

Desenvolvimento de Metodologia *in vitro* para Avaliação do
Fenômeno de Sensibilização à Histamina induzido pela Toxina
Pertussis e Vacina Pertussis *in vivo*

REGINALDO ASSAD MILLER

Mestrado Profissional

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Orientador: Dra. Helena Pereira da Silva Zamith

Rio de Janeiro

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título: Desenvolvimento de Metodologia *in vitro* para Avaliação do Fenômeno de Sensibilização à Histamina induzido pela Toxina Pertussis e Vacina Pertussis *in vivo*.

Autor: Reginaldo Assad Miller

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado
Departamento de Farmacologia / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Antonio Eugenio Castro Cardoso Almeida
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Marco Antonio Mota da Silva
Hospital Central do Exército / Ministério da Defesa

Orientador: _____
Profa. Dra. Helena Pereira da Silva Zamith
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde /
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Miller, Reginaldo Assad

Desenvolvimento de Metodologia *in vitro* para Avaliação do Fenômeno de Sensibilização à Histamina induzido pela Toxina Pertussis e Vacina Pertussis *in vivo* / Reginaldo Assad Miller. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008.

xxii, 91 p.,il., tab.

Dissertação (Mestrado profissional) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2008.

Orientador: Helena Pereira da Silva Zamith

1.Histamina 2. Toxina Pertussis de Referência 3. Vacina DTP 4. Vacina Pertussis de Referência 5. Ensaio *In Vivo* 6. Ensaio *In Vitro* . I. Título

Development of *in vitro* methodology for the assessment of the histamine sensitization phenomenon induced by pertussis toxin and pertussis vaccine *in vivo*.

À Deus

À minha companheira Roseli

Aos meus filhos Reginaldo e Raquel

À minha família

Mostrai-nos, ó Senhor, vossa bondade, e a vossa salvação nos concedei!

Quero ouvir o que o Senhor irá falar:

é a paz que ele vai anunciar.

Está perto a salvação dos que o temem,

e a glória habitará em nossa terra.

A verdade e o amor se encontrarão,

a justiça e a paz se abraçarão;

da terra brotará a fidelidade,

e a justiça olhará dos altos céus.

O Senhor nos dará tudo o que é bom,

e a nossa terra nos dará suas colheitas;

a justiça andará na sua frente,

e a salvação há de seguir os passos seus.

Mostrai-nos, ó Senhor, vossa bondade, e a vossa salvação nos concedei!

AGRADECIMENTOS

- Ao INCQS pela realização deste estudo.
- À equipe do Serviço de Animais de Laboratório pela colaboração.
- À equipe do Setor de Ensaio Toxicológicos na ajuda na experimentação animal.
- Ao Chefe do Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Fernando Faria Fíngola, INCQS, FIOCRUZ, pelo apoio recebido.
- À Dra. Helena Pereira da Silva Zamith, Chefe do Laboratório de Farmacologia, do Departamento de Farmacologia e Toxicologia, INCQS, FIOCRUZ, pelo privilégio da orientação recebida, pelos ensinamentos, paciência, confiança e pela sua preciosa ajuda no desenvolvimento deste trabalho.
- À Chefe do Laboratório de Toxicologia, Roseli Maria Domingos, pelo incentivo, companheirismo e a oportunidade neste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado, Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pelos ensinamentos e colaboração para a realização deste trabalho.
- Aos meus filhos Reginaldo Junior e Raquel, pela paciência e compreensão.
- A DEUS, por estar aqui e poder realizar este trabalho.

RESUMO

Dentre os efeitos induzidos pela toxina pertussis (TP) em mamíferos, ocupa um lugar de destaque o fenômeno conhecido por “sensibilização” aos efeitos biológicos e letais da histamina, cuja intensidade e constância proporcionaram o estabelecimento de um ensaio *in vivo* de controle de qualidade para avaliação da segurança de vacinas contra a pertussis (coqueluche) e tríplice bacteriana contra a difteria, tétano e coqueluche (DTP). O ensaio de sensibilização à histamina (ESH) em camundongos NIH fêmeas mostrou-se altamente sensível à toxina pertussis de referência NIBSC 90/518 (TPR) detectando níveis tão baixos quanto 20 ng de TP/dose. Todas as 5 vacinas DTP de um produtor nacional no ESH apresentaram níveis de TP ativa que variaram entre 84 a 147 ng/mL, valores inferiores ao valor limite de 1789 ng/mL obtido para a vacina pertussis de referência NIBSC 66/303 (VPR), logo, todas as vacinas foram aprovadas para uso humano. Embora o ESH tenha sido conclusivo quanto à alta especificidade à TP, o elevado número de animais, no mínimo, 40 por ensaio, acarretando alto custo e o sofrimento dos animais são fatores limitantes que dificultam o uso rotineiro como ensaio de controle de qualidade da vacina DTP. O objetivo do nosso estudo foi desenvolver uma metodologia *in vitro* em preparações de íleo isolado de cobaias Short Hair fêmeas (250 a 300 g) fornecidas pelo CECAL/FIOCRUZ /Rio de Janeiro para avaliação do fenômeno de sensibilização à histamina pela TPR. Todos os experimentos foram aprovados de acordo com as diretrizes estabelecidas pela CEUA/FIOCRUZ. Curvas concentração-efeito à histamina em íleos isolados de cobaias foram analisadas e os parâmetros de concentração efetiva média (CE_{50}), concentração efetiva máxima (CE_{max}) e de constante de dissociação no equilíbrio do complexo droga-receptor (K_d) para histamina foram determinados. Não detectamos aumento da resposta contrátil à histamina em íleos isolados de cobaias, 4 dias após o tratamento intraperitoneal com doses e diluições correspondentes às DSH_{50} obtidas em camundongos NIH fêmeas da TPR (40 ng), VPR e das 5 vacinas DTP (0,26 UI) em relação ao grupo controle PBS. Nos dez ensaios realizados por grupo experimental, todos os dados seguiram uma distribuição normal, as variâncias foram homogêneas não se detectando diferenças significantes entre os ensaios. Com doses 10 vezes superiores às DSH_{50} de TPR (400 ng) e de VPR (2,6 UI), todos os dados apresentaram o mesmo comportamento acima. Porém, diferente do esperado, a CE_{50} da histamina e de K_d em íleo isolado de cobaias tratadas pela TPR foi significativamente superior ($p < 0,05$) aos valores médios de CE_{50} para o controle e VPR, não acompanhado de alteração nos valores de CE_{max} ($p = 0,3672$). Tratamento *in vitro* de íleo de cobaia com 30 ng/ml de TPR durante 15 min reduziu aproximadamente à metade ($p = 0,0028$) a concentração efetiva de histamina necessária para ocupação total dos receptores (CE_{max}) em relação à preparação controle. A redução da CE_{max} não foi acompanhada por redução significativa nos valores médios de CE_{50} de histamina ($p = 0,09$), bem como nos valores de K_d ($p = 0,0930$). Por outro lado, incubação de íleos com 40 ng/mL de TPR durante 15 min reduziu significativamente a CE_{max} ($p = 0,0069$), a CE_{50} ($p = 0,0261$) de histamina e de K_d ($p = 0,0479$) em relação à preparação controle. O tratamento *in vitro* do íleo pelo PBS (390 e 590 μ L em 13 mL de Tyrode), respectivamente, não alterou significativamente os valores médios de CE_{50} , ($p = 0,4043$ e $p = 0,1035$), de CE_{max} ($p = 0,2366$ e $p = 0,2708$) e de K_d ($p = 0,4564$ e $p = 0,1158$) de histamina em relação à preparação controle sem tratamento, demonstrando-se ausência de efeito do controle solvente (PBS) sobre a contratilidade de íleo pela histamina. Concluindo, demonstramos o aumento da sensibilização da preparação isolada de íleo de cobaias fêmeas à histamina após o tratamento *in vitro* com 30 e 40 ng/mL de TPR.

Palavras-chave: Histamina - Toxina Pertussis - Vacina - íleo de cobaia

ABSTRACT

Among the effects induced by pertussis toxin (PT) in mammalian species, a prominence place is occupied by the phenomenon known as sensitization to the biological and lethal effects of the histamine, whose intensity and constancy promoted the establishment of an *in vivo* quality control assay to evaluate the safety of the pertussis vaccine (PV) against whooping cough and the triple bacterial vaccine, (DPT) against diphtheria, whooping cough and tetanus. The histamine sensitization assay (HSA) performed with NIH female mice was highly sensitive to reference pertussis toxin NIBSC 90/518 (RPT), detecting levels as low as 20 ng of administered RPT/dose, which caused 50% lethality. All five samples of DPT vaccines from one Brazilian producer presented active PT levels in the range of 84 and 147 ng/ml by the HSA, inferior to the limit value of 1789 ng/mL obtained for reference pertussis vaccine NIBSC 66/303 (RPV), thus all the vaccines were approved for use. Although the HSA has been conclusive in relation to its high specificity for RPT, the large number of mice used (at least 40 per assay) results in high costs and the suffering of the mice are limiting factors that make its routine use as a DPT vaccine quality control assay difficult. The aim of our study was to develop an *in vitro* methodology in ileum segments from female Short Hair guinea pigs (250-300 g) maintained in the animal facilities of the Oswaldo Cruz Foundation in Rio de Janeiro (FIOCRUZ), Brazil, to evaluate the histamine sensitization phenomenon by RPT. All experiments were approved in accordance with the guidelines of the Committee for Ethics in Animal Use of the FIOCRUZ. Concentration effects curves for histamine in guinea pig ileum were studied and the parameters of mean effective concentration (EC_{50}), maximum effective concentration (EC_{max}) and dissociation constant of drug-receptor complex (K_d) were determined. No increase in ileum contractile response to histamine was detected in relation to control PBS 4 days after intraperitoneal treatment of guinea pigs with doses and dilutions corresponding to mean histamine sensitization dose (HSD_{50}) obtained in NIH female mice of RPT (40 ng), RPV and of 5 DPT vaccines (0.26 IU). In all the ten assays performed on the experimental group, the data followed normal distribution, the variances were homogeneous and no significant differences occurred between assays. With doses 10 times higher than the HSD_{50} of RPT (400 ng) and of RPV (2.6 IU), analysis of the data showed the same behavior above. Contrary to the anticipated results, histamine EC_{50} and K_d values in ileum of guinea pigs treated *in vivo* with RPT were significantly higher than the control and RPV ($p < 0.05$) with no alteration in EC_{max} ($p = 0.3672$). *In vitro* 15 min treatment of guinea pig ileum with 30 ng/ml of RPT reduced the EC_{max} to about half in relation to control ($p = 0.0028$), with no significant reduction in the mean values of histamine EC_{50} and K_d ($p = 0.09$). In contrast, *in vitro* 15 min treatment of ileum with 40 ng/ml of RPT significantly reduced histamine EC_{max} ($p < 0.0069$), EC_{50} ($p = 0.0261$) and K_d ($p = 0.0479$) in relation to control ileum. *In vitro* 15 min treatment with PBS (390 and 520 μ L in 13 mL of Tyrode) did not significantly alter the mean values of histamine EC_{50} ($p = 0.4043$ and $p = 0.1035$), EC_{max} ($p = 0.2366$ and $p = 0.2708$) or K_D ($p = 0.4564$ and $p = 0.1158$) in relation to control without treatment, demonstrating no effect of the control solvent (PBS) on ileum contractile response by histamine. In conclusion, increased histamine sensitization in female guinea pig ileum after *in vitro* treatment of 30 and 40 ng/ml of RPT was demonstrated.

Keywords: Histamine - pertussis toxin - vaccine - guinea pig ileum

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância
ASH	Atividade sensibilizadora a histamina
<i>B. Pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
C	Celsius
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório
CE _{max}	Concentração efetiva máxima
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CO ₂	Dióxido de carbono
CHO	Células de ovário de hamster chinês
DFH	Difosfato de histamina
DFT	Departamento de Farmacologia e Toxicologia
DSH ₅₀	Dose Sensibilizante Média à Histamina
DTP	Vacina tríplice contra a difteria, tétano e pertussis (coqueluche)
E _{max}	Efeito máximo
EPM	Erro padrão da média
ESH	Ensaio de sensibilização à histamina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
G	Proteína G
G _i	Proteína G inibitória
GPCC	Ganho de peso corpóreo em camundongos
h	Horas
HAF	Hemaglutinina filamentosa
H ₁	Receptor histaminérgico 1
H ₂	Receptor histaminérgico 2
H ₃	Receptor histaminérgico 3
H ₄	Receptor histaminérgico 4
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G

INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IP	Intraperitoneal
KCl	Cloreto de potássio
K_d	Constante de dissolução droga-receptor
L	Litro
LI	Limite inferior
LS	Limite superior
Log	Logarítmo
LPS	Lipossacarídeo
Ltda	Limitada
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mg	Miligrama
min	Minutos
mm	Milímetros
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
ng/mL	Nanograma por mililitro
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
NIH	National Institute of Health
nM	Nano molar
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução tampão salina-fosfato
pH	Potencial de hidrogênio
PM	Peso molecular
PO	Protocolo
R	Coeficiente de correlação
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid em Milieuhygiene
SAL	Serviço de animais de laboratório
SE	Solução estoque
ST	Solução teste
SNC	Sistema nervoso central

TAC	Toxina adenil ciclase
TD	Toxina dermonecrótica
TP	Toxina pertussis
TPR	Toxina pertussis de referência
UI	Unidade Internacional
UI/mL	Unidade Internacional por mililitro
VP	Vacina pertussis
VPA	Vacina pertussis acelular
VPAs	Vacinas pertussis acelulares
VPCI	Vacina pertussis de células inteiras
VPCIs	Vacinas pertussis de células inteiras
VPR	Vacina pertussis de referência
WHO	World Health Organization

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1.	Cobaias Short Hair	13
FIGURA 2.	Camundongos da cepa NIH	13
FIGURA 3.	Pesagem dos animais	15
FIGURA 4.	Marcação dos animais	15
FIGURA 5.	Administração das diluições por via IP	16
FIGURA 6.	Pesagem dos animais	16
FIGURA 7.	Administração da sol. de histamina	16
FIGURA 8.	Pesagem dos animais.....	17
FIGURA 9.	Marcação dos animais	17
FIGURA 10.	Administração das diluições	18
FIGURA 11.	Pesagem dos animais	18
FIGURA 12.	Sacrifício dos animais.....	18
FIGURA 13.	Preparação para a laparotomia	19
FIGURA 13a.	Preparação para a laparotomia.....	19
FIGURA 14.	Laparotomia	19
FIGURA 14a.	Laparotomia	19
FIGURA 15.	Retirada do íleo	19
FIGURA 16.	Lavagem do íleo	19
FIGURA 17.	Fragmento de íleo na placa de Petri	20
FIGURA 18.	Corte de 3 cm	20
FIGURA 19.	Cuba para banho de órgão isolados	20
FIGURA 20.	Registrador com dois canais	20
FIGURA 21.	Realização da tensão do íleo	21
FIGURA 22.	Registro da tensão	21
FIGURA 23.	Haste de vidro.....	21
FIGURA 24.	Transdutor	21
FIGURA 25.	Fragmento de íleo na cubeta	21
FIGURA 26.	Solução de Tyrode	21
FIGURA 27.	Cilindro com carbogênio	22
FIGURA 28.	Realização da tensão	22
FIGURA 29.	Registros da tensão	22
FIGURA 30.	Retorno da pena à linha base	22
FIGURA 31.	Administração das diluições.....	22

FIGURA 32.	Registros das contrações	22
FIGURA 32a.	Registros das contrações.....	23
FIGURA 32b.	Registros das contrações.....	23
FIGURA 33.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina de preparações isoladas de íleo de cobaias 4 dias após o tratamento (0,5 mL/cobaia/via IP) com as diluições 1/1,84 (DTP-A); 1/1,82 (DTP-B); 1/1,73 (DTP-C); 1/1,05 (DTP-D) e 1/1,22 (DTP-E). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=10)	36
FIGURA 34.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina de preparações isoladas de íleo de cobaias 4 dias após o tratamento (0,5 mL/cobaia/via IP) com PBS (controle) , 40 ng de toxina pertussis, 0,26 UI de vacina pertussis de referência e com as diluições de 5 vacinas (DTP-A a DTP-E) correspondentes às DSH ₅₀ em camundongos NIH fêmeas. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=10)	37
FIGURA 35.	Valores médios de CE ₅₀ (nM), ± erro padrão da média (E.P.M.) de histamina em íleos isolados de cobaias 4 dias após o tratamento (0,5 mL/cobaia via IP) com PBS, TPR, VPR e vacinas DTP (A a E) em doses correspondentes às DSH ₅₀ em camundongos NIH fêmeas. Os resultados são apresentados como médias ± E.P.M. (n = 10).....	41
FIGURA 36.	Valores médios de CE _{max} (nM), ± E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias 4 dias após o tratamento (0,5 mL/cobaia via IP) com PBS, TPR, VPR e vacinas DTP (A a E) em doses correspondentes às DSH ₅₀ em camundongos NIH fêmeas. Os resultados são apresentados como médias ± E.P.M. (n = 10) * Significamente diferente do PBS, (p<0,05)	42
FIGURA 37.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina de preparações isoladas de íleo de cobaias 4 dias após o tratamento (5 mL/cobaia/via IP) com PBS (controle) , 400 ng de TPR, 2,6 UI de VPR, correspondentes a doses 10x superiores às DSH ₅₀ em camundongos NIH fêmeas. Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n=10)	46
FIGURA 38.	Valores médios de CE ₅₀ (nM), ± E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias 4 dias após o tratamento (5 mL/cobaia/via IP) com PBS (controle) , 400 ng de TPR, 2,6 UI de VPR correspondentes às doses 10 X superiores às DSH ₅₀ em camundongos NIH fêmeas. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=10) * Significamente diferente do PBS, (p<0,05)	48
FIGURA 39.	Valores médios de CE _{max} (nM), ± E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias 4 dias após o tratamento (5 mL/cobaia/via IP) com PBS (controle) , 400 ng de TPR, 2,6 UI de VPR correspondentes às doses 10 X superiores às DSH ₅₀ em camundongos NIH fêmeas. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=10)	48

FIGURA 40.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia controle (sem tratamento <i>in vitro</i> pelo PBS). Resultados individuais de cada ensaio (n=5)	54
FIGURA 41.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia incubadas <i>in vitro</i> durante 15 min com 390 µl de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode. Resultados individuais de cada ensaio (n=5)	54
FIGURA 42.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia controle (sem tratamento <i>in vitro</i> por 30 ng/mL de TPR. Resultados individuais de cada ensaio (n=5)	55
FIGURA 43.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia incubadas <i>in vitro</i> durante 15 min com 390 µl de TPR (1 µg/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (concentração final de 30 ng/mL). Resultados individuais de cada ensaio (n=5)	55
FIGURA 44.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleos isolados de cobaias não tratados <i>in vitro</i> (controle PBS) e incubados <i>in vitro</i> durante 15 min com 390 µl de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (PBS 390). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=5)	56
FIGURA 45.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleos isolados de cobaias não tratados <i>in vitro</i> (controle TPR) e incubados <i>in vitro</i> durante 15 min com 390 µl de TPR (1 µg/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode, concentração final de 30 ng/mL (TP 390). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=5)	56
FIGURA 46.	Valores médios de CE ₅₀ (nM), ± E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados <i>in vitro</i> (controle PBS) e incubadas <i>in vitro</i> durante 15 min com 390 µl de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (PBS 390). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=5)	58
FIGURA 47.	Valores médios de CE ₅₀ (nM), ± E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados <i>in vitro</i> (controle TPR) e incubadas <i>in vitro</i> durante 15 min com 390 µl de TPR (1 µg/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (concentração final de 30 ng/mL (TPR 390). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=5)	58
FIGURA 48.	Valores médios de CE _{max} (nM), ± E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados <i>in vitro</i> (controle PBS) e incubadas <i>in vitro</i> durante 15 min com 390 µl de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (PBS 390). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=5)	59

FIGURA 49.	Valores médios de CE_{max} (nM), \pm E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados <i>in vitro</i> (controle TPR) e incubadas <i>in vitro</i> durante 15 min com 390 μ l de TPR (1 μ g/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (TPR 390). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n=5). **Significativamente diferente do PBS (p< 0,01)	59
FIGURA 50.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia controle (sem tratamento <i>in vitro</i> pelo PBS). Resultados individuais de cada ensaio (n=10)	64
FIGURA 51.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia incubadas <i>in vitro</i> durante 15 min com 520 μ l de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode. Resultados individuais de cada ensaio (n=10)	65
FIGURA 52.	.Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia controle (sem tratamento <i>in vitro</i> por 40 ng/mL de TPR). Resultados individuais de cada ensaio (n=9)	65
FIGURA 53.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia incubadas <i>in vitro</i> durante 15 min com 520 μ l de TPR (1 μ g/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (concentração final de 40 ng/mL). Resultados individuais de cada ensaio (n=9)	65
FIGURA 54.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleos isolados de cobaias não tratados <i>in vitro</i> (controle PBS) e incubados <i>in vitro</i> durante 15 min com 520 μ l de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (PBS 520). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n= 10)	66
FIGURA 55.	Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleos isolados de cobaias não tratados <i>in vitro</i> (controle TPR) e incubados <i>in vitro</i> durante 15 min com 520 μ l de TPR (1 μ g/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode, concentração final de 40 ng/mL (TP 520). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n=9)	66
FIGURA 56.	Valores médios de CE_{50} (nM), \pm E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados <i>in vitro</i> (controle TPR) e incubadas <i>in vitro</i> durante 15 min com 520 μ l de TPR (1 μ g/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (concentração final de 40 ng/mL (TPR 520). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n=9). * Significativamente diferente do controle (p< 0,05)	68
FIGURA 57.	Valores médios de CE_{50} (nM), \pm E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados <i>in vitro</i> (controle TPR) e incubadas <i>in vitro</i> durante 15 min com 520 μ l de TPR (1 μ g/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (concentração final de 40 ng/mL (TPR	

520). Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=9). * Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$) 68

FIGURA 58. Valores médios de CE_{max} (nM), \pm E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle PBS) e incubadas *in vitro* durante 15 min com 520 μ l de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (PBS 520). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n=10) 69

FIGURA 59. Valores médios de CE_{max} (nM), \pm E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle PBS) e incubadas *in vitro* durante 15 min com 520 μ l de TPR (1 μ g/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (concentração final de 40 ng/mL. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n=9). ** Significativamente diferente do controle ($p < 0,01$) 69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Tabela 1 : Valores de DSH ₅₀ em diluição, ng/mL e UI/mL no ESH ₅₀ da TPR, VPR e de vacinas DTP (A, B, C, D e E)	26
TABELA 2.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL de PBS/animal por via intraperitoneal (10 ensaios).....	28
TABELA 3.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/25 de TPR/animal (40ng) por via intraperitoneal (10 ensaios)	28
TABELA 4.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/22,36 de VPR/animal (0,26 UI) por via intraperitoneal (10 ensaios)	29
TABELA 5.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.84 da vacina DTP–A/animal por via intraperitoneal (10 ensaios)	29
TABELA 6.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.82 da vacina DTP–B/animal por via intraperitoneal (10 ensaios)	30
TABELA 7.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.73 da vacina DTP–C/animal por via intraperitoneal (10 ensaios)	30
TABELA 8.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.05 da vacina DTP–D/animal por via intra peritoneal (10 ensaios)	31
TABELA 9.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1,22 da vacina DTP–E/animal por via intra peritoneal (10 ensaios)	31
TABELA 10.	Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL de PBS/animal por via intraperitoneal (10 ensaios)	32
TABELA 11.	Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/25 de ¹ TPR/animal (40ng) por via intraperitoneal (10 ensaios)	32
TABELA 12.	Tabela 12: Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/22,36 de ¹ VPR/animal (0,26 UI) por via intraperitoneal (10 ensaios)	33
TABELA 13	Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.84	

	da vacina DTP–A/animal por via intraperitoneal (10 ensaios)	33
TABELA 14.	Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.82 da vacina DTP–B/animal por via intraperitoneal (10 ensaios)	34
TABELA 15.	Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.73 da vacina DTP–C/animal por via intraperitoneal (10 ensaios)	34
TABELA 16.	Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.05 da vacina DTP–D/animal por via intra peritoneal (10 ensaios)	35
TABELA 17.	Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1,22 da vacina DTP–E/animal por via intra peritoneal (10 ensaios)	35
TABELA 18.	Valores de CE_{50} , E_{Max} , R, C_{MAX} e Kd a partir das curvas de concentração-resposta à histamina em preparações isoladas de íleo de cobaia	38
TABELA 19.	Valores de CE_{50} , E_{Max} , R, C_{MAX} e Kd a partir das curvas de concentração-resposta à histamina em preparações isoladas de íleo de cobaia	39
TABELA 19a.	Valores de CE_{50} , E_{Max} , R, C_{MAX} e Kd a partir das curvas de concentração-resposta à histamina em preparações isoladas de íleo de cobaia	40
TABELA 20.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 5 mL de PBS/animal por via intraperitoneal (10 ensaios)	43
TABELA 21.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 5 mL da diluição 1/25 de solução de ² TPR/animal (400 ng) via intraperitoneal (10 ensaios)	43
TABELA 22.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 5 mL de ² VPR/animal (2,6 UI) por via intraperitoneal (10 ensaios)	44
TABELA 23.	Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 5 mL de PBS/animal por via intraperitoneal (10 ensaios)	44
TABELA 24.	Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 5 mL da diluição 1/25 de solução de ¹ TPR/animal (400 ng) via intraperitoneal (10 ensaios)	45
TABELA 25.	Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 5 mL de ¹ VPR/animal (2,6	

	UI) por via intraperitoneal (10 ensaios)	45
TABELA 26.	Valores de CE_{50} , E_{Max} , R, C_{MAX} e Kd a partir das curvas de concentração-resposta à histamina em preparações isoladas de íleo de cobaia	47
TABELA 27.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> pelo PBS (05 ensaios) Controle (sem tratamento)	50
TABELA 27a.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> pelo PBS (05 ensaios) PBS (390 μ l em 13 mL de solução de Tyrode)	50
TABELA 28.	Tabela 28: Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> por 30 ng/mL de TPR (05 ensaios) Controle (sem tratamento)	51
TABELA 28a.	Tabela 28a: Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> por 30 ng/mL de TPR (05 ensaios) TP (30 ng/mL)	51
TABELA 29.	Tabela 29: Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> pelo PBS (05 ensaios) Controle (sem tratamento)	52
TABELA 29a.	Tabela 29a: Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> pelo PBS (05 ensaios) PBS (390 μ l em 13 mL de solução de Tyrode)	52
TABELA 30.	Tabela 30: Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> por 30 ng/mL de TPR (05 ensaios) Controle (sem tratamento)	53
TABELA 30a.	Tabela 30a: Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> por 30 ng/mL de TPR (05 ensaios) TPR (30 ng/mL)	53
TABELA 31.	Valores de CE_{50} , E_{Max} , R, C_{MAX} e Kd, a partir das curvas de concentração-resposta à histamina em preparações isoladas de íleo de cobaia não tratadas e tratadas <i>in vitro</i> pelo PBS e TPR	57
TABELA 32.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> pelo PBS (10 ensaios) Controle (sem tratamento)	60
TABELA 32 ^a .	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> pelo PBS (10 ensaios) PBS (520 μ l em 13 mL de solução de Tyrode)	61
TABELA 33.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> por 40 ng/mL de TPR (9 ensaios) Controle (sem tratamento)	61

TABELA 33a.	Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> por 40 ng/mL de TPR (10 ensaios) TPR (40 ng/mL) .	62
TABELA 34.	Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> pelo PBS 10 ensaios) Controle (sem tratamento)	62
TABELA 34a.	Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> pelo PBS (10 ensaios) PBS (520 µl em 13 mL de solução de Tyrode)	63
TABELA 35.	Tabela 35: Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> por 40 ng/mL de TPR (9 ensaios) Controle (sem tratamento)	63
TABELA 35a.	Tabela 35a: Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento <i>in vitro</i> por 40 ng/mL de TPR (10 ensaios) TPR (40 ng/mL)	64
TABELA 36.	Valores de CE_{50} , E_{Max} , R, C_{MAX} e Kd, a partir das curvas de concentração-resposta à histamina <i>in vitro</i> em preparações isoladas de íleo de cobaia	67

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Toxina Pertussis (TP)	1
1.2.	Vacinas Pertussis (VP)	2
1.3.	Controle de qualidade de vacinas pertussis	4
1.4.	Atividade Sensibilizadora à Histamina (ASH).....	5
1.5.	Histamina	9
2.	OBJETIVOS	12
2.1.	Objetivo geral	12
2.2.	Objetivo específico	12
3.	METODOLOGIA	13
3.1.	Animais	13
3.2.	Toxina pertussis de referência (TPR)	14
3.3.	Vacinas	14
3.3.1.	Vacina pertussis de referência (VPR)	14
3.3.2.	Vacinas DPT	14
3.4.	Ensaio	15
3.4.1.	Ensaio <i>in vivo</i> de sensibilização à histamina ao efeito letal da histamina em camundongos NIH fêmeas (ESH <i>in vivo</i>)	15
3.4.1.1	Execução do ESH <i>in vivo</i>	15
3.4.2.	Ensaio <i>in vitro</i> de sensibilização à histamina ao efeito letal da histamina (ESH <i>in vitro</i>)	17
3.4.2.1.	Administração de cobaias com doses correspondentes as DSH ₅₀ em camundongos	17
3.4.2.1.1	Procedimento para isolamento do íleo	19
3.4.3.	Execução do ESH <i>in vitro</i> em cobaias não tratadas.....	23
3.5.	Cálculos	24
4.	RESULTADOS	25
4.1.	Determinação dos valores de DSH ₅₀ para vacinas DTP (DTP-A a DTP-E), TPR e VPR	25
4.1.1.	Ensaio <i>in vivo</i> de sensibilização à histamina ao efeito letal da histamina em camundongos NIH fêmeas	25

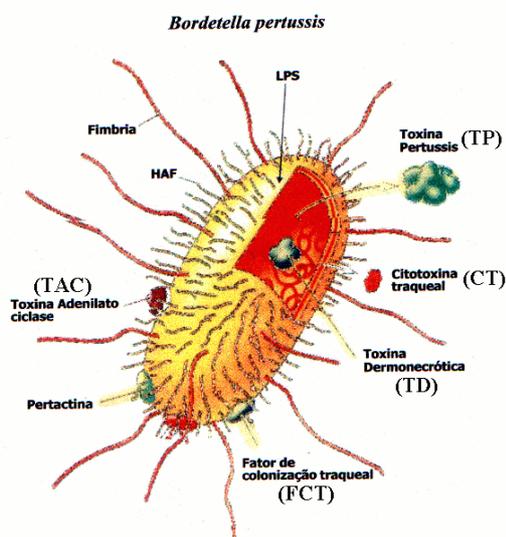
4.2.	Efeito do tratamento <i>in vivo</i> pela TPR, VPR e vacinas DTP sobre a contratilidade do íleo isolado de cobaias à histamina <i>in vitro</i>	27
4.2.1.	Administração de cobaias com doses correspondentes às DSH ₅₀ obtidas em camundongos (0,5 mL)	27
4.2.2.	Administração de cobaias com doses 10 vezes superiores às DSH ₅₀ de TPR e VPR obtidas em camundongos NIH fêmeas (5 mL)	42
4.3.	Efeito do tratamento <i>in vitro</i> pelo PBS e TPR sobre a contratilidade do íleo isolado de cobaias à histamina	49
4.3.1.	Tratamento <i>in vitro</i> de íleo isolado de cobaia com PBS (controle) e TPR (30 ng/mL)	49
4.3.2.	Tratamento <i>in vitro</i> de íleo isolado de cobaia com PBS (controle) e TPR (40 ng/mL)	60
5.	DISCUSSÃO	70
5.1.	ESH <i>in vivo</i> em Camundongos NIH fêmeas	70
5.2.	Importância do Desenvolvimento de Metodologia <i>in vitro</i> para evidenciação da facilitação induzida pela TPR aos efeitos biológicos induzidos pela TP	71
5.2.1.	Efeito do tratamento <i>in vivo</i> pela TPR, VPR e vacinas DTP sobre a contratilidade do íleo isolado de cobaias à histamina <i>in vitro</i>	74
5.2.1.1.	Administração de cobaias com doses correspondentes às DSH ₅₀ obtidas em camundongos NIH fêmeas	74
5.2.1.2.	Administração de cobaias com doses 10 vezes superiores às DSH ₅₀ de TPR e VPR obtidas em camundongos NIH fêmeas	75
5.2.2.	Efeito do tratamento <i>in vitro</i> pelo PBS e TP sobre a contratilidade do íleo isolado de cobaia	75
5.2.2.1.	Tratamento <i>in vitro</i> de íleo isolado de cobaia com PBS (controle) e TPR (30 ng/mL).....	75
5.2.2.2.	Tratamento <i>in vitro</i> de íleo isolado de cobaia com PBS (controle) e TPR (40 ng/mL).....	77
6.	CONCLUSÃO	79
7.	PERSPECTIVAS	81
8.	REFERÊNCIAS	82
	ANEXO	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Toxina Pertussis (TP)

A TP é a principal toxina secretada pela *Bordetella pertussis*, bactéria gram-negativa causadora da coqueluche. A TP é capaz de penetrar nas células do hospedeiro e de interferir principalmente no sistema regulador da atividade da adenilil ciclase das células eucarióticas, através da inibição da subunidade α inibitória da proteína G_i com o conseqüente aumento da concentração intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). Este aumento de AMPC é o responsável pelos efeitos sistêmicos observados no quadro infeccioso, representados pelo aparecimento de acentuada linfocitose, hiperinsulinemia, hipoglicemia e sensibilização à histamina.

Além da TP, a *B. pertussis* produz outras substâncias biologicamente ativas, as quais, atuando conjuntamente, exercem um papel importante na fisiopatologia da coqueluche. Tais substâncias incluem: os componentes de superfície, como a hemaglutinina filamentosa (HAF), a pertactina, os aglutinógenos e o lipopolissacarídeo (LPS); as toxinas de origem endógena, isto é a dermonecrótica (TD), a adenilil ciclase (TAC), a citotoxina traqueal e uma hemolisina (WEISS ; HEWLETT, 1986).



Apesar dos programas eficientes de vacinação pediátrica, estima-se que a coqueluche ainda afeta 40 milhões de pessoas (GALAZKA, 1991), resultando em mais de 350.000 mortes/ano no mundo (CHERRY, 1996). Mesmo em populações com boa cobertura vacinal, a coqueluche continua sendo uma importante causa da morbidade e

mortalidade em lactentes (RANGANATHAN et al., 1999). A coqueluche ou pertussis é uma doença respiratória que pode ser causada por três espécies de bactérias gram-negativas do gênero *Bordetella*: *B. pertussis*, que é a causa mais freqüente e mais grave; *B. parapertussis*, mais benigna e *B. bronchiseptica*, a mais rara.

Normalmente o período de incubação da infecção por *B. pertussis* dura 9 a 10 dias antes do início da fase catarral. Os sintomas iniciais são comparáveis aos de uma infecção leve das vias respiratórias superiores incluindo rinorréia, febre baixa e tosse moderada. A fase catarral é seguida por uma fase paroxística, caracterizada por tosse copiosa, sem as inspirações intermitentes, provavelmente devido à dificuldade para expelir o muco espesso da árvore traqueobrônquica. Os acessos são seguidos de uma rápida inspiração de ar que produz o “guincho” típico da coqueluche. A fase paroxística pode durar até 6 semanas (raramente dura mais); durante esse tempo os ataques de tosse diminuem gradualmente.

Durante a fase final de convalescença da doença, a tosse não-paroxística pode persistir por várias semanas até que ocorra recuperação completa.

A infecção por *B.pertussis* em lactentes está associada a complicações freqüentemente graves e pode ser fatal. As complicações da coqueluche em lactentes incluem: otite média, pneumonia, atelectasia, encefalopatia grave e dificuldades de alimentação em decorrência da tosse emetizante.

1.2. Vacinas Pertussis (VP)

Desde 1940, o emprego de vacinas pertussis de células inteiras (VPCI) tem reduzido drasticamente a incidência de coqueluche.

Anteriormente à vacinação, a freqüência de casos relatados de coqueluche era de 157 por 100.000 habitantes. Em 1981, a incidência de casos de coqueluche e de mortes associadas diminuíram para 1 por 100.000 habitantes (CHERRY et al., 1988).

Atualmente são empregados dois tipos de vacinas contra a coqueluche: as VPCIs e as acelulares. Ambos tipos de vacinas podem ser combinados com os toxóides diftérico e tetânico e administrados como vacinas combinadas trivalentes. A VPCI, como seu nome indica, é composta de células inteiras inativadas de *B. pertussis*. Embora os processos de produção possam variar segundo o fabricante, em geral, as culturas de *B. pertussis* obtidas são concentradas e mortas em seguida, mediante o uso de calor, de substâncias químicas como o timerosal, ou mesmo uma combinação de ambos, ou o tratamento pelo formaldeído.

A formulação final geralmente envolve a diluição a uma concentração celular bacteriana aceitável determinada pela opacidade, seguida pela adição dos toxóides diftérico e tetânico adsorvidos em alumínio.

A maioria das VPCIs apresenta uma eficácia de no mínimo 80%, estimativa revelada em ensaios iniciais de eficácia realizados pelo Conselho Britânico de Investigação Médica (MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1951), e confirmada em estudos de BLENNOW et al., (1988), ainda que tenham sido publicadas estimativas inferiores (CLARCKSON, 1987).

A cada ano são administradas milhões de doses de VPCIs, principalmente sob a forma de vacina DTP, que se mostram eficazes para o controle da coqueluche. Eventos adversos têm ocorrido, ainda que a maioria destes tenham uma evolução limitada com recuperação completa, eventos neurológicos graves são raros e podem ocorrer. A vacinação tem sido associada a reações tanto sistêmicas como locais (CODY et al., 1981). As reações locais mais comuns são eritema, inflamação e dor no local da injeção e as sistêmicas incluem febre (temperatura igual ou maior que 38° C), sonolência, nervosismo, vômitos, anorexia e choro persistente. Foram também registradas associações temporárias de certas reações graves com a vacinação, como crise convulsiva, hipotonia e apatia, encefalopatia e inclusive a morte, ainda que a relação causa e efeito com a VPCI não seja conclusiva (CHERRY et al., 1988).

A ocorrência de freqüentes efeitos adversos associados às VPCIs estimularam o desenvolvimento nos anos 70, de um novo tipo de vacina contra a coqueluche, denominada vacina pertussis acelular (VPA), composta de adesinas tais como, HAF, pertactina, fímbrias e TP destoxificadas. Estas quatro proteínas produzidas pela *B.pertussis* podem ser purificadas e inativadas em quantidades suficientes para a produção de vacinas (GOLDAN et al., 1982; KASLOW ; BURNS, 1992). A destoxificação pode ser realizada por engenharia genética resultando em alterações de resíduos específicos de aminoácidos envolvidos na capacidade enzimática ou na atividade de ligação da toxina ao receptor na célula alvo. Avaliação em animais de laboratório e em ensaios clínicos têm indicado que as VPAs são quase tão protetoras quanto as VPCI e são muito menos reatogênicas. Entretanto, estas vacinas são mais caras e necessitam de múltiplas administrações para alcançar ótima proteção.

A TP inativada faz parte de todas as vacinas pertussis acelulares, isoladamente ou associada a HFA, pertactina, ou fímbrias 2 e 3. A TP é o mais importante antígeno indutor de imunidade da *B.pertussis* e exerce efeitos no sistema imune incluindo o aumento da

produção de imunoglobulinas (Ig), IgE, IgA e de IgG, intensificação das reações de hipersensibilidade do tipo retardada e a indução de doenças autoimunes experimentais (KASLOW ; BURNS, 1992).

Tem-se comprovado que uma vacina monovalente composta de TP inativada com formaldeído protege contra coqueluche. A maioria das vacinas acelulares contra a coqueluche contém também HAF. Além da TP, a HAF é uma proteína filamentosa com peso molecular de aproximadamente 200.000 e que atua como mediadora da aderência do microorganismo às células (URISU et al., 1986). Os ensaios clínicos realizados em seres humanos têm demonstrado que a vacina composta de HAF e TP inativadas protege da infecção melhor do que as que contém unicamente esta última (STORSAETER et al., 1990).

Algumas VPAs contém também pertactina, fímbrias ou ambas. A pertactina é uma proteína da membrana exterior que parece intervir na aderência da bactéria à célula (LEININGER et al., 1996). O papel biológico das fímbrias de *B. pertussis* ainda não foi esclarecido. Tem-se observado que ambos os tipos de proteínas são protetoras em modelos animais (SHAHIN et al., 1990; ZHANG et al., 1985). Atualmente estuda-se a capacidade destes antígenos de contribuir para a proteção contra a doença nos seres humanos.

Os ensaios clínicos têm demonstrado que VPAs em geral estão associadas com menos reações locais e menos febre do que as VPCIs (ANDERSON et al., 1988).

Tanto no Japão como nos Estados Unidos, as VPAs são recomendadas somente para a vacinação de crianças de 15 ou mais meses de idade, ainda que recentemente no Japão, começou-se a vacinar crianças a partir dos 3 meses de idade. Como não são disponíveis dados suficientes sobre a eficácia das VPAs para lactentes de menos de 6 meses de idade, continuam sendo realizados estudos clínicos a fim de se ter os dados necessários para estender a administração destas vacinas a crianças de idade menores.

1.3. Controle de qualidade de vacinas pertussis

Dentre os constituintes da vacinas contra difteria, tétano e pertussis (DTP), o componente pertussis é o responsável pela variabilidade de resposta aos ensaios toxicológicos aos quais a vacina tríplice é submetida para a sua aprovação. Na VP, a TP é também o principal fator de virulência e mais importante antígeno indutor de imunidade e

atua como adjuvante imunológico aumentando a produção de anticorpos de várias classes, principalmente IgE (MUNOZ et al., 1981, 2004, MU; SEWELL, 1993, 2003).

O ensaio de sensibilização à histamina *in vivo* (ESH) permite a detecção da atividade sensibilizadora à histamina da TP sendo considerado mais confiável do que o ensaio de ganho de peso corpóreo em camundongos (GPCC) na detecção de resíduos ativos de TP eventualmente presentes nas vacinas DTP. Por este motivo, a World Health Organization (WHO) recomenda aos produtores de vacinas DTP, o ESH *in vivo* como sendo apropriado para o controle de qualidade de lotes de vacinas DTP (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990) baseado no estudo colaborativo internacional no qual o ESH mostrou-se mais sensível que o ensaio de GPCC (VAN STRAATEN et al., 1997) na avaliação da toxicidade de VPCIs.

A sensibilização ao efeito letal da histamina observada em camundongos previamente inoculados com a TP ou com resíduos de TP não inativados presentes em VP e em vacinas DTP, é um fenômeno dose-dependente, o que propiciou o seu emprego como teste *in vivo* para a quantificação de resíduos de TP não inativados presentes em VP e vacinas DTP.

A finalidade do ESH é a determinação das doses sensibilizantes médias à histamina (DSH_{50}), isto é, das doses de toxina pertussis de referência (TPR), das vacinas pertussis de referência (VPR) e DTP que causam sensibilização à histamina, ou seja que determinam mortes em 50% dos animais.

Embora os resultados obtidos no ensaio de sensibilização à histamina em camundongos NIH fêmeas (originários do National Institute of Health) com vacinas DTP sejam conclusivos quanto à alta especificidade à TP, o elevado número de animais necessários para a sua realização, no mínimo 40 animais por ensaio, acarretando alto custo e sofrimento aos animais são fatores limitantes, que inviabilizam o seu uso rotineiro, como ensaio de controle da qualidade da vacina DTP.

1.4. Atividade Sensibilizadora a Histamina (ASH)

Munoz e Bergman em 1977 descreveram no livro *Bordetella pertussis*, Imunologia e outras Atividades Biológicas, importantes considerações sobre a ação histamino-sensibilizante da TP. A maioria dos trabalhos utilizaram preparações solúveis de TP com

impurezas, mas, segundo os autores, resultados semelhantes poderiam ser obtidos com preparações puras de TP. Os resultados mais importantes estão resumidos abaixo.

Como foi mostrado por PARFENTJEV e GOODLINE (1948), camundongos tratados com a VP mostraram aumento de cerca de 200 vezes de suscetibilidade à histamina. Esta ação foi induzida em camundongos CFW fêmeas com baixas doses de TP, como 0,5 ng sob a forma cristalizada. O aumento da sensibilidade à histamina foi demonstrado em um curto período de tempo, ou seja, 90 min após administração de TP e persistiu sem sofrer diminuição durante o período de 21 dias. Depois deste período, a sensibilidade diminuiu, mas ainda pôde ser detectada 85 dias após a administração da TP, pois, a dose letal média (DL_{50}) da histamina para os camundongos normais que era de 15 mg, passou a ser somente de 3 mg. Este efeito duradouro da TP, indubitavelmente desempenha um papel importante em relação as suas atividades biológicas. Estes dados sugerem que a TP permanece ligada aos receptores por um longo período de tempo. A persistência da TP no local da injeção foi indicada pelo desenvolvimento de uma reação inflamatória na pata dos camundongos, 5 a 6 dias após sua aplicação local (MUNOZ; ROBBINS; COLE, 1980).

O fenômeno de sensibilização à histamina pode ser observado somente em poucas cepas de camundongos, sendo as fêmeas da cepa CFW, uma das mais sensíveis. Esta suscetibilidade deve ser controlada geneticamente, mas o exato gene ou genes que a controlam ainda não foram determinados.

A maioria das cepas de camundongos tem-se mostrado, inicialmente, altamente sensíveis ao desafio combinado com a histamina e a serotonina (MUNOZ; BERGMAN, 1977). Das 34 cepas de camundongos testadas, somente a C3H/H2N foi claramente resistente ao desafio com a histamina ou a serotonina, ou com uma combinação das duas aminas. A resistência da maioria das cepas de camundongos à histamina está provavelmente ligada a destoxificação eficiente desta amina. Igualmente, a resistência à serotonina também pode estar ligada a destoxificação eficiente desta substância, mas esta hipótese não foi testada experimentalmente.

O desenvolvimento da sensibilidade à histamina pode estar relacionado a vários fatores. O estresse induzido por fatores dietéticos, químicos ou físicos fazem com que a cepa CFW se torne a mais resistente à sensibilização (MUNOZ; BERGMAN, 1977). Camundongos muito jovens (com menos de 5 semanas de idade) são menos suscetíveis ao desafio com a histamina do que camundongos adultos (com idade acima de 5 semanas).

Esta constatação torna sem sentido a mudança gradual da dose de desafio da histamina tomando como base o peso corpóreo do animal.

Camundongos machos são menos suscetíveis do que camundongos fêmeas a sensibilização à histamina pela TP. O efeito da TP na DSH_{50} mostra uma relação quantitativa inversa: quando a dose da TP é aumentada, a DSH_{50} decresce a um ponto mínimo, a partir do qual um aumento adicional da TP não causa qualquer efeito adicional.

Esta relação pode indicar que a TP interage com os receptores e que, quando a maioria dos receptores apresentam-se bloqueados, nenhuma ação adicional poderá ser observada. Com doses muito baixas da TP, a DL_{50} de histamina foi maior que 8 mg. Quando a dose da TP foi consecutivamente dobrada, a DL_{50} da histamina diminuiu para 3,42; 1,3; 0,81 e 0,48 mg em uma relação quase direta. Com doses iguais ou superiores a 2,5 µg de extrato bruto, um *plateau* de sensibilidade foi alcançado, no qual aumentos adicionais da TP não causaram nenhuma diminuição significativa na DL_{50} da histamina. A mais baixa DL_{50} da histamina foi encontrada com as doses mais altas de TP utilizadas (MUNOZ; BERGMAN, 1977).

As observações sobre o efeito do estresse na sensibilização à histamina focaram a atenção no papel das glândulas supra-renais neste fenômeno. A adrenalectomia torna camundongos tão suscetíveis à histamina quanto o tratamento pela TP. Alguns pesquisadores achavam que esteróides adrenais fossem importantes, já que altas doses destes esteróides conferiam uma certa proteção a estes camundongos da morte pela histamina. Mas na realidade era a epinefrina, um hormônio produzido pelo tecido medular das adrenais, que demonstrou proteger efetivamente camundongos adrenalectomizados ou TP- tratados de morte pela histamina (MUNOZ; BERGMAN, 1977). A proteção de camundongos tratados com a TP só era possível quando a quantidade de TP administrada para sensibilizar os camundongos não era excessiva. Com altas doses da TP parece que a epinefrina não pode compensar os efeitos mediados pelo pertussígeno (TP e ou a *B. pertussis*). Estas observações convenceram os autores que a TP interferia com uma função imprescindível da epinefrina, função esta necessária para manter o volume sanguíneo, possivelmente pela redução ou pelo controle nas mudanças de permeabilidade produzidas pela histamina e outras aminas que têm ação sobre os vasos sanguíneos.

Em camundongos, a morte pela histamina, serotonina, e pela combinação histamina e serotonina, ou anafilaxia é devida a perda da pressão sanguínea (MUNOZ; BERGMAN, 1977). Isto foi demonstrado quando camundongos que morreram por esta forma de choque

foram protegidos, simplesmente restabelecendo volume de sangue com salina fisiológica. A epinefrina deve ser capaz de prevenir alguma perda de fluido da circulação permitindo que o coração possa continuar bombeando sangue completamente aos tecidos.

Em camundongos normais, um choque pela histamina não é fatal, enquanto que nos animais tratados com a TP ocorre a morte. Contudo, ainda não está claro quais são os receptores adrenérgicos que estão envolvidos, podendo ser diferentes dependendo do tecido

De acordo com WILT et al. (1983), a TP diminui as respostas autonômicas cardiovasculares do rato, pois, as respostas α_2 adrenérgicas foram reduzidas enquanto as respostas α_1 adrenérgicas foram aumentadas. Os autores também observaram uma disfunção colinérgica nos vasos sanguíneos e no coração.

Conclusões semelhantes foram obtidas por BOYER et al., (1983) que empregaram uma preparação da TP purificada em camundongos e verificaram que os receptores α_2 adrenérgicos foram bloqueados por esta toxina.

WILT et al. (1983) também verificaram que a TP diminuiu a pressão sanguínea e reduziu a resistência total vascular periférica. Em parte, estas mudanças hemodinâmicas produzidas poderiam estar relacionadas à aumentada permeabilidade dos vasos capilares do músculo esquelético, como foi demonstrado em camundongos tratados com a TP. Observou-se que no camundongo o músculo esquelético foi o único tecido que mostrou uma permeabilidade capilar aumentada depois da injeção da TP. Postulou-se que alguns agentes normalmente liberados neste músculo têm a capacidade de aumentar a permeabilidade dos vasos capilares, e que sob a influência da ação da TP, esta permeabilidade é aumentada pelo fato de que algumas funções adrenérgicas são bloqueadas.

Muito ainda precisa ser feito antes que a sensibilização à histamina ou o aumento dos efeitos do choque produzidos pela TP, possam ser totalmente compreendidos, porém estudos sobre os efeitos da TP em receptores adrenérgicos, na ADP-ribosilação de proteínas de membrana, na inibição dos receptores mediadores da adenilil ciclase, poderiam explicar melhor estes fenômenos.

O fenômeno de sensibilização induzido pela TP ao efeito letal da histamina, evidenciado a partir da administração de histamina exógena, ocorre muito provavelmente

pelo aumento da afinidade dos receptores à histamina resultante do bloqueio prolongado da sua liberação endógena dos mastócitos e basófilos.

1.5. Histamina

A histamina é um composto endógeno sintetizado, armazenado e liberado principalmente por mastócitos e que, depois de liberado exerce numerosas ações nos sistemas nervoso, endócrino e imune através da interação com três receptores farmacologicamente diferentes, H₁, H₂ e H₃. Segundo BONAMIN e ABEL (2002), a histamina pertence à classe dos autacóides, definidos como substâncias endógenas de estrutura química e atividades farmacológicas diversas. É um dos mediadores mais importantes da reação de hipersensibilidade imediata e da resposta inflamatória aguda.

A histamina é uma amina biogênica, quimicamente, 2-(4-imidazolil)-etilamina, ou β aminoetilimidazol sendo formada a partir da L-histidina pela ação da histidina descarboxilase. Sua constituição química compreende um anel imidazólico e um grupo amino, conectados por dois grupos metila. A estrutura do anel imidazólico da histamina é extensamente modificada ou substituída por outros grupamentos nos antagonistas H₁ (ADAMS, 1992).

A histamina, descoberta no início do século XX, foi detectada pela primeira vez como estimulante uterino. Distribui-se amplamente entre os tecidos dos mamíferos em ambos os compartimentos, neural e extra-neural (IZZ0, 1998).

No início do século passado (1910 -1911), DALE e LAIDLAW foram os responsáveis pelos estudos pioneiros sobre as ações fisiológicas da histamina envolvendo a estimulação de musculatura lisa, bem como a sua capacidade de produção de intensa vasodilatação. Esses pesquisadores demonstraram que a reação anafilática local era consequência da reação antígeno-anticorpo no tecido sensibilizado. Subseqüentemente, descreveram que a histamina podia reproduzir em grande parte, as alterações observadas nas reações anafiláticas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A demonstração de que a histamina era liberada em reações anafiláticas nos tecidos foi a base inicial das pesquisas realizadas posteriormente, e atualmente, quase um século após sua descoberta, ainda têm sido descritos novos conceitos sobre a síntese, metabolismo, a expressão de receptores e os efeitos fisiológicos e patológicos desencadeados por esse mediador (HOLGATE, 1999).

Os principais locais de armazenamento e liberação da histamina são os mastócitos amplamente distribuídos no organismo sendo particularmente encontrados em associação com vasos sanguíneos e linfáticos, no tecido conjuntivo subepitelial da pele, ao redor de nervos periféricos e nos tratos gastrintestinal, respiratório e geniturinário (GALLI, 1993). Além dos mastócitos, os basófilos e os neurônios no sistema nervoso central (SNC) são outros locais de armazenamento e de liberação de histamina. Trata-se, portanto de autacóide amplamente distribuído pelo organismo encontrando-se em maiores concentrações na pele, pulmões e mucosa gastrintestinal e correspondendo à densidade dos mastócitos (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Além dessas funções clássicas desencadeadas pela histamina e mediadas por diferentes receptores, alguns estudos têm demonstrado que estes receptores também são expressos de maneira constitutiva em diferentes células do sistema imune, assim como em mastócitos e basófilos, indicando que a histamina de forma direta e ou indireta pode influenciar a atividade efetora destas células (BACHERT, 2002).

Diversos efeitos fisiológicos e patológicos atribuídos à histamina são decorrentes de sua ligação a 3 tipos de receptores designados como H₁, H₂ e H₃, membros de uma família de receptores acoplados a proteínas G (HOUGH, 2001).

Sabe-se da literatura que a histamina apresenta vários efeitos biológicos via receptor H₁ relacionados principalmente aos processos inflamatórios e alérgicos como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, secreção de muco e broncoconstricção (WHITE, 1990; HOWARTH, 1990).

Além disso, desempenha função fisiológica como inibidor da liberação de neurotransmissores, particularmente no SNC e no trato gastrintestinal (PANULA et al., 1990).

As respostas de broncoconstricção são mediadas pelos receptores de histamina H₁ acoplados a fosfolipase C β presentes na musculatura lisa dos brônquios e bronquíolos, enquanto a vasodilatação cutânea facial é mediada por receptores H₂ acoplados a adenilil ciclase. Além de atuar em receptores H₁ do músculo bronquiolar, a histamina atua também a nível de receptores H₁ no músculo liso do íleo e do útero provocando contração, bem como em receptores H₂ no estômago causando aumento da secreção ácida (RANG; DALE; RITTER, 2001).

A histamina causa efeitos cardiovasculares, dilata os vasos sanguíneos através de uma ação sobre os receptores H₁ e o efeito depende, em parte do endotélio em alguns

leitões vasculares. Aumenta a frequência e o débito cardíacos através de uma ação sobre os receptores H₂ cardíacos (efeito direto) e que pode ser acoplado a uma resposta reflexa indireta se houver queda da pressão arterial.

As ações da histamina mediadas pelos receptores H₂ são atribuídas à ativação da adenilil ciclase. Isto ocorre nos sistemas de receptor H₂ que medeiam a secreção ácida, o relaxamento do músculo liso vascular, a excitação neuronal, a inibição da desgranulação basófila e o aumento da contratilidade miocárdica. Apesar da ativação de receptores H₂ estar preferencialmente relacionada ao aumento de secreção gástrica e ao aumento da frequência e débito cardíacos, o efeito da histamina sobre estes receptores também ocasiona relaxamento da musculatura lisa e resistência das vias aéreas superiores (KNIGHT et al., 1992; TAMAOKI et al., 1997).

Em contraste, os receptores H₃ estão principalmente envolvidos na regulação da liberação autócrina de histamina em tecidos nervosos.

Embora as funções específicas da histamina mediadas por receptores H₁, H₂ e H₃ estejam claramente caracterizadas (BAKKER et al., 2002), pouco se tem descrito sobre o efeito da histamina via receptor H₄, embora alguns trabalhos demonstraram significativa expressão dos mesmos em células e tecidos pulmonares (MORSE et al., 2001, GANTNER et al., 2002).

No presente trabalho cabe assinalar uma possibilidade ideal, qual seja a de substituir o ensaio de sensibilização à histamina *in vivo* pelo correspondente *in vitro* em íleo de cobaia, condição que eliminaria a maioria dos inconvenientes assinalados, além, de estarmos comprometidos com o chamado “Princípio dos 3 Rs” (substituição, redução e refinamento), apoiando a busca permanente de métodos alternativos ao uso de animais (FLECKNELL, 2002). 2002). Nestas preparações nos propusemos a estudar *in vitro* a sensibilização da histamina induzida pela TP.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia *in vitro* em preparação isolada de íleo de cobaia para avaliação do fenômeno de sensibilização à histamina.

2. 2. Objetivo específico

Relacionar os resultados obtidos nos ensaios de sensibilização à histamina *in vivo* em camundongos e os obtidos *in vitro* em preparação isolada de íleo de cobaia.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Foram utilizadas cobaias Short Hair, fêmeas adultas, com pesos entre 250 a 300 g e camundongos da cepa NIH, fêmeas, com pesos entre 20 e 24 g, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As cobaias foram mantidas em caixas de polipropileno medindo (40 centímetros (cm) x 60 cm x 20 cm), com cama de maravalha de *pinus* e os camundongos em caixas de polipropileno (30 cm x 19 cm x 12 cm) com tampa de aço inoxidável com cama de maravalha de *pinus*. Os animais foram aclimatados no mínimo por 24 h (pernoite) antes do início dos experimentos.



Figura 1. Cobaias Short Hair



Figura 2. Camundongos da cepa NIH

Os animais receberam água e ração comercial para camundongos (Nuvilab-Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná) e foram mantidos no Serviço de Animais de Laboratório (SAL/INCQS) com controle de temperatura ambiental de $20 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade relativa do ar de aproximadamente 70% e ciclo claro-escuro de 12 h. As trocas de cama e água foram realizadas três vezes por semana e a ração repostada diariamente.

Antes da execução do ensaio, os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos de 10 e de 15, as cobaias em grupos de cinco, marcados individualmente e seus pesos anotados.

Os procedimentos no decorrer dos experimentos seguiram o Procedimento Operacional Padronizado nº 65.3340.002 e nº 65.3340.004 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE, 2000).

Os protocolos experimentais referentes aos dois ensaios realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FIOCRUZ), sob o nº PO 137 – 02.

3.2. Toxina pertussis de referência (TPR)

A TPR, extrato obtido do sobrenadante de cultura de *B. pertussis* foi fornecida pelo National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) com o código 90/518. Cada ampola contendo o equivalente a 20 µg de TP liofilizada foi reconstituída com 10 mL de solução PBS resultando na concentração de 2000 ng/mL.

Após a reconstituição da TPR, procedeu-se às diluições (1/5, 1/25, 1/125, 1/625) da suspensão de TPR em solução PBS (ANEXO). As diluições foram inoculadas no volume de 0,5 mL por via intraperitoneal (IP) em cada animal.

3.3. Vacinas

3.3.1. Vacina pertussis de referência (VPR)

Como vacina de referência foi utilizado o Terceiro Padrão Internacional para VPCI estabelecido em 1998 e fornecido pelo NIBSC com o código 66/303 sob a forma liofilizada.

Imediatamente, antes do seu uso, tal preparação apresentando uma potência de 46 UI de *in vivo* VPR por ampola, foi reconstituída com 4 mL de PBS, resultando em potência final de 11,5 UI/mL, visando a obtenção da mesma concentração como nas amostras de vacinas, por dose humana, ou seja por volume de 0,5 mL inoculado.

Após a reconstituição da vacina, procedeu-se às diluições (1/5, 1/25 e 1/125) da suspensão celular em solução PBS. As diluições foram inoculadas no volume de 0,5 mL por via (IP) em cada animal.

3.3.2. Vacinas DTP

Foram analisadas cinco amostras (A, B, C, D e E) de lotes diferentes de vacinas DTP celular, provenientes de um produtor nacional.

A vacina DTP é uma suspensão composta pelos toxóides diftérico e tetânico purificados combinados com a VP adsorvidos por hidróxido de alumínio e tendo como conservante o timerosal. Cada dose (0,5 mL) contém 30 UI de toxóide diftérico, 60 UI de

toxóide tetânico, 4 UI de *B. pertussis*, hidróxido de alumínio (1,25 mg em alumínio) e 0,01 % de timerosal em solução de cloreto de sódio 0,9 %.

Nas cinco amostras foram efetuadas 4 diferentes diluições das vacinas DTP em PBS, (1/1, 1/5, 1/25 e 1/125) e foram inoculadas no volume de 0,5 mL por via IP em cada animal.

3.4. Ensaio

3.4.1. Ensaio *in vivo* de sensibilização à histamina ao efeito letal da histamina em camundongos NIH fêmeas (ESH *in vivo*)

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido pelo NIBSC (NATIONAL INSTITUTE FOR STANDARDS AND CONTROL, 1999) e o objetivo foi a determinação das DSH₅₀ da TPR, da VPR e das cinco vacinas DTP, que causaram sensibilização à histamina em 50% dos animais, baseado em metodologia descrita por ISHIDA et al., (1976) e por VAN STRAATEN et al., (1997).

3.4.1.1. Execução do ESH *in vivo*

Antes da realização do ensaio, os camundongos da cepa NIH, fêmeas, com pesos entre 20 e 24 g foram divididos em grupos de 10 animais para as vacinas, de 15 animais para o ensaio realizado com TPR; em seguida pesados e marcados individualmente, de acordo com o Procedimento Operacional Padronizado nº 65.3300.005 e nº 65.3300.002 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE, 2005).



Figura 3. Pesagem dos animais



Figura 4. Marcação dos animais

No primeiro dia de ensaio, os animais foram administrados por via IP com 0,5 mL das 4 diferentes diluições das vacinas DTP em PBS, (1/1, 1/5, 1/25 e 1/125), com 3 diluições da VPR (1/5, 1/25 e 1/125) e com 5 diluições (1/1, 1/5, 1/25, 1/125 e 1/625) da TPR. A solução PBS foi empregada como controle negativo sendo administrada também por via IP no volume de 0,5 mL.



Figura 5. Administração das diluições por via IP.

Quatro dias após o tratamento, os animais foram pesados e em seguida desafiados por via IP com 0,5 mL de solução de histamina (ANEXO) contendo 1,0 mg de histamina base.



Figura 6. Pesagem dos animais



Figura 7. Administração da sol. de histamina

A ocorrência de mortes, que ocorre por asfixia devido à broncoconstrição, foi registrada durante o período de 2 h após o desafio com a solução de histamina.

Os valores de DSH₅₀ obtidos foram empregados posteriormente no ensaio de sensibilização à histamina *in vitro*.

3.4.2. Ensaio *in vitro* de sensibilização ao efeito letal da histamina (ESH *in vitro*)

O ESH *in vitro* foi realizado em preparações de íleo provenientes de cobaias administradas pela via intraperitoneal com 0,5 mL de solução de PBS (controle), com 40 ng de TPR, 0,26 UI da VPR e com as cinco amostras de lotes diferentes de vacinas DTP nas diluições correspondentes às DSH₅₀ determinadas no ESH *in vivo*. Adicionalmente ensaios *in vitro* foram realizados em íleos de cobaias administradas com doses 10 X superiores às DSH₅₀ obtidas no ESH *in vivo* para o PBS, TPR e VPR. No ESH *in vitro* foram estabelecidas as curvas concentração efeito para a resposta contrátil à histamina na faixa de 10 a 50000 nM, em íleo quatro dias após os diferentes tratamentos.

No ESH *in vitro* foram estabelecidas curvas concentração efeito para a resposta contrátil à histamina na faixa de 10 a 50000 nM, em preparações isoladas de íleo de cobaias quatro dias após os diferentes tratamentos.

Tratamento de íleos com PBS e a TPR (30 e 40 ng/mL) foram também efetuados *in vitro* e determinadas as curvas concentração efeito para histamina.

3.4.2.1. Administração de cobaias com doses correspondentes as DSH₅₀ em camundongos

Antes da realização do ensaio, as cobaias Short Hair, fêmeas adultas, com pesos entre 250 a 300 g foram divididos em grupos de cinco animais, para cada amostra, pesadas e marcadas individualmente, de acordo com o Procedimento Operacional Padronizado nº 65.3300.005 e nº 65.3300.002 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE, 2005).



Figura 8. Pesagem dos animais.



Figura 9. Marcação dos animais.

No primeiro dia de ensaio, os animais foram administrados por via IP com 0,5 mL de PBS, 0,5 mL da diluição 1/22,36 (0,26 UI/cobaia) da VPR e com 0,5 mL da diluição 1/25 (40 ng/cobaia) da TPR, 1/1,84 (DTP A), 1/1,82 (DTP B), 1/1,73 (DTP C), 1/1,05 (DTP D) e 1/1,22 (DTP E), (ANEXO) e com 5 mL de PBS, 5 mL da diluição 1/22,36 (2,6 UI/cobaia) da VPR e com 5 mL da diluição 1/25 (400 ng/cobaia) da TPR, para cobaias administradas com doses 10 X superiores às DSH_{50} obtidas no ESH *in vivo*.



Figura 10. Administração das diluições.

Quatro dias após o tratamento, os animais foram pesados e em seguida sacrificados (Procedimento de utilização nº 65.3340.013 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE, 2005). Vinte e quatro horas anteriores ao sacrifício os animais foram mantidos em jejum, com livre acesso à água. A retirada do íleo foi realizada conforme procedimento descrito no item 3.4.2.1.1.



Figura 11. Pesagem dos animais.



Figura 12. Sacrifício dos animais.

3.4.2.1.1. Procedimento para retirada do íleo

Após o sacrifício com dióxido de Carbono (CO₂), as cobaias foram exsanguinadas através de secção dos vasos cervicais e em seguida é realizada a laparotomia para a localização da válvula íleo cecal, semelhante a um grão de feijão por baixo do ceco. Um corte foi feito abaixo da válvula desprendendo o íleo. Com o auxílio de uma pinça, o íleo, foi suspenso e cortado na porção oposta à válvula íleo cecal.



Figura 13. Preparação para a laparotomia.



Figura 13a. Preparação para a laparotomia



Figura 14. Laparotomia.



Figura 14a. Laparotomia.



Figura 15. Retirada do íleo.



Figura 16. Lavagem do íleo.

A luz intestinal da preparação foi lavada com solução de Tyrode (ANEXO) utilizando-se uma pipeta de 10 mL e em seguida a mesma foi transferida para uma placa de Petri contendo a mesma solução. Um fragmento de cerca de 3 cm foi cortado e fixado nas extremidades com um fio de algodão.



Figura 17. Fragmento de íleo na placa de Petri



Figura 18. Corte de 3 cm.

Antes do início do ensaio foi realizada a preparação da cuba para órgãos isolados e a calibração do registrador com pré-amplificadores e transdutores isométricos.

A solução nutritiva de Tyrode foi adicionada as cubetas no volume de 13 mL em banho de órgãos isolados contendo água destilada mantida a 37° C. A calibração do registrador com pré-amplificadores conectado aos transdutores isométricos foi realizada de acordo com o Procedimento de Uso nº 65.3300.026 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE, 2005).

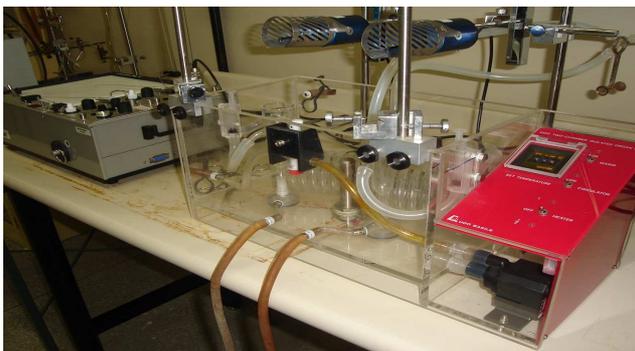


Figura 19. Cuba para banho de órgão isolados



Figura 20. Registrador com dois canais.

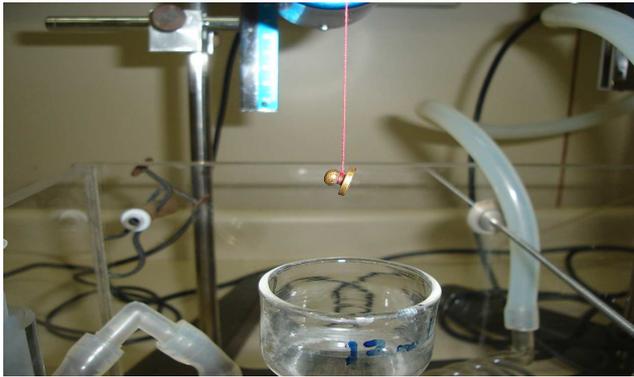


Figura 21. Realização da tensão do íleo

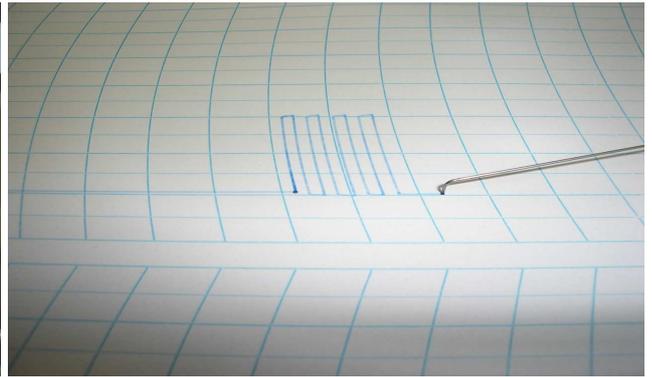


Figura 22. Registro da tensão

Em seguida a preparação (fragmento de cerca de 3 cm) foi fixada através de fio de algodão ao transdutor isométrico conectado ao fisiógrafo, enquanto a outra extremidade foi fixada também por meio de fio de algodão na parte inferior da haste de vidro.



Figura 23. Haste de vidro.

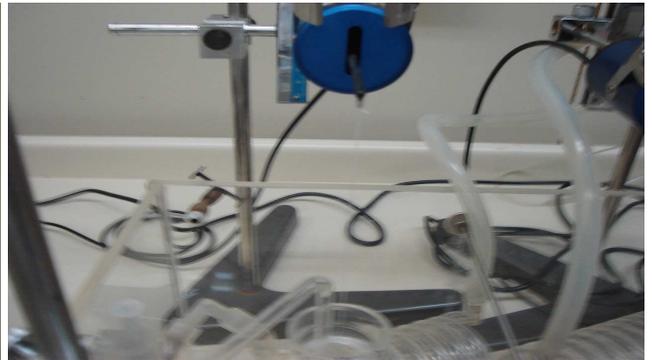


Figura 24. Transdutor.

A preparação foi colocada nas cubetas contendo 13 mL de solução nutritiva de Tyrode mantida a 37° C sob gaseificação constante com carbogênio (5% CO₂ e 95% O₂), de acordo com o Procedimento de Uso nº 65.3300.026 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE, 2005).

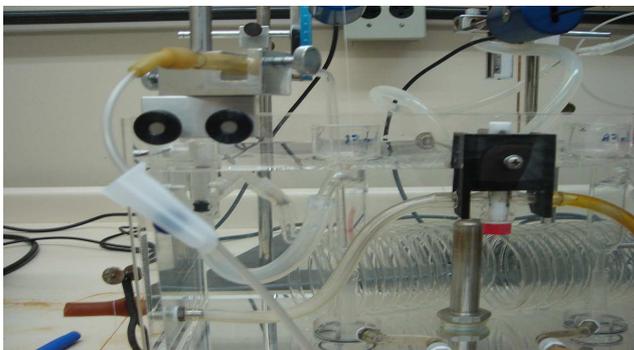


Figura 25. Fragmento de íleo na cubeta.



Figura 26. Solução de Tyrode.

Em seguida com auxílio da cremalheira, submetemos a preparação à tensão desejada de 1 g e aguardamos a estabilização por pelo menos 30 min e retornamos a pena para a linha base inicial.



Figura 27. Cilindro com carbogênio.



Figura 28. Realização da tensão.

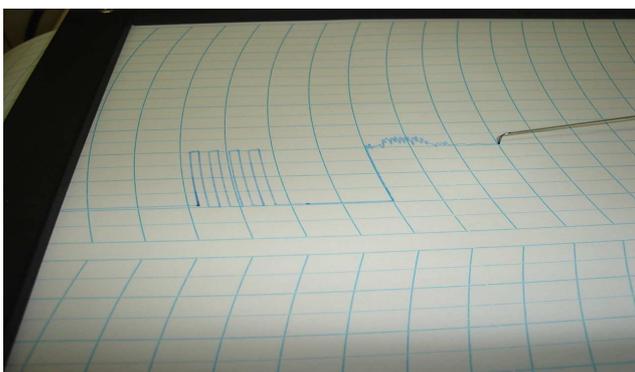


Figura 29. Registro da tensão.



Figura 30. Retorno da pena à linha base.

Após a estabilização da preparação, foi iniciada a administração das diluições de histamina, começando pela diluição menos concentrada, entre uma administração e outra das diluições da histamina, foi realizado 3 lavagens da preparação na cubeta do banho de órgãos isolados com a solução de Tyrode .

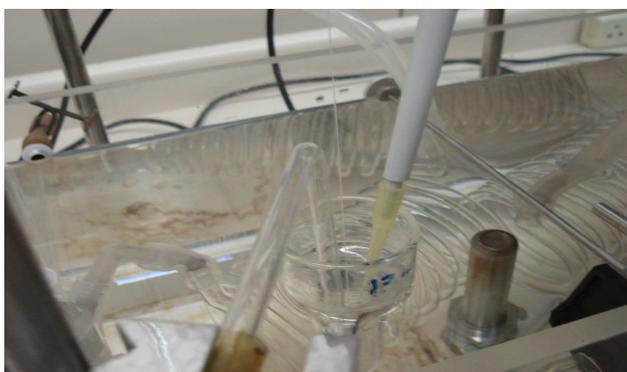


Figura 31. Administração das diluições

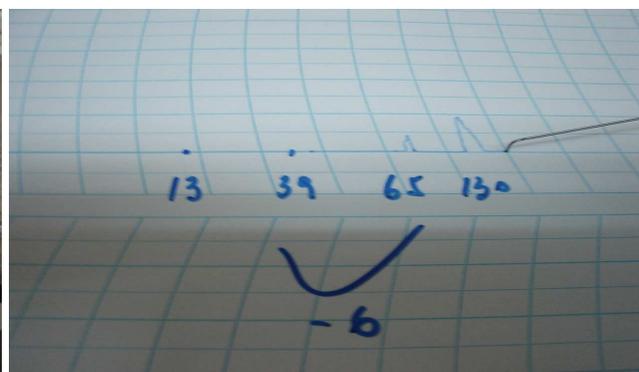


Figura 32. Registro das contrações.

Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em íleo foram realizadas na faixa de 1 a 50.000 nM de histamina. Ao final dos experimentos, os resultados foram expressos em % de efeito máximo versus concentração molar de histamina em escalas linear e logarítmica.

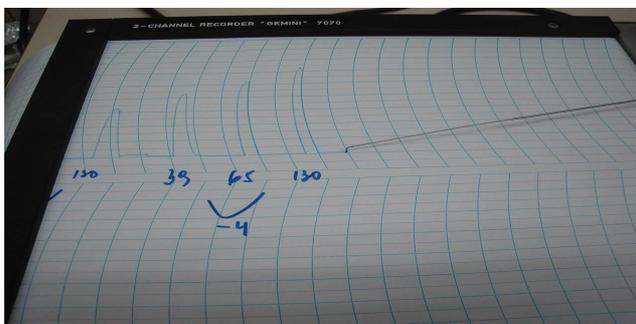


Figura 32a. Registro das contrações.

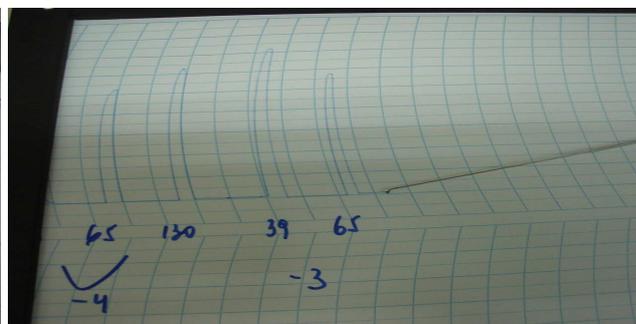


Figura 32b. Registro das contrações.

3.4.3. Execução do ESH *in vitro* em cobaias não tratadas

Após 24 h de aclimação dos animais procedemos conforme o descrito nos itens 3.4.2.1, para o sacrifício dos animais, e 3.4.2.1.1 para a retirada do íleo.

Após a estabilização da preparação, iniciou-se a 1ª fase do ensaio (sem tratamento), com a administração das diferentes diluições de histamina, começando pela diluição menos concentrada, entre uma administração e outra das diluições da histamina, foi realizado 3 lavagens da preparação na cubeta do banho de órgãos isolados com a solução de Tyrode. Após o término da 1ª fase foi feita a lavagem da preparação por pelo menos 3 vezes com a solução de Tyrode e aguardamos 10 minutos para o início da segunda fase do experimento.

Na segunda fase (com tratamento) a preparação de íleo foi incubada durante 15 min com 390 μ L e 520 μ L e TPR (1 μ g/mL) no volume final de 13 mL de solução Tyrode em cubeta..

Após a incubação realizamos 3 lavagens da preparação com a solução de Tyrode e iniciamos a administração das diluições de histamina, iniciando pela diluição menos concentrada.

Curvas concentração-efeito foram realizadas para histamina na faixa de 1 nM a 50.000 nM para as duas fases do ensaio. Ao final dos experimentos, os resultados foram expressos como % de efeito máximo versus concentração molar de histamina em escalas linear e logarítmica.

3.5 Cálculos

Para o cálculo da DSH_{50} , as doses da TPR, VPR e das vacinas DTP (A a E) expressas em diluições foram transformadas em seus quocientes. Os números de camundongos mortos foram transformados em percentagens de mortes para cada diluição. Os valores de DSH_{50} foram calculados pelo método dos probitos (BLISS, 1938) empregando programa computacional para o controle de qualidade de vacinas desenvolvido por MARSMAN, F.R, do Rijksinstituut Voor Volksgezondheid En Milieuhygiene (RIVM), (RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE, 1991) e seus resultados estabelecidos por diluição, em UI/mL.

O valor da Concentração Efetiva Média de histamina (CE_{50}), Efeito máximo (E_{max}), Coeficiente de correlação (R), Concentração efetiva máxima (CE_{max}) e a constante de dissociação droga receptor (Kd) foram calculados empregando-se o programa computacional GraphPad Prism Instat (GraphPad Software, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Determinação dos Valores de DSH₅₀ para vacinas DTP (DTP-A a DTP-E), TPR E VPR

Com a finalidade de se obter os valores de DSH₅₀ das amostras das vacinas DTP (A, B, C, D e E), da VPR e da TPR, para serem empregados posteriormente no ensaio de sensibilização à histamina *in vitro*, realizamos o ensaio de sensibilização à histamina *in vivo* e analisamos para cada uma das amostras respectivamente os valores de DSH₅₀, com intervalo de confiança de 95%.

As duas preparações de referência empregadas nos ensaios forma: VPR contendo 11,5 UI/mL e TPR (2000ng/mL)

4.1.1. Ensaio *in vivo* de sensibilização à histamina ao efeito letal da histamina em camundongos NIH fêmeas

Os valores médios de DSH₅₀ com seus limites de confiança de 95% expressos em diluição obtidos em camundongos NIH fêmeas para TPR, VPR e para as 5 amostras de vacinas DTP (A a E) são mostrados na Tabela 1. Adicionalmente são mostrados os valores de ng/mL e de UI/mL das diferentes amostras.

Tabela 1. Valores médios de DSH₅₀ em diluição, ng/mL e UI/mL no ESH₅₀ da TPR, VPR e de vacinas DTP (A, B, C, D e E)

Amostras	¹ DSH ₅₀ Média - ² (LI – LS) (Diluições)	DSH ₅₀ Médias geométricas (Diluições)	Conteúdo de TP ativa (ng/mL)	UI/mL
³ TPR	1/25 (1/50 - 1/17,0) 1/25 (1/50 - 1/17,0)	1/25		
⁴ VPR	1/20 (1/33,0 - 1/11,1) 1/25 (1/33,0 - 1/16,6)	1/22,36	1789	11,5
Vacina A	1/ 2,0 (1/3,7 - 1/0,4) 1/ 1,7 (1/4,0 - 1/0,7)	1/1,84	147,2	0,95
Vacina B	1/1,1 (1/3,1 - 1/0,4) 1/3,0 (1/3,1 - 1/0,2)	1/1,82	145,6	0,94
Vacina C	1/2,0 (1/4,7 - 1/0,8) 1/1,5 (1/4,3 - 1/0,5)	1/1,73	138,4	0,89
Vacina D	1/1,0 (1/2,5 - 1/0,4) 1/1,1 (1/3,1 - 1/0,4)	1/1,05	84,0	0,54
Vacina E	1/1,0 (1/2,5 - 1/0,4) 1/1,5 (1/3,2 - 1/0,6)	1/1,22	97,6	0,63

¹ Dose sensibilizante média à histamina

³ Toxina pertussis de referência NIBSC 91/518

² Limite inferior e superior (95 % de confiança)

⁴ Vacina pertussis de referência NIBSC 66/303

Os valores médios de DSH_{50} para a TPR com seus limites de confiança de 95% foram iguais a 40 (20 a 59) ng/dose por camundongo.

Os valores médios de DSH_{50} em diluições da TPR , VPR e das cinco amostras das vacinas DTP (A a E) foram calculadas por média geométrica.

As cinco amostras de vacina DTP apresentaram menor conteúdo de TP ativa do que a VPR (1789), conforme mostrado na Tabela 1.

4.2. Efeito do tratamento *in vivo* pela TPR, VPR e vacinas DTP sobre a contratilidade do íleo isolado de cobaias à histamina *in vitro*

4.2.1. Administração de cobaias com doses correspondentes às DSH_{50} obtidas em camundongos (0,5 mL)

As tabelas 2 a 9 mostram os dados referentes às curvas (sigmóides) concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina de preparações isoladas de íleo de cobaias 4 dias após o tratamento por via intraperitoneal com o controle PBS (0,5 mL/cobaia) com 40 ng de TPR, 0,26 UI de VPR e com as diluições das 5 amostras das vacinas DTP(A a E) correspondentes às DSH_{50} em camundongos NIH fêmeas.

Para cada um dos grupos experimentais são apresentados os resultados de contração de íleo para 10 ensaios (medidos em mm) para as concentrações de histamina na faixa de 1 a 50.000 nM transformados em seus logaritmos para a obtenção das sigmóides, bem como os correspondentes valores do efeito máximo (E_{max}).

Tabela 2. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL de PBS/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (mm)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	11	4	0	1	1	1	0	2	4	7
30	1,47712	16	11	0	2	2	3	5	10	8	14
50	1,69897	25	18	0	2	3	6	13	22	12	30
100	2,00000	41	40	9	3	6	9	18	24	30	32
300	2,47712	49	42	15	6	12	11	36	41	52	49
500	2,69897	54	49	26	12	21	22	46	51	68	56
1000	3,00000	56	56	28	15	28	31	55	66	82	72
3000	3,47712	59	61	33	18	33	32	68	67	88	69
5000	3,69897	63	69	38	22	36	37	60	62	94	
10000	4,00000	60	67	37	25	37	41			96	
30000	4,47712				22	39	35			88	
50000	4,69897					35					
¹ E _{max}		61	65	39	25	38	39	68	69	98	70
¹ Efeito máximo											

Tabela 3. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/25 de ²TPR/animal (40ng) por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (mm)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	1	2	0	0	1	0	0	0	0	1
3	0,47712	2	3	1	2	2	1	2	2	1	3
5	0,69897	3	5	3	3	3	2	4	2	2	4
10	1,00000	5	7	4	5	4	3	5	5	3	5
30	1,47712	12	9	7	11	5	7	15	11	9	9
50	1,69897	15	23	12	15	7	9	22	13	14	13
100	2,00000	25	31	27	37	16	17	42	22	28	33
300	2,47712	27	40	35	47	22	30	52	38	44	53
500	2,69897	37	56	49	60	33	37	68	45	64	68
1000	3,00000	41	58	58	62	52	43	73	67	75	70
3000	3,47712	55	64	65	66	56	50	75	77	79	80
5000	3,69897	59	65	69	68	59	58	76	82	84	86
10000	4,00000	61	72	75	76	65	68	78	87	87	89
30000	4,47712	58	67	70	69	60	70	67	74	72	73
50000	4,69897						58				
¹ E _{max}		60	68	73	71	64	64	76	84	84	85
¹ Efeito máximo											
		² Toxina pertussis de referência NIBSC 90/518									

Tabela 4. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/22,36 de ²VPR/animal (0,26 UI) por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (mm)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	5	0	2	5	0	0	4	10
30	1,47712	4	3	15	11	4	11	5	4	12	15
50	1,69897	9	9	22	15	8	13	11	9	17	26
100	2,00000	18	18	42	26	18	22	23	16	32	40
300	2,47712	29	27	52	40	37	38	42	45	54	55
500	2,69897	46	46	68	52	50	45	67	64	64	69
1000	3,00000	57	55	73	53	71	67	73	73	74	78
3000	3,47712	72	70	75	64	77	77	85	83	78	81
5000	3,69897	81	83	75	66	83	82	90	87	78	78
10000	4,00000	95	94	76	70	79	71	83	80	80	
30000	4,47712	85	75	67	63					72	
¹ E _{max}		91	76	76	67	87	82	92	89	80	79

¹Efeito máximo

²Vacina pertussis de referência NIBSC 66/303

Tabela 5. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.84 da vacina DTP-A/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (mm)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	3	3	0	0	1	2	0	0	1	1
30	1,47712	4	9	5	2	5	6	6	2	4	6
50	1,69897	6	11	15	8	10	11	9	6	7	9
100	2,00000	12	25	29	9	12	14	14	12	12	14
300	2,47712	27	35	33	25	35	31	26	29	23	31
500	2,69897	42	48	41	41	50	42	31	44	38	44
1000	3,00000	61	55	42	53	56	53	43	53	50	62
3000	3,47712	70	57	33	51	74	52	48	76	59	81
5000	3,69897	68	62			59		47	72	51	78
10000	4,00000		54								
¹ E _{max}		79	60	42	62	72	60	51	83	61	90

¹Efeito máximo

Tabela 6. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.82 da vacina DTP–B/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (mm)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	1,47712	0	0	12	6	9	10	11	6	8	11
50	1,69897	3	9	14	8	11	13	15	15	22	14
100	2,00000	11	13	25	14	21	18	25	21	27	25
300	2,47712	17	30	32	23	34	37	33	27	34	39
500	2,69897	25	32	36	43	48	41	35	36	38	50
1000	3,00000	36	37	44	55	62	51	42	41	43	60
3000	3,47712	58	34	41	73	74	61	39	38	40	51
5000	3,69897	51			66	77	72				
10000	4,00000					67	65				
¹ E _{max}		64	40	44	78	77	69	42	41	43	60

¹ Efeito máximo

Tabela 7. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.73 da vacina DTP–C/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (mm)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	3	0	0	0	0	0	5	4	5	3
30	1,47712	4	8	0	0	4	7	7	11	10	9
50	1,69897	8	11	0	0	7	11	16	13	15	10
100	2,00000	12	16	0	0	14	20	22	25	21	26
300	2,47712	22	26	4	2	23	27	33	31	29	29
500	2,69897	34	32	4	6	27	32	36	34	39	36
1000	3,00000	39	38	17	15	37	36	37	41	43	37
3000	3,47712	41	41	20	22	40	38	38	44	42	39
5000	3,69897	42	44	26	25	42	34	39	47		35
10000	4,00000	44	42	28	28	39		44	42		
30000	4,47712	42		26	27			36			
¹ E _{max}		44	44	30	30	42	38	40	44	45	39

¹ Efeito máximo

Tabela 8. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.05 da vacina DTP–D/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (mm)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
30	1,47712	2	2	7	10	3	5	3	4	9	10
50	1,69897	3	7	11	16	8	8	15	10	14	14
100	2,00000	11	12	28	24	12	12	21	18	21	21
300	2,47712	16	13	32	33	23	18	31	24	26	22
500	2,69897	20	26	39	38	29	24	38	27	30	29
1000	3,00000	24	29	46	42	24	30	46	28	32	31
3000	3,47712	22	28	42	40		20	43	29	29	29
5000	3,69897								27		
[†] E _{max}		25	32	47	43	31	26	48	30	32	31

[†]Efeito máximo

Tabela 9 . Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1,22 da vacina DTP–E/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (mm)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	1,47712	0	0	4	0	0	0	6	0	0	0
50	1,69897	4	0	7	1	1	1	10	3	0	0
100	2,00000	7	1	12	3	2	4	21	10	0	3
300	2,47712	12	11	30	10	3	11	33	27	4	11
500	2,69897	30	19	36	21	11	19	39	30	10	21
1000	3,00000	37	31	46	30	20	34	45	41	21	36
3000	3,47712	39	36	40	32	29	36	47	43	30	37
5000	3,69897	41	39		31	33	38	45	41	35	39
10000	4,00000	39	31			35	39			37	42
30000	4,47712					33	37			38	36
50000	4,69897									37	
[†] E _{max}		46	39	48	37	38	41	49	47	40	42

[†]Efeito máximo

Os valores de E_{max} em mm de contração estabelecidos a partir da análise das curvas sigmóides de concentração-efeito à histamina (tabelas 2 a 9) foram empregados para o cálculo em termos de % de efeito máximo demonstrados nas tabelas 10 a 17.

Tabela 10. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL de PBS/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (% do efeito máximo)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	18	6	0	4	3	3	0	3	4	10
30	1,47712	26	17	0	8	5	8	7	15	8	20
50	1,69897	41	28	0	8	8	15	19	32	12	42
100	2,00000	67	61	24	12	16	23	26	35	32	46
300	2,47712	80	65	45	23	32	28	53	59	55	69
500	2,69897	88	75	68	46	55	56	68	74	72	80
1000	3,00000	92	86	74	58	74	79	81	96	84	103
3000	3,47712	97	94	87	69	87	82	100	97	90	98
5000	3,69897	103	106	97	85	95	95	88	90	96	
10000	4,00000	98	103	96	96	97	105			98	
30000	4,47712				85	103	90			90	
50000	4,69897					92					

Tabela 11. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/25 de ¹TPR/animal (40ng) por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (% do efeito máximo)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	2	3	0	0	1	0	0	0	0	1
3	0,47712	3	4	1	3	3	2	3	2	1	3
5	0,69897	5	7	4	4	5	3	5	2	2	5
10	1,00000	8	10	5	7	6	5	7	6	4	6
30	1,47712	20	13	10	15	8	11	20	13	11	11
50	1,69897	27	33	16	21	11	14	29	15	17	15
100	2,00000	42	45	37	52	25	27	55	26	33	39
300	2,47712	47	58	48	66	34	47	68	45	52	62
500	2,69897	62	81	67	85	52	58	89	54	76	80
1000	3,00000	68	84	79	87	81	67	96	80	89	82
3000	3,47712	92	93	89	93	87	78	99	92	94	94
5000	3,69897	98	94	94	96	92	91	100	98	100	101
10000	4,00000	96	107	103	107	101	106	103	104	104	105
30000	4,47712		97	96	97	94	109	88	88	86	86
50000	4,69897						91				

¹Toxina pertussis de referência NIBSC 90/518

Tabela 12. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/22,36 de ¹VPR/animal (0,26 UI) por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (% do efeito máximo)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	7	0	2	6	0	0	5	13
30	1,47712	4	3	20	16	5	13	5	4	17	19
50	1,69897	10	10	29	22	9	16	12	10	21	33
100	2,00000	20	21	55	39	21	27	27	18	40	51
300	2,47712	32	31	68	60	43	46	46	51	68	70
500	2,69897	50	53	89	78	57	55	73	72	80	87
1000	3,00000	63	63	96	79	82	82	79	82	93	99
3000	3,47712	79	80	99	96	86	94	92	93	98	102
5000	3,69897	93	95	99	99	95	100	98	98	98	99
10000	4,00000	104	108	100	104	91	86	90	90	100	
30000	4,47712	93	99	88	94					90	

¹ Vacina pertussis de referência NIBSC 66/303

Tabela 13. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.84 da vacina DTP-A/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (% do efeito máximo)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	4	5	0	0	1	3	0	0	2	1
30	1,47712	5	15	12	3	7	10	12	2	7	7
50	1,69897	8	18	36	13	14	18	18	7	11	10
100	2,00000	21	42	69	14	17	23	28	14	20	16
300	2,47712	34	58	79	40	49	52	51	35	38	34
500	2,69897	53	80	98	66	69	70	61	53	62	49
1000	3,00000	77	92	100	85	78	88	84	64	82	69
3000	3,47712	89	95	78	82	103	87	94	92	97	90
5000	3,69897	86	103			82		92	87	84	87
10000	4,00000		90								

Tabela 14. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.82 da vacina DTP–B/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (% do efeito máximo)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	1,47712	0	0	27	8	12	14	26	15	19	18
50	1,69897	5	22	32	10	14	19	36	37	51	23
100	2,00000	17	32	57	18	27	26	60	51	63	42
300	2,47712	27	75	73	27	44	54	79	66	79	65
500	2,69897	39	80	82	55	62	59	83	88	88	83
1000	3,00000	56	92	100	70	80	74	100	100	100	100
3000	3,47712	91	85	93	94	96	88	93	93	93	85
5000	3,69897	80			85	100	104				
10000	4,00000					87	94				

Tabela 15. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.73 da vacina DTP–C/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (% do efeito máximo)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	0	0	0	0	12	9	11	8
30	1,47712	7	18	0	0	9	18	18	25	22	23
50	1,69897	9	25	0	0	17	29	40	29	33	26
100	2,00000	18	36	0	0	33	53	56	57	47	67
300	2,47712	27	59	13	7	55	71	82	70	64	74
500	2,69897	50	73	13	20	64	84	90	77	87	92
1000	3,00000	77	86	57	50	88	95	93	93	96	95
3000	3,47712	89	93	67	73	95	100	95	100	93	100
5000	3,69897	93	100	87	83	100	89	98	107		90
10000	4,00000	95	95	93	93	93		110	95		
30000	4,47712	100		87	90			90			
50000	4,69897	95									

Tabela 16. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1.05 da vacina DTP–D/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (% do efeito máximo)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	13	13
30	1,47712	8	6	15	23	10	19	6	13	25	32
50	1,69897	12	22	23	37	26	31	31	33	44	45
100	2,00000	44	38	60	56	39	46	44	60	66	68
300	2,47712	68	41	68	77	74	69	65	80	81	71
500	2,69897	80	81	83	88	93	92	79	90	94	93
1000	3,00000	96	91	98	98	77	115	96	97	100	100
3000	3,47712	88	87	89	93		77	89	100	91	93
5000	3,69897								90		

Tabela 17 . Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 0,5 mL da diluição 1/1,22 da vacina DTP–E/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (% do efeito máximo)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	1,47712	0	0	8	0	0	0	12	0	0	0
50	1,69897	9	0	14	3	3	2	20	6	0	0
100	2,00000	15	3	25	8	5	10	43	21	0	7
300	2,47712	26	28	63	26	8	27	67	59	10	26
500	2,69897	65	49	79	55	29	46	80	64	25	50
1000	3,00000	80	79	96	79	53	83	92	87	53	86
3000	3,47712	85	92	83	86	76	89	96	91	75	88
5000	3,69897	89	100		84	87	93	92	87	88	93
10000	4,00000	85	79			92	95			93	100
30000	4,47712					87	90			95	86
50000	4,69897									93	

Nos 10 ensaios de resposta do íleo isolado de cobaias à histamina pré-tratados com cada uma das 5 amostras de vacinas DTP os dados seguiram uma distribuição normal ($p > 0,1$) baseado no teste de Kolmogorov-Smirnov e as variâncias não foram estatisticamente significantes ($p = 0,99$) pelo teste de Bartlett. A partir da análise de variância (*ANOVA one way*) não foram detectadas diferenças significativas ($p = 0,91$) entre os ensaios realizados (Figura 33).

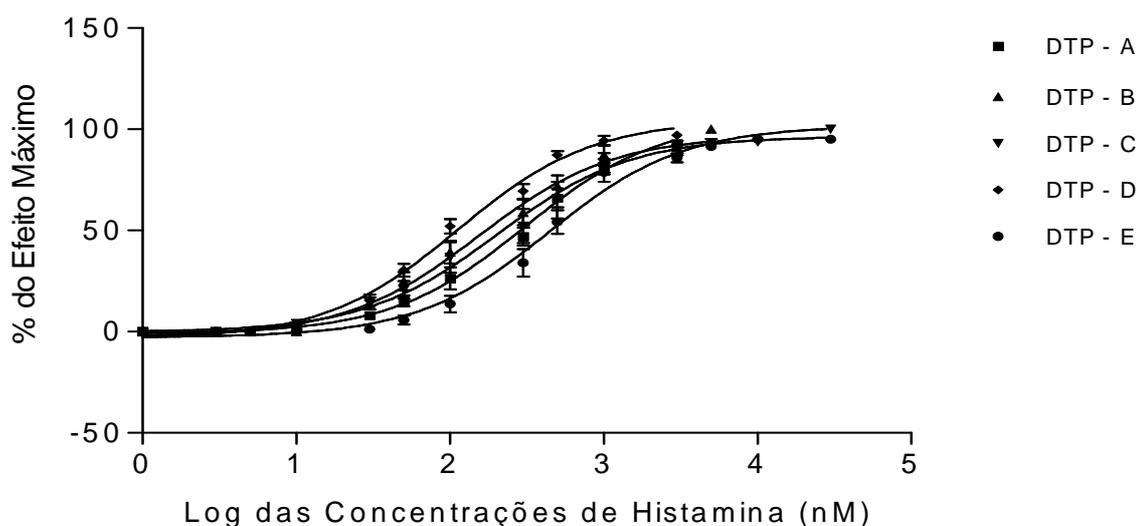


FIGURA 33. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina de preparações isoladas de íleo de cobaias 4 dias após o tratamento (0,5 mL/cobaia/via IP) com as diluições 1/1,84 (DTP-A); 1/1,82 (DTP-B); 1/1,73 (DTP-C); 1/1,05 (DTP-D) e 1/1,22 (DTP-E). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) ($n=10$)

Diferenças estatisticamente significantes também não foram detectadas pela *ANOVA* nos ensaios de contratilidade à histamina em íleos isolados de cobaias pré-tratadas com TPR, VPR e com as 5 amostras de vacinas DTP quando comparadas ao controle PBS (Figura 34).

Os dados seguiram uma distribuição normal ($p > 0,1$) e as variâncias não foram estatisticamente diferentes ($p = 0,99$).

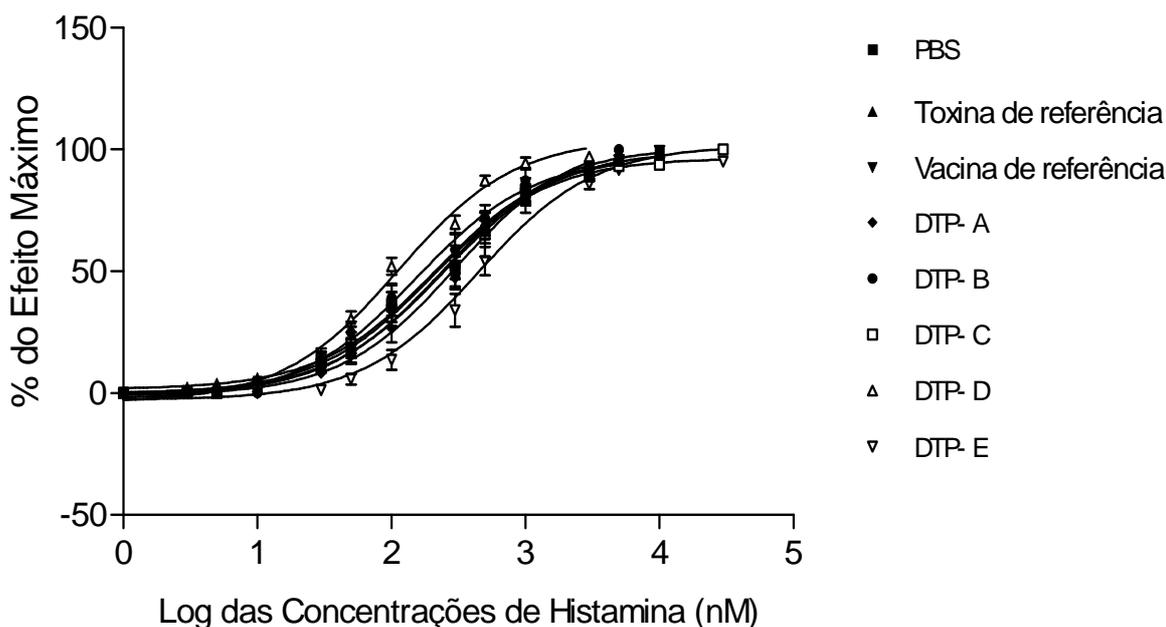


FIGURA 34. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina de preparações isoladas de íleo de cobaias 4 dias após o tratamento (0,5 mL/cobaia/via IP) com PBS (controle) , 40 ng de TPR, 0,26 UI de VPR e com as diluições de 5 vacinas (DTP- A a DTP-E) correspondentes às DSH_{50} em camundongos NIH fêmeas. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M (n=10)

Os valores de concentração efetiva média (CE_{50}) de histamina em nM, E_{max} em % de concentração efetiva máxima, dos coeficientes de correlação (R), (CE_{Max} de histamina em nM) obtidos a partir da análise das curvas concentração-resposta à histamina dos 10 ensaios realizados em íleo de cobaia para os 8 grupos experimentais da Figura 34 são mostrados na Tabela 18 (PBS, TPR e VPR) e na Tabela 19 (5 amostras de vacinas DTP), assim como os valores das constantes de dissociação droga receptor (K_d).

Tabela 18. Valores de CE_{50} , E_{MAX} , R, C_{MAX} e Kd a partir das curvas de concentração-resposta à histamina em preparações isoladas de fêo de cobaia

PBS (CONTROLE)											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Regressão não linear
											Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	61,1	110,1	319,8	762,8	492,6	506,8	242,0	153,6	220,7	222,5	245,8 ± 1,1
² E _{MAX}	99,9	100,3	100,9	97,7	103,5	105,6	100,2	99,4	100,2	102,9	99,6 ± 2,2
³ R	0,9918	0,9795	0,9874	0,9858	0,9952	0,9805	0,9913	0,9836	0,9967	0,9666	0,9650
⁴ CE _{MAX}	2223	2958	5780	23988	9660	12850	4786	3552	4786	2309	7289,0 ± 2143,0
⁵ Kd	68,3	120,8	364,9	722,2	508,1	487,3	261,5	162,3	237,5	215,0	246,0 ± 23,6
TOXINA PERTUSSIS DE REFERÊNCIA 91/518 (40 ng/COBAIA)											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Regressão não linear
											Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	269,4	140,3	237,4	120,9	464,0	285,5	110,4	404,9	233,4	182,8	211,3 ± 1,0
² E _{MAX}	96,6	96,4	96,9	98,6	102,4	89,9	103,6	105,3	104,8	100,8	98,1 ± 1,8
³ R	0,9668	0,9876	0,9922	0,9892	0,9846	0,9937	0,9927	0,9942	0,9943	0,9907	0,9796
⁴ CE _{MAX}	5942	2494	4149	2213	9354	6137	2841	8491	3935	3054	4861,0 ± 799,2
⁵ Kd	179,7	124,7	229,7	126,1	418,1	265,0	113,2	363,2	238,1	183,0	196,5 ± 14,4
VACINA PERTUSSIS DE REFERENCIA NIBSC 66/303 (0,26UI/COBAIA)											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Regressão não linear
											Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	626,6	647,9	101,4	176,9	333,0	388,2	252,7	263,3	147,9	115,5	1,6 ± 1,0
² E _{MAX}	104,5	107,7	102,4	101,9	98,5	104,0	99,0	100,5	102,9	105,1	101,1 ± 1,8
³ R	0,9918	0,9879	0,9935	0,9939	0,9932	0,9928	0,9903	0,9892	0,9983	0,9941	0,9766
⁴ CE _{MAX}	14256	15488	1813	3169	4168	5893	3126	2978	2254	1963	5511,0 ± 1607,0
⁵ Kd	617,7	639,1	112,1	188,8	355,0	360,5	378,1	295,4	159,1	166,5	249,0 ± 19,5

¹Concentração efetiva média ²Efeito máximo ³Coefficiente de correlação ⁴Concentração efetiva máxima ⁵Constantes de dissociação droga-receptor

Tabela 19. Valores de CE_{50} , E_{MAX} , R , C_{MAX} e Kd a partir das curvas de concentração-resposta à histamina em preparações isoladas de fêlo de cobaia

VACINA DTP – A											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Regressão não linear
											Média ± E.P.M.
¹ CE_{50}	504,4	172,7	89,2	717,1	368,9	382,7	287,1	604,0	470,9	606,0	306,9 ± 1,1
² E_{MAX}	107,0	103,5	112,2	149,6	111,4	121,8	103,4	109,6	115,0	108,6	104,6 ± 4,2
³ R	0,9910	0,9910	0,9751	0,9912	0,9907	0,9970	0,9946	0,9963	0,9943	0,9985	0,9626
⁴ CE_{MAX}	11611	3006	1153	57116	7925	9141	4897	15166	18115	16032	14420,0 ± 5071,0
⁵ Kd	510,8	184,4	111,5	780,2	704,1	384,8	293,8	643,6	483,5	603,5	321,5 ± 36,7
VACINA DTP – B											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Regressão não linear
											Média ± E.P.M.
¹ CE_{50}	1070,0	146,0	81,7	670,8	362,2	230,7	71,9	100,1	60,3	125,5	153,6 ± 1,1
² E_{MAX}	122,0	100,2	99,5	115,8	107,3	92,4	99,9	101,8	100,1	99,7	96,9 ± 3,3
³ R	0,9962	0,9851	0,9838	0,9937	0,9980	0,9968	0,9946	0,9909	0,9896	0,9893	0,9499
⁴ CE_{MAX}	61376	2529	1717	19906	6622	3801	1616	1936	1468	2322	10330,0 ± 5942,0
⁵ Kd	1076,0	174,5	93,3	664,8	363,0	239,1	87,6	118,2	75,9	143,7	170,3 ± 21,4
VACINA DTP – C											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Regressão não linear
											Média ± E.P.M.
¹ CE_{50}	513,5	167,7	1529,0	1574,0	255,0	95,4	75,6	98,4	105,2	75,7	203,5 ± 1,1
² E_{MAX}	102,8	99,1	109,8	110,2	101,0	99,2	100,5	100,3	99,2	99,9	96,4 ± 3,1
³ R	0,9961	0,9976	0,9853	0,9931	0,9960	0,9988	0,9968	0,9952	0,9942	0,9888	0,9942
⁴ CE_{MAX}	11350	5880	5211	5546	5956	2673	2580	2718	2958	2586	4746,0 ± 870,4
⁵ Kd	527,0	177,6	1703,0	1762,0	241,7	112,3	85,6	106,1	110,6	87,7	205,1 ± 28,7

¹Concentração efetiva média ²Efeito máximo ³Coefficiente de correlação ⁴Concentração efetiva máxima ⁵Constantes de dissociação droga-receptor

Tabela 19a . Valores de CE_{50} , E_{Max} , R, C_{MAX} e Kd a partir das curvas de concentração-resposta à histamina em preparações isoladas de íleo de cobaia

VACINA DTP – D											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Regressão não lineal
											Média ± E.P.M.
¹ CE_{50}	205,4	320,2	116,7	87,9	124,4	138,2	157,3	86,2	67,7	56,6	112,7 ± 1,1
² E_{Max}	116,4	119,9	106,0	105,1	100,9	112,3	107,8	103,2	106,0	100,6	104,6 ± 2,7
³ R	0,9936	0,9769	0,9878	0,9781	0,9828	0,9939	0,9917	0,9938	0,9960	0,9906	0,9779
⁴ CE_{MAX}	2676	5754	1432	1158	1563	1633	1927	1761	1149	931	1998,0 ± 445,2
⁵ Kd	244,8	334,7	141,8	107,0	149,5	165,5	186,5	105,1	78,7	67,2	132,0 ± 11,9

VACINA DTP – E											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Regressão não lineal
											Média ± E.P.M.
¹ CE_{50}	409,7	673,5	188,7	557,4	1259,0	541,3	149,7	282,4	1185,0	541,1	444,4 ± 1,1
² E_{Max}	100,4	116,6	101,6	107,8	107,3	105,1	103,7	105,4	104,0	107,4	101,7 ± 3,1
³ R	0,9838	0,9916	0,9830	0,9839	0,9939	0,9897	0,9979	0,9919	0,9981	0,9872	0,9588
⁴ CE_{MAX}	6194	9848	2722	7726	24899	7112	2421	3515	19364	7464	9127,0 ± 2331,0
⁵ Kd	452,5	768,4	216,8	633,1	1361,0	602,4	172,0	329,7	1311,0	611,8	487,2 ± 52,9

¹Concentração efetiva média ²Efeito máximo ³Coefficiente de correlação ⁴Concentração efetiva máxima ⁵Constantes de dissociação droga-receptor

Os valores médios de CE_{50} (nM) de histamina em íleos isolados de cobaias pré-tratadas com TPR, VPR e com as 5 amostras de vacinas DTP (Tabelas 10 e 11 e Figura 35) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (ANOVA) não paramétrica, seguido pelo teste de Dunn, pois as diferenças entre as variâncias dos grupos experimentais foram estatisticamente significativas pelo teste de Bartlett ($p < 0,0001$). O teste de comparações múltiplas de Dunn mostrou que íleos isolados de cobaias tratadas pela vacina DTP-D

apresentou valores de CE_{50} inferior aos obtidos pelas vacinas DTP-A ($p=0,05$) e DTP-E ($p=0,01$) não foram detectadas diferenças significativas entre diferentes grupos experimentais e o controle PBS.

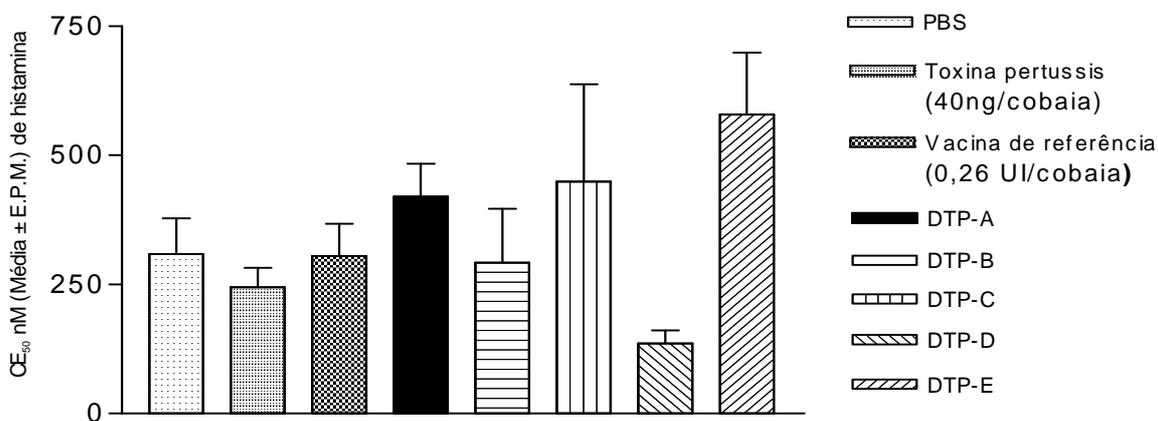


FIGURA 35. Valores médios de CE_{50} (nM), \pm E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias 4 dias após o tratamento (0,5 mL/cobaia via IP) com PBS, TPR, VPR e vacinas DTP (A a E) em doses correspondentes às DSH_{50} em camundongos NIH fêmeas. Os resultados são apresentados como médias \pm E.P.M. ($n = 10$)

Os valores médios de CE_{max} (nM) de histamina (tabelas 18 e 19 e Figura 36) da mesma forma que os valores de CE_{50} (nM) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

O teste de Dunn mostrou que íleos isolados de cobaias tratadas pela vacina DTP- D apresentaram valores de CE_{max} inferiores nos obtidos pelo PBS ($p < 0,05$), pela vacina DTP- A ($p < 0,001$) e DTP- E ($p < 0,01$).

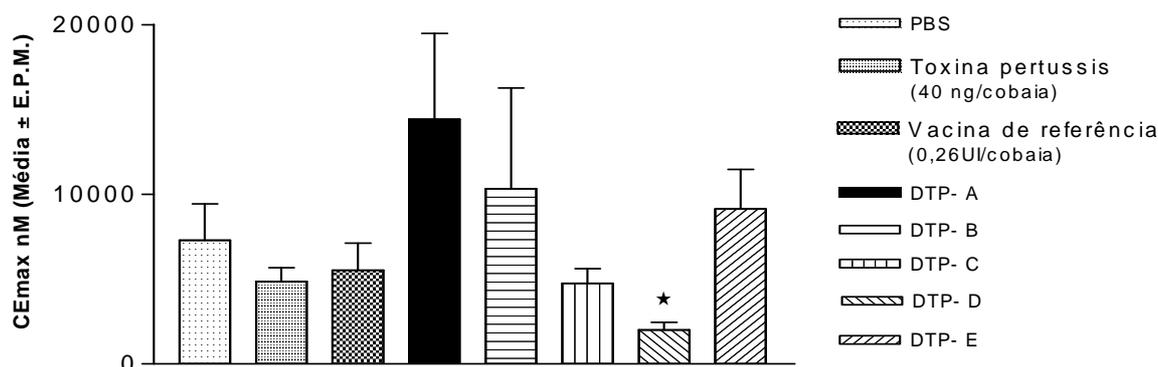


FIGURA 36. Valores médios de CE_{max} (nM), \pm E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias 4 dias após o tratamento (0,5 mL/cobaia via IP) com PBS, TPR, VPR e vacinas DTP (A a E) em doses correspondentes às DSH_{50} em camundongos NIH fêmeas. Os resultados são apresentados como médias \pm E.P.M. (n = 10) * Significativamente diferente do PBS, ($p < 0,05$)

Análise da porção retilínea das curvas sigmóides constantes na Figura 34 pelo método de regressão linear mostrou que as concentrações de 10 a 5000 nM de histamina correspondem à faixa linear das curvas controle (PBS; $R = 0,93$) comparável as faixas lineares das curvas obtidas de íleos isolados de animais tratados pela TPR (10 a 3000 nM; $R = 0,95$), pela VPR (30 a 3000 nM; $R = 0,93$ pelas vacinas DTP-A, DTP-B, DTP-D (10 a 3000 nM; $R = 0,93$; $R = 0,93$ e $R = 0,96$), DTP-C (10 a 10000 nM; $R = 0,88$) e DTP-E (30 a 5000 nM; $R = 0,92$), estes resultados são mostrados nas Tabelas 18 e 19.

4.2.2. Administração de cobaias com doses 10 vezes superiores às DSH_{50} de TPR e VPR obtidas em camundongos NIH fêmeas (5 mL)

As tabelas 20 a 22 mostram os dados referentes as curvas (sigmóides) concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina de preparações isoladas de íleo de cobaia 4 dias após o tratamento por via IP com o controle PBS (5 mL/cobaia) com 400 ng de TPR e com 2,6 UI de VPR, isto é, doses 10 x superiores às DSH_{50} obtidas em camundongos NIH fêmeas.

Para cada um dos grupos experimentais são apresentados os resultados de contração de íleo para 10 ensaios (medidos em mm) para as concentrações de histamina na faixa de 1 a 50.000 nM transformados em seus logaritmos para a obtenção das sigmóides, bem como os correspondentes valores do E_{max} .

Tabela 20. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 5 mL de PBS/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (mm)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	1	1	4	2	1	1	0	0
5	0,69897	0	0	3	3	11	4	3	3	0	0
10	1,00000	1	2	12	9	22	8	6	12	1	3
30	1,47712	3	5	21	11	32	11	13	18	3	7
50	1,69897	7	9	25	17	37	15	25	26	7	10
100	2,00000	10	19	55	32	55	26	47	41	13	24
300	2,47712	20	30	64	40	82	60	53	63	36	37
500	2,69897	37	47	69	67	89	70	75	70	50	44
1000	3,00000	57	73	85	76	92	94	82	92	70	77
3000	3,47712	77	85	87	80	98	97	78	79	86	79
5000	3,69897	80	90	88	86	89	94			82	75
10000	4,00000	85	97	80	79						
30000	4,47712	77	75								
¹ E _{max}		87	93	87	86	97	105	85	89	95	86

¹ Efeito máximo

Tabela 21. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 5 mL da diluição 1/25 de solução de ²TPR/animal (400 ng) via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (mm)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	1,47712	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1
50	1,69897	1	1	0	1	11	1	1	1	7	7
100	2,00000	3	2	3	3	21	5	4	8	21	10
300	2,47712	13	5	18	14	26	10	33	19	31	20
500	2,69897	23	21	37	32	44	24	56	34	53	36
1000	3,00000	40	36	60	46	57	35	76	52	65	47
3000	3,47712	63	56	76	53	67	46	81	55	76	57
5000	3,69897	64	67	78	63	69	47	77	60	73	50
10000	4,00000	66	71	81	57	72	53		56		
30000	4,47712	64	66	76		65	50				
¹ E _{max}		72	76	86	66	72	54	92	64	82	58

¹ Efeito máximo

²Toxina pertussis de referência NIBSC 90/518

Tabela 22. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 5 mL de ²VPR/animal (2,6 UI) por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (mm)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	4	0	1	3	0	0	3	9
30	1,47712	2	2	11	9	3	7	3	2	11	13
50	1,69897	6	5	16	12	5	9	7	6	13	22
100	2,00000	11	11	30	16	11	14	15	11	25	34
300	2,47712	18	16	37	33	22	25	25	31	43	47
500	2,69897	28	28	48	43	29	30	40	43	50	58
1000	3,00000	35	33	52	44	42	44	43	49	59	66
3000	3,47712	44	42	53	53	44	51	51	56	62	68
5000	3,69897	52	50	54	54	48	54	54	59	63	66
10000	4,00000	58	57	53	57	46	44	49	54	59	
30000	4,47712	44	50		53						
50000	4,69897										
¹ E _{max}		56	53	54	55	51	54	55	60	63	67

¹ Efeito máximo ² Vacina pertussis de referência NIBSC 66/303

Os valores de E_{max} estabelecidos a partir da análise das curvas sigmóides de concentração-efeito à histamina (tabelas 20 a 22) foram empregadas para o cálculo do efeito máximo em termos de % de efeito máximo demonstrados nas tabelas 23 a 25.

Tabela 23. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 5 mL de PBS/animal por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (% do efeito máximo)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	1	1	4	2	1	1	0	0
5	0,69897	0	0	3	3	11	4	3	3	0	0
10	1,00000	1	2	14	10	23	8	7	13	1	3
30	1,47712	3	5	24	13	33	10	15	20	3	8
50	1,69897	8	10	29	20	38	14	29	29	7	12
100	2,00000	11	20	63	37	57	25	55	46	14	28
300	2,47712	23	32	73	49	84	57	62	71	38	43
500	2,69897	42	50	79	78	92	67	88	79	53	51
1000	3,00000	65	78	98	88	95	89	96	103	74	89
3000	3,47712	88	91	100	93	101	92	92	89	91	92
5000	3,69897	92	97	101	100	92	89			86	87
10000	4,00000	98	104	92	92						
30000	4,47712	88	81								

Tabela 24. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 5 mL da diluição 1/25 de solução de ¹TPR/animal (400 ng) via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) em contrações (% do efeito máximo)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	1,47712	0	0	0	0	3	0	0	0	1	2
50	1,69897	1	1	0	2	15	2	1	2	9	12
100	2,00000	4	3	3	5	29	9	4	19	26	17
300	2,47712	18	7	21	22	36	18	37	31	38	34
500	2,69897	32	25	44	50	61	44	63	55	65	62
1000	3,00000	56	48	71	72	79	65	85	84	80	81
3000	3,47712	89	75	90	83	93	85	91	89	94	98
5000	3,69897	90	89	93	98	96	87	86	97	90	86
10000	4,00000	93	95	96	89	100	98		90		
30000	4,47712	90	88	90		90	93				

¹Toxina pertussis de referência NIBSC 90/518

Tabela 25. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia 4 dias após o tratamento com 5 mL de ¹VPR/animal (2,6 UI) por via IP (10 ensaios)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E10) Contrações (% do efeito máximo)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	5	0	2	5	0	0	0	0
30	1,47712	4	3	15	11	4	11	5	4	4	4
50	1,69897	9	9	22	15	8	13	1	9	9	9
100	2,00000	18	18	42	26	18	22	23	16	16	16
300	2,47712	29	27	52	40	37	38	42	45	45	45
500	2,69897	46	46	68	52	50	45	67	64	64	64
1000	3,00000	57	55	73	53	71	67	73	73	73	73
3000	3,47712	72	70	75	64	77	77	85	83	83	83
5000	3,69897	81	83	75	66	83	82	90	87	87	87
10000	4,00000	95	94	76	70	79	71	83	80	80	80
30000	4,47712	85	74	67	63					72	66
50000	4,69697	79									

¹Vacina pertussis de referência NIBSC 66/303

Nos 10 ensaios de resposta do íleo isolado de cobaias à histamina pré-tratados com o controle PBS (5mL/cobaia), com 400ng de TPR e 2,6 UI de VPR, os dados seguiram uma distribuição normal ($p > 0,1$) baseado no teste de Kolmogorov-Smirnov e as variâncias não foram significativamente diferentes ($p = 1$) pelo teste de Bartlett. A partir da análise de variância (*ANOVA one way*) não foram detectadas diferenças significativas ($p = 0,90$) entre os ensaios realizados (Figura 37).

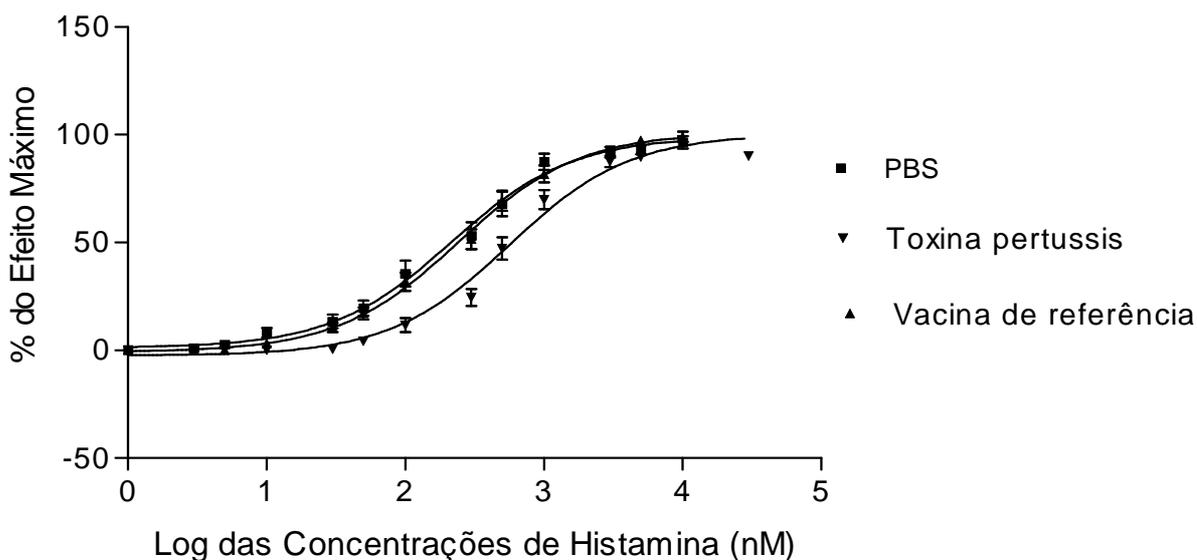


FIGURA 37. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina de preparações isoladas de íleo de cobaias 4 dias após o tratamento (5 mL/cobaia/via IP) com PBS (controle) , 400 ng de TPR, 2,6 UI de VPR, correspondentes a doses 10x superiores às DSH_{50} em camundongos NIH fêmeas. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=10)

Os valores de CE_{50} de histamina em nM, E_{max} em %, CE_{max} de histamina e os de R obtidos a partir da análise das curvas (sigmóides) concentração-resposta à histamina dos 10 ensaios realizados em íleo de cobaia para os grupos experimentais da Figura 37 são mostradas na Tabela 26 (PBS, TPR e VPR), assim como os valores das constantes de dissociação droga receptor (K_d).

Tabela 26. Valores de CE_{50} , E_{Max} , R, C_{MAX} e Kd a partir das curvas de concentração-resposta à histamina em preparações isoladas de íleo de cobaia

PBS											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Regressão não linear
											Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	770,9	551,9	85,0	202,6	71,7	240,4	108,4	116,7	432,4	327,5	215,2 ± 1,1
² E _{MAX}	107,7	109,5	99,4	100,0	100,3	99,4	100,2	100,8	100,0	99,7	99,2 ± 2,6
³ R	0,9977	0,9970	0,9917	0,9928	0,9938	0,9947	0,9898	0,9907	0,9966	0,9876	0,9574
⁴ CE _{MAX}	4285	2228	2338	4886	6521	19275	2523	2728	15135	9785	6970,0 ± 1884,0
⁵ Kd	792,8	556,7	88,8	195,1	64,1	236,4	117,1	117,0	467,4	334,0	205,6 ± 21,9
TOXINA PERTUSSIS DE REFERÊNCIA 91/518 (400 ng/COBAIA)											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Regressão não linear
											Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	1194,0	1207,7	613,3	1308,0	329,3	689,0	394,5	417,8	334,8	393,0	572,7 ± 1,1
² E _{MAX}	117,9	102,2	101,8	102,7	99,9	101,2	103,0	102,2	101,8	103,7	100,9 ± 2,1
³ R	0,9961	0,9912	0,9903	0,9901	0,9992	0,9941	0,9825	0,9897	0,9933	0,9898	0,9752
⁴ CE _{MAX}	22768	15553	8778	19364	6011	10429	5767	7879	5272	6165	10800,0 ± 1978,0
⁵ Kd	1315,0	1320,0	688,7	1442,0	344,7	751,3	458,1	464,7	267,8	425,2	621,3 ± 52,1
VACINA PERTUSSIS DE REFERENCIA NIBSC 66/303 (2,6 UI/COBAIA)											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Regressão não linear
											Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	552,6	506,8	90,68	165,9	339,7	313,2	260,8	264,5	135,4	95,91	241,6 ± 1,1
² E _{MAX}	90,76	86,49	75,43	66,84	86,48	81,48	91,53	89,44	79,71	79,24	81,1 ± 1,3
³ R	0,9958	0,9939	0,9967	0,9969	0,9965	0,9963	0,9951	0,9945	0,9991	0,9970	0,9766
⁴ CE _{MAX}	2831	2978	4786	6886	13365	16032	10023	18716	6266	5058	8694,0 ± 1772,0
⁵ Kd	553,1	515,6	102,1	177,8	361,6	300,8	286,1	295,9	148,1	102,9	235,9 ± 17,5

¹Concentração efetiva média ²Efeito máximo ³Coefficiente de correlação ⁴Concentração efetiva máxima ⁵Constantes de dissociação droga-receptor

Os valores médios de CE_{50} (nM) de histamina em íleos isolados de cobaias pré-tratadas com o controle PBS (5 mL/cobaia), com 400 ng de TPR e 2,6 UI de VPR (Tabela 26 e Figura 38) foram analisados pelo teste de análise de variância seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. O teste de Tukey mostrou que íleos isolados de cobaias tratadas pela TPR apresentaram valores médios de CE_{50} superiores aos obtidos pelo PBS ($p < 0,05$) e VPR ($p < 0,05$).

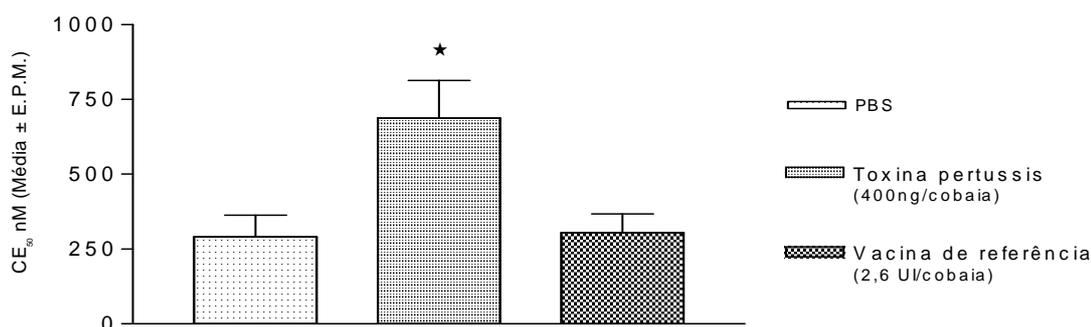


FIGURA 38. Valores médios de CE_{50} (nM), \pm E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias 4 dias após o tratamento (5 mL/cobaia/via IP) com PBS (controle), 400 ng de TPR, 2,6 UI de VPR correspondentes às doses 10 X superiores às DSH_{50} em camundongos NIH fêmeas. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=10) * Significativamente diferente do PBS, ($p < 0,05$)

Não foram detectadas na ANOVA diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de CE_{max} (nM) em ensaios de contratilidade à histamina em íleos isolados de cobaias pré-tratadas com TPR e VPR em relação ao controle PBS ($p = 0,3672$).

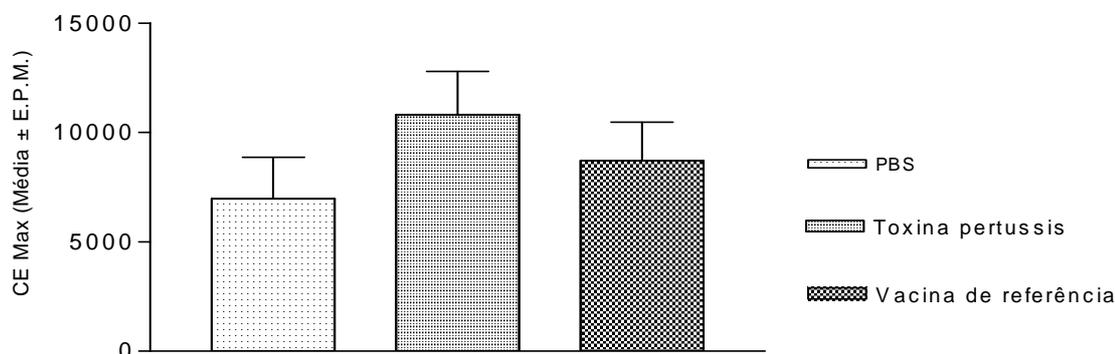


FIGURA 39. Valores médios de CE_{max} (nM), \pm E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias 4 dias após o tratamento (5 mL/cobaia/via IP) com PBS (controle), 400 ng de TPR, 2,6 UI de VPR correspondentes às doses 10 X superiores às DSH_{50} em camundongos NIH fêmeas. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=10)

Análise da porção retilínea das curvas sigmóides constantes na Figura 37 pelo método de regressão linear mostrou que as concentrações de 3 a 5000 nM de histamina correspondem à faixa linear das curvas controle (PBS; $R = 0,93$) comparável às faixas

lineares das curvas obtidas de íleos isolados de animais tratados pela TPR (30 a 10000 nM; R= 0,95), pela VPR (10 a 10000 nM; R= 0,95).

4.3. Efeito do tratamento *in vitro* pelo PBS e TPR sobre a contratilidade do íleo isolado de cobaias à histamina

4.3.1. Tratamento *in vitro* de íleo isolado de cobaia com PBS (controle) e TPR (30 ng/mL)

As tabelas 27 e 28 mostram os dados referentes às 5 curvas (sigmóides) concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina de preparações isoladas de íleo controle (sem tratamento) e de preparações incubadas *in vitro* durante 15 min com 390 µL de solução PBS adicionada à 13 mL de solução nutritiva de Tyrode em cuba (Tabela 27a) e com 390 µL de solução TPR em PBS (1 µg/mL) resultando na concentração final de 30 ng/mL (Tabela 28a).

Para cada um dos grupos experimentais são apresentados os resultados de contração de íleo para 05 ensaios (medidos em mm) para as concentrações de histamina na faixa de 1 a 30.000 nM transformados em seus logaritmos para a obtenção das sigmóides, bem como os correspondentes valores do E_{max} .

Tabela 27. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* pelo PBS (05 ensaios) - Controle (sem tratamento)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 5) em contrações (mm)				
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5
1	0,00000	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	0	0	0
30	1,47712	0	0	1	2	1
50	1,69897	5	4	4	3	4
100	2,00000	11	11	10	8	10
300	2,47712	44	44	30	15	14
500	2,69897	54	54	45	29	26
1000	3,00000	61	65	63	49	47
3000	3,47712	65	67	72	68	68
5000	3,69897	70	71	77	79	78
10000	4,00000	74	79	65	69	68
30000	4,47712	68	68			
¹ E _{max}		73	76	78	84	84

¹Efeito máximo

Tabela 27a. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* pelo PBS (05 ensaios) - PBS (390 µl em 13 mL de solução de Tyrode)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 5) em contrações (mm)				
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5
1	0,00000	0	0	0	0	0
1	0,47712	0	0	0	0	0
3	0,69897	0	0	0	0	0
5	1,00000	0	0	1	0	0
10	1,47712	0	0	3	1	2
30	1,69897	6	3	9	4	6
50	2,00000	15	15	31	6	9
100	2,47712	38	38	46	12	14
300	2,69897	48	48	60	30	24
500	3,00000	60	60	73	51	38
1000	3,47712	62	68	76	67	59
3000	3,69897	68	72	65	80	72
5000	4,00000	70	78		68	69
10000	4,47712	66	66			
¹ E _{max}		82	70	75	78	84

¹Efeito máximo

Tabela 28. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* por 30 ng/mL de TPR (05 ensaios) - Controle (sem tratamento)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 5) em contrações (mm)				
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5
1	0,00000	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	1	1	2	0
30	1,47712	1	4	3	6	2
50	1,69897	5	11	5	13	6
100	2,00000	10	18	9	2	8
300	2,47712	2	3	29	40	18
500	2,69897	3	55	47	59	31
1000	3,00000	61	65	64	65	61
3000	3,47712	63	72	70	71	64
5000	3,69897	68	68	67	87	80
10000	4,00000	74			81	74
30000	4,47712	62				
50000	4,69897					
[†] E _{max}		73	76	78	84	84
[†] Efeito máximo						

Tabela 28a. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* por 30 ng/mL de TPR (05 ensaios) - TPR (30 ng/mL)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 5) em contrações (mm)				
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5
1	0,00000	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	1
5	0,69897	0	0	0	0	2
10	1,00000	2	2	1	2	11
30	1,47712	3	4	3	6	16
50	1,69897	0	11	5	13	24
100	2,00000	17	18	9	29	38
300	2,47712	39	38	28	40	58
500	2,69897	50	54	47	59	65
1000	3,00000	61	64	63	65	84
3000	3,47712	66	71	69	71	73
5000	3,69897	62	67	66	70	
[†] E _{max}		70	75	77	84	82
[†] Efeito máximo						

Os valores de E_{max} estabelecidos a partir da análise das curvas sigmóides de concentração-efeito à histamina (Tabelas 27 e 28) foram empregados para o cálculo em termos de % de efeito máximo demonstrados nas tabelas 29 e 30.

Tabela 29. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* pelo PBS (05 ensaios) - Controle (sem tratamento)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 5) em contrações (% do efeito máximo)				
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5
1	0,00000	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	0	0	0	0
30	1,47712	0	0	1	2	1
50	1,69897	7	5	5	3	5
100	2,00000	15	14	13	9	12
300	2,47712	60	58	38	18	17
500	2,69897	74	71	58	34	31
1000	3,00000	83	85	81	58	56
3000	3,47712	89	88	92	81	81
5000	3,69897	96	93	99	94	93
10000	4,00000	101	104	83	82	81
30000	4,47712	93	89			

Tabela 29a. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* pelo PBS (05 ensaios) - PBS (390 µl em 13 mL de solução de Tyrode)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 5) em contrações (% do efeito máximo)				
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5
1	0,00000	0	0	0	0	0
1	0,47712	0	0	0	0	0
3	0,69897	0	0	0	0	0
5	1,00000	0	0	1	0	0
10	1,47712	0	0	4	1	2
30	1,69897	8	4	11	5	7
50	2,00000	21	20	40	7	11
100	2,47712	54	51	59	14	17
300	2,69897	68	64	77	36	29
500	3,00000	86	80	93	61	46
1000	3,47712	88	91	97	80	72
3000	3,69897	97	96	83	95	88
5000	4,00000	100	104		81	84
10000	4,47712	94	88			

Tabela 30. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* por 30 ng/mL de TPR (05 ensaios)

Controle (sem tratamento)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 5) em contrações (% do efeito máximo)				
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5
1	0,00000	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0
10	1,00000	0	2	2	2	0
30	1,47712	1	5	4	7	3
50	1,69897	7	15	6	15	7
100	2,00000	14	24	12	35	10
300	2,47712	31	51	37	48	22
500	2,69897	43	72	61	70	37
1000	3,00000	84	85	82	78	73
3000	3,47712	87	95	90	85	76
5000	3,69897	93	90	86	104	95
10000	4,00000	102			96	88
30000	4,47712	85				

Tabela 30a. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* por 30 ng/mL de TPR (05 ensaios) - TPR (30 ng/mL)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 5) em contrações (% do efeito máximo)				
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5
1	0,00000	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	1
5	0,69897	0	0	0	0	3
10	1,00000	3	2	2	2	13
30	1,47712	4	5	4	7	20
50	1,69897	15	15	6	15	29
100	2,00000	24	24	12	35	46
300	2,47712	56	51	37	48	71
500	2,69897	72	72	61	70	79
1000	3,00000	87	85	82	78	103
3000	3,47712	95	95	90	85	89
5000	3,69897	88	90	86	83	

Nos 05 ensaios de resposta do íleo isolado de cobaias à histamina não tratados e tratados durante 15 min *in vitro* com o PBS (390 µL em 13 mL de Tyrode) e com 30 ng/mL de TPR (390 µL de solução de TPR (1 µg/mL) em PBS em 13 mL de Tyrode), os dados seguiram uma distribuição normal ($p > 0,1$) baseado no teste de Kolmogorov-Smirnov e as variâncias não foram significativamente diferentes ($p = 0,9$) pelo teste de Bartlett. A partir

da análise de variância (*ANOVA one way*) não foram detectadas diferenças significativas ($p= 0,78$; $p= 0,74$), respectivamente, entre os ensaios realizados em preparações sem (Figura 40) e com o tratamento pelo PBS (Figura 41), e sem (Figura 42) e com o tratamento pela TPR 30 ng/mL ($p= 0,96$; $p= 0,98$) na Figura 43.

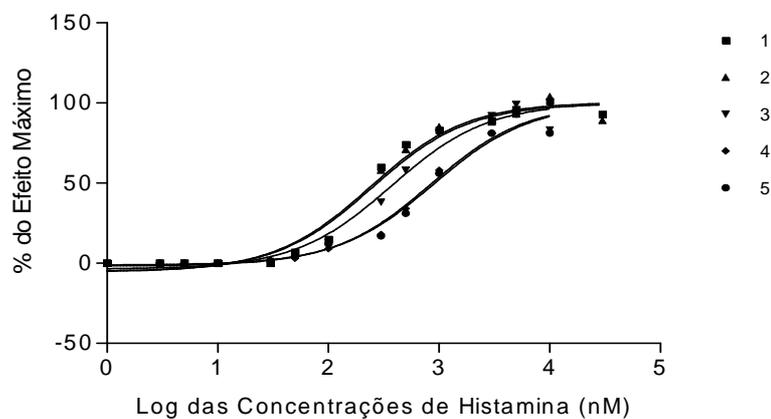


FIGURA 40. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia controle (sem tratamento *in vitro* pelo PBS). Resultados individuais de cada ensaio (n=5)

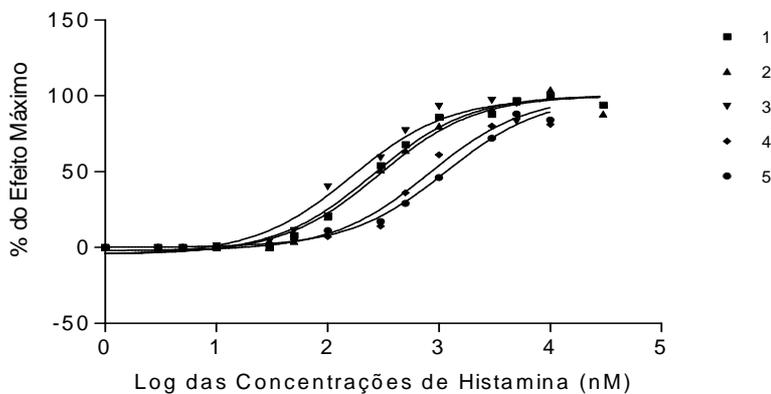


FIGURA 41. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia incubadas *in vitro* durante 15 min com 390 µl de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode. Resultados individuais de cada ensaio (n=5)

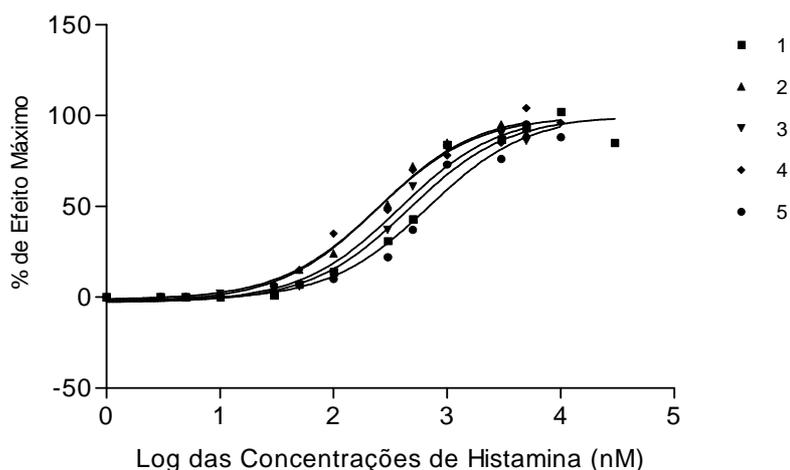


FIGURA 42. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia controle (sem tratamento *in vitro* por 30 ng/mL de TPR). Resultados individuais de cada ensaio (n=5)

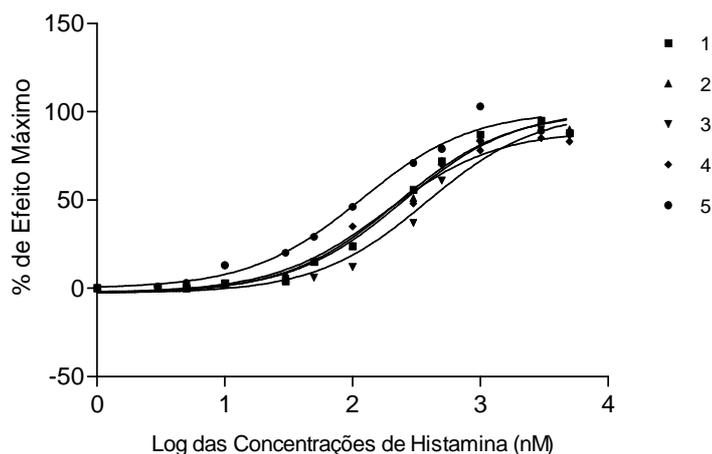


FIGURA 43. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia incubadas *in vitro* durante 15 min com 390 μ L de TPR (1 μ g/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (concentração final de 30 ng/mL). Resultados individuais de cada ensaio (n=5)

As Figuras 43 e 44 mostram as curvas combinadas dos 5 ensaios realizados nas preparações de íleo antes (controle) e após o tratamento com 390 μ L de PBS e em preparações antes (controle) e após tratamento com TPR (30 ng/mL), respectivamente.

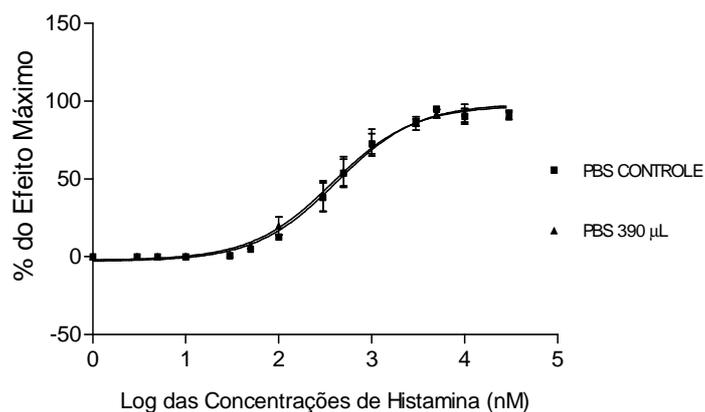


FIGURA 44. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle PBS) e incubados *in vitro* durante 15 min com 390 µL de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (PBS 390). Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n=5)

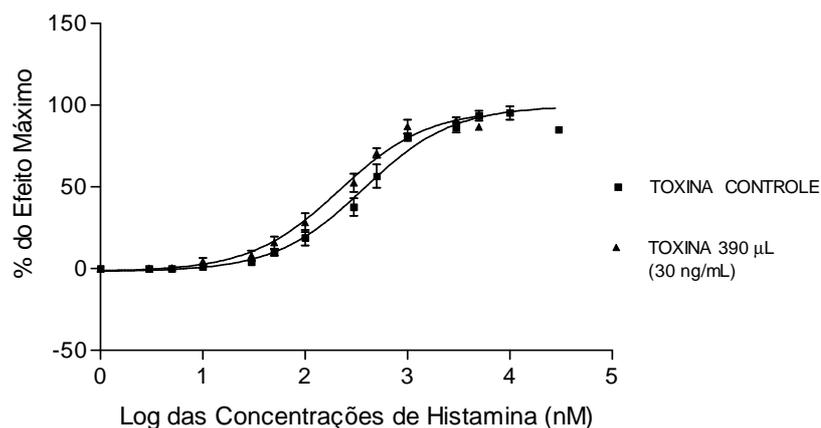


FIGURA 45. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle TPR) e incubados *in vitro* durante 15 min com 390 µL de TPR (1 µg/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode, concentração final de 30 ng/mL (TPR 390). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=5)

Os valores de CE_{50} de histamina em nM, E_{max} em %, CE_{max} de histamina em nM e os de R obtidos a partir da análise das curvas (sigmóides) concentração-resposta à histamina dos 5 ensaios realizados em íleo de cobaia constantes nas Figuras 40 a 43 são mostrados na Tabela 31 (PBS e TPR 30 ng/mL), assim como os valores das constantes de dissociação droga receptor (K_d).

Tabela 31. Valores de CE_{50} , E_{MAX} , R, C_{MAX} e Kd, a partir das curvas de concentração-resposta à histamina em preparações isoladas de íleo de cobaia não tratadas e tratadas *in vitro* pelo PBS e TPR

Controle (sem tratamento pelo PBS)						
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	Regressão não linear
						Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	240,0	248,4	370,5	840,2	891,5	416,4 ± 1,1
² E _{MAX}	100,4	99,6	100,0	100,1	99,7	98,3 ± 2,9
³ R	0,9914	0,9891	0,9894	0,9915	0,9902	0,9732
⁴ CE _{MAX}	8491	8128	12133	15739	16180	12130,0 ± 1713,00
⁵ Kd	278,0	288,3	414,8	894,7	931,8	459,8 ± 56,7
PBS (390 µL de PBS em 13 mL de solução de Tyrode)						
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	Regressão não linear
						Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	255,6	288,7	164,8	820,3	1159,0	379,4 ± 1,2
² E _{MAX}	100,5	100,1	98,5	99,8	99,8	97,1 ± 2,2
³ R	0,9952	0,9934	0,9873	0,9872	0,9959	0,9812
⁴ CE _{MAX}	9705	11142	3655	14454	12302	10250,0 ± 1823,0
⁵ Kd	291,2	328,4	191,5	882,1	1156,0	411,5 ± 58,4
Controle (sem tratamento pela TPR)						
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	Regressão não linear
						Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	461,4	247,5	379,9	247,5	675,9	373,8 ± 1,1
² E _{MAX}	99,8	101,0	100,5	99,8	100,2	99,6 ± 2,6
³ R	0,9861	0,9961	0,9907	0,9936	0,9882	0,9812
⁴ CE _{MAX}	5847	5370	5834	4255	9162	6094,0 ± 820,0
⁵ Kd	499,5	270,7	416,8	260,5	712,7	397,3 ± 40,4
TPR (390 µL de TPR 1µg/mL em 13 mL de solução de Tyrode)						
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	Regressão não linear
						Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	225,1	247,5	379,9	182,9	116,7	215,8 ± 1,1
² E _{MAX}	100,1	101,0	100,5	89,6	100,8	97,5 ± 2,8
³ R	0,9948	0,9961	0,9907	0,9951	0,9907	0,9904
⁴ CE _{MAX}	2529	2851	3981	2460	2192	2803,0 ± 312,7
⁵ Kd	249,1	170,7	416,8	202,2	117,0	229,8 ± 24,8

¹Concentração efetiva média ²Efeito máximo ³Coefficiente de correlação ⁴Concentração efetiva máxima ⁵Constantes de dissociação droga-receptor

Diferenças estatisticamente não significativas foram detectadas pelo teste t pareado entre os valores médios de CE_{50} (nM) de histamina (Tabela 18) em íleos isolados de cobaias antes e após o tratamento com solução de PBS ($p= 0,4043$), bem

como antes e após o tratamento com 30 ng/mL de TPR ($p= 0,09$), como mostrado respectivamente nas Figuras 46 e 47.

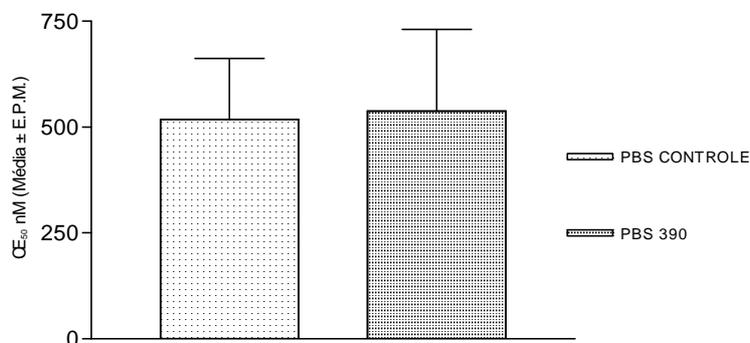


FIGURA 46. Valores médios de CE₅₀ (nM), ± E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle PBS) e incubadas *in vitro* durante 15 min com 390 µl de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (PBS 390). Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n=5)

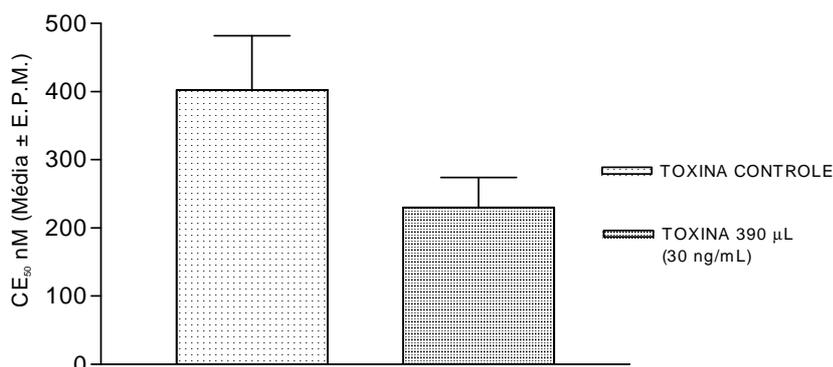


Figura 47. Valores médios de CE₅₀ (nM), ± E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle TPR) e incubadas *in vitro* durante 15 min com 390 µl de TPR (1 µg/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (concentração final de 30 ng/mL (TPR 390)). Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n=5)

Diferenças estatisticamente não significativas foram detectadas pelo teste t pareado entre os valores médios de CE_{max} (nM) de histamina em íleos isolados de cobaias (Tabela 31) antes e após o tratamento com solução de PBS ($p= 0,2366$). As CE_{max} (nM) de histamina em íleos isolados de cobaias tratados com 30 ng/mL de TPR apresentaram valores significativamente inferiores em relação ao controle ($p= 0,0028$) como mostrado respectivamente nas Figuras 48 e 49.

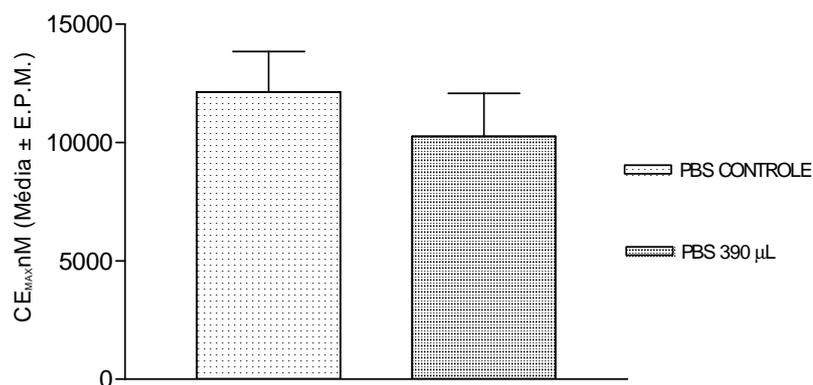


Figura 48. Valores médios de CE_{max} (nM), ± E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle PBS) e incubadas *in vitro* durante 15 min com 390 µl de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (PBS 390). Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n=5)

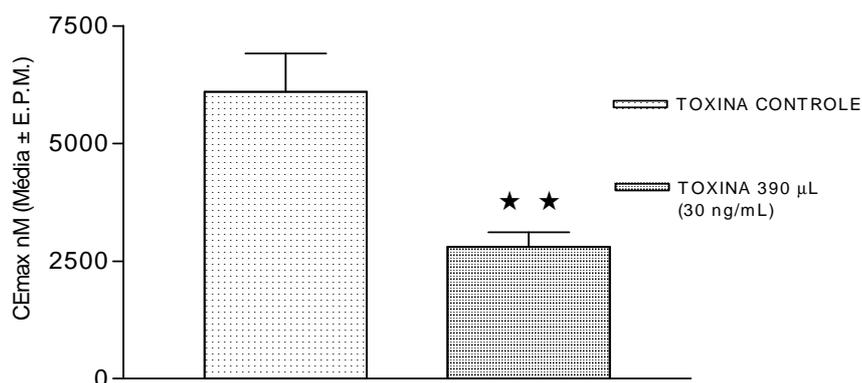


Figura 49. Valores médios de CE_{max} (nM), ± E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle TPR) e incubadas *in vitro* durante 15 min com 390 µl de TPR (1 µg/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (TP 390). Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n=5). **Significamente diferente do PBS (p < 0,01)

Análise da porção retilínea das curvas sigmóides constantes das Figuras 45 e 46 pelo método de regressão linear mostrou que as concentrações de 30 a 10000 nM e 30 a 5000 nM de histamina correspondem às faixas lineares, respectivamente, das curvas controle (PBS: R= 0,924 e TPR: R= 0,9575), comparáveis às faixas lineares de 10 a 10000 nM e de 30 a 3000 nM de histamina obtidas das curvas de íleos tratados *in vitro*, respectivamente, pelo PBS (R= 0,9323) e pela TPR (R= 0,9512).

4.3.2 Tratamento *in vitro* de íleo isolado de cobaia com PBS (controle) e TPR (40 ng/mL)

As Tabelas 32 e 33 mostram os dados referentes às 10 curvas (sigmóides) concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina de preparações isoladas de íleo controle (sem tratamento) e de preparações incubadas *in vitro* durante 15 min com 520 µL de solução PBS adicionada à 13 mL de solução nutritiva de Tyrode em cuba (Tabela 32a) e com 520 µL de solução TPR em PBS (1 µg/mL) resultando na concentração final de 40 ng/mL (Tabela 33a).

Para cada um dos grupos experimentais são apresentados os resultados de contração de íleo para 10 ensaios (medidos em mm) para as concentrações de histamina na faixa de 1 a 50.000 nM transformados em seus logaritmos para a obtenção das sigmóides, bem como os correspondentes valores do E_{max} .

Tabela 32. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* pelo PBS (10 ensaios) - Controle (sem tratamento)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 10) em contrações (mm)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
10	1,00000	1	0	0	0	0	0	0	1	3	3
30	1,47712	4	0	1	1	1	3	2	3	9	6
50	1,69897	10	1	10	2	3	8	7	7	13	13
100	2,00000	21	4	15	4	8	21	13	11	19	22
300	2,47712	39	8	21	13	15	37	19	30	30	52
500	2,69897	47	17	37	26	29	50	27	35	47	57
1000	3,00000	60	38	60	52	49	56	35	40	60	62
3000	3,47712	65	57	75	64	68	61	39	42	68	56
5000	3,69897	71	67	80	79	79	64	43	44	80	
10000	4,00000	65	82	82	86	91	60	45	38	70	
30000	4,47712		65	62	72	82		48			
50000	4,69897							45			
¹ E _{max}		71	80	80	86	92	65	46	44	78	67

¹Efeito máximo

Tabela 32a. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* pelo PBS (10 ensaios) - PBS (520 µl em 13 mL de solução de Tyrode)

Concentração de Histamina		(E1 a E 10) em contrações (mm)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
10	1,00000	1	0	0	0	0	3	1	0	1	0
30	1,47712	5	0	1	3	1	6	10	2	2	1
50	1,69897	11	5	4	12	4	13	17	3	9	3
100	2,00000	22	9	10	25	7	22	35	10	16	8
300	2,47712	38	25	21	41	14	52	40	20	33	18
500	2,69897	54	31	28	55	30	57	43	35	55	24
1000	3,00000	63	59	38	59	48	62	46	41	70	38
3000	3,47712	67	64	41	62	69	56	44	44	76	45
5000	3,69897	72	66	46	65	80			37	79	51
10000	4,00000	66	75	52	61	90				81	57
30000	4,47712		69	50	50	81				75	48
[†] E _{max}		72	75	51	62	92	67	48	46	83	55

[†]Efeito máximo

Tabela 33. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* por 40 ng/mL de TPR (9 ensaios) - Controle (sem tratamento)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 9) em contrações (mm)								
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	1	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	2	0	0	0	1	0	0	0
10	1,00000	3	3	1	1	3	3	1	2	0
30	1,47712	7	5	3	3	8	9	2	5	1
50	1,69897	14	6	8	8	15	13	9	9	4
100	2,00000	27	22	16	17	35	19	16	19	12
300	2,47712	47	35	23	25	49	30	33	30	30
500	2,69897	57	54	36	38	59	47	55	47	45
1000	3,00000	66	75	55	57	68	60	70	73	63
3000	3,47712	68	88	67	69	72	68	76	85	72
5000	3,69897	64	92	71	73	68	80	79	90	77
10000	4,00000		84	80	82		70	81	97	92
30000	4,47712			69	75			75	75	80
[†] E _{max}		71	96	78	81	74	78	83	93	87

[†]Efeito máximo

Tabela 33a. Curvas concentração-efeito de histamina em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* por 40 ng/mL de TPR (9 ensaios) - TPR (40 ng/mL)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 9 em contrações (mm))								
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	1	0	0	0	0	0	0	4
5	0,69897	0	4	0	0	0	0	0	2	6
10	1,00000	4	6	3	2	2	0	0	4	13
30	1,47712	7	9	8	4	7	1	2	7	16
50	1,69897	10	19	16	9	14	2	5	14	19
100	2,00000	24	29	27	16	34	11	7	22	28
300	2,47712	45	58	36	28	51	22	28	39	44
500	2,69897	53	64	51	40	64	31	41	47	55
1000	3,00000	62	69	71	59	72	51	55	61	66
3000	3,47712	67	86	82	72	78	49	58	58	70
5000	3,69897	63	82	87	78	74		51	64	66
10000	4,00000			82	72				58	
¹ E _{max}		70	87	89	81	81	61	62	67	72

¹ Efeito máximo

Os valores de E_{max} estabelecidos a partir da análise das curvas sigmóides de concentração-efeito à histamina (Tabelas 32, 32a, 33 e 33a) foram empregados para o cálculo em termos de % de efeito máximo demonstrados nas tabelas 34 e 35.

Tabela 34. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* pelo PBS (10 ensaios) - Controle (sem tratamento)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 10 em contrações (% do efeito máximo))									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
10	1,00000	1	0	0	0	0	0	0	2	4	4
30	1,47712	6	0	1	1	1	5	4	7	11	9
50	1,69897	14	1	12	2	3	12	15	16	17	19
100	2,00000	29	5	19	5	9	32	28	25	24	33
300	2,47712	55	10	26	15	16	57	41	68	38	78
500	2,69897	66	21	46	30	31	77	59	79	60	85
1000	3,00000	84	47	75	60	53	86	76	91	77	92
3000	3,47712	91	71	94	74	74	94	85	95	87	83
5000	3,69897	100	84	100	92	86	98	93	100	102	
10000	4,00000	91	102	102	100	99	92	98	86	90	
30000	4,47712		81	77	84	89		104			
50000	4,69897							98			

Tabela 34a. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* pelo PBS (10 ensaios) - PBS (520 µl em 13 mL de solução de Tyrode)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 10) em contrações (% do efeito máximo)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
10	1,00000	1	0	0	0	0	4	2	0	1	0
30	1,47712	7	0	2	5	1	9	21	4	2	2
50	1,69897	15	7	8	19	4	19	35	6	11	5
100	2,00000	30	12	20	40	8	33	73	22	19	14
300	2,47712	53	33	41	66	15	78	83	43	40	33
500	2,69897	75	41	55	89	33	85	89	76	66	44
1000	3,00000	87	79	74	95	52	92	96	89	84	69
3000	3,47712	93	85	80	100	75	83	92	96	92	82
5000	3,69897	100	88	90	105	87			80	95	93
10000	4,00000	92	100	102	98	98				97	104
30000	4,47712		92	98	81	88				90	87

Tabela 35. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* por 40 ng/mL de TPR (9 ensaios) - Controle (sem tratamento)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 9) em contrações (% do efeito máximo)								
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,47712	0	1	0	0	0	0	0	0	0
5	0,69897	0	2	0	0	0	1	0	0	0
10	1,00000	4	3	1	1	4	4	1	2	0
30	1,47712	10	5	4	4	11	11	2	5	1
50	1,69897	20	6	10	10	20	17	11	10	4
100	2,00000	38	23	20	21	47	24	19	20	14
300	2,47712	66	36	29	31	66	38	40	32	34
500	2,69897	80	56	46	47	80	60	66	50	52
1000	3,00000	93	78	70	70	92	77	84	78	72
3000	3,47712	96	92	86	85	97	87	92	91	83
5000	3,69897	90	96	91	90	92	102	95	97	88
10000	4,00000		87	102	101		90	97	104	106
30000	4,47712			88	92			90	81	92

Tabela 35a. Curvas concentração-efeito de histamina em % do efeito máximo em íleo de cobaia obtidas do tratamento *in vitro* por 40 ng/mL de TPR (9 ensaios) - TPR (40 ng/mL)

Concentração de Histamina		Ensaio (E1 a E 9) em contrações (% do efeito máximo)									
(nM)	(log)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	
1	0,00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	0,47712	0	1	0	0	0	0	0	0	5	
5	0,69897	0	4	0	0	0	0	0	3	9	
10	1,00000	6	7	3	2	2	0	0	6	19	
30	1,47712	10	10	9	5	9	2	1	11	22	
50	1,69897	14	22	18	11	17	3	8	22	26	
100	2,00000	34	33	30	20	42	18	11	34	39	
300	2,47712	64	67	40	34	63	36	45	61	62	
500	2,69897	76	73	57	49	79	51	66	73	76	
1000	3,00000	88	79	80	73	89	84	89	95	92	
3000	3,47712	96	99	92	89	96	80	93	91	97	
5000	3,69897	90	94	98	96	91		82	100	92	
10000	4,00000			92	89				91		

Nos 10 ensaios de resposta do íleo isolado de cobaias à histamina não tratados e tratados durante 15 min *in vitro* com o PBS (520 µL em 13 mL de Tyrode) e com os 09 ensaios com 40 ng/mL de TPR (520 µL de solução de TPR (1 µg/mL) em PBS em 13 mL de Tyrode), os dados seguiram uma distribuição normal ($p > 0,1$) baseado no teste de Kolmogorov-Smirnov e as variâncias não foram significativamente diferentes ($p = 1$) pelo teste de Bartlett. A partir da análise de variância (ANOVA *one way*) não foram detectadas diferenças significativas ($p = 0,99$; $p = 0,99$), respectivamente, entre os ensaios realizados em preparações sem (Figura 50) e com o tratamento pelo PBS (Figura 51), e sem (Figura 52) e com o tratamento pela TPR 40 ng/mL ($p = 1$; $p = 0,93$), respectivamente como mostrado na Figura 53.

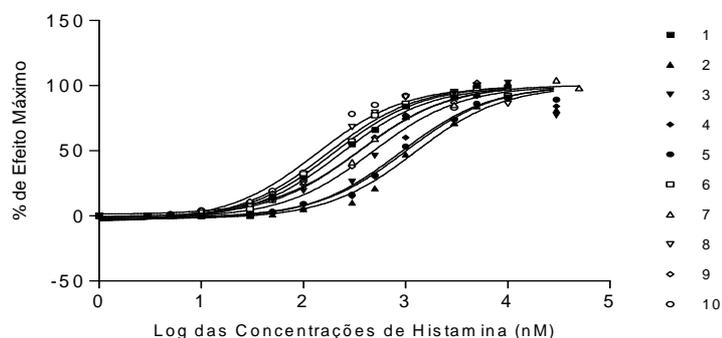


FIGURA 50. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia controle (sem tratamento *in vitro* pelo PBS). Resultados individuais de cada ensaio (n=10)

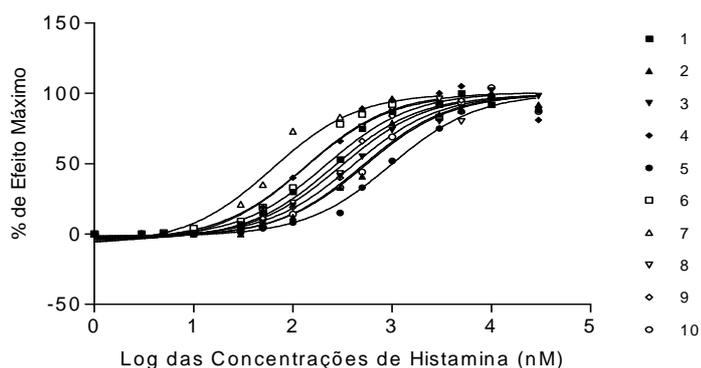


FIGURA 51. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia incubadas *in vitro* durante 15 min com 520 µl de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode. Resultados individuais de cada ensaio (n=10)

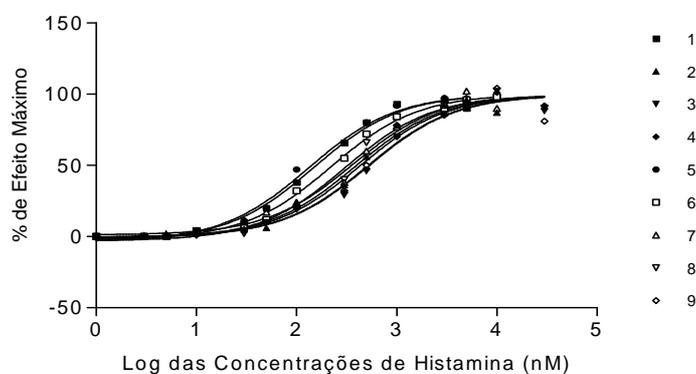


FIGURA 52. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia controle (sem tratamento *in vitro* por 40 ng/mL de TPR). Resultados individuais de cada ensaio (n=9)

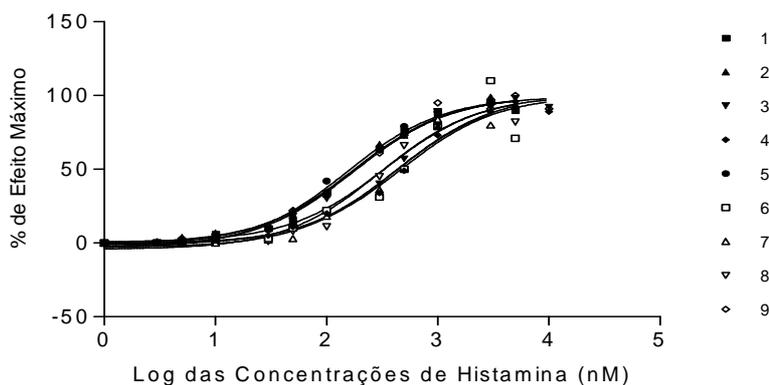


FIGURA 53. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleo de cobaia incubadas *in vitro* durante 15 min com 520 µl de TPR (1 µg/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (concentração final de 40 ng/mL). Resultados individuais de cada ensaio (n=9)

A Figura 54 mostra as curvas combinadas dos 10 ensaios realizados nas preparações de íleo antes (controle) e após o tratamento com 520 μL de PBS e a Figura 55 mostra as curvas combinadas dos 9 ensaios realizados em preparações antes (controle) e após tratamento com TPR (40 ng/mL).

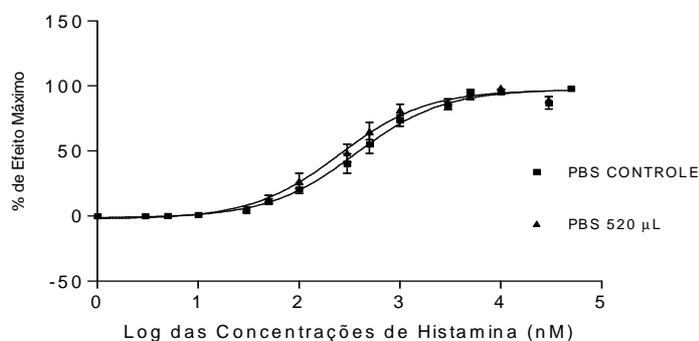


FIGURA 54. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle PBS) e incubados *in vitro* durante 15 min com 520 μl de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (PBS 520). Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. (n= 10)

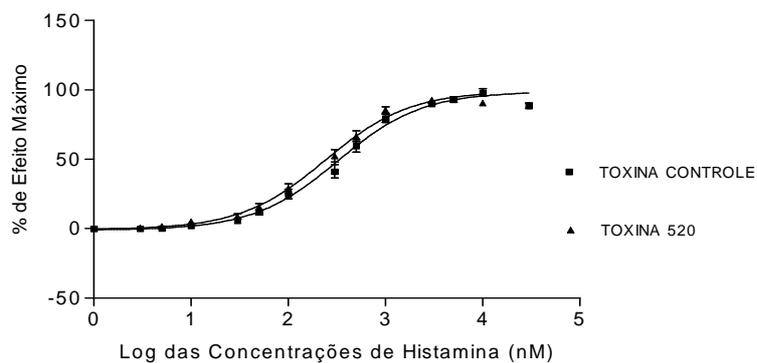


FIGURA 55. Curvas concentração-efeito para a resposta contrátil à histamina em preparações de íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle TPR) e incubados *in vitro* durante 15 min com 520 μl de TPR (1 $\mu\text{g/mL}$) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode, concentração final de 40 ng/mL (TPR 520). Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=9)

Os valores de CE_{50} de histamina em nM, E_{max} em %, CE_{max} de histamina em nM e os de R obtidos a partir da análise das curvas (sigmóides) concentração-resposta à histamina dos 10 ensaios realizados em íleo de cobaia constantes nas Figuras 50 e 51 e com 9 ensaios nas figuras 52 e 53 são mostrados na Tabela 36 (PBS e TPR 40 ng/mL), assim como os valores das constantes de dissociação droga receptor (K_d).

Tabela 36. Valores de CE_{50} , E_{MAX} , R, C_{MAX} e Kd, a partir das curvas de concentração-resposta à histamina *in vitro* em preparações isoladas de íleo de cobaia

Controle (sem tratamento pelo PBS)											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Regressão não linear
											Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	233,1	1234	473,4	889,6	1002	196,9	352,1	172,2	364,9	134,2	365,5 ± 1,1
² E _{MAX}	99,6	99,9	99,7	99,9	100,6	100,3	100,4	100,2	100,2	99,7	97,4 ± 2,3
³ R	0,9958	0,9856	0,9771	0,9880	0,9950	0,9961	0,9971	0,9908	0,9935	0,9848	0,9600
⁴ CE _{MAX}	5662	15703	6109	11481	14554	5321	7744	5188	7870	2285	8192,0 ± 1378,0
⁵ Kd	252,9	1326,0	197,0	950,6	1040,0	224,1	259,5	195,1	346,1	154,6	430,6 ± 53,5
PBS (520 µL de PBS em 13 mL de solução de Tyrode)											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	Regressão não linear
											Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	214,3	507,1	402,4	132,4	978,5	134,2	62,1	252,8	304,2	537,2	251,7 ± 1,1
² E _{MAX}	100,8	99,9	99,6	100,7	100,1	99,7	100,5	99,2	99,4	99,7	97,0 ± 2,3
³ R	0,9964	0,9922	0,9969	0,9854	0,9937	0,9848	0,9890	0,9811	0,9938	0,9936	0,9872
⁴ CE _{MAX}	5834	9817	8749	3419	19453	2488	1534	5046	6338	9332	7201,0 ± 1632,0
⁵ Kd	233,1	546,0	429,7	153,8	1030,0	154,6	76,6	285,8	333,3	572,3	327,5 ± 41,5
Controle (sem tratamento pela TP)											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9		Regressão não linear
											Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	148,5	388,7	522,6	514,1	132,5	364,9	304,2	424,8	479,1		323,5 ± 1,1
² E _{MAX}	100,3	99,7	99,4	99,7	99,9	100,2	99,4	99,7	100,3		98,7 ± 1,7
³ R	0,9925	0,9870	0,9877	0,9925	0,9921	0,9872	0,9878	0,9740	0,9892		0,9812
⁴ CE _{MAX}	3491	9057	9484	10000	3206	8749	6337	6998	9015		7371,0 ± 853,3
⁵ Kd	165,8	400,1	530,5	519,8	149,4	350,1	333,0	439,4	520,0		335,8 ± 24,4
TP (520 µL de TP 1µg/mL em 13 mL de solução de Tyrode)											
Parâmetros	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9		Regressão não linear
											Média ± E.P.M.
¹ CE ₅₀	175,9	183,4	337,0	467,9	150,8	409,8	301,9	173,1	170,7		240,0 ± 1,1
² E _{MAX}	99,9	99,9	100,5	100,3	99,4	99,5	99,9	99,5	99,9		99,2 ± 1,9
³ R	0,9963	0,9966	0,9943	0,9961	0,9962	0,9848	0,9841	0,9950	0,9934		0,9807
⁴ CE _{MAX}	3917	3935	5861	7888	3419	7744	5847	3326	4111		5116,0 ± 596,4
⁵ Kd	192,0	185,0	328,3	474,1	171,2	458,9	344,6	179,7	134,2		245,7 ± 18,7

¹Concentração efetiva média ²Efeito máximo ³Coefficiente de correlação ⁴Concentração efetiva máxima ⁵Constantes de dissociação droga-receptor

Diferenças estatisticamente não significativas foram detectadas pelo teste t pareado entre os valores médios de CE₅₀ (nM) de histamina em íleos isolados de

cobaias (Tabela 36) antes e após o tratamento com solução de PBS ($p= 0,1035$). As CE_{50} (nM) de histamina em íleos isolados de cobaias tratados com 40 ng/mL de TPR apresentaram valores significativamente inferiores em relação ao controle ($p=0,0284$) como mostrado respectivamente nas Figuras 56 e 57.

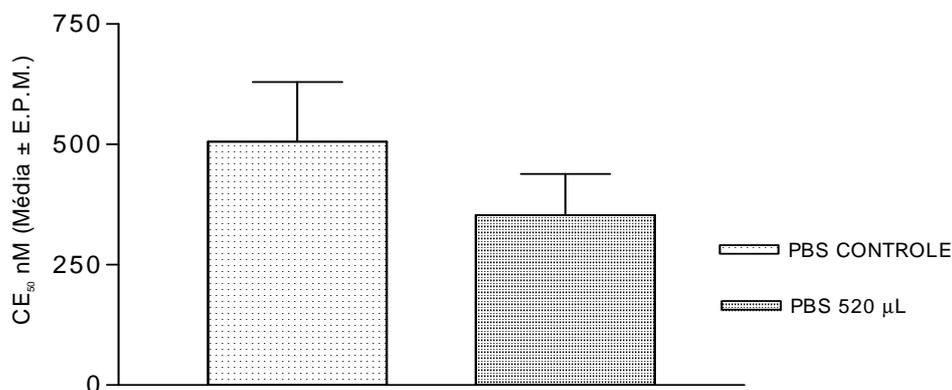


FIGURA 56. Valores médios de CE_{50} (nM), \pm E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle PBS) e incubadas *in vitro* durante 15 min com 520 μ l de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (PBS 520). Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=10)

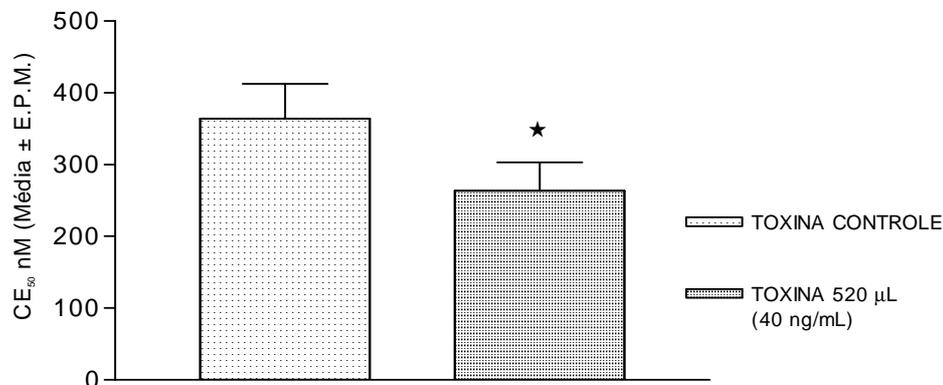


FIGURA 57. Valores médios de CE_{50} (nM), \pm E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle TPR) e incubadas *in vitro* durante 15 min com 520 μ l de TPR (1 μ g/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (concentração final de 40 ng/mL (TPR 520). Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=9). * Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$)

Diferenças estatisticamente não significativas foram detectadas pelo teste t pareado entre os valores médios de CE_{max} (nM) de histamina em íleos isolados de cobaias (Tabela 36) antes e após o tratamento com solução de PBS ($p= 0,2708$), Figura

58. As CE_{max} (nM) de histamina em íleos isolados de cobaias tratados com 40 ng/mL de TPR apresentaram valores significativamente inferiores em relação ao controle sem tratamento ($p= 0,0069$) como mostrado na Figura 59.

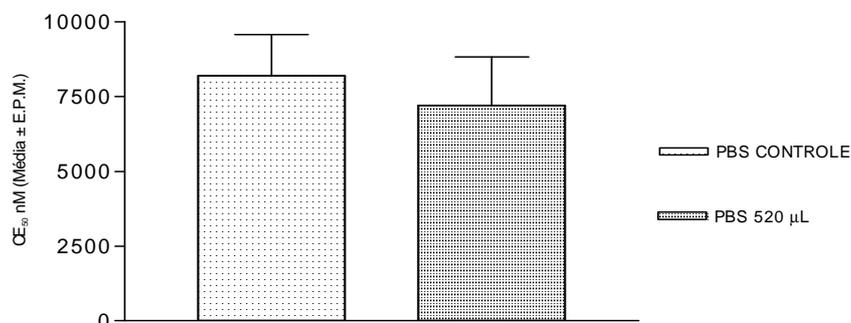


FIGURA 58. Valores médios de CE_{max} (nM), \pm E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle PBS) e incubadas *in vitro* durante 15 min com 520 μ l de PBS em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (PBS 520). Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=10)

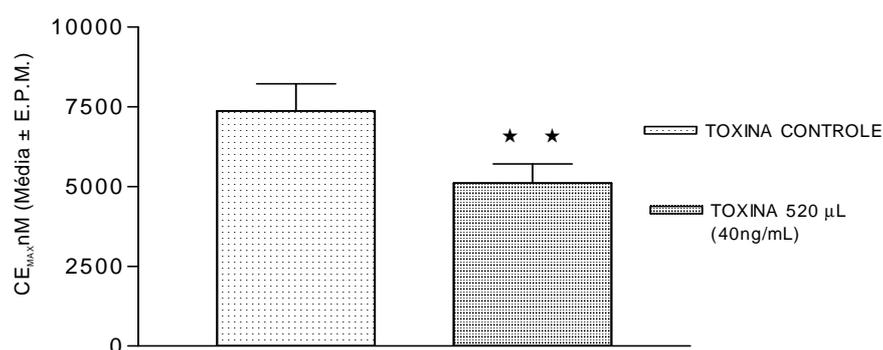


FIGURA 59. Valores médios de CE_{max} (nM), \pm E.P.M. de histamina em íleos isolados de cobaias não tratados *in vitro* (controle PBS) e incubadas *in vitro* durante 15 min com 520 μ l de TPR (1 μ g/mL) em 13 mL de solução nutritiva de Tyrode (concentração final de 40 ng/mL). Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=9). ** Significativamente diferente do controle ($p < 0,01$)

Análise da porção retilínea das curvas sigmóides constantes das Figuras 54 e 55 pelo método de regressão linear mostrou que as concentrações de 30 a 10000 nM e 10 a 10000 nM de histamina correspondem às faixas lineares, respectivamente, das curvas controle (PBS: $R= 0,9252$ e TPR: $R= 0,9615$), comparáveis às faixas lineares de 10 a 10000 nM e de 10 a 5000 nM de histamina obtidas das curvas de íleos tratados *in vitro*, respectivamente, pelo PBS: $R= 0,9289$ e TPR: $R= 0,9483$.

5. DISCUSSÃO

5.1. ESH *in vivo* em Camundongos NIH fêmeas

O ESH em camundongos NIH fêmeas empregado no controle de qualidade das vacinas pertussis e da DTP (CORBEL; XING, 2004; VAN STRAATEN DE KAPPELLE et al., 1997) mostrou-se altamente sensível à TP isolada nos dois ensaios realizados detectando níveis tão baixos quanto 20 ng de TP/dose inoculada que causaram letalidade em 50% dos animais inoculados (Tabela 1). Os camundongos NIH fêmeas mostraram-se portanto adequados ao ESH, pois de acordo com as recomendações da OMS cepas consideradas sensíveis devem mostrar valores de DSH₅₀ para TP abaixo de 50 ng/animal (WHO, 1996).

Todas as 5 amostras de vacinas DTP testadas no ESH apresentaram menor conteúdo de TP ativa do que a VPR demonstrada pelo menor número de mortes em todas as diluições testadas ou pelos maiores valores de DSH₅₀ quando comparadas à VPR (Tabela 1).

A VPR fornecida pelo NIBSC, foi estabelecida como o Terceiro Padrão Internacional para a toxicidade de vacinas pertussis de células inteiras em 1998.

A VPR apresentou em média 1789 ng de TP ativa/mL, comparável ao valor médio obtido de 1540 ng/mL obtido por ZAMITH (2003). O conteúdo de TP ativa das 5 vacinas DTP variaram de 84 a 147 ng/mL. Desta forma, todas as 5 vacinas DTP seriam aprovadas para uso humano segundo o critério acima estabelecido pelo NIBSC (1999).

Embora o ESH tenha sido conclusivo quanto à alta especificidade à TP, o elevado número de animais empregado, no mínimo 40 animais por ensaio acarretando alto custo e sofrimento aos animais são fatores limitantes que dificultam o seu uso rotineiro como ensaio de controle de qualidade da vacina DTP.

Ensaio *in vivo* têm sido desenvolvidos para avaliação da atividade residual de TP em VPA como alternativas ao ESH. No Japão tem sido empregado uma metodologia altamente sensível baseada em mudanças de temperaturas retais de camundongos por vários anos. Para reduzir o sofrimento dos animais, avaliou-se um novo método de ensaio através de determinações de temperaturas dérmicas empregando-se termômetro de infravermelho que se mostrou tão sensível quanto o método retal (OCHIAL et al., 2007).

Apesar do ESH *in vivo* ser empregado como ensaio para avaliação de segurança de VP, ensaios alternativos são necessários devido à grande variabilidade de resultados e

aspectos éticos referentes ao uso de animais. O ensaio quantitativo proposto de *binding* de TP usando glicoproteínas ou oligossacarídeos mostrou-se específico, sensível e robusto e poderia ser usado para se investigar os mecanismos de destoxificação de TP e para o monitoramento de atividade de ligação de TP em formulações de vacinas. Este ensaio poderia ser usado para complementar o teste enzimático para TP, recentemente desenvolvido pelos autores, e ambos como potenciais ensaios alternativos *in vitro* visando a substituição do ESH *in vivo* (GOMEZ et al., 2006).

A eficiência do ensaio *in vitro* do efeito *clustering* em células CHO em relação ao ESH *in vivo* foi avaliada empregando-se TP purificada tratada com diferentes concentrações de formaldeído a 37°C por 24 h. (KATAOKA et al., 2002). A TP tratada pelo formaldeído perdeu a atividade de induzir *clustering* ao nível de 0,01% a partir do tratamento brando, enquanto conservou 3,7 a 20,3 % da atividade sensibilizadora à histamina distante dos níveis das vacinas comerciais. Quando se examinou a reversão à toxicidade de TP destoxificada, pela incubação a 37°C por 3 semanas, o ensaio de *clustering* em células CHO novamente falhou na detecção da reversão de toxicidade à TP, porém mostrou uma considerável reversão à atividade sensibilizadora à histamina. Os autores sugeriram que o teste do efeito *clustering* em células CHO podia ter uma limitação de eficácia em prever a atividade *in vivo* de TP tratada pelo aldeído.

Diferentemente, ZAMITH, (2003) verificou uma alta correlação não linear ($r= 0,96$ e $0,9$) entre os valores de TP não inativada, respectivamente, em 4 vacinas DTP satisfatórias e 4 vacinas DTP insatisfatórias no ensaio de GPCC detectados em ensaios *in vitro* de efeito *clustering* em células CHO e *in vivo* no ESH

Limites necessitam ser estabelecidos para o conteúdo de toxinas específicas para VPA e de VPCI e devem ser baseados em testes específicos. Estão em avaliação pelo NIBSC, métodos mais precisos baseados na determinação da atividade ribosiltransferase *in tandem* com ensaios de *binding* ao receptor (CORBEL; XING, 2004).

5.2. Importância do Desenvolvimento de Metodologia *in vitro* para evidenciação da facilitação induzida pela TPR aos efeitos biológicos induzidos pela TP

O desenvolvimento de metodologia *in vitro* em preparações de musculatura lisa de íleo de cobaia para avaliação do fenômeno de sensibilização à histamina se enquadra perfeitamente na regra dos 3Rs (RUSSELL; BURCH, 1959), há tempos estabelecida para

harmonizar os ensaios biológicos *in vivo*. Tal princípio recomenda desde um Refinamento das metodologias, para torná-las menos lesivas aos animais de experimentação e/ou uma Redução do seu número, ou até mesmo, a sua substituição (**R**eplacement) pelos ensaios *in vitro* (FLECKNELL, 2002).

Procuramos desde o início desenvolver o nosso trabalho, focalizando esta última alternativa. Isto explica o nosso particular interesse pelas preparações *in vitro* de íleo de cobaias como alternativa para traduzir, de forma quantitativa os efeitos farmacológicos induzidos pela TP, considerada o componente de maior relevância, em termos de toxicidade, dentre as toxinas secretadas pela *B. pertussis* e presente nas vacinas DTP de células inteiras como resíduos não inativados.

No ESH, após o desafio com uma dose fixa de 1mg de histamina base por camundongo, a morte dos animais ocorre por asfixia respiratória devida à broncoconstricção acompanhada de mudança de cor cutânea devido à vasodilatação cutânea facial. As respostas de vasoconstricção são mediadas pelos receptores H₁ acoplados a fosfolipase C β , presentes na musculatura lisa dos brônquios e bronquíolos, enquanto a vasodilatação cutânea facial é mediada por receptores H₂ acoplados à adenilil ciclase. Além de atuar em receptores H₁ do músculo liso bronquiolar, a histamina atua também a nível de receptores H₁ no músculo liso do íleo e do útero provocando contração (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Os efeitos da TP e o papel do bloqueio dos receptores H₁, H₂ e H₃ sobre as ações da histamina na pressão sanguínea, frequência cardíaca e mortalidade foram estudados em ratos anestesiados (VLEEMING et al., 2000). Quatro dias após o tratamento com a TP, a histamina causou queda de pressão sanguínea arterial média (PSAM) dose-dependente e aumentou o decréscimo de PSAM. No grupo tratado com TP, mas não nos grupos tratados pela TP inativada ou pela salina, após a dose mais alta de histamina (300 mg/kg endovenosamente), três dos seis animais tratados morreram. Para determinar o tipo de receptor histaminérgico que mediava a sensibilização à histamina, 4 dias após o tratamento com TP, os antagonistas seletivos mepiramina (H₁), cimetidina (H₂) e clobenpropit (H₃) foram administrados 20 min antes do desafio com a histamina. Mepiramina inibiu completamente o aumento do decréscimo da PSAM e a mortalidade causada pela TP. Cimetidina e clobenpropit não tiveram efeitos protetores, mas propriamente aumentaram a mortalidade induzida pela histamina provocada pela TP. Demonstrou-se que a TP causou sensibilização à histamina em ratos mediada principalmente via receptores H₁ e

secundariamente vias H_2 e H_3 sendo tais resultados considerados importantes para a elucidação do (s) mecanismo (s) do ESH usado no controle de qualidade de VP.

O emprego de preparações isoladas de íleo de cobaias reconhecidamente sensíveis à histamina (PERRY, 1970) elimina a maioria dos inconvenientes assinalados, pois além de reduzir o número de animais, pois em média 5 ensaios podem ser realizados a partir de fragmentos obtidos de um único animal, o desafio à histamina, etapa que acarreta o maior sofrimento dos animais é realizado *in vitro* em banho de órgãos isolados através da elaboração de curvas concentração-efeito à histamina na faixa de 1 a 50000 nM.

Adicionalmente, os experimentos conduzidos em órgãos isolados são os mais representativos para quantificar o efeito de drogas. Nestes experimentos, o órgão é incubado com diferentes concentrações de drogas e a resposta produzida é obtida a partir de um sistema de registro. Os resultados são utilizados para a construção de curvas concentração-efeito. A análise cuidadosa destas curvas permite estabelecer várias relações matemáticas e estas originam diversos parâmetros farmacodinâmicos. A partir das curvas dose-resposta pode-se calcular CE_{50} e E_{max} (PERRY, 1970).

A CE_{50} é definida como a concentração efetiva da droga que produz 50% da resposta máxima e que expressa a potência da droga para produzir um dado efeito. Este parâmetro equivale à constante de dissociação no equilíbrio do complexo droga-receptor (K_d) e dela depende a potência da droga. Quanto menor o valor de K_d da droga, maior será sua afinidade pelo receptor. Portanto, a afinidade é o inverso de K_d (RANG; DALE; RITTER, 2001).

O parâmetro CE_{50} é usado para medir a potência de drogas que depende basicamente da afinidade droga-receptor e de variáveis farmacocinéticas. A afinidade expressa a capacidade da droga em ligar-se ao receptor. Quanto maior a afinidade da droga por seu receptor maior será a sua potência. As variáveis farmacocinéticas definem a concentração da droga na biofase e, conseqüentemente a potência da droga (RANG; DALE; RITTER, 2001).

O E_{max} , obtido com concentrações saturantes da droga é definido como o efeito máximo ou resposta máxima produzida pela droga em um dado sistema biológico que expressa a capacidade da droga em produzir uma dada resposta, ou seja, a sua atividade intrínseca (α). A magnitude da resposta biológica é pois, diretamente proporcional à percentagem dos receptores ocupados pelas moléculas da droga, sendo o efeito máximo obtido com a ocupação total ou saturação dos receptores (RANG; DALE; RITTER, 2001).

5.2.1. Efeito do tratamento *in vivo* pela TP, VPR e vacinas DTP sobre a contratilidade do íleo isolado de cobaias à histamina *in vitro*

5.2.1.1. Administração de cobaias com doses correspondentes às DSH₅₀ obtidas em camundongos NIH fêmeas

Diferenças estatisticamente significativas não foram detectadas nos ensaios de contratilidade à histamina em íleos isolados de cobaias fêmeas pré-tratadas com doses correspondentes às DSH₅₀ obtidas em camundongos fêmeas da VPR, TPR e das 5 diferentes amostras de vacinas DTP (Tabela 1) em relação ao grupo controle PBS. Nos dez ensaios realizados por grupo experimental, todos os dados seguiram uma distribuição normal e as variâncias foram homogêneas, ou seja homocedásticas (Figura 34). Os ensaios foram considerados precisos com alto grau de repetibilidade (PRADO et al., 2002), pois não foram detectadas diferenças significativas entre os 10 ensaios nos diferentes grupos experimentais. Os coeficientes de correlação não linear das curvas sigmóides concentração-resposta à histamina variaram de 0,95 a 0,99 (Tabelas 18 e 19) demonstrando a excelência de ajuste (SPIEGEL, 1979) entre as duas variáveis (logaritmo das concentrações de histamina e a % de efeito máximo).

Somente as preparações de íleo isolados de cobaias tratadas pela vacina DTP-D apresentaram valor médio de CE₅₀ (136,1 ± 24,8 nM de histamina) significativamente inferior (cerca de 4,2 vezes) aos valores médios de CE₅₀ das vacinas DTP-E (578,8 ± 120 nM), p < 0,01 e cerca de 3,1 vezes inferior ao da DTP-A (420,3 ± 63,1), p < 0,05 (Figura 35). O valor médio da CE_{max} de histamina (nM) obtido para a vacina DTP-D (1998,0 ± 445,2) também foi significativamente inferior (cerca de 3,6 vezes) aos valores médios obtidos para o PBS (7289,0 ± 2143,0), p < 0,05, cerca de 7,2 vezes inferior ao da DTP-A (14420 ± 5071), p < 0,001 e 4,6 vezes inferior ao da DTP-E (9127,0 ± 2331), p < 0,01, como mostrado na Figura 36.

A facilitação induzida à resposta contrátil à histamina em íleo de cobaia pela vacina DTP-D em relação às vacinas DTP-E e DTP-A não parece estar relacionada à TP, pois não se detectou sensibilização à histamina *in vitro* em preparações isoladas de íleo de cobaias tratadas por via intraperitoneal com 40 ng de TPR, bem como pela VPR, quando comparadas ao controle PBS (Figura 35). As diferenças encontradas entre as vacinas DTP-

D e DTP-E e DTP-A podem ser devidas aos diferentes conteúdos de endotoxina, pois, URBASCHEK, (1975), verificou que endotoxinas aumentam a atividade de histamina e serotonina e que o efeito sensibilizante à histamina não é impedido por antihistamínicos. Segundo o autor, endotoxinas e aminas biogênicas causam distúrbios semelhantes no leito capilar. A desgranulação de mastócitos pervasculares estão entre as alterações observadas.

5.2.1.2. Administração de cobaias com doses 10 vezes superiores às DSH₅₀ de TPR e VPR obtidas em camundongos NIH fêmeas

Com doses 10 vezes superiores às DSH₅₀ estabelecidas para a TPR e VPR em camundongos NIH fêmeas (Tabela 1), todos os dados também seguiram uma distribuição normal e as variâncias foram homogêneas e não houve diferenças significantes entre os 10 ensaios de contratilidade à histamina em íleos isolados de cobaias fêmeas pré-tratadas com doses de 400 ng de TPR e com 2,6 UI de VPR, bem como para o controle PBS (5 mL/cobaia) comprovando a precisão do método (PRADO et al., 2002). Os coeficientes de correlação não linear das curvas sigmóides concentração-resposta à histamina variaram de 0,96 a 0,98 (Tabela 58) demonstrando a excelência de ajuste (SPIEGEL, 1979) entre as duas variáveis (logaritmo das concentrações de histamina e a % de efeito máximo).

Porém, diferente do esperado, a CE₅₀ da TPR (688,1 ± 125,4 nM de histamina) foi cerca de 2,4 e 2,3 vezes superior aos valores médios de CE₅₀ para o controle PBS (290,7 ± 73,36 de histamina), p < 0,05 e para VPR (304,9 ± 62,64), p < 0,05, como mostrado na Figura 38. A dessensibilização do íleo, ou seja, o decréscimo na sensibilidade à ação contrátil de histamina) foi caracterizada pelo aumento no valor de CE₅₀ não acompanhado de alteração nos valores médios de CE_{max} de histamina de TP em relação ao controle PBS e à VPR (p = 0,3672) como mostrado na Figura 39.

5.2.2. Efeito do tratamento *in vitro* pelo PBS e TP sobre a contratilidade do íleo isolado de cobaia

5.2.2.1. Tratamento *in vitro* de íleo isolado de cobaia com PBS (controle) e TPR (30 ng/mL)

Não foram detectadas diferenças significativas entre os 5 ensaios realizados em íleo controle referente ao PBS (Figura 40), íleo controle da TPR (Figura 42) e entre os ensaios

individuais realizados pelo tratamento *in vitro* pelo PBS (Figura 41) e pela TPR 30 ng/mL (Figura 43). Os ensaios com tratamento *in vitro* foram considerados precisos com alto grau de repetibilidade (PRADO et al., 2002). Os coeficientes de correlação não linear das curvas sigmóides concentração-resposta à histamina variaram de 0,97 a 0,99 (Tabela 31) demonstrando a excelência de ajuste (SPIEGEL, 1979) entre as duas variáveis (logaritmo das concentrações de histamina e a % de efeito máximo).

O tratamento com PBS não alterou significativamente ($p= 0,4043$) os valores médios de CE_{50} ($537,7 \pm 193,2$ nM) de histamina (Figura 46), bem como não alterou ($p= 0,2366$) CE_{Max} ($10250,0 \pm 1823,0$ nM) de histamina (Figura 48), em relação, respectivamente, aos valores médios de CE_{50} ($518,1 \pm 144,1$ nM) e de CE_{max} ($12130,0 \pm 1713,0$ nM) de histamina obtidos para as preparações de íleo controle, ou seja, antes do tratamento pelo PBS. A ausência de efeito do controle-solvente (PBS), empregado para a solubilização da TPR sobre a contratilidade do íleo pela histamina foi também demonstrada pela superposição das curvas combinadas dos 5 ensaios antes e após tratamento pelo PBS (Figura 44),

Diferentemente, o tratamento *in vitro* pela TPR (30 ng/mL) não alterou ($p= 0,09$) os valores médios de CE_{50} de histamina ($230,4 \pm 43,5$) em relação aos valores controles de íleos sem tratamento ($402,4 \pm 79,6$ nM) como mostrado na Figura 47, porém a TPR (30 ng/mL) reduziu significativamente ($p= 0,0028$), cerca de 2,2 vezes (Figura 50), o valor médio de CE_{max} de histamina ($2803,0 \pm 312,7$ nM) em relação ao controle ($6094,0 \pm 820,0$ nM). Na Figura 46, as 2 curvas combinadas dos 5 ensaios realizados antes e após o tratamento com a TPR (30 ng/mL) apresentam perfil diferente do apresentado pelas curvas controle PBS (Figura 44).

Tratamento *in vitro* com a TPR (30 ng/mL) aumentou a afinidade da histamina pelo receptor reduzindo aproximadamente à metade, em relação à preparação-contrôle, a concentração efetiva de histamina necessária para ocupação total dos receptores em preparações isoladas de íleo de cobaias. No entanto, a redução da CE_{max} de histamina não foi acompanhada por reduções significativas nos valores médios de CE_{50} bem como nas constantes de dissociação do complexo droga-receptor, ou seja, histamina-receptor (K_d de histamina).

5.2.2.2. Tratamento *in vitro* de íleo isolado de cobaia com PBS (controle) e TPR (40 ng/mL)

Da mesma forma como no tratamento *in vitro* com PBS (390 μ L em 13 mL de Tyrode) e com TPR (30 ng/mL), não foram detectadas diferenças significativas entre os ensaios realizados em íleo controle referente ao PBS (Figura 50), íleo controle da TPR (Figura 52) e entre os ensaios individuais realizados pelo tratamento *in vitro* pelo PBS (Figura 51) e pela TPR 40 ng/mL (Figura 53).

Os ensaios com tratamento *in vitro* foram considerados precisos com alto grau de repetibilidade (PRADO et al., 2002). Os coeficientes de correlação não linear das curvas sigmóides concentração-resposta à histamina variaram de 0,96 a 0,99 (Tabela 36) demonstrando a excelência de ajuste (SPIEGEL, 1979) entre as duas variáveis (logaritmo das concentrações de histamina e a % de efeito máximo).

O tratamento com PBS também não alterou significativamente ($p= 0,1035$) os valores médios de CE_{50} ($352,5 \pm 85,9$ nM) de histamina (Figura 56), bem como não alterou ($p= 0,2708$) CE_{max} ($7201,0 \pm 1632,0$ nM) de histamina (Figura 58), em relação, respectivamente, aos valores médios de CE_{50} ($505,2 \pm 124,2$ nM) e de CE_{max} ($8192,0 \pm 1378,0$ nM) de histamina obtidos para as preparações de íleo controle, ou seja, antes do tratamento pelo PBS. Conseqüentemente, demonstrou-se a ausência de efeito do controle-solvente (PBS), empregado para a solubilização da TPR sobre a contratilidade do íleo pela histamina (Figura 54).

Diferentemente, o tratamento *in vitro* pela TPR (40 ng/mL) reduziu significativamente ($p= 0,0261$), cerca de 1,4 vezes, os valores médios de CE_{50} de histamina ($263,4 \pm 39,7$ nM) em relação aos valores de íleos controles sem tratamento ($364,4 \pm 48,4$ nM) como observado na Figura 57. Além da redução da CE_{50} de histamina, a TPR (40 ng/mL) reduziu significativamente ($p= 0,0069$), cerca de 1,4 vezes (Figura 59), o valor médio de CE_{max} de histamina ($5116,0 \pm 596,4$ nM) em relação ao controle ($7371 \pm 853,3$ nM). Na Figura 56, as 2 curvas combinadas dos 9 ensaios realizados antes e após o tratamento com a TPR (40 ng/mL).

O tratamento *in vitro* com a TPR (40 ng/mL) aumentou a afinidade da histamina pelo receptor traduzida pela redução da CE_{max} de histamina necessária para ocupação total dos receptores em preparações isoladas de íleo de cobaias. O aumento da afinidade da histamina pelo receptor foi acompanhado por uma redução da CE_{50} de histamina. O aumento da afinidade da histamina pelo receptor foi confirmado pela redução significativa

($p= 0,0479$) do valor médio da constante de dissociação do complexo droga-receptor (K_d de histamina) após o tratamento com 40 ng/mL de TPR ($274,2 \pm 43,4$) em relação ao controle não tratado ($378,7 \pm 48,3$). Os valores de K_d foram determinados a partir da análise das hipérboles obtidas ao se plotar as concentrações e efeitos em escala linear. Diferentemente, o tratamento pelo PBS não alterou ($p= 0,1158$) o valor médio de K_d ($381,5 \pm 89,2$) de histamina em relação ao controle não tratado pelo PBS ($534,6 \pm 131,6$).

Conseqüentemente demonstramos o aumento da sensibilização da preparação isolada de íleo de cobaia à histamina após o tratamento *in vitro* com 30 e 40 ng/mL de TPR.

6. CONCLUSÃO

Com base nos nossos resultados e do seu confronto com os dados da literatura podemos concluir que:

1. O ESH em camundongos NIH fêmeas foi altamente sensível à TPR (NIBSC 90/518), detectando níveis tão baixos quanto 20 ng de TP/dose administrada por via intraperitoneal.
2. Os camundongos NIH fêmeas apresentaram sensibilidade adequada no ESH por apresentarem valores de DSH_{50} para TP abaixo de 50 ng, de acordo com as recomendações da OMS.
3. As 5 diferentes amostras de vacinas DTP testadas no ESH foram aprovadas para uso humano por apresentarem níveis de TP ativa que variaram de 84 a 147 ng/mL, cerca de 12 a 21 vezes inferiores ao valor limite determinado de 1789 ng/mL para a VPR (NIBSC 66/303) empregada como preparação padrão para avaliação da toxicidade.
4. Não detectamos aumento da resposta contrátil à histamina em preparações de íleo isolados de cobaias 4 dias após o tratamento intraperitoneal com 40 ng de TPR e com as diluições correspondentes às DSH_{50} obtidas nos ESH de VPR e de 5 diferentes amostras de vacinas DTP em relação ao controle PBS.
5. A facilitação induzida à resposta contrátil à histamina em íleo de cobaias pela vacina DTP-D (traduzida por redução significativa da CE_{50} e CE_{max} de histamina) em relação às vacinas DTP-E ($p < 0,01$) e DTP-A ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) parecem não ser atribuídas à TP, mas a outros constituintes presentes nas vacinas como endotoxinas reportadas na literatura com efeito sensibilizante à histamina. O aumento da afinidade de histamina pelo receptor causado pela DTP-D foi acompanhado por uma redução altamente significativa ($p < 0,01$) e significativa ($p < 0,05$) da constante de dissociação do complexo droga-receptor (K_d de histamina), respectivamente, em relação às vacinas DTP-E e DTP-A.

6. Decréscimo da sensibilidade à ação contrátil de histamina em íleos isolados de cobaias, 4 dias após o tratamento intraperitoneal, com 400 ng de TPR (10x superior à DSH_{50} de TPR) foi traduzido pelo aumento significativo no valor de CE_{50} de histamina e de K_d em relação ao controle PBS e à VPR ($p < 0,05$) não acompanhado de alteração nos valores médios de CE_{Max} ($p = 0,3672$).
7. Tratamento *in vitro* de íleo de cobaia com 30 ng/mL de TPR durante 15 min aumentou significativamente a afinidade de histamina pelo receptor em relação à preparação controle ($p = 0,0028$) reduzindo aproximadamente à metade, a concentração efetiva de histamina necessária para ocupação total dos receptores (CE_{max}). A redução da CE_{max} não foi acompanhada por reduções significativas nos valores médios de CE_{50} de histamina ($p = 0,09$), bem como ($p = 0,0930$) nos valores de K_d de histamina.
8. Tratamento *in vitro* de íleo de cobaia com 40 ng/mL de TPR durante 15 min aumentou significativamente a afinidade de histamina pelo receptor em relação à preparação controle ($p = 0,0069$), traduzida pela redução da CE_{max} de histamina. O aumento da afinidade da histamina pelo receptor foi acompanhado por uma redução da CE_{50} de histamina em relação ao controle ($p = 0,0261$), confirmado pela redução ($p = 0,0479$) de K_d de histamina.
9. O tratamento *in vitro* de íleo com PBS (390 e 590 μ L em 13 mL de Tyrode), respectivamente, não alterou significativamente os valores de CE_{50} ($p = 0,4043$ e $p = 0,1035$), de CE_{max} ($p = 0,2366$ e $p = 0,2708$) e de K_d ($p = 0,4564$ e $p = 0,1158$) de histamina em relação à preparação controle, demonstrando-se ausência de efeito do controle solvente (PBS) sobre a contratilidade de íleo pela histamina.
10. Concluindo, demonstramos o aumento da sensibilização da preparação isolada de íleo de cobaias fêmeas à histamina após o tratamento *in vitro* com 30 e 40 ng/mL de TPR.

7. PERSPECTIVAS

Em função dos resultados obtidos daremos continuidade a este trabalho desenvolvendo os pontos a seguir:

1. realizar com as vacinas DTP (A a E) a administração em cobaias das doses 10 vezes superiores às DSH_{50} obtidas em camundongos NIH fêmeas, com a finalidade de comparação com os resultados obtidos na resposta contrátil à histamina em preparações de íleo isolados de cobaias administradas com o PBS, a TPR e a VPR.
2. realizar com as amostras de vacinas DTP o ensaio de endotoxina, pois segundo nossos resultados principalmente com a vacina DTP- D, a facilitação induzida à resposta contrátil à histamina em íleo de cobaias parecem não ser atribuídas à TP, mas a outros constituintes presentes nas vacinas como endotoxinas reportadas na literatura com efeito sensibilizante à histamina.
3. realizar ensaios com preparações isoladas em íleos de cobaias 4 dias após o tratamento por via intraperitoneal com doses 2,5 e 5X superiores às DSH_{50} obtidas em camundongos NIH fêmeas (TPR 100 e 200 ng), com o objetivo de esclarecer a dessensibilização, ou decréscimo da sensibilidade verificada com a administração de 400 ng de TPR.
4. realizar ensaios de tratamento *in vitro* de íleo de cobaia com 40 ng/mL de TPR por períodos de incubação de 30 e 60 min com a finalidade de verificar um possível aumento da sensibilização à histamina após o tratamento *in vitro* com tempos maiores de incubação.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, H.R. Histamina e anti-histaminicos; Serotonina e Anti-serotonínicos. Farmacologia e terapêutica em veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Googan, 1992. cap. 21, p. 349 – 357, 1992.
- ANDERSON, E.L.; Belshe, R. B.; Bartram, J. Differences in reactogenicity and antigenicity of acellular and standard pertussis vaccines. Association of Biologicals Manufacturers of Japan, 1988.
- BACHERT, C. The role of histamine in allergic disease: re-appraisal of its inflammatory potential. *Allergy*, v.57, p. 287-296, 2002.
- BAKKER, R.A., Timmerman, H., Leurs, R. Histamine receptors: specific ligands, receptor biochemistry and signal transduction. *Clin. Allergy Immunol.*, v.17, p. 27-64 , 2002.
- BLENNOW, M.; Olin, P.; Granstrom, ; Bernier, R. Protective efficacy of a whole cell pertussis vaccine. *Br. Med. J.*, 296:1570-3, 1988.
- BLISS. J.C., The determination of the dosage-mortality curve from small numbers. *Quart. J. Pharm. Pharmacol.*, 11, p.192-215, 1938.
- BONAMIM, L.V.; Abel, M.N.C. Histamina, serotonina e seus antagonistas. Farmacologia aplicada a medicina veterinária. 3. ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, cap. 18, p. 193 – 202, 2002.
- BOYER, J.L.; Cardenas, C.; Garcia-Sainz, J.A. *Life Scs.*, 33, 2627, 1983
- BURNS, D. L. ; Kenimer, J. G. & Manclark, C. R. Role of the A subunit of pertussis toxin in alteration of chinese hamster ovary cell morphology. *Infection and Immunity*, 55(1): 24-28, 1992.

CHERRY, J. D. ;Brunell, P. A. ; Golden, G. S.; Karzon, D. T. Report of the Task force on Pertussis and Pertussis Immunization. *Pediatrics* 81:939-984, 1988.

CHERRY, J. D. Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J. Infect. Dis*, 174 (Suppl. 3): S259 – S263, 1996.

CLARCKSON, J. A. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev. Infect. Dis.*, 9:866-83, 1987.

CODY, D. L.; Baraff, L.J.; Cherry J.D. et al. Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DTP immunizations in infants and children. *Pediatrics*; 68:650-60, 1981.

CORBEL, M.J.; Xing, D.K. Toxicity and potency evaluation of pertussis vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*, 3(1): 89-101, 2004.

DALE, H.H.; Laidlaw P. , The Physiological function of beta-iminoazolytethylamine. *J. Phisiol*, 41: 318, 1910.

FLECKNELL, P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX* : Alternativenzu Tierexperimenten, Jan 2002.

GALAZKA, A. Pertussis mortality: methods for estimation of deaths due to pertussis. (Document WHO/EPI/RD/91/Wp5 Oct). EPI Research and Development Group Meeting. Geneva. Switzerland: World Health Organization, 1991.

GALLI, S.J. New concepts about the mast cell. *N. Engl. J. Med.*, 328: 257 - 265, 1993.

GANTNER, F., Sakai, K., Tusche, M.W., Cruikshank, W.W., Center, D.M., Bacon, K.B. Histamine H4 and H2 receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8 + T cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 303, p. 300-307, 2002.

GOLDAN, W.E.; Klaper, D.G.; Baseman, J.B. Detection, isolation, and analysis of a released *Bordetella pertussis* product toxic to cultured tracheal cells. *Infect. Immun.*; 782-794, 1982.

GOMEZ, S.R.; Xing, D.K.; Corbel, M.J.; Coote, J.; Parton, R.; Yuen, C.T. Development of a carbohydrate binding assay for the B-oligomer of pertussis toxin and toxoid. *Anal. Biochem.*, 356(2): 244-253, 2006.

GRAPH PAD INSTAT, **GraphPad Software**, Canada, USA, 2003

HOLGATE, S.T. Experimental models in asthma. *Clin. Exp. Allergy.*, v. 29, Suppl. 3, p. 82-86, 1999.

HOUGH, L.B. Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors. *Mol Pharmacol.*, v. 59, p. 415-419, 2001.

HOWARTH, P. H. Histamine and asthma: an appraisal based on specific H₁ receptor antagonism. *Clin. Exp. Allergy.*, v. 20S, p. 31-41, 1990.

INSTITUTO Nacional De Controle De Qualidade Em Saúde. Boas Práticas em Experimentação Animal. Rev. 4. IN MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2000. Seção 4.3. (65.3340.002).

INSTITUTO Nacional De Controle De Qualidade Em Saúde. Identificação de caixas e gaiolas. Rev. 3. IN MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2000. Seção 10. (65.3340.004).

INSTITUTO Nacional De Controle De Qualidade Em Saúde. Marcação Padrão de Animais de Laboratório. Rev. 4. IN MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2005. Seção 10. (65.3300.002).

INSTITUTO Nacional De Controle De Qualidade Em Saúde. Capela de sacrifício de animais. Rev. 3. IN MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2005. (65.3340.013).

INSTITUTO Nacional De Controle De Qualidade Em Saúde. Cilindro de Carbogênio. IN MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2005. (65.3300.026).

INSTITUTO Nacional De Controle De Qualidade Em Saúde. Polígrafo Gemini 7070 – Pré – Amp. 7082 com transdutores isométricos 7003, 7004, 7005 7010, ou Isotônicos 7006. IN MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2005. (65.3330.011).

INSTITUTO Nacional De Controle De Qualidade Em Saúde. Determinação do Peso Corporal de Animais de Laboratório (Roedores). Rev. 3. IN MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2005. Seção 10. (65.3300.005).

ISHIDA, S.; Kurokawa, M. & Asakawa, S. A new biological assay method for histamine-sensitizing factor using survival time as a response. Japan. J. Méd. Sci. Biol., 29: 139-150, 1976.

IZZO, A.A. The role of histamine H1, H2 and H3 receptors on enteric ascending synapse transmission in the guinea pig ileum. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 287, n.3, p. 952 – 957, 1998.

KASLOW, H. R.; Burns, D. L. Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry and activation. FASEB J.; 6:2684-90, 1992.

KATAOKA, M.; Toyozumi, H.; Yamamoto, A; Ochiai, M.; Horiuchi, Y. Chinese hamster ovary (CHO) cell clustering does not correlate with *in vivo* histamine-sensitization when measuring residual activity of aldehyde-treated pertussis toxin (PT). **Biologicals**, 30(4): 297-302, 2002.

KNIGHT, D.A., Stewart, G.A., Thompson, P.J. Histamine tachyphylaxis in human airway smooth muscle. The role of H2 receptors and the bronchial epithelium. Am. Rev. Respir. Dis., v. 146, p. 137-140, 1992.

LEININGER, E. Roberts,; M. Kenimer, J.G. et al. Pertactin, an Arg-Gly-Asp containing Bordetella pertus sis surface protein that promotes adherence of mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.; 88:345-49, 1996.

MARSMAN, F.R., Rijksinstituut Voor Volksgezondheid En Milieuhygiene (Holanda), Bilthoven, 1991.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL. The prevention of whooping cough by vaccination. *Br. Med J.*: 1:1463-71, 1951.

MORSE, K.L., Behan, J., Laz, T. M., West Jr, R.E., Greenfeder, S.A., Anthes, J.C., Umland, S., Wan, Y., Hipkin, R.W., Gonsiorek, W., Shin. N., Gustafson, E.L., Qiao, X., Wang, S., Hedrick, Jr., Geene, J., Bayne, M., Monsma Jr, F.J. Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 296, p. 1058-1066, 2001.

MU, H. H.; Sewell, W. A. , Enhancement of interleukin-4 production by pertussis toxin. *Infect. Immun.* 61(7): 2834-2840, 1993, 2003.

MUNOZ, J.J.; Bergman, R.K.. In "Immunology Series". (N. Rose, Ed.), vol 4, p.1. Marcel Dekker, Inc., New York, 1977.

MUNOZ, J.J.; Robbins, K.E.; Cole, R.L. *J. Reticuloendothelial. Soc.*, 27, 259, 1980.

MUNOZ, J. J. , Arai, H., Bergman, R. K., Sadowski, P.L. , Biological activities of crystalline pertussigen from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, set, 1981.

MUNOZ, J. J. , Arai, H., Bergman, R. K., Sadowski, P.L. , Biological activities of crystalline pertussigen from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, mar, 2004.

NATIONAL Institute For Standards And Control. Histamine Sensitization Assay Standard Operating Procedures, Hertfordshire, United Kingdom, 1999.

OCHIAL, M.; Yamamoto, A.; Kataoka, M.; Toyozumi, H; Arakawa, Y; Horiuchi, Y. Highly sensitive histamine-sensitization test for residual activity of pertussis toxin in acellular pertussis vaccine. **Biologicals**, 35(4): 259-264, 2007.

PANULA, P.; Alraksinem, M.S.; Pirvola, U. Kotllainem, E.A. A. Histamine-containing neuronal system in human brain. *Neuroscienc*, 34: 127-132, 1990.

PARFENTJEV, I.; Goodline, M.A. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 92, 411, 1948.

PERRY, W.L.M. *Pharmacological experiments on isolated preparations*. 2.edition. Edinburgh London and New York, Churchill Livingstone, pp.1-161, 1970.

PRADO, M.S.A.; Steppe, M.; Kedor-Hackmann, E.R.M; Santoro, M.I.R.M. Métodos estatísticos empregados para comparação de métodos analíticos. *Rev. Bras. Farm.*, 83(1/4): 69-76, 2002.

RANG, H.P; Dale, M.M.; Ritter, J.M. *Farmacologia*. 4.ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., pp.1-703 - 2001.

RANGANATHAN, S.; Tasker, R.; Booy, R.; Habibi, P.; Nadel, S. & Britto, J. Pertussis is increasing in unimmunized infants: is a change in policy needed. *Arch. Dis. Child.*, 80: 297-299, 1999.

RUSSEL, W.M.S.; Burch, R.L. *The principles of human experimental technique*. London, Methuen & Co, 1959.

SHAHIN, R. D.; Brennan, M.J.; Li, Z.M.; Meade, B.D.; Manclarck, C.R. Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69-kDa outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med.*; 171:63-73, 1990.

SPIEGEL, M.R. *Estatística*. Editora McGraw-Hill do Brasil Ltda. 1979. pp.1-580.

STORSAETER, J.; Hallander, H.; Farrington, C.P.; Olin, P.; Mollby, R.; Miller, E. Secondary analysis of the efficacy of two acellular pertussis vaccines evaluated in a Swedish phase III trial. *Vaccines*; 8:457-61, 1990.

TAMAOKI, J., Nakata, J., Takeyama, K., Chiyotani, A, Konno, K. Histamine H₂ receptor-mediated airway goblet secretion and its modulation by histamine-degrading enzymes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 99, p. 233-238, 1997.

VAN STRAATEN – VAN DE KAPPELLE, I. ; Van Der Gun, J. W.; Marsman, F.R.; Hendriksen & Van De Donk, H.J.M. Collaborative study on test systems to assess toxicity of whole cell pertussis vaccine. **Biologicals**, 25: 41-57, 1997.

VLEEMING, W; Hendriksen, C.F.M.; Van De Kuil, A; Van De Hout, J.W.E; De Wildt, D.J. Mepyramine but not cimetidine or clobenpropit blocks pertussis toxin-induced histamine sensitization in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 129(8): 1801-1807, 2000.

URBASCHEK, B. Pathophysiological significance of endotoxins. *Fortschr. Med.*, 93 (22-23): 1067-1071, 1975.

URISU, A.; Cowell, J.L.; Manclarck, C.R. Filamentous hemagglutinin has a major role in mediating adherence to human WiDr cells. *Infect. Immun.*; 52:695-701, 1986.

WEISS, A.A. & Hewlett, E. L. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annu. Ver. Microbiol.* 40: 661, 1986.

WHITE, M.V. The role of histamine in allergic diseases. *J Allergy. Clin. Immunol.*, v. 86, p. 599-605, 1990.

WILT, D.J., Kreeftenberg, H.C.; Nijkamp, F. P. *Infect. Immun.*, 41: 476, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on Biological Standardization: Requirements for diphtheria, pertussis, tetanus and combined vaccines. **Technical Report Series**. n. 800, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on Biological Standardization: Requirements for Acellular Pertussis Vaccines. **Technical Report Series**. n.5, 1996.

ZAMITH, H.P.S. Contribuição ao Estudo do Mecanismo da Citotoxicidade *In Vitro* Induzida pela Toxina Pertussis e suas Implicações no Controle de Qualidade da Vacina Tríplice-DTP.. Rio de Janeiro: IOC, 2003. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

ZHANG, J. M.; Cowell, J.L.; Steven, A.C. et al. Purification and characterization of fimbriae isolated from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*; 48:422-7, 1985.

ANEXO

1. SOLUÇÃO NUTRITIVA DE TYRODE 20X CONCENTRADA

Solução A

8,0 g de cloreto de sódio (Vetec) + 0,2 g de cloreto de potássio (Verc) + 0,2 g de cloreto de cálcio (Merck) + 0,1 g de cloreto de magnésio (Reagen)

Diluyente: Água desionizada 1000 mL

Solução B

1,0 g de carbonato de sódio (Merck) + 0,05 g fosfato monobásico de sódio (Merck)

Diluyente: água desionizada 1000 mL

No momento da realização dos experimentos preparamos a solução nutritiva de Tyrode 1X concentrada final, com 50 mL da solução A + 50 mL da solução B + 900 mL de água desionizada + glicose (Merck) 1,0 g.

2. SOLUÇÃO TAMPÃO SALINA FOSFATO SEM CÁLCIO E MAGNÉSIO (PBS)

Cloreto de sódio	(PM 58,44)	8,0 g
Cloreto de potássio	(PM 74,55)	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico	(PM 141,96)	1,2 g
Fosfato de potássio monobásico	(PM 136,09)	0,2 g
Água desionizada		1,0 L

dissolução com agitação magnética;

ajuste ao pH 7,4 com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N;

esterilização por autoclavação durante 30 min.

3. SOLUÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO 0,9%

Cloreto de sódio 0,9 g

Água destilada q.s.p. 100mL

Esterilização por autoclavação 15 minutos a 121° C

4. SOLUÇÃO DE HISTAMINA (2mg de histamina base/mL)

Difosfato de histamina (DFH) (PM 307,1) com 111.1 mg de histamina base

DFH – 0,552g

Cloreto de sódio 0,9% qsp – 100mL

Uso: Administração de 0,5 mL/camundongo

5. PREPARO DAS DILUIÇÕES DAS VACINAS VPR e DTP (A a E) e da TPR

Vacinas DTP (A ,B, C, D e E)

Vacina A: (1/1.84) 1 mL da vacina DTP + 0,84 mL de PBS

Vacina B: (1/1.82) 1 mL da vacina DTP + 0,82 mL de PBS

Vacina C: (1/1.73) 1 mL da vacina DTP + 0,73 mL de PBS

Vacina D: (1/1.05) 1 mL da vacina DTP + 0,05 mL de PBS

Vacina E: (1/1.22) 1 mL da vacina DTP + 0,22 mL de PBS

VPR (1/22.36)

1 mL da reconstituição da vacina contendo 11,5 UI/mL + 21,36 mL de PBS

Dose com 0,5 mL = 0,26 UI/cobaia - dose com 5 mL = 2,6 UI/cobaia

TPR (1/25)

1 mL da suspensão contendo 2 µg/mL + 24 mL de PBS

Dose com 0,5 mL = 40 ng/cobaia - dose com 5 mL = 400 ng/cobaia

6. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE DIFOSFATO DE HISTAMINA (DFH, PM 307,1)

- Preparo da solução estoque (SE) 10^{-1} M
- 153,55 mg de DFH em 5 mL de Na Cl 0,9 %
- Preparo das soluções teste (ST) de 10^{-2} a 10^{-6} M
- ST 10^{-2} M: 200 µL da SE + 1800 µL de Na Cl 0,9 %
- ST 10^{-3} M: 200 µL da SE 10^{-2} M + 1800 µL de Na Cl 0,9 %
- ST 10^{-4} M: 200 µL da SE 10^{-3} M + 1800 µL de Na Cl 0,9 %
- ST 10^{-5} M: 200 µL da SE 10^{-4} M + 1800 µL de Na Cl 0,9 %
- ST 10^{-6} M: 200 µL da SE 10^{-5} M + 1800 µL de Na Cl 0,9 %