza mais rapidamente, ou em maior quantidade, frente à um estímulo específico?

Neste propósito, um primeiro aspecto importante a ser ressaltado é que, dentro das condições experimentais do presente trabalho, a simples adição dos meios de cultura, sem aplicação das toxinas estimuladoras, promovia a liberação de tanto de $TNF\alpha$ como de $IL1\beta$ como substâncias mediadoras. Verificou-se também, que as expressões matemáticas que

descreviam a liberação de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL1}\beta$, mediante o estímulo de MCLR, eram do mesmo tipo; sugerindo que, no mínimo, os mecanismos de liberação destes mediadores apresentavam um comportamento cinético similar.

Admitindo-se que, do ponto de vista prático, haveriam dificuldades para se averiguar diretamente o comportamento das funções obtidas nos seus valores extremos, procurou-se trabalhar com a taxa de variação infinitesimal tanto de $\text{TNF}\alpha$ como de $\text{IL1}\beta$, em relação à menor quantidade de estímulo imaginável de MCLR, suficiente para induzir os macrófagos à liberarem estes mediadores.

Aplicando-se um método de derivação simples, verificou-se que ambas as taxas de liberação de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL1}\beta$ eram constantes e independentes da quantidade de estímulo químico aplicado. Em outras palavras, apesar de haver uma relação de dose-resposta positiva, entre a concentração de MCLR e a quantidade liberada de ambos os mediadores, a taxa de liberação dos mesmos manteve-se constante, mesmo em presença de concentrações elevadas de MCLR..

A relação entre taxas infinitesimais de liberação de ambos mediadores, mostrou que macrófagos liberavam, com maior afinidade, mais $\text{IL1}\beta$ do que $\text{TNF}\alpha$, quando o estímulo era a toxina MCLR. Este achado é interessante, uma vez que, inicialmente, antes do estímulo ser aplicado, a concentração de $\text{TNF}\alpha$ era sempre bem maior do que a de $\text{IL1}\beta$; e mesmo quando a concentração de MCLR foi de $1,0 \mu\text{g/ml}$, a concentração de $\text{TNF}\alpha$ verificada no SOB de $\text{M}\phi\text{S}$ foi nominalmente maior do que a concentração de $\text{IL1}\beta$, embora as diferenças não foram significativas para um valor de $p < 0,05$; mesmo admitindo-se os efeitos parácrinos destes mediadores (figura 45).

Seria este fato, de crucial importância para o estabelecimento das alterações fisiológicas fundamentais, que culminariam na caracterização das diferentes patologias associadas à MCLR envolvendo a participação de macrófagos?

Considerando-se os efeitos proporcionados pela ação de $\text{IL1}\beta$ sobre os vários tipos de células, tecidos e sistemas orgânicos, poderia se fazer muitas especulações sobre o significado de ser este mediador, justamente aquele que o macrófago, sob certas condições,

liberaria com maior rapidez. Não deve ser a toa que IL1 β é o principal fator liberado de macrófagos estimulados com MCLR, responsável pelas alterações eletrogênicas intestinais, em preparações de íleo de coelho.

Esperava-se que a estimulação de macrófagos por Tox A apresentasse um perfil cinético de liberação de IL-1 β e TNF- α similar, embora com valores numéricos distintos; pois em ambos os casos os mediadores seriam praticamente os mesmos.

Numa primeira abordagem, verificou-se que as expressões matemáticas que melhor descreviam a liberação de TNF α e IL1 β , em função da variação da concentração de ToxA eram diferentes. TNF α variava segundo uma função do tipo radiciação, enquanto IL1 β variava segundo uma função do tipo polinômio incompleto do terceiro grau, quando o estímulo químico era Tox A. Este comportamento difere de quando macrófagos eram estimulados com MCLR, pois tanto TNF α como IL1 β foram liberados segundo funções do tipo linear (figura 46).

Em princípio, poder-se-ia admitir a participação de mecanismos diferentes para a produção e liberação destes mediadores, em situações distintas quanto ao estímulo químico empregado. Mas, poderia um macrófago, possuir mais de um mecanismo para a produção e liberação de um mesmo tipo de mediador químico?

Levando-se em conta aspectos termodinâmicos, pode-se dizer que seria pouco provável que uma célula como um macrófago, viesse a possuir diferentes mecanismos de liberação para um mesmo tipo de mediador químico, pois isto implicaria num dispêndio energético alto, não compatível com suas características fisiológicas e necessidades metabólicas; embora existam fortes evidências de que macrófagos possam também utilizar aminoácidos como a glutamina, alanina, além da glicose, como suprimento energético adicional, para fins catalíticos (Curi e cols, 1999). Seria mais lógico admitir que tanto para a produção como para a liberação de um tipo específico de mediador, exista um único mecanismo que possa ser modulado por várias outras substâncias.

Não foi possível determinar, qualitativamente e quantitativamente, a dimensão das alterações bioquímicas ocorridas no interior dos macrófagos, em decorrência das condições em que foram realizados nossos experimentos; portanto, não há como precisar se estas

alterações ocorreram somente em termos de produção, liberação ou em ambos os mecanismos. Pelo mesmo motivo, também não foi estabelecida uma relação entre produção e liberação de mediadores à partir de macrófagos estimulados com toxinas. Com toda certeza, estes não são processos simultâneos; como também nem sempre lineares. Daí o cuidado em associarmos estes dois termos, neste trabalho. Podemos apenas dizer, que as diferenças observadas na forma de liberação de $\text{TNF}\alpha$ e de $\text{IL1}\beta$ em presença de ToxA, foi em resposta à um padrão de interação molecular específico, que gerou importantes transformações bioquímicas, que resultaram num mecanismo operacional distinto daquele observado quando os macrófagos eram estimulados por MCLR.

As taxas infinitesimais obtidas para $\text{IL1}\beta$ e $\text{TNF}\alpha$, quando macrófagos eram estimulados com Tox A, eram funções da concentração de toxina adicionada ao sistema de cultura; ou seja, a taxa de liberação dos mediadores em presença de Tox A não era constante, mas sim, variava conforme a concentração de toxina no meio. Esta é uma importante diferença de comportamento cinético quando comparávamos o resultado acima com àquele obtido quando macrófagos eram estimulados com MCLR, em que as taxas de liberação destes mesmos mediadores era constante e independente da variação de concentração do estímulo químico no meio.

A razão matemática entre as taxas infinitesimais de liberação $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL1}\beta$ em presença de Tox A, assinala que à partir de uma concentração crítica de Toxina A na cultura de macrófagos, a cinética de liberação de $\text{TNF}\alpha$ pode ser alterada de forma significativa em relação à liberação de $\text{IL1}\beta$, podendo ser igualada ou mesmo invertida. Estes dados sugerem que Tox A. exerce uma influência muito mais significativa sobre o macrófago, quanto a liberação de mediadores do que MCLR.

De maneira geral, verifica-se que a taxa de liberação de $\text{IL-1}\beta$ é mais atuante do que a taxa de liberação de $\text{TNF-}\alpha$, quando o estímulo é mediado pela Tox A.

Seria este um fator também importante no delineamento das diferenças observadas na patologia e no efeito secretório intestinal proporcionados pela participação da ToxA em relação à MCLR?

A observação de todos estes fatos levou à confirmação de que a hipótese acima levantada era verdadeira; ou seja, de que a forma de liberação de mediadores, no caso IL1 β e TNF α , a partir de macrófagos estimulados, dependia do tipo de estímulo químico empregado.

Sendo assim, pode-se também admitir, que esta característica distinta entre as cinéticas de liberação de mediadores observada em macrófagos sob estímulos químicos distintos, tem importante papel no encaminhamento dos estados patológicos nos diferentes tipos de tecidos ou sistemas, em especial sobre o sistema gastroentérico.

É possível que, uma vez conhecida as relações existentes de produção e liberação das principais substâncias, que cumprem importante papel na modulação das ações moleculares mais significativas da resposta biológica; seja possível, num futuro próximo, a compreensão dos mecanismos das mais importantes patologias; como também o desenvolvimento de recursos que possibilitem a manipulação destes fatores, objetivando melhorar a performance fisiológica dos organismos acometidos.

Por outro lado, com as expressões matemáticas acima obtidas, é possível avaliar, indiretamente, a magnitude de efeitos orgânicos proporcionados pela liberação dos mediadores estudados, conforme o tipo e a quantidade de estímulo químico presente. Apesar das equações terem sido escritas segundo os valores médios obtidos tanto para TNF α como IL1 β , pode-se estimar o intervalo de valores reais para cada mediador, considerando-se que a razão entre os valores do erro padrão da média (epm) e os valores médios é proporcional à uma constante adimensional cujo valor é de 0,156.

A simples interação de uma toxina com um tipo celular específico, está longe de ser um evento trivial. Tudo ocorre, na verdade, como se as células possuíssem um tipo especial de memória, que permitisse o reconhecimento de grupamentos químicos específicos, emitindo uma resposta, não necessariamente ao estímulo recebido, mas, acima de tudo, um sinal que pudesse mobilizar as operações necessárias para que o organismo viesse a encontrar a melhor forma de minimizar os riscos deletérios, eminentes pela presença do agente agressor.

O conhecimento das sutilezas escondidas nas diferentes dimensões em que os parâmetros biológicos se relacionam, pode fazer a diferença na obtenção de medidas preventivas ou mesmo de procedimentos clínicos e terapêuticos eficazes.

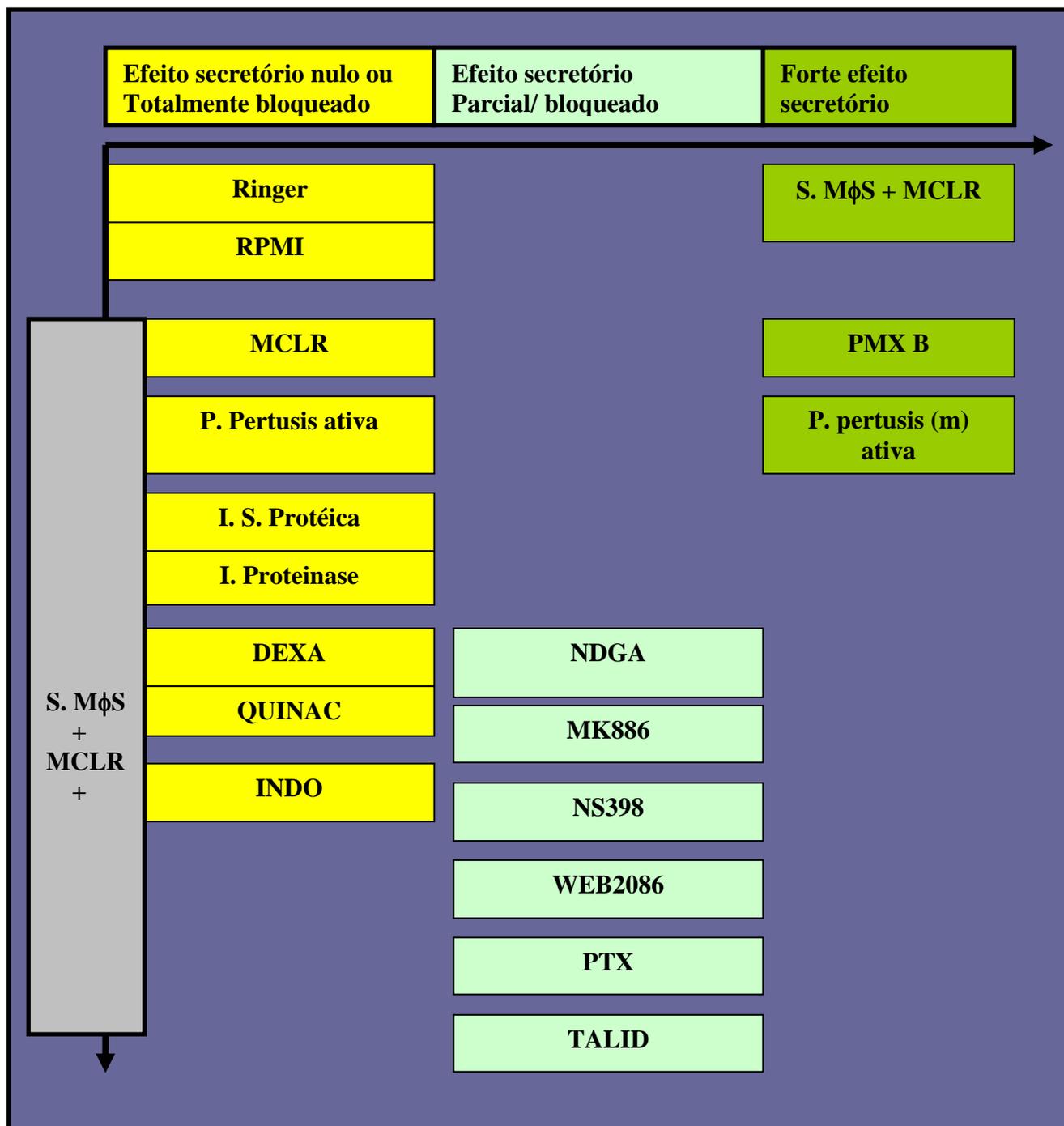


Figura 47. Resumo esquemático dos resultados obtidos a partir dos protocolos experimentais, até a etapa correspondente ao uso de bloqueadores de TNF.

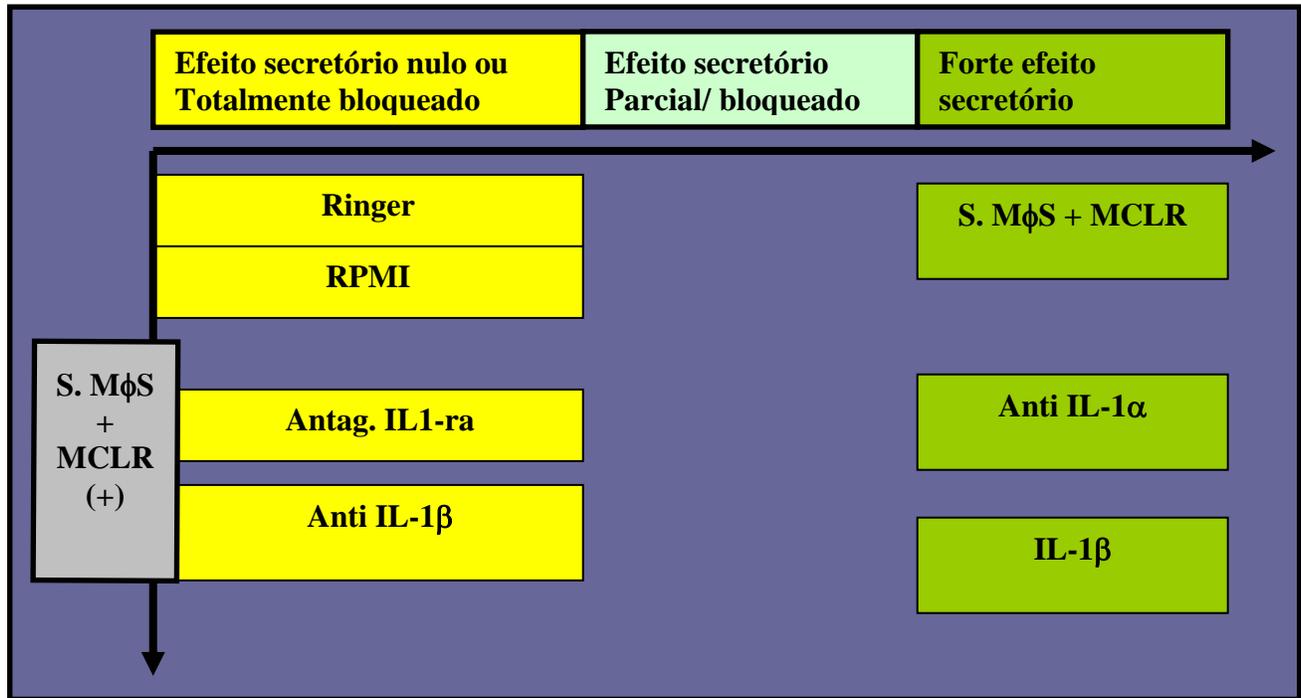


Figura 48. Resumo esquemático: resultados dos protocolos experimentais, compreendido entre as dosagens de TNF-α até a dosagem de IL-1β.

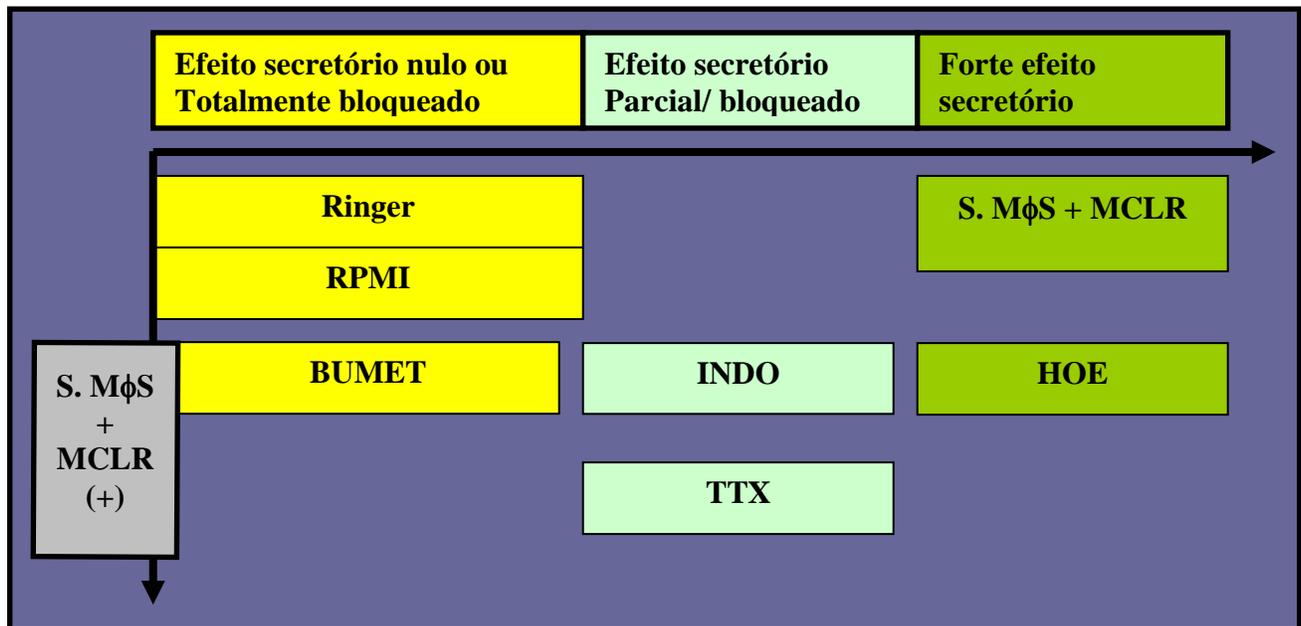


Figura 49. Resumo esquemático: resultados dos protocolos experimentais, referentes à fase de pré-tratamento da mucosa ileal, com diferentes tipos de bloqueadores.

O modelo proposto (figura 50), foi idealizado tomando-se como base os resultados obtidos no presente trabalho (resumidamente nas figuras 47, 48 e 49), bem como as informações disponíveis na literatura especializada. A seguir, segue-se um resumo destas informações, objetivando clarificar algumas etapas do mecanismo acima proposto, destacando-se os autores cujos resultados dos seus trabalhos concordaram com os deste trabalho; sendo que os detalhes estão pormenorizados no capítulo referente à discussão dos resultados. *Microcystis aeruginosa*, libera MCLR, que, por sua vez, pode estimular macrófagos a liberar diferentes mediadores, entre estes, TNF- α , IL-1 β , PAF e prostaglandinas, como também se pode verificar nos trabalhos de Racussem, e cols., (1980); Nakano, e cols., (1991); Watanabe, e cols., (1996). TNF- α pode participar da inibição de sistemas enzimáticos específicos, diretamente (Wojcjak e cols., 1998; Gitter e cols., 2000); ou indiretamente, pela estimulação de mediadores da cascata do ácido araquidônico (Nusrat, e cols., 2000); sendo que muitos destes sistemas enzimáticos estão associados à uma proteína G (Saha e cols., 2001). Este efeito inibitório pode sinalizar operações enzimáticas, envolvendo o sistema de quinases; que podem interferir com os mecanismos de ativação dos diferentes sistemas de filamentos que constituem as junções firmes, promovendo assim, uma diminuição da resistência transepitelial, aumentando a permeabilidade paracelular. Já com relação à IL-1 β , esta pode estimular a produção e liberação de prostaglandinas (Racussem e cols., 1980; Chang e cols., 1990; Chiossone e cols., 1990), bem como, a liberação de mediadores a partir do sistema nervoso entérico (Pousele, 1992); sendo que estas substâncias ativariam enzimas quinases específicas que atuariam sobre os sistemas bioquímicos de regulação das junções firmes (Kandil e cols., 1992; Nusrat e cols., 2000) ou sobre canais iônicos específicos como é o caso da ativação dos canais de íons cloreto (Hinterleitner e cols., 1996, 1998). Uma outra possibilidade, provavelmente mais efetiva, seria a participação de IL-1 β promovendo a inibição de sistemas enzimáticos desfosforiladores, deixando algumas enzimas, como as quinases do tipo A, ativadas. Estas enzimas, por sua vez, poderiam agora, inibir os canais apicais de Na⁺ e promover a abertura de canais de íons cloreto, promovendo assim um significativo efeito secretório intestinal (Musch e cols., 1987; Perdue, 1993).

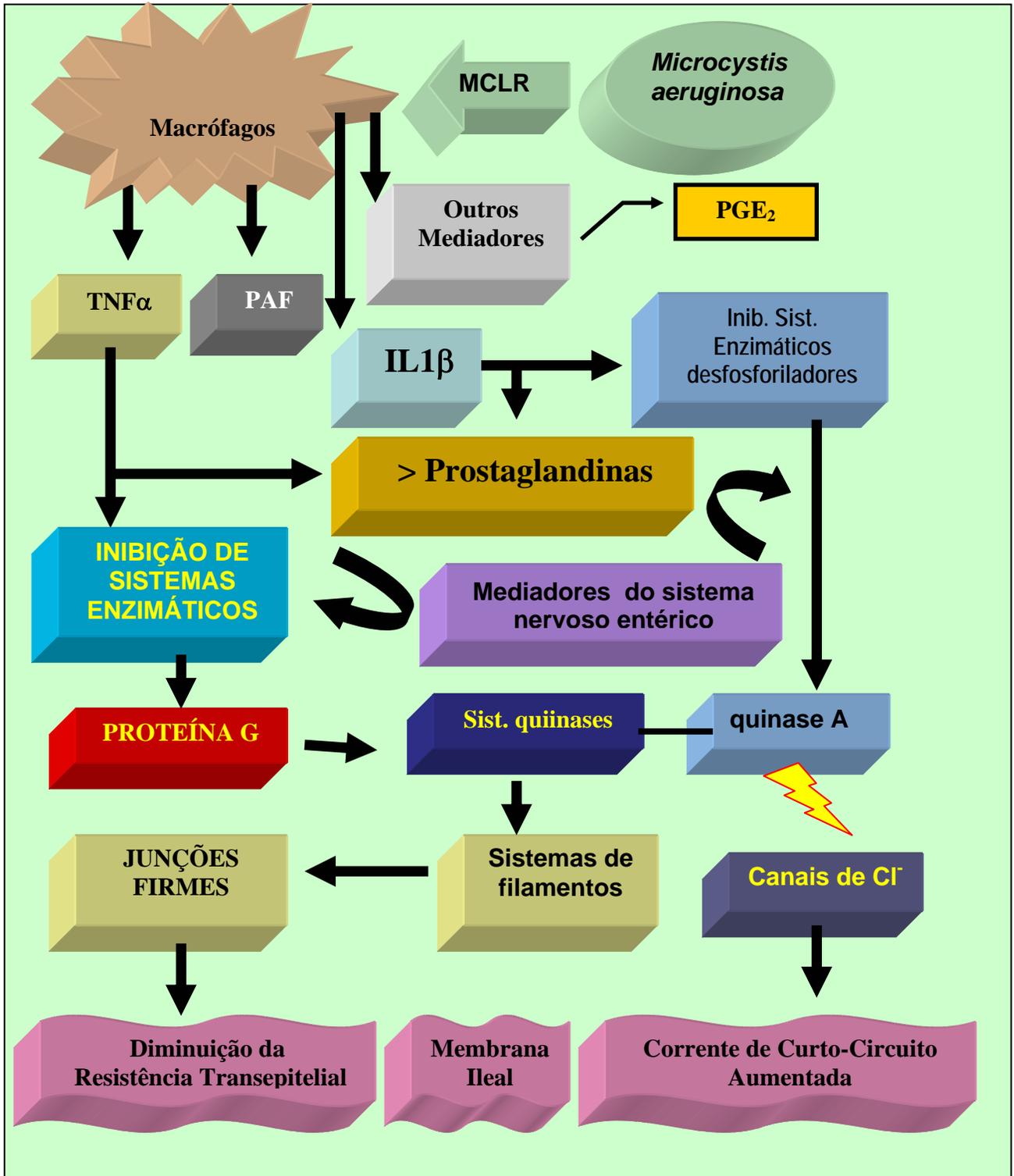


Figura 50. Possível mecanismo para os efeitos secretórios induzidos por sobrenadante de macrófagos estimulados com MCLR, em preparações de tecido ileal em câmaras de Üssing.

6. CONCLUSÕES

1. O sobrenadante de macrófagos estimulados com microcistina-LR (MCLR) de *Microcystis aeruginosa* induz a formação de um significativo “efeito secretório” em preparações de íleo de coelho montadas em câmaras de Üssing;
2. Os processos metabólicos envolvidos na formação do fator de secreção intestinal produzido por macrófagos estimulados por MCLR, foi dependente de uma proteína G, sensível à toxina pertussis;
3. Prostaglandinas, PAF e TNF participaram, de maneira autócrina, nos mecanismos metabólicos de formação do fator de secreção intestinal;
4. A interleucina IL1 β é o principal fator responsável pelo efeito secretório intestinal induzido por MCLR;
5. A “secreção intestinal” induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR é dependente da secreção de íons cloreto;
6. O “efeito secretório” intestinal mediado por IL1- β ocorre indiretamente, com a participação de macrófagos residentes, envolvendo a síntese de prostaglandinas e a ativação do sistema nervoso entérico;
7. O “efeito secretório” intestinal proporcionado por sobrenadante de macrófagos estimulados por MCLR, promove redução da resistência transepitelial;
8. Pela análise da variação do coeficiente de Hurst, verificou-se que o sistema de regulação dos fenômenos eletrogênicos ao nível de mucosa ileal, não operam aleatoriamente; variando dinamicamente, para uma nova configuração de cinética iônica, à medida que a quantidade do fator de secreção aumentava no sobrenadante de macrófagos estimulados com doses crescentes de MCLR. Este processo envolveu tanto o aumento de corrente de curto-circuito, como a diminuição da resistência transepitelial;
9. Pela análise da dimensão fractal, verificou-se que as taxas de produção de corrente, como também as taxas de variação de resistência transepitelial não eram constantes ao longo do tempo, sendo os seus valores dependentes da escala temporal empregada para suas aferições;

10. Macrófagos estimulados por MCLR produzem e liberam TNF α e IL1 β de forma característica, a taxas constantes e de mesma magnitude.
11. A taxa de Liberação de TNF α e IL1 β por macrófagos estimulados por MCLR de *Microcystis aeruginosa* foi diferente quantitativamente e qualitativamente, em relação a taxa liberação dos mesmos mediadores, quando o estímulo empregado era a Toxina A de *Clostridium difficile*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ABCOUWER, S. F.; BODE, B. P.; SOUBA, W. W. Glucocorticoids regulate rat glutamine synthetase expression in a tissue-specific manner. **J. Surg. Res.**, 59 (1): 59-65, 1995a.
02. ABCOUWER, S. F.; LUKASCEWICZ, G. C.; RYAN, U. S.; SOUBA, W. W. Molecular regulation of lung endothelial glutamine synthetase expression. **Surgery**, 118 (2): 325-335, 1995b.
03. ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. Molecular transductional mechanisms by which IFN- γ and other signals regulate macrophage development. **Immunolog. Rev.**, 97: 5-15, 1987.
04. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 2. ed. New York: Garland Publishing, 695p, 1989.
05. ANGLIM, A. M.; FARR, B. M. Nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, 7: 602-608, 1994.
06. AUSTGEN, T. R.; CHEN, N. K.; DUDRICK, P. S.; COPELAND, E. M.; SOUBA, W. W. Cytokine regulation of intestinal glutamine utilization. **Am. J. Surg.**, 163 (1): 174-180, 1992.
07. AVERY, R. M.; SHELTON, A. P.; BEARDS, G. M.; OMOTADE, O. O.; OYEJIDE, O. C.; OLALEYE, D. O. Viral agents associated with infantile gastroenteritis in Nigeria: relative prevalence of Adenovirus Serotypes 40 and 41, Astrovirus, and Rotavirus Serotypes 1 to 4. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, 10: 105 – 108, 1992.
08. BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-activating peptide-1 / interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **J. Clin. Invest.**, 84: 1045-1049, 1989.
09. BALBACH, M.; BLISS, L. C. **A laboratory manual for botany**. 7. ed. Saunders Harcourt Brace Jovanich, 201-203, 1991.
10. BALDA, M. S.; MATTER, K. Tight junctions. **J. Cell Sci.** 111: 541-547, 1998.

11. BARCHI, R. I. Biochemical studies of the excitable membrane sodium channel. **Int. Rev. Neurobiol.**, 263: 69-101, 1982.
12. BARRET, T. A.; MUSCH, M. W.; CHANG, E. B. Chemotactic peptide effects on intestinal electrolyte transport. **Am. J. Physiol.**, 259: G947-G954, 1990.
13. BARRETT, K. E. Mechanisms of inflammatory diarrhoea. **Gastroenterology**, 103: 710-711, 1992.
14. BEASLEY, V. R.; COOK, W. O.; DAHLEM, A. M.; HOOSER, S. B.; LOVELL, R. A.; VALENTINE, W. M. Algae intoxication in livestock and waterfowl. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 5: 345-361, 1989.
15. BERGER, J. M. & MANDELBROT, B. B. A new model for the clustering of errors on telephone circuits. **IBM j. of Research and Development** 7: 224-236; 1963.
16. BERN, C.; MARTINES, J.; DE ZOYSA, I.; GLASS, R. I. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. **Bull World Health Organ.**, 70 (6): 705-714, 1992
17. BERN, M. J.; STURBAUM, C. W.; KARAYALCIN, S. S.; BERSCHNEIDER, .H. M.; WACHSMAN, N. T.; POWELL, D. W. Immune system control of rat and rabbit colonic electrolyte transport: role of prostaglandins and enteric nervous system. **J. Clin. Invest.**, 83: 1810-1820, 1989.
18. BERSCHNEIDER, H. M.; GORALSKA, M. Interleukin- α (IL-1) and tumor necrosis factor- α (TNF) enhance the paracrine modulation of intestinal epithelial Cl⁻ secretion by fibroblasts. **Gastroenterology**, 102: A201, 1992.
19. BERSCHNEIDER, h. m. Fibroblast modulation of intestinal secretory responses. **Ann N. Y. Acad. Sci.**, 664: 140-147, 1992.
20. BILLINGS, W. H. Water-associated human illness in northeast Pennsylvania. In the water environment: algal toxins and health. Edited by W. W. Carmichael. **Plenum Press**, . New York, 243-255, 1981
21. BINDER, H. J. Pathophysiology of acute diarrhea. **Am. J. Med.**, 88: 2S-4S, 1990.
22. BISCHOFF, H. The toxicology of microcystin-LR: occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment.. **Vet. Hum Toxicol** 43(5):. 294-7, 2001.

23. BOBAK, D. A. & GUERRANT, R. L. New developments in enteric bacterial toxins. **Adv. Pharmacol.**, 23: 85-108, 1992.
24. BÖCKMANN, S.; MOHRDIECK, K.; PAEGELOW, I.; ZÜNDORF, G. Regulation of the bradykinins receptors by interleukin-1 β , Tumor necrosis Factor - α and lipopolysaccharide in dependence on the activity state of guinea pig peritoneal macrophages. **Arch Pharmacol**, 353(4): 95, 1996.
25. BOTES, D. O.; KRUGER, H.; VILJOEN, C.C. isolation and characterization of four toxins from the blue-green algae, *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, 20: 945, 1982.
26. BOTES, D. P.; WESSELS, P. L.'KRUGER, H.; RUNNEGAR, M. T. C.; SANTIKARN, S.; SMITH, R. J.; BARNA, J. C. J.; WILLIAMS, D. H. Structure studies on cyanoginosin-LR, -YR, -YA and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. **J. Chem. Soc. Perkin. Trans.**, 1: 2747, 1985.
27. BRISHOP, C. T.; ANET, E. F. L. J.; GORHAM, P. R. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. **Physiology**, 37: 453, 1959.
28. BURCKHARDT, G.; KRAMER, W.; KURZ, G.; WILSON, F. A. Photoaffinity labeling studies of the rat renal sodium/bile salt co-transport system. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 143: 1018-1023, 1987.
29. BYTHS, S. Palm Island mystery disease. **Med. J. Aust.** 2: 40-42, 1980.
30. CALDERARO, V.; GIOVANI, A.; DE SIMONE, B.; CAMUSSI, G.; ROSSIELLO, R.; QUAGLIUOLO, L.; SERVILLO, L.; TACCONE, W.; GIORDANO, C.; BALESTRIERI, C. Arachidonic acid metabolites and chloride secretion in rabbit distal colonic mucosa. **Am. J. Physiol.**, 261: G443-G450, 1991.
31. CARMICHAEL, W. W. The toxins of cianobacteria, **Sci Am** 270: 78-86, 1994.
32. CARMICHAEL, W. W.; FALCONER, I. R. Diseases related to fresh water blue green algal toxins, and control measures. In: FALCONER, I. R. (Ed). **Algal toxins in sea food and drinking water**. London: Academic Press, 187-209, 1993.
33. CARMICHAEL, W. W. Cianobacteria secondary metabolites – The cyanotoxins. **J. Appl. Bacteriol**, 72: 445, 1992.

34. CARMICHAEL, W. W. Toxic of freshwater algae. In: **Handbook of natural toxins**. New York: Marcel Dekker, 3: 21, 1988.
35. CARNIO, E. C.& VARANDA, W. A. Calcium –activated potassium channel are involved in the response of mouse Leyding cells to human chorionic gonadotropin. **Braz. J. Med. Biol. Res**, 813-824, 1995.
36. CERMAK, R.; FOLLMER, U.; WOLFFRAM, S. Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. **Am . J. Physiol.**, 275: G1166-G1172, 1998.
37. CHANG, E. B. M. W. MUSCH & L. MAYER. Interleukins 1 and 3 stimulate anion secretion in chicken intestine. **Gastroenterology**, 98: 1518-1524, 1990.
38. CHAPPE, V.; METTEY, T.; VIERFOND, J. M.; HANRAHAN, J. W.; GOLA, M.; VERRIER, B.; BECQ, F. Strutural basis for specificity and potency of xanthine derivatives as activators of the CFTR chloride channel. **Br. J. Pharmacol.**, 123 (4):. 683-693, 1998.
39. CHIOSSONE D. C.; SIMON, P. L.; SMITH, P. L. Interleukin-1 effects on rabbit ileal mucosa ion transport *in vitro*. **Eur. J. Pharmacol.**, 180: 217-228, 1990.
40. CHOU, Y. H.; ROSEEVER, E.; GOLDMAN, R. D. Phosdphorylation and disassembly of intermediate filaments in mitotic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 86: 1885, 1989.
41. CHURILLA, A. M. ; GOTTSCHALK , W. A; LIEBOWICH, L. S.; SELECTOR, L. Y.; YEANDLE, S. Membrane potencial fluctuations of human T-lymphocytes have the fractal characteristics of fractional Brownian motion. **Ann. Biomed. Eng.** 24, 99-108, 1996.
42. CIANCIO, M. J.; CHANG, E. B. Epithelial secretory response to inflammation. **Ann. N. Y. Acad, Sci.**, 664: 210-221, 1992.
43. COHN, S. A. The activation of mononuclear phagocytes: Fact, fancy and future. **J. Immunol.**, 121: 813-816, 1978.
44. COMINELLI, F.; NAST, C. C.; CLARK, B. D.; SCHINDLER, R.; LIERENA, R.; EYSSELEIN, V. E.; THOMPSON, R. C.; DINARELLO, C. A. Interleukin-1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. **J. Clin. Invest.**, 86: 972-980, 1990.

45. COMINELLI, F.; NAST, C. C.; DINARELLO, C. A.; GENTILINI, P.; ZIPSER, R. D. Regulation of eicosanoid production in rabbit colon by interleukin-1. **Gastroenterology**, 97: 1400-1405, 1989.
46. COMINELLI, F.; NAST, C. C.; DUCHINI, L. M. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. **Gastroenterology**, 103: 365-371, 1992.
47. CORDENONSI, M.; D`ATRI, F.; HAMMAR, E.; PARRY, D. A.; KENDRICK-JONES, J.; SHORE, D.; CITI, S. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1m ZO-2, ZO-3 and myosin. **J. Cell. Biol.**, 147: 1569-1582, 1999.
48. COX, D. S.; GAO, H.; RAJE, S.; SCOTT, K. R.; EDDINGTON, N. D. Enhance the permeation of marker compounds and enaminone anticonvulsivants across Caco-2 monolayers by modulating tight junctions using zonula occludens. **Eur J Pharm Biopharm.** 52(2), p. 145-50, 2001.
49. CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal machophages by endotoxin: Inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol.**, 129: 65-76, 1996.
50. DEVRIES, S. E.; GALEY, F. D.; NAMIKOSHI, M.; WOO, J. C. Clinical and pathologic findings of blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) in a dog. **J. Vet. Diag. Invest.** 5: 403-408, 1993.
51. DIAMOND, J. M. Twenty-first Bowditch Lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. **Physiologist**, 20: 10-18, 1977.
52. DILLENBERG, H. O.; DEHNEL, M. K. Toxic water bloom in Saskatchewan. **Can. Med. Assoc. J.**, 83: 1151-1154, 1960.
53. DINARELLO, C. A.; WOLF, S. M. The role of interleukin-1 disease. **N. Engl. J. Med.**, 328: 106-113, 1993.
54. DREVRIES, S. E.; GALEY, F. D.; NAMIKOSHI, M.; WOO, J. C. Clinical and pathologic findings of blue-green algae (*M icrocystis aeruginosa*) in a dog. **J. Vet. Diag. Invest.**, 5: 403-408, 1993.
55. EBERHART, C. E.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, 109: 285-301, 1995.

56. ECKMANN, L.; JUNG, H. C.; SCHURER-MALY, C.; PANJA, A.; MORZYCKA-WROBLEWSKA, E.; KAGNOFF, M. F. Differential Cytokine Expression by Human Intestinal Epithelial Cell Lines: Regulated Expression of Interleukin-8. **Gastroenterology**, 105: 1689-1697, 1993.
57. ELLEMAN, T. C.; FALCONER, I. R.; JACKSON, A. R. B.; RUNNEGAR, M. T. Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (*Anacystis cynea* bloom). **Aust. J. Biol. Sci.**, 31: 209, 1978.
58. ELTON, E.; CHIOSSONE, D. C.; MACCAFFERTY, G. P.; RYAN, F. M.; SMITH, P. L. SKF & F 104353: Selective antagonism of peptidoleukotriene-induced changes in electrolyte transport by rat ileal mucosa *in vitro*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 251: 484-489, 1989.
59. ERIKSSON, J. E.; GRONBERG, L.; NYGARD, S.; SLOTTE, J. P.; MERILUOTO, J. A. Hepatocellular uptake of 3H-dehydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Biochim. Biophys. Acta**, 1025 (1): 60-66, 1990.
60. FACCIOLI, L. H.; SOUZA, G. E. P.; CUNHA, F. Q.L; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration “*in vivo*” by indirect mechanisms. **Agents Action**. 30: 344-349, 1990.
61. FALCONER, I. R.; BERESFORD, A M.; RUNNEGAR, M. T. C. evidence of liver damage by toxin from a blood of a blue-green algae, *Microcystis aeruginosa*. **Med. J. Aust.** 1: 511-514, 1983.
62. FANNING, A. S.; & ANDERSON, J. M. Protein modules as organizers of membrane structure. **Curr. Opin. Cell Biol**, 11: 432-439, 1999.
63. FANNING, A. S.; JAMESON B. J.; JESAITS L. A.; ANDERSON, J. M. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occluding and the actin cytoskeleton. **J. Biol. Chem.**, 273: 29745-29753, 1998.
64. FASANO, A. Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. **Ann N. Y. Acad. Sci.** 915: 214-22, 2000.
65. FEDER, J. The Fractal Dimension – cap. 2; in **Fractals**, Plenum Press, N. York and London, 6-30, 1988.
66. FERREIRA, S. H. Are macrophages the body’s alarme cells? **Agents Actions**, 10: 229-230, 1980.

67. FERETI, M.; CASINI-RAGGI, V.; PIZARRO, T. T.; EISENBERG, S. P.; NAST, C. C.; COMINELLI, F. Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. **J. Clin. Invest.**, 94: 449-453, 1994.
68. FIELD, M.; FROMM, D.; McCOLL, I. Ion transport in rabbit ileal mucosa. I. Na and Cl fluxes and short-circuit current. **Am. J. Physiol.**, 220: 1388-1396, 1971.
69. FIELD, M. Intestinal secretion: effect of cyclic AMP and its role in cholera. **N. Engl. J. Med.** 284: 1137-1144, 1971a.
70. FIELD, M. Ion transport in rabbit ileal mucosa. II. Effects of cyclic 3', 5'- AMP. **Am J. Physiol.**, 221 (4):. 992-997, 1971b.
71. FIELD, m.; RAO, M. C.; CHANG, E. B. Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease. **N. Engl. J. Med.**, 321: 879-883, 1989.
72. FINLEY, R. B.; SMITH, P. L. Stimulation of intestinal Cl⁻ secretion: similarities between fMLP and LTD₄. **Gastroenterology**, 96: A151, 1989.
73. FONTELES, M. C.; FANG, G.; THIELMAN, N. M.; YOTSEFF, P. S.; GUERRANT, R. L. Role of platelet activating factor in inflammatory and secretory effects of *Clostridium difficile* toxin A. **J. Lip. Med. Cell. Sign.**, 11: 133-143, 1995.
74. FORTE, L. R.; THORNE, P. K.; EBER, S. L.; KRAUSE, W. J.; FREEMAN, R. H.; FRANCIS, S. H.; CORBIN, J. D. Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin activation of camp-dependent protein kinase by cGMP. **Am. J. Physiol.**, 263:. C607-C615, 1992.
75. FRANCIS, G. Poisonous Australian lake. **Nature**, 18: 11-12, 1978.
76. FRIMMER, M.; ZEIGLER, K. The transport of bile acids in liver cells. **Biochim. Biophys. Acta**, 947: 75-99, 1988.
77. FUJIKI, H.; SUGANUMA, M. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2^A: The okadaic acid class of compounds. **Adv. Cancer Res.**, 61:, 143, 1993.
78. FUJITA, H.; KATOH, H.; HASEGAWA, H.; YASUI, H.; AOKI, J.; YAMAGUCHI, Y. NEGISHI, M. Molecular decipherment of Rho effector

- pathways regulations tight-junction permeability. **Biochem, J.** 15, 346(pt3): 617-622., 2000.
79. FURUSE, M.; SASAKI, H.; FUJIMOTO, K.; TSUKITA, S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occluding in fibroblasts. **J. Cell. Biol.**, 143: 391-401, 1998.
 80. GALEY, F. D.; BEASLEY, V. R.; CARMICHAEL, W. W.; KLEPPE, G.; HOOSER, S. B.; HASCHECK, W. M. Blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) hepatotoxicity in dairy cows. **Am. J. Vet. Res.**, 48: 1415-1420, 1987.
 81. GASSLER, N.; ROHR, C.; SCHNEIDER, A.; KARTEMBECK, J.; BACH, A.; OBERMULLER, N.; OTTO, H. F.; AUTSCHBACH, F. inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. **Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 281(1): G216-28, 2001.
 82. GATHERCOLE, P. S.; THIEL, P. G. Liquid chromatographic determination of the cyanoginosins, toxins produced by the ccyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **J. Chromatogr.**, 408: 435, 1987.
 83. GAUTAM, N.; HEDQVIST, P.; LINDBOM, L. Kinetics os leukocyte-induced changes in endothelial barrier function, **Br. J. Pharmacol.**, 125: 1109-1114, 1998.
 84. GIERSCHIK, P. ADP- ribosylation of signal-transducing nucleotide-bind proteins by pertussis toxin. **Microbiol. Immunol.**, 175: 69-96, 1992.
 85. GILLARD, J.; FORD-HUTCHINSON, A. W.; CHAN, C.; CHARLESON, S.; DENIS, D.; FOSTER, A.; FORTIN, r.; LEGER, S; McFARLANE, C. S.; MORTON, H. L-663,536 (MK886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesisinhibitor. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 67: 456-464, 1989.
 86. GITTER, A.H.; BENDFELDT, K.; SCHMITZ, H.; SCHULZKE, J. D.; BENTZEL, C. J.; FROMM, M. Epithelial barrier defects in HT – 29/B6 coloni monolayers by tumor necrosis factor-alpha. **Ann N. Y. Acad Sci.**915: 193-203, 2000.
 87. GORBACH, S. L. Treating diarrhoea. **BMJ**, 314: 1776-1777, 1997.

88. GUERANT, R. L. Lessons from diarrheal diseases: Demography to molecular pharmacology. **J. Infect. Dis.**, 169: 1206-1218, 1994.
89. GUERANT, R. L.; ARAUJO, V.; SOARES, E.; KOTLOFF, K.; LIMA, A. A. M.; COOPER, W. H.; LEE, A. G. Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 1238-1242, 1992.
90. GUERRANT, R. L.; HUGHES, J. M.; LIMA, N. L.; CRANE, J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. **Ver. Infect. Dis.**, 12: S41-S50, 1990.
91. GUERRANT, R. L.; BOBAK, D. Bacterial and protozoal gastroenteritis. **N. Engl. J. Med.**, 325: 327-340, 1991.
92. GUERRANT, R. L.; KIRCHHOFF, L. V.; SHIELDS, D. S.; NATIONS M. K.; LESLIE, J.; DE SOUSA, M. A.; ARAUJO, J. G.; COREIA, L. L.; SAUER, K. T.; MCCLELLAND, K. E. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of diseases, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **J. Infect Dis.**, 148 (6): 986-997, 1983.
93. GUERRANT, R. L.; SCHORLING, J. B.; MCAULIFFE, J. F.; DE SOUSA, M. A. Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition increase diarrhea frequency and duration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 47 (1): 28-35, 1992.
94. GUERRANT, R. L.; VAN GILDER, T.; STEINER, T. S.; THIELMAN, N. M.; SLUTSKER, L.; TAUXE, R. V.; HENNESSY, T.; GRIFFIN, P. M.; DUPONT, H.; SACK, R. B.; TARR, P.; NEILL, M.; NACHAMKIN, I.; RELLER, L. B.; OSTERHOLM, M. T.; BENNISH, M. L.; PICKERING, L. K. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, 32 (3): 331-351, 2001.
95. GUMBINER, b. Breaking through the tight junction barrier. **J. Cell Biol.**, 123: 1631-1633, 1993.
96. GUMBINER, B. Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. **Am. J. Physiol.**, 253: C749-C578, 1987.
97. HALM, D. R.; RECHKEMMER, G. R.; SCHOUMACHER, R. A.; FRIZZELI, R. A. Apical membrane chloride channels in a colonic cell line activated by secretory agonists. **Am. J. Physiol.**, 254: C505-511, 1988.

98. HANGLOW, A. C.; BIENENSTOCK, J.; PERDUE, M. H. Effects of platelet-activating factor on ion transport in isolated rat jejunum. **Am. J. Physiol.**, 257: G845-G850, 1989.
99. HARADA, K-I.; SUZUKI, M.; DAHLEM, A. M.; BEASLEY, V. R.; CARMICHAEL, W. W.; RINEHART JR., K. L. Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria. **Toxicon**, 26: 433, 1988.
100. HARADA, K-I.; MATSUURA, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M. F.; OISHI, S.; DAHLEM, ^a M.; BEASLEY, V., R.; CARMICHAEL, W. W. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystin-LR and -RR in the cyanobacterium (blue-green algae). **Toxicon**, 28: 55, 1990.
101. HARADA, K-I. ;KONDO, F.;LAWSTON, L. Laboratory Analysis of cyanotoxins – Chapter 13; in Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management.. Published on Behalf of World Health Organization; Edited by Ingrid Chorus and Jamie Bartram. E & FN SPON, an imprint of Routledge, London and New York, 370 – 405, 1999.
102. HARADA, K-I.; OGAWA, K.; MATSUURA, K.; NAGAI, H.; MURATA, H.; SUZUKI, M.; ITOH, Y.; NAKAYAMA, N.; SHIRAI, M.; NAKANO, M. Isolation of two toxic heptapeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa*, K-139. **Toxicon**, 29, 479, 1991a.
103. HARADA, K-I.; OGAWA, K.; KIMURA, Y.; NAGAI, H.; MURATA, H.; SUZUKI, M.; THORN, P. M.; EVANS, W. R.; CARMICHAEL, W. W. Microcystins from *Anabaena flosaquae* NRC 525-17. **Chem. Res. Toxicol.**, 4: 535, 1991b.
104. HARRIS, J. C.; DuPONT, H. L.; HORNICK, R. B. Fecal leukocytes in diarrheal disease. **Ann. Intern. Med.**, 72: 697-703, 1972.
105. HASEGAWA, H.; FUJITA, H.; KATO, H.; AOKI, J.; NAKAMURA, K.; ICHIKAWA, A.; NEGISHI, M. Opposite regulation of transepithelial electrical resistance and paracellular permeability by Rho in Madin-Darby canine Kidney cells. **J. Biol. Chem.** 274(30): 20982-8, 1999.
106. HAYMAN, J. Beyond the Barcoo-probable human tropical cyanobacterial poisoning in outback Australia. **Med. J. Aust.** 157: 794-796, 1992.

107. HEINTZE, K., STEWART, C. P.; PRIZZELL, R. A. Sodium-dependent chloride secretion across rabbit descending colon. **Am. J. Physiol.**, 244: G357-G365, 1983.
108. HERMANISKY, S. J.; STOHS, S. J.; MARKIN, R. S.; MURRAY, W. J. Hepatic lipid peroxidation, sulphhydryl status, and toxicity of the blue-green algal toxin microcystin-LR in mice. **J. Toxicol. Environ. Health**, 31 (1):. 71-91, 1990.
109. HERMANISKY, S. J.; MARKIN, R. S.; FOWLER, E. H.; STOHS, S. J. Hepatic ultrastructural changes induced by the toxin microcystin-LR in mice. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, 12 (2):. 101-106, 1993.
110. HEYMAN, M.; DESJEUX, J. F. Cytokine-induced alteration of the epithelial barrier to food antigens in disease. **Ann N. Y. Acad Sci.** 915: 304-311, 2000.
111. HIGGS, G. A.; VANE, J. R.; Inhibitor of cyclooxygenase and lipoxygenase. **Br. Med. Bull.**, 39: 265-268, 1983.
112. HINTERLEITNER, T. A.; BERSCHNEIDER, H. M.; POWELL, D. W. Fibroblast-mediated Cl⁻ secretion by T84 cells is amplified by interleukin-1 β . **Gastroenterology**, 100: A690, 1991.
113. HINTERLEITNER, T. A.; POWELL, D. W. Immune system control of intestinal ion transport. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 197: 249-260, 1991.
114. HINTERLEITNER, T. A.; SAADA, J. I.; BERSCHNEIDER, H. M.; POWELL, D. W.; VALENTICH, J. D. IL-1 stimulates intestinal myofibroblast COX gene expression and augments activation of Cl⁻ secretion in T84 cells. **Am. J. Physiol.**, 271: C1262-C1268, 1996.
115. HINTERLEITNER, T. A.; VALENTICH, J. D.; CHA, J. H.; WILL, P.; WELTON, A.; POWELL, D. W. platelet-activating factor contributes to immune cell and oxidant-mediated intestinal secretion. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 281: 1264-1271, 1997.
116. HONKANEN, R. E.; ZWILLER, J. E. M. R.; DAILY, S. L.; KHATRA, B. S.; DUKELOW, M.; BOYNTON, A. L. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. **J. Biol. Chem.**, 265: 19401, 1990.

117. HOOSER, S. B.; BEASLEY, V. R.; LOVELL, R. A.; CARMICHAEL, W. W.; HASCHEK, W. M. Toxicity of microcystin-LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa*, to rats and mice. **Vet. Pathol.**, 26: 246-252, 1989.
118. HOOP, B.; KAZEMI, W.; and LIEBOWITH L. rescaled range analysis of resting respiration. **Chaos: Int. J. Nonlin. Sci.**, 3: 27-29, 1993.
119. HORSFIELD, K. & CUMMINGS, G. Angles of branching and diameters of branches in the human bronchial tree. **Bulletin of Mathematics Biophysics**, 29: 245-259; 1967.
120. HOOSER, S. B.; BEASLEY, V. R.; BASGALL, E. J.; CARMICHAEL, W. W.; HASCHEK, W. M. Microcystin-LR induced ultrastructural changes in rats. **Vet. Pathol.**, 27: 9-15, 1990
121. HOOSER, S. B.; KUHLENSCHMIDT, M. S.; DAHLEM, A. M.; BEASLEY, V. R.; CARMICHAEL, W. W.; HASCHEK, W. M. Uptake and subcellular localization of tritiated dihydro-microcystin-LR in rat liver. **Toxicol.**, 29 (6): 589-601, 1991.
122. HONKANEN, R. E. J.; ZWILLER, R. E.; MOORE, S. L.; DAILY, B. S.; KHATRAL, M.; DUKELOW, A; BOYNTON, L. characterization of micorcystin-LR, a potent inhibitor of type 2A protein phosphatases. **J. Biol. Chem**, 265: 19401-19404, 1990.
123. HYAMS, J. S.; FITZGERALD, J. E.; TREEM, W. R.; WYZGA, N.; KREUTZER, D. L. Relationship of functional and antigenic interleukin-6 to disease activity in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 104: 1285-1292, 1993.
124. HUANG, W. L.; HARPER, C. G.; EVANS, S. F.; NEWNHAM, J. P.; DUNLOP, S. A. Repeated prenatal corticosteroid administration delays astrocyts and capillary tight junction maturation in fetal sheep. **Int. J. Dev. Neurosci**, 19(5): 487-93, 2001.
125. HUANG, A. J.; MANNING J. E.; BANDAK, T. M.; RATAU, M. C.; HANSER, K. R.; SILVERSTEIN, S. C. Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. **J. Cell Biol.** 120: 1371-1380, 1993.

126. HUMPAGE, A. R.; HARDY, S.J.; MOORE, E. J.; FROSCIO, S. M.; FALCONER, I. R. Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. **J. Toxicol. Environ Health A.**, 13; 61(3): 155-65, 2000.
127. ISAACS, K. L.; SARTOR, R. B.; HASKILL, J. S. Cytokine mRNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by PCR amplification. **Gastroenterology**, 103: 1587-1595, 1992.
128. ITOH, M.; FURUSE, M.; MORITA, K.; KUBOTA, K.; SAITOU, M.; TSUKITA, S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, ZO-3, with the COOH termini of claudins. **J. Cell Biol.**, 147: 1351-1363, 1999.
129. JESAITIS, L. A.; GOODENNOUGH, D. A Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. **J. Cell Biol.**, 124 (6): 949-961., 1994.
130. JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; NA, J. S.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E.; ANTUNES, M. B.; DE MELO FILHO, S. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S.; AZEVEDO, S. M.; JARVIS, W. R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **N. Engl. J. Med.**, 338 (13): 873-878, 1998.
131. JOHNSTON Jr., R. B. Monocytes and macrophages. **New Eng. J. Med.**, 318: 747-752, 1988.
132. KANDIL, H.; BERSCHNEIDER, H.; ARGENZIO, A. TNF- α alters intestinal ion transport through a paracrine mechanism involving prostaglandins. **Gastroenterology**, 102: A217, 1992.
133. KARAYALCIN, S. S.; STURBAUM, C. W.; WACHSMAN, J. T.; CHA, J.; POWELL, D. W. Hydrogen peroxide stimulates rat colonic prostaglandin production and alters electrolyte transport. **J. Clin. Invest.**, 886: 60-68, 1990.
134. KATZ, D. A.; BATES, D. W.; RITTENBERG, E.; ONDERDONK, A.; SANDS, K.; BAREFOOT, L. A.; SNYDMAN, D. Predicting *Clostridium difficile* stool cytotoxin results in hospitalizes patients with diarrhea. **J. Gen. Intern. Med.**, 12: 57:62, 1997.

135. KAYA, K.; WATANABE, M. M. Microcystin composition of an axenic clonal strain of *Microcystis viridis* and *Microcystis viridis* – containing waterblooms in Japanese freshwaters. **J. Appl. Phycol.**, 2: 173, 1990.
136. KAZMIEROWSKI, J. A.; GALLIN, J. I.; REYNOLDS, H. Y. Mechanism for the inflammatory response in primate lungs. Demonstration and partial characterization of an alveolar macrophage – derived factor with preferential activity for polymorphonuclear leukocytes. **J. Clin. Invest.**, 59: 273-281, 1977.
137. KIMBERG, D. V.; FIELD, M.; JOHSON, J.; HENDERSON, .A.; GERSHON, E. Stimulation of intestinal mucosal adenyl cyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins. **J. Clin. Invest.**, 50 (6): 1218-1230, 1971.
138. KIVIRANTA, J.; NAMIKOSHI, M.; SOVONEN, K.; EVANS, W. R.; CARMICHAEL, W. W.; RINEHART, K. L. Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205. **Toxicon**, 30: 1093, 1992.
139. KONST, H.; MCKERCHER, P. D.; GORHAM, P. R.; ROBERTSON, A.; HOWELL, J. Symptoms and pathology produced by toxic *Microcystis aeruginosa* NRC – 1, in laboratory and domestic animals. **Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.**, 29: 221, 1965.
140. KRISHNAMURTHY, T.; CARMICHAEL, W. W.; SARVER, E. W. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). In: Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flosaquae*. **Toxicon**, 34: 517 – 525, 1996.
141. KRISHNAMURTHY, T.; SZAFRANIEC, L.; HUNT, D. F.; SHABONOWITZ, J.; YATES, J. R.; CARMICHAEL, W. W.; SKULBERG, O.; CODD, G. A.; MISSLER, S. Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 86: 770, 1989.
142. KUSAGAMI, K.; KUROIWA, A.; HARUTA, J. Interleukin-6 activities in lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis. **Gastroenterology**, 100: A591, 1991.

143. KUSUMI, T.; OOI, T.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, H.; KAKISAWA, H. Cyanoviridin-RR, a toxic from the cyanobacteria, (blue-green algae) *Microcystis viridis*. **Tetrahedron Lett.**, 28: 4695, 1987.
144. LAMBERT, T. W.; HOLMES, C. F. B.; HRUDEY, S. E. Microcystins class of toxins: health effects and safety of drinking water supplies. **Environ. Rev.**, 2: 167-186, 1994.
145. LANEY, D. W. Jr.; COHEN, M. B. Approach to the pediatric patient with diarrhea. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, 2 (3): 499-516, 1993.
146. LASKIN, D. L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 35: 655-677, 1995.
147. LAWTON, L. A.; COOD, G. A. Cyanobacterial (blue-green algal), toxins and their significance in U. K. and European waters. **J. Inst. Water Environ. Manage**, 5: 459-465, 1991.
148. LeFEVRE, M E.; HAMMER, R.; JOEL, D. D. Macrophages of the mammalian small intestine: A review. **J. Reticuloendothel. Soc.**, 26: 553-573, 1979.
149. LeMAY, L. G.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. The effects of pentoxifyline on lipopolysaccharide (LPS) fever, plasma interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor (TNF) in the rat. **Cytokine**, 2: 300-306, 1990.
150. LI, X.; LIU, T.; SONG, L. Cytological alterations in isolated hepatocytes from common carp (*Cyprinum carpio*, L.) exposed to microcystin-LR. **Environ Toxicol** 16(6): 517-522, 2001.
151. LIEBOVITCH, L. S. analysis of fractal ion channel gating kinetics; kinetic rates, energy levels and activation energies. **Math. Biosci.** 93, 97-115.1989.
152. LIEBOVITCH, L. S.; & SULLIVAN, J. M. Fractal analysis of a voltage-dependent potassium channel from cultured mouse hippocampal neurons. **Biophys. J.** 52: .979-988, 1987
153. LIFSHITZ, F.; COELLO-RAMIREZ P.; GUTIERREZ-TOPETE, G.; CORNADO-CORNET, M. C. Carbohydrate intolerance in infants with diarrhea. **J. Pediatr.**, 79 (5): 760-767, 1971.
154. LIMA, A. A.; MOORE, S. R.; BARBOZA, M. S. Jr.; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; NATARO, J. P.;

- FEDORKO, D. P.; WUHIB, T.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in north-eastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, 181 (5): 1643-1651, 2000.
155. LIMA, A. A. M. Cholera: molecular epidemiology, pathogenesis, immunology, treatment and prevention. **Curr. Op. Infect. Dis.**, 7: 592-601 1994.
156. LIMA, A. A. M.; LIMA, N. L. Epidemiology, therapy and prevention of infection with *Shigella* organisms and *Clostridium difficile*. **Curr. Op. Infect. Dis.**, 6: 63-71, 1993.
157. LIMA, A. A.; FANG, G.; SCHORLING, J. B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J. F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Pediatr.**, 381: 39-44, 1992.
158. LIMA, A A; SOARES, A. M.; FREIRE JUNIOR, J. E.; GUERRANT, R. L. Cotransport of sodium with glutamine, alanine and glucose in the isolated rabbit ileal mucosa. **Braz. J. med. Boil. Res.**, 25 (6): 637-640, 1992.
159. 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, **Laborat. Invest.**, 61: 419-425, 1989.
160. LIMA, A. A. M.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T D.; INNES, D. J.; GUERRANT, R. L. Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine **in vivo** and on cultured cells **in vitro**, **Infect. Immun.** 56: 582-588, 1988.
161. LONG, B. M.; JONES G. J.; ORR, P. T. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. **Appl Environ Microbiol** , 67(1): 278-83, 2001.
162. LYERLY, D. M.; LOCKWOOD, D. E.; RICHARDSON, S. H.; WILKINS, T. D. Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. **Infect Immun.**, 35: 1147-1150, 1982.
163. MACKINTOSH, B. K. A.; KLUMPP, C.; COHEN, C.; CODD, G. A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein

- phosphatase 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS Lett.**, 264: 187, 1990.
164. MADARA, J. L. Regulation of the movement of solute across tight junctions. **Annu. Ver. Physiol.**, 60: 143-159, 1998.
165. MADARA, J. L.; PARKOS, C.; COLGAN, S.; NUSTRAT, A.; ATISOOK, K.; KAOOUTZANI, P. The movement of solutes and cells across tight junctions. **Ann. NY Acad. Sci.**, 664: 47-60, 1992.
166. MADARA J. L.; MOORE, R.; CARLSON, S. Alteration of intestinal tight junction structure and permeability by cytoskeletal contraction. **Am. J. Physiol.**, 253: C854-C861, 1987.
167. MADARA, J. L.; PAPPENHEIMER, J. R. Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. **J. Membr. Biol.**, 100 (2): 149-164, 1987.
168. MAIN, D. C.; BERRY, P. H.; PEET, R. L.; ROBERTSON, J. P. Sheep mortalities associated with the blue green alga *Nodularia spumigena*. **Aust. Vet.** 53: 578-581, 1977.
169. MANDELBROT, B. B. How long is the coast of Britain? Statistical self-similarity and fractional dimension. **Science**, 155, 636-638; 1967s.
170. MANDELBROT, B. B. The fractal Geometry of Nature, **Freeman Ed. San Francisco**, 465 p. 1983.
171. McCAIN, R. W.; DESSYPRIS, E. N.; CHRISTMAN, J. W. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor stimulates human polymorphonuclear leukocytes to produce interleukin-8 *in vitro*. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, 8: 28-34, 1993.
172. McFARLAND, L. V.; MULLIGAN, M. E.; KWOK, R. Y. Y.; STAMM, W. E. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. **N. Engl. Med.**, 320: 204-210, 1989.
173. McKAY, D. M., PERDUE, M. H. Intestinal epithelial function: The case for immunophysiological regulation. Cells and mediators. **Dig. Dis. Sci.**, 38: 1377-1387, 1993.

174. MARANO, C. W.; LEUGHLIN, K. V.; RUSSO, L. M.; PERALTA SOLER, A.; MULLIN, J. M. Long-term effects of tumor necrosis factor on LLC-PK1 transepithelial resistance. **J. Cell. Physiol.**, 157: 519-527, 1993.
175. MARSHALL, B. E. Toxic cyanobacteria in Lake Chivero: a possible health hazard? **Trans. Zimbabwe Sci. Assoc.** 65: 16-19, 1991.
176. MEENAM, J.; GROOL, T. A.; HOMMES, D. W.; DIJKHUIZEN, S.; TEN KATE, F. J.; WOOD, M.; WHITTAKER, M.; TYTGAT, G. N.; VAN DEVENTER, S. J. Lexipafant (BB-882), a platelet activating factor receptor antagonist, ameliorates mucosal inflammation in an animal model of colitis. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, 8: 569-573, 1996.
177. MERILUOTO, J. A. O.; SANDSTROM, A.; ERIKSSON, J. E.; REMAUD, G.; GREY CRAIG, A.; CHATTOPADHYAYA, J. Structure and toxicity of a peptide heptoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. **Toxicon**, 27: 1021, 1989.
178. MILLER, C. Genetic manipulation of ion channels: A new approach to structure an mechanism. **Neuron**, 2: 1195-1205, 1989.
179. MOHAMMAD-PANAH, R.; GYMOREY, K.; ROMMENS, J.; CHOUDHURY, M.; LI, C.; WANG, Y.; BEAR, C. E. ClC-2 contributes to native chloride secretion by a human intestinal cell line, Caco-2. **J. Biol. Chem.** 16, 276(11): 8306-13, 2001.
180. MOREIRA, A. L.; SAMPAIO, E. P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K. A.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor α by enhancing mRNA degradation. **J. Exp. Med.** 177: 1675-1680, 1993.
181. MORTEAU, O., PONS, L.; BUENO, L. Platelet-activating factor and interleukin-1 are involved in colonic dysmotility in experimental colitis in rats. **Gastroenterology**, 104: 47-56, 1993.
182. MUMBY, M. C.; WALTER G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. **Physiol. Rev.**, 73: 673-699, 1993.
183. MURTHY, J. R.; CAPINDALE, J. B. A new isolation and structure for the endotoxin from *Microcystis aeruginosa* NRC – 1. **Can. J. Biochem.**, 48: 508, 1970.

184. MUSCH, M. W.; FIELD, M.; MILLER, R. J.; STAFF, J. S. Homologous desensitization of prostaglandins in rabbit ileum. **Am. J. Physiol.**, 252: G120-G127, 1987.
185. NAKANO, M.; NAKANO, Y.; SATO-TAKI, T.; MORI, N.; KOJIMA, M.; OHTAKE, A; SHIRAI, M. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* K-139 strain. **Microbiol. Immunol.**, 33: 787, 1989.
186. NAKANO, Y.; SHIRAI, M.; MORI, N.; NAKANO, M. Neutralization of microcystin shock in mice by tumor necrosis factor alpha antiserum. **Appl. Environ. Microbiol.**, 57 (1) 327-330, 1991.
187. NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K. L.; SAKAI, R.; SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W. W. Structures of three new cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green algae). *Nostoc* sp. Strain 152. **J. Org. Chem.**, 55: 6135, 1990.
188. NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K. L.; SAKAI, R.; STOTTS, R. R.; DAHLEM, A. M.; BEASLEY, V. R.; CARMICHAEL, W. W.; EVANS, W. R. Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*; nine new microcystins. **J. Org. Chem.**, 57: 866, 1992b.
189. NAMIKOSHI, M.; SIVONEN, K.; EVANS, W. R.; CARMICHAEL, W. W.; ROUHIAINEN, L.; LUUKAINEN, R.; RINEHART, K. L. Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205. **Toxicon**, 30: 1093, 1992a.
190. _____. Two new L- serine variants of microcystins-LR and -RR from *Anabaena* sp. Strais 202 A1 and 202 A2. **Toxicon**, 30: 1457, 1992d.
191. NAMIKOSHI, M.; SIVONEN, K.; EVANS, W. R.; SUN, F.; CARMICHAEL, W. W.; RINEHART, K. L. Isolation and structures of microcystins from a cyanobacterial water bloom. Finland: **Toxicon**, 30: 1473, 1992c.
192. NASSEM, S. M.; HINES, H. B. Effect of glucocorticoids in microcystin- induced release of arachidonic acid metabolites in rat hepatocytes. **Toxicology**, 9: 153, 1989a.

193. NASSEM, S. M.; HINES, H. B.; CREASIA, D. ^a Effects of toxins on arachidonic acid metabolism in rat cultured pulmonary alveolar macrophages. **Biochem. Int.**, 19: 583, 1989b.
194. _____. Inhibition of microcystin- induced release of cyclooxygenase products from rat hepatocytes by anti-inflammatory steroids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 195: 345, 1990.
195. NEREMBERG, M. A.H.; ESSEX, C. Correlation dimension and systematic geometric effects. **Phys. Rev. A.** 42: 7065 –7-74, 1990.
196. NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, 79: 319-326, 1987.
197. NISHIWAKI MATSUSHIMA, R.; NISHIWAKI, S.; OHTA, T.; YOSHIZAWA, S.; SUGANUMA, M.; HARADA, K.; WATANABE, M. F.; FUJIKI, H. Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. **Jpn. J. Cancer. Res.**, 82 (9): 993-6, 1991.
198. NISHIWAKI MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W. W.; FUJIKI, H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 118 (6): 420-424, 1992.
199. NISHIYAMA, R.; SAKAGUSHI, T.; KINUGASA, T.; GU, X.; MAcDERMOTT, R. P.; PODOLSKY, D. K.; REINECKER, H. C. Interleukin-2 receptor beta subunit-dependent and independent regulation of intestinal epithelial tight junctions. **J. Biol. Chem.** (21,276(38): 35571-80, 2001.
200. NOBRE, A. C. L.; COÊLHO, G. R.; COUTINHO, M. C. M.; SILVA, M. M. M.; ANGELIM, E. V.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The role of phospholipase A2 and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. **Toxicol.**, 39: 727-734, 2001.
201. NOBRE, A. C. L.; JORGE, M. C. M.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 32: 985-988, 1999.

202. NOEL, P.; NELSON, S.; BOKULIC, R.; BAGBY, G.; LIPPTON, H.; LIPSCOMB, G.; SUMMER, W.; Pentoxifyline inhibits lipopolysaccharide-induced serum tumor necrosis factor and mortality. **Life Sci.**, 47: 1023-1029, 1990.
203. NORTH, R. J. The concept of the activated macrophage. **J. Immunol.**, 121: 806-809, 1978.
204. NUSRAT, A.; VON EICHEL-STREIBER, C.; TURNER, J. R.; VERKADE, P.; MADARA, J. L.; PARKOS, C. A. *Clostridium difficile* toxin disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. **Infect Immun.** 69(3): 1329-36, 2001.
205. NUSRAT, A.; PARKOS, C. A.; VERKADE, P.; FOLEY, C. S.; LIANG, T. W.; INNIS-WHITEHOUSE, W.; EASTBURN, K. K.; MADARA, J. L. Tight junctions are membrane microdomains, **J. Cell Sci.**, 113: 1771-1781, 2000.
206. NUSRAT, A.; TURNER, J. R.; MADARA, J. L. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. **Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 279,(5): G851-7, 2000.
207. OGLE, C. K.; WU, JUN-ZHEN; MAO, X.; SZCZUR, K.; ALEXANDER, J. W.; OGLE, J. D. Heterogeneity of kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for the production of TNF, IL-1, and IL-6. **Inflammation**, 18: 511-523, 1994.
208. OHTA, T.; NISHIWAKI, R.; YATSUNAMI, J.; KOMORI, A.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H. Hyperphosphorylation of cytokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. **Carcinogenesis**, 13: 2442, 1992.
209. OSHIRO, N.; FUKATA, Y.; KAIBUCHI, K. phosphorylation of moesin by rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. **J. Biol. Chem.** 273(52): 34663-6, 1998.
210. PACE, J. G.; ROBINSON, N. A.; MIURA, G. A.; MATSON, C. F.; GEISBERT, T. W.; WHITE, J. D. Toxicity and kinetics of [³H] Microcystin-LR in isolated perfused rat livers. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 107: 391-401, 1991.
211. PAN, M.; STEVENS, B. R.; SOUBA, W. W. Regulation of intestinal amino acid transport a surgical perspective. **Contemp Surg.**, 44: 213-220, 1994.

212. PELCZAR JR, M. I., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1: 232-244, 1996 a.
213. PERDUE, M. H.; McKAY, M. M. Integrative immunophysiology in the intestinal mucosa. **Am. J. Physiol.**, 267: G151-G165, 1994.
214. PIZZA, M.; COVACCI, A.; BARTOLONI, A.; PERUGINE, M.; NENCIONE, L.; DE MAGISTRIS, M. T.; VILLA, L.; NUCCI, D.; MANETTI, R.; BUGNOLI, M.; GIOVANNONI, F.; ROBERTO, O.; BARBIERI, J. T.; SATO, H.; RAPPUOLI, R. Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. **Science**. 246: 497-500, 1989.
215. PORITZ, L.; TILBERG, A.; KOLTUN, W. Tumor necrosis factor alfa (TNFalfa) Disrupts Tight Junction (TJ) Assembly But Not Just By Decreasing ell Number (RFS). **Dis Colon Rectum** 44(4): A2-A4, 2001.
216. POWEL, D. W.; SZAUTER, K. E. Nonantibiotic therapy and pharmacotherapy of acute infectious diarrhea. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, 22 (3):.683-707, 1993.
217. POWELL, D. W. Epithelial secretory responses to inflammation: Platelet Activating Factor and Reactive Oxygen Metabolites. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 664: 232-247, 1992.
218. PRINSEP, M. R., CAPLAN, F. R., MOORE, R. E., PATTERSON, G. M. L., HONKANEN, R. E., BOYNTON, A. L. Microcystn-LA from a blue-green algae belonging to the Stigonematales. **Phytochemistry**, 31: 1247, 1992.
219. RABIN, P.; DARBRE, A. Na improved extraction procedure for the endotoxin from *Microcystis aeruginosa* NRC-1. **Biochem. Soc. Trans.**, 3: 428, 1975.
220. RACUSEN, L. C.; BINDER, H. J. Effect of prostaglandins on ion transport across isolated colonic epithelium. **Dig. Dis. Sci.**, 25: 900-904, 1980.
221. RADBERGH, C. M. I.; CYLOND, G.; ERIKSSON, J. E. Histological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic toxicol.**, 20: 131-146, 1991.
222. REINECKER, H. C.; STEFFEN, M.; WITTHOEFT, T.; PFLUEGER, I.; SCHREIBER, S.; McDERMOTT, R. P.; RAEDLER, A. Enhanced secretion of tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-1 beta by isolated lamina propria

- mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. **Clin. Exp. Immunol.**, 94: 174-181, 1993.
223. REYNOLDS, C. S. **The ecology of freshwater phytoplankton.** Cambridge: University Press, .384 p, 1984.
224. RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of macrophage neutrophil chemotactic factor. **J. Exp. Path.**, 71: 717-727, 1990.
225. RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. IL-8 causes **in vivo** neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, 73: 472-477, 1991.
226. RIDLEY, A. J. The GTP-binding protein Rho. **Int. J. Biochem Cell Biol.** 29(11): 1225-9, 1997.
227. RINEHART, K. L.; HARADA, K. I.; NAMIKOSHI, M.; CHEN, C.; HARVIS, C. A. MUNROE, M. H. G.; BLUNT, J. W.; MULLIGAN, P. E.; BEASLEY, V. R.; DAHLEM, A. M.; CARMICHAEL, W. W. Nodularin, microcystin and the .configuration of Adda. **J. Am. Chem. Soc.**, 110: 8557, 1988.
228. ROCHA, M. F. G.; SOARES, A. M.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A.M. Absence of intestinal secretion on supernatants from macrophages stimulated with *Clostridium difficile* Toxin B on rabbit ileum. **Toxicon**, 39: 335 – 340, 2001
229. ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J.; SOARES, A M.; JIMENEZ; G. C.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A; LIMA, A A M.; Supernatantes from Macrophages Stimulated with Microcystin-LR Induce Electrogenic Intestinal Response in Rabbit. **Pharmacology & Toxicology**, 87 (1): 46-51, 2000.
230. ROCHA, M. F. G.; SOARES, A. M.; FLORES, C. A.; STEINER, T. S.; LYERLY, D. M.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A ; LIMA, A. A. M. Intestinal secretory factor released by machophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: Role of interleukin-1 β . **Infect. Immun.**, 66: 4910-4916, 1998.
231. ROCHA, M. F. G.; MAIA, M. E. T.; BEZERRA, L. R. P. S.; LYERLY, D. M.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. *Clostridium difficile* toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal

- macrophages: Role of Interleukin-1 β , Tumor Necrosis Factor Alpha, and leukotrienes. **Infect. Immun.**, 65: 2740-2746, 1997.
232. RUNNEGAR, M. T. C.; ANDREWS, J.; GERDES, R. G.; FALCONER, I. R. Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon.**, 25: 1235-1239, 1987.
233. RUNNEGAR, M. T. C.; GERDES, R. G.; FALCONER, I. R.; The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocyte. **Toxicon**, 29: 43, 1991.
234. SACK, R. B.; RAHMAN, M.; YUNUS, M.; KHAN, E. H. Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease. **Clin. Infect. Dis.**, 24: (Suppl) S102-S105, 1997.
235. SAHA, C.; NIGAN, S. K.; DENKER, B. M. Expanding role of G proteins in tight junction regulation: Galpha(s) stimulates Tj assembly. **Biochem Biophys Res Commun.** 13,285(2): 250-6, 2001.
236. SAHAI, E.; ISHIZAKI, T.; NARUMIYA, S.; TREISMAN, R. Transformation mediated by Rho A activity of Rho Kinases. **Curr Biol.** 11, 9(3): 136-45, 1999.
237. SAKISATA, S.; KAWAGUCHI, T.; TANIGUCHI, E.; HANADA, S.; SASATOMI, K.; KOGA, H.; HARADA, M.; KIMURA, R.; SATA, M.; SAWADA, N.; MONI, M.; TODO, S.; FUROHIJI, T. Alterations in tight junctions differ between primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. **Hepatology.** 33(6): 1460-8, 2001.
238. SAMORE, M. H.; VENKATARAMAN, L.; DeGIROLAMI, P. C.; ARBEIT, R. D.; KARCHMER, A. W. Clinical and molecular epidemiology of sporadic and clustered cases of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. **Am. J. Med.**, 100: 32-40, 1996.
239. SANTOS-NETO, M. S.; SILVA, A. C.; ROCHA, M. F.G.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M.; O sobrenadante de macrófagos estimulados com a toxina A do *Clostridium difficile* reduz absorção de água e eletrólitos no modelo *in vivo* de perfusão intestinal de rato. **Fesbe**, A12079: 203, 1996.

240. SARANTOS, P.; ABOUHAMZE, Z.; COPELAND, E. M.; SOUBA, W. W. Decrease of glutaminase expression by interferon-gamma in human intestinal epithelial cells. **Ann. Surg. Oncol.**, 1 (5): 428-435, 1994b
241. SARTOR, R. B. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology**, 106: 533-539, 1994.
242. SARTOR, R. B.; CHAPMAN, E. J.; SCHWAB, J. H. Increased interleukin-1 β concentrations in resected inflammatory bowel disease (IBD) tissue. **Gastroenterology**, 94: A399, 1988.
243. SATAKE, M.; WATANABE, H.; MIYAMOTO, Y.; SHIMIZU, M. induction of nitric oxide synthase and subsequent production of nitric oxide not involved in interferon-gama-induced hyperpermeability of Caco-2 intestinal epithelial monolayers. **Biosc. Biotechnol Biochem.** 65(2): 428-430, 2001.
244. SCHADE, U. F. Pentoxifylline increases survival in murine endotoxin shock and decreases formation of tumor necrosis factor. **Crit. Shock.**, 31: 171-181, 1990.
245. SCHEPERS, H. E.; VAN BEEK, J. H. G. M.; BASSINGTHWAIGHTE, J. B. Four Methods to estimate the fractal dimension from Self-Affine Signals. **IEEE Engineering in Medicine and Biology**, 2: 57 – 71, 1992.
246. SCHREIBER, S.; RAEDLER, A.; STENSON, W. F.; MACDERMOTT, R. P. The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. **Gastr. Clin. N. Am.**, 21: 451-502, 1992.
247. SEARS, C. L. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions V. assault of the tight junction by enteric pathogen. **Am. J. Gastrointest Liver Physiol.** 279(3): G1129-34, 2000.
248. SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric Bacterial Toxins: Mechanisms of Action and Linkage to intestinal Secretion. **Microbiol. Rev.**, 60: 167-215, 1996.
249. SHARP, G. W.; HYNIE, S. Stimulation of intestinal adenyl cyclase by cholera toxin. **Nature**, 229: 266-269, 1971.
250. SHUN-ZHANG, Y. Drinking water and primary liver cancer. In Primary liver cancer. Edited by Z. Y. TANG, M. C. WU, S. S. XIA. **China Academic Publishers**, Beijing and Springer – Verlag, Berlin, 30-37, 1989.

251. SIMONOVIC, I.; ARPIN, M.; KOUTSOURIS, A.; FALK-KRZESINSKI, B. J.; HECHT, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* activates ezrin, which participates in disruption of tight junction barrier function. **Infect Immun.** 69(9): 5679-88, 2001.
252. SING, U.; MITIC, L. L.; WIECKOWSKI, E. U.; ANDERSON, J. M.; McCLANE, B. A. Comparative biochemical and immunocytochemical studies reveal differences in the effects of *Clostridium perfringens*, enterotoxin on polarized Caco-2 cells versus Vero cells. **J. Biol. Chem.** 7,276(36): 33402-12, 2001.
253. SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W. W.; NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K. L.; DAHLEM, A. M.; NIEMELA, S. I. Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium Nostoc sp. Strain 152. **Appl. Environ. Microbio.**, 56: 2650, 1990.
254. SIVONEN, K.; NAMIKOSHI, M.; EVANS, W. R.; FARDIG, M.; CARMICHAEL, W. W.; RINEHART, K. L. Three new microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, from Nostoc sp. Strain 152. **Chem. Res. Toxicol.**, 5: 464, 1992a.
255. SIVONEN, K.; NAMIKOSHI, M.; EVANS, W. R.; GROMOV, B. V.; CARMICHAEL, W. W.; RINEHART, K. L. Isolation and structures of five microcystins from a Russian *Microcystis aeruginosa* strain CALU. **Toxicon**, 30: 1481, 1992b.
256. SIVONEN, K.; SKULBERG, O. M.; NAMIKOSHI, M.; EVANS, W. R.; CARMICHAEL, W. W.; RINEHART, K. L. Two ester derivatives of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flosaquae* strain. CYA 83/1 **Toxicon**, 30: 1465. 1992c.
257. SKULBERG, O. M., CARMICHAEL, W. W.; CODD, G. A., SKULBERG, R. taxonomy of toxic cyanophyceae (cyanobacteria) In: FALCONER, I. R. (Ed.). **Algal toxins in Seafood and Drinking water.** London: Academic Press, Champ. 9, 1993.
258. SMITH, R. J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **JPEN J. Parenter Enteral Nutr.**, 14 (4): suppl, 40S-44S, 1990.

259. SMITH, P. L.; MONTZKA, D. P.; MACCAFFERTY, G. P.; WASSERMAN, M. A. & FONDACARO, J. D. Effect of sulfidopeptide leukotrienes D₄ e E₄ on ileal ion transport *in vitro* in the rat and rabbit. **Am. J. Physiol.**, 255: G175-G183, 1988.
260. SMITH, P. L. Effects of the neuroimmune mediators, peptidoleukotrienes, endothelin, and interleukin-1 on intestinal ion transport. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 664: 260-274, 1992.
261. SMITH, P. L.; BLUMBERG, J. B.; STOFF, J. S.; FIELD, M. Antisecretory effects of indomethacin on rabbit ileal mucosa *in vitro*. **Gastroenterology**, 80: 356-365, 1981.
262. SCHMITZ, H.; FROMM, M.; BENTZEL, C. J.; SCHOLZ, P.; DETJEN, K.; MANKERTZ, J.; BODE, H.; EPPLE, H. J. RIECKEN E. O.; SCHULZKE, J. D. Tumor necrosis factor α (TNF α) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. **J. Cell Sci**, v, 112: p, 137-146, 1999.
263. SNYDER, F. Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. **Am. J. Physiol.**, 259: C697-C708, 1990.
264. SNYDER, J. D.; MERSON, M. H. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of the active surveillance data. **Bull World Health Organ.**, 60 (4): 605-613, 1982.
265. SONODA, N., FURUSE, M., SASAKI, H.; YONEMURA, S.; KATAHIRA, J.; HORIGUCHI, Y.; TSUKITA, S. *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands evidence for direct involvement of claudins in tight junctions barrier. **J. Cell Biol.** 147: 195-204, 1999.
266. SOUBA, W. W. Glutamine and cancer. **Ann Surg.**, 218 (6): 715-728, 1993.
267. SOUZA, G. E. P.; CUNHA, F. Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S. H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions**, 24: 377-380, 1988.
268. SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by anti-macrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Aents Actions**, 17: 97-103, 1985.

269. SOUZA, M. H. L. P.; MELO-FILHO, A. A.; ROCHA, M. F. G.; LYERLY, D. M.; CUNHA, F. Q.; LIMA, A. A. M.; RIBEIRO, R. A. The involvement of macrophage-derived tumor necrosis factor and lipoxygenase products on the neutrophil recruitment induced by *Clostridium difficile* toxin B. **Immunology**, 91: 281-288, 1997.
270. STACK, W. A.; KEELY, S. J.; O'DONOGHUE, D. P.; BAIRD, A. W. Immune regulation of human colonic electrolyte transport *in vitro*. **Gut**, 36: 395-400, 1995.
271. STARR, J. M.; ROGERS, T. R.; IMPALLOMENI, M. Hospital-acquired *Clostridium difficile* diarrhoea and herd immunity. **Lancet**, 349: 426-428, 1997.
272. STEAD, R. H.; TOMIOKA, M.; QUINONEZ, G.; SIMON, G. T.; FELTEN, S. Y.; BIENENSTOCK, J. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 84: 2975-2979, 1987.
273. STEINEIR, T. S.; LIMA, A.A.M.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* Produce Intestinal Inflammation and Growth Impairment and Cause Interleukin-8 Release from Intestinal Epithelial Cells. **J. Infect. Dis.**, 177: 88-96, 1998.
274. STEVENSON, B. R.; SILICIANO, J. D.; MOOSEKER, M. D.; GOODENOUGH, D. A. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (*zonula ocludens*) in a variety of epithelia. **J. Cell Biol.**, 103 (3): 755-766, 1986.
275. STEYN, D. G. Poisoning of animals and human being by algae. **S. Afr. J. Sci.** 16: 243-244, 1945.
276. STONER, R. D.; ADAMS, W. H.; SLATKIN, D. N.; SIEGELMAN, H. W. The effects of single L- amino acid substitution on the lethal potencies of microcystins. **Toxicon**, 27: 825, 1989.
277. STOTTES, R. R.; NAMIKOSHI, M.; HASCHEK, W. M.; RINEHART, K. L.; CARMICHAEL, W. W.; DAHLEM, A. M.; BEASLEY, V. R. Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis Spp.* **Toxicon**, 31: 783, 1993.

278. SULLIVAN, N. M.; PELLET, S.; WILKINS, T. D. Purification of toxins A and B of *Clostridium difficile*. **Infect. Immun.**, 35: 1032-1040, 1982.
279. TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am J. Physiol.**, 246: C1-C9, 1984.
280. TAMAI, H.; GAGINELLA, T. S.; KACHUR, J. F.; MUSH, M. W.; CHANG, E. B. Ca-mediated stimulation of Cl secretion by reactive oxygen metabolites in human colonic T84 cells. **J. Clin. Invest.**, 89: 301-307, 1992.
281. TEIXEIRA, M. G. L. C.; COSTA, M. C. N.; CARVALHO, V. L. P.; PEREIRA, M. S.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the área of Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bull. Pan. Am. Health Organ.**, 27: 3, 1993.
282. THEODOROU, V.; EUTAMENE, H.; FIORAMONTI, J.; JUNIEN, J. L.; BUENO, L. Interleukin 1 induces a neurally mediated colonic secretion in rats: Involvement of mast cells and prostaglandins. **Gastroenterology**, 106: 1493-1500, 1994.
283. THEODOROU, V.; FIORAMONTI, J.; BUENO, L. Integrative neuroimmunology of the digestive tract. **Vet. Res.**, 27: 427-442, 1996.
284. TILLET, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; VON DOHREN, H.; BORNER, T.; NEILAN, B. A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chem Biol**, 7(10): 753-64, 2000.
285. TILG, H.; EIBL, B.; PICHL, M.; GACHTER, A.; HEROLD, M.; BRANKOVA, J.; HUBER, C.; NIEDERWIESER, D. **Transplantation**, 56: 196-201, 1993.
286. TISDALE, Epidemic of intestinal disorders in Charleston, Wva, occurring simultaneously with unprecented water supply conditions. **Am. J. Public Health**, 21: 198-200, 1931.
287. TOERIEN, D. F.; SCOTT, W. E.; PIPOUT, M. J. *Microcystis* toxins: isolation, identification, implication. **Water S. Afr.**, 2: 160, 1976.
288. TOMAI, H.; GAGINELLA, T. S.; KACHUR, J. F.; MUSCH, M. W.; CHANG, E. B. Mechanisms of inflammatory diarrhea. **Gastroenterology**, 103: 710-711, 1992.

289. TORPKNE, A; PALOVICS, A.; BANKINE, M. allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria – experimental evidence. **Environ Toxicol**, 16(6); 512-6, 2001.
290. TORRES, S. E. A. **Estudo comparativo de parâmetros elétricos na absorção de substratos Na^+/H^+ - dependentes, em epitélio jejunal e ileal de coelho, em câmaras de Üssing**. Fortaleza, 2002, 146p; Tese de Doutorado;. Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC, 2002.
291. TRISCHITTA, F.; DENARO, M. G.; FAGGIO, C.; LIONETTO, M. G. Ca^{++} regulation of paracellular permeability in the middle intestine of the eel, *Anguilla anguilla*. **J. Comp. Physiol (B)**. 171(2): 85-90, 2001.
292. TSUKITA, S.; FURUSE, M. occluding and claudins in tight junction strands: leading or supporting players? **Trends Cell boil.**, 9: 268-273, 1999.
293. UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T. HASEGAWA, A.; WATANABE, M. F.; PARK, H. D.; CHEN, G.- C.; CHEN G.; YU, S. – Z. Detection of microcystins , a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunossay. **Carcinogenesis**, 17: 1317-1321.
294. UNANUE, E. R.; ALLEN, P. M. The basis for the immunoregulatory: Role of macrophages and other accessory cells. **Science**, 236: 551-557, 1987.
295. USAMI, M.; MURAKI, K.; IWAMOTO, M.; OHATA, A.; MATSUSHITA, E.; MIKI, A. Effect of eicosanpentaenoic acid (EPA) on tight junction permeability in intestinal monolayer cells. **Clin. Nutr.** 20(4): 351-9, 2001.
296. ÜSSING, H. H.; ZERAHN, K. Active transport of sodium as the source of electrical current in the short-circuited frog skin. **Acta Physiol. Scan.**, 23: 110-117, 1951.
297. VAN FURTH, R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. **Cur. Top. Pathol.**, 79: 125, 1988.
298. VAN ITALLIE, C. M. & ANDERSON, J. M.; Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. **J. Cell. Sci.**, 110: 1113-1121, 1997.

299. VAN ITALLIE, C. M.; BALDA, M. S.; ANDERSON, J. M. Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation and reorganization of the tight junctions protein ZO-1 in A431 cells. **J. Cell Sci.**, 108: 1735-1742, 1995.
300. VARANDA, W. A.; LIEBOVITCH, L. S.; FIGUEIROA, J. N.; NOGUEIRA, R. A. Hurst Analysis Applied to the Study of Single Calcium-activated Potassium Channel Kinetics. **J. Theor. Biol.** 206: 343-353, 2000.
301. VALDEE, M. V. Epidemiological study of suspected water-borne gastroenteritis. **Am. J. Public. Health**, 21: 1227-1234, 1931.
302. VOSS, R. F. Evolution of long-range fractal correlation and 1/f noise in DNA base sequences. **Phys. Ver. Lett.** 68: 3805-3808, 1992.
303. WACHTEL, M.; BOLLINGER, M. F.; ISHIHARA, H.; FREI, K.; BLUMENTHMANN, H.; GLOOR, S. M.; Down-regulation of occluding expression in astrocytes by tumor necrosis factor (TNF) is mediated via TNF type-1 receptor and nuclear factor-kappa b activation. **J. Neurochem.** 78(11): 155-62, 2001.
304. WALSH, S. V.; HOPKINS, A. M.; CHEN, J.; NARUMIYA, S.'PARKOS, C. A.; NUSRAT A. Rho kinase regulates tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarizes intestinal epithelia. **Gastroenterology** 121(3): 566-79, 2001.
305. WATANABE, M. F.; HARADA, K-I.; MATSUURA, K.; KAWAI, H.; SUZUKI, M. Toxins contained in Microcystis species of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, 26: 1017, 1988.
306. WATANABE, M. F.; HARADA, K. I; CARMICHAEL, W. W.; FUJIKI, H. **Toxic Microcistys**. New York: CRC Press, 259 p. 1996.
307. WATANABE, M. F.; PARK, H-D.; ONDO, F.; HARADA, K-I., HAYASHI, H.; OKINO, T. Identification and estimation of microcystin in freshwater mussels. **Nat. Toxins.**, 5: 31-35, 1997.
308. WILKENS, T.; De RIJK, R. Glucocorticoids and immune function: Unknown dimensions and new frontiers. **Immun. Today**, 18: 418-423, 1997.

309. WITCHEN, E. S.; HASKINS, J.; STEVENSON, B. R. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. **J. Biol. Chem.**, 274: 35179-35185, 1999.
310. WOJCIAK –STOCHARD, B.; EATWISTLE, A.; CARG, R.; RIDLEY, A.; J. Regulation of TNF- α -induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. **J. Cell. Physiol**, 176: 150-165, 1998.
311. WONG, R. K.; BALDWIN, A. L.; HEIMARK, R. L.; Cadherin-5 redistribution at sites of TNF- α and IFN- γ induced permeability in mesenteric venules. **J. Physiol. Heart Circ Physiol.**, 276: H736-H748, 1999.
312. YAMAGUCHI, S.; KAGOSHIMA, M.; KOHGE, S.; TERASAWA, M. Suppressive effects of Y-24180, a lung – acting antagonist for platelet-activating factor, on allergic pulmonary eosinophilis in mice. **Jpn J. Pharmacol.**, 75 (2): 129 – 134, 1997.
313. YANG, C. M.; CHIEN, C. S.; MA, Y. M.; HSIAO, L. D.; LIN, C. H.; WU, C. Bradykinin B₂ receptor – mediated proliferation via activation of the Ras/Raf/MEK/MAPK pathway in rat vascular smooth muscle cells. **J. Biomed. Sci** 10 (2): 208-18, 2003.
314. YOSHIZAWA, S.; MATSUSHIMA, R.; WATANABE, M. F.; HARADA, K.; ICHIHARA, A.; CARMICHAEL, W. W.; FUJIKI, H. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 116 (6): 609-614, 1990.
315. YOUNGMAN, R. R.; SIMON, P. L.; WEST, G. A.; COMINELLI, F.; RACHMILEWITZ, D.; KLEIN, J. S.; FIOCCHI, C. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. **Gastroenterology**, 104: 749-758, 1993.
316. YU, S. Z. Drinking water and primary liver cancer. In: TANG, Z. Y.; WU, M. C.; XIA, S. S. (Eds.). **Primary Liver Cancer. New York: China Academic Publishers.** 30-37, 1989.

317. ZHANG, Y.; CHEN, J. Z.; XIA, Q.; HU, X. C. Effect of HOE on ischemic myocardium reperfusion injury. **Zhejiang Da Xue Wue Bao Y: Xue Ban**, 31 (3): 189 – 192, 2002.
318. ZILBERG, B. Gastroenteritis in Salisbury European children – a five year study. **Cent. Afr. J. Med.**, 12: 164-168, 1966.
319. ZIN, L. L.; EDWARDS, W. C. Toxicity of blue-green algae in livestock. **Bov. Pract.**, 14: 151-153, 1979.

8. ANEXOS

8.1. Tabelas de dados experimentais, utilizados para o delineamento dos resultados do presente trabalho.

Tabela 6. Valores de Δ Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR, diferentes concentrações (Figura 11).

Controle	MCLR $3,2 \cdot 10^{-7}$ M	MCLR $9,6 \cdot 10^{-7}$ M	MCLR $3,2 \cdot 10^{-6}$ M
m \pm epm (n)	m \pm epm (n)	m \pm epm (n)	m \pm epm (n)
19,60 \pm 3,10 (9)	57,60 \pm (5)	50,80 \pm 12,40 (6)	103,30 \pm 18,20 (9)

Tabela 7. Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI - Controle (Figura 12).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
0	20,0	56,0	21,0	43,0	27,0	58,0	39,0	23,0	20,0	31,0
10	11,0	59,0	15,0	44,0	26,0	59,0	44,0	23,0	24,0	39,0
20	12,0	67,0	11,0	47,0	26,0	68,0	44,0	29,0	25,0	52,0
30	10,0	65,0	7,0	47,0	26,0	68,0	45,0	31,0	25,0	50,0
40	9,0	86,0	15,0	54,0	26,0	76,0	48,0	63,0	34,0	61,0
50	10,0	86,0	21,0	65,0	31,0	79,0	51,0	73,0	34,0	65,0
60	21,0	86,0	30,0	68,0	40,0	98,0	59,0	75,0	36,0	65,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 8. Valores de I_{sc} (μA . cm⁻²), S.MφS + MCLR (3,2.10⁻⁶M) - (Figura 12).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
0	25,0	34,0	79,0	106,0	24,0	26,0	20,0	54,0	22,0	19,0
10	135,0	39,0	84,0	137,0	32,0	28,0	70,0	48,0	58,0	19,0
20	170,0	50,0	85,0	140,0	51,0	36,0	74,0	56,0	78,0	107,0
30	171,0	68,0	92,0	135,0	70,0	93,0	77,0	75,0	68,0	150,0
40	171,0	90,0	135,0	175,0	93,0	115,0	87,0	90,0	80,0	236,0
50	1790	108,0	154,0	192,0	106,0	129,0	96,0	95,0	91,0	276,0
60	179,0	143,0	188,0	213,0	140,0	126,0	104,0	121,0	96,0	327,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 9. Valores de I_{sc} (μA . cm⁻²), S.MφS + Ringer (Figura 13)

Min	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0	22,0	51,0	26,0	39,0	29,0	56,0
10	22,0	53,0	25,0	41,0	29,0	59,0
20	23,0	53,0	31,0	42,0	29,0	58,0
30	26,0	55,0	31,0	42,0	30,0	58,0
40	25,0	56,0	31,0	42,0	32,0	62,0
50	26,0	58,0	34,0	45,0	34,0	61,0
60	28,0	61,0	35,0	48,0	37,0	65,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 10. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) (Figura 13)

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	73,0	51,0	43,0	79,0	79,0	49,0	61,0	53,0
10	85,0	88,0	59,0	86,0	88,0	56,0	79,0	64,0
20	90,0	94,0	66,0	97,0	93,0	69,0	119,0	63,0
30	110,0	126,0	92,0	131,0	129,0	92,0	148,0	76,0
40	140,0	133,0	111,0	149,0	143,0	106,0	190,0	98,0
50	179,0	171,0	149,0	187,0	191,0	149,0	196,0	119,0
60	218,0	204,0	187,0	201,0	218,0	181,0	199,0	137,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 11. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) diretamente nas câmaras (Figura 13)

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	20,0	23,0	20,0	60,0	39,0	26,0	31,0
10	20,0	20,0	19,0	51,0	36,0	24,0	31,0
20	20,0	21,0	22,0	53,0	35,0	23,0	33,0
30	34,0	26,0	23,0	56,0	41,0	28,0	33,0
40	36,0	27,0	23,0	56,0	42,0	29,0	39,0
50	39,0	32,0	29,0	54,0	46,0	33,0	46,0
60	42,0	37,0	33,0	67,0	48,0	39,0	49,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 12. Valores de I_{sc} (μA . cm⁻²), S.MφS+RPMI – controle, (Figura 14).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
0	23	28	32	31	36	31	21	11	68
10	23	34	35	30	39	29	23	14	69
20	23	55	38	35	40	31	22	15	71
30	25	58	38	39	41	31	23	15	71
40	26	79	38	39	46	31	26	14	72
50	26	98	39	40	49	32	27	18	73
60	26	147	41	41	50	32	28	20	73

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 13. Valores de I_{sc} (μA . cm⁻²), S.MφS+ MCLR (3,2.10⁻⁶M), (Figura 14).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
0	35,0	29,0	30,0	19,0	28,0	46,0	31,0	31,0	18,0	37,0
10	41	56,0	51,0	67,0	50,0	49,0	38,0	68,0	29,0	81,0
20	58	68,0	76,0	78,0	90,0	87,0	76,0	97,0	68,0	80,0
30	63	79,0	98,0	80,0	111,0	128,0	101,0	112,0	132,0	103,0
40	96	109,0	119,0	135,0	178,0	174,0	154,0	126,0	157,0	145,0
50	116	142,0	157,0	156,0	198,0	215,0	172,0	156,0	160,0	166,0
60	164,0	178,0	166,0	177,0	237,0	275,0	180,0	167,0	181,0	176,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 14. Valores de I_{sc} (μA . cm⁻²), S.MφS+ MCLR (3,2.10⁻⁶M) + PMXB (6,9.10⁻⁵M), (Figura 14).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	31,0	32,0	28,0	48,0	25,0	35,0	32,0	18,0
10	31,0	33,0	33,0	72,0	48,0	42,0	65,0	40,0
20	25,0	28,0	30,0	86,0	53,0	49,0	70,0	40,0
30	32,0	36,0	49,0	113,0	78,0	70,0	85,0	42,0
40	45,0	41,0	54,0	120,0	83,0	77,0	103,0	85,0
50	62,0	49,0	56,0	136,0	98,0	96,0	110,0	147,0
60	196,0	170,0	99,0	141,0	154,0	161,0	138,0	200,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 15. Valores de I_{sc} (μA . cm⁻²), S.MφS+ RPMI, (Figura 15).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	37,0	38,0	30,0	18,0	63,0	38,0	48,0
10	40,0	42,0	34,0	15,0	63,0	32,0	55,0
20	42,0	42,0	36,0	14,0	62,0	32,0	56,0
30	41,0	43,0	36,0	15,0	64,0	39,0	58,0
40	52,0	57,0	49,0	16,0	68,0	43,0	60,0
50	56,0	58,0	50,0	19,0	76,0	60,0	74,0
60	63,0	68,0	60,0	24,0	79,0	71,0	81,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 16. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S+MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$), (Figura 15).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	79,0	53,0	22,0	60,0	19,0	16,0	41,0
10	89,0	48,0	58,0	90,0	19,0	69,0	46,0
20	85,0	55,0	78,0	111,0	97,0	69,0	49,0
30	92,0	72,0	78,0	178,0	111,0	73,0	52,0
40	135,0	86,0	80,0	206,0	126,0	79,0	78,0
50	157,0	99,0	91,0	231,0	158,0	109,0	95,0
60	188,0	138,0	99,0	238,0	159,0	131,0	102,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 17. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S+MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + TxP ($9,5 \cdot 10^{-7}\text{M}$), (Figura 15).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	45,0	35,0	65,0	37,0	42,0	77,0	66,0
10	48,0	37,0	67,0	34,0	40,0	78,0	76,0
20	45,0	34,0	60,0	39,0	61,0	74,0	80,0
30	48,0	37,0	59,0	59,0	79,0	87,0	80,0
40	53,0	42,0	62,0	68,0	80,0	96,0	79,0
50	54,0	43,0	66,0	84,0	85,0	99,0	83,0
60	57,0	45,0	72,0	95,0	85,0	104,0	86,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 18. Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S+MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + TxPm ($9,5 \cdot 10^{-7}\text{M}$), (Figura 15).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	62,0	37,0	128,0	48,0	50,0	26,0	39,0
10	57,0	48,0	125,0	52,0	49,0	37,0	45,0
20	55,0	60,0	172,0	55,0	68,0	45,0	50,0
30	59,0	61,0	179,0	121,0	79,0	49,0	72,0
40	64,0	76,0	230,0	120,0	86,0	63,0	91,0
50	74,0	115,0	231,0	149,0	106,0	99,0	96,0
60	78,0	150,0	277,0	223,0	111,0	122,0	108,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 19. Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S+ RPMI - controle, (Figura 16).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	37,0	38,0	30,0	18,0	63,0	38,0	48,0
10	40,0	42,0	34,0	15,0	63,0	32,0	55,0
20	42,0	42,0	36,0	14,0	62,0	32,0	56,0
30	41,0	43,0	36,0	15,0	64,0	39,0	58,0
40	52,0	57,0	49,0	16,0	68,0	43,0	60,0
50	36,0	58,0	50,0	19,0	76,0	60,0	74,0
60	63,0	68,0	60,0	24,0	79,0	71,0	81,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 20. Valores de I_{sc} (μA . cm⁻²), S.MφS+MCLR (3,2.10⁻⁶M), (Figura 16).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	79,0	53,0	22,0	60,0	19,0	16,0	41,0
10	89,0	48,0	58,0	90,0	19,0	69,0	46,0
20	85,0	55,0	78,0	111,0	97,0	69,0	49,0
30	92,0	72,0	78,0	178,0	111,0	73,0	62,0
40	135,0	86,0	80,0	206,0	126,0	79,0	78,0
50	157,0	99,0	91,0	231,0	158,0	109,0	95,0
60	188,0	138,0	99,0	238,0	159,0	131,0	102,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 21. Valores de I_{sc} (μA . cm⁻²), S.MφS+MCLR (3,2.10⁻⁶M) + CHX (10⁻⁵M), (Figura 16).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	26,0	43,0	35,0	69,0	58,0	33,0	11,0	25,0
10	22,0	43,0	38,0	82,0	59,0	31,0	9,0	43,0
20	22,0	46,0	41,0	84,0	62,0	30,0	11,0	66,0
30	22,0	44,0	58,0	79,0	84,0	43,0	12,0	59,0
40	22,0	54,0	77,0	96,0	101,0	36,0	13,0	60,0
50	36,0	63,0	84,0	116,0	103,0	36,0	13,0	61,0
60	40,0	66,0	87,0	124,0	108,0	45,0	18,0	69,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 22. Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S+RPMI, (Figura 17).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	37,0	38,0	30,0	18,0	63,0	38,0	48,0
10	40,0	42,0	34,0	15,0	63,0	32,0	55,0
20	42,0	42,0	36,0	14,0	62,0	32,0	56,0
30	41,0	43,0	36,0	15,0	64,00	39,0	58,0
40	52,0	57,0	49,0	16,0	68,0	43,0	60,0
50	56,0	58,0	50,0	19,0	76,0	60,0	74,0
60	63,0	68,0	60,0	24,0	79,0	71,0	81,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 23. Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S+MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$), (Figura 17).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	79,0	53,0	22,0	60,0	19,0	16,0	41,0
10	89,0	48,0	58,0	90,0	19,0	69,0	46,0
20	85,0	55,0	78,0	111,0	97,0	69,0	49,0
30	92,0	72,0	78,0	178,0	111,0	73,0	62,0
40	135,0	86,0	80,0	206,0	126,0	79,0	78,0
50	157,0	99,0	91,0	231,0	158,0	109,0	95,0
60	188,0	138,0	99,0	238,0	159,0	131,0	102,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 24. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S+MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + I.PROT (1mg/ml), (Figura 17).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	21,0	42,0	35,0	61,0	31,0	17,0	44,0	25,0
10	26,0	43,0	40,0	63,0	39,0	26,0	49,0	43,0
20	27,0	46,0	42,0	65,0	43,0	34,0	54,0	66,0
30	31,0	46,0	41,0	65,0	52,0	40,0	56,0	59,0
40	36,0	53,0	44,0	65,0	60,0	48,0	60,0	60,0
50	40,0	64,0	52,0	76,0	68,0	51,0	62,0	61,0
60	40,0	69,0	55,0	82,0	68,0	59,0	78,0	69,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 25. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S+MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + DEXA (10^{-5}M), (Figura 18).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	26,0	61,0	26,0	44,0	26,0	57,0	42,0	27,0
10	23,0	67,0	31,0	45,0	27,0	57,0	51,0	33,0
20	27,0	65,0	34,0	46,0	28,0	64,0	54,0	30,0
30	31,0	66,0	45,0	52,0	32,0	64,0	62,0	56,0
40	51,0	67,0	58,0	66,0	73,0	73,0	85,0	83,0
50	65,0	69,0	71,0	78,0	87,0	73,0	99,0	101,0
60	81,0	73,0	88,0	84,0	98,0	91,0	109,0	105,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle – idem tabela 19 e S.M ϕ S+MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) – idem à tabela 20.

Tabela 26. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S+MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + QUINAC. (10^{-5}M), (Figura 19).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	43,0	45,0	38,0	35,0	36,0	40,0	66,0	62,0
10	44,0	46,0	31,0	35,0	38,0	42,0	64,0	58,0
20	46,0	46,0	32,0	36,0	37,0	41,0	65,0	56,0
30	50,0	51,0	38,0	42,0	44,0	44,0	77,0	56,0
40	56,0	55,0	41,0	45,0	51,0	49,0	89,0	60,0
50	58,0	56,0	44,0	51,0	66,0	64,0	92,0	65,0
60	62,0	63,0	47,0	52,0	74,0	74,0	96,0	74,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle – idem tabela 19 e S.M ϕ S+MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) – idem à tabela 20.

Tabela 27. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S+MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + NDGA. (10^{-5}M), (Figura 20).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	44,0	30,0	58,0	37,0	74,0	41,0	29,0
10	44,0	30,0	60,0	36,0	67,0	46,0	32,0
20	57,0	31,0	51,0	37,0	80,0	42,0	31,0
30	84,0	65,0	54,0	42,0	81,0	39,0	36,0
40	97,0	74,0	66,0	43,0	86,0	38,0	40,0
50	100,0	81,0	80,0	47,0	98,0	41,0	39,0
60	100,0	87,0	82,0	48,0	106,0	43,0	45,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle – idem tabela 19 e S.M ϕ S+MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) – idem à tabela 20.

Tabela 28. Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI - controle, (Figura 21).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	38,0	33,0	38,0	35,0	31,0	29,0	21,0
10	32,0	44,0	42,0	37,0	39,0	36,0	25,0
20	32,0	50,0	42,0	56,0	47,0	45,0	21,0
30	38,0	55,0	43,0	61,0	52,0	51,0	27,0
40	45,0	61,0	57,0	59,0	55,0	56,0	25,0
50	53,0	61,0	58,0	64,0	59,0	60,0	31,0
60	56,0	66,0	59,0	64,0	63,0	63,0	36,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 29. Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S+MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$), (Figura 21).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	58,0	19,0	31,0	61,0	24,0	26,0	27,0	19,0
10	69,0	19,0	46,0	91,0	32,0	28,0	27,0	29,0
20	69,0	107,0	55,0	108,0	51,0	36,0	27,0	48,0
30	71,0	150,0	122,0	190,0	70,0	45,0	54,0	67,0
40	78,0	155,0	172,0	236,0	93,0	93,0	64,0	63,0
50	81,0	158,0	230,0	276,0	106,0	45,0	70,0	106,0
60	185,0	158,0	247,0	327,0	140,0	129,0	178,0	116,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 30. Valores de I_{sc} (μA . cm⁻²), S.MφS+MCLR (3,2.10⁻⁶M) + INDO (10⁻⁵M), (Figura 21).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	58,0	28,0	54,0	35,0	71,0	41,0	57,0	42,0
10	55,0	21,0	69,0	44,0	69,0	42,0	60,0	40,0
20	54,0	21,0	63,0	41,0	72,0	41,0	72,0	40,0
30	64,0	23,0	62,0	37,0	88,0	40,0	76,0	40,0
40	67,0	26,0	63,0	38,0	97,0	47,0	90,0	41,0
50	69,0	29,0	81,0	45,0	99,0	50,0	98,0	43,0
60	71,0	31,0	96,0	52,0	108,0	57,0	98,0	46,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 31. Valores de I_{sc} (μA . cm⁻²), S.MφS + MCLR (3,2.10⁻⁶M) +MK886 (10⁻⁵M), (Figura 22).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	24,0	43,0	29,0	48,0	36,0	39,0	33,0
10	37,0	56,0	35,0	59,0	74,0	86,0	55,0
20	44,0	63,0	44,0	59,0	102,0	96,0	60,0
30	55,0	76,0	58,0	66,0	116,0	95,0	65,0
40	56,0	89,0	67,0	70,0	123,0	109,0	77,0
50	78,0	99,0	78,0	87,0	119,0	111,0	94,0
60	95,0	131,0	108,0	115,0	128,0	119,0	112,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle idem à tabela 28, e S.MφS + MCLR (3,2.10⁻⁶M), idem à tabela 29.

Tabela 32. Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI - controle, (Figura 23).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	37,0	38,0	30,0	18,0	63,0	38,0	48,0
10	40,0	42,0	34,0	15,0	63,0	32,0	55,0
20	42,0	42,0	36,0	14,0	62,0	32,0	56,0
30	41,0	43,0	36,0	15,0	64,0	39,0	58,0
40	52,0	57,0	49,0	16,0	68,0	43,0	60,0
50	56,0	58,0	50,0	19,0	76,0	60,0	74,0
60	63,0	68,0	60,0	24,0	79,0	71,0	81,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 33. Valores de Isc ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$), (Figura 23).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	79,0	53,0	22,0	60,0	19,0	16,0	41,0
10	89,0	48,0	58,0	90,0	19,0	69,0	46,0
20	85,0	55,0	78,0	111,0	97,0	69,0	49,0
30	92,0	72,0	78,0	178,0	111,0	73,0	62,0
40	135,0	86,0	80,0	206,0	126,0	79,0	78,0
50	157,0	99,0	91,0	231,0	158,0	109,0	95,0
60	188,0	138,0	99,0	238,0	159,0	131,0	102,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 34. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + NS398 (10^{-5}M), (Figura 23).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0	51,0	39,0	41,0	63,0	51,0	42,0
10	52,0	58,0	44,0	77,0	63,0	50,0
20	62,0	62,0	53,0	83,0	70,0	55,0
30	78,0	75,0	69,0	92,0	72,0	53,0
40	85,0	81,0	71,0	96,0	96,0	72,0
50	97,0	86,0	77,0	98,0	98,0	89,0
60	101,0	92,0	89,0	103,0	102,0	96,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 35. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + WEB2086 (10^{-5}M), (Figura 24).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	21,0	29,0	38,0	14,0	31,0	17,0	43,0	20,0
10	51,0	31,0	49,0	26,0	74,0	38,0	57,0	39,0
20	61,0	36,0	55,0	38,0	73,0	61,0	62,0	56,0
30	75,0	45,0	55,0	44,0	77,0	87,0	80,0	73,0
40	88,0	46,0	67,0	70,0	82,0	123,0	94,0	80,0
50	94,0	71,0	78,0	97,0	101,0	136,0	101,0	98,0
60	103,0	92,0	119,0	105,0	108,0	139,0	112,0	104,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle idem à tabela 28, e S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$), idem à tabela 29.

Tabela 36. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + PTF ($5 \cdot 10^{-4}\text{M}$), (Figura 25).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	40,0	38,0	29,0	16,0	23,0	32,0	23,0	26,0
10	73,0	85,0	65,0	53,0	33,0	66,0	28,0	39,0
20	77,0	106,0	96,0	57,0	63,0	69,0	40,0	56,0
30	99,0	109,0	98,0	61,0	72,0	97,0	55,0	73,0
40	100,0	118,0	99,0	68,0	82,0	111,0	62,0	86,0
50	101,0	130,0	102,0	74,0	92,0	126,0	75,0	98,0
60	114,0	139,0	113,0	76,0	103,0	133,0	98,0	104,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle idem à tabela 28, e S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$), idem à tabela 29.

Tabela 37. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + TAL ($1,5 \cdot 10^{-5}\text{M}$), (Figura 26).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
0	42,0	39,0	31,0	14,0	28,0	22,0	40,0	31,0	27,0
10	51,0	45,0	33,0	19,0	29,0	38,0	53,0	35,0	32,0
20	59,0	59,0	46,0	30,0	34,0	37,0	54,0	39,0	31,0
30	73,0	65,0	55,0	42,0	42,0	44,0	58,0	42,0	31,0
40	84,0	70,0	65,0	50,0	57,0	51,0	60,0	46,0	34,0
50	89,0	87,0	75,0	58,0	71,0	59,0	67,0	51,0	52,0
60	99,0	90,0	103	77,0	81,0	73,0	88,0	75,0	72,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle idem à tabela 28, e S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$), idem à tabela 29.

Tabela 38. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI – controle, (Figura 28).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	18,0	26,0	21,0	33,0	19,0	38,0	20,0	17,0
10	21,0	29,0	26,0	36,0	26,0	38,0	22,0	19,0
20	23,0	36,0	32,0	39,0	32,0	37,0	26,0	29,0
30	30,0	41,0	38,0	45,0	38,0	46,0	35,0	36,0
40	31,0	43,0	38,0	47,0	41,0	53,0	34,0	38,0
50	34,0	46,0	41,0	50,0	46,0	59,0	37,0	39,0
60	37,0	47,0	41,0	53,0	49,0	61,0	39,0	40,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$), idem à tabela 13.

Tabela 39. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$) + Anti-IL-1ra ($4,5 \cdot 10^{-6}\text{M}$), (Figura 28).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0	37,0	50,0	24,0	16,0	29,0	42,0
10	41,0	54,0	29,0	19,0	31,0	46,0
20	46,0	55,0	30,0	20,0	33,0	49,0
30	51,0	65,0	28,0	20,0	36,0	56,0
40	54,0	68,0	29,0	21,0	36,0	62,0
50	58,0	76,0	30,0	38,0	42,0	69,0
60	62,0	81,0	30,0	42,0	49,0	75,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 40. Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) + Anti-IL-1 α (Figura 29).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0	35,0	39,0	26,0	51,0	58,0	32,0
10	39,0	42,0	38,0	73,0	79,0	39,0
20	39,0	46,0	51,0	76,0	94,0	47,0
30	53,0	71,0	63,0	95,0	115,0	61,0
40	65,0	85,0	78,0	106,0	127,0	83,0
50	78,0	92,0	92,0	134,0	147,0	94,0
60	93,0	104,0	120,0	131,0	143,0	100,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle – idem à tabela 38. S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), idem à tabela 13.

Tabela 41. Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) + Anti-IL-1 β (Figura 29).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0	53,0	57,0	59,0	46,0	44,0	64,0
10	52,0	60,0	26,0	51,0	63,0	60,0
20	47,0	56,0	55,0	57,0	48,0	67,0
30	84,0	64,0	93,0	67,0	58,0	68,0
40	97,0	76,0	93,0	75,0	89,0	69,0
50	99,0	83,0	98,0	78,0	97,0	73,0
60	90,0	85,0	99,0	86,0	76,0	96,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle – idem à tabela 38. S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), idem à tabela 13.

Tabela 42. Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$) + Anti-IL-1 α + Anti-IL-1 β (Figura 29).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0	29,0	40,0	48,0	19,0	50,0	37,0
10	36,0	41,0	49,0	28,0	67,0	50,0
20	36,0	44,0	65,0	34,0	71,0	61,0
30	39,0	44,0	69,0	41,0	70,0	69,0
40	41,0	51,0	71,0	59,0	75,0	71,0
50	47,0	62,0	77,0	59,0	76,0	72,0
60	48,0	68,0	73,0	55,0	75,0	72,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle – idem à tabela 38. S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), idem à tabela 13.

Tabela 43. Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), Aplicação de IL-1 β diretamente às câmaras (Figura 31).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	34,0	23,0	16,0	41,0	35,0	24,0	26,0
10	48,0	52,0	36,0	40,0	39,0	48,0	51,0
20	59,0	83,0	65,0	67,0	78,0	89,0	76,0
30	72,0	86,0	94,0	98,0	96,0	112,0	111,0
40	91,0	118,0	112,0	132,0	143,0	123,0	115,0
50	112,0	129,0	150,0	176,0	167,0	139,0	123,0
60	130,0	157,0	171,0	260,0	186,0	144,0	128,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle – idem à tabela 38. S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), idem à tabela 13.

Tabela 44. Valores de I_{sc} (μA . cm⁻²), Ringer (Figura 32).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
0	22,0	20,0	52,0	19,0	53,0	48,0	22,0	51,0	26,0
10	22,0	18,0	52,0	19,0	44,0	42,0	22,0	53,0	25,0
20	29,0	17,0	43,0	21,0	42,0	41,0	23,0	53,0	31,0
30	39,0	23,0	35,0	21,0	44,0	48,0	25,0	55,0	35,0
40	43,0	29,0	37,0	21,0	39,0	54,0	25,0	56,0	31,0
50	50,0	29,0	48,0	24,0	49,0	58,0	26,0	58,0	34,0
60	50,0	41,0	61,0	30,0	54,0	65,0	28,0	61,0	35,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle – idem à tabela 38. S.MφS + MCLR (3,2.10⁻⁶M), idem à tabela 13.

Tabela 45. Valores de I_{sc} (μA . cm⁻²), S.MφS + MCLR (3,2.10⁻⁶M), em câmaras com tecido ileal, preparadas previamente com BUM (10⁻⁵M) (Figura 32).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	74,0	13,0	79,0	50,0	49,0	21,0	36,0	21,0
10	94,0	14,0	73,0	55,0	51,0	22,0	37,0	26,0
20	105,0	18,0	75,0	64,0	59,0	25,0	39,0	27,0
30	113,0	39,0	82,0	83,0	64,0	26,0	42,0	31,0
40	120,0	40,0	86,0	98,0	72,0	25,0	46,0	38,0
50	137,0	48,0	94,0	99,0	81,0	24,0	47,0	43,0
60	152,0	57,0	102,0	100,0	86,0	23,0	49,0	49,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle – idem à tabela 38. S.MφS + MCLR (3,2.10⁻⁶M), idem à tabela 13.

Tabela 46. Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), em câmaras com tecido ileal, preparadas com INDO ($10^{-6}M$); (Figura 33).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	38,0	77,0	25,0	15,0	32,0	20,0	26,0	34,0
10	36,0	61,0	24,0	11,0	41,0	22,0	28,0	40,0
20	25,0	56,0	19,0	12,0	42,0	26,0	29,0	43,0
30	28,0	72,0	21,0	17,0	57,0	29,0	35,0	51,0
40	29,0	101,0	28,0	13,0	72,0	29,0	54,0	57,0
50	49,0	118,0	38,0	14,0	81,0	36,0	59,0	61,0
60	59,0	160,0	41,0	21,0	103,0	47,0	62,0	64,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle – idem à tabela 38. S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), idem à tabela 13.

Tabela 47. Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), em câmaras com tecido ileal, preparadas com TTX ($10^{-7}M$); (Figura 34).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	43,0	26,0	14,0	17,0	71,0	76,0	34,0	37,0
10	42,0	29,0	12,0	54,0	76,0	89,0	39,0	43,0
20	51,0	30,0	21,0	56,0	83,0	95,0	41,0	51,0
30	60,0	34,0	43,0	59,0	85,0	115,0	48,0	55,0
40	88,0	42,0	53,0	61,0	89,0	117,0	48,0	58,0
50	97,0	46,0	54,0	64,0	106,0	121,0	51,0	63,0
60	110,0	47,0	58,0	61,0	117,0	147,0	53,0	64,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle – idem à tabela 38. S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), idem à tabela 13.

Tabela 48. Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), em câmaras com tecido ileal, preparadas com HOE ($10^{-5}M$); (Figura 35).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5
0	70,0	74,0	44,0	24,0	35,0
10	91,0	102,0	56,0	45,0	67,0
20	132,0	156,0	69,0	68,0	106,0
30	146,0	187,0	78,0	96,0	134,0
40	176,0	191,0	107,0	114,0	137,0
50	181,0	207,0	121,0	126,0	156,0
60	188,0	210,0	144,0	135,0	161,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento. Controle – idem à tabela 38. S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}M$), idem à tabela 13.

Tabela 49. Valores de Rte ($\Omega \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI, controle; (Figura 38).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0	50	61	34	39	27	84	29	36	17	39	33	66
20	51	60	28	36	23	85	25	39	20	37	46	68
40	57	67	31	37	24	91	29	46	26	33	44	68
60	52	76	40	42	25	87	25	52	32	21	45	68

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 50. Valores de Rte ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$); (Figura 38).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
0	50	11	26	21	24	34	35	22	36	36
20	32	8	15	3	23	26	30	14	31	35
40	24	10	17	3	20	25	28	19	26	35
60	20	12	18	4	18	26	24	13	24	34

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento

Tabela 51. Valores de Vte (mV . cm^{-2}), S.M ϕ S +RPMI, controle; (Figura 39).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
0	1,4	1,5	1,8	2,9	0,9	1,6	1,2	1,2	1,7	0,1	3,2	3,0
20	1,4	1,3	1,6	2,5	0,9	1,5	1,0	2,2	2,0	0,3	2,6	3,7
40	1,8	2,1	1,7	2,8	1,5	1,6	1,6	3,0	2,6	0,1	2,1	3,5
60	2,6	3,4	2,6	3,7	1,9	2,0	1,6	3,9	3,2	0,4	3,7	3,9

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 52. Valores de Vte (mv. cm^{-2}), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$); (Figura 39).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
0	2,5	0,6	2,8	0,3	1,4	2,0	1,4	1,1	0,2	1,0
20	2,1	0,1	0,7	1,0	1,3	2,0	1,4	2,0	8,0	1,5
40	2,4	1,0	3,2	0,9	1,7	2,4	2,1	2,3	1,4	2,7
60	3,9	0,7	3,8	0,9	1,9	2,6	2,8	2,7	2,0	3,4

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 53. Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI; valores estes usados para o cálculo da constante de Hurst (Figuras 36 e 37).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
0	26,0	20,0	69,0	54,0	48,0	45,0	46,0	41,0	21,0	30,0	80,0
10	23,0	17,0	72,0	56,0	41,0	46,0	49,0	46,0	15,0	34,0	72,0
20	24,0	17,0	72,0	57,0	44,0	49,0	48,0	48,0	11,0	31,0	73,0
30	29,0	22,0	73,0	55,0	48,0	51,0	47,0	49,0	10,0	28,0	73,0
40	30,0	26,0	75,0	61,0	53,0	55,0	47,0	49,0	15,0	32,0	75,0
50	35,0	32,0	78,0	64,0	53,0	59,0	48,0	59,0	21,0	33,0	78,0
60	40,0	42,0	85,0	74,0	64,0	89,0	55,0	78,0	30,0	34,0	85,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 54. Valores de I_{sc} ($\mu A \cdot cm^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}M$); valores estes usados para o cálculo da constante de Hurst (Figuras 36 e 37).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5
0	12,0	51,0	38,0	49,0	39,0
10	11,0	49,0	39,0	50,0	43,0
20	11,0	48,0	38,0	57,0	47,0
30	24,0	47,0	45,0	64,0	45,0
40	38,0	47,0	53,0	72,0	48,0
50	53,0	48,0	63,0	82,0	56,0
60	67,0	48,0	92,0	101,0	77,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 55. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($9,6 \cdot 10^{-7}\text{M}$); valores estes usados para o cálculo da constante de Hurst (Figuras 36 e 37).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0	139,0	112,0	35,0	15,0	70,0	24,0
10	159,0	139,0	48,0	24,0	130,0	63,0
20	160,0	118,0	85,0	28,0	128,0	69,0
30	165,0	171,0	74,0	28,0	126,0	65,0
40	175,0	214,0	75,0	32,0	118,0	66,0
50	179,0	238,0	79,0	36,0	119,0	65,0
60	188,0	288,0	82,0	61,0	117,0	105,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 56. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$); valores estes usados para o cálculo da constante de Hurst (Figuras 36 e 37).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
0	25,0	29,0	12,0	26,0	34,0	44,0	30,0	46,0	32,0
10	135,0	70,0	27,0	28,0	39,0	48,0	69,0	81,0	61,0
20	170,0	74,0	37,0	36,0	50,0	54,0	75,0	87,0	69,0
30	171,0	74,0	54,0	93,0	68,0	88,0	76,0	91,0	79,0
40	171,0	87,0	59,0	115,0	90,0	97,0	85,0	97,0	88,0
50	179,0	96,0	68,0	129,0	108,0	118,0	97,0	104,0	99,0
60	179,0	104,0	84,0	126,0	106,0	126,0	108,0	120,0	105,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 57. Valores de I_{sc} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), IL-1 β (10^{-7}M), diretamente às câmaras de Üssing; valores estes, utilizados para o cálculo do coeficiente de Hurst (Figuras 36 e 37).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
0	31,0	29,0	37,0	51,0	44,0	28,0	16,0	33,0
10	37,0	88,0	39,0	58,0	53,0	29,0	41,0	39,0
20	54,0	104,0	38,0	66,0	74,0	93,0	53,0	45,0
30	66,0	116,0	59,0	78,0	85,0	106,0	62,0	61,0
40	98,0	123,0	84,0	95,0	90,0	113,0	91,0	93,0
50	113,0	147,0	92,0	119,0	90,0	132,0	107,0	100,0
60	129,0	149,0	99,0	132,0	110,0	139,0	107,0	119,0

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 58. Valores de R_{te} ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + RPMI); valores estes, utilizados para o cálculo do coeficiente de Hurst (Figura 40).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
0	50	61	34	36	84	36	39
20	50	60	28	39	85	39	37
40	57	67	31	46	91	46	33
60	52	76	40	50	87	52	21

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 59. Valores de Rte ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-7}\text{M}$); valores estes, utilizados para o cálculo do coeficiente de Hurst (Figura 40).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5
0	29	24	16	10	15
20	60	32	23	22	44
40	69	38	26	21	55
60	50	50	25	28	52

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento

Tabela 60. Valores de Rte ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($9,6 \cdot 10^{-7}\text{M}$); valores estes utilizados para o cálculo do coeficiente de Hurst (Figura 40).

Min.	C1	C2	C3	C4
0	6	16	23	33
20	10	24	14	14
40	10	28	18	16
60	11	26	22	29

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 61. Valores de Rte ($\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$), S.M ϕ S + MCLR ($3,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$); (Figura 40).

Min.	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0	5	26	21	24	34	22
20	14	15	3	23	26	14
40	16	17	3	20	25	19
60	29	18	4	18	25	13

OBS: “Min.” é o tempo útil decorrido do experimento; “C1...” representa cada câmara de Üssing considerada, para o experimento.

Tabela 62. Articulação de valores de Isc da primeira coluna da tabela 53, a fim de exemplificar o cálculo do coeficiente de Hurst.

Min.	Isc (t)	M	S	Isc - M	R	R/S	Log R/S	Log T/2
01	26,0	26,00	0	0	0	-	-	0
10	23,0	24,50	2,12	-1,50	1,50	0,71	-0,15	0,70
20	24,0	24,33	1,53	-0,33	1,50	0,98	-0,01	1,00
30	29,0	25,50	2,65	3,50	4,50	1,70	0,23	1,18
40	30,0	26,40	3,05	3,60	5,00	1,67	0,22	1,30
50	35,0	27,83	4,45	7,16	7,66	1,72	0,24	1,40
60	40,0	29,57	6,13	10,43	11,93	1,94	0,29	1,48
C. A=		0,3199	C.R. =		0,9476			

OBS: Isc (t) = valores de corrente de curto-circuito a cada instante “t”.

M = Valores médios de Isc a cada intervalo temporal “T”.

S = Desvio padrão de Isc, a cada intervalo “T”.

Isc – M = diferença de Isc em relação à média “M “ à cada instante “t”.

R = diferença máxima de Isc em relação à média no intervalo temporal “T”.

R/S = razão entre R e S a cada intervalo “T”.

Log R/S = logaritmo natural da razão R/S

Log T/2 = logaritmo natural de T/2

C. A. = Coeficiente angular de um processo de regressão linear = Coeficiente de Hurst

C. R.= Coeficiente de regressão linear.

8.2. Publicações geradas a partir dos estudos pertinentes aos objetivos do presente trabalho

8.2.1 Trabalhos completos e em preparação

1. ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J.; SOARES, A. M.; JIMENEZ, G. C.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M.; Supernatantes from Macrophages Stimulated with Microcystin-LR Induce Electrogenic Intestinal Response in Rabbit. **Pharmacology & Toxicology**, 87 (1): 46-51, 2000.
2. JIMENEZ, G. C.; ROCHA, M. F. G.; BENEVIDES, C. C. M.; TORRES, E. A.; SOARES, A. M.; LIMA, A. A. M. Dinamic analysis of TNF- α and IL-1 β released from macrophages stimulated with microcystin-LR from *Microcystis aeruginosa* and Toxin A from *Clostridium difficile*. (Artigo pronto para ser enviado para publicação).
3. JIMENEZ, G. C.; TORRES, E. A.; BENEVIDES, C. C. M.; ROCHA, M. F. G.; SOARES, A. M.; LIMA, A. A. M. Kinetic study of Na⁺ intestinal co-transport induced by glucose, glutamine, alanine and n-acetilglutamine in rabbit ileum mucosa mounted in voltage clamp system. (Artigo pronto para ser enviado para publicação).

8.2.2 Resumos apresentados em Congressos Nacionais e Internacionais.

1. JIMENEZ, G. C.; BENEVIDES, C. C. M.; ROCHA, M. F. G.; LIMA, A. A. M. Evaluation of the release dynamics of TNF and IL-1 β in supernatants from macrophages stimulated with microcystin – LR of *Microcystis aeruginosa* or Toxin A of *Clostridium difficile*. In. Latin-American Congress of Pharmacology. Aguas de Lindoia, SP.B on 13 to17, set.16:, **Resumos**, 16: 17087, 2000.
2. BENEVIDES, C. C. M.; JIMENEZ, G. C.; ROCHA, M. F. G.; LIMA, A. A. M. Participation of proteic mediators and lipidic derivates in intestinal secretory effects induced by supernatant of macrophages stimulated with microcystin-LR. Congress of Pharmacology. Aguas de Lindoia, SP.B on 13 to17, set.16:, **Resumos**, 16: 17088, 2000.
3. JIMENEZ, G. C.; BENEVIDES, C. C. M.; ROCHA, M. F. G.; LIMA, A. A. M. Intestinal secretory effects of supernatant from macrophages stimulated with microcystin-LR: Kinetic of dose-response employing Hurst Analysis. Congress of Pharmacology. Aguas de Lindoia, SP.B on 13 to17, set.16:, **Resumos**, 16: 17133, 2000.
4. JIMENEZ, G. C.; BENEVIDES, C. C. M.; ROCHA, M. F. G.; LIMA, A. A. M. Kinetic study of Na⁺ intestinal co-transport incuced by glucose, glutamine and alanine in rabbit ileum mucosa mounted in voltage clamp system. Congress of Pharmacology. Aguas de Lindoia, SP.B on 13 to17, set.16: **Resumos**, 16: 22009, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)