



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGBiotec**

FRANCISCA BEATRIZ DE MELO SOUSA

**EFEITO ANTISSECRETÓRIO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO NA DIARREIA
INDUZIDA PELA TOXINA DO *Vibrio cholerae* EM CAMUNDONGOS: EVIDÊNCIA
DE NÃO ENVOLVIMENTO DA VIA ADENILATO CICLASE/AMP_c/PKA E AMPK.**

**PARNAÍBA – PI
2016**

FRANCISCA BEATRIZ DE MELO SOUSA

EFEITO ANTISSECRETÓRIO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO NA DIARREIA INDUZIDA PELA TOXINA DO *Vibrio cholerae* EM CAMUNDONGOS: EVIDÊNCIA DE NÃO ENVOLVIMENTO DA VIA ADENILATO CICLASE/AMPc/PKA E AMPK.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBiotec da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Farmacologia
Molecular Aplicada à Biotecnologia.

Orientador: Jand Venes Rolim Medeiros

PARNAÍBA – PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

S725e Sousa, Francisca Beatriz de Melo.
Efeito antissecretório do sulfeto de hidrogênio na diarreia induzida pela toxina do *Vibrio cholerae* em camundongos: evidência de não envolvimento da via Adenilato Ciclase/AMPC/PKA E AMPK [manuscrito] / Francisca Beatriz de Melo Sousa. – 2016.
104 f.: il. color.

Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.

1. Cólera. 2. Diarreia. 3. Secreção Intestinal. 4. Sulfeto de Hidrogênio. 5. Biotecnologia. 6. Mediador Gasoso. I. Título.

CDD: 616.9

FRANCISCA BEATRIZ DE MELO SOUSA

EFEITO ANTISSECRETÓRIO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO NA DIARREIA INDUZIDA PELA TOXINA DO *Vibrio cholerae* EM CAMUNDONGOS: EVIDÊNCIA DE NÃO ENVOLVIMENTO DA VIA ADENILATO CICLASE/AMPc/PKA E AMPK.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBiotec da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

APROVADA EM ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros – UFPI (Presidente)

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares – UFC (Examinador Externo ao Programa)

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza – UFC (Examinador Externo ao Programa)

PARNAÍBA – PI
2016

Dedico,

À Deus e minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora por todas as oportunidades que tem me dado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros, pela oportunidade em ingressar na pós-graduação, por acreditar em mim e aceitar me orientar. Agradeço pelo tempo dedicado à orientação e correção do trabalho. Agradeço a você por me ensinar o caminho da pesquisa, pela paciência, dedicação e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos professores do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia pela exímia dedicação à docência. Agradeço de forma especial aos professores Dr. Jefferson Soares de Oliveira e Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras, pela colaboração na realização do trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) da UFPI por disponibilizar os animais necessários a realização dessa pesquisa.

A minha família, Pompéia Olímpio, Raimundo Francisco, Jesus Olímpio, Fábio Sousa, Flávio Sousa, Thiago Sousa e Kaéllyta Lima, pelos ensinamentos, dedicação e amor a mim conferidos. Obrigado por sempre acreditarem em mim e por permitirem a realização desse objetivo, pois sem vocês eu nada seria.

A todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia Farmacológica Experimental (LAFPEX), em especial os que me receberam muito bem quando tive a oportunidade de ingressar no laboratório: Nathalia Carvalho, Camila Brito, Maisa Santos, Irismara Sousa Silva, Samara Damasceno, Renan Oliveira, Valdelânia Gomes e Lucas Nicolau. Aos demais membros pela ajuda nos experimentos, pela troca de conhecimentos e amizade: Simone de Araújo, Ana Patrícia de Oliveira, José Júnior, Bruno Iles, Gabriella Pacheco, Matheus Sombra, Caroline Brandão, Mariana Kalenna, André Fernandes, Elenice Monte, Fabiana Moura, Kerolayne Nogueira, Dvison Pacífico, Monique Campos, Ana Leódido, Vanessa Meneses, Douglas Costa, Thiago Lopes, Nayara Alves e Luan Kelves.

Ao Renan Oliveira e Lucas Nicolau pela contribuição nos estudos de imunohistoquímica;

Aos meus amigos Camila Brito, Irismara Sousa, Antônio Carlos, Rafaela Muniz, Thamyres Cristhina, Fabiana Moura, Jéssica Brito e Susi Brito pelos laços de amizade construídos, pelo incentivo e compreensão nos momentos em que fui ausente. Em especial a Irismara Sousa pela cumplicidade e ensinamentos vividos tão intensamente nesses últimos meses de produção científica. À Fabiana Moura pelo companheirismo e bons conselhos;

Ao Mikhail Fonseca pelo carinho e companheirismo na etapa final da realização desse trabalho;

Aos amigos da 5ª turma de mestrado em Biotecnologia e da 2ª turma de mestrado em Ciências Biomédicas, em especial a Márcia Perfeito, Diva Magalhães, Stefany Guimarães e Mariana Costa pela amizade, estímulo, aconselhamentos e momentos divertidos;

Aos funcionários da Universidade Federal do Piauí (UFPI), campus de Parnaíba, seu corpo docente, direção e administração pela constante dedicação. Em especial ao Cleisson, pela simpatia e pelo excelente trabalho e dedicação na organização do laboratório, Muito obrigada!

Ao Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) da Universidade Federal do Ceará pela colaboração;

Ao CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento do meu projeto de mestrado;

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho e que por ventura não foram citados, por tudo, muito OBRIGADA!

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”

Marcelo Camelo

RESUMO

A cólera é uma doença infecciosa aguda causada pela bactéria *Vibrio cholerae*, que se multiplica rapidamente no intestino humano produzindo a chamada toxina da cólera (TC). A TC causa uma diarreia grave devido a seu efeito direto sobre as células epiteliais intestinais, promovendo nestas uma ativação excessiva da adenilato ciclase (AC) e conseqüentemente um aumento dos níveis intracelulares de AMPc, que culminam com a secreção excessiva de Cl⁻ que é acompanhada pelo movimento osmótico de uma grande quantidade de água para o lúmen intestinal. A solução de reidratação oral é o método mais eficaz para o tratamento da cólera, entretanto este não interfere no mecanismo de ação da TC. Portanto, é de suma importância o estudo sobre o desenvolvimento de fármacos e biomoléculas que possam agir no mecanismo intracelular dessa toxina. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi estudar a atividade antidiarreica do sulfeto de hidrogênio (H₂S) bem como o seu possível mecanismo de ação na diarreia secretória causada pela TC. Inicialmente, a atividade antidiarreica do H₂S foi avaliada no modelo de secreção de fluido em alças intestinais isoladas de camundongos vivos tratadas com a TC. Assim, camundongos Swiss em jejum (24h), foram pré-tratados (v.o), com L-cisteína (10 ou 50 mg/kg) sozinha ou com DL-propargilglicina (PAG 100 mg/kg), NaHS (3 ou 27 µmol/kg), regente de Lawesson's (3 ou 27 µmol/kg) ou salina, e 30 min. depois os animais foram anestesiados, seguido de uma incisão abdominal para isolar uma porção do jejuno (2-3cm). As alças intestinais foram então inoculadas com 100 µl PBS ou TC (1 µg/alça). 4 h após a anestesia, os animais foram eutanasiados e as alças foram removidas para medida da relação g/cm das alças. Amostras teciduais das alças intestinais foram recolhidas para análise dos níveis de H₂S e expressão intestinal de CSE através de imunohistoquímica. O conteúdo intestinal acumulado também foi recolhido para determinação da concentração de íons Cl⁻. Para determinar o papel do H₂S na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera, os animais foram pré-tratados com PAG (100 mg/kg) seguido da administração intraluminal de uma dose submáxima de toxina da cólera (0,5 µg/alça). O efeito da H₂S sob a absorção intestinal também foi avaliado. Para o estudo do mecanismo de ação antidiarreica do H₂S, os camundongos em jejum, foram pré-tratados (v.o) com PAG (100 mg/kg) ou salina. Após 25 min., foi realizado o procedimento da indução da diarreia na alça intestinal, entretanto, antes da administração da TC, os animais em determinados grupos receberam SQ22536 0,01M/alça (inibidor de AC), Bupivacaina 100µM/alça (inibidor de AMPc) ou KT5720 1µg/alça (inibidor de PKA). Para avaliar a participação da AMPK no efeito antissecretório do H₂S, os animais foram tratados, com um ativador ou um inibidor específico da AMPK: AICAR (1mM/alça) e dorsomorfina (30µM/alça), respectivamente. Em seguida foi realizado o procedimento de indução da diarreia na alça intestinal isolada semelhante ao descrito anteriormente. O H₂S por meio da L-cisteína e doadores apresentou atividade antidiarreica reduzindo significativamente a secreção de fluido intestinal e perda de íons Cl⁻ induzida pela TC. Além disso, observou-se que o pré-tratamento com PAG seguido da administração de uma dose submáxima da TC, promoveu um aumento na secreção de fluido intestinal maior que o observado para o grupo tratado apenas com a toxina nessa dose. Esses dados indicam que o H₂S é uma molécula essencial para a proteção contra os efeitos nocivos da TC. Foi observado também que TC induz um aumento da expressão de CSE, assim como da produção de H₂S. Os dados desse trabalho também sugerem que o efeito antissecretório do H₂S não está envolvido com o aumento da absorção intestinal e provavelmente ocorre por um mecanismo independente da via AC/AMPc/PKA e AMPK. Dessa forma, este estudo mostra a relevância da atividade antidiarreica H₂S, e indica que drogas doadoras de H₂S são candidatas promissoras para a terapia da cólera. Porém mais estudos são necessários a fim de elucidar o possível mecanismo de ação do H₂S na diarreia induzida pela TC.

Palavras-chave: mediador gasoso, diarreia, cólera, secreção intestinal, sulfeto de hidrogênio.

ABSTRACT

Cholera is an infectious disease caused by the bacterium *Vibrio cholerae* that multiplies fast in human bowel producing the called cholera toxin (CT). The CT causes severe diarrhea due to its direct effect on intestinal epithelial cells, promoting these excessive activation of adenylate cyclase (AC) and consequently an increase of the intracellular cAMP levels, culminating in excessive secretion of Cl⁻ which is accompanied by the osmotic movement of a large quantity of water into the intestinal lumen. The oral rehydration solution is the most effective method for the treatment of cholera, however this does not interfere with the CT mechanism of action. Therefore, it is extremely important to study on the development of drugs and biomolecules that can act on intracellular mechanism of this toxin. Thus, the objective of this work was to study the antidiarrheal activity of hydrogen sulfide (H₂S) and its possible mechanism of action in secretory diarrhea caused by CT. Initially, the antidiarrheal activity of H₂S was evaluated in fluid secretion model in isolated intestinal loops of live mice treated with CT. Thus Swiss mice fasted (24h) were pretreated (v.o) with L-cysteine (10 or 50 mg/kg) alone or with DL-propargylglycine (PAG 100 mg/kg), NaHS (3 or 27 μmol/kg), Lawesson's reagent (3 or 27 μmol/kg) or saline, and 30 min. later the animals were anaesthetized, followed by abdominal incision to isolate a portion of the jejunum (2-3 cm). The intestinal loops were then inoculated with 100 μl PBS or CT (1 μg/loop). 4 h after anesthesia, the animals were euthanized and the loops were removed for measuring the g/cm ratio of the loops. Tissue samples from the intestinal loops were collected for analysis of levels of H₂S and intestinal expression of CSE by immunohistochemistry. The accumulated intestinal contents was also collected for determination of the concentration of Cl⁻ ions. For determine the role of H₂S in cholera toxin-induced intestinal secretion, the animals were pretreated with PAG (100 mg/kg) followed by the intraluminal administration of a submaximal dose of cholera toxin (0.5 μg/loop). The effect of H₂S in the intestinal absorption was also evaluated. To study the mechanism of action antidiarrheal H₂S, mice fasted were pretreated (v.o) with PAG (100 mg/kg) or saline. After 25 min., was performed diarrhea inducing procedure in the intestinal loop, however, before administration of CT, the animals in certain groups received SQ22536 0.01M/loop (inhibitor AC), Bupivacaine 100 μM/loop (inhibitor of cAMP) or KT5720 1 μg/loop (PKA inhibitor). To evaluate the role of AMPK in the antisecretory effect of H₂S, the animals were treated with an activator or a specific inhibitor of AMPK: AICAR (1 mM/loop) and dorsomorphine (30 μM/loop), respectively. Then it was performed the diarrhea induced in isolated intestinal loop procedure similar to that described above. The H₂S through L-cysteine and donor showed antidiarrheal activity significantly reducing the secretion of intestinal fluid and loss of Cl⁻ ions induced by CT. Besides was observed that the pre-treatment with PAG followed by the administration of a submaximal dose of CT promoted an increase in intestinal fluid secretion higher than that observed for the group only treated with the toxin at this dose. These data indicate that H₂S is an essential molecule for protection against the damaging effects of CT. It has also been observed that CT induces an increase in CSE expression as well as H₂S production. This work data also suggest that the effect of H₂S antisecretory is not involved with the increase of intestinal absorption and probably occurs by a independent mechanism of pathway AC/cAMP/PKA and AMPK. Thus, this study shows the importance of antidiarrheal activity H₂S, and indicates that H₂S donor drugs are promising candidates for cholera therapy. However more studies are needed to elucidate the possible mechanism of action of H₂S on diarrhea induced by CT.

Keywords: gaseous mediator, diarrhea, cholera, intestinal secretion, hydrogen sulfide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arquitetura tecidual do intestino delgado.	19
Figura 2. Mecanismos de transporte intestinal.	20
Figura 3. Casos de cólera notificados à OMS por ano e por continente: 1989-2014.	29
Figura 4. Mecanismo de ação da toxina da cólera (TC).	31
Figura 5. Ativação do Sistema Nervoso entérico pela Toxina da Cólera.	34
Figura 6. Vias de biossíntese de H ₂ S endógeno.	39
Figura 7. Representação esquemática do delineamento experimental realizado.	47
Figura 8. Indução da diarreia pela TC através do modelo de alça intestinal isolada.	49
Figura 9. Grupos experimentais para estudo do efeito antissecretório do H ₂ S na diarreia induzida pela enterotoxina bacteriana do <i>Vibrio cholerae</i>	50
Figura 10. Grupos experimentais para estudo do envolvimento da Adenilato Ciclase (AC), AMPc e Proteína Quinase A (PKA) no efeito antissecretório do H ₂ S.	54
Figura 11. Grupos experimentais para estudo do envolvimento da Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no efeito antissecretório do H ₂ S.	56
Figura 12. Efeito do sulfeto de hidrogênio na diarreia induzida pela enterotoxina bacteriana do <i>Vibrio cholerae</i> em camundongos.	59
Figura 13. Efeito do PAG sobre a secreção de fluido intestinal induzida por um dose submáxima da toxina da cólera	60
Figura 14. Efeito do sulfeto de hidrogênio sobre os níveis de cloreto presentes em alças intestinais isoladas de camundongos inoculadas com TC.	61
Figura 15. Efeito do sulfeto de hidrogênio na absorção intestinal.	62
Figura 16. Imunohistoquímica para cistationina- γ -liase (CSE) no intestino delgado de camundongos normais ou tratados com toxina do <i>V. cholerae</i>	63

Figura 17. Níveis de H ₂ S no intestino delgado de camundongos tratados com PBS ou toxina do <i>V. cholerae</i>	64
Figura 18. Papel da AC, AMPc e PKA no efeito antissecretório do sulfeto de hidrogênio na diarreia induzida pela enterotoxina bacteriana do <i>V. cholerae</i> em camundongos.....	66
Figura 19. Papel da AMPK no efeito antissecretório do sulfeto de hidrogênio na diarreia induzida pela enterotoxina bacteriana do <i>V. cholerae</i> em camundongos.....	68
Figura 20. Diagrama esquemático representativo do efeito do Sulfeto de hidrogênio na diarreia induzida pela toxina da cólera (TC)	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 3-MST** – 3 Mercaptopiruvato sulfurtransferase
- 5-HT** – Serotonina
- AC** – Adenilato ciclase
- ACh** – Acetilcolina
- ADPR** – Adenosina difosfato ribose
- AINEs** – Antiinflamatórios não esteroidais
- AMPc** – Monofosfato cíclico de adenosina
- AMPK** – Proteína quinase dependente de adenosina monofosfato
- ANOVA** – Análise de Variância
- BSA** – Albumina bovina
- CaCCs** – Canais de Cl⁻ ativado por Ca²⁺
- CAT** – Cisteína amino-transferase
- CBS** – Cistationina β-sintase
- CFTR** – Regulador de condutância transmembrana da fibrose cística
- COX- 2** – Ciclooxigenase 2
- CSE** – Cistationina γ-liase
- DAO** – D-aminoácido oxidase
- Dorso** – Dorsomorfina
- EPM** – Erro padrão da média
- GM1** – Monosialogangliosídeo
- GMPc** – Monofosfato cíclico de guanosina
- IL-1β** – Interleucina- 1beta
- IL-8** – Interleucina 8
- iNOS** – NO sintase induzível
- KATP** – Canais de potássio sensíveis ao ATP
- Law.** – Reagente de Lawesson's
- NAD** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NF-KB** – Factor nuclear kappa B
- NT** – Neurotensina
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- PAF** – Fator de ativação de plaquetas

PAG – DL-propargilglicina
PBS – Tampão fosfato-salina
PDE – Fosfodiesterase
PKA – Proteína quinase A
PKC – Proteína quinase C
PLP – Piridoxal 5'-fosfato
Sal – Salina/ Soro Fisiológico
SNE – Sistema nervoso entérico
SOR – Solução oral de reidratação
SP – Substância P
TC – Toxina da cólera
TNF- α – Factor de necrose tumoral
TRPA1 – Receptor de potencial transitório A1
TRPV1 – Receptor potencial transiente de vanilóide do tipo 1
UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância
UTP – Trifosfato de Uridina
v.o – via oral
VIP – Polipeptídeo intestinal vasoativo
V. cholerae. – *Vibrio cholerae*

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1. Intestino Delgado: estrutura anatomofuncional.....	18
2.2. Fisiologia do Transporte Intestinal de íons	19
2.2.1. Absorção Intestinal	20
2.2.2. Secreção Intestinal	21
2.3. Diarreia	23
2.3.1. Classificação da diarreia.....	25
2.5. A Cólera.....	27
2.5.1 Epidemiologia da cólera	28
2.5.2 Fisiopatologia da cólera.....	30
2.5.3. Tratamento da Cólera	34
2.6. Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S): Síntese e metabolismo	37
2.6.1. Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S): Ações Fisiológicas	40
2.6.2 Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S): Possível Mecanismo de Ação	42
3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo Geral	44
3.2. Objetivos Específicos	44
4. METODOLOGIA	45
4.1. Drogas e Reagentes	45
4.2. Animais.....	45
4.3. Considerações Éticas	45
4.4. Delineamento experimental.....	46
4.5. Estudo da ação antissecretória do H ₂ S.....	48
4.5.1. Estudo do efeito antissecretório do H ₂ S na diarreia induzida pela enterotoxina bacteriana do <i>Vibrio cholerae</i>	48
4.5.2. Efeito do PAG sobre a secreção de fluido intestinal utilizando um dose submáxima da toxina da cólera	50

4.5.3. Avaliação do efeito do H ₂ S sobre a secreção intestinal de íons Cl ⁻ provocada pela toxina do <i>Vibrio cholerae</i>	51
4.5.5. Avaliação da influência do H ₂ S sobre a absorção intestinal de fluido	51
4.5.6. Imunohistoquímica para Cistationina γ -liase (CSE).....	52
4.5.7. Determinação dos níveis de Sulfeto de hidrogênio no Tecido Intestinal	53
4.6. Estudo do mecanismo de ação antissecretória do H ₂ S	53
4.6.1. Papel da Adenilato Ciclase (AC), AMPc e Proteína Quinase A (PKA) no efeito antissecretório do H ₂ S	53
4.6.2. Papel da Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no efeito antissecretório do H ₂ S.....	55
4.7. Dados e análise estatística	57
5. RESULTADOS	58
5.1. Estudo da ação antissecretória do H ₂ S	58
5.1.1. Efeito antissecretório do H ₂ S na diarreia induzida pela enterotoxina bacteriana do <i>Vibrio cholerae</i> em camundongos	58
5.1.2. Efeito do PAG na dose submáxima da toxina da cólera.....	60
5.1.3. Efeito do H ₂ S sobre a secreção intestinal de íons Cl ⁻ provocada pela toxina do <i>Vibrio cholerae</i>	61
5.1.4. Efeito da H ₂ S na absorção intestinal	62
5.2. Avaliação imunohistoquímica para cistationina- γ -liase (CSE) no intestino delgado de camundongos tratados com PBS ou toxina do <i>V. cholerae</i>	63
5.3. Avaliação dos níveis de H ₂ S no intestino delgado de camundongos tratados com PBS ou toxina do <i>V. cholerae</i>	64
5.4. Estudo do mecanismo de ação antissecretório do H ₂ S	65
5.4.1. Papel da Adenilato Ciclase (AC), AMPc e Proteína Quinase A (PKA) no efeito antissecretório do H ₂ S	65
5.4.2. Papel da Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no efeito antissecretório do H ₂ S	67
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
Anexos	103

1. INTRODUÇÃO

No trato gastrointestinal muitos fatores contribuem para sua defesa. Dentre esses fatores, a secreção de fluido e eletrólitos pelo intestino contribui para a lubrificação da superfície de seu epitélio, garantindo assim sua proteção contra o dano físico que o alimento poderia causar durante sua passagem por todo o comprimento intestinal. A secreção de fluido intestinal envolve uma série de canais e transportadores que culminam com o transporte de Cl^- do sangue para o lúmen intestinal. Alterações nesse processo envolvendo o aumento da secreção e diminuição da absorção intestinal leva ao desenvolvimento da chamada diarreia secretória (PARIWAT et al., 2008; TRADTRANTIP; KO; VERKMAN, 2014).

A diarreia secretória é a principal causa de mortalidade infantil em todo o mundo e uma das principais causas de mortalidade infecciosa, com cerca de 5 milhões de mortes anualmente. Esse tipo de diarreia é prevalente em países em desenvolvimento, com 1,7 bilhões de episódios de diarreia a cada ano, que resultam na morte de um número estimado de 580.000 crianças menores de 5 anos. Nos países desenvolvidos, a diarreia secretória está associada a uma morbidade significativa (THIAGARAJAH et al., 2004; LAMBERTI et al., 2014; GRIGGS et al., 2016).

Diferentes fatores infecciosos e não infecciosos podem contribuir para o desenvolvimento da diarreia secretória. Dentre as causas infecciosas, muitas bactérias podem levar ao desenvolvimento dessa diarreia pela produção de enterotoxinas que interferem nos mecanismos de secreção intestinal de fluido e eletrólitos. Duas das principais bactérias causadores da diarreia secretória infecciosa em humanos são a *Escherichia coli* toxigênica e *Vibrio cholerae* (THIAGARAJAH et al., 2004).

O *Vibrio cholerae* é o agente causador da cólera, uma doença infecciosa intestinal aguda, caracterizada por um diarreia líquida e intensa, com aspecto de “água de arroz”, vômitos e câibra nas pernas. Apesar dos avanços quanto a prevenção, controle e tratamento, a cólera continua sendo um importante problema de saúde pública em países em desenvolvimento com populações sem acesso a água e saneamento. A cada ano estima-se que ocorra cerca de 3-5 milhões de casos de infecção por cólera (HARRIS et al., 2012; BARATI et al., 2015; POSNY et al., 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde em 2014, um total de 42 países de todos os continentes relataram 190.549 casos de cólera, entretanto, o verdadeiro número de casos é conhecido por ser muito maior que o valor notificado (KOPIC; GEIBEL, 2010; SHRESTHA et al., 2015).

Fisiopatologicamente o principal fator de virulência responsável pela desidratação características observada durante a cólera, é a toxina da cólera (TC), secretada pelo *V. cholerae* no intestino delgado durante a sua infecção. A toxina da cólera causa um diarreia grave devido a seu efeito direto sobre as células epiteliais intestinais, por promover nestas a ativação excessiva da adenilato ciclase (AC) e conseqüentemente um aumento dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (WANDS et al., 2015). O aumento intracelular de AMPc resulta na ativação da proteína quinase A (PKA), que medeia a fosforilação do receptor regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR), provocando uma secreção excessiva de Cl^- que é acompanhada pelo movimento osmótico de uma grande quantidade de água para o lúmen intestinal. A perda de fluido por vezes é rápida e intensa, podendo levar ao óbito dos pacientes caso não tratados (MOON et al., 2015).

Basicamente o tratamento da cólera consiste na administração de uma solução de reidratação oral (SRO) por promover a absorção de fluido intestinal e manter a hidratação. Esse tratamento surgiu a partir da descoberta de que glicose fisiologicamente estimula a absorção de Na^+ por um mecanismo independente do aumento de AMPc (FLACH et al., 2007; CHENG 2016). Embora a SRO seja a melhor medida terapêutica recomendada pelas diretrizes da OMS e UNICEF e tenha causado uma redução da mortalidade em cerca de quatro vezes nas últimas 3 décadas, a sua eficácia é limitada, particularmente nos jovens e idosos, pois a administração de fluidos por si só não proporciona um alívio dos sintomas, não elimina a infecção pelo *V. cholerae* e não interfere no mecanismo de ação de sua toxina (TRADTRANTIP; KO; VERKMAN, 2014; GRIGGS et al., 2016). Baseado nestes fatores não há atualmente nenhuma terapia eficaz ou medicamento disponível para o tratamento da cólera.

Assim, acredita-se que uma terapia eficaz para o entendimento e tratamento da cólera poderia ser conseguida investigando os mecanismos que contribuem para o aumento da secreção de íons e água ou buscando moléculas sinalizadoras que inibiriam este efeito. Entre as moléculas importantes que possuem várias funções fisiológicas e fisiopatológicas no trato gastrointestinal se destacam os mediadores gasosos, como o óxido nítrico (NO), o monóxido de carbono (CO) e o sulfeto de hidrogênio (H_2S) (WALLACE; WANG, 2015; HARTLE; PLUTH, 2016). Entre esses mediadores, estudos têm demonstrado que o H_2S , possui importantes efeitos biológicos no epitélio intestinal, microcirculação local e no processo inflamatório, além de promover alterações na musculatura lisa gastrointestinal (FIORUCCI et al., 2006; SIVARAJAH et al., 2009; POLHEMUS; LEFER, 2014). Em adição, dados recentes demonstram que H_2S possui efeito inibitório sobre a via da adenilato ciclase/AMPc e promove a ativação da proteína

quinase dependente de adenosina monofosfato (AMPK), uma importante proteína reguladora de secreção intestinal, fatores indicativos de que esse mediador gasoso pode possuir efeitos benéficos nos tipos de diarreias que envolvem o aumento de AMPc (YANG et al., 2014; LI et al., 2015; SUN et al., 2015; XIE et al., 2015; LIU et al., 2016). Neste contexto, o presente estudo, objetivou avaliar o potencial efeito protetor do H₂S na doença diarreica secretória induzida pela enterotoxina do *V. cholerae* bem como os possíveis mecanismos envolvidos neste efeito, e mostra-se de extrema relevância, pois poderá conduzir ao desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento desta doença.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Intestino Delgado: estrutura anatomofuncional

O intestino delgado é uma parte do tubo digestório médio, situado entre o estômago e o intestino grosso, que mede aproximadamente 6 metros de comprimento e 2,5 a 3 cm de diâmetro. O intestino humano constitui a maior área de superfície do corpo e consiste na barreira mais importante que está exposta e interage com o ambiente externo e interno, característica importante para o aumento da absorção dos componentes alimentares e para a regulação do sistema imune. A parede intestinal é composta por quatro camadas; a camada mais interna, chamada de mucosa, seguida pela submucosa, a muscular e a serosa (SALIM; SODERHOLM, 2011; KIELA; GHISHAN, 2016).

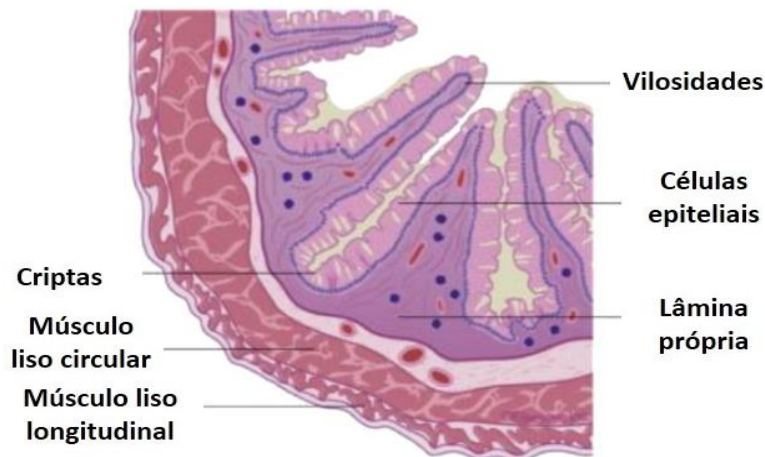
A mucosa intestinal é composta por uma camada simples de células epiteliais intestinais e a lâmina própria. O epitélio separa o ambiente externo do interno e assim atua prevenindo que microrganismos patogênicos, bem como substâncias nocivas no lúmen, ganhem acesso ao corpo. O epitélio intestinal é formado principalmente por enterócitos, células que apresentam um número de adaptações especializadas para lhes garantir proteção, tais como a formação de junções celulares que vedam os espaços paracelulares e na sua superfície livre microvilos, que são chamados de borda em escova, seguido de outros tipos celulares como os linfócitos intraepiteliais, as células M, as células de Paneth, células enterocromafins e as células caliciformes (MCKAY, 2005).

A arquitetura do intestino delgado é composta por uma única camada de epitélio colunar que contém células terminalmente diferenciadas em vilosidades contíguas e criptas. As vilosidades correspondem a porção do epitélio que se estendem para o lúmen intestinal e as criptas são invaginações epiteliais na mucosa do intestino (Figura 1). Funcionalmente os enterócitos das vilosidades são células responsáveis pela maior parte da absorção intestinal, enquanto que os enterócitos da cripta são células responsáveis pela secreção intestinal. (THIAGARAJAH; VERKMAN, 2003; SCOVILLE et al., 2008).

A maior parte da absorção de nutrientes ocorre no intestino delgado, ao passo que o cólon é principalmente responsável pela absorção de água e eletrólitos. O trato gastrointestinal é responsável pelo tratamento de cerca de 8 a 10 litros de líquido contendo aproximadamente 800 mmol de sódio (Na^+), 700 mmol de cloreto (Cl^-), e 100 mmol de potássio (K^+) que passam através do lúmen intestinal todos os dias. A maior parte do transporte destes fluidos e eletrólitos

ocorre através do intestino delgado, deixando aproximadamente 1,5 litros para o cólon absorver e cerca de 100 mL é perdido através das fezes por dia (KIELA; GHISHAN, 2016).

Figura 1. Arquitetura tecidual do intestino delgado.



Fonte: Adaptado de Barrett (2014)

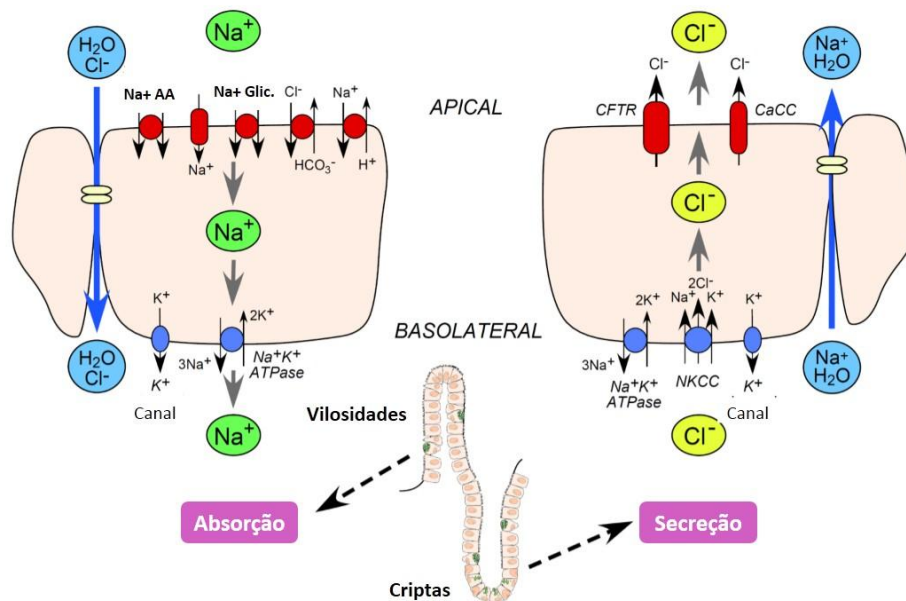
2.2. Fisiologia do Transporte Intestinal de íons

A mucosa intestinal é um epitélio complexo que possui mecanismos de absorção e secreção de água e eletrólitos, sendo que a maior absorção desses elementos ocorre no intestino delgado. O movimento da água pelo epitélio, ou seja, o transporte de fluidos no intestino, como em outros epitélios, ocorre secundário ao transporte ativo de sais em resposta aos gradientes osmóticos criados pela absorção de solutos, particularmente o Na^+ . O jejuno é a área mais permeável do intestino delgado e, conseqüentemente, mudanças rápidas na osmolalidade luminal ocorrem durante a passagem e digestão dos alimentos nesta porção. O mais importante mecanismo de absorção se dá por meio do co-transporte de sódio acoplado a substratos orgânicos, tais como glicose, galactose, aminoácidos e tripeptídeos. O íleo é menos permeável à água, embora a absorção de sódio e substratos orgânicos ocorra da mesma forma que no jejuno (WHYTE; JENKINS, 2012). Anatomicamente a absorção e a secreção intestinal ocorrerem ao longo do eixo cripta-vilosidade, com absorção predominando nas vilosidades e secreção nas criptas (THIAGARAJAH; VERKMAN, 2003).

2.2.1. Absorção Intestinal

A maior absorção de fluidos no intestino delgado, ocorre nos enterócitos das vilosidades, onde estão presentes em suas microvilosidades múltiplos transportadores de íons (Figura 2). Os principais transportadores relacionados ao processo de absorção consistem nos canais de co-transporte de Na^+ que promovem o acoplamento deste a um soluto orgânico, como a glicose. O acoplamento de Na^+ permite que o soluto orgânico seja transportado contra o seu gradiente de concentração, ou seja, a partir de sua baixa concentração luminal para uma concentração superior nas células, um gradiente oposto ao de Na^+ . Os solutos orgânicos em seguida, passam do enterócito para o sangue através de transportadoras de membrana basolaterais que operam independente do movimento de íons. O gradiente de Na^+ , por conseguinte, é a força motriz para a absorção de aminoácidos, oligopeptídeos e açúcar. Como estes solutos orgânicos são absorvidos, o Na^+ é absorvido com eles, e a água segue por osmose (MELVIN et al., 1999; KIELA; GHISHAN, 2016).

Figura 2. Mecanismos de transporte intestinal.



A Absorção de fluido ocorre principalmente nas células epiteliais das vilosidades e envolve co-transportadores de Na^+ na membrana apical (Na^+ e aminoácidos - Na^+/AA ; Na^+ e glicose - $\text{Na}^+/\text{GLic.}$), contratransportadores de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$; Na^+/H^+ e a bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$. A absorção de H_2O e Cl^- ocorre no espaço intercelular entre as membranas laterais dos enterócitos. A secreção de fluido ocorre principalmente nas células epiteliais das criptas e envolve os canais de Cl^- apicais, CFTR e CaCC, intracelularmente os níveis de Cl^- são mantidos pelo transportador NKCC impulsionado pela bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ e canais K^+ . A secreção de H_2O e Na^+ ocorre no espaço intercelular entre as membranas laterais dos enterócitos. Fonte: Adaptado e modificado de Thiagarajah e Verkman (2013).

No citoplasma destas células, o Na^+ é transportado para o sangue por meio da bomba de Na/K-ATPase localizada na membrana basolateral, que utiliza a energia a partir da hidrólise do ATP para conduzir a extrusão de Na^+ e entrada de K^+ na proporção estequiométrica de 3:2, ambos movendo-se contra seus gradientes eletroquímicos. Nestas células também há transportadores dos íons H^+ e HCO_3^- , produzidos através da ação da enzima intracelular anidrase carbônica, para então serem liberados do enterócito em troca de Na^+ e Cl^- . A absorção de H_2O e Cl^- ocorre no espaço intercelular entre as membranas laterais dos enterócitos em decorrência do gradiente osmótico criado pela absorção de Na^+ . Os transportadores de solutos são constitutivamente ativos, embora possam ser modulados por segundos mensageiros, incluindo AMPc e Ca^{2+} . No cólon, a absorção é também facilitada no epitélio pelo canal de Na^+ e transportadores de ácidos graxos de cadeia curta (FIELD, 2003).

2.2.2. Secreção Intestinal

Cerca de 8 L de fluido são secretados diariamente no trato intestinal humano. Embora este volume também consista em secreção gástrica, pancreática e sais biliares, o intestino delgado contribui significativamente para essa quantidade com a secreção de água. A maior parte deste volume é reabsorvida durante sua passagem pelo intestino, deixando apenas pequenos traços de água nas fezes. (MUREK et al., 2010). Essa secreção de fluido intestinal fornece um ambiente ideal para a digestão enzimática e facilita a passagem das fezes através do trato intestinal, além de proteger as células epiteliais de estresses mecânicos que poderiam ocorrer durante a passagem do bolo fecal (BARRETT; KEELY, 2000).

A maior secreção de fluidos no intestino delgado ocorre nas criptas, sendo impulsionada pelo transporte de Cl^- para a porção apical dos enterócitos através do canal de ânion apical chamado CFTR. (Figura 2). Nestas células os níveis de Cl^- intracelular são mantidos pelo transportador de membrana basolateral NKCC, responsável pelo co-transporte de $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, facilitando o movimento acoplado destes íons através da membrana basolateral. A diminuição de Cl^- na célula é seguida pela abertura do canal CFTR, bem como permite a entrada desses três íons através do canal NKCC. A atividade desse co-transportador é impulsionada pelos gradientes de concentração de Na^+ e Cl^- produzidos pela bomba de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ e canais de K^+ basolaterais. O gradiente eletroquímico dirige a secreção de Cl^- em toda a membrana apical das células através do canal CFTR, bem como os canais de Cl^- ativado por Ca^{2+} (CaCCs). Enquanto isso ocorre, a secreção paracelular de Na^+ segue, criando um gradiente osmótico para

a secreção de água (KUNZELMANN et al., 2001). O AMPc via proteína quinase A (PKA), estimula a secreção ativando ou reforçando as atividades dos canais CFTR, canal de K^+ basolateral e o co-transportador de NKCC na membrana basolateral (SHEPPARD; WELSH, 1999; FIELD, 2003).

Uma variedade de estímulos podem causar a secreção Cl^- nos enterócitos. Por exemplo, vias neuronais secretoras causam a libertação de serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) a partir de células enterocromafins, o que resulta na ativação de neurônios colinérgicos que culminam com a produção do peptídeo intestinal vasoativo (VIP), que ativa células da cripta, aumentando assim a secreção intestinal, pelo aumento de AMPc e Ca^{2+} nestas células. Mediadores inflamatórios, tais como prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas, fator ativador de plaquetas, histamina e serotonina, o peptídeo ativo guanilina liberado no lúmen intestinal por células caliciformes, acetilcolina, substância P, ATP e UTP são igualmente capazes de induzir a secreção de Cl^- pelos enterócitos (CHANG et al., 1982; FIELD, 2003).

Entre estes compostos citados, intracelularmente o AMPc medeia a ação do VIP, UTP e prostaglandinas (em concentrações elevadas). A ação de Guanilina é mediada pelo GMPc. Para todos os outros (incluindo menores concentrações de prostaglandinas), a ativação de seus receptores aumenta os níveis de Ca^{2+} intracelular que ativam a proteína quinase C (PKC). O aumento de Ca^{2+} abre um canal de K^+ basolateral diferente do canal aberto pelo AMPc (NEILSON et al., 1998). Enterotoxinas bacterianas tais como a toxina da cólera produzida pelo *Vibrio cholerae* e a enterotoxina termoestável da *Escherichia coli* são importantes fatores externos responsáveis pela secreção exacerbada de Cl^- que envolvem múltiplas vias de sinalização convergente (PETRI et al., 2008).

O grupo de compostos que inibem tanto a secreção ativa de Cl^- , bem como de HCO_3^- , e melhoram a absorção inclui a norepinefrina (através de receptores α_2), neuropeptídeo Y, encefalinas, todos os neurotransmissores, e somatostatina (como neurotransmissor ou agente parácrino). Entre os precursores de leucotrienos, o ácido 12-hidroxieicosatetraenóico é anti-secretório, bloqueando o canal de K^+ ativado por Ca^{2+} localizado na membrana basolateral dos enterócitos (ROGGIN et al., 1972).

2.3. Diarreia

A diarreia é o resultado de uma ruptura no equilíbrio delicado entre os processos de absorção e secreção intestinal. Esse acometimento clínico pode ter diferentes significados, no entanto, a maioria dos pacientes consideram as fezes líquidas ou pastosas como a principal característica da diarreia. As definições de diarreia podem incluir alterações na consistência das fezes, aumento do volume e o aumento da frequência da defecação. A massa das fezes considerada normal em adultos é de até 250 g por dia, sendo que, alterações dessa quantidade consiste no critério que realmente define a diarreia. No entanto, a medição do conteúdo das fezes é muitas vezes impraticável, sendo a avaliação da frequência preferida para fins diagnóstico (SCHILLER, 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a diarreia como um aumento no número de evacuações de três ou mais por dia, com um aumento na fluidez das fezes, ou mais frequentemente do que é normal para o indivíduo. Geralmente é um sintoma de infecção gastrointestinal, que pode ser causado por uma variedade de bactérias, vírus e parasitas, sendo a infecção transmitida através de alimentos contaminados ou água potável, ou de pessoa para pessoa, como resultado da falta de higiene (VELÁZQUEZ et al., 2012).

Doenças diarreicas afetam todas as raças, sexos, idades e áreas geográficas, tendo alto impacto sobre a mortalidade e morbidade em todo o mundo, além de ser a segunda principal causa de morte em crianças com menos de cinco anos de idade, sendo responsável pela morte de cerca de 760.000 crianças a cada ano (OMS, 2013). Em relação ao Brasil, as doenças diarreicas possuem maior prevalência nas cidades da região Nordeste, onde atualmente 50% dos casos nacionais estão concentrados e tendo como principal agente etiológico o rotavírus. Índices de mortalidade infantil devido à doença diarreica aguda chegam a 7,8 para cada 100.000 crianças menores que cinco anos, onde grande parte dos casos é subnotificado. Só em 2011, os indicadores de mortalidade mostraram 756 óbitos por doença diarreica aguda, sendo 354 destes na região nordeste e 20 casos no Piauí (BRASIL, 2015). Recentemente, a Secretária de Estado da Saúde do Piauí (Sesapi) registrou oito surtos de diarreia em 2013. Metade registrada só em Teresina, onde apenas 17% da população tem acesso a saneamento básico. Ao todo, foram mais de 100 mil pessoas afetadas, com 126 óbitos. No ano de 2014, os números continuaram alarmantes, sendo registrados 7.279 casos de diarreia no estado, com 105 óbitos (SESAPI, 2015).

Do ponto de vista clínico a maioria dos casos de diarreia, constituem numa desordem funcional conhecida como síndrome do intestino irritável, que é responsável por pelo menos

25% de todas as visitas aos gastroenterologistas (SPILLER, 2016). Fisiologicamente a diarreia é um sinal proveniente da redução da absorção ou uma hipersecreção de água juntamente com um aumento da motilidade intestinal que reduz a solidez das fezes. O aumento da secreção também aumenta a quantidade de água e a fluidez das fezes. Esta mudança na consistência das fezes é devido a um aumento na secreção de Cl^- ou HCO_3^- e uma inibição na absorção de Na^+ e Cl^- (FIELD; SEMRAD, 1993). Se a doença primária causa inflamação ou ulceração da mucosa intestinal, particularmente do intestino grosso ou reto, sangue e muco também podem estar presentes nas fezes. Uma grande variedade de condições, incluindo infecções entéricas, alteração na digestão e absorção dos alimentos, fatores hormonais ou mesmo uma resposta a infecção parenteral pode resultar no sintoma da diarreia (PAWLOWSKI et al., 2009).

Dentre essa variedades de condições, a diarreia de causa infecciosa é uma doença comum que afeta milhões de pessoas anualmente, sendo uma doença autolimitada e constitui uma importante causa de morbidade entre crianças. Seu maior risco é a desidratação. A maioria dos patógenos gastrintestinais é transmitida por alimentos ou bebidas contaminadas com material fecal. Muitos patógenos entéricos, como bactérias, parasitas e vírus têm sido associados aos casos de diarreia em humano, causando doenças, ou estimulando a secreção de fluidos no intestino delgado, ou irritando e invadindo o cólon (THIELMAN; GUERRANT, 2004).

As infecções por bactérias enteropatogênicas causam uma doença gastrintestinal por vários mecanismos. Certas cepas de estafilococos liberam enterotoxinas poderosas enquanto crescem no alimento contaminado e, quando ingeridas, causam sintomas de intoxicação sem qualquer multiplicação bacteriana no trato gastrintestinal. O *Vibrio cholerae* e a *Escherichia coli* toxigênica multiplicam-se dentro da mucosa que recobre o epitélio gastrintestinal e liberam exotoxinas que fazem com que o epitélio intestinal secrete volumes excessivos de líquido levando a diarreia aquosa. A *Salmonella*, *Shigella* e o *Campylobacter* invadem e lesam a mucosa intestinal e a lâmina própria, causando ulceração, inflamação e hemorragia, que clinicamente se manifestam como disenteria. A *Salmonella typhi* pode passar pela mucosa lesada para a corrente sanguínea, resultando em infecção sistêmica (GALE; WILSON 2016; STEFFEN et al., 2015).

O *Clostridium difficile* produz uma enterotoxina, toxina A (308 KDa), e uma citotoxina, toxina B (279 KDa), que causam diarreia e colite em humanos e animais experimentais (KELLY et al., 1994; ROCHA et al., 1998; HENSGENS et al., 2012). A resistência de algumas

bactérias e antibióticos tem crescido, e isto tem causado um efeito limitante sobre as escolhas de tratamento disponíveis para casos de suspeita de diarreia bacteriana (GOODMAN; SEGRETI, 1999).

A maioria dos casos de diarreia infecciosa aguda são devido à infecção por vírus, como o Norovírus e Rotavírus. A diarreia viral é causada pela diminuição da absorção de sódio e água através da luz intestinal, ao contrário das diarreias bacterianas mediadas por toxinas que são causadas por um aumento da secreção pelas células epiteliais (GUERRANT et al., 2001).

Existem várias causas parasitárias de diarreia como *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Entamoeba*, *Microsporídios*, *Strongyloides* e *Giardia* (JUCKETT; TRIVEDI, 2011). *Giardia lamblia* é o parasita mais comum entre os pacientes com diarreia crônica. Este protozoário flagelado resulta em 280 milhões de infecções anualmente e é considerada uma doença tropical negligenciada pela OMS por causa de seu efeito desproporcional sobre as crianças nos países em desenvolvimento (BARTELT, 2015).

2.3.1. Classificação da diarreia

A classificação clínica da diarreia é baseada na sua duração. A diarreia aguda é geralmente autolimitada e tem duração menor que duas semanas. A diarreia que persiste por 14 dias ou mais é classificada como diarreia persistente. Se a duração dos sintomas é maior que um mês, a diarreia é classificada como crônica (MATHAN, 1998).

A diarreia é o resultado final de um desarranjo na fisiologia normal do transporte intestinal de água e eletrólitos. Dessa modo a diarreia pode ser classificada de acordo com o seu mecanismo fisiopatológico em secretora, osmótica, exsudativa e de motilidade alterada. A maioria das etiologias tem uma fisiopatologia complexa envolvendo um ou mais destes mecanismos (VELÁZQUEZ et al., 2012).

A diarreia osmótica é causada pela ingestão de solutos mal absorvíveis de baixo peso molecular. Estes solutos retêm rapidamente a água e, em segundo lugar, os íons no lúmen intestinal, levando a redução da reabsorção de água. Indivíduos com função intestinal normal irão desenvolver diarreia osmótica quando ingerirem grandes quantidades de solutos mal absorvíveis, tais como a lactulose (usada para o tratamento de encefalopatia hepática), sorbitol ou Mg^{2+} (presente em certos antiácidos ou purgantes intestinais) (SCHILLER et al., 2012).

A diarreia osmótica também pode se desenvolver quando um nutriente absorvível é ingerido por um indivíduo que possui um defeito na absorção intestinal, por exemplo, lactose por alguém com deficiência de lactase congênita, ou carboidratos por alguém com doença celíaca. A insuficiência pancreática, pode causar diarreia osmótica de origem colônica, na qual carboidratos e lipídeos não absorvidos, ao chegarem ao cólon, são hidrolisados por bactérias em curtas cadeias de ácidos orgânicos em quantidade que podem sobrecarregar a capacidade do cólon de absorção (FIELD, 2003).

A diarreia exsudativa acontece quando a barreira epitelial intestinal é comprometida pela perda de células epiteliais ou rompimento de suas junções, na qual a pressão hidrostática nos vasos sanguíneos e linfáticos fará com que a água, eletrólitos, muco, proteína, e às vezes até hemácias e leucócitos se acumulem no lúmen intestinal, e pode ocorrer nos casos de colite ulcerativa e infecções por *E. coli.*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campilobacter*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium difficile* e *Entamoeba* (VELÁZQUEZ et al., 2012).

Perturbações da motilidade intestinal também podem levar a diarreia. Esse tipo de diarreia pode ocorrer nos casos de diminuição da motilidade eficaz do intestino delgado, devido a danos no músculo liso, como ocorre nos casos de esclerodermia, dermatomiosite, amiloidose, distrofia muscular, ou danos causados pela radiação ou neuropatia autônoma (diabética ou idiopática) (FIELD, 2003; GOMEZ; PARKMAN 2009).

A diarreia secretória é causada pela superestimulação da capacidade de secreção de água e eletrólitos (cloreto ou bicarbonato) no lúmen intestinal, sendo o efeito final o aumento da secreção e diminuição da absorção intestinal (THIAGARAJAH et al., 2015). Esse tipo de diarreia representa a segunda principal causa de mortalidade no mundo e estima-se que 1,7 bilhões de episódios de diarreia secretória ocorrem a cada ano, resultando na morte de um número estimado de 580.000 crianças com menos de 5 anos de idade, principalmente nos países em desenvolvimento (WALKER et al, 2013; GRIGGS et al., 2016). Há também um carga substancial de morbidade e mortalidade em crianças mais velhas, adolescentes e adultos (LAMBERTI et al., 2014). Os pacientes que sobrevivem a este quadro clínico frequentemente lidam com episódios recorrentes associados com consequências adicionais de longo prazo, tais como aumento da susceptibilidade a infecções, desnutrição e atraso no desenvolvimento mental (GRIGGS et al., 2016). Nos países em desenvolvimento as principais causas de diarreias secretórias incluem bactérias produtoras de enterotoxina como o *Vibrio cholerae* e *E. coli* enterotóxica, rotavírus, e as bactérias enteroinvasivas *Shigella* e *Salmonella* (WALKER et al.,

2013). Nos países em desenvolvimento as diarreias secretórias são principalmente causadas por vírus, tais como rotavírus, embora com o uso generalizado de vacinas contra o rotavírus outros agentes patogênicos, tais como norovírus, têm se tornado cada vez mais predominante (PAYNE et al., 2013).

A maioria das causas de diarreia secretória levam a alterações nos segundos mensageiros através do aumento de AMPc, GMPc ou Ca^{2+} intracelular, no qual alterações nestes mediadores causam o aumento da secreção de Cl^- e inibição da absorção de $Na^+ Cl^-$ no intestino delgado (VELÁZQUEZ et al., 2012).

A diarreia secretória também pode ter causa não-infecciosa, e pode se apresentar como uma alteração secundária de algum distúrbio no organismo, como é o caso de alguns tumores, alterações de neurotransmissores, síndromes congênitas raras ou alterações nos numerosos transportadores responsáveis pelo fluxo constante de íons e água no epitélio intestinal. Tumores como o de ilhotas pancreáticas secretam grandes quantidades de peptídeo intestinal vasoativo (VIP), carcinomas podem sintetizar quantidades consideráveis de serotonina, bradicinina, substância P, prostaglandinas e calcitonina, contribuindo assim, para o aumento da secreção intestinal quando estes chegam a circulação sistêmica. O aumento de neurotransmissores tais como histamina em mastocitose, também representam um aumento de estímulos secretores. A diarreia secretória em resposta a sais biliares e ácidos graxos mal absorvidos também pode ocorrer (VELÁZQUEZ et al., 2012).

2.5. A Cólera

A cólera é uma doença infecciosa intestinal aguda causada pela enterotoxina do *Vibrio cholerae* O1 toxigênico ou O139 (BAKHSHI, 2016). O *Vibrio cholerae* foi primeiro isolado por Koch no Egito e na Índia em 1884 e inicialmente denominado de Kommabazilus (bacilo em forma de vírgula). É um bacilo gram-negativo com flagelo polar, aeróbio ou anaeróbio facultativo, membro da família *Vibrionaceae* (BRASIL, 2008). O *Vibrio cholerae* é classificado em mais de 200 sorogrupos baseado no antígeno S do lipopolissacarídeo. Destes, apenas os sorogrupos O1 e O139 causam epidemias de cólera. O *V. cholerae* O1 possui dois biotipos: o clássico e o El Tor. O biotipo El Tor é menos patogênico que o biotipo clássico, causando mais infecções assintomáticas e tem maior resistência às condições externas (HARRIS et al., 2012).

Nos últimos anos, tem havido várias epidemias de cólera em todo o mundo. A doença também é endêmica em várias áreas da Ásia e África. Como essa doença possui transmissão fecal-oral, a cólera está associada com condições sanitárias precárias. Surto de cólera são, portanto, comuns em catástrofes naturais e em situações de extrema pobreza (SACK et al, 2004). Outro fator que desencadeia o padrão potencial de surtos é o curto período de incubação de 2 horas a 5 dias (OMS, 2015).

A cólera é uma doença de origem hídrica com múltiplos modos de infecção, cuja transmissão pode ser direta e rápida ou indireta e lenta. A cólera pode ser transmitida a partir de um reservatório aquático para hospedeiros humanos através da ingestão de alimentos ou água contaminados. Indivíduos infectados são fontes do patógeno e novas infecções podem surgir tanto da exposição indireta à água contaminada, como da transmissão de pessoa-a-pessoa (TIEN; EARN, 2010).

As manifestações clínicas da cólera ocorrem de variadas formas, desde infecções inaparentes ou assintomáticas, até casos graves e fatais. A desidratação e os distúrbios eletrolíticos são as complicações mais importantes da cólera (KELLY et al, 2016). Os casos graves mais típicos (menos de 10% do total de infecções pelo *V. cholerae*), com perda de até 1 litro de fluido intestinal por hora, pode levar à rápida desidratação, acidose pela perda de bicarbonato nas fezes, acidose láctica associada à má perfusão, choque hipovolêmico e morte nas primeiras horas após os sintomas. As taxas de mortalidade em pacientes com cólera grave, onde as perdas hidroeletrólíticas não foram restabelecidas de forma imediata, pode exceder 70% (BRASIL, 2008).

2.5.1 Epidemiologia da cólera

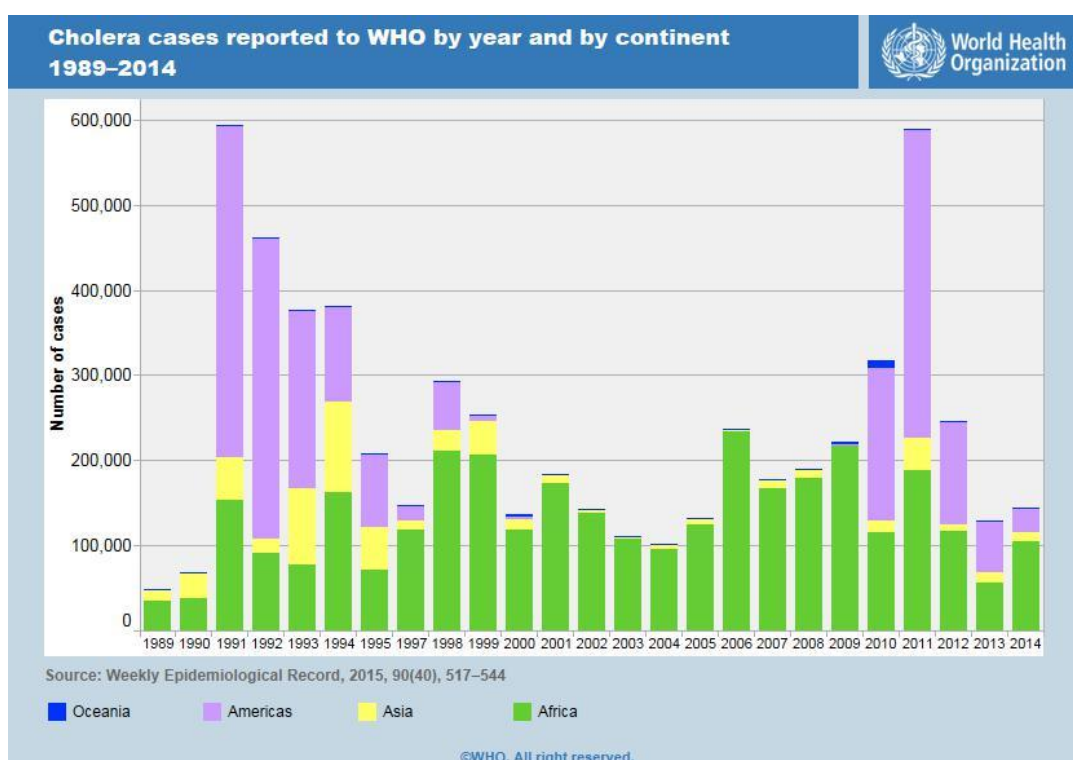
A cólera possui predisposição para causar epidemias com potencial pandêmico assim como capacidade de permanecer endêmica em todas as áreas afetadas. Em ambientes de epidemia, pessoas de todas as idades estão em risco de contrair a infecção, já áreas endêmicas as crianças com mais de 2 anos são as principais afetadas (SILVA, 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde em 2014, um total de 42 países de todos os continentes relataram 190.549 casos de cólera, dos quais 55% foram relatados na África e 15% nas Américas (Figura 3). Ainda segundo a OMS, pesquisas estimam que o número real de infecções sintomáticas anuais pelo *V. cholerae* é muito maior do que o valor notificado, e que na verdade

acoram cerca de 1,4 a 4,3 milhões de casos, e de 28.000 a 142.000 mortes por ano em todo o mundo devido à cólera (KOPIC; GEIBEL, 2010; OMS, 2015).

Fonte: OMS, 2015.

No Brasil, o último surto de cólera teve início em 1991 e foi causado pelo biotipo El Tor. O ápice do número de infectados pela enterotoxina no Brasil ocorreu em 1994, quando

Figura 3. Casos de cólera notificados à OMS por ano e por continente: 1989-2014.



foram registrados 51.324 casos, sendo 49.276 na região nordeste, com maior incidência nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Norte e Alagoas. Entre os anos de 2000 e 2008, ocorreu uma redução significativa no número de casos e óbitos por cólera no Brasil, sendo registrados, nesse período, 766 casos e 20 óbitos. Todos os casos foram registrados na região Nordeste e o estado de Pernambuco liderou o número de registros. Desde 2007 não há registro de casos autóctones de cólera no Brasil, entretanto, considerando-se a ocorrência de casos e surtos em países com relações estreitas com o Brasil tais como Haiti, República Dominicana, e México, considera-se que pode haver risco de reintrodução de cólera por viajantes do exterior, turistas ou trabalhadores brasileiros (EDUARDO; KATSUYA, 2014).

2.5.2 Fisiopatologia da cólera

Após a ingestão do *V. cholerae*, a maior parte das bactérias são mortas pelo ácido gástrico. Os organismos que sobrevivem colonizam o intestino delgado e secretam a toxina da cólera (TC), o maior fator de virulência das cepas patogênicas (WOLF et al., 2008).

A enterotoxina da cólera é uma proteína de massa molecular de 85 kDa, constituída por uma subunidade A de 27,2 kDa, composta pelas subunidades A1 e A2 e uma subunidade B, composta por 5 subunidades B de 11,6 kDa cada (BASU; MUKHOPADHYAY, 2014). A subunidade TC-B é uma lectina pentamérica composta por cinco cadeias polipeptídicas idênticas, que se ligam ao domínio oligossacarídico do receptor de membrana das células epiteliais do jejuno intestinal, o monossialogangliosídeo, GM1 (CHINNAPEN et al., 2007). A subunidade TC-A, que se prolonga bem acima do anel pentamérico, consiste em dois polipeptídeos distintos ligados por uma única ponte dissulfeto. A porção TC-A1 é enzimaticamente ativa e exibe atividade de mono-ADP-ribosiltransferase, envolvida na ADP-ribosilação da proteína Gs dos enterócitos, enquanto a porção TC-A2 funciona como um agente de ligação entre TC-A1 e TC-B (DE HAAN; HIRST, 2004; WERNICK et al., 2010). A porção TC-A2 também desempenha um papel no tráfico retrógrado do complexo de Golgi ao retículo endoplasmático (DAMS; DE WOLF; DIERICK, 1991).

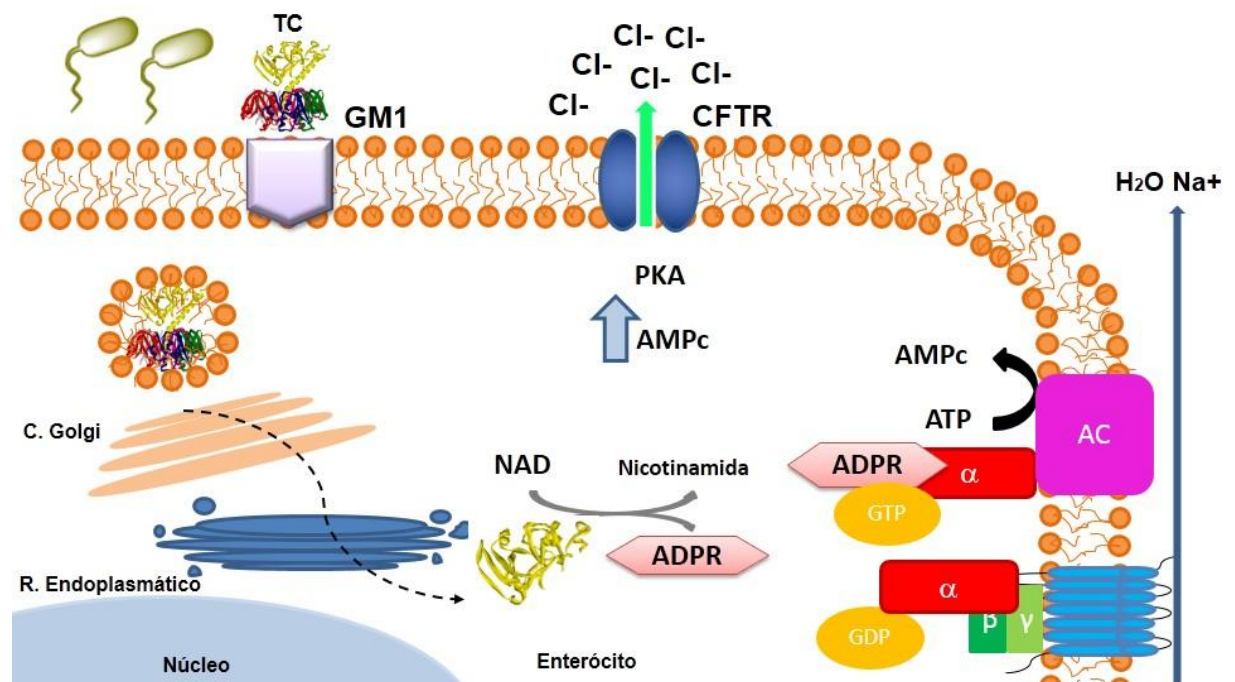
Uma vez presente no intestino delgado, a bactéria *V. cholerae* secreta a sua toxina, que interage com os receptores no epitélio intestinal (WOLF et al., 2008). A secreção de sua toxina, conhecida como toxina da cólera (TC) é acompanhada pela liberação de uma hemaglutinina/protease (HA/protease). Esta HA/protease extracelular é responsável por promover uma modificação pós-traducional entre as subunidades TC-A1 e TC-A2 que estão ligados exclusivamente por uma única ligação dissulfeto. Esta modificação é essencial para a atividade plena da toxina, conduzindo a um aumento na produção de AMPc (BROECK; HORVATH; DE WOLF, 2007).

A toxina inicia sua ação pela ligação com alta afinidade e especificidade ao seu receptor de membrana na porção apical da célula, o GM1 dos enterócitos. Após esta ligação a toxina é ativamente internalizada pela maquinaria da célula hospedeira pelo sistema de endossomas. Subsequentemente, a TC é transportada como uma holotoxina de forma retrógrada para o complexo de Golgi e logo após para o retículo endoplasmático. Neste último, a TC dissocia-se

em porção TC-A1 e um complexo de TC-A2/TC-B. TC-A1 é então retrotranslocada através do complexo proteico Sec61p para o citosol, evitando assim a degradação proteossômica (RODIGHIERO et al., 2002).

Uma vez translocada para o citosol a porção TC-A1 se torna ativa, promovendo a clivagem da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) presente no citoplasma em adenosina difosfato ribose (ADPR) e nicotinamida. Após essa clivagem adenosina difosfato ribose (ADPR) se liga covalentemente a subunidade α da proteína Gs, que tem por função estimular a adenilato ciclase localizada na membrana basolateral dos enterócitos (WANDS et al., 2015). Essa ligação inibe a atividade intrínseca GTPase da subunidade α , impedindo assim, a auto-inativação da sua atividade estimulante da adenilato ciclase. Portanto, a ligação ADPR-Gs α faz com que o GTP permaneça ligado a subunidade α da proteína Gs impedindo a sua reassociação as porções β e γ da proteína Gs. Dessa forma a toxina da cólera, mais especificamente por meio da sua porção TC-A1, promove uma ativação persistente da AC e uma elevação dos níveis de AMPc intracelular (MUANPRASAT; CHATSUDTHIPONG, 2013). O aumento intracelular de AMPc resulta na ativação da PKA, que medeia a fosforilação do receptor regulador de CFTR (Figura 4) (THIAGARAJAH; VERKMAN, 2003).

Figura 4. Mecanismo de ação da toxina da cólera (TC).



A TC inicia sua ação pela ligação ao receptor GM1, que induz a sua internalização e transporte subsequente para o complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Neste último, a TC dissocia-se, em porção TC-A1 e um complexo de TC-A2/TC-B. TC-A1 é então liberada no citosol, promovendo a clivagem de NAD em adenosina difosfato

ribose (ADPR) e nicotinamida. ADPR se liga covalentemente a subunidade α da proteína Gs, inibindo a sua atividade intrínseca GTPase. Consequentemente, ocorre uma ativação persistente da AC e aumento dos níveis de AMPc intracelular, que ativam a PKA e medeia a fosforilação do canal CFTR, ocasionando uma secreção excessiva de Cl^- acompanhada pelo movimento osmótico de uma grande quantidade de água. Fonte: A autoria própria.

O canal CFTR é um canal de Cl^- expresso na membrana apical de células epiteliais que revestem vários órgãos, incluindo o intestino, e tem um papel crítico no transporte transepitelial de cloreto e secreção de fluido intestinal (FIELD, 2003). A hiperativação do canal CFTR pela toxina da cólera faz com que ocorra uma secreção excessiva de Cl^- que é acompanhada pelo movimento osmótico de uma grande quantidade de água para o lúmen intestinal, o que pode sobrecarregar a reabsorção de fluido intestinal pelo cólon, causando a diarreia secretória (MOON et al., 2015).

A atividade do canal CFTR é regulada pela PKA e pela proteína quinase dependente de AMP (AMPK). A ativação do canal CFTR estimulada pela PKA é dependente de AMPc e ocorre via fosforilação do seu domínio regulatório R. Por outro lado, a AMPK inibe a função do CFTR nas células epiteliais intestinais (KONGSUPHOL et al., 2009). A AMPK é uma quinase do tipo serina/treonina heterotrimérica constituída por um subunidade catalítica α e duas subunidades regulatórias β e γ (HARDIE; ASHFORD, 2014). Estudos têm mostrado que a ativação da AMPK é regulada por numerosas vias, incluindo a inibição da síntese de ácidos graxos, triglicerídeos e esteróis, além da estimulação da captação de glicose e a glicólise (HARDIE; HAWLEY, 2001).

A atividade da AMPK aumenta durante condições de estresse metabólico onde os níveis intracelulares de AMP é maior em relação aos níveis de ATP. Essa ativação envolve um mecanismo alostérico no qual o AMP em alta concentração se liga a AMPK (WALKER et al., 2003).

No intestino, o CFTR é o principal canal responsável pela a secreção de cloreto e sua ativação requer a hidrólise de ATP pela adenilato ciclase, o que promove o aumento de AMP que interagem fisicamente com o AMPK, levando a sua ativação, que resulta na inibição do canal CFTR nas células epiteliais intestinais (WALKER et al., 2003). Mais especificamente a AMPK promove a fosforilação do domínio R do canal CFTR em duas porções (porções serina 737 e serina 768), o que inibe a atividade do canal CFTR e impede a sua estimulação pela PKA (MUANPRASAT et al., 2013). Assim, a ativação do AMPK em resposta ao estresse metabólico

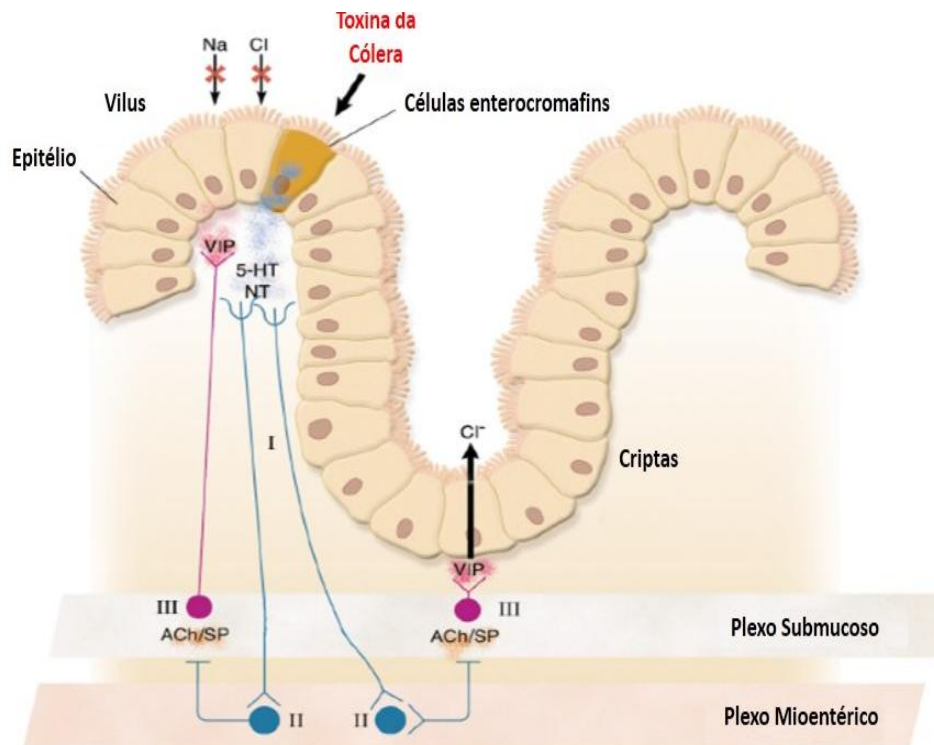
gerado pela toxina da cólera é responsável pelo feedback negativo e potencial alvo para a disfunção na secreção de cloreto e água causado pela cólera.

Um outro mecanismo pelo qual a toxina da cólera induz o aumento da secreção intestinal é por meio da ativação do sistema nervoso entérico (KORDASTI et al., 2006). Apesar de comprovado que a toxina da cólera não possui capacidade de atingir as camadas mais profundas da mucosa, esta induz um reflexo neural intramural por meio da sua ação nas células enterocromafins no epitélio intestinal (GWYNNE et al., 2009).

Assim como nos enterócitos, a toxina da cólera causa nas células enterocromafins, situadas na superfície das vilosidade do epitélio intestinal, um aumento de AMPc, que desencadeia nestas células a liberação de serotonina (5-HT), neurotensina (NT), e, possivelmente, outros peptídeos no espaço subepitelial (FIELD, 2003). Estes mediadores parácrinos induzem um reflexo neural secretor por meio da ativação de neurônios aferentes entéricos que começam no plexo subepitelial e terminam no plexo mioentérico, onde estes se conectam com interneurônios que, por sua vez, através da liberação de acetilcolina (ACh) e/ou a substância P (SP), ativam neurônios secreto-motores na submucosa do plexo neural. Os axônios destes neurônios secreto-motores alcançam a superfície do epitélio liberando VIP, que se liga a receptores dos enterócitos situados nas vilosidades e criptas (MOURAD; NASSAR, 2000). Nos vilos e criptas, VIP induz uma ativação da adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMPc nestas células. O aumento do AMPc promove a redução da absorção de sais nos vilos (transportadores de Na^+/Cl^-) sem alterar o co-transporte de $\text{Na}^+/\text{glicose}$, enquanto nas criptas induz um aumento na secreção de Cl^- e HCO_3^- resultando em uma enorme perda de eletrólitos e água durante a cólera (POPOFF, POULAIN, 2010) (Figura 5).

O NO também parece estar envolvido na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera. Estudos têm indicado que o NO é produzido pelas células epiteliais intestinais em resposta à toxina da cólera (JANOFF et al., 1997; CANANI et al., 2003). Janoff e colaboradores (1997) concluíram em seus estudos que a infecção sintomática de humanos pelo *V. cholerae* induz a produção de NO e que, em modelo de alça ileal de coelho, a toxina da cólera estimula significativamente a produção de NO em associação com o aumento na atividade local de NOS Ca^{2+} dependente. Na literatura não há relatos da relação da diarreia secretória induzida pela toxina do *V. cholerae* e outros mediadores gasosos, como o CO e H_2S .

Figura 5. Ativação do Sistema Nervoso entérico pela Toxina da Cólera.



A TC ativa as células enterocromafins causando nestas um aumento de AMPc e consequente liberação de serotonina (5-HT) e neurotensina (NT). Estes mediadores ativam subsequentemente neurônios aferentes entéricos conectados a interneurônios que, por sua vez, liberam acetilcolina (ACh) e/ou a substância P (SP), ativando assim neurônios secreto-motores na submucosa do plexo neural. Estes liberam VIP, que se liga a receptores nos enterócitos situados nas vilosidades e criptas. Nos vilos e criptas VIP induz a ativação da AC, aumentando os níveis de AMPc nestas células. O aumento do AMPc promove a redução da absorção de sais nos vilos, enquanto nas criptas induz um aumento na secreção de Cl⁻ e HCO₃⁻ resultando em uma enorme perda de eletrólitos e água. Fonte: Adaptado e modificado de Field (2003).

2.5.3. Tratamento da Cólera

O tratamento de doenças diarreicas agudas infecciosas baseia-se na melhoria imediata e completa da desidratação, no qual o paciente deve adquirir uma hidratação suficiente e fornecer os íons necessários para manter o equilíbrio de eletrólitos. Nos hospitais, especialmente nos países desenvolvidos, este tratamento é muitas vezes conseguido através de reposição de líquidos por via intravenosa. Nos países em desenvolvimento o uso da solução de reidratação oral (SRO) é a medida terapêutica base para esse tipo de acometimento (THIAGARAJAH et al., 2015).

A SRO consiste numa mistura simples de sais e glicose em proporções específicas ingerida por via oral, que foi desenvolvida em 1968 por pesquisadores de institutos financiados pelo governo dos EUA e é atualmente a única terapia oral que é recomendado para crianças com diarreia aguda. Esta terapia é um resultado de descobertas básicas que mostraram que o transporte de sódio (Na^+) e glicose são acoplados no intestino de modo que a glicose acelera a absorção de fluido. A notável eficácia da SRO no tratamento da cólera associada a desidratação foi a descoberta de que a glicose fisiologicamente estimula a absorção de Na^+ por um mecanismo independente do aumento de AMPc, o que significa que ele permanece intacto, apesar do mecanismo fisiopatológico que a toxina da cólera causa nos enterócitos (responsáveis pela absorção intestinal), no qual a maioria dos outros processos de absorção estão alterados (CARPENTER, 1992; CHENG 2016).

Dessa forma, inicialmente a SRO foi utilizada como tratamento para cólera. Mais tarde verificou-se que esta solução era eficaz em corrigir a desidratação de outras formas de diarreia aguda, tanto em adultos como em crianças. Devido à sua simplicidade e disponibilidade, a SRO rapidamente se espalhou pelo mundo, o que resultou na redução dos níveis de mortalidade em crianças e idosos por desidratação, no entanto, não se observou uma redução expressiva da morbidade (VELÁZQUEZ et al., 2012). Desde a sua criação, a SRO salvou no mínimo milhões de vidas por ano, por isso é considerada um dos mais importantes avanços médicos do século XX (CHENG, 2016).

As diretrizes da OMS e UNICEF recomendam o uso da SRO como um importante tratamento para a desidratação causada pela diarreia. No entanto, o uso desta não diminui a secreção de fluido intestinal ou interfere na atividade do sistema nervoso entérico, que são fatores importantes para o tratamento da diarreia secretória, nem reduz a permeabilidade intestinal ou inflamação que são os principais contribuintes da diarreia inflamatória. Assim, consequentemente, a SRO não diminui a diarreia a curto prazo. Devido a esta limitação, o tratamento da diarreia requer, em alguns casos, o uso de terapias alternativas (VELÁZQUEZ et al., 2012).

Em pacientes que apresentam cólera com moderada a grave desidratação, o uso de antibióticos é recomendado com terapia adjuvante. Embora a terapia antimicrobiana seja útil em alguns casos, a escolha do tratamento com antibióticos adequados requer a confirmação por exame laboratorial da cultura de fezes, um recurso geralmente indisponível, principalmente em países em desenvolvimento (CHENG et al., 2016). O uso de antibióticos, quando eficazes,

encurtam a duração da diarreia, reduzem o volume de perdas de fezes de até 50% e diminuem a liberação de bactérias viáveis nas fezes em alguns dias (1-2 dias). A terapia com antibióticos deve basear-se nos padrões de resistência locais prevalentes, pois como em outras infecções, o uso destes na cólera pode contribuir para o aumento da resistência antimicrobiana, levando a repetidos episódios de diarreia, muitas vezes causando desnutrição e desidratação, que por sua vez leva a mais frequentes e mais graves episódios de diarreia (GREENOUGH et al., 1964; LINDENBAUM et al., 1967; HARRIS et al., 2012).

Nos casos graves de cólera, para evitar a desnutrição, bem como complicações imediatas como hipocalemia e hipoglicemia em decorrência do perda de fluidos, intervenções nutricionais devem ser tomadas. A OMS recomenda a suplementação com zinco para as crianças com menos de 5 anos de idade com diarreia (BHANDARI et al., 2008). As crianças com diarreia nos países em desenvolvimento também se beneficiam de suplementação com vitamina A (MAYO-WILSON et al., 2011).

Para o tratamento da diarreia secretória em geral, há algumas drogas que reduzem o movimento e hipersecreção intestinal, tais como Racecadotril e Loperamida que são capazes de estimular a absorção e reduzir a secreção de água e eletrólitos no trato gastrointestinal, por diminuir as contrações intestinais e aumentar o tempo de contato do conteúdo intestinal com a superfície da mucosa, o que favorece a absorção. No entanto, ambas as drogas têm efeitos colaterais; o Racecadotril causa broncoespasmos, febre e vômitos, já a Loperamida não deve ser administrada em crianças com menos de 6 anos de idade, pacientes com constipação e obstrução intestinal, e em pacientes com cólera, pois este medicamento pode disfarçar os seus sintomas e causar o aumento da proliferação bacteriana intestinal. Por outro lado, existem alguns compostos que apresentaram propriedades inibidoras sobre a secreção intestinal tal como berberina, clorpromazina, clonidina, ácido nicotínico, indometacina e somatostatina, mas eles não foram desenvolvidos como medicamentos antidiarreicos (ROGÉ et al., 1993; SALAZAR et al., 2000).

Para o tratamento da cólera os agentes antimotilidade e anti-eméticos utilizados como terapia alternativa para o tratamento de outras diarreias secretórias não têm benefício estabelecido porque podem prolongar a infecção ou ter efeitos sedativo que interferem com a terapia de reidratação oral eficaz (HARRIS et al., 2012).

Levando em consideração as limitações de terapias alternativas abordadas, a base para o tratamento da cólera é a administração de solução de reidratação oral (SRO) por promover a

absorção de fluido intestinal e manter a hidratação. No entanto, a eficácia da SRO tem diminuído, talvez por causa das dificuldades práticas envolvidas na consistente administração de grandes quantidades de fluido, fato observado nos casos de surtos de cólera em catástrofes (THIAGARAJAH; VERKMAN, 2012). Outro fator que evidencia a baixa eficácia da SRO, é o fato de que a cólera continua a ser um grande problema sócio-econômico e de saúde global que tira a vida de muitas de crianças a cada ano (THIAGARAJAH; VERKMAN, 2012). Os rápidos avanços no ritmo da pesquisa biomédica continuará a beneficiar as doenças que afetam o mundo desenvolvido, mas infelizmente este não é o caso de países em desenvolvimento e/ou subdesenvolvidos. Como resultado, não existe uma terapia eficaz ou medicamento disponível para o tratamento da cólera (DAHL; YAMADA, 2008).

Assim, a pesquisa de novos agentes antissecretórios mais eficazes e seguros para o tratamento a cólera ainda é uma meta necessária, que pode ser conseguida investigando os mecanismos que contribuem para o aumento da secreção de íons e água ou buscando moléculas sinalizadoras que possam inibir este efeito (VELÁZQUEZ et al., 2006).

2.6. Sulfeto de Hidrogênio (H₂S): Síntese e metabolismo

O sulfeto de hidrogênio (H₂S) é um gás inorgânico incolor e inflamável caracterizado por um cheiro peculiar de ovos podres (YU et al., 2014). Apesar de sua longa história como um gás tóxico e poluente ambiental, o H₂S, juntamente com o óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO), ao longo dos últimos anos tornou-se reconhecido como uma importante molécula de sinalização que desempenha diversos papéis fisiológicos e de grande importância para a saúde humana (WALLACE; WANG, 2015). Devido as suas propriedades químicas inatas, que incluem a sua atividade redox, acidez, e alta nucleofilicidade, o H₂S possui capacidade de reagir com diferentes alvos celulares, o que explica em parte, a sua capacidade de sinalização (HARTLE; PLUTH, 2016). Apesar da atividade tóxica do H₂S exógeno, numerosos trabalhos têm demonstrado diferentes papéis do H₂S na sinalização de vias em uma gama de organismos, incluindo vários animais e plantas (WANG, 2002; WANG, 2014; OLAS, 2015).

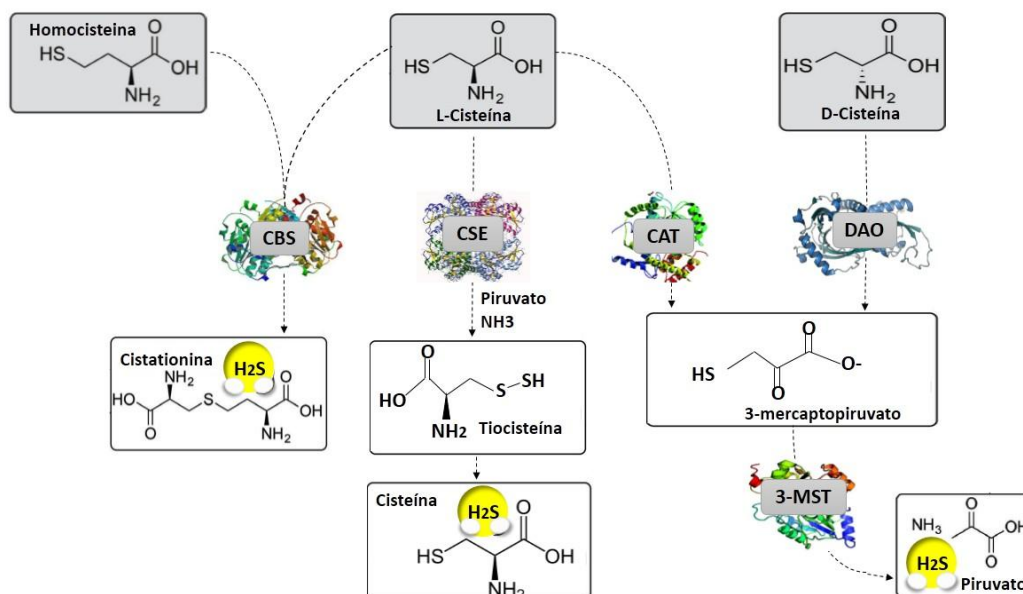
Recentemente foi demonstrado que esse gás é formado naturalmente no corpo, em baixas concentrações, estando presente em todos os órgãos, células e intracelularmente em

diferentes organelas (OLAS, 2015). Ao nível endógeno o H₂S é modulado por diferentes vias metabólicas, incluindo a oxidação do H₂S, que ocorre nas mitocôndrias. Em concentrações elevadas ou, administradas em curto espaço de tempo, o sulfeto de hidrogênio se torna tóxico por interferir na respiração mitocondrial através da inibição da Citocromo C oxidase (REIFFENSTEIN, 1992).

No meio ambiente, o H₂S é produzido a partir da degradação de matéria orgânica por bactérias na ausência de oxigênio (WU et al., 2016). Em células de mamíferos, a produção endógena de H₂S é realizada principalmente através da via de transulfatação reversa a partir da L-cisteína catalisada por duas enzimas dependentes do co-fator piridoxal-5'-fosfato (Vitamina B₆): cistationina β-sintase (CBS) e cistationina γ-liase (CSE). Alternativamente, a L-cisteína pode ser convertida em 3-mercaptopiruvato pela enzima cisteína amino-transferase (CAT), e em seguida, em H₂S através da enzima 3 mercaptopiruvato sulfurtransferase (3-MST) (DUNN et al., 2016).

Intracelularmente as enzimas CSE e CBS localizam-se no citosol com distribuições específicas em determinados tecidos. A CBS é predominantemente expressa no sistema nervoso central, enquanto que a expressão de CSE predomina no sistema cardiovascular, fígado, rins, útero, placenta, pâncreas, pulmão e no trato gastrointestinal (ZHAO et al., 2001; FIORUCCI et al., 2006; YANG et al., 2013; ZHANG et al., 2013). CAT e 3-MST são ambas enzimas citosólicas e mitocondriais, mas a maior parte destas enzimas se situam nas mitocôndrias, sendo que estas são expressas no cérebro e no endotélio vascular (SHIBUYA et al., 2009a; SHIBUYA et al., 2009b; YU et al., 2014).

A produção de H₂S pela CBS envolve a condensação da L-cisteína com a homocisteína por meio de uma reação de β-substituição para gerar cistationina. Nesse processo reativo, o H₂S é liberado. A enzima CSE catalisa a conversão da L-cisteína para piruvato, tiocisteína e NH₃. Em seguida, a tiocisteína sofre decomposição (processo independente de enzima) para formar H₂S e cisteína. Um domínio de ligação ao co-fator PLP (piridoxal 5'-fosfato) é crucial para a atividade catalítica dessas duas enzimas. A enzima CAT também utiliza a L-cisteína como substrato, que na presença do co-fator α-cetoglutarato, leva à síntese de 3-mercaptopiruvato. Este é então catalisado pela enzima 3-MST em piruvato, NH₃ e H₂S (YU, 2014) (Figura 6).

Figura 6. Vias de biossíntese de H₂S endógeno.

Cistationina β-sintase (CBS) catalisa a β-substituição de L-cisteína com homocisteína produzindo cistationina e H₂S. Cistationina γ liase (CSE) converte a L-cisteína em piruvato, tiocisteína e NH₃. Em seguida, a tiocisteína sofre decomposição e forma H₂S e cisteína. A enzima cisteína amino-transferase (CAT) utiliza L-cisteína como substrato, levando à síntese de 3-mercaptopiruvato. D-cisteína é metabolizada pela enzima D-aminoácido oxidase (DAO) também gerando 3-mercaptopiruvato. Este é então catalisado pela enzima 3 mercaptopiruvato sulfurtransferase (3-MST) em piruvato, NH₃ e H₂S. Fonte: Autoria própria.

Recentemente, descobriu-se uma nova via de produção de H₂S que utiliza a D-cisteína como substrato. A D-cisteína pode ser adquirida de duas formas: por meio de uma mudança quiral da L-cisteína e por meio da sua absorção a partir dos alimentos (SHIBUYA et al., 2013). A D-cisteína é metabolizada pela enzima D-aminoácido oxidase (DAO) localizada nos peroxissomos em 3-mercaptopiruvato, que também é produzida pela CAT a partir de L-cisteína (KIMURA, 2014; OLAS, 2015; HARTLE; PLUTH, 2016). Apesar dessa recente descoberta, até o momento, essa nova via enzimática também capaz de produzir H₂S endógeno, tem sido pouco estudada em profundidade quanto a sua importância fisiológica e biológica.

Apesar das vias alternativas de produção de H₂S por meio da conversão de L-cisteína pela enzima CAT e da produção de H₂S pela conversão de D-cisteína, a maior parte da produção de H₂S em mamíferos é regulada pelas enzimas CBS e CSE, sendo estas as mais estudadas em diferentes processos patológicos e fisiológicos (FLANNIGAN et al., 2013).

2.6.1. Sulfeto de Hidrogênio (H₂S): Ações Fisiológicas

Desde 1996 quando Ade e Kimura começaram a estudar os efeitos biológicos do H₂S endógeno, o papel de H₂S foi revelado gradualmente por várias contribuições de cientistas em todo o mundo. Recentes descobertas ao longo da última década em relação ao H₂S demonstram a sua importância crítica no campo da medicina (ABE; KIMURA, 1996; GUO; CHENG; ZHU, 2013).

O H₂S está implicado em muitas funções fisiológicas que incluem efeitos sobre o músculo liso, células inflamatórias, células endoteliais, percepção e mediação da dor, bem como o controle da integridade da mucosa gástrica, do tônus vascular e o controle da motilidade gastrointestinal (FIORUCCI et al., 2006; SIVARAJAH et al., 2009; POLHEMUS; LEFER, 2014). Portanto, o H₂S participa na regulação da homeostase de numerosos sistemas em nosso corpo incluindo, mas não se limitando, o sistema cardiovascular, neuronal, respiratório, renal, hepático e o trato gastrointestinal. A natureza lipossolúvel do H₂S permite que este gasotransmissor chegue facilmente em seus alvos moleculares, como no plasma, no citosol ou em organelas intracelulares. Essa característica é muito importante para a sua permeabilidade através de membranas, mas é a sua reatividade química única com certos tipos de macromoléculas em diferentes tipos de células que o torna uma importante molécula sinalizadora seletiva e específica (KIMURA; SHIBUYA; KIMURA, 2012).

O sulfeto de hidrogênio como uma molécula de sinalização desempenha um papel importante regulando a função do sistema nervoso. No cérebro de diversas espécies, incluindo camundongos, ratos, bovinos e humanos, altas concentrações de H₂S (50 – 160 µmol/L) foram detectadas. As duas enzimas, CBS e CSE podem ser encontradas no SNC, mas a atividade da CBS é cerca de 30 vezes maior do que a CSE nos neurônios (SAVAGE; GOULD, 1990; AWATA et al., 1995). No sistema nervoso central, o H₂S está envolvido em processos fisiológicos de neuroproteção e neurotransmissão. Os mecanismos subjacentes aos efeitos neuroprotetores do H₂S parecem incluir uma ação anti-inflamatória e regulação positiva de enzimas antioxidantes. Resultados de Lu e colaboradores (2010) indicam que o sulfeto de hidrogênio regula o pH intracelular em células microgliais eliminando o dano da microglia no local da lesão proporcionando uma função neuroprotetora (QU et al., 2006; HU et al., 2008; KIDA et al., 2011; OLAS, 2015).

No sistema cardiovascular, o H₂S em concentrações fisiológicas ou farmacológicas protege os vasos sanguíneos, atenua a lesão miocárdica e regula a pressão sanguínea

(POLHEMUS; LEFER, 2014). O H₂S mostra-se útil para o tratamento da hipertensão, devido ao seu efeito vasodilatador observado na veia aorta torácica, portal, e artéria mesentérica de ratos, que sugere uma papel fundamental na regulação da contratilidade e da pressão arterial (PERNA et al., 2010; GUO; CHENG; ZHU, 2013). YAN e colaboradores (2004) estudaram ratos hipertensos e observaram uma diminuição da expressão e atividade de CSE na aorta torácica. Eles também observaram que o tratamento com um doador de H₂S atenuava o aumento da pressão sanguínea durante o desenvolvimento da hipertensão. Por outro lado, estudos adicionais sugeriram que o H₂S é um vasoconstritor em baixas concentrações, com um possível mecanismo de supressão do NO, que também está envolvido na contratilidade (GUO; CHENG; ZHU, 2013).

A resposta hipotensora causada pelo H₂S se deve, em parte, ao fato que este ativa os canais KATP (canais de potássio sensíveis ao ATP), promovendo uma hiperpolarização das células musculares lisas dos vasos sanguíneos, desencadeando o relaxamento destes. O canal KATP foi o primeiro alvo molecular identificado do H₂S endógeno, sendo que a sua ativação pelo H₂S tem sido relatada nos sistemas cardiovascular, endócrino, respiratório, nervoso e gastrointestinal (ZHAO et al., 2001; YANG et al., 2005; MEDEIROS et al., 2012; FITZGERALD et al., 2014).

Assim como outros mediadores gasosos, o H₂S é considerado uma potente molécula anti-inflamatória. Estudos mostram que o H₂S é capaz de inibir o rolamento e adesão firme dos leucócitos ao endotélio, assim como suprimir a expressão de moléculas de adesão nestas células (GEMICI et al., 2015). Outros trabalhos nessa área mostram que o H₂S inibe a atividade da enzima mieloperoxidase promovendo uma redução dos efeitos citotóxicos de neutrófilos (PÁLINKÁS et al., 2015). Além disso, o H₂S promove a apoptose de neutrófilos e aumenta a fagocitose de bactérias por macrófagos, fatores fundamentais na resolução da inflamação (SERHAN et al., 2007; DUFTON et al., 2012). Doadores de H₂S são capazes de reduzir a inflamação por redução da expressão de um número de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α , interleucina-1 β , IL-8 e o interferon- γ (FIORUCCI et al., 2007). No entanto, a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias pelo H₂S parece ocorrer mais provavelmente por supressão do fator nuclear NF κ B (CHEN; LIU, 2016; SEN et al., 2012).

No sistema gastrointestinal, o H₂S produzido pelas células locais ou por bactérias entéricas, tem sido implicado como um importante mediador de diversas funções fisiológicas. Há uma série de trabalhos que evidenciam a utilidade de doadores de H₂S no tratamento de

vários distúrbios gastrointestinais, particularmente aquelas associadas com a inflamação (WALLACE et al., 2009; ZINS et al., 2010; CHÁVEZ-PIÑA; TAPIA-ÁLVAREZ; NAVARRETE, 2010; WALLACE; WANG, 2015). O H₂S pode contribuir para a defesa da mucosa gastrintestinal por estimular a secreção de bicarbonato no duodeno, reduzindo desse modo os efeitos potencialmente prejudiciais do ácido gástrico proveniente do estômago. O H₂S pode também inibir diretamente a secreção de ácido gástrico. Uma redução no fluxo sanguíneo gástrico e aumento da adesão de leucócitos ao endotélio vascular na microcirculação gástrica são características comuns nas fases iniciais da lesão gástrica induzida por AINES, e que pode ser prevenida por doadores de H₂S (FIORUCCI et al., 2005; ZANARDO et al., 2006; TAKEUCHI et al., 2012; BLACKLER et al., 2014; WALLACE; WANG, 2015). Outros trabalhos também mostraram o efeito do H₂S na proteção da mucosa gástrica no dano gástrico induzido por etanol e por alendronato, no qual em ambos, o mecanismo de proteção do H₂S, pelo menos em parte, se deve a ativação de KATP (NICOLAU et al., 2013; MEDEIROS et al., 2009).

Outros mecanismos que contribuem para a proteção da mucosa intestinal mediada pelo H₂S consiste no aumento da produção de muco pelas células caliciformes intestinais e aumento da expressão de ciclooxygenase (COX), que por meio da prostaglandina E₂, promove o reparo da mucosa, contribuindo para as ações citoprotetoras do H₂S (GEMICI et al., 2015). Há também evidências de que o H₂S é um importante mediador da motilidade gastrintestinal, por meio de sua ação nas células musculares lisas do trato gastrintestinal, bem como em neurônios do sistema nervoso entérico (LINDEN et al., 2010).

2.6.2 Sulfeto de Hidrogênio (H₂S): Possível Mecanismo de Ação

Os mecanismos e vias de sinalização do H₂S ainda não estão completamente compreendidos. Felizmente, alguns mecanismos fundamentais foram determinados, como a ação seletiva do H₂S no canal de KATP, ativação dos canais de cálcio do tipo T, envolvidos na nocicepção visceral e hiperalgesia somática em camundongos, e estimulação dos receptores TRPV1 e TRPA1, alvos importantes em investigações patológicas (SCHICHO et al., 2006; MATSUNAMI et al., 2011; SZABÓ et al., 2011; MIYAMOTO et al., 2011; GUO; CHENG; ZHU 2013). Estudos conduzidos por Medeiros e colaboradores (2009) demonstraram os efeitos gastroprotetores da L-cisteína e doadores de H₂S no dano gástrico induzido por etanol, sendo este efeito, pelo menos em parte, devido a ativação de canais KATP e receptores TRPV1 em neurônios aferentes.

Recentemente outros possíveis mecanismos de ação para o sulfeto de hidrogênio têm atraído bastante atenção. Diversos estudos indicam que drogas doadoras de H₂S (como o NaHS), possuem a capacidade de inibir a atividade da enzima adenilato ciclase e, assim, diminuir a formação de AMPc em diferentes tipos celulares e teciduais, como células renais, neuronais e células musculares lisas de aorta e artéria cerebral de ratos. (LIM et al., 2008; JIANG et al., 2012; YANG et al., 2014; NAGPURE; BIAN 2014; LI et al., 2015).

Outros estudos mostram que doadores de H₂S ativam AMPK em alguns tipos de células, como osteoblastos, microglia, monócitos, células epiteliais renais, hepatócitos, células endoteliais e no miocárdio (LEE et al., 2012; MANNA; JAIN 2013; YANG et al., 2014; KUNDU et al., 2014; ZHOU et al., 2014; SUN et al., 2015; XIE et al., 2015; LIU et al., 2016). Em estudo investigando o possível mecanismo da atividade cardioprotetora do H₂S na isquemia miocárdica e reperfusão, Xie e colaboradores (2015) concluíram que o H₂S possui efeitos cardioprotetores quando administrado após isquemia do miocárdio e sugerem que este efeito, dentre outros fatores, se deve a ativação da AMPK.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do H₂S sobre a diarreia secretória provocada pela toxina do *Vibrio cholerae* em camundongos, bem como tentar identificar os possíveis mecanismos envolvidos neste efeito.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito antissecretório da L-cisteína e doadores de H₂S sobre a secreção intestinal provocada pela toxina do *Vibrio cholerae*;
- Analisar o efeito do H₂S sobre a secreção intestinal de íons Cl⁻ provocada pela toxina do *Vibrio cholerae*;
- Avaliar a influência do H₂S sobre a absorção intestinal de fluídos;
- Estudar o efeito da toxina do *V. cholerae* sobre a expressão intestinal de cistationina γ -lyase (CSE) através de imunohistoquímica;
- Estudar o efeito da toxina do *V. cholerae* sobre níveis de sulfeto de hidrogênio no tecido intestinal;
- Investigar o papel da via adenilato ciclase/AMPC/PKA e proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no efeito antissecretório do H₂S sobre a diarreia provocada pela toxina do *Vibrio cholerae*.

4. METODOLOGIA

4.1. Drogas e Reagentes

L-cisteína, DL-propargilglicina (PAG), reagente de Lawesson's, NaHS, a toxina da cólera (TC), anticorpo anti-CSE, SQ-22536, Bupivacaina HCl, KT 5720, AICAR e Dorsomorfina (composto C) foram obtidos a partir da *Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA*. Todas as drogas foram dissolvidas em solução tampão fosfato-salina (PBS) ou solução salina. Todos os outros produtos químicos e reagentes eram de grau analítico e obtidos a partir de fornecedores comerciais padrão.

4.2. Animais

No presente trabalho, foram utilizados camundongos (variedade Swiss) pesando entre 25 e 30 gramas, de ambos os sexos, provenientes do Biotério de Manutenção de Animais Destinados a Experimentação do Departamento de Morfofisiologia Veterinária-CCA/UFPI. Os animais foram mantidos em gaiolas e acondicionados no laboratório com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo de 12 h claro/12 h escuro, com livre acesso a ração (dieta padrão) e água *ad libitum*. Os grupos experimentais consistiram de 6 a 8 animais por grupo. Antes dos experimentos os animais foram submetidos a jejum de 24 horas, mas com livre acesso ao consumo de água. Os animais foram eutanasiados após anestesia com quetamina-xilazina ou sobredose de tiopental sódico.

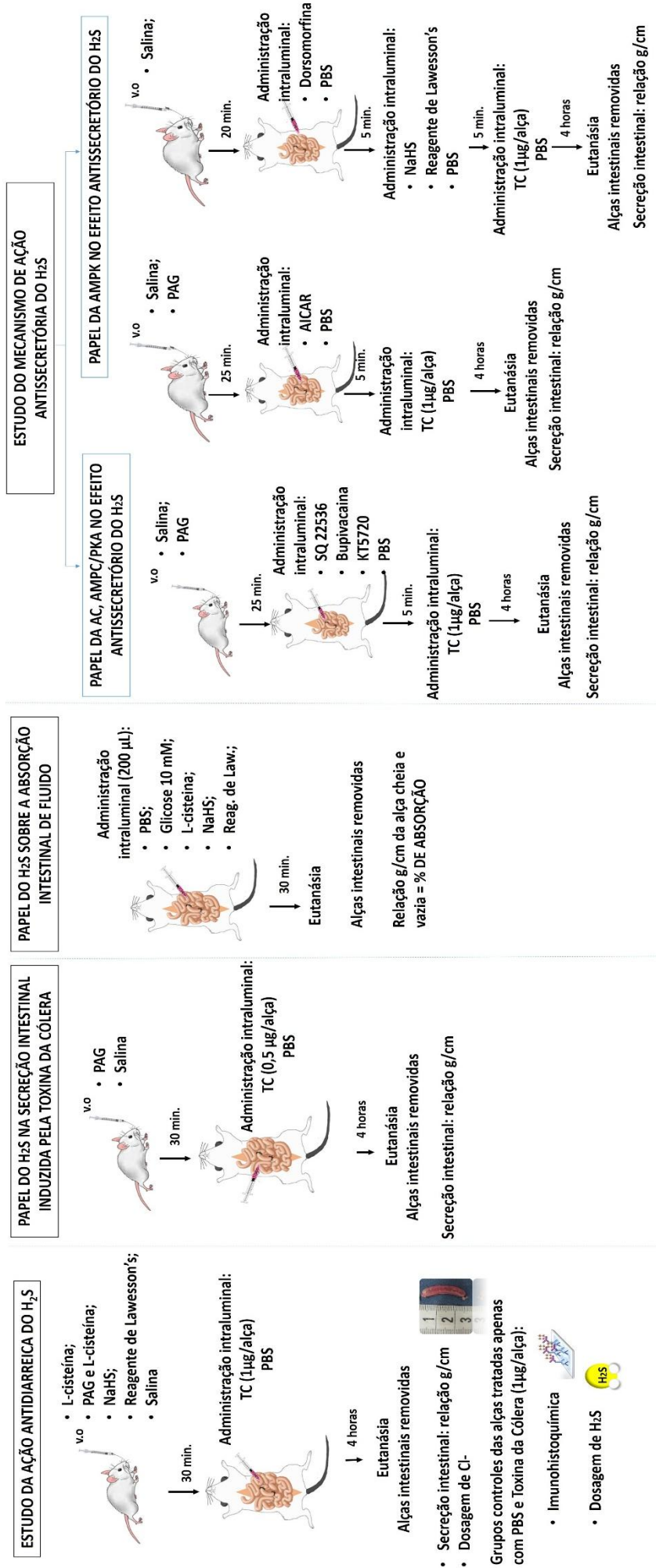
4.3. Considerações Éticas

Os procedimentos e protocolos experimentais usados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí (Protocolo nº 079/2015) (ver anexo 1). Todos os procedimentos e cuidados foram conduzidos em estrito acordo com as normas internacionalmente aceitas para utilização de animais em projetos de pesquisa e do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

4.4. Delineamento experimental

A atividade antissecretória do H₂S foi analisada por meio do pré-tratamento (v.o) dos animais com L-cisteína sozinha ou com PAG, NaHS, regente de Lawesson's ou salina, e 30 min. depois os animais foram anestesiados, para realização do modelo de indução da diarreia pela toxina da cólera em alça intestinal isolada. Neste modelo após quatro horas da anestesia os animais foram eutanasiados para retirada das alças intestinais. O conteúdo do fluido intestinal dessas alças foram analisados quanto aos níveis de íons Cl⁻. Amostras teciduais dos grupos controles pré-tratados com salina e posteriormente tratados com PBS ou Toxina da cólera foram analisadas quanto a expressão de CSE por imunohistoquímica e níveis teciduais de H₂S. Também foi avaliado o papel do H₂S na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera por meio do pré-tratamento dos animais com PAG, seguido da administração intraluminal da toxina da cólera numa dose submáxima (0,5 µg/alça). O papel do H₂S sobre a absorção intestinal de fluido também foi avaliado em alça intestinal isolada através da administração intraluminal, após anestesia, de PBS, Glicose, L-cisteína, NaHS e Reagente de Lawesson's. Após 30 minutos os animais foram eutanasiados para avaliação da porcentagem de absorção intestinal. Além disso, o mecanismo de ação antidiarreica do H₂S também foi avaliado. Para avaliar o papel da via AC/AMPC/PKA os camundongos foram pré-tratados (v.o) com PAG ou salina. Após 25 min., foi realizado o procedimento da indução da diarreia pela toxina da cólera na alça intestinal, entretanto, antes da administração da toxina, os animais em determinados grupos receberam SQ22536 (inibidor de AC), Bupivacaina (inibidor de AMPC) ou KT5720 (inibidor de PKA). Para avaliar a participação da AMPK no efeito antissecretório do H₂S, os animais foram tratados, com um ativador ou um inibidor específico da AMPK: AICAR e dorsomorfina, respectivamente. Em seguida foi realizado o procedimento de indução da diarreia na alça intestinal isolada semelhante ao descrito anteriormente. O delineamento experimental está ilustrado na Figura 7.

Figura 7. Representação esquemática do delineamento experimental realizado.

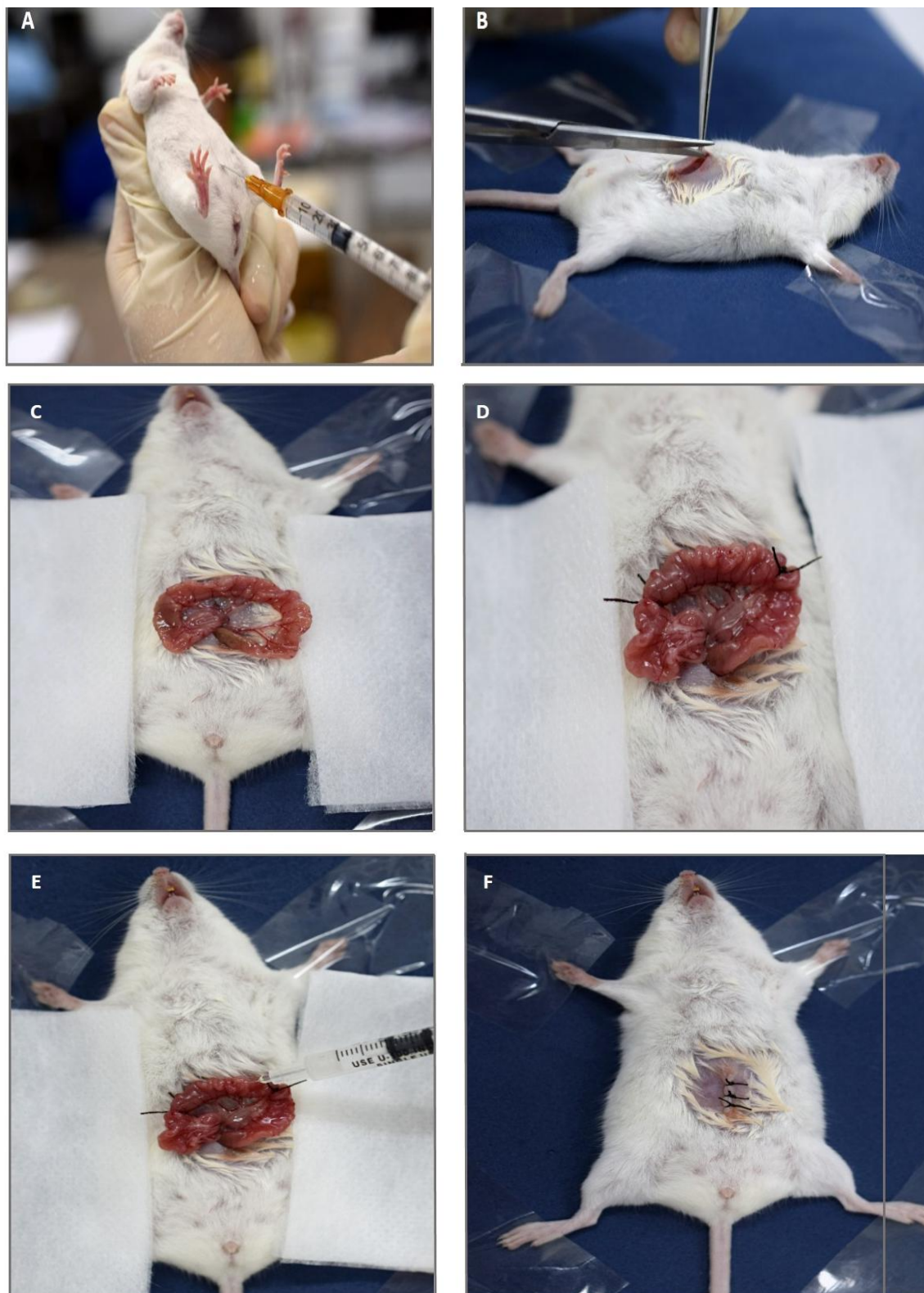


4.5. Estudo da ação antissecretória do H₂S

4.5.1. Estudo do efeito antissecretório do H₂S na diarreia induzida pela enterotoxina bacteriana do *Vibrio cholerae*

Os camundongos, em jejum por 24 horas, foram tratados, por gavagem (v.o), com L-cisteína (precursor da síntese de H₂S; nas doses de 10 ou 50 mg/kg) sozinha ou com PAG (inibidor da síntese de CSE, na dose de 100 mg/kg), NaHS (doador de H₂S; nas doses de 3 ou 27 µmol/kg), regente de Lawesson's (doador de H₂S; nas doses de 3 ou 27 µmol/kg) ou solução salina (2,5 ml/kg). A escolha destas doses foram baseadas no estudo realizado por Medeiros e colaboradores (2012) e trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa. Após 30 min, foi realizado o procedimento da indução da diarreia na alça intestinal isolada de acordo com Thiagarajah e colaboradores (2004) (Figura 8). Inicialmente os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilasina (8 mg/kg) e cloridrato de quetamina (60 mg/kg), injetados por via intraperitoneal. Em seguida foi realizada uma laparotomia mediana de 1-2 cm, incidindo-se, em primeira instância, a pele e, em seguida, o peritônio, para visualizar e expor do intestino delgado. Uma porção do jejuno foi isolada e fechada com dupla lassada de modo a formar uma alça intestinal medindo aproximadamente 2-3 cm. As alças intestinais foram então inoculadas com 100 µl de solução tampão fosfato-salina (PBS) para o grupo controle negativo, pré-tratado apenas com solução salina, ou TC dissolvida em PBS na dose de 1 µg/alça para os grupos pré-tratados com salina, controle positivo para secreção intestinal, L-cisteína, sozinha ou com PAG, e os doadores de H₂S. Com base no exposto, os grupos podem ser divididos como esquematizado na figura 9. As alças intestinais foram devolvidas para a cavidade abdominal, a incisão abdominal foi fechada com suturas e os camundongos foram deixados para se recuperarem da anestesia. Quatro horas após a anestesia, os animais foram eutanasiados e as alças isoladas foram rapidamente removidas da cavidade abdominal. A secreção de fluido intestinal foi medida indiretamente através da relação do peso/comprimento da alça expressa em g/cm. Amostras teciduais das alças intestinais isoladas foram recolhidas para análise dos níveis teciduais de H₂S e expressão intestinal de CSE através de imunohistoquímica. O conteúdo intestinal acumulado também foi recolhido separadamente para se determinar a concentração de íons cloreto (Cl⁻).

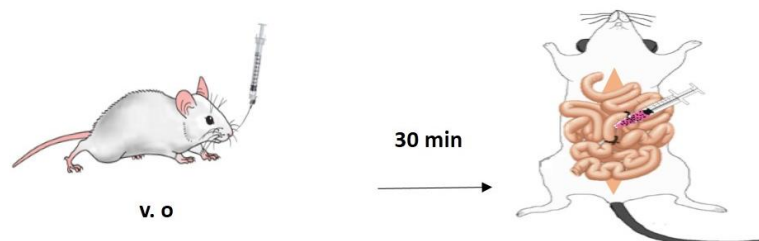
Figura 8. Indução da diarreia pela TC através do modelo de alça intestinal isolada.



A. Aplicação intraperitoneal de uma associação de xilasina e quetamina. **B.** Laparotomia mediana. **C.** Avaliação do segmento do jejunum a ser isolado. **D.** Alça intestinal isolada por dupla lassada medindo aproximadamente 2-3

cm. E. Aplicação da TC ou PBS. F. Animal em plano anestésico, após fechamento da cavidade abdominal. Fonte: Autoria própria.

Figura 9. Grupos experimentais para estudo do efeito antissecretório do H₂S na diarreia induzida pela enterotoxina bacteriana do *Vibrio cholerae*



L-cisteína (10 ou 50 mg/kg)	TC 1 µg/alça
PAG (100 mg/kg) e L-cisteína (50 mg/kg)	TC 1 µg/alça
NaHS (3 ou 27 µmol/kg)	TC 1 µg/alça
Reagente de Lawesson (3 ou 27 µmol/kg)	TC 1 µg/alça
sal. (2,5 ml/kg)	TC 1 µg/alça
sal. (2,5 ml/kg)	PBS 100 µl

Fonte: Autoria própria.

4.5.2. Efeito do PAG sobre a secreção de fluido intestinal utilizando um dose submáxima da toxina da cólera

Os animais em jejum por 24 horas, mas com livre acesso à água foram tratados por via oral com solução salina (2,5 ml/kg) ou PAG (100 mg/kg). Após trinta minutos, os animais foram anestesiados e realizado o ensaio de indução de diarreia na alça intestinal isolada como descrito acima. As alças intestinais foram inoculadas com 100 µl de PBS para o grupo de controle negativo tratado com solução salina e toxina da cólera na dose de 0,5 µg/alça para os grupos tratados com solução salina e PAG. As alças intestinais foram devolvidas à cavidade abdominal e a incisão abdominal foi suturada. Quatro horas após a anestesia, os animais foram eutanizados e as alças intestinais foram rapidamente removidas da cavidade abdominal. A secreção de fluido foi medida indiretamente através da relação peso/comprimento da alça expressa em g/cm.

4.5.3. Avaliação do efeito do H₂S sobre a secreção intestinal de íons Cl⁻ provocada pela toxina do *Vibrio cholerae*

A concentração de íons cloreto no fluido intestinal acumulado em cada alça isolada foi medida seguindo protocolo prévio de acordo com as instruções do fabricante (*Labtest*, São Paulo, Brasil). Resumidamente, as amostras coletadas foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido e diluído de 1:2 com água destilada. As amostras foram então misturadas com os reagentes do kit durante dois minutos e a absorbância foi medida a 470 nm em espectrofotômetro. Os valores obtidos foram expressos em mEq/L.

4.5.5. Avaliação da influência do H₂S sobre a absorção intestinal de fluido

O efeito da H₂S sob a absorção intestinal foi determinado de acordo com o método previamente descrito por Tradtrantip e colaboradores (2014). Inicialmente, após um jejum de 24 horas, os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilasina (8 mg/kg) e cloridrato de quetamina (60 mg/kg) via intraperitoneal. Em seguida foi realizada uma laparotomia mediana de 1-2 cm, incidindo-se, em primeira instância, a pele e, em seguida, o peritônio, para visualizar e expor o intestino delgado. Após exposição do intestino delgado uma porção do jejuno foi isolada e fechada com dupla lassada de modo a formar uma alça intestinal medindo aproximadamente 2-3 cm. As alças intestinais foram então inoculadas com 200 µL de PBS (controle negativo para absorção), PBS contendo glicose 10 mM (controle positivo para absorção) ou 200 µL de PBS contendo os compostos L-cisteína (50 mg/kg), NaHS (27 µmol/kg) ou Reagente de Lawesson's (27 µmol/kg). As alças intestinais foram então devolvidas para a cavidade abdominal e a laparotomia foi fechada com suturas. Trinta minutos após a inoculação nas alças, os animais foram eutanasiados, a cavidade abdominal foi reaberta e as alças intestinais isoladas foram removidas. As alças foram pesadas com e sem o conteúdo luminal e o volume do conteúdo intestinal foi calculado indiretamente pela subtração dos dois valores. A porcentagem de absorção de fluido foi medida indiretamente através da relação do peso/comprimento da alça isolada.

4.5.6. Imunohistoquímica para Cistationina γ -liase (CSE)

Amostras de alças intestinais isoladas tratadas apenas com a toxina da cólera na dose de 1 $\mu\text{g}/\text{alça}$ ou PBS 100 $\mu\text{l}/\text{alça}$, obtidas por meio do procedimento previamente descrito no item 4.5.1. foram utilizadas para se determinar a expressão de CSE de acordo com o método descrito por Ribeiro e colaboradores (2002). Após retiradas as amostras intestinais foram fixadas em formol tamponado a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e em seguida parafinizados. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 3 a 4 micrômetros de espessura e as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C por 15 min. Após a desparafinização do tecido, seguida de hidratação, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 3% diluída em metanol. Posteriormente, foi realizada a lavagem das lâminas com PBS 0,01M (5 min.), seguido por glicina 0,1M em PBS (5 min.) e PBS 0,01M (5 min.). As lâminas foram então mergulhadas numa solução de PBS com albumina bovina (BSA) a 1%, durante 30 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário para detecção da CSE (anti-CSE de coelho, 1:200) diluído em PBS-BSA 1%, em temperatura de 4°C, durante uma noite. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS-BSA 1% e incubadas com o anticorpo secundário marcado com biotina (anticorpo anti-Ig-G de camundongo), na diluição de 1:100, por 1 hora, à temperatura ambiente. Após a remoção do excesso de anticorpo, o material foi incubado com o complexo streptoavidina-biotina- peroxidase diluído em PBS, por 35 minutos, à temperatura ambiente. Após a lavagem com PBS, a reação foi revelada utilizando diamino- benzidina- peróxido de hidrogênio em PBS, à temperatura ambiente, por 5 min., no escuro. Após controle da intensidade, a reação foi interrompida pela lavagem com água corrente por 5 min. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Mayer, por 45 segundos, sendo o excesso retirado com água corrente. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em hidróxido de amônia a 0,5%, por 10 segundos e lavadas novamente em água destilada. Finalmente, as mesmas foram submetidas à desidratação com álcool 95%, álcool absoluto, xilol e montadas com lamínulas em Entellan.

As células do tecido intestinal foram identificadas pela sua morfologia específica, localização e comportamento de coloração. Cada lâmina de microscópio continha duas porções do segmento intestinal. Um patologista por meio de uma análise cega para as condições experimentais utilizou uma microscópio de óptico para contar o número total de células imunomarcadas por campo no aumento de 40x.

4.5.7. Determinação dos níveis de Sulfeto de hidrogênio no Tecido Intestinal

Amostras de alças intestinais isoladas tratadas apenas com a toxina da cólera na dose de 1 µg/alça ou PBS 100 µl/alça, obtidas por meio do procedimento previamente descrito no item 4.5.1. foram utilizadas para determinar os níveis de H₂S de acordo com o método descrito por Gu e colaboradores (2013). Este método permite quantificar indiretamente os níveis de H₂S teciduais por meio da utilização de um tampão antioxidante diluído na amostra de interesse. Esse tampão contém salicilato de sódio, ácido ascórbico e NaOH, que convertem todo o H₂S no íon S²⁻, que é então mensurado por um microeletrodo de íon sulfeto. Segundo esse protocolo, inicialmente, as alças intestinais foram pesadas e homogeneizadas no tampão antioxidante diluído para se obter um homogenato a 10%. No homogenato de cada amostra foi então inserido o microelétrodo de íon sulfeto (*Lazar Research Laboratories*, Los Angeles, CA, EUA) ligado a um medidor de pH modelo 6230M (Jenco Instruments), seguindo as especificações do fabricante. As soluções padrões para a curva de calibração foram preparadas usando-se o NaHS como doador de sulfeto.

4.6. Estudo do mecanismo de ação antissecretória do H₂S

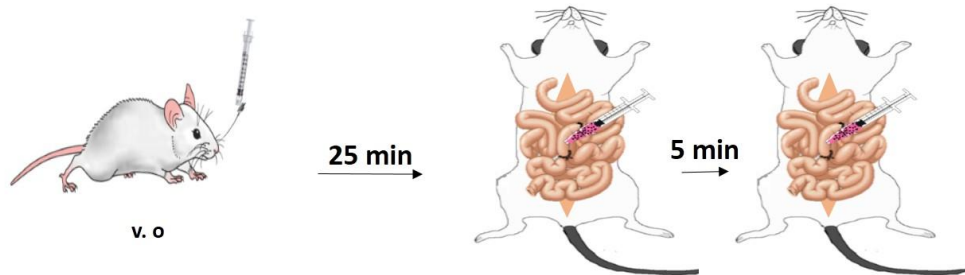
4.6.1. Papel da Adenilato Ciclase (AC), AMPc e Proteína Quinase A (PKA) no efeito antissecretório do H₂S

Para identificar a participação da via AC/AMPc/PKA no efeito antissecretório do H₂S, os camundongos, após um jejum de 24 horas, foram pré-tratados por gavagem com PAG na dose de 100 mg/kg ou solução salina (2,5ml/kg). Em seguida, após 25 minutos, foi realizado o procedimento da indução da diarreia na alça intestinal, previamente descrito no item 4.5.1, entretanto, antes da administração da toxina da cólera, os animais em determinados grupos receberam PBS (50 µl), SQ22536 na dose de 0,01M/alça (um inibidor de AC), Bupivacaina na dose de 100µM/alça (um inibidor da produção de AMPc) ou KT5720 na dose de 1µg/alça (um inibidor de PKA) diretamente na alça. Após 5 minutos, as alças intestinais foram então inoculados com 100 µl PBS para o grupo controle negativo pré-tratado apenas com solução salina e TC na dose de 1 µg/alça para o restante dos grupos. A escolha destas doses foram baseadas em estudos publicados na literatura e trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa (BUTTERWORTH et al., 1993; KINDLER et al., 2003; KANDILCI et al., 2008). Apesar da

Bupivacaina ser mais comumente usada como um anestésico local, ela também é capaz de inibir a produção de AMPc, fato observado em ensaios de cardiotoxicidade desse anestésico (BUTTERWORTH et al., 1993).

Com base no exposto, os grupos podem ser divididos como esquematizado na figura 10. Quatro horas após a anestesia, os animais foram eutanasiados e as alças isoladas foram rapidamente removidas da cavidade abdominal. A secreção de fluido intestinal foi medida indiretamente através da relação do peso/comprimento da alça expressa em g/cm.

Figura 10. Grupos experimentais para estudo do envolvimento da Adenilato Ciclase (AC), AMPc e Proteína Quinase A (PKA) no efeito antissecretório do H₂S.



AC	Sal. (2,5 ml/kg)	PBS (50 µL)	PBS (50 µL)
	Sal. (2,5 ml/kg)	PBS (50 µL)	TC 1 µg (50 µL)
	Sal. (2,5 ml/kg)	SQ22536 0,01M (50 µL)	TC 1 µg (50 µL)
	PAG (100 mg/kg)	SQ22536 0,01M (50 µL)	TC 1 µg (50 µL)

AMPc	Sal. (2,5 ml/kg)	PBS (50 µL)	PBS (50 µL)
	Sal. (2,5 ml/kg)	PBS (50 µL)	TC 1 µg (50 µL)
	Sal. (2,5 ml/kg)	Bupivacaina 100µM (50 µL)	TC 1 µg (50 µL)
	PAG (100 mg/kg)	Bupivacaina 100µM (50 µL)	TC 1 µg (50 µL)

PKA	Sal. (2,5 ml/kg)	PBS (50 µL)	PBS (50 µL)
	Sal. (2,5 ml/kg)	PBS (50 µL)	TC 1 µg (50 µL)
	Sal. (2,5 ml/kg)	KT5720 1µg (50 µL)	TC 1 µg (50 µL)
	PAG (100 mg/kg)	KT5720 1µg (50 µL)	TC 1 µg (50 µL)

4.6.2. Papel da Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no efeito antissecretório do H₂S

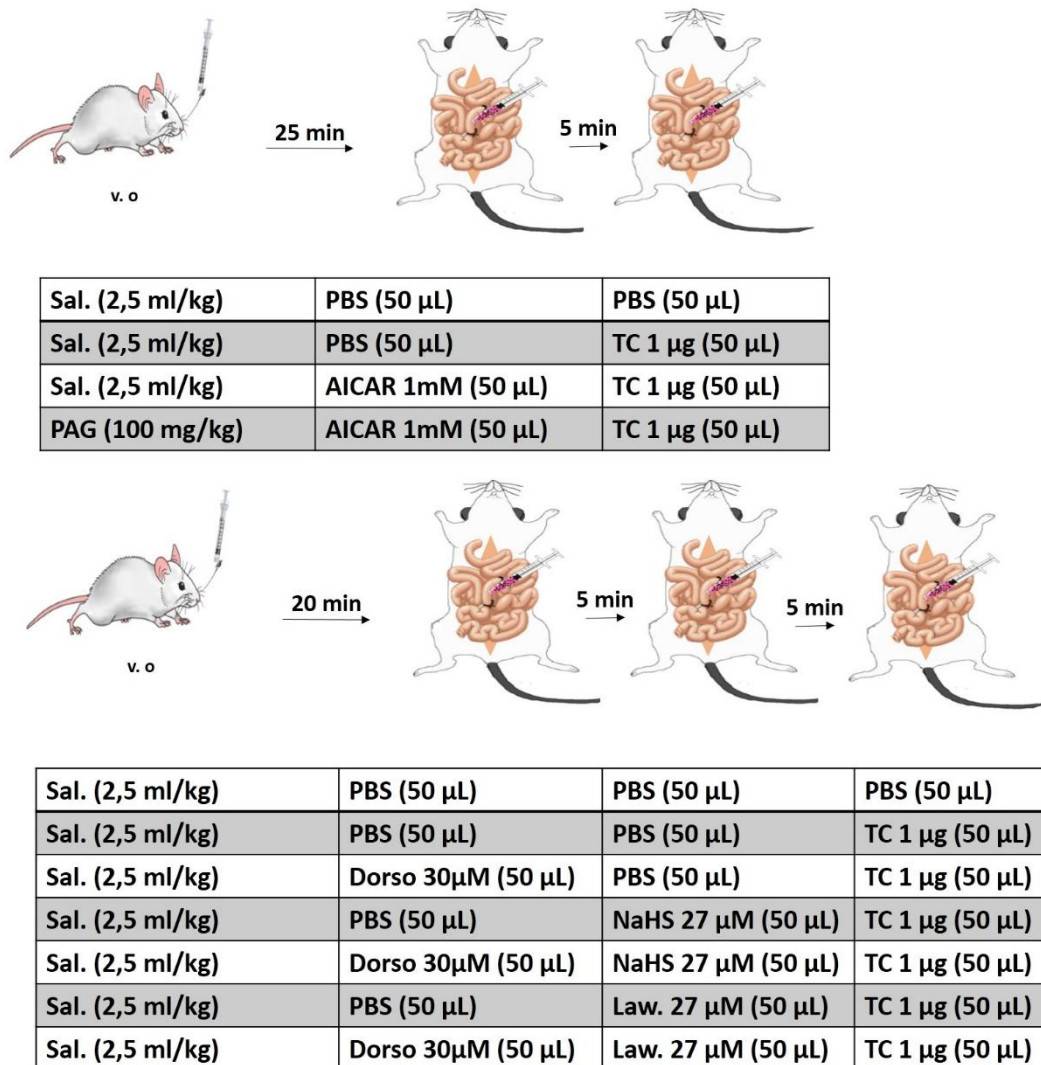
Para avaliar a participação da AMPK no efeito antissecretório do H₂S, os animais foram tratados, em protocolos experimentais diferentes, com AICAR, um ativador da AMPK, ou com dorsomorfina, um inibidor da AMPK.

No experimento em que foi utilizado o AICAR para avaliar a participação da AMPK no efeito antissecretório do H₂S, os camundongos, após um jejum de 24 horas, foram pré-tratados, por gavagem, com PAG na dose de 100 mg/kg ou solução salina (2,5ml/kg). Após 25 minutos, foi realizado o procedimento da indução da diarreia na alça intestinal isolada, previamente descrito no item 4.5.1, entretanto, antes da administração da toxina da cólera, em determinados grupos, os animais receberam AICAR na dose de 1mM/alça ou PBS (50 µl). Nos 5 minutos seguintes, as alças intestinais foram então inoculados com 100 µl PBS para o grupo controle negativo pré-tratado apenas com solução salina ou TC na dose de 1 µg/alça para o restante dos grupos. A escolha destas doses foram baseadas em estudo realizado por Kim e colaboradores (2010) e trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa. Com base no exposto os grupos podem ser divididos como esquematizado na figura 11. Quatro horas após a anestesia, os animais foram eutanasiados e as alças isoladas foram rapidamente removidas da cavidade abdominal. A secreção de fluido intestinal foi medida indiretamente através da relação do peso/comprimento da alça expressa em g/cm.

No experimento em que foi utilizada a dorsomorfina para avaliar a participação da AMPK no efeito antissecretório do H₂S, os camundongos, após um jejum de 24 horas, foram pré-tratados, por gavagem, com solução salina (2,5ml/kg). Em seguida, após 20 minutos foi realizado o procedimento da indução da diarreia na alça intestinal isolada, previamente descrito no item 4.5.1, entretanto, antes da administração da toxina da cólera, em determinados grupos, os animais receberam diretamente na alça Dorsomorfina na dose de 30µM ou PBS (50 µl). Nos 5 minutos seguintes as alças intestinais foram então inoculados com NaHS ou Reagente de Lawesson's ambos na dose de 27 µM/alça. Finalmente, após mais 5 minutos desses procedimentos as alças intestinais foram então novamente inoculados com 100 µl PBS para o grupo controle negativo pré-tratado apenas com solução salina ou TC na dose de 1 µg/alça para o restante dos grupos. A escolha destas doses foram baseadas em estudo realizado por Shen e colaboradores (2014) e trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa. Com base no exposto, os

grupos podem ser divididos como esquematizado na figura 11. Quatro horas após a anestesia, os animais foram eutanasiados e as alças isoladas foram rapidamente removidas da cavidade abdominal. A secreção de fluido intestinal foi medida indiretamente através da relação do peso/comprimento da alça expressa em g/cm.

Figura 11. Grupos experimentais para estudo do envolvimento da Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no efeito antissecretório do H₂S.



Fonte: Autoria própria.

4.7. Dados e análise estatística

Os dados estão apresentados como a média (\pm EPM) de animais em cada grupo (n=6-8). Os testes estatísticos foram realizados no software *Graphpad Prism* (versão 5.0). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi determinada por análise unidirecional da variância (ANOVA) seguida do teste comparações múltiplas de *Student-Newman-Keuls*. Para a análise dos níveis teciduais de H₂S intestinal e número de células imunomarcadas/campo no ensaio de imunohistoquímica foi utilizado o teste não paramétrico (teste t), seguido pelo teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

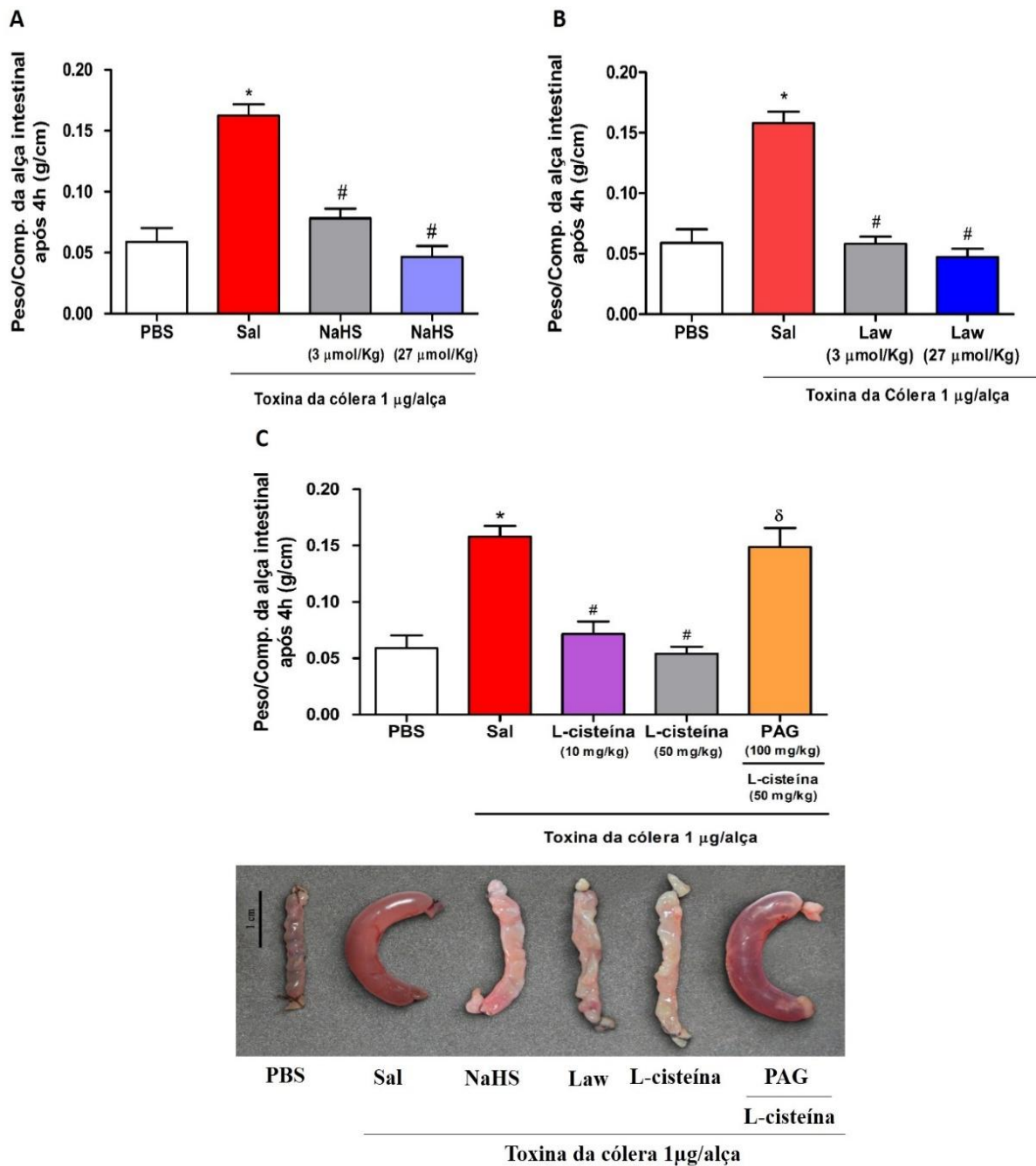
5.1. Estudo da ação antissecretória do H₂S

5.1.1. Efeito antissecretório do H₂S na diarreia induzida pela enterotoxina bacteriana do *Vibrio cholerae* em camundongos

Na Figura 12 podemos observar que os animais do grupo controle positivo tratados com salina e cujas alças foram inoculadas com a TC apresentaram um acúmulo excessivo de fluido intestinal, observado indiretamente através da relação peso/comprimento da alça. Ainda na figura 12 observa-se que o tratamento com doadores de H₂S (NaHS, em A, ou o reagente de Lawesson's, em B) ou com o precursor da síntese de H₂S (L-cisteína, em C) reduziram significativamente ($P < 0,001$), o acúmulo de fluido intestinal induzido pela TC. A L-cisteína (50 mg/kg), o (NaHS 27 $\mu\text{mol/kg}$) e o reagente de Lawesson's (27 $\mu\text{mol/kg}$), reduziram a secreção intestinal em ($0,054 \pm 0,006$ g/cm), ($0,047 \pm 0,009$ g/cm), ($0,047 \pm 0,007$ g/cm), respectivamente. Em C também foi verificado que a administração de PAG, que bloqueia a atividade da CSE, reverteu a efeito antissecretório da L-cisteína ($0,1488 \pm 0,0168$ g/cm).

A imagem em D mostra uma alça intestinal isolada de cada grupo em estudo, na qual observa-se um acúmulo excessivo de fluido na alça intestinal inoculada com a TC, grupo controle positivo, comparado ao grupo negativo onde as alças foram injetadas apenas com PBS. O pré-tratamento com NaHS, reagente de Lawesson's e L-cisteína reduziram a acumulação de fluido intestinal, e o pré-tratamento com PAG e L-cisteína reverte o efeito antissecretório da L-cisteína, causando uma intensa secreção intestinal.

Figura 12. Efeito do sulfeto de hidrogênio na diarreia induzida pela enterotoxina bacteriana do *Vibrio cholerae* em camundongos.

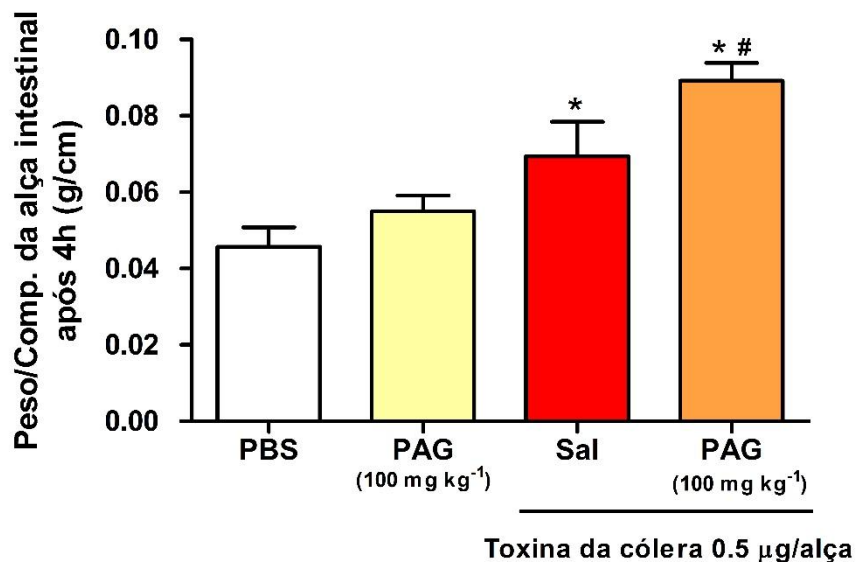


O pré-tratamento com NaHS (3 e 27 $\mu\text{mol/kg}$) (A), reagente de Lawesson's (3 e 27 $\mu\text{mol/kg}$) (B) e L-cisteína sozinha (10 e 50 mg/kg) (C) reduziu significativamente a secreção de fluido intestinal medida 4 h após a inoculação da toxina da cólera na alça intestinal (1 $\mu\text{g/alça}$). O pré-tratamento com PAG (100 mg/kg) e L-cisteína (50 mg/kg) (C) reverteu o efeito antissecretório da L-cisteína, causando uma intensa secreção intestinal. A secreção intestinal foi avaliada através da relação do peso/comprimento (g/cm) da alça intestinal. D. Alças intestinais de cada grupo em estudo. Os dados são expressos como média \pm EPM de um mínimo de 6 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Newman-Keuls. Diferenças significativas: * $P < 0,001$ vs. grupo PBS; # $P < 0,001$ vs. grupo TC. $\delta P < 0,001$ vs. grupo L-cisteína (50 mg/kg). Abreviaturas: PBS: solução tampão fosfatossalina; Sal: salina; Law: reagente de Lawesson's; PAG: DL-propargilglicina.

5.1.2. Efeito do PAG na dose submáxima da toxina da cólera

Para determinar o papel do H₂S na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera, os animais foram pré-tratados com PAG (100 mg/kg) seguido da administração intraluminal de uma dose submáxima de toxina da cólera (0,5 µg/alça). Utilizando metade dessa dose observou-se que o pré-tratamento com PAG promoveu um aumento significativo ($P < 0,01$) na secreção de fluido intestinal ($0,0891 \pm 0,0046$ g/cm) em relação ao grupo de controle tratado com a toxina (Figura 13). Nós também avaliamos o efeito do pré-tratamento com PAG (100 mg/kg) sem a administração de toxina, no qual foi observado que este não interfere com a secreção intestinal ($0,055 \pm 0,004$ g/cm). A toxina da cólera nessa dose promoveu um aumento significativo da secreção intestinal ($0,06938 \pm 0,0091$ g/cm).

Figura 13. Efeito do PAG sobre a secreção de fluido intestinal induzida por um dose submáxima da toxina da cólera

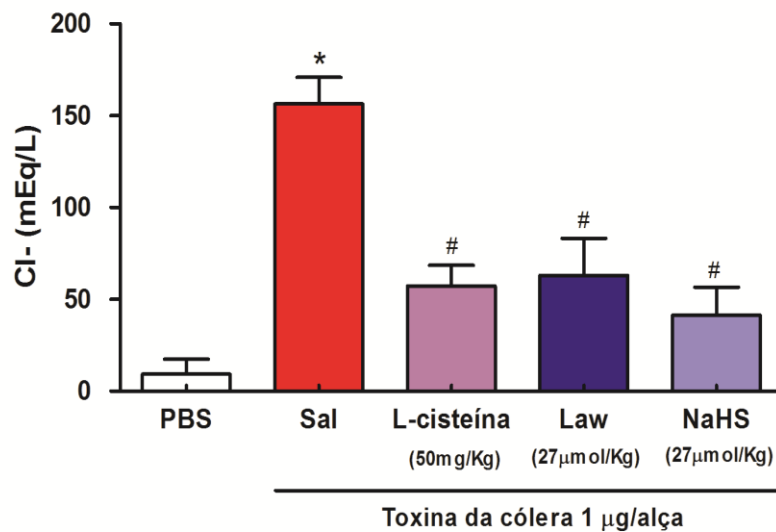


O pré-tratamento com PAG (100 mg/kg) aumentou significativamente a secreção de fluido intestinal medida 4 h após a inoculação da toxina da cólera na alça intestinal (0,5 µg/alça). A secreção intestinal foi avaliada através da relação do peso/comprimento (g/cm) da alça intestinal. Os dados são expressos como média \pm EPM de um mínimo de 6 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Newman-Keuls. Diferenças significativas: * $P < 0,001$ vs. grupo TC (0,5 µg/alça) ; # $P < 0,001$ vs. grupo PAG 100 mg/kg. Abreviaturas: PBS: solução tampão fosfato-salina; Sal: salina; PAG: DL-propargilglicina.

5.1.3. Efeito do H₂S sobre a secreção intestinal de íons Cl⁻ provocada pela toxina do *Vibrio cholerae*

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a concentração de íons cloreto aumentou significativamente nas alças intestinais inoculadas com a TC ($156.5 \pm 14,51$ mEq/L) em comparação com as alças inoculadas com PBS ($9,21 \pm 8,0$ mEq/L). O tratamento com NaHS, reagente de Lawesson's e L-cisteína reduziram significativamente ($P < 0,001$) os níveis de cloreto nas alças intestinais ($41,47 \pm 15,07$ mEq/L, 73,51% de inibição), ($63,16 \pm 20,07$ mEq/L, 59,64% de inibição), ($57,27 \pm 11,35$ mEq/L, 63,41% de inibição) respectivamente, como mostrado na Figura 14. Estes resultados indicam que o H₂S reduz o efluxo de íons cloreto para o lúmen intestinal característico da diarreia induzida pela TC.

Figura 14. Efeito do sulfeto de hidrogênio sobre os níveis de cloreto presentes em alças intestinais isoladas de camundongos inoculadas com TC.

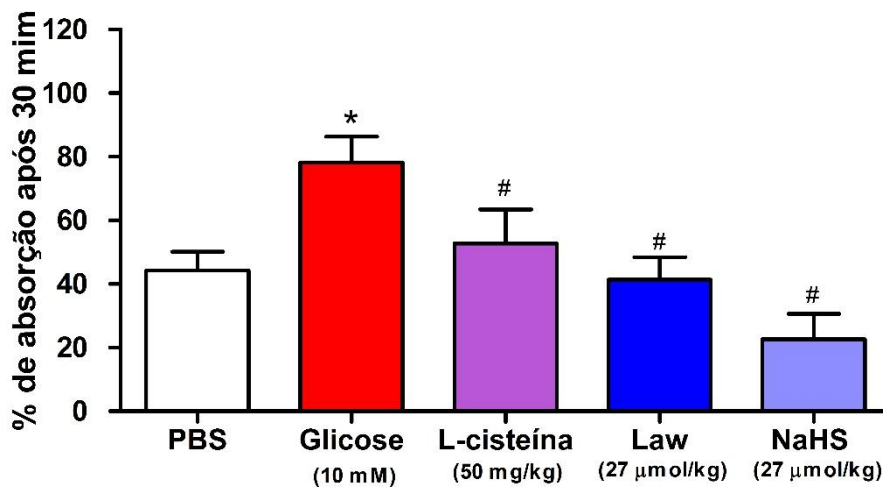


O tratamento com NaHS, reagente de Lawesson's e L-cisteína diminuiu de forma significativa o efluxo de íons cloreto para o lúmen intestinal, característico da diarreia secretória induzida pela TC. Os dados são expressos como média ± EPM de um mínimo de 6 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Newman-Keuls. Diferenças significativas: * $P < 0,001$ vs. grupo PBS; # $P < 0,001$ vs. grupo TC. Abreviaturas: PBS: solução tampão fosfato-salina; Sal: salina; Law: reagente de Lawesson's.

5.1.4. Efeito da H₂S na absorção intestinal

O efeito do H₂S sobre a absorção intestinal foi estudado 30 minutos após a inoculação intraluminal de 200 µl de PBS, glicose 10 mM, NaHS, reagente de Lawesson's ou L-cisteína em alças intestinais isoladas de camundongos. A figura 15 mostra que a administração de uma solução de glicose 10 mM, promove uma significativa ($P < 0,001$) absorção intestinal ($78,25 \pm 8,0\%$), quando comparada com o grupo controle negativo no qual foi administrado PBS ($44,26 \pm 5,91\%$ de absorção). A injeção intraluminal de NaHS, reagente de Lawesson's ou L-cisteína nas alças isoladas não demonstraram efeito expressivo na absorção intestinal: ($22,64 \pm 8,03\%$ de absorção), ($41,33 \pm 7,08\%$ de absorção), ($52,75 \pm 10,73\%$ de absorção), respectivamente. Estes resultados indicam que o efeito do antissecretório do H₂S sobre a secreção de fluido intestinal estimulada pela TC provavelmente é mediado por outro mecanismo, não envolvido com o aumento da absorção intestinal.

Figura 15. Efeito do sulfeto de hidrogênio na absorção intestinal.

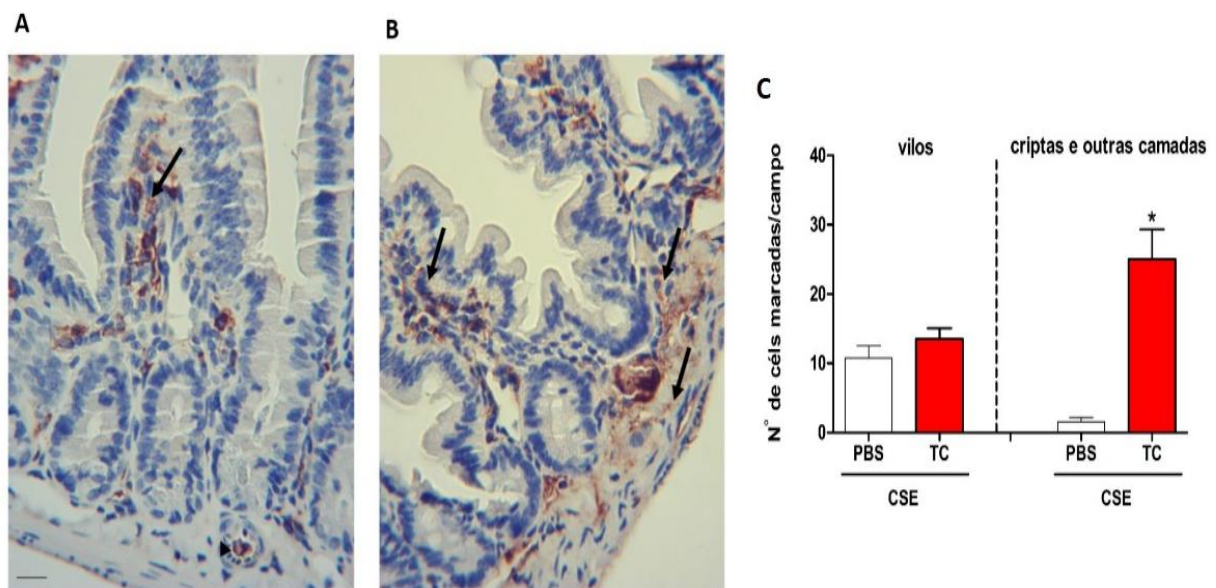


O tratamento com NaHS, reagente de Lawesson's e L-cisteína não alterou expressivamente a absorção intestinal medida como uma porcentagem da razão peso/comprimento 30 minutos após a inoculação intraluminal dos compostos em estudo. Os dados são expressos como média \pm EPM de um mínimo de 6 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Newman-Keuls. Diferenças significativas: * $P < 0,001$ vs. grupo PBS; # $P < 0,001$ vs. grupo TC. Abreviaturas: PBS: solução tampão fosfato-salina; Sal: salina; Law: reagente de Lawesson's.

5.2. Avaliação imunohistoquímica para cistationina- γ -liase (CSE) no intestino delgado de camundongos tratados com PBS ou toxina do *V. cholerae*

Na figura 16 podemos observar que as alças intestinais tratadas apenas com PBS, houve imunomarcção para CSE especialmente na lâmina própria da camada mucosa das vilosidades intestinais. Uma pequena marcação nos vasos sanguíneos também foi observada (A). No entanto, quando as alças intestinais foram inoculadas com a TC a marcação foi observada em outras porções do tecido intestinal, na qual é possível observar além de uma intensa marcação para CSE na lâmina própria da camada mucosa das vilosidades, há também uma intensa marcação nas criptas e alguma marcação nas camadas mais profundas do tecido intestinal (muscular e serosa). Quanto a análise quantitativa do número de células marcadas, os resultados em C indicam que a imunomarcção das células da camada mucosa das vilosidades são praticamente iguais entre os grupos tratados com a toxina da cólera e PBS ($13,50 \pm 1,555$ vs $10,75 \pm 1,750$, respectivamente) não sendo observado diferença estatística entre estes. No entanto ao analisar-se a quantidade de células marcadas nas criptas intestinais e outras camadas intestinais encontrou-se diferença significativa ($P < 0,001$) entre o grupo tratado com a toxina da cólera e PBS ($25,00 \pm 4,301$ vs $1,5 \pm 0,64$, respectivamente).

Figura 16. Imunohistoquímica para cistationina- γ -liase (CSE) no intestino delgado de camundongos normais ou tratados com toxina do *V. cholerae*.



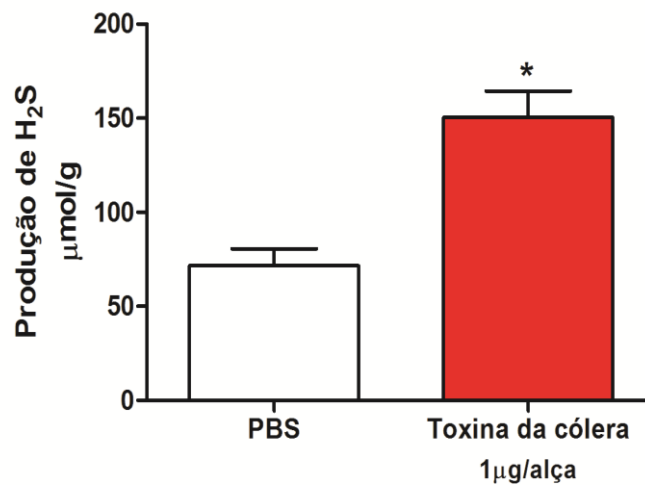
Imunomarcção para CSE no intestino delgado de animal tratado apenas com PBS (A) ou com toxina do *V. cholerae* (B). Barra de escala: 50 μ m. Em A, a seta indica marcação para a camada mucosa da vilosidade intestinal e a cabeça de seta indicando marcação para os vasos sanguíneos. Em B as setas indicam marcação para a camada

mucosa das vilosidades e criptas, e camadas mais profundas do tecido intestinal. C. Diferenças quantitativas dos padrões de imunomarcção observado entre o grupos tratados com PBS e Toxina da cólera em relação as camadas do tecido intestinal. Os dados são expressos como média \pm EPM de um mínimo de 6 animais por grupo. Os resultados foram analisados por Teste t seguido por Mann-Whitney. Diferenças significativas: * $P < 0,001$ vs. grupo PBS.

5.3. Avaliação dos níveis de H₂S no intestino delgado de camundongos tratados com PBS ou toxina do *V. cholerae*

Na figura 17 podemos observar um aumento de modo significativo ($P < 0,001$) dos níveis de H₂S nas alças intestinais inoculadas com a TC ($150,30 \pm 14,04 \mu\text{mol/g}$ de tecido), quando comparado com as alças intestinais tratadas apenas com PBS ($71,61 \pm 8,94 \mu\text{mol/g}$ de tecido).

Figura 17. Níveis de H₂S no intestino delgado de camundongos tratados com PBS ou toxina do *V. cholerae*.



O tratamento com a Toxina da cólera aumentou de modo significativo os níveis teciduais de H₂S. Os dados são expressos como média \pm EPM de um mínimo de 6 animais por grupo. Os resultados foram analisados por Teste t seguido por Mann-Whitney. Diferenças significativas: * $P < 0,001$ vs. grupo PBS.

5.4. Estudo do mecanismo de ação antissecretório do H₂S

5.4.1. Papel da Adenilato Ciclase (AC), AMPc e Proteína Quinase A (PKA) no efeito antissecretório do H₂S

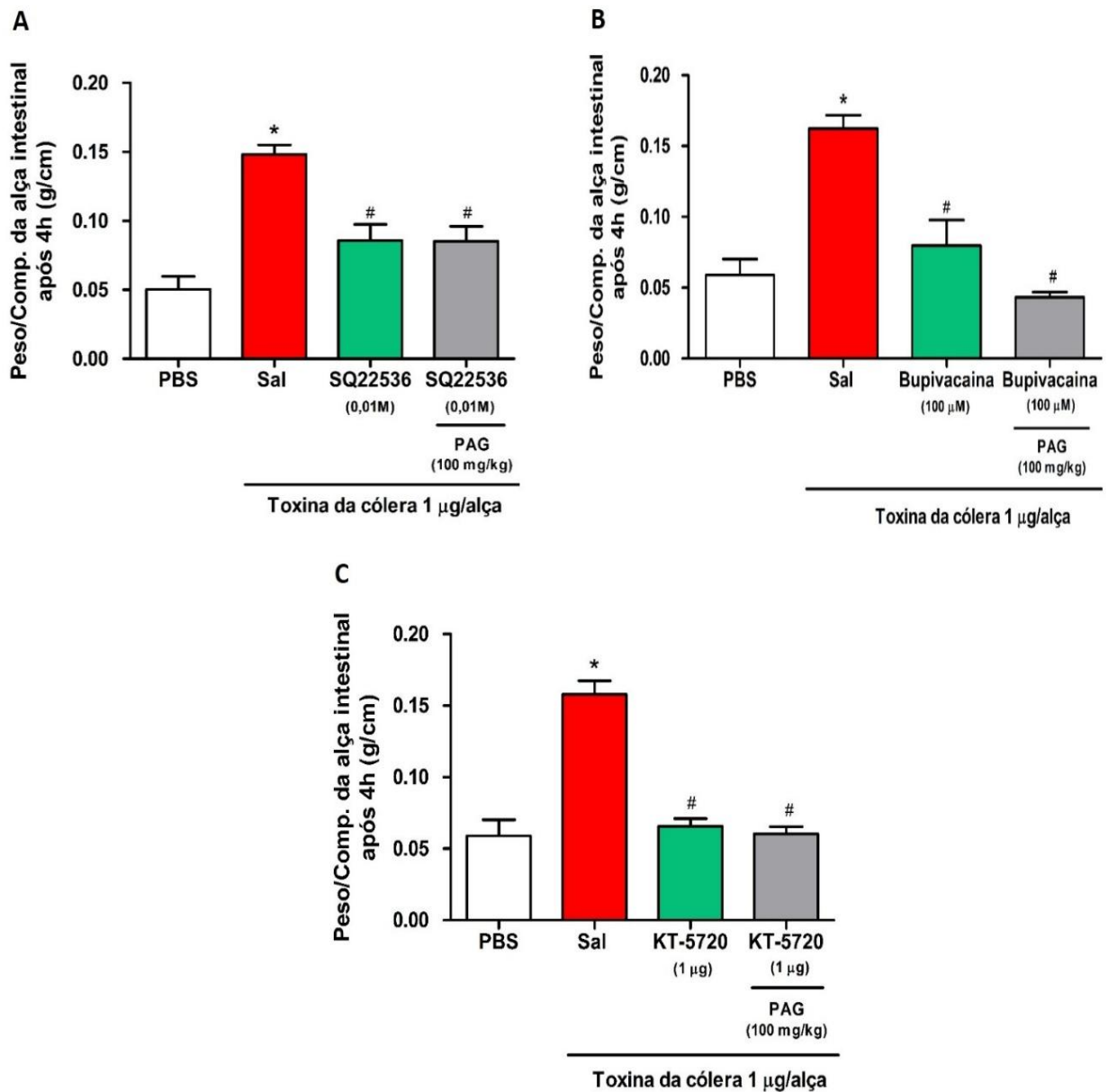
Na figura 18, é possível observar que a administração da TC induz de modo significativo ($P < 0,001$) um acúmulo excessivo de fluido intestinal em relação ao grupo que recebeu PBS na alça. Como mostrado anteriormente no item 5.1.1, o H₂S endógeno, por meio da L-cisteína ou exógeno, produzido pelos doadores, reduz a secreção intestinal induzida pela TC, e o pré-tratamento com PAG (100 mg/kg, v.o) reverte o efeito antissecretório da L-cisteína.

Para avaliar o envolvimento da AC no efeito antissecretório do H₂S (A), os animais foram tratados diretamente na alça isolada com SQ22536 0,01M, um inibidor específico da AC, que promoveu uma redução significativa ($P < 0,001$) da secreção de fluido intestinal ($0,0857 \pm 0,0118$ g/cm) induzida pela TC. Entretanto, o pré-tratamento com PAG (100 mg/kg, v.o) não reverteu o efeito protetor do SQ22536 ($0,0853 \pm 0,0107$ g/cm).

O papel do AMPc no efeito antissecretório do H₂S (B) também foi avaliado, no qual os animais foram tratados diretamente na alça isolada com Bupivacaina 100 μ M, um inibidor da produção de AMPc, que promoveu uma redução significativa ($P < 0,001$) da secreção de fluido intestinal ($0,0797 \pm 0,0183$ g/cm) induzida pela TC. Contudo, o pré-tratamento com PAG (100 mg/kg, v.o) não reverteu o efeito protetor da Bupivacaina ($0,0432 \pm 0,0037$ g/cm).

No estudo do envolvimento da PKA no efeito antissecretório do H₂S (C), os animais foram tratados diretamente na alça isolada com KT5720 1 μ g, um inibidor específico da PKA, que promoveu uma redução significativa ($P < 0,001$) da secreção de fluido intestinal ($0,0658 \pm 0,0053$ g/cm) induzida pela TC. Porém, o pré-tratamento com PAG (100 mg/kg, v.o) não reverteu o efeito protetor do KT5720 ($0,06038 \pm 0,0051$ g/cm). Estes dados sugerem que provavelmente o efeito antissecretório H₂S não se dá por meio da sua ação sobre a AC, AMPc ou PKA.

Figura 18. Papel da AC, AMPc e PKA no efeito antissecretório do sulfeto de hidrogênio na diarreia induzida pela enterotoxina bacteriana do *V. cholerae* em camundongos.



O tratamento com SQ22536 0,01M (A) Bupivacaina 100µM (B) e KT5720 1µg (C) reduziu de modo significativo a secreção de fluido intestinal. Porém, o pré-tratamento com PAG (100 mg/kg, v.o) não reverteu o efeito protetor desses compostos. Os dados são expressos como média ± EPM de um mínimo de 6 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Newman-Keuls. Diferenças significativas: *P < 0,001 vs. grupo PBS; #P < 0,001 vs. grupo TC. Abreviaturas: PBS: solução tampão fosfato-salina; Sal: salina; Law: reagente de Lawesson's; PAG: DL-propargilicina.

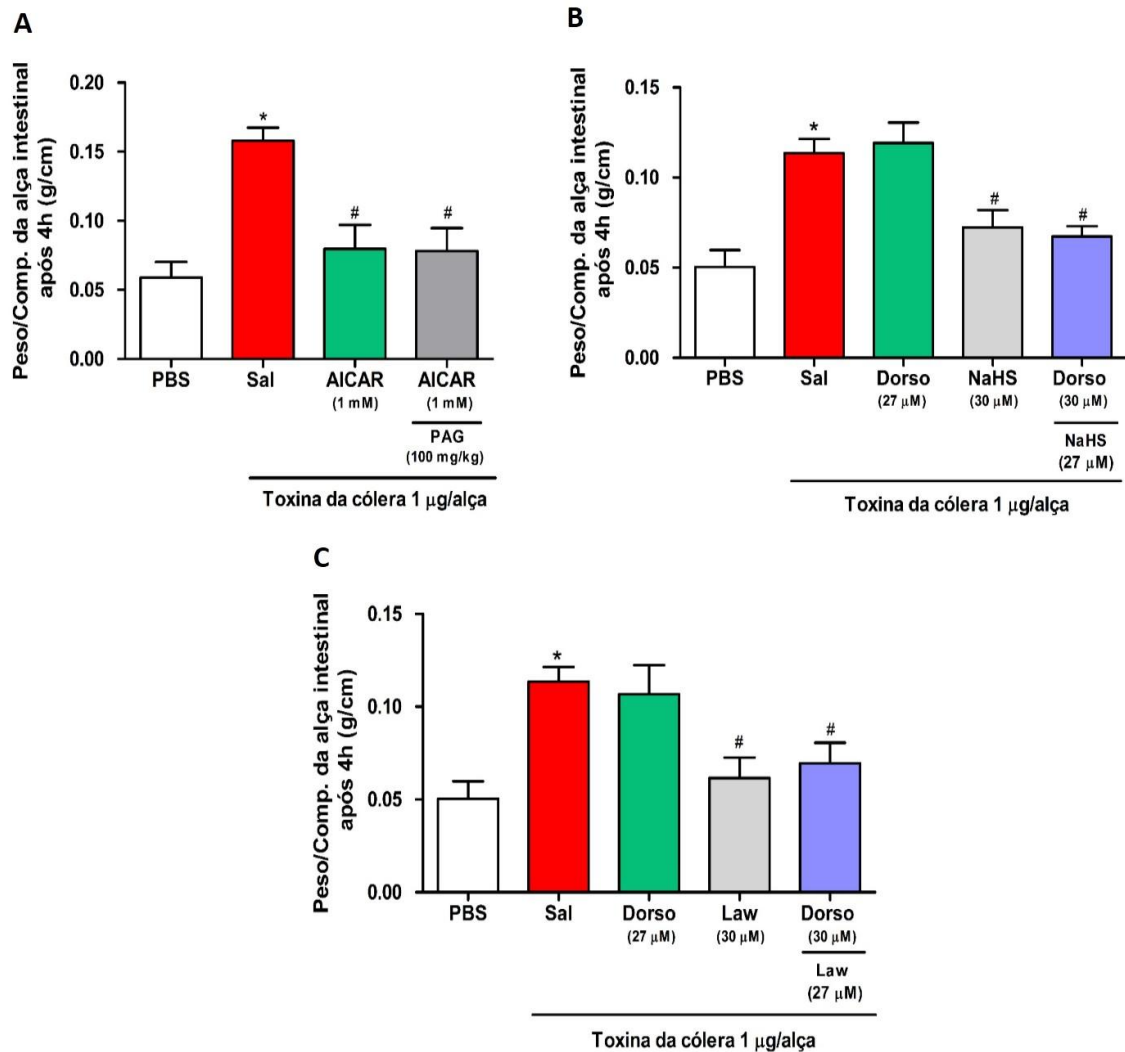
5.4.2. Papel da Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no efeito antissecretório do H₂S

O papel da AMPK no efeito antissecretório do H₂S na diarreia induzida pela TC foi avaliado por meio de um ativador e um inibidor específico da AMPK: AICAR (Figura 19 A) e Dorsomorfina (Figura 19 B e C), respectivamente. Na figura 18 podemos observar que os animais cujas alças foram inoculadas com TC apresentaram de modo significativo ($P < 0,001$) um acúmulo excessivo de fluido intestinal em relação ao grupo que recebeu PBS na alça.

Para avaliar o papel da AMPK por meio da inoculação de AICAR diretamente na alça, os animais foram pré-tratados com PAG, que como mostrado no item 5.1.1 reverte o efeito antissecretório da L-cisteína. Em A é possível observar que o tratamento com AICAR 1mM promove uma redução significativa ($P < 0,01$) da secreção de fluido intestinal ($0,0797 \pm 0,0175$ g/cm) induzida pela TC. Contudo, o pré-tratamento com PAG (100 mg/kg, v.o) não reverte o efeito protetor do AICAR ($0,0782 \pm 0,0166$ g/cm).

A dorsomorfina administrada diretamente na alça também foi utilizada para confirmar os resultados anteriores. Por ser um inibidor específico da AMPK, o tratamento com dorsomorfina promoveu, como esperado, um acúmulo excessivo de fluido intestinal ($0,1192 \pm 0,0114$ g/cm, Figura 18 B e C). O tratamento com NaHS 27 μ M (B) e reagente de Lawesson's 27 μ M (C) diretamente na alça reduziram significativamente ($P < 0,01$), o acúmulo de fluido intestinal induzido pela TC ($0,0724 \pm 0,0097$ g/cm e $0,0616 \pm 0,0109$ g/cm, respectivamente). Por outro lado, a administração de dorsomorfina seguida por NaHS ou reagente de Lawesson's diretamente na alça não reverteu o efeito antissecretório dos doadores ($0,0673 \pm 0,0056$ g/cm e $0,0695 \pm 0,0115$ g/cm, respectivamente). Assim, esses dados sugerem que o sulfeto de hidrogênio reduz a secreção intestinal induzida pela TC provavelmente por um mecanismo independente da AMPK.

Figura 19. Papel da AMPK no efeito antissecretório do sulfeto de hidrogênio na diarreia induzida pela enterotoxina bacteriana do *V. cholerae* em camundongos.



O tratamento com AICAR (A) reduziu de modo significativo ($P < 0,001$) a secreção de fluido intestinal. Entretanto o pré-tratamento com PAG não reverteu o efeito protetor do AICAR. O tratamento intraluminal com NaHS (B) e reagente de Lawesson's (C) na alça isolada reduziram significativamente a acumulação de fluido intestinal induzida pela TC. A dorsomorfina promoveu um acúmulo excessivo de fluido intestinal. Por outro lado, a administração de dorsomorfina seguida por NaHS ou reagente de Lawesson's não reverteu o efeito antissecretório dos doadores. Os dados são expressos como média \pm EPM de um mínimo de 6 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Newman-Keuls. Diferenças significativas: * $P < 0,001$ vs. grupo PBS; # $P < 0,001$ vs. grupo TC; $\delta P < 0,01$ vs. grupo Dorso. Abreviaturas: PBS: solução tampão fosfato-salina; Sal: salina; Law: reagente de Lawesson's; PAG: DL-propargilglicina; Dorso: Dorsomorfina.

6. DISCUSSÃO

O interesse na realização do presente trabalho surgiu, em parte, devido a cólera continuar a ser uma ameaça significativa para a saúde pública global, resultando em cerca de 100.000 mortes por ano (TAYLOR et al., 2015). A solução de reidratação oral (SRO) foi estabelecida como a única medida terapêutica para esse tipo de acometimento (BINDER et al., 2014). Apesar de combater a desidratação, a eficácia da SRO é limitada, particularmente nos jovens e idosos, em que a perda intensa de fluido intestinal pode ser complicada nos casos de desnutrição e pneumonia. Outro fator que limita a eficácia da SRO consiste na dificuldade de repor grandes quantidades desta, principalmente nos casos de cólera associados a desastres naturais (DESJEUX; BRIEND; BUTZNER, 1997). Assim, a busca por moléculas antissecretórias para o tratamento da cólera pode ser eficaz quando a SRO não está disponível, como durante desastres naturais, sendo que moléculas antissecretórias poderiam potencializar a eficácia da SRO (MUNOS, WALKER; BLACK, 2010). Portanto, os objetivos do presente estudo foram investigar a atividade antissecretória do sulfeto de hidrogênio na diarreia secretora induzida pela toxina da cólera em camundongos e identificar seu possível mecanismos de ação.

No presente estudo, demonstrou-se pela primeira vez que o NaHS, reagente de Lawesson's (moléculas doadores de H₂S) e a L-cisteína (um substrato para a síntese de H₂S) possuem eficácia antidiarreica, por meio de sua ação antissecretória, na acumulação de líquido intestinal, nas alças intestinais isoladas tratadas com toxina da cólera, em camundongos, reduzindo significativamente a secreção de fluido intestinal e a perda de íons Cl⁻ extracelular (Figura 20). No intestino o controle do transporte de íons e conseqüentemente da absorção e secreção fluido intestinal é realizado por neurotransmissores, hormônios e substâncias de ação parácrina, bem como, alguns estudos sugerem que moléculas gasotransmissores como CO, NO e H₂S, também podem regular esta importante função intestinal (POUOKAM; STEIDLE; DIENER, 2011). Hennig e Diener (2009) estudando os efeitos do H₂S sobre o transporte de íons através do cólon distal mostraram que o H₂S afeta processos chaves do transporte iônico dentro do epitélio colônico, e concluíram que produção endógena de H₂S pode contribuir para mecanismos basais de transporte de íons no epitélio. Sob condições de normóxia, a produção endógena de H₂S parece envolver neurônios submucosos, no entanto, como o H₂S contribui para a regulação do transporte de íons ainda continua é desconhecida (SCHICHO et al., 2006; POUOKAM; ALTHAUS, 2016). Em um estudo usando diferentes compostos geradores de H₂S, Pouokam e Diener (2012) demonstraram por meio da secreção de íons cloreto em enterócitos de rato que a concentração local de H₂S parece determinar criticamente se este

gasotransmissor exerce uma ação pró-secretória ou antissecretória na mucosa gastrointestinal. No modelo de secreção intestinal induzido pela toxina da cólera em alças intestinais avaliado neste estudo, verificou-se que o sulfeto de hidrogênio possui ação antissecretória.

Este efeito antissecretório também foi evidenciado pelo fato do PAG reverter o efeito da L-cisteína induzindo uma severa secreção intestinal. O PAG tem sido comumente utilizado como um inibidor seletivo da enzima CSE e usado para inibir a produção de H₂S no nível celular ou ao nível tecidual e também em algumas experimentos in vivo utilizando modelos animais de doenças, onde normalmente inibe o efeito protetor do H₂S (SZABO, 2007).

Além do efeito antissecretório esses achados iniciais também nos levaram à hipótese de que o sulfeto de hidrogênio é uma molécula essencial para a proteção contra os efeitos nocivos da toxina da cólera. Testamos esta hipótese pré-tratando os animais com PAG e posteriormente administrando uma dose submáxima da toxina de cólera (0,5 µg/alça). Através desse ensaio, observou-se que o pré-tratamento com PAG seguido de um dose submáxima da toxina da cólera, promoveu um aumento (maior do que o observado para o grupo controle tratado apenas com a dose submáxima da toxina da cólera) nos níveis de secreção intestinal, confirmando assim esta hipótese. Nessa dose a toxina da cólera não promoveu um aumento nos níveis de secreção intestinal. Isto foi necessário, uma vez que, nos ensaios anteriores o pré-tratamento com PAG em associação com a toxina da cólera na dose de 1 µg/alça, não piorou a secreção intestinal, em relação ao grupo controle positivo tratado apenas com a toxina nessa dose. Acreditamos que isso possa ter ocorrido devido a toxina de cólera na 1 µg/alça seja capaz de induzir o máximo de secreção que possa ser realizada pelo tecido da alça intestinal. Wallace e colaboradores (2012) tem sugerido a importância do H₂S na proteção intestinal como uma molécula importante para a regulação e modulação das mucosa intestinal. Tem sido mostrado que o sulfeto de hidrogênio, por meio de moléculas doadoras também apresenta efeitos protetores em outras lesões intestinais, como na colite induzida por dextran sulfeto de sódio (DSS) e TNBS em camundongos (MATSUNAMI et al., 2009; HIRATA et al., 2011).

Com base nesses resultados nós também investigamos o papel do H₂S na absorção intestinal. Isto foi necessário para excluir a hipótese de que o H₂S estaria agindo diminuindo a acumulação de fluido intestinal por meio de um possível aumento da absorção intestinal. Nossos resultados mostraram que o H₂S não interfere no processo de absorção de fluido intestinal, indicando que ele pode estar atuando por outros mecanismos, talvez interferindo no processo fisiopatológico da cólera. Embora o H₂S seja uma molécula de sinalização emergente em órgãos

como o intestino, seus efeitos sobre o transporte epitelial de Na^+ e conseqüentemente sobre os processos de absorção intestinal nesse órgão é amplamente desconhecido (ALTHAUS, 2012).

Endogenamente o H_2S é sintetizado a partir de L-cisteína principalmente por duas enzimas chaves: CSE e CBS. Em alguns tecidos, CSE e CBS são ambas necessárias para a geração de H_2S , enquanto que em outros uma enzima é suficiente. No trato gastrintestinal, o H_2S é produzido principalmente pela enzima CSE (LINDEN et al., 2010). Em relação aos níveis de H_2S em tecidos humanos, Olson (2009) mostrou que as concentrações de H_2S estão entre 30 e 300 μM no plasma ou no sangue, mas o valor exato desta concentração permanece desconhecido, porque o nível de H_2S em vários tecidos humanos pode depender do método, que é usado para a medição. Sabe-se que no cérebro a concentração fisiológica de H_2S é até três vezes maior do que no soro. No intestino a concentração local é pouco conhecida (OLAS, 2015). Nesse trabalho também demonstrou-se que em alças intestinais isoladas de camundongos há um aumento da expressão de CSE, principalmente nas criptas intestinais, evidenciada pela técnica de imuno-histoquímica. Da mesma forma, a toxina da cólera também causou um aumento na produção de H_2S , sendo observado uma média de 150,3 $\mu\text{mol/g}$ de tecido de tecido intestinal, no modelo em estudo. Estes efeitos não foram observados em alças intestinais administradas com PBS. Estes dados sugerem que o tecido intestinal pode tentar compensar o efeito prejudicial da toxina da cólera por um aumento da produção de H_2S para melhorar a autodefesa da mucosa protetora e promover mecanismos antissecretórios, provavelmente pelo aumento da expressão de CSE nas criptas intestinais, como observado, local onde ocorre maior secreção de fluido intestinal. Esta observação está de acordo com achados prévios de outros processos fisiopatológicos no trato gastrointestinal (CHAN; WALLACE, 2013). No modelo de úlcera induzida por ácido acético em ratos foi demonstrado que logo após a indução da úlcera, existe uma marcada regulação positiva da expressão de CSE no local da lesão e conseqüentemente um aumento na síntese de H_2S (WALLACE et al., 2007); O mesmo efeito foi observado na colite em ratos (FLANNIGAN et al., 2013) e no dano da mucosa gástrica induzido por etanol em camundongos (MEDEIROS et al., 2013).

Na fisiopatologia da cólera o aumento da secreção de fluido intestinal requer funções cooperativas de várias proteínas de transporte, incluindo canais Cl^- apicais (por exemplo, o canal de Cl^- ativado por AMP cíclico (CFTR)), canais basolaterais de K^+ (por exemplo, o canal de K^+ ativado por AMPc) e o transportador basolateral (por exemplo, o co-transportador de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (NKCC)). O aumento do AMPc intracelular causado pela toxina da cólera induz a abertura dos correspondentes canais de Cl^- apicais e dos canais basolaterais de K^+ , o que permite

a secreção aumentada de Cl^- transepitelial (PONGKORPSAKOL et al., 2015). Estudos que buscam moléculas que possam promover uma redução da secreção de Cl^- intestinal na diarreia induzida pela toxina cólera mostram que esta redução pode ocorrer através da inibição de qualquer uma destas proteínas de transporte, bem como diminuição das moléculas efetoras de sinalização nos enterócitos (como o segundo mensageiro AMPc). Um bom exemplo que comprova que estas vias de sinalização são potenciais alvos antissecretórios, consiste nos estudos de eficácia de uma pequena molécula ativadora da enzima fosfodiesterase (PDE), que reduz consideravelmente os níveis de AMPc e conseqüentemente a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera no mesmo modelo de alça intestinal isolada em camundongos usado nesse estudo (TRADTRANTIP et al., 2009). Baseado nestes importantes achados e alvos, avaliamos o papel da via AC/cAMP/PKA no efeito antissecretório do H_2S .

Embora não existam relatos dos efeitos do sulfeto de hidrogênio através da inibição da AC em doenças do trato gastrointestinal, recentemente, vários estudos indicaram que moléculas doadoras de H_2S , como o NaHS, têm a capacidade de inibir a atividade da AC e assim reduzir a formação de AMPc em diferentes tipos de células e tecidos tais como células renais, neuronais e de músculo liso da aorta e artéria cerebral de ratos (LIM et al., 2008, YANG et al., 2014, NAGPURE; BIAN 2014, LI et al., 2015). É interessante notar que o H_2S regula a produção de AMPc de diferentes maneiras em vários sistemas. Foi observado que o H_2S aumenta a produção de AMPc nas células cerebrais (KIMURA, 2000), mas inibe a atividade da AC/AMPc em cardiomiócitos (YONG et al., 2008). Vários mecanismos estão provavelmente envolvidos nesta discrepância. Primeiro, o local de ação primária de H_2S pode não estar na AC e PDE. O H_2S pode regular as atividades destas enzimas indiretamente via estimulação de diferentes mecanismos de sinalização em várias células. Devido a isso também é importante avaliar o seu efeito sobre a atividade do AMPc e PKA. O H_2S também pode atuar em diferentes isoformas da AC, como no cérebro e tecidos cardiovasculares, portanto, causando diferentes efeitos na produção de AMPc. Assim, é razoável especular o envolvimento da via AC/AMPc, que é ativada excessivamente na cólera, no efeito antissecretório do H_2S observado nesse estudo. Apesar destes dados da literatura, nosso estudo mostrou que o efeito inibitório do H_2S na diarreia secretora induzida pela toxina da cólera provavelmente não ocorre por sua ação na via AC/AMPc/PKA (Figura 20). No entanto sem mensurar a expressão e atividade das enzimas AC e PDE não é possível concluir com total certeza esse resultado, devido a isso mais pesquisas precisam ser realizadas para confirmar esses resultados.

Entre os estudos que buscam estratégias alternativas focadas na modulação farmacológica da inibição do aumento do fluxo de íons cloreto induzido pela toxina da cólera, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) surge como um potencial candidato (ROGERS et al., 2013). AMPK é uma importante quinase considerada um sensor de energia intracelular que controla a homeostase energética celular ao nível de vários tecidos. A AMPK tem por função fosforilar proteínas alvo e modular suas atividades funcionais em resposta ao aumento dos níveis intracelulares de AMP quando comparado com os níveis de ATP (MUANPRASAT et al., 2015). Nas células epiteliais intestinais, a AMPK quando ativada pelo aumento dos níveis de AMPc, fosforila o canal CFTR inibindo a secreção de íons Cl^- (WALKER et al., 2003). Devido a este efeito observado em células intestinais a AMPK tem sido implicada como alvo de drogas para redução da perda de fluido intestinal em diarreias secretoras, especialmente a cólera. Muanprasat e colaboradores (2015), por exemplo, demonstraram que um oligossacarídeo obtido a partir da quitina é capaz de ser absorvido pelo epitélio intestinal e reduzir a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera no modelo de alça intestinal isolada em camundongos. Nesse mesmo trabalho os autores também concluíram que esse efeito antissecretório contra a toxina da cólera ocorre devido a ativação da AMPK. Baseado nesse alvo potencial nós decidimos avaliar se o efeito benéfico do H_2S seria devido a ativação da AMPK.

Muitos efeitos do H_2S , incluindo inibição da inflamação vascular na diabetes (MANNA; JAIN 2013), atividade anti-osteoporose (Yang et al., 2014) e supressão da neuroinflamação (ZHOU et al., 2014) entre outros, foram observados devido a ativação da AMPK. Xie e colaboradores (2015) também observaram que o H_2S reverte os efeitos lesivos da isquemia miocárdica quando administrado após a indução desta e sugeriram que seu efeito é devido à ativação da AMPK, porque o tratamento com dorsomorfina (um inibidor da AMPK) aboliu o efeito benéfico dos doadores de H_2S . Contrariando estes resultados, no nosso estudo o tratamento com dorsomorfina não aboliu o efeito inibitório do sulfeto de hidrogênio na diarreia induzida pela toxina da cólera. Assim, estes dados sugerem que o sulfeto de hidrogênio reduz a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera provavelmente por um mecanismo independente da AMPK (Figura 20).

Baseado nestes resultados estudos adicionais tornam-se necessários para elucidar o possível mecanismo de ação do H_2S sobre a diarreia induzida pela toxina da cólera. Além do mecanismo preciso pelo qual a toxina da cólera afeta diretamente a secreção de fluidos, por meio da ativação excessiva da AC e seu envolvimento no SNE através de sua ação nas células enterocromafins, promovendo a liberação de serotonina que inibe a absorção e ativa neurônios

secretomotores, outros mecanismos parecem estar envolvido na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera. Alguns estudos sugerem que a toxina da cólera pode estimular uma modesta resposta inflamatória intestinal (SILVA et al, 1996; SEARS; KAPER, 1996; SAHA et al., 2000; QADRI et al., 2002). Soriani e colaboradores (2002) relataram que células epiteliais estimuladas pela toxina da cólera secretam não só íons Cl^- responsáveis por causar a diarreia, mas também um número considerável de citocinas. Em outro estudo, Rocha e colaboradores (2003) analisaram o fluido intestinal de ratos, onde foi injetado a toxina cólera, e revelaram que esta induz a liberação de $\text{IL-1}\beta$ e $\text{TNF-}\alpha$ no fluido intestinal e que, pelo menos em parte, os mastócitos estão envolvidos na secreção induzida pela toxina da cólera, bem como sugerem a importância da histamina, prostaglandinas, PAF, $\text{IL-1}\beta$ e $\text{TNF-}\alpha$ neste processo.

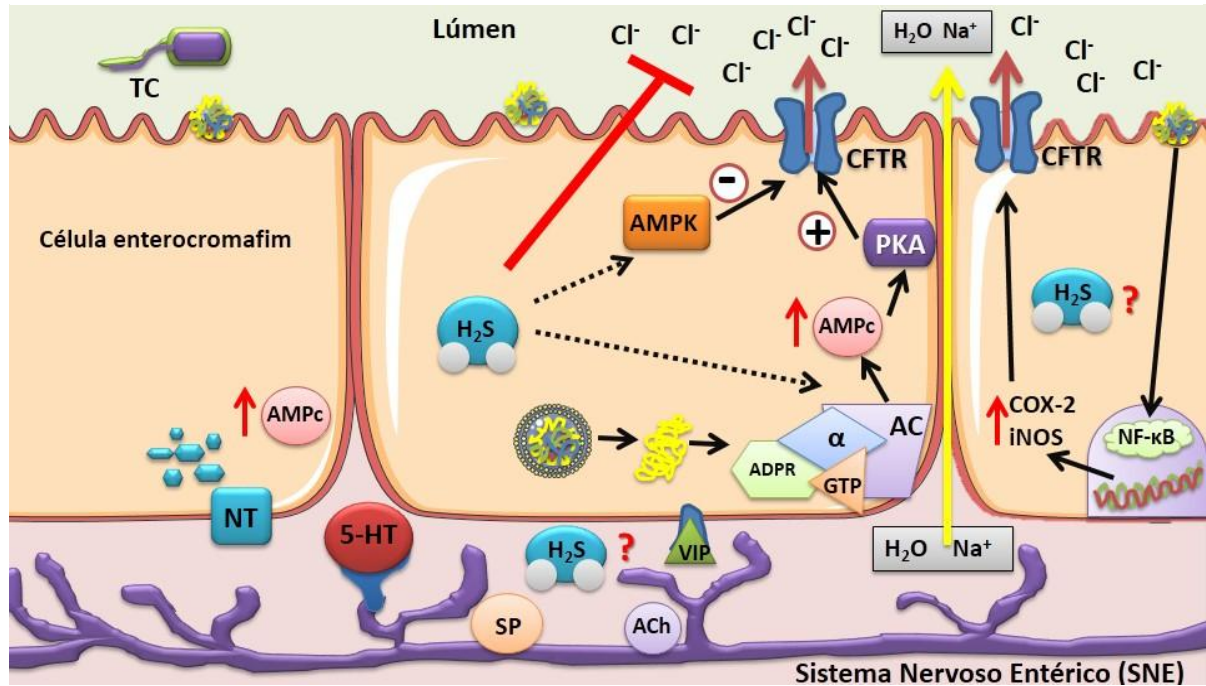
Recentemente foi demonstrado que a patogênese da diarreia induzida pelo *V. cholerae* variante O1 El Tor também envolve uma resposta inflamatória mediada pelo fator nuclear $\text{NF}\kappa\text{B}$, que promove um aumento na expressão das enzimas cicloxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A expressão dessas enzimas induzida pela toxina da cólera parece estar relacionada a ruptura da barreira intestinal e aumento da secreção de fluido intestinal pelo canal CFTR (SATITSRI et al., 2016). Essas novas vias de ativação da secreção intestinal pela toxina da cólera nos levam a hipótese de que o H_2S possa estar agindo via inibição de um desses mecanismos, uma vez que a literatura mostra que o H_2S é considerado uma importante molécula anti-inflamatória capaz de reduzir a expressão de citocinas, a ativação do fator nuclear $\text{NF}\kappa\text{B}$, bem como o edema de pata induzido por diferentes agentes, incluindo a serotonina (CHAN; WALLACE, 2013; KODELA et al., 2015). Outro fator que também nos leva a crer que o H_2S também possa estar atuando sobre o sistema nervoso entérico, consiste no fato de que neurônios entéricos expressam as principais enzimas que produzem o H_2S , no qual a sua produção modula importantes funções gastrointestinais, dessa forma, o sulfeto de hidrogênio pode estar atuando via inibição de neurônios secretomotores no plexo submucoso (LINDEN, 2014).

Por fim, nossos resultados indicam que o H_2S em baixas concentrações e por via oral é uma importante molécula envolvida na proteção contra a cólera, exercendo efeito antidiarreico por meio de sua ação antissecretória contra os efeitos nocivos da toxina da cólera em camundongos. Embora existam vários mecanismos através dos quais este efeito possa ocorrer, nossos dados indicam que provavelmente ocorra independente de sua ação na via AC/AMPC/PKA e AMPK . A compreensão dos mecanismo pelo qual o H_2S exerce esses efeitos

no intestino poderá ser um alvo interessante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da cólera.

De acordo com os estudos citados, bem como os resultados obtidos nesse trabalho, nós também podemos concluir que o H₂S como um mediador gasoso desempenha importantes papéis em muitos aspectos fisiológicos e fisiopatológicos no corpo humano, com particular participação no sistema digestivo. Além do seu efeito protetor observado contra a toxina da cólera em camundongos o H₂S participa na prevenção natural contra muitos distúrbios do sistema digestivo, devido a isto, vários compostos capazes de promover a liberação de H₂S estão sendo testados em ensaios clínicos para o tratamento de distúrbios humanos (SINGH; LIN, 2015). No entanto, o conhecimento deste importante gasotransmissor está longe de ser completo, pois a atividade desta molécula no trato GI depende de sua concentração em tecidos particulares. Assim, é muito importante melhorar os métodos que ajudam a determinar com precisão o valor limiar do H₂S nos tecidos, principalmente no intestino, onde sua concentração ainda permanece controversa. O entendimento dessa real concentração, bem como de outros aspectos da biologia do H₂S na saúde e na doença se faz necessário, para que se possa otimizar novas terapias, que levem ao desenvolvimento e comercialização de medicamentos que promovam a liberação controlado do H₂S como uma droga segura e com benefícios clínicos.

Figura 20. Diagrama esquemático representativo do efeito do Sulfeto de hidrogênio na diarreia induzida pela toxina da cólera (TC)



O H_2S reduz a perda de Cl^- induzida pela TC e consequentemente a secreção de fluido intestinal (seta vermelha). Este efeito possivelmente não está envolvido com a via AC/AMPC/PKA e AMPK (setas pretas pontilhadas). Este esquema ainda levanta questionamentos (representados pela interrogação) quanto a outros alvos por onde o H_2S poderia estar atuando, como envolvimento no sistema nervoso entérico induzido pela TC através de sua ação nas células enterocromafins ou sobre a via do fator nuclear NFκB, um importante fator da resposta inflamatória intestinal mediada pela TC.

7. CONCLUSÕES

- O Sulfeto de hidrogênio apresenta atividade antidiarreica no modelo de diarreia secretória induzida pela toxina da cólera em alça intestinal isolada de camundongos, inibindo a secreção de fluido e íons cloretos (Cl^-) a partir dos enterócitos para o lúmen intestinal.
- O efeito antissecretório do H_2S não está envolvido com o aumento da absorção intestinal e provavelmente ocorre por um mecanismo independente da via AC/AMPC/PKA e AMPK.
- Supõe-se que o H_2S é uma molécula essencial para a proteção contra os efeitos nocivos da TC.
- A TC induz um aumento da expressão de CSE, assim como da produção de H_2S .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 1066–1071, 1996.
- ALTHAUS, M. Gasotransmitters: novel regulators of epithelial Na^{+} transport? *Frontiers in Physiology*, v. 3, n.83, p.1–10, 2012.
- AWATA, S.; NAKAYAMA, K.; SUZUKI, I.; SUGAHARA, K.; KODAMA, H. Changes in cystathionine γ -lyase in various regions of rat brain during development. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 35, p. 1331–1338, 1995.
- BAKHSHI, B. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* isolates from Iran 2012 and 2013 outbreaks. **Letters in Applied Microbiology**. v. 62, n. 6, p. 466–471, 2016.
- BARATI, H.; MORADI, G.; RASOULI, M. A.; MOHAMMADI, P. Epidemiologic and Drug Resistance Pattern of *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor, Serotype Ogawa, in the 2011 Cholera Outbreak, in Alborz Province, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 11, p. e23477, 2015.
- BARRETT, K. E. *Gastrointestinal Physiology*, 2e. Filadelfia: Elsevier; 2014.
- BARRETT, K. E.; KEELY, S. J. Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. **Annual Review of Physiology**, v. 62, p. 535–572, 2000.
- BARTELT, L. A.; SARTOR, R. B. Advances in understanding Giardia: determinants and mechanisms of chronic sequelae. **F1000Prime Reports**, v. 7, n. 62, p. 1–14, 2015.
- BASU, I.; MUKHOPADHYAY, C. Insights into Binding of Cholera Toxin to GM1 Containing Membrane. **Langmuir**, v. 30, n. 50, p. 15244–15252, 2014.
- BHANDARI, N; MAZUMDER, S.; TANEJA, S.; DUBE, B.; AGARWAL, R. C.; MAHALANABIS, D.; FONTAINE, O.; BLACK, R. E.; BHAN, M. K. Effectiveness of zinc supplementation plus oral rehydration salts compared with oral rehydration salts alone as a

treatment for acute diarrhea in a primary care setting: a cluster randomized trial. **Pediatrics**, v. 121, n. 5, e1279–e1285, 2008.

BINDER, H. J.; BROWN, I.; RAMAKRISHNA, B. S.; YOUNG, G. P. Oral rehydration therapy in the second decade of the twenty-first century. **Current Gastroenterology Reports**, v. 16, n. 3, p. 376, 2014.

BLACKLER, R. W.; GEMICI, B.; MANKO, A.; WALLACE, J. L. NSAID-gastroenteropathy: new aspects of pathogenesis and prevention. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 19, p. 11–16, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª edição. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vigilancia_epidemio_2010_web.pdf>. Acesso em 10 jun 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual integrado de vigilância epidemiológica da cólera. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Departamento de Informática do SUS (DATASUS). Sistema de Informação de Mortalidade (SIM). Indicadores de mortalidade, 2015. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c06.def>> Acesso em 25 de maio de 2016.

BROECK, D. V.; HORVATH, C.; DE WOLF, M. J. S. *Vibrio cholerae*: Cholera toxin. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 10, p. 1771–1775, 2007.

BUTTERWORTH, J. F.; BROWNLOW, R. C.; LEITH, J. P.; PRIELIPP, R. C.; COLE, L. R. Bupivacaine inhibits cyclic-3',5'-adenosine monophosphate production. A possible contributing factor to cardiovascular toxicity. **Anesthesiology**, v. 79, n. 1, p. 88–95, 1993.

CANANI, R. B.; CIRILLO, P.; BUCCIGROSSI, V.; DE MARCO, G.; MALLARDO, G.; BRUZZESE, E.; POLITO, G.; GUARINO, A. Nitric oxide produced by the enterocyte is

involved in the cellular regulation of ion transport. **Pediatric Research**, v. 54, n. 1, p. 64–68, 2003.

CARPENTER, C. C. The treatment of cholera: clinical science at the bedside. **Journal of Infectious Diseases**, 166, n. 1, p. 2–14, 1992.

CHAN, M. V.; WALLACE, J. L. Hydrogen sulfide-based therapeutics and gastrointestinal diseases: translating physiology to treatments. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 7, p. G467–G473, 2013.

CHANG, E. B.; FIELD, M.; MILLER, R. J. Alpha-2-adrenergic receptor regulation of ion transport in rabbit ileum. **American Journal of Physiology**, v. 242, n. 3, p. G237–G242, 1982.

CHÁVEZ-PIÑA, A. E.; TAPIA-ÁLVAREZ, G. R.; NAVARRETE, A. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide synthesis by PAG protects against ethanol-induced gastric damage in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 630, n. 1/3, p. 131–136, 2010.

CHEN, X.; LIU, X. S. Hydrogen sulfide from a NaHS source attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced inflammation via inhibiting nuclear factor- κ B. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 17, n. 3, p. 209–217, 2016.

CHENG, S. X. Calcium-sensing receptor: A new target for therapy of diarrhea. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 9, p. 2711–2724, 2016.

CHINNAPEN, D. J.-F.; CHINNAPEN, H.; SASLOWSKY, D.; LENCER, W. Rafting with cholera toxin: Endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, n. 2, p. 129–137, 2007.

DAHL, C. A.; YAMADA, T. Global health inequity: scientific challenges remain but can be solved. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 1242–1243, 2008.

DAMS, E.; DE WOLF, M.; DIERICK, W. Nucleotide sequence analysis of the CT operon of the *Vibrio cholerae* classical strain 569B. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1090, n. 1, p. 139–141, 1991.

DE HAAN, L.; HIRST, T. R. Cholera toxin: A paradigm for multifunctional engagement of cellular mechanisms. **Molecular Membrane Biology**, v. 21, n. 2, p. 77–92, 2004.

DESJEUX, J. F.; BRIEND, A.; BUTZNER, J. D. Oral rehydration solution in the year 2000: pathophysiology, efficacy and effectiveness. **Bailliere's Clinical Gastroenterology**, v. 11, n. 3, p. 509–527, 1997.

DONOWITZ, M.; ALPERS, D. H.; BINDER, H. J.; BREWER, T.; CARRINGTON, J.; GREY, M. J. Translational approaches for pharmacotherapy development for acute diarrhea. **Gastroenterology**, v. 142, n. 3, p. e1–e9, 2012.

DUFTON, N.; NATIVIDAD, J.; VERDU, E. F.; WALLACE, J. L. Hydrogen sulfide and resolution of acute inflammation: a comparative study utilizing a novel fluorescent probe, **Scientific Reports**, v. 2012, n. 2, p. 499, 2012.

DUNN, W. R.; ALEXANDER, S. P.; RALEVIC, V.; ROBERTS, R. E. Effects of hydrogen sulphide in smooth muscle. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 158, p. 101-13, 2016.

EDUARDO, M. B. P.; KATSUYA, E. M. Informe técnico. Situação da cólera no mundo – CVE/SES-SP. BE CVE/ 3 v. 04, n. 01, 2014.

FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 7, p. 931–943, 2003.

FIELD, M.; SEMRAD, C. E. Toxigenic diarrreas, congenital transport. **Annual Review of Physiology**, v. 55, p. 631–655, 1993.

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E.; DISTRUTTI, E.; RIZZO, G.; MENCARELLI, A.; ORLANDI, S.; ZANARDO, R.; RENGHA, B.; DI SANTE, M.; MORELLI, A.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury

caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. **Gastroenterology**, v. 129, n. 4, p. 1210–1224, 2005.

FIORUCCI, S.; DISTRUTTI, E.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. **Gastroenterology**, v. 131, n. 1, p. 259–271, 2006.

FIORUCCI, S.; ORLANDI, S.; MENCARELLI, A.; CALIENDO, G.; SANTAGADA, V.; DISTRUTTI, E.; SANTUCCI, L.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. Enhanced activity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis, **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 8, p. 996–1002, 2007.

FITZGERALD, R.; DESANTIAGO, B.; LEE, D. Y.; YANG, G.; KIM, J. Y.; FOSTER, D. B.; CHAN-LI, Y.; HORTON, M. R.; PANETTIERI, R. A.; WANG, R.; AN, S. S. H₂S relaxes isolated human airway smooth muscle cells via the sarcolemmal KATP channel. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, n. 1, p. 393–398, 2014.

FLACH, C. F.; QADRI, F.; BHUIYAN, T. R.; ALAM, N. H.; JENNISCHE, E.; HOLMGREN, J.; LÖNNROTH, I. Differential expression of intestinal membrane transporters in cholera patients. **FEBS Letters**, v. 581, n.17, p. 3183–3188, 2007.

FLANNIGAN, K. L.; FERRAZ, J. G.; WANG, R.; WALLACE, J. L. Enhanced synthesis and diminished degradation of hydrogen sulfide in experimental colitis: a site-specific, pro-resolution mechanism. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71962, 2013.

FLANNIGAN, K. L.; FERRAZ, J. G.; WANG, R.; WALLACE, J. L. Enhanced synthesis and diminished degradation of hydrogen sulfide in experimental colitis: a site-specific, pro-resolution mechanism. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71962, 2013.

GALE, A. R.; WILSON, M. Diarrhea: Initial Evaluation and Treatment in the Emergency Department. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 34, n. 2, p. 293–308, 2016.

GEMICI, B.; ELSHEIKH, W.; FEITOSA, K. B.; COSTA, S. K.; MUSCARA, M. N.; WALLACE, J. L. H₂S-releasing drugs: anti-inflammatory, cytoprotective and chemopreventative potential. **Nitric Oxide**, v. 46, p. 25–31, 2015.

GOMEZ, J.; PARKMAN, H. P. Gastrointestinal motility and functional disorders. **American College of Physicians Medicine**, p. 1–14, 2009.

GOODMAN, L.; SEGRETI, J. Infectious Diarrhea. **Disease-a-Month**, v. 45, n. 7, p. 268–299, 1999.

GREENOUGH, I. W. B.; GORDON, R. S.; ROSENBERG, I.; DAVIES, B. I.; BENENSON, A. S. Tetracycline in the treatment of cholera 1964. **Lancet**, v. 1, n. 7329, p. 355–357, 1964.

GRIGGS, D. W.; PRINSEN, M. J.; OLIVA, J.; CAMPBELL, M. A.; ARNETT, S. D.; TAJFIROUZ, D.; RUMINSKI, P. G.; YU, Y.; BOND, B. R.; JI, Y.; NECKERMANN, G.; CHOY, R. K.; DE HOSTOS, E.; MEYERS, M. J. Pharmacologic Comparison of Clinical Neutral Endopeptidase Inhibitors in a Rat Model of Acute Secretory Diarrhea. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 357, n. 2, p. 423–431, 2016.

GU, Q.; WANG, B.; ZHANG, X. F.; MA, Y. P.; LIU, J. D.; WANG, X. Z. Contribution of hydrogen sulfide and nitric oxide to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 375, n. 1/2, p. 199–206, 2013.

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. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 3, p. 331–350, 2001.

GUO, W.; CHENG, Z. Y.; ZHU, Y. Z. Hydrogen sulfide and translational medicine. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 10, p. 1284–1291, 2013.

GWYNNE, R. M.; ELLIS, M.; SJÖVALL, H.; BORNSTEIN, J. C. Cholera toxin induces sustained hyperexcitability in submucosal secretomotor neurons in guinea pig jejunum. **Gastroenterology**, v. 136, n. 1, p. 299–308, 2009.

HARDIE, D. G.; ASHFORD, M. L. AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels. **Physiology (Bethesda)**, v. 29, n. 2, p. 99–107, 2014.

HARDIE, D. G.; HAWLEY, S. A. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. **Bioessays**, v. 23, n. 12, p. 1112–1119, 2001.

HARRIS, J. B.; LAROCQUE, R. C.; QADRI, F.; RYAN, E. T.; CALDERWOOD, B. S.C holera. **Lancet**, v. 379, n. 9835, p.2466–2476, 2012.

HARTLE, M. D.; PLUTH, M. D. A practical guide to working with H₂S at the interface of chemistry and biology. *Chemical Society Reviews*, in press, 2016.

HENNIG, B.; DIENER, M. Actions of hydrogen sulphide on ion transport across rat distal colon. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 5, p. 1263–1275, 2009.

HENSGENS, M. P.; GOORHUIS, A.; DEKKERS, O. M.; KUIJPER, E. J. Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 3, p. 742–748, 2012.

HIRATA, I.; NAITO, Y.; TAKAGI, T.; MIZUSHIMA, K.; SUZUKI, T.; OMATSU, T.; HANDA, O.; ICHIKAWA, H.; UEDA, H.; YOSHIKAWA, T. Endogenous hydrogen sulfide is an anti-inflammatory molecule in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 5, p. 1379–1386, 2011.

HU, Y.; CHEN, X.; PAN, T. T.; NEO, K. L.; LEE, S. W.; KHIN, E. S.; MOORE, P. K.; BIAN, J. S. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. **Pflugers Arch**, v. 455, n. 4, p. 607–616, 2008.

JANOFF, E. N.; HAYAKAWA, H.; TAYLOR, D. N.; FASCHING, C. E.; KENNER, J. R.; JAIMES, E.; RAIJ, L. Nitric oxide production during *Vibrio cholerae* infection. **American Journal of Physiology**, v. 273, n. 5 Pt 1, p. G1160–G1167, 1997.

JIANG, L. H.; WANG, J.; WEI, X. L.; LIANG, Q. Y.; CHENG, T. T. Exogenous sodium hydrosulfide can attenuate naloxone-precipitated withdrawal syndromes and affect cAMP signaling pathway in heroin-dependent rat's nucleus accumbens. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 16, n. 14, p. 1974–82, 2012.

JUCKETT, G.; TRIVEDI, R. Evaluation of chronic diarrhea. **American Family Physician**, v. 84, n.10, p. 1119–1126, 2011.

KANDILCI, H. B.; GUMUSEL, B.; LIPPTON, H. Intermedin/adrenomedullin-2 (IMD/AM2) relaxes rat main pulmonary arterial rings via cGMP-dependent pathway: role of nitric oxide and large conductance calcium-activated potassium channels (BK(Ca)). **Peptides**, v. 29, n. 8, p. 1321–1328, 2008.

KELLY, C. P.; BECKER, S.; LINEVSKY, J. K.; JOSHI, M. A.; OKEANE, J. C.; DICKEY, B. F.; LAMONT, J. T.; POTHOUKAKIS, C. Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 3, p. 1257–1265, 1994.

KELLY, M. R. JR.; TIEN, J. H.; EISENBERG, M. C.; LENHART, S. The impact of spatial arrangements on epidemic disease dynamics and intervention strategies. **Journal of Biological Dynamics**. v. 10, n. 1, p. 222–249, 2016.

KIDA, K.; YAMADA, M.; TOKUDA, K.; MARUTANI, E.; KAKINOHANA, M.; KANEKI, M.; ICHINOSE, F. Inhaled hydrogen sulfide prevents neurodegeneration and movement disorder in a mouse model of Parkinson's disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n. 2, p. 343–352, 2011.

KIELA, P. R.; GHISHAN, F. K. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, n. 2, p. 145–159, 2016.

KIM, J. E.; SONG, S. E.; KIM, Y. W.; KIM, J. Y.; PARK, S. C.; PARK, Y. K.; BAEK, S. H.; LEE, I. K.; PARK, S. Y. Adiponectin inhibits palmitate-induced apoptosis through suppression of reactive oxygen species in endothelial cells: involvement of cAMP/protein kinase A and AMP-activated protein kinase. **Journal of Endocrinology**, v. 207, n. 1, p. 35–44, 2010.

KIMURA H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. **Nitric Oxide**, v. 41, p. 4–10, 2014.

KIMURA, H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 267, n. 1, p. 129–133, 2000.

KIMURA, H., SHIBUYA, N.; KIMURA, Y. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 17, n. 1, p. 45–57, 2012.

KINDLER, C. H.; PAUL, M.; ZOU, H.; LIU, C.; WINEGAR, B. D.; GRAY, A. T.; YOST, C. S. Amide local anesthetics potently inhibit the human tandem pore domain background K⁺ channel TASK-2 (KCNK5). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 1, p. 84–92, 2003.

KODELA, R.; NATH, N.; CHATTOPADHYAY, M.; NESBITT, D. E.; VELÁZQUEZ-MARTÍNEZ, C. A.; KASHFI, K. Hydrogen sulfide-releasing naproxen suppresses colon cancer cell growth and inhibits NF- κ B signaling. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 4873-82, 2015.

KONGSUPHOL, P.; HIEKE, B.; OUSINGSAWAT, J.; ALMACA, J.; VIOLLET, B.; SCHREIBER, R.; KUNZELMANN, K. Regulation of Cl⁻ secretion by AMPK in vivo. **Pflugers Arch**, v. 457, n. 5, p. 1071–1078, 2009.

KOPIC, S.; GEIBEL, J. P. Toxin Mediated Diarrhea in the 21st Century: The Pathophysiology of Intestinal Ion Transport in the Course of ETEC, *V. cholerae* and Rotavirus Infection. **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2132–2157, 2010.

KORDASTI, S.; SAPNARA, M.; THOMAS, E. A.; LINDSTROM, E.; FORSMAN, M.; BORNSTEIN, J. C.; SJÖVALL, H. Effects of cholera toxin on the potential difference and motor responses induced by distension in the rat proximal small intestine in vivo. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 5, p. G948–G958, 2006.

KUNDU, S.; PUSHPAKUMAR, S.; KHUNDMIRI, S. J.; SEN, U. Hydrogen sulfide mitigates hyperglycemic remodeling via liver kinase B1-adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, n. 12, p. 2816–2826, 2014.

KUNZELMANN, K.; HÜBNER M.; SCHREIBER R.; LEVY-HOLZMAN, R.; GARTY, H, BLEICH, M.; WARTH, R.; SLAVIK, M.; VON HAHN, T.; GREGER, R. Cloning and function of the rat colonic epithelial K⁺ channel KVLQT1. **Journal of Membrane Biology**, v. 179, n. 2, p. 155–164, 2001.

LAMBERTI, L. M.; BOURGEOIS, A. L.; WALKER, C. L. F.; BLACK, R. E.; SACK, D. Estimating diarrheal illness and deaths attributable to *Shigellae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* among older children, adolescents, and adults in South Asia and Africa. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2705, 2014.

LEE, H. J.; MARIAPPAN, M. M.; FELIERS, D.; CAVAGLIERI, R. C.; SATARANATARAJAN, K.; ABOUD, H. E.; CHOUDHURY, G. G.; KASINATH, B. S. Hydrogen sulfide inhibits high glucose-induced matrix protein synthesis by activating AMP-activated protein kinase in renal epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 7, p. 4451–4461, 2012.

LI, L.; ROSSONI G.; SPARATORE A.; LEE, L. C.; DEL SOLDATO P.; MOORE P. K. Antiinflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 5, p. 706–719, 2007.

LI, S.; PING, N. N.; CAO, L.; MI, Y. N.; CAO, Y. X. H₂S induces vasoconstriction of rat cerebral arteries via cAMP/adenylyl cyclase pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 3, p. 389–96, 2015.

LI, W.; TANG, C.; JIN, H.; DU, J. Regulatory effects of sulphur dioxide on the development of atherosclerotic lesions and vascular hydrogen sulfide in atherosclerotic rats.

Atherosclerosis, v. 215, n. 2, p. 323–330, 2011.

LIM, J. J.; LIU, Y. H.; KHIN, E. S.; BIAN, J. S. Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells. **American Journal of Physiology, Cell physiology**, v. 295, n. 5, p. C1261–C1270, 2008.

LINDEN, D. R. Hydrogen sulfide signaling in the gastrointestinal tract. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 5, p. 818–830, 2014.

LINDEN, D. R.; LEVITT, M. D.; FARRUGIA, G.; SZURSZEWski, J. H. Endogenous production of H₂S in the gastrointestinal tract still in search of a physiologic function. **Antioxidants Redox Signaling**, v. 12, n. 9, p. 1135–1146, 2010.

LINDENBAUM, J.; GREENOUGH, W. B.; ISLAM, M. R. Antibiotic therapy of cholera in children. **Bull World Health Organ**, v. 37, n. 4, p. 529–538, 1967.

LIU, J.; WU, J.; SUN, A.; SUN, Y.; YU, X.; LIU, N.; DONG, S.; YANG, F.; ZHANG, L.; ZHONG, X.; XU, C.; LU, F.; ZHANG, W. Hydrogen sulfide decreases high glucose/palmitate-induced autophagy in endothelial cells by the Nrf2-ROS-AMPK signaling pathway. **Cell and Bioscience**, v. 23, p. 6–33, 2016.

LU, M.; CHOO, C. H.; HU, L. F.; TAN, B. H.; HU, G.; BIAN, J. B. Hydrogen sulfide regulates intracellular pH in rat primary cultured glia cells. **Neuroscience Research**, v. 66, n. 1, p. 92–98, 2010.

MANNA, P.; JAIN, S. K. L-cysteine and hydrogen sulfide increase PIP3 and AMPK/PPAR γ expression and decrease ROS and vascular inflammation markers in high glucose treated human U937 monocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 10, p. 2334–45, 2013.

MARD, S. A.; ASKARI, H.; NEISI, N.; VEISI, A. Antisecretory effect of hydrogen sulfide on gastric acid secretion and the involvement of nitric oxide. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

MATHAN, V. I. Diarrhoeal diseases. **British Medical Bulletin**, v. 54, n. 2, p. 407–419, 1998.

MATSUNAMI, M.; KIRISHI, S.; OKUI, T.; KAWABATA, A. Chelating luminal zinc mimics hydrogen sulfide-evoked colonic pain in mice: possible involvement of T-type calcium channels. **Neuroscience**, v. 181, p. 257–64, 2011.

MATSUNAMI, M.; TARUI, T.; MITANI, K.; NAGASAWA, K.; FUKUSHIMA, O.; OKUBO, K.; YOSHIDA, S.; TAKEMURA, M.; KAWABATA, A. Luminal hydrogen sulfide plays a pro-nociceptive role in mouse colon. **Gut**, v. 58, n. 6, p. 751–761, 2009.

MAYO-WILSON, E.; IMDAD, A.; HERZER, K.; YAKOOB, M. Y.; BHUTTA, Z. A. Vitamin A supplements for preventing mortality, illness, and blindness in children aged under 5: systematic review and metaanalysis. **British Medical Journal**, v. 343, p. d5094, 2011.

MCKAY, D. M. Good bug, bad bug: in the case of enteric inflammatory disease does the epithelium decide? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, s.1, p.205-210, 2005.

MEDEIROS, J. V.; BEZERRA, V. H.; GOMES, A. S.; BARBOSA, A. L.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; SOARES, P. M.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; SOUZA, M. H. Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 330, n. 3, p. 764–770, 2009.

MEDEIROS, J. V.; BEZERRA, V. H.; LUCETTI, L. T.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; BARBOSA, A. L.; TAVARES, B. M.; MAGALHÃES, P. J.; SANTOS, A. A.; CUNHA, F. Q.; SOARES, P. M.; SOUZA, M. H. Role of KATP channels and TRPV1 receptors in hydrogen sulfide-enhanced gastric emptying of liquid in awake mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 693, n. 1-3, p. 57–63, 2012.

MEDEIROS, J. V.; SOARES, P. M.; BRITO, G. A. C.; SOUZA, M. H. Immunohistochemical approach reveals localization of cystathionine- γ -lyase and cystathionine- β -synthetase in ethanol-induced gastric mucosa damage in mice. **Arquivos De Gastroenterologia**, v. 50, n. 2, p. 157–160, 2013.

MELVIN, J. E., PARK, K., RICHARDSON, L., SCHULTHEIS, P. J.; SHULL, G. E. Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 22855–22861, 1999.

MIYAMOTO, R.; OTSUGURO, K.; ITO, S. Time- and concentration-dependent activation of TRPA1 by hydrogen sulfide in rat DRG neurons. **Neuroscience Letters**, v. 499, n. 2, p. 137–142, 2011.

MOON, C.; ZHANG, W.; SUNDARAM, N.; YARLAGADDA, S.; REDDY, V. S.; ARORA, K.; HELMRATH, M. A.; NAREN, A. P. Drug-induced secretory diarrhea: A role for CFTR. **Pharmacological Research**, v. 102, p. 107–112, 2015.

MOURAD, F. H.; NASSAR, C. F. Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) antagonism on rat jejunal fluid and electrolyte secretion induced by cholera and *Escherichia coli* enterotoxins. **Gut**, v. 47, n. 3, p. 382–386, 2000.

MUANPRASAT, C.; CHATSUDTHIPONG, V. Cholera: pathophysiology and emerging therapeutic targets. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 781–98, 2013.

MUANPRASAT, C.; SIRIANANT, L.; SAWASVIROJWONG, S.; HOMVISASEVONGSA, S.; SUKSAMRARN, A.; CHATSUDTHIPONG, V. Activation of AMP-activated protein kinase by a plant-derived dihydroisosteviol in human intestinal epithelial cell. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 4, p. 522–528, 2013.

MUANPRASAT, C.; WONGKRASANT, P.; SATITSRI, S.; MOONWIRIYAKIT, A.; PONGKORPSAKOL, P.; MATTAVEEWONG, T.; PICHYANGKURA, R.; CHATSUDTHIPONG, V. Activation of AMPK by chitosan oligosaccharide in intestinal epithelial cells: Mechanism of action and potential applications in intestinal disorders. **Biochemical Pharmacology**, v. 96, n. 3, p. 225–236, 2015.

MUNOS, M. K.; WALKER, C. L.; BLACK, R. E. The effect of oral rehydration solution and recommended home fluids on diarrhoea mortality. **International Journal of Epidemiology**, v. 39, p. i75–i87, 2010.

MUREK, M.; KOPIC, S.; GEIBEL, J. Evidence for intestinal chloride secretion.

Experimental Physiology, v. 95, n. 4, p. 471–478, 2010.

NAGPURE, B. V.; BIAN, J. S. Hydrogen sulfide inhibits A2A adenosine receptor agonist induced β -amyloid production in SH-SY5Y neuroblastoma cells via a cAMP dependent pathway. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88508, 2014.

NEILSON, M. S., WARTH, R., BLEICH, M., WEYLAND, B.; GREGER, R. The basolateral Ca^{2+} -dependent K^+ channel in rat colonic crypt cells. **Pflugers Arch.** v. 435, n. 2, p. 267–272, 1998.

NICOLAU, L. A.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R.; CARVALHO, N. S.; COSTA, N. R.; ARAGÃO, K. S.; BARBOSA, A. L.; SOARES, P. M.; SOUZA, M. H.; MEDEIROS, J. V. The hydrogen sulfide donor, Lawesson's reagent, prevents alendronate-induced gastric damage in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 8, p. 708–714, 2013.

OLAS, B. Hydrogen sulfide in signaling pathways. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 212–218, 2015.

OLSON, K. R. Is hydrogen sulfide a circulating “gasotransmitter” in vertebrate blood? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1787, n. 7, p. 856–863, 2009.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, Cholera Fact Sheet, n. 107, 2015.

Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/>> Acesso em 11 de abril de 2016.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, Diarrhoeal disease, n. 330, 2013,

Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>> Acesso em 20 de abril de 2016.

PÁLINKÁS, Z.; FURTMÜLLER, P. G.; NAGY, A.; JAKOPITSCH, C.; PIRKER, K. F.; MAGIEROWSKI, M.; JASNOS, K.; WALLACE, J. L.; OBINGER, C.; NAGY, P.

Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 6, p. 1516–1532, 2015.

PARIWAT, P.; HOMVISASEVONGSA, S.; MUANPRASAT, C.; CHATSUDTHIPONG, V. A natural plant-derived dihydroisosteviol prevents cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 2, p. 798–805, 2008.

PAWLOWSKI, S. W.; WARREN, C. A.; GUERRANT, R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 1874–1886, 2009.

PAYNE, D. C.; VINJÉ, J.; SZILAGYI, P. G.; EDWARDS, K. M.; STAAT, M. A.; WEINBERG, G. A.; HALL, C. B.; CHAPPELL, J.; BERNSTEIN, D. I.; CURNS, A. T.; WIKSWO, M.; SHIRLEY, S. H.; HALL, A. J.; LOPMAN, B.; PARASHAR, U. D. Norovirus and medically attended gastroenteritis in U. S. children. **New England Journal of Medicine**, v. 368, p. 1121–1130, 2013.

PERNA, A. F.; LUCIANO, M. G.; INGROSSO, D.; RAIOLA, I.; PULZELLA, P.; SEPE, I.; LANZA, D.; VIOLETTI, E.; CAPASSO, R.; LOMBARDI, C.; DE SANTO, N. G. Hydrogen sulfide, the third gaseous signaling molecule with cardiovascular properties, is decreased in hemodialysis patients. **Journal of Renal Nutrition**, v. 20, n. 5, p. S11–S14, 2010.

PETRI-Jr, W. A.; MILLER, M.; BINDER, H. J.; LEVINE, M. M.; DILLINGHAM, R.; GUERRANT, R. L. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1277–1290, 2008.

POLHEMUS, D. J.; LEFER, D. J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 114, n. 4, p. 730–737, 2014.

PONGKORPSAKOL, P.; WONGKRASANT, P.; KUMPUN, S.; CHATSUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. Inhibition of intestinal chloride secretion by piperine as a cellular basis for the anti-secretory effect of black peppers. **Pharmacological Research**, v. 100: 271–280, 2015.

POPOFF, M. R.; POULAIN, B. Bacterial Toxins and the Nervous System: Neurotoxins and Multipotential Toxins Interacting with Neuronal Cells. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 683–737, 2010.

POSNY, D.; WANG, J.; MUKANDAVIRE, Z.; MODNAK, C. Analyzing transmission dynamics of cholera with public health interventions. **Mathematical Biosciences**, v. 264, p. 38–53, 2015.

POUOKAM, E.; ALTHAUS, M. Epithelial Electrolyte Transport Physiology and the Gasotransmitter Hydrogen Sulfide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, p. 1–13, 2016.

POUOKAM, E.; DIENER, M. Modulation of Ion Transport Across Rat Distal Colon by Cysteine. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 43, p. 1–10, 2012.

POUOKAM, E.; STEIDLE, J.; DIENER, M. Regulation of colonic ion transport by gasotransmitters. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 6, p. 789–793, 2011.

QADRI, F.; RAQIB, R.; AHMED, F.; RAHMAN, T.; WENNERAS, C.; KUMAR, D.S.; ALAM, N.H.; MATHAN, M.M.; SVENNERHOLM, A. M. Increased levels of inflammatory mediators in children and adults infected with *Vibrio cholerae* O1 and O139. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 2, 221–229, 2002.

QU, K.; CHEN, C. P.; HALLIWELL, B.; MOORE, P. K.; WONG, P. T. Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. **Stroke**, v. 37, n. 3, p. 889–893, 2006.

REIFFENSTEIN, R. J.; HULBERT, W. C.; ROTH, S. H. Toxicology of hydrogen sulphide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 32, p. 109–134, 1992.

RIBEIRO, R. A.; FREITAS, H. C.; CAMPOS, M. C.; SANTOS, C. C.; FIGUEIREDO, F. C.; BRITO, G. A.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **Journal of Urology**, v. 167, n. 5, p. 2229–2234, 2002.

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 release by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin 1-beta.

Infection and Immunity, v. 66, n. 10, p. 4910–4916, 1998.

ROCHA, M. F.; AGUIAR, J. E.; SIDRIM, J. J.; COSTA, R. B.; FEITOSA, R. F.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. Role of mast cells and pro-inflammatory mediators on the intestinal secretion induced by cholera toxin. **Toxicon**, v. 42, n. 2, p. 183–189, 2003.

RODIGHIERO, C., TSAI, B., RAPOPORT, T. A., & LENCER, W. I. Role of ubiquitination in retro-translocation of cholera toxin and escape of cytosolic degradation. **EMBO Reports**, v. 3, n. 12, p. 1222–1227, 2002.

ROGÉ, J.; BAUMER, P.; BÉRARD, H.; SCHWARTZ, J. C.; LECOMTE, J. M. The enkephalinase inhibitor, acetorphan, in acute diarrhoea: a doubleblind, controlled clinical trial versus loperamide. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 4, p. 352–354, 1993.

ROGERS, A. C.; HUETTER, L.; HOEKSTRA, N.; COLLINS, D.; COLLACO, A.; BAIRD, A. W.; WINTER, D. C.; AMEEN, N.; GEIBEL, J. P.; KOPIC, S. Activation of AMPK inhibits cholera toxin stimulated chloride secretion in human and murine intestine. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69050, 2013.

ROGGIN, G. M.; BANWELL, J. G.; YARDLEY, J. H.; HENDRIX, T. R. Unimpaired response of rabbit jejunum to cholera toxin after selective damage to villus epithelium. **Gastroenterology**, v. 63, n. 6, p. 981–988, 1972.

SACK, D. A.; SACK, R. B.; NAIR, G. B.; SIDDIQUE, A. K. Cholera. **Lancet**, v. 363, n. 9404, p. 223–233, 2004.

SAHA, D. R.; NIYOGI, S. K.; NAIR, G. B.; MANNA, B.; BHATTACHARYA, S. K. Detection of faecal leucocytes and erythrocytes from stools of cholera patients suggesting an evidence of an inflammatory response in cholera. **Indian Journal of Medical Research**, v. 112, p. 5–8, 2000.

SALAZAR, E., SANTISTEBAN, J., CHEA, E., GUTIERREZ, M. Racecadotril in the treatment of acute watery diarrhea. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 7, p. 463–467, 2000.

SALIM, S. Y.; SODERHOLM, J. D. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 1, p. 362–381, 2011.

SATITSRI, S.; PONGKORPSAKOL, P.; SRIMANOTE, P.; CHATSUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. Pathophysiological mechanisms of diarrhea caused by the *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant: an in vivo study in mice. **Virulence**, v. 24, p. 1–17, 2016.

SAVAGE, J. C.; GOULD, D. H. Determination of sulphide in brain tissue and rumen fluid by ion interaction, reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 526, n. 2, p. 530–545, 1990.

SCHICHO, R.; KRUEGER, D.; ZELLER, F.; VON WEYHERN, C. W.; FRIELING, T.; KIMURA, H.; ISHII, I.; DE GIORGIO, R.; CAMPI, B.; SCHEMANN, M. Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the guinea-pig and human colon. **Gastroenterology**, v. 131, n. 5, p. 1542–1552, 2006.

SCHILLER, L. R. Definitions, pathophysiology, and evaluation of chronic diarrhea. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 26, n. 5, p. 551–562, 2012.

SCOVILLE, D. H.; SATO, T.; HE, X. C.; LI, L. Current view: intestinal stem cells and signaling. **Gastroenterology**, v. 134, n. 3, p. 849–864, 2008.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 167–215, 1996.

SEN, N.; PAUL, B. D.; GADALLA, M. M.; MUSTAFA, A. K.; SEN, T.; XU, R.; KIM, S.; SNYDER, S. H. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NFκB mediates its antiapoptotic actions. **Molecular Cell**, v. 45, n. 1, p. 13–24, 2012.

SERHAN, C. N.; BRAIN, S. D.; BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; HASLETT, C.; O'NEILL, L. A.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G.; WALLACE, J. L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB Journal**, v. 21, n. 2, p. 325-32, 2007.

SESAPI - Secretária Estadual de Saúde Piauí. Disponível em:

<<http://www.saude.pi.gov.br/noticias/2014-05-09/5841/diarreia-mata-uma-crianca-a-cada-15-segundos-em-todo-o-mundo.html>> Acesso em 10 de abril de 2016.

SHEN, K. Z.; YAKHNITSA, V.; MUNHALL, A. C.; JOHNSON, S. W. AMP kinase regulates K-ATP currents evoked by NMDA receptor stimulation in rat subthalamic nucleus neurons. **Neuroscience**, v. 274, p. 138–52, 2014.

SHEPPARD, D. N.; WELSH, M. J. Structure and function of the CFTR chloride channel. **Physiological Reviews**, v. 79, n. Suppl. 1, p. S23–S45, 1999.

SHIBUYA, N.; KOIKE, S.; TANAKA, M.; ISHIGAMI-YUASA, M.; KIMURA, Y.; OGASAWARA, Y.; FUKUI, K.; NAGAHARA, N.; KIMURA, H. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. **Nature Communications**, v. 4, p. 1366, 2013.

SHIBUYA, N.; MIKAMI, Y.; KIMURA, Y.; NAGAHARA, N.; KIMURA H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. **Journal of Biochemistry**, v. 146, n. 5, p. 623–626, 2009a.

SHIBUYA, N.; TANAKA, M.; YOSHIDA, M.; OGASAWARA, Y.; TOGAWA, T.; ISHII, K.; KIMURA, H. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, n. 4, p. 703–714, 2009b.

SHRESTHA, U. T.; ADHIKARI, N.; MAHARJAN, R.; BANJARA, M. R.; RIJAL, K. R.; BASNYAT, S. R.; AGRAWAL, V. P. Multidrug resistant *Vibrio cholerae* O1 from clinical and environmental samples in Kathmandu city. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 104, p. 1–7, 2015.

SILVA, A. C. **Soluções de reidratação oral no modelo de desnutrição e diarreia induzida pela toxina do cólera em camundongos: correção gênica e expressão das proteínas transportadoras SGLT-1, PEPT-1, CAT-1 e SN2.** 2013. 114f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza.

SILVA, T. M., SCHLEUPNER, M. A., TACKET, C. O., STEINER, T. S., KAPER, J. B., EDELMAN, R., GUERRANT, R. L. New evidence for an inflammatory component in diarrhea caused by selected new, live attenuated cholera vaccines and by El Tor and Q139 *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, 64, n. 6, p. 2362–2364, 1996.

SINGH, S. B.; LIN, H. C. Hydrogen Sulfide in Physiology and Diseases of the Digestive Tract. **Microorganisms**, v. 3, n. 4, p. 866-889, 2015.

SIVARAJAH, A.; COLLINO, M.; YASIN, M.; BENETTI, E.; GALLICCHIO, M.; MAZZON, E.; CUZZOCREA, S.; FANTOZZI, R.; THIEMERMANN, C. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. **Shock**, v. 31, n. 3, p. 267–274, 2009.

SORIANI, M., BAILEY, L., HIRST, T. R. Contribution of the ADPribosylating and receptor-binding properties of cholera-like enterotoxins in modulating cytokine secretion by human intestinal epithelial cells. **Microbiology**, v. 148, 667–676, 2002.

SPILLER, R. Irritable bowel syndrome: new insights into symptom mechanisms and advances in treatment. **F1000Research**, v. 29, n. 5, p. 1–11, 2016.

STEFFEN, R.; HILL, D. R.; DUPONT, H. L. Traveler's diarrhea. A clinical review. **Journal of the American Medical Association**, v. 313, n. 1, p. 71–80, 2015.

SUN, L.; ZHANG, S.; YU, C.; PAN, Z.; LIU, Y.; ZHAO, J.; WANG, X.; YUN, F.; ZHAO, H.; YAN, S.; YUAN, Y.; WANG, D.; DING, X.; LIU, G.; LI, W.; ZHAO, X.; LIU, Z.; LI, Y. Hydrogen sulfide reduces serum triglyceride by activating liver autophagy via the AMPK-mTOR pathway. **American Journal of Physiology Endocrinology and metabolism**, v. 309, n. 11, p. E925–E935, 2015.

SZABO, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 11, p. 917–935, 2007.

SZABÓ, G.; VERES, G.; RADOVITS, T.; GERO, D.; MÓDIS, K.; MIESEL-GRÖSCHEL, C.; HORKAY, F.; KARCK, M.; SZABÓ, C. Cardioprotective effects of hydrogen sulfide. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 2, p. 201–210, 2011.

TAKEUCHI, K.; AIHARA, E.; KIMURA, M.; DOGISHI, K.; HARA, T.; HAYASHI, S. Gas mediators involved in modulating duodenal HCO_3^- secretion. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 43–54, 2012.

TAYLOR, D. L.; KAHAWITA, T. M.; CAIRNCROSS, S.; ENSINK, J. H. The Impact of Water, Sanitation and Hygiene Interventions to Control Cholera: A Systematic Review. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135676, 2015.

THIAGARAJAH, J. R.; BROADBENT, T.; HSIEH, E.; VERKMAN, A. S. Prevention of toxin-induced intestinal ion and fluid secretion by a small-molecule CFTR inhibitor. **Gastroenterology**, v. 126, n. 2, p. 511–519, 2004.

THIAGARAJAH, J. R.; DONOWITZ, M.; VERKMAN, A. S. Secretory diarrhoea: mechanisms and emerging therapies. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 8, p. 446–457, 2015.

THIAGARAJAH, J. R.; VERKMAN, A. S. CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 6, p. 594–599, 2003.

THIAGARAJAH, J. R.; VERKMAN, A. S. Chloride channel-targeted therapy for secretory diarrheas. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 6, p. 888–894, 2013.

THIELMAN, N. M.; GUERRANT, R. L. Acute infectious diarrhea. **New England Journal of Medicine**, v. 350: 38–47, 2004.

TIEN, J. H.; EARN, D. J. D. Multiple transmission pathways and disease dynamics in a waterborne pathogen model, **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 72, n. 6, p. 1506–1533, 2010.

TRADTRANTIP, L.; KO, E. A.; VERKMAN, A. S. Antidiarrheal efficacy and cellular mechanisms of a Thai herbal remedy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2674, 2014.

TRADTRANTIP, L.; YANGTHARA, B.; PADMAWAR, P.; MORRISON, C.; VERKMAN, A. S. Thiophenecarboxylate suppressor of cyclic nucleotides discovered in a small-molecule screen blocks toxin-induced intestinal fluid secretion. **Molecular Pharmacology**, v. 75, n. 1, p. 134–142, 2009.

VELÁZQUEZ, C.; CALZADA, F.; BAUTISTA, M.; GAYOSSO, J. A. Management of Secretory Diarrhea. **Current Concepts in Colonic Disorders**, p. 67–84, 2012.

VELÁZQUEZ, C.; CALZADA, F.; TORRES, J.; GONZÁLEZ, F.; CEBALLOS, G. Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 66–70, 2006.

WALKER, C. L. F.; PERIN, J.; ARYEE, M. J.; PINTO, C. B.; BLACK, R. E. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. **BMC Public Health**, v. 12, p. 220, 2012.

WALKER, C. L.; RUDAN, I.; LIU, L.; NAIR, H.; THEODORATOU, E.; BHUTTA, Z. A.; O'BRIEN, K. L.; CAMPBELL, H.; BLACK, R. E. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **Lancet**, v. 381, n. 9875, p. 1405–1416, 2013.

WALKER, J.; JIJON, H. B.; CHURCHILL, T.; KULKA, M.; MADSEN, K. L. Activation of AMP-activated protein kinase reduces cAMP-mediated epithelial chloride secretion. **American journal of physiology - Gastrointestinal and liver Physiology**, v. 285, n. 5, p. G850–G860, 2003.

WALLACE, J. L.; DICAY, M.; MCKNIGHT, W.; MARTIN, G. R. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. **FASEB Journal**, v. 21, n. 14, p. 4070–4076, 2007.

WALLACE, J. L.; FERRAZ, J. G.; MUSCARA, M. N. Hydrogen Sulfide: An Endogenous Mediator of Resolution of Inflammation and Injury. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 17, n. 1, p. 58–67, 2012.

WALLACE, J. L.; VONG, L.; MCKNIGHT, W.; DICAY, M.; MARTIN, G. R. Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. **Gastroenterology**, v. 137, n. 2, p. 569–78, 2009.

WALLACE, J. L.; WANG, R. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 5, p. 329–345, 2015.

WANDS, A. M.; FUJITA, A.; MCCOMBS, J. E.; CERVIN, J.; DEDIC, B.; RODRIGUEZ, A. C.; NISCHAN, N.; BOND, M. R.; METTLEN, M.; TRUDGIAN, D. C.; LEMOFF, A.; QUIDING-JÄRBRINK, M.; GUSTAVSSON, B.; STEENTOFT, C.; CLAUSEN, H.; MIRZAEI, H.; TENEBERG, S.; YRLID, U.; KOHLER, J. J. Fucosylation and protein glycosylation create functional receptors for cholera toxin. **Elife**, v. 29, n. 4, p. 1–38, 2015.

WANG, R. Gasotransmitters: growing pains and joys. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 5, p. 227–232, 2014.

WANG, R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? **FASEB J**, v. 16, n. 13, p. 1792–1798, 2002.

WERNICK, N. L.; CHINNAPEN, D. J.; CHO, J. A.; LENCER, W. I. Cholera toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum. **Toxins**, v. 2, n. 3, p. 310–325, 2010.

WHYTE, L. A.; JENKINS, H. R. Pathophysiology of diarrhoea. **Paediatrics and Child Health**, v. 22, n. 10, p. 443–447, 2012.

WOLF, A. A.; JOBLING, M. G.; SASLOWSKY, D. E.; KERN, E.; DRAKE, K. R.; KENWORTHY, A. K.; HOLMES, R. K.; LENCER, W. I. Attenuated endocytosis and toxicity of a mutant cholera toxin with decreased ability to cluster ganglioside GM1 molecules. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 4, p. 1476–1484, 2008.

WU, D.; HU, Q.; ZHU, Y. Therapeutic application of hydrogen sulfide donors: the potential and challenges. **Frontiers in Medicine**. v. 10, n. 1, p. 18-27, 2016.

XIE, H.; XU, Q.; JIA, J.; AO, G.; SUN, Y.; HU, L.; ALKAYED, N. J.; WANG, C.; CHENG, J. Hydrogen sulfide protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by activating AMP-activated protein kinase to restore autophagic flux. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 458, n. 3, p. 632–638, 2015.

YAN, H.; DU, J.; TANG, C. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 1, p. 22–27, 2004.

YANG, G.; ZHAO, K.; JU, Y.; MANI, S.; CAO, Q.; PUUKILA, S.; KHAPER, N.; WU, L.; WANG, R. Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulphydration of Keap1 and activation of Nrf2. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, n. 15, p. 1906–1919, 2013.

YANG, H. Y.; WU, Z. Y.; WOOD, M.; WHITEMAN, M.; BIAN, J. S. Hydrogen sulfide attenuates opioid dependence by suppression of adenylate cyclase/cAMP pathway. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 1, p. 31–41, 2014.

YANG, M.; HUANG, Y.; CHEN, J.; CHEN, Y. L.; MA, J. J.; SHI, P. H. Activation of AMPK participates hydrogen sulfide-induced cyto-protective effect against dexamethasone in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 454, n. 1, p. 42–47, 2014.

YANG, W.; YANG, G.; JIA, X.; WU, L.; WANG, R. Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. **Journal of Physiology**, v. 569, n. 2, p. 519–531 2005.

YONG, Q. C.; PAN, T. T.; HU, L. F.; BIAN, J. S. Negative regulation of betaadrenergic function by hydrogen sulphide in the rat hearts. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 44, n. 4, p. 701–710, 2008.

YU, X. H.; CUI, L. B.; WU, K.; ZHENG, X. L.; CAYABYAB, F. S.; CHEN, Z. W.; TANG, C. K. Hydrogen sulfide as a potent cardiovascular protective agent. **Clinica Chimica Acta** v. 437, p. 78-87, 2014.

ZANARDO, R. C.; BRANCALEONE, V.; DISTRUTTI, E.; FIORUCCI, S.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. **FASEB Journal**, v. 20, n. 12, p. 2118–2120, 2006.

ZHANG, G.; WANG, P.; YANG, G.; CAO, Q.; WANG, R. The inhibitory role of hydrogen sulfide in airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of asthma. **American Journal of Pathology**, v. 18, n. 2, p. 1188–1195, 2013.

ZHAO, W.; ZHANG, J.; LU, Y.; WANG, R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. **EMBO Journal**, v. 20, n. 21, p. 6008–6016, 2001.

ZHOU, X.; CAO, Y.; AO, G.; HU, L.; LIU, H.; WU, J.; WANG, X.; JIN, M.; ZHENG, S.; ZHEN, X.; ALKAYED, N. J.; JIA, J.; CHENG, J. CaMKK β -dependent activation of AMP-activated protein kinase is critical to suppressive effects of hydrogen sulfide on neuroinflammation. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 21, n. 12, p.1741–1758, 2014.

ZINS, K. A.; ORDOG, T.; BARDSLEY, M. R.; FARRUGIA, G.; LEVITT, M. D.; SLUNGAARD, A.; SZURSZEWSKI, J. H.; LINDEN, D. R. T2049 hydrogen sulfide ameliorates murine experimental colitis through specific effects on diverse classes of infiltrating immune cells. **Gastroenterology**, v. 138, n. 5, p. S–621, 2010.

Anexos

Anexo 1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPI.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do sulfeto de hidrogênio (H₂S) na diarreia aguda induzida pela enterotoxina do *Vibrio cholerae* em camundongos: Papel da via adenilato CICLASE/AMPC/PKA", protocolo nº 079/15, sob a responsabilidade de JAND VENES ROLIM MEDEIROS- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 23/10/2015.

Vigência do Projeto	Novembro/ 2015 à Dezembro/ 2017
Espécie/Linhagem	Camundongo isogênico/ <i>Swiss</i>
Nº de Animais	205
Peso/ Idade	20-35 g/ 1 mês
Sexo	Macho e Fêmeas
Origem	Biotério de manutenção de Animais Destinados a Experimentação do Departamento de Morfofisiologia Veterinária-CCA/UFPI.

Teresina, 23 de Outubro de 2015.


 Prof^a Iyete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora